应用简报

食品检测

Agilent

Trusted Answers

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化和 LC/MS/MS 分析牛肉中的多类别兽药多残留

作者

Limian Zhao 和 Derick Lucas

安捷伦科技公司

摘要

Agilent Captiva 增强型脂质去除 (EMR-Lipid) 过滤柱是第二代 Agilent EMR-Lipid 产品，采用固相萃取 (SPE) 形式，用于在不影响分析物回收率的情况下实现高选择性脂质去除。SPE 过滤柱提供了简便的直通式净化工作流程，只需极少的方法开发。萃取管经过优化，可在大体积样品净化过程中重力自洗脱，免除了控制真空或压力的麻烦。为促进脂类捕获并提高疏水性化合物的回收率，需要在 Captiva EMR-Lipid 吸附剂中加入 20% 水以活化 EMR 净化吸附剂。本研究展示了 Captiva EMR-Lipid 在分析牛肉中 39 种代表性多类别兽药中的应用。采用两步样品萃取，使亲水性和疏水性化合物均获得满意的回收率。然后将萃取液混合并加载到 Captiva EMR-Lipid 过滤柱上进行净化。评估了该方法的基质效应、分析物回收率和方法重现性。与其他过滤柱直通式净化产品相比，Captiva EMR-Lipid 过滤柱提供了更高效的基质净化和更出色的疏水性分析物回收率。

前言

兽药广泛用于动物食品中以预防动物疾病或作为生长促进剂。这些药物可能在动物组织中发生富集，使用不当会导致药物残留于食用组织中，对人类健康构成威胁。随着公众对食品安全的日益关注，大多数国家/地区都会对动物食品生产中使用的兽药进行监管[1,2]。动物食品（如肌肉、肝脏和蛋类）属于复杂基质；因此有必要在仪器分析之前使用高效前处理方法进行样品萃取、净化和浓缩。已有的样品前处理方法包括传统的溶剂萃取、固相萃取 (SPE) 或几项技术的组合。这些方法通常费力费时，仅适用于有限的化合物类别，并且需要进行方法开发。

多类别多残留方法在监管性监测项目中越来越受青睐，因为它们可以扩大分析范围并提高实验室效率。过去几年，文献中已经报道了对 100 多种兽药的分析[3-5]。样品前处理通常涉及采用乙腈 (ACN)/水混合物进行预萃取，然后采用 C18 净化或其他净化技术的组合。然而，现有净化技术存在脂质去除效率低下和分析物意外损失等局限性。ACN/水混合物直接萃取可能影响萃取步骤中的蛋白质去除效率和疏水性分析物的可萃取性。

安捷伦增强型脂质去除 (EMR-Lipid) dSPE 净化产品自 2015 年推出以来备受关注。EMR-Lipid 吸附剂通过体积排阻和疏水相互作用的组合机制，与脂类化合物的非支化烃链发生特异性相互作用。这种组合机制提供了高选择性脂质去除，且对目标分析物没有不良影响。该技术已被用于复杂基质中的多类别多残留农药分析，可提供卓越的基质净化和最佳结果[6,7]。第二代产品 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱减少了吸附剂活化所需的水分比例，且随后无需 Polish 净化盐析萃取步骤。这样简化了工作流程并改善了疏水性化合物在净化过程中的溶解度。

本研究考察了 Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化在分析牛肉中 39 种棘手的代表性兽药的样品前处理过程中的应用。所选择的代表性兽药涉及 17 种不同类别，包括亲水性和疏水性药物，酸性、中性和碱性药物，以及一些最难分析的类别，如四环素和 β-内酰胺。表 1 列出了药物类别、法规信息、保留时间以及用于分析这些兽药的 MS/MS 条件。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。乙腈 (ACN) 购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)。二甲基亚砜 (DMSO) 和脱水乙二胺四乙酸二钠盐 (NaEDTA) 购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。试剂级甲酸 (FA) 购自安捷伦公司（部件号 G2453-86060）。兽药标准品和内标购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。

溶液与标样

用 DMSO 配制 2.0 mg/mL 的标样和内标 (IS) 储备液，以下储备液除外：

- 用 DMSO 配制 1.0 mg/mL 的达氟沙星储备液
- 用 DMSO 配制 0.25 mg/mL 的环丙沙星储备液

用水配制所有 β-内酰胺药物和头孢唑啉储备液，浓度为 2.0 mg/mL。除 β-内酰胺药物、头孢唑啉和四环素药物储备液在聚丙烯塑料管中配制以外，所有其他储备液均在棕色玻璃样品瓶中配制。所有溶液均保存于 -20 °C 下。根据其仪器响应不同，将 39 种化合物分为两组：第 1 组 (G1) 和第 2 组 (G2)。在 1:1 ACN/水中配制两种混合标准工作溶液，浓度分别为 25/5 µg/mL 和 5/1 µg/mL (G1/G2)。在 1:1 ACN/水中配制 25 µg/mL 氟尼辛-d3 IS 工作溶液。

将 2 mL 甲酸和 2 mL DMSO 加入 100 mL 经预冷却的 ACN，每天新鲜配制冷萃取溶剂。将 1.8612 g NaEDTA 粉末溶于 50 mL Milli-Q 水中，制得 0.1 M NaEDTA 溶液。溶液在室温下保存。混合 80 mL ACN 与 20 mL Milli-Q 水，制得 80:20 ACN/水。

表 1. 分析所选的兽药列表；药物类别、美国容许量、保留时间和 MRM 条件

分析物	药物类别	美国容许量 (µg/g)	保留时间 (min)	极性	母离子 (*m/z*)	子离子			
						定量离子	CE (V)	定性离子	CE (V)
2-硫脲嘧啶	硫氧嘧啶类	–	1.41	负	127	57.9	17	–	–
阿莫西林	β-内酰胺类	0.01	1.94	正	366.1	349.2	5	114	25
羟基甲硝唑	硝基咪唑类	[d]	2.21	正	188.1	123.1	9	126.1	13
林可霉素	林可胺类	0.1[c]	3.80	正	407.2	126.1	37	70.1	80
左旋咪唑	抗蠕虫药	0.1[f]	3.90	正	205.1	178.1	21	91.1	41
二甲胺四环素	四环素		4.14	正	458.2	440.9	17	282.9	49
氨苄青霉素	β-内酰胺类	0.01	4.15	正	350.1	106	33	79.1	61
诺氟沙星	氟喹诺酮类	[d]	4.36	正	320.1	276.1	17	302.2	21
土霉素	四环素类	2[e]	4.42	正	461.2	426.1	17	443.2	9
环丙沙星	氟喹诺酮类	[d]	4.43	正	332.1	231	45	314.3	21
四环素	四环素类	2e	5.37	正	445.2	409.9	17	153.9	33
达氟沙星	氟喹诺酮类	0.2[b,f]	4.53	正	358.2	340.2	21	81.9	53
莱克多巴胺	β-激动剂	0.03[f]	4.55	正	302.2	107	33	77	77
头孢唑啉	头孢菌素类	–	4.78	正	455	323.1	9	156	13
磺胺甲二唑	磺胺类	–	4.88	正	271	156.1	13	92	29
磺胺甲氧哒嗪	磺胺类	–	4.91	正	281.1	92	33	65.1	57
去甲金霉素	四环素类	–	4.94	正	465.1	429.9	21	448.0	13
二氟沙星	β-内酰胺类	–	4.97	正	400.2	356.3	17	382.0	25
甲噻嘧啶	抗蠕虫药	–	5.08	正	221.1	123.1	37	76.9	80
加米霉素	大环内酯类	0.15	5.22	正	777.6	157.9	41	83.1	65
金霉素	四环素类	2[e]	5.24	正	479.1	444.2	21	462.1	17
多西环素	四环素类	–	5.36	正	445.2	428.1	17	410.2	25
氟甲砜霉素	苯丙醇类	0.2[c]	5.69	负	356.0	336.0	5	185.1	13
氯霉素	苯丙醇类	[d]	5.86	负	321	152	17	257.1	9
泰乐菌素	大环内酯类	0.2[g]	5.94	正	916.5	173.9	45	772.5	33
泼尼松	皮质类固醇	–	6.02	正	359.2	147.2	33	341.2	9
克洛索隆	杀吸虫剂	0.1[f]	6.09	负	377.9	341.9	9	–	–
乙酰丙嗪	镇静剂	–	6.09	正	327.2	86	21	58	45
氯丙嗪	镇静剂	–	6.69	正	319.1	86	21	58.1	45
青霉素 V	β-内酰胺类	0.05[a]	6.70	正	351.6	160.1	9	113.9	45
苯唑西林	β-内酰胺类	–	6.93	正	402.1	160.0	17	242.9	9
芬苯达唑	抗蠕虫药	–	6.98	正	300.1	268.1	25	159.1	41
氯唑西林	β-内酰胺类	0.01[a]	7.20	正	436.1	159.9	9	276.8	13
萘夫西林	β-内酰胺类	–	7.35	正	415.1	199.0	13	171.0	41
酮洛芬	镇静剂	–	7.44	正	255.1	208.9	13	77	57
羟布宗	非甾体抗炎药 (NSAID)	–	7.47	负	323.1	295	17	133.9	25
氟尼辛-d3（负）	–	–	7.81	负	298.1	254.2	17	192	37
氟尼辛-d3（正）			7.81	正	300.1	282	25	264	41
醋酸美伦孕酮	其他	0.025[h]	9.05	正	397.2	279.2	21	337.4	13
氯硝柳胺	杀吸虫剂	–	9.07	负	325	170.9	25	289.1	13
硫氯酚	杀吸虫剂	–	9.07	负	352.9	161	21	191.8	25

[a] 生牛食用组织中的容许量
[b] 牛肝中的容许量
[c] 猪肌肉中的容许量
[d] 禁止超出标签用法
[e] 容许量是指肌肉中包括金霉素、土霉素和四环素在内的四环素类残留之和
[f] 牛肌肉中的容许量
[g] 生牛脂肪、肌肉、肝脏和肾脏中的容许量
[h] 牛脂肪中的容许量

仪器与材料

采用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统进行分离，该系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

该 UHPLC 系统与配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent G6490 三重四极杆液质联用系统联用。采用 Agilent MassHunter 工作站软件进行数据采集和分析。

用于样品前处理的其他仪器：

- 2010 Geno/Grinder (Metuchen, NJ, USA)
- Centra CL3R 离心机 (Thermo IEC, MA, USA)
- Multi Reax 试管振荡器 (Heidolph, Schwabach, Germany)
- Eppendorf 移液器和连续分液器
- Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱，6 mL，600 mg（部件号 5190-1004）；3 mL，300 mg（部件号 5190-1003）
- Agilent Vac Elut SPS 24 多管装置（部件号 12234004），配备可容纳 16 个 100 mm 试管的收集架

仪器条件

图 1 显示了 A) 牛肉萃取液基质空白和 B) 添加 5/1 ng/g (G1/G2) 兽药标样（定量限浓度）的牛肉萃取液的典型色谱图。

样品前处理

图 2 显示了用于制备牛肉样品的最终样品前处理过程。对于牛肉样品的优化萃取和净化方法，需要强调以下几点：

- 采用购自当地杂货店的牛肉进行方法开发和验证研究。样品经均质化并在 −20 °C 下保存
- 将标样和 IS 预加标至均质化牛肉样品后，样品在室温下静置 20 分钟。这使加标标样渗入样品基质中，并在样品萃取之前达到平衡
- 在样品萃取中需要使用水以实现与牛肉的均匀混合，并确保极性药物化合物的回收率和稳定性。采用 20:80 水/ACN 混合物的一步萃取法大大降低了疏水性化合物的溶剂可萃取性和蛋白质去除效率。因此，采用两步萃取方案：首先使用 2 mL 水溶液进行萃取，然后使用 8 mL 溶剂进行萃取

HPLC 条件

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18，150 × 2.1 mm, 2.7 µm（部件号 693775-902） Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 UHPLC 保护柱，5 × 2.1 mm, 2.7 µm（部件号 821725-911）
流速	0.3 mL/min
柱温	40 °C
自动进样器温度	4 °C
进样量	3 µL
流动相	A) 0.1% 甲酸的水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液
进样针清洗	1:1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H_2O（含 0.2% FA）
梯度	时间 (min) %B 流速 (mL/min) 0 10 0.3 0.5 10 0.3 8.0 100 0.3
停止时间	12 分钟
后运行时间	3 分钟

质谱条件

参数	值
正/负离子模式	
干燥气温度	120 °C
干燥气流速	14 L/min
雾化器	40 psi
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3000 V
iFunnel 参数	正 负 高压 RF 90 V 90 V 低压 RF 70 V 60 V

- 为防止由螯合引起的四环素化合物的损失，使用 0.1 M EDTA 缓冲液进行水溶液萃取
- 为改善棘手的药物化合物（如四环素、β-内酰胺和氟喹诺酮）的溶剂可萃取性，将 2% 甲酸和 2% DMSO 加入萃取溶剂 ACN 中
- 为改善与固体残留物的相分离（尤其是在第一步水溶液萃取中），需要使用低温离心 (4 °C)
- 为确保分析物从过滤柱上完全洗脱，在进行 EMR-Lipid 过滤柱净化后进行二次洗脱

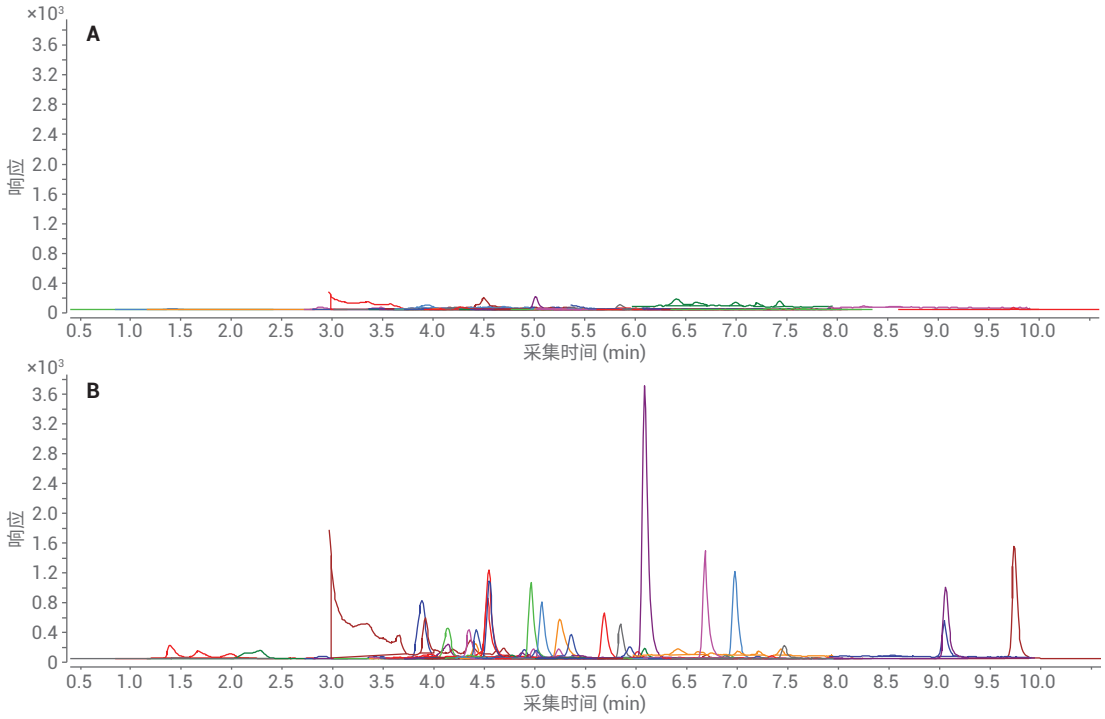

图 1. A) 牛肉萃取液基质空白和 B) 添加 5/1 ng/g (G1/G2) 兽药标样的牛肉萃取液的 LC/MS/MS 色谱图。第 1 组 (G1) 分析物对应的加标浓度为 5 ng/g，第 2 组 (G2) 化合物对应的加标浓度为 1 ng/g。请参见表 1 了解分析物鉴定结果和洗脱顺序，并参见表 2 了解化合物组鉴定结果

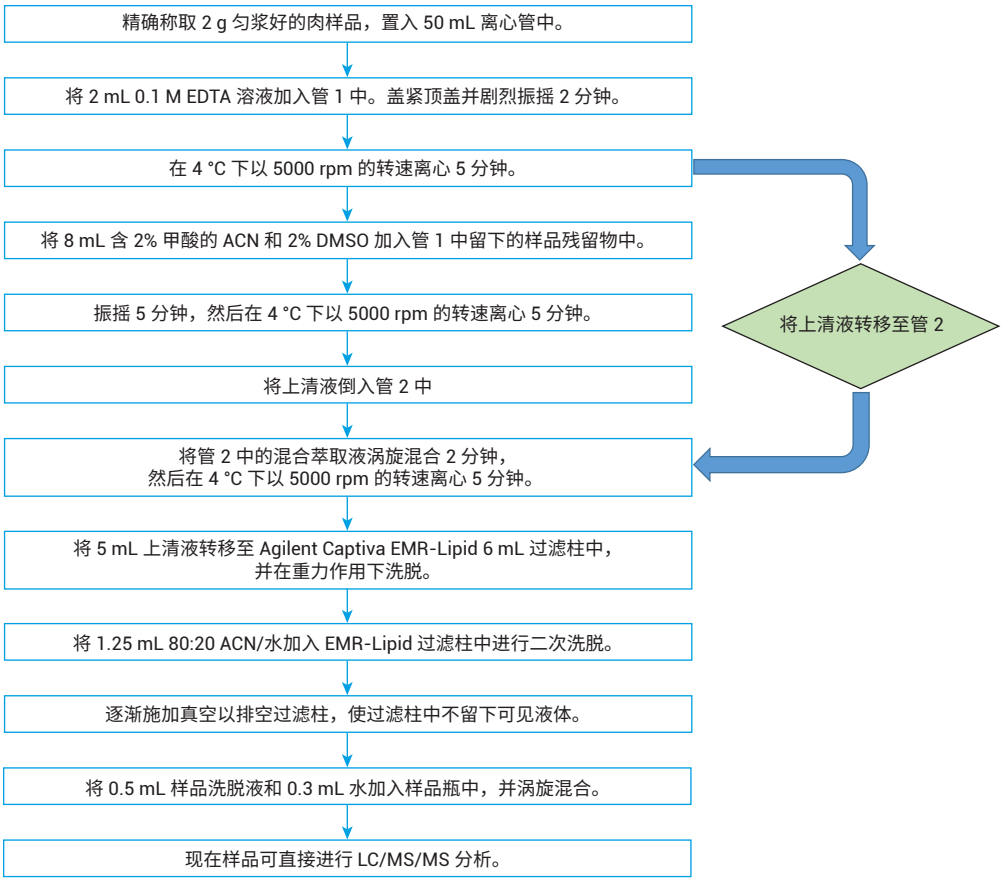

图 2. 牛肉样品萃取及随后使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 6 mL 过滤柱的净化流程

校准标样和质控 (QC) 样品

通过将适当的标准工作溶液加入均质化牛肉样品中，得到预加标的 QC 样品，其中涵盖低浓度、中等浓度和高浓度，重复测定六次。

- 对于 G1 分析物，加标浓度为 10、50 和 750 ng/g
- 对于 G2 分析物，加标浓度为 2、10 和 150 ng/g

采用标准 25/5 µg/mL (G1/G2) 工作溶液加标高浓度 QC 样品；而采用 5/1 µg/mL (G1/G2) 标准溶液加标低浓度和中等浓度 QC 样品。除基质空白外的所有样品均加入内标溶液，浓度相当于 200 ng/g 氟尼辛-d3。

在过滤柱净化后，将适当的标样和 IS 工作溶液加入基质空白洗脱液中，制得基质匹配校准标样和后加标 QC 样品。牛肉校准标样的加标浓度为 5、25、50、250、750 和 1000 ng/g (G1) 或 1、5、10、50、150 和 200 ng/g (G2)，内标浓度为 200 ng/g；后加标 QC 样品的加标浓度为 10、50 和 750 ng/g (G1) 或 2、10 和 150 ng/g (G2)。

测定共萃取物含量

对于 EMR-Lipid 过滤柱及其他制造商的过滤柱净化，通过失重测定法[5] 来测定共萃取物残留量。基于 1 mL ACN 最终萃取液来采集共萃取物残留重量，通过比较经过滤柱净化和未经过滤柱净化的共萃取物残留重量的差值比率，来计算净化方法的基质共萃取物去除效率。

基质效应评估

采用柱后注射测试对色谱基质效应进行评估。在进样分析基质空白样品的同时，以 90 µL/min 的流速在柱后注射 10 ng/mL 纯兽药标准溶液。通过色谱窗口监测所有化合物离子对。

过滤柱净化的分析物回收率评估

通过在过滤柱净化前将标样预加标至牛肉萃取液空白中以及在过滤柱净化后将标样后加标至牛肉萃取液空白中，评估过滤柱净化对分析物回收率的影响。由此得到的回收率不仅反映了过滤柱净化对分析物回收率的影响，而且排除了萃取过程的其他贡献。该方法能够更直接地比较过滤柱净化对分析物回收率的影响。对 EMR-Lipid 3 mL 和 6 mL 过滤柱与其他制造商的对应过滤柱进行比较。对于 3 mL 过滤柱，载样体积为 2.5 mL，二次洗脱体积为 0.625 mL。

方法验证

为确保校准重现性，采用两条单独的校准曲线在 QC 样品前后运行完整的定量批处理，以此对开发的方法进行验证。

结果与讨论

简便易用的过滤柱净化

使用 Captiva EMR-Lipid 过滤柱进行复杂样品基质净化的一个重要特征是简便易用。EMR-Lipid 吸附剂针对的是不需要的脂质干扰物而非分析物，并采用直通方法。将样品混合物加载到过滤柱上，使其穿过过滤柱中填充的 Captiva EMR-Lipid 吸附剂。脂类被捕集在吸附剂中，而目标分析物穿过过滤柱，无需活化、清洗和洗脱等传统的 SPE 步骤。因此，使用 Captiva EMR-Lipid 过滤柱大大简化了净化过程，节省了大量时间和吸附剂。直通式净化无需针对清洗和洗脱步骤进行传统的 SPE 方法开发。对 Captiva EMR-Lipid 的一种可能的方法改型是使用二次洗脱步骤以实现完全洗脱。在二次洗脱时，建议使用 20:80 水/ACN 混合物，其体积为载样体积的 20%–25% 左右（例如，在载样体积为 5 mL 时，采用 1–1.25 mL 进行二次洗脱）。最后，重力洗脱的产品设计使样品在加载到 EMR-Lipid 过滤柱上之后即可自动操作。无需通过调节真空度或正压来控制洗脱流速。这些特征使得在采用 Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化来制备复杂的食品样品时，可获得更高的实验室工作效率。

共萃取物含量

表 2 显示了样品共萃取物的失重测试结果。共萃取物残留重量研究是评估样品萃取和净化方法如何能够高效控制基质共萃取物的残余物（包括进样至仪器的最终样品中的蛋白质、脂类、盐类及其他基质组分）的重要方法。基质共萃取物残留重量反映了整个共萃取物含量，无论它们能否在仪器上检出都是如此。无论共萃取物残留能否在仪器上检出，均可引起基质效应，影响方法可靠性和数据质量，在仪器流路（如色谱柱和 MS 源）中聚集，并损害检测系统的长期性能。

基质共萃取物残留越少，方法可靠性和仪器性能就越高。结果清楚地表明，Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化相比于其他制造商的过滤柱净化共萃取物残留重量更小，提供了更出色的基质净化效率。

基质效应评估

利用柱后注射 (PCI) 兽药标样来评估经 Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化和未经 Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化的牛肉萃取液中的基质效应。通过整个采集窗口对所有分析物进行监测。PCI 图谱反映出正离子和负离子模式下监测到的基质对分析物的影响。图 3 显示了 PCI 图谱。

表 2. 牛肉基质共萃取物残留量以及过滤柱净化的基质去除效率

净化技术	每毫升 ACN 最终萃取液中的共萃取物重量 (mg)	通过净化达到的基质共萃取物去除效率 (%)
未净化	7.68	–
Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL 过滤柱	4.38	43
Agilent Captiva EMR-Lipid 6 mL 过滤柱	4.03	48
其他制造商的 3 mL 过滤柱	5.91	23
其他制造商的 6 mL 过滤柱	6.30	18

$$\text{基质共萃取物去除效率 (\%)} = \frac{(\textit{未经净化的共萃取物含量} - \textit{净化后的共萃取物含量})}{\textit{未经净化的共萃取物含量}} \times 100$$

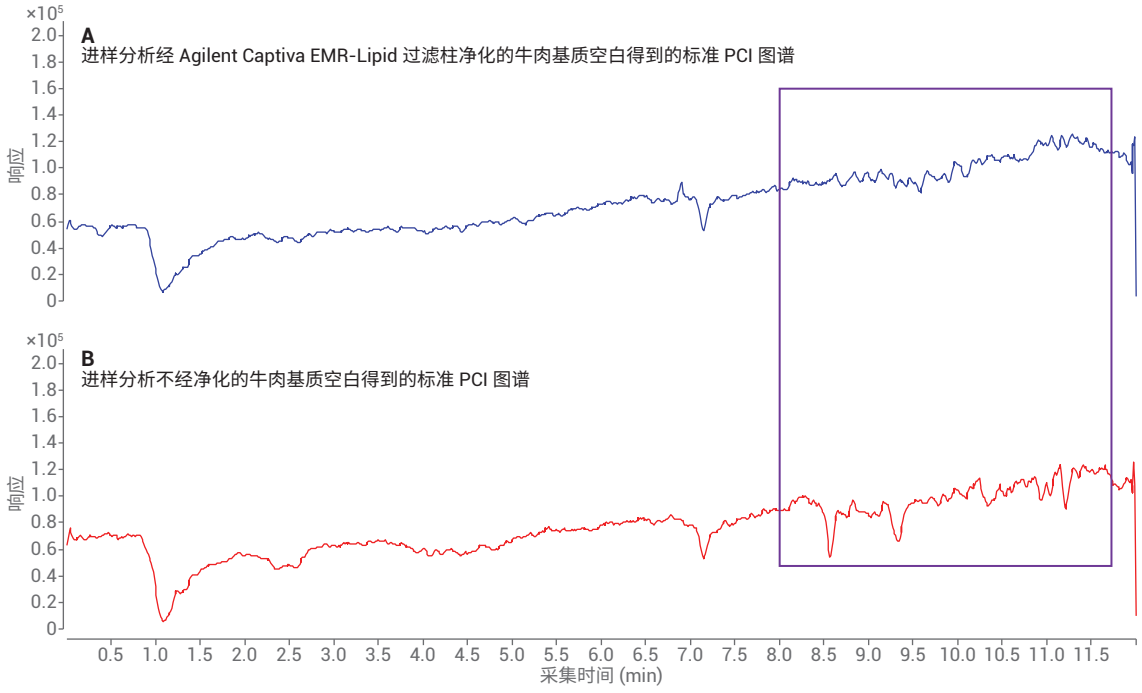

图 3. 通过进样分析经 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化 (A) 和未经任何净化 (B) 的牛肉基质空白，利用标准 PCI 进行基质效应研究

图 3B 显示呈红色的 PCI 图谱，在进样分析未净化的牛肉萃取液时观察到基质离子抑制效应（基线总体偏低）。基质离子抑制会显著影响方法灵敏度、可靠性以及处于共洗脱窗口内的分析物的数据质量。相反，图 3A 显示了进样分析经 EMR-Lipid 过滤柱净化的牛肉萃取液所得到的 PCI 图谱（呈蓝色），该图谱变得更平滑且更一致，其中的波谷较少。图 3 中突出显示的 RT 窗口对比了更低的基质离子抑制效应。

过滤柱净化回收率

过去，脂质去除的机制是基于脂类与吸附剂之间的疏水相互作用。尤其是在使用强疏水相互作用作为主要吸附剂作用机制来捕集和去除脂类的情况下，这一机制可能很有效。然而，这种相互作用机制缺乏选择性，无法将不需要的脂类和不需要的疏水性分析物与样品区分开来。因此，该吸附剂虽然能够捕获脂类，但是它也会与疏水性分析物发生强相互作用，导致过滤柱净化过程中出现显著的分析物损失。此外，并非所有类别的脂类均可通过疏水相互作用有效去除（如磷脂）。

Captiva EMR-Lipid 吸附剂使用新型化学键合相，这种吸附剂结合了体积排阻与疏水相互作用，可显著改善脂质去除的选择性。仅包含直链非支化烃链的脂类分子（最好含六个以上碳原子）能够进入 EMR-Lipid 吸附剂孔内。一旦脂类进入 EMR-Lipid 吸附剂，它们将通过强疏水相互作用被捕集到吸附剂内。其他非脂类且体积过大而不能进入 EMR-Lipid 吸附剂的疏水性分子将留在溶液中，随后得到分析。因此，EMR-Lipid 吸附剂能够高效区分脂类与其他疏水性分子，显著改善灵敏度，并减少净化过程中疏水性化合物的损失。

该机制已得到过滤柱净化回收率研究的充分证实。在本研究中，在过滤柱净化前将标样预加标至牛肉空白萃取液中，并在过滤柱净化后将标样后加标至空白洗脱液中。回收率数据仅显示了过滤柱净化对分析物的影响。对比研究包括四种类型的过滤柱：Captiva EMR-Lipid 3 mL (300 mg) 和 6 mL (600 mg) 过滤柱，其他制造商的 3 mL (60 mg) 和 6 mL (500 mg) 过滤柱。图 4 显示了研究结果。对比研究中所示的分析物是具有较强疏水性的化合物，在 C18 色谱柱上较晚洗脱。EMR-Lipid 3 mL 和 6 mL 过滤柱为具有中等至高疏水性的化合物提供了同样优异的过滤柱净化回收率。然而，对于其他制造商的过滤柱净化，其中主要使用疏水相互作用进行脂质去除，具有更强疏水性（后洗脱）的分析物回收率较低。在使用包含吸附剂床层质量相当 (500 mg) 的 6 mL 过滤柱时，中等至高疏水性化合物发生显著保留。例如，对于疏水性最强的两种化合物氯硝柳胺和硫氯酚 (log P > 5)，其他制造商的 6 mL 过滤柱净化回收率为个位数，表明过滤柱上发生了大量的分析物损失。它们的 3 mL 过滤柱使用少得多的吸附剂以平衡疏水性分析物损失。总而言之，采用 60 mg 吸附剂的其他过滤柱净化管牺牲了过滤柱基质净化效率，而增加吸附床质量则使疏水性化合物的回收率降低至不可接受的较低水平 (< 40%)。本研究清楚地表明，EMR-Lipid 吸附剂为脂类提供了高选择性相互作用机制，确保获得可接受的目标分析物回收率，对疏水性分析物更是如此。

方法验证

通过运行完整的定量批处理来验证经优化的萃取和净化方法。该方法在实验部分有所描述。利用内标（针对正离子和负离子模式的氟尼辛-d3）进行定量分析。然而，由于在评估新的样品前处理方法时最关心的是绝对回收率，验证运行中包括以三种浓度预加标和后加标的 QC。表 3 详细列出了定量结果，并由各种浓度下的平均回收率和精度生成汇总图（图 5）。除乙酰丙嗪和氯丙嗪两种异常化合物以外，三种浓度下的大多数分析物 (94%) 均获得了可接受的回收率 (60%–120%)。确证研究表明这两种化合物可能在本方案的萃取步骤中发生了分析物损失。然而，各种浓度下这两种化合物六次重复测定的 RSD 值非常出色，91% 分析物的 RSD < 10%，其余 9% 分析物的 RSD 为 10%–20%。

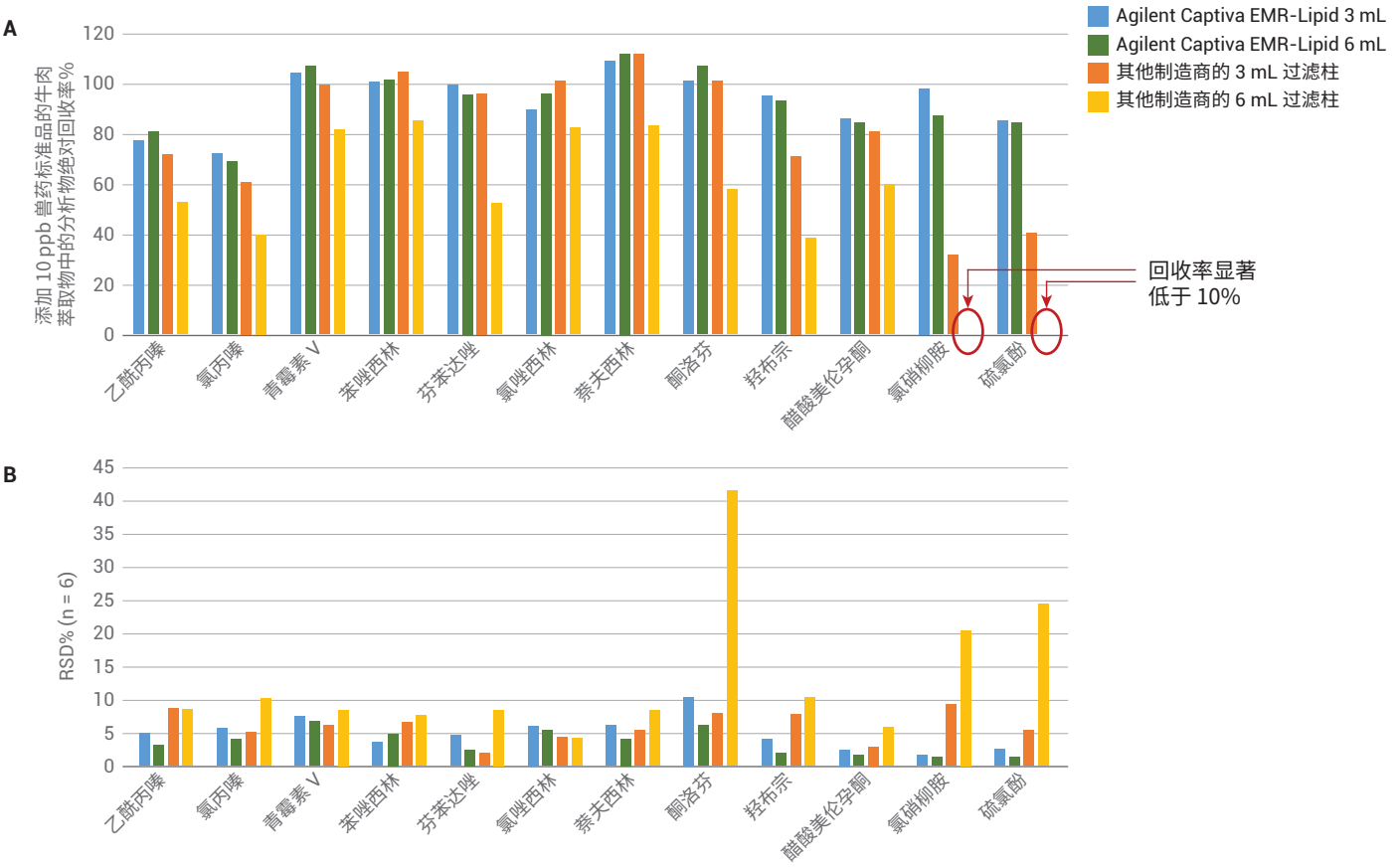

图 4. 过滤柱净化比较：牛肉萃取液中疏水性分析物的回收率 (A) 和重现性 (B)。在过滤柱净化前，将标样加标至牛肉萃取液中，加标浓度为 10 ng/mL。从左到右，分析物疏水性逐渐提高

表 3. 牛肉中兽药分析的方法定量结果

组号[a]	分析物	校准曲线		方法绝对回收率和精度									
				2 ng/g QC (n = 6)		10 ng/g QC (n = 6)		50 ng/g QC (n = 6)		150 ng/g QC (n = 6)		750 ng/g QC (n = 6)	
		R^2	校准范围 (ng/g)	回收率%	RSD	回收率%	RSD	回收率%	RSD	回收率%	RSD	回收率%	RSD
1	2-硫脲嘧啶	0.9862	5–1000	–	–	94	6.7	116	2.2	–	–	103	4.1
1	阿莫西林	0.9964	5–1000	–	–	88	8.6	77	3.9	–	–	69	2.7
1	羟基甲硝唑	0.9963	5–1000	–	–	112	3.8	108	1.8	–	–	103	2.1
1	氨苄青霉素	0.9926	5–1000	–	–	88	9.6	84	3.8	–	–	82	4.2
1	二甲胺四环素	0.9943	5–1000	–	–	72	13.3	69	11.2	–	–	62	2.9
1	土霉素	0.9941	5–1000	–	–	84	6.2	87	11.0	–	–	72	5.1
1	四环素	0.9919	5–1000	–	–	87	9.0	86	5.2	–	–	90	4.1
1	头孢唑啉	0.9933	5–1000	–	–	109	5.8	94	2.8	–	–	87	5.4
1	去甲金霉素	0.9966	5–1000	–	–	80	17.6	86	3.4	–	–	86	3.8
1	二氟沙星	0.9824	5–1000	–	–	122	7.3	102	5.9	–	–	102	5.0
1	加米霉素	0.9901	5–1000	–	–	100	8.9	92	5.3	–	–	89	6.1
1	金霉素	0.9976	5–1000	–	–	80	7.8	86	8.5	–	–	81	4.1
1	多西环素	0.9936	5–1000	–	–	77	11.2	70	5.4	–	–	73	4.7
1	氟甲砜霉素	0.9920	5–1000	–	–	116	4.4	110	3.8	–	–	99	7.1
1	氯霉素	0.9928	5–1000	–	–	113	7.6	104	1.9	–	–	103	3.4
1	泼尼松	0.9932	5–1000	–	–	110	6.7	110	5.5	–	–	106	5.4
1	克洛索隆	0.9927	5–1000	–	–	114	12.1	97	4.8	–	–	98	5.7
1	青霉素 V	0.9952	5–1000	–	–	97	4.3	100	6.3	–	–	100	7.1
1	苯唑西林	0.9942	5–1000	–	–	96	12.0	99	8.2	–	–	99	5.1
1	氯唑西林	0.9932	5–1000	–	–	103	8.1	101	6.0	–	–	97	5.7
1	萘夫西林	0.9926	5–1000	–	–	107	8.9	110	6.5	–	–	95	5.6
1	羟布宗	0.9910	5–1000	–	–	106	8.1	98	3.0	–	–	86	2.8
1	醋酸美伦孕酮	0.9942	5–1000	–	–	117	7.0	114	3.0	–	–	102	5.1
1	硫氯酚	0.9807	5–1000	–	–	63	8.2	81	5.7	–	–	92	1.4
2	林可霉素	0.9961	1–200	94	8.5	99	3.0	–	–	88	6.4	–	–
2	左旋咪唑	0.9942	1–200	111	2.1	109	3.0	–	–	99	1.3	–	–
2	诺氟沙星	0.9974	1–200	111	5.5	91	4.9	–	–	100	8.0	–	–
2	环丙沙星	0.9965	1–200	114	11.8	103	6.9	–	–	103	4.0	–	–
2	达氟沙星	0.9969	1–200	101	8.3	94	5.8	–	–	99	5.6	–	–
2	莱克多巴胺	0.9858	1–200	120	6.5	110	5.5	–	–	109	3.2	–	–
2	磺胺甲二唑	0.9950	1–200	102	11.0	105	2.5	–	–	97	5.0	–	–
2	磺胺甲氧哒嗪	0.9949	1–200	118	9.7	106	6.3	–	–	86	4.6	–	–
2	甲噻嘧啶	0.9965	1–200	107	7.8	112	6.1	–	–	109	6.5	–	–
2	泰乐菌素	0.9946	1–200	125	5.3	105	4.8	–	–	98	7.5	–	–
2	乙酰丙嗪	0.9942	1–200	66	7.9	52	3.2	–	–	56	3.7	–	–
2	氯丙嗪	0.9944	1–200	50	9.2	36	3.2	–	–	43	4.1	–	–
2	芬苯达唑	0.9910	1–200	76	5.6	99	1.6	–	–	90	4.9	–	–
2	酮洛芬	0.9911	1–200	112	9.4	102	7.0	–	–	103	1.9	–	–
2	氯硝柳胺	0.9964	1–200	120	10.2	85	8.5	–	–	89	2.1	–	–

[a] 第 1 组分析物的校准范围为 5–1000 ng/g，QC 加标浓度为 10、50、250 和 750 ng/g；而第 2 组分析物的校准范围为 1–200 ng/g，QC 加标浓度为 2、10、50 和 150 ng/g

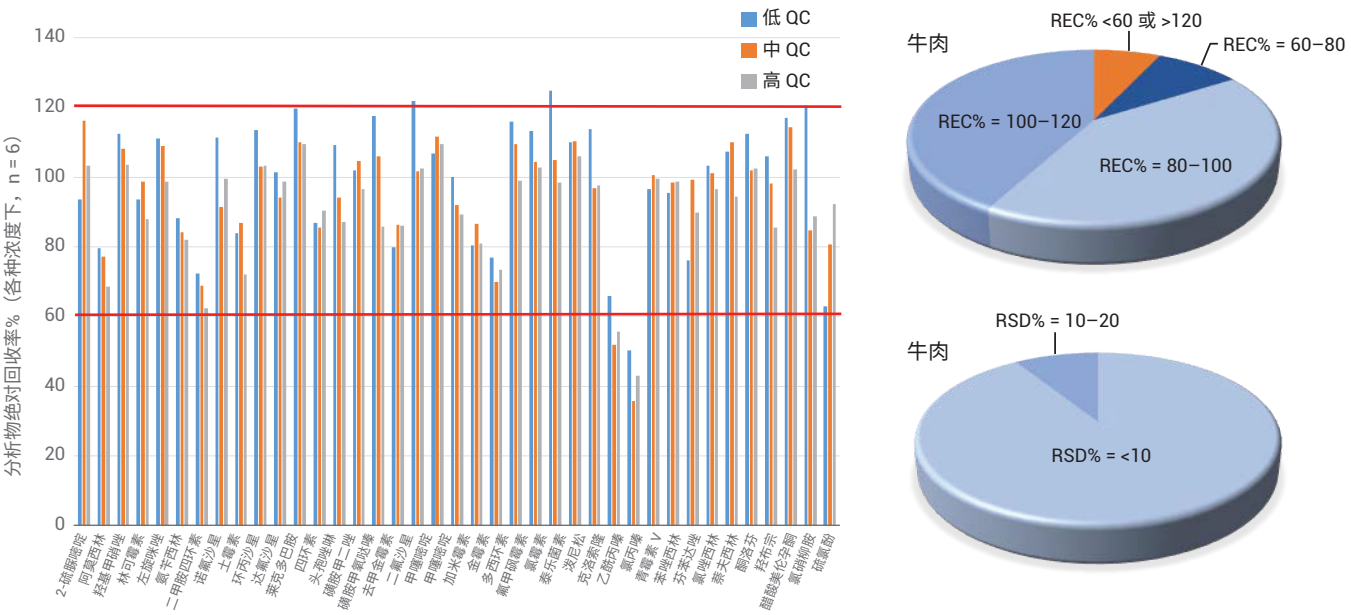

图 5. 牛肉中兽药分析方法验证得到的绝对分析物回收率和统计结果汇总。请参见表 3 了解详细信息

结论

开发并验证了一种采用固液萃取和 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化分析牛肉中兽药多残留物的快速、可靠且稳定的方法。改进的萃取流程依次采用水溶液萃取步骤和有机溶剂萃取步骤来优化分析物回收率。将这些萃取液混合并加载到 Captiva EMR-Lipid 过滤柱上进行净化。详细评估了基质共萃取物和基质效应，并与另一制造商的类似过滤柱进行了比较。过滤柱净化对分析物回收率影响的研究表明，EMR-Lipid 吸附剂提供了高选择性脂质去除，且不会引起不必要的目标分析物损失。结果表明，经优化的固液萃取以及 Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化方法在此类应用中提供了卓越的基质净化、优异的回收率和精密的结果。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, A Description of the U.S. Food Safety System, March 2000, www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.html
2. European Commission, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Comm*. **2002**, *L122*, 8
3. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1202*, 118-123
4. Geis-Asteggiante, L.; *et al.* Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1258*, 43-54
5. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. Validation of a streamlined multiclass, multiresidue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem*. **2015**, *407*, 4423-4435
6. Han, L.; *et al.* Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1449*, 17-29
7. López-Blanco, R.; *et al.* Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1456*, 89-104

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017

2017 年 11 月 7 日，中国出版
5991-8598ZHCN

Agilent
Trusted Answers