

用于三文鱼中兽药分析的快速样品前处理工作流程

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 和 LC/MS/MS

作者

Xia Yang
安捷伦科技有限公司

前言

开发了一种简单、快速、可靠的样品前处理工作流程和分析方法，用于分析三文鱼中七类 53 种药物。这些药物在欧洲、美国、加拿大和亚洲国家/地区应用广泛并受到相应监管^[1]。采用一步溶剂萃取法，然后利用 Agilent Captiva EMR-Lipid 进行通过式净化，实现了对多种兽药的分析，并获得了满意的回收率和精密度。

设备与材料

- Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱，3 mL，300 mg（部件号 5190-1003）
- SPEX 样品前处理 2010 Geno/Grinder（Metuchen, NJ, USA）
- Agilent Vac Elut 20 真空萃取装置，（部件号 12234101）
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm（部件号 695975-302）
- Agilent 1290 Infinity 液相色谱
- 配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6495B 三重四极杆液质联用系统

样品前处理和优化

由于三文鱼中含有大量的水，因此加入 9 mL 80/5/5 乙腈 (ACN)/H₂O/甲酸 (FA)（相当于约 80/20 ACN/水的最终提取物），以进行兽药萃取。考察了三种萃取溶剂（含 2% FA、5% FA 以及不含 FA 的 H₂O）。含 5% FA 的萃取溶剂萃取能力最强，获得的回收率最佳（图 1）。

方法验证

用于标准曲线的校准标样溶剂的配制浓度为 0.1、0.5、1、5、10、20、50 和 100 ng/g。包含孔雀石绿-D₃、隐性孔雀石绿-D₄ 和氯霉素-D₆ 的内标混合物的加标浓度为 10 ng/g，用于对相应的分析物进行选择性校准。将标准溶液加入经相同样品前处理工作流程处理的基质空白中，建立基质匹配校准曲线。



图 1. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL 过滤柱（部件号 5190-1003）进行三文鱼样品的萃取和净化

根据定量限和线性范围，将药物分为三组。将适量的标准工作溶液加入均质化三文鱼样品中，得到预加标的 QC 样品，其中涵盖低浓度、中等浓度和高浓度，各平行配制 6 份，分为第 1 组（5 ppb/10 ppb/50 ppb）、第 2 组（1 ppb/10 ppb/50 ppb）和第 3 组（1 ppb/5 ppb/50 ppb）。

线性

使用 Agilent MassHunter 定量分析软件处理数据。使用线性回归拟合和 1/x 加权得到兽药的校准曲线，其 R² 值均在 0.993–0.999 之间。

准确度和精密度结果

如图 3 所示，通过运行 3 个 QC 浓度下的加标样品来验证先进行 5% FA 和 80% ACN 一步式溶剂萃取，然后进行 Captiva EMR-Lipid 通过式净化的这一方法。该方法的回收率为 60%–120%。对于研究的 53 种兽药，在 3 个 QC 浓度下，96% 的回收率数据点位于 70%–120% 之间，仅 4% 的数据点位于 60%–70% 之间。

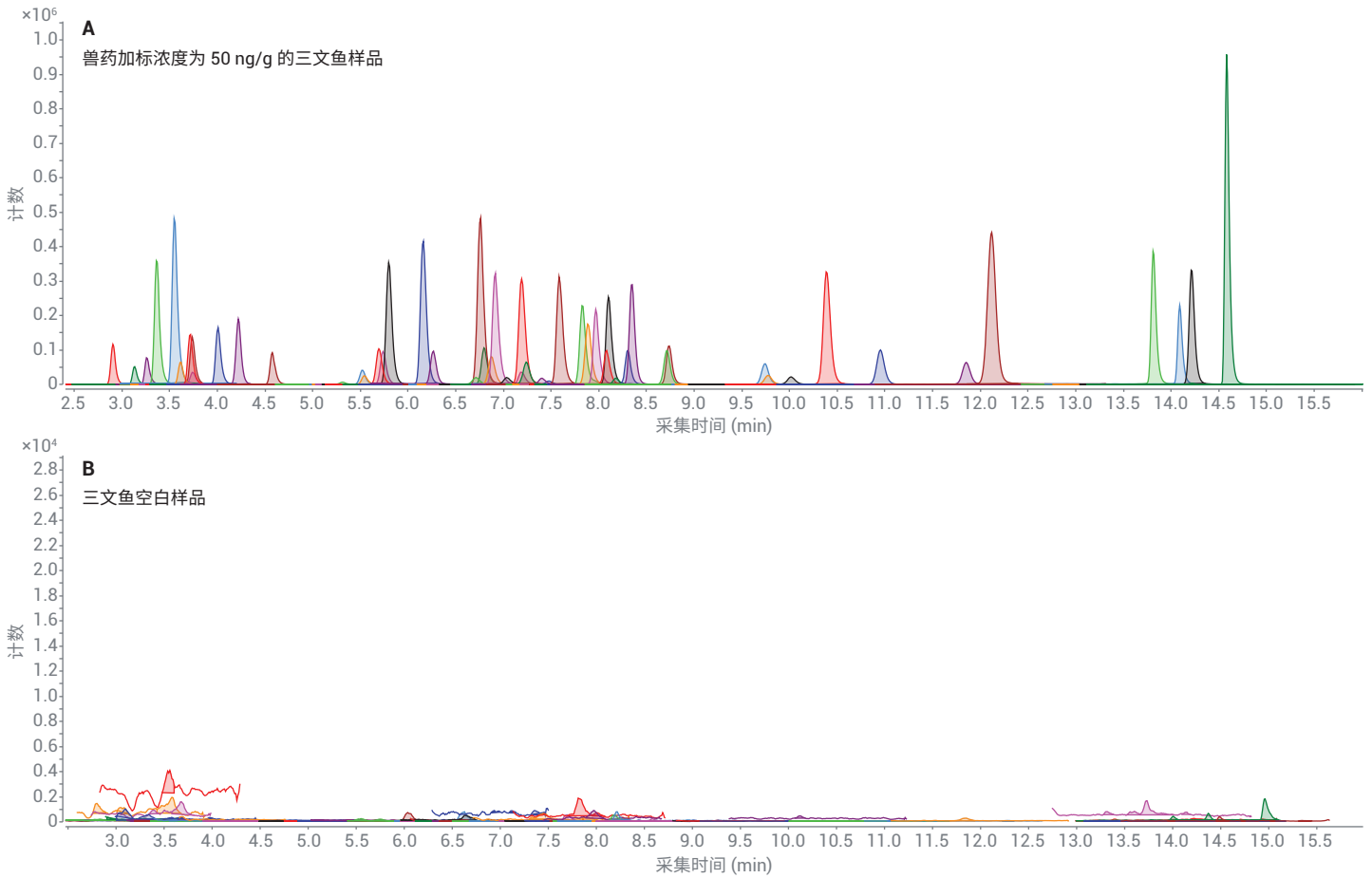


图 2. (A) 加标 50 ng/g 兽药标准的三文鱼提取物和 (B) 三文鱼提取物基质空白的 LC/MS/MS 色谱图

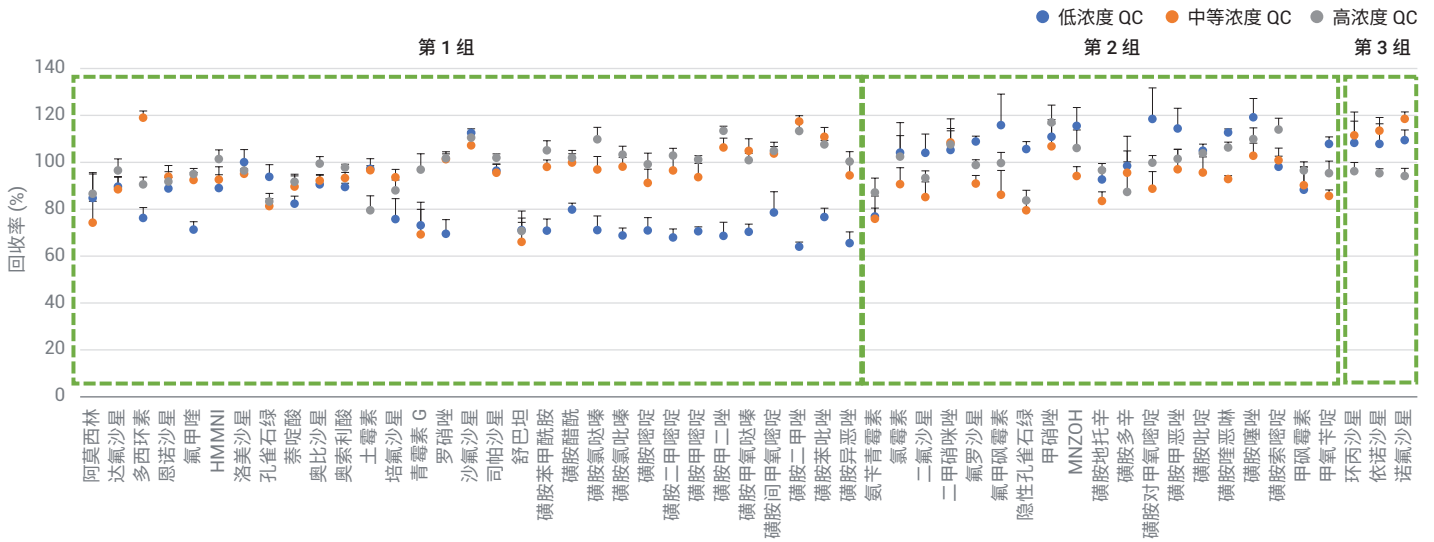


图 3. 考察的 53 种三文鱼兽药在 3 个 QC 浓度下的回收率和精密度数据

结论

本研究展示了一种用于分析三文鱼中多种兽药的简单、快速且稳定的样品前处理工作流程。该工作流程仅包含两个步骤：含 5% FA 的一步式 ACN 溶剂萃取，以及使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 在重力作用下进行通过式净化。该方法为海产品中各类常规检测的兽药提供了可接受的回收率和 RSD。

参考文献

1. Love, D. C. et al. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. *Environmental Science and Technology* **2011**, 45, 7232–7240

附录：MRM 参数

| 分类 | 分析物 | 保留时间 (min) | 极性 | | | | |
|-------|---------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------|
| | | | | 定量 MRM | CE (V) | 定性 MRM | CE (V) |
| 磺胺类 | 磺胺苯甲酰胺 | 8.5 | 正 | 277.1 → 155.9 | 12 | 277.1 → 92.0 | 36 |
| | 磺胺醋酰 | 3.2 | 正 | 215.0 → 156.0 | 8 | 215.0 → 108.0 | 16 |
| | 磺胺氯哒嗪 | 6.7 | 正 | 285.0 → 156.0 | 12 | 285.0 → 108.1 | 24 |
| | 磺胺氯吡嗪 | 9.5 | 正 | 285.0 → 155.9 | 20 | 285.0 → 108.1 | 24 |
| | 磺胺嘧啶 | 3.7 | 正 | 251.1 → 92.1 | 28 | 251.1 → 108.1 | 20 |
| | 磺胺二甲嘧啶 | 5.6 | 正 | 279.1 → 92.1 | 38 | 279.1 → 186.1 | 12 |
| | 磺胺甲噁啶 | 4.6 | 正 | 265.1 → 92.1 | 28 | 265.1 → 156.0 | 12 |
| | 磺胺甲二唑 | 5.7 | 正 | 271.0 → 92.0 | 29 | 271.0 → 156.0 | 9 |
| | 磺胺甲氧哒嗪 | 6.2 | 正 | 281.1 → 92.1 | 32 | 281.1 → 108.1 | 28 |
| | 磺胺间甲氧嘧啶 | 7.3 | 正 | 281.0 → 126.0 | 20 | 281.0 → 156.0 | 10 |
| | 磺胺二甲唑 | 5.4 | 正 | 268.1 → 155.9 | 20 | 268.1 → 112.5 | 24 |
| | 磺胺苯吡唑 | 9.4 | 正 | 315.1 → 158.1 | 40 | 315.1 → 92.0 | 40 |
| | 磺胺异恶唑 | 7.9 | 正 | 268.1 → 156.0 | 10 | 268.1 → 92.0 | 40 |
| | 磺胺地托辛 | 10.4 | 正 | 311.1 → 156.0 | 16 | 311.1 → 108.1 | 28 |
| | 磺胺多辛 | 7.7 | 正 | 311.1 → 156.0 | 16 | 311.1 → 92.1 | 32 |
| | 磺胺对甲氧嘧啶 | 5.5 | 正 | 281.1 → 92.0 | 40 | 281.1 → 215.1 | 20 |
| | 磺胺甲恶唑 | 7.1 | 正 | 254.1 → 92.1 | 24 | 254.1 → 156.0 | 12 |
| | 磺胺吡啶 | 4.2 | 正 | 250.1 → 92.0 | 29 | 250.1 → 156.0 | 17 |
| | 磺胺噻恶啉 | 11.2 | 正 | 301.1 → 156.0 | 16 | 301.1 → 92.0 | 32 |
| | 磺胺噻唑 | 4.0 | 正 | 256.0 → 156.0 | 12 | 256.0 → 92.1 | 28 |
| 磺胺索嘧啶 | 3.8 | 正 | 279.1 → 124.1 | 20 | 279.1 → 186.0 | 20 | |
| 甲氧苄啶 | 5.6 | 正 | 291.2 → 261.1 | 24 | 291.2 → 123.1 | 24 | |
| 四环素类 | 多西环素 | 6.5 | 正 | 445.2 → 410.0 | 24 | 445.2 → 428.1 | 16 |
| | 土霉素 | 6.8 | 正 | 461.2 → 426.1 | 14 | 461.2 → 201.1 | 48 |

| 分类 | 分析物 | 保留时间 (min) | 极性 | | | | |
|--------|--------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------|
| | | | | 定量 MRM | CE (V) | 定性 MRM | CE (V) |
| 喹诺酮类 | 达氟沙星 | 7.7 | 正 | 358.2 → 340.1 | 20 | 358.2 → 82.1 | 48 |
| | 恩诺沙星 | 7.5 | 正 | 360.2 → 316.2 | 16 | 360.2 → 342.2 | 20 |
| | 氟甲喹 | 13.9 | 正 | 262.1 → 244.1 | 12 | 262.1 → 202.0 | 32 |
| | 洛美沙星 | 7.8 | 正 | 352.2 → 308.2 | 16 | 352.2 → 265.0 | 20 |
| | 萘啶酸 | 13.6 | 正 | 233.1 → 215.1 | 20 | 233.1 → 159.1 | 40 |
| | 奥比沙星 | 8.1 | 正 | 396.2 → 352.1 | 16 | 396.2 → 295.1 | 28 |
| | 奥索利酸 | 11.5 | 正 | 262.1 → 243.9 | 16 | 262.1 → 159.9 | 40 |
| | 培氟沙星 | 6.5 | 正 | 334.2 → 290.1 | 16 | 334.2 → 233.1 | 28 |
| | 沙氟沙星 | 8.4 | 正 | 386.1 → 368.1 | 20 | 386.1 → 342.1 | 20 |
| | 司帕沙星 | 9.8 | 正 | 393.2 → 349.0 | 20 | 393.2 → 375.2 | 20 |
| | 二氟沙星 | 8.0 | 正 | 400.1 → 299.1 | 32 | 400.1 → 382.1 | 20 |
| | 氟罗沙星 | 6.0 | 正 | 370.1 → 326.0 | 20 | 370.1 → 268.9 | 24 |
| | 环丙沙星 | 7.3 | 正 | 332.1 → 314.0 | 20 | 332.1 → 288.0 | 20 |
| | 依诺沙星 | 6.6 | 正 | 321.1 → 303.3 | 16 | 321.1 → 231.8 | 40 |
| 诺氟沙星 | 6.9 | 正 | 320.1 → 302.1 | 20 | 320.1 → 282.1 | 40 | |
| 硝基咪唑类 | 甲硝唑 | 3.4 | 正 | 172.0 → 128.0 | 13 | 172.0 → 82.0 | 25 |
| | MNZOH | 3.0 | 正 | 188.0 → 123.0 | 13 | 188.0 → 126.0 | 21 |
| | HMMNI | 3.3 | 正 | 158.0 → 140.0 | 18 | 158.0 → 55.0 | 13 |
| | 罗硝唑 | 3.8 | 正 | 201.0 → 140.0 | 9 | 201.0 → 55.0 | 25 |
| | 二甲硝咪唑 | 3.6 | 正 | 142.0 → 96.0 | 21 | 142.0 → 54.0 | 40 |
| 氯霉素类 | 氯霉素 | 9.8 | 负 | 321.0 → 151.9 | 21 | 321.0 → 257.0 | 9 |
| | 氟甲砜霉素 | 7.3 | 负 | 356.0 → 185.1 | 12 | 356.0 → 336.0 | 0 |
| | 甲砜霉素 | 5.3 | 负 | 354.0 → 289.9 | 8 | 354.0 → 185.0 | 16 |
| β-内酰胺类 | 阿莫西林 | 3.8 | 正 | 366.1 → 349.1 | 4 | 366.1 → 114.1 | 32 |
| | 青霉素 G | 14.0 | 正 | 335.1 → 160.1 | 8 | 335.1 → 176.0 | 8 |
| | 舒巴坦 | 3.8 | 负 | 232.0 → 140.1 | 12 | 232.0 → 64.1 | 44 |
| | 氨苄青霉素 | 8.0 | 正 | 350.0 → 106.0 | 16 | 350.0 → 114.0 | 36 |
| 孔雀石绿 | 孔雀石绿 | 14.3 | 正 | 329.3 → 313.3 | 40 | 329.3 → 284.0 | 50 |
| | 隐性孔雀石绿 | 14.2 | 正 | 331.2 → 239.2 | 28 | 331.2 → 316.2 | 20 |

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，2019
2019年7月2日，中国出版
5994-1124ZHCN

