



牛奶中大环内酯类抗生素的自动化分析

大环内酯类药物的活性来源于大环内酯环的存在，而大环内酯环上可能有一个或多个脱氧糖，经常为二脱氧甲基糖和脱氧糖胺。内酯经常是 14、15 或 16 环的。大环内酯类抗生素被广泛应用于兽医药物，如果牛奶提取期太短，抗生素仍然可能存在残留，对消费者带来直接的毒副作用(过敏反应)。

1 离线的 SPE 萃取方案

传统上，微生物检测被用来监测食品基质中的抗生素。这些方案都有很好的定量结果，但越来越缺乏高度的专属性。随着现代实验室 LC/MS 或 LC/MS/MS 系统的普遍使用，多残留方法更被常规工作所认可。牛奶分析最常用的萃取方案是用乙腈沉淀蛋白，然后离心数分钟，上清液可以用其它的萃取技术进一步提纯。

离线的 SPE 牛奶方案步骤：加入 5mL 的牛奶到 50mL 的离心管中，再加入 15mL 的乙腈，涡旋并在 3200 r·min<sup>-1</sup> 转速下离心 15min。转移上清液到 50mL 的离心管中，加入 20mL 的正己烷，涡旋 15min。在 3200 r·min<sup>-1</sup> 转速下离心 15min。移去正己烷层，蒸发乙腈。牛奶上清液到 3mL。加入 15mL 0.1mol·L<sup>-1</sup>、pH 值为 8.0 的硫酸盐缓冲液，用 10mL 的甲醇活化 Oasis<sup>®</sup> HLB(6cc)，用 10mL 的水活化 Oasis<sup>®</sup> HLB(6cc)，用 10mL 2% 的 NaCl 活化 Oasis<sup>®</sup> HLB(6cc)，用 2mL 0.1mol·L<sup>-1</sup>、pH 值为 8.0 的磷酸盐活化 Oasis<sup>®</sup> HLB(6cc)，上载复溶的样品，用 5mL 的水清洗，用 5mL 40% 的甲醇水溶液清洗，使 Oasis<sup>®</sup> HLB 流干 5min。用 5mL 95% 的甲醇水溶液洗脱；蒸发近干(45min)；用 1mL 的初始条件流动相复溶；用 0.45μm 的聚偏二乙烯氟化物(PVDF)过滤萃取物。

2 在线的 SPE 萃取方案

自动化萃取/分析技术：Waters AquaAnalysis 系统带来了多种好处：减少手工操作、减少溶剂消耗和减少样品体积。使用在线的 SPE/LC/MS/MS 技术平台省去了消耗时间的蒸干/复溶步骤。饮用水样品可直接上样到自动进样器，然后就是完全自动化的电脑控制的萃取/分析步骤。对于食品分析，固体样品要先转变成液体形式。

在线的 SPE 牛奶方案步骤如下：加入 1mL 牛奶到 50mL 的离心管中；加入一定浓度的氨水 20μL。加入 2mL 的乙腈(2:1)；涡旋并在 3500r·min<sup>-1</sup> 的转速下离心 15min。转移 2mL 的上清液到 20mL 的进样瓶；加入 18mL 的水；进样 5mL

3 实验条件

大环内酯所用的 MRM 条件见表 1。使用的 SPE 萃取柱是 Waters Oasis<sup>®</sup> HLB 2.1×20 mm, 25μm, 中性 pH 值上样，流动相(无添加物)。使用的分析柱是 XBridge<sup>™</sup> C<sub>18</sub> 2.1×50 mm 3.5μm, 低 pH 值流动相洗脱。

SPE 和 LC 工作条件：载样泵：管路 A: 100% 水；管路 B: 100% 甲醇；载样流速：4.0 mL·min<sup>-1</sup>；清洗液：20% 的甲醇/乙腈(30/70) + 0.5% 甲酸；再平衡泵：A: 50/50 的甲醇/丙酮；B: 80/20 的乙酸乙酯/丙酮；C: 80/20 的正己烷/丙酮；再平衡流速：4.0 mL·min<sup>-1</sup>；萃取柱：Oasis<sup>®</sup> HLB 2.1mm×20 mm, 25.0μm；分析柱：XBridge C<sub>18</sub> 2.1mm×50 mm, 3.5μm。

表 1 大环内酯的 MRM 条件

| 大环内酯 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | 大环内酯  | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) |
|------|-----------|-----------|-------|-----------|-----------|
| 红霉素  | 734.4     | 158.2     | 阿齐红霉素 | 749.6     | 591.3     |
| 克拉霉素 | 748.5     | 158.2     | 螺旋霉素  | 843.6     | 174.2     |
| 罗红霉素 | 837.5     | 679.4     | 替米考星  | 869.6     | 174.2     |

4 结果和讨论

图 1 为添加了 0.5ppb 每种抗生素的牛奶样品的提取离子色谱图。抗生素在微量水平都具有良好的信号和峰形。图 2 为添加了 100ppb 红霉素，分别用 5%、10%、20%、30% 和 40% 甲醇清洗的色谱图。在图 2 中，20% 甲醇清洗与 5% 甲醇清洗相比，会产生更高的信号。5% 甲醇的弱信号可归因于离子抑制效应。可是，当清洗步骤中的有机相比例增加过多时，信号的灵敏度由于部分洗脱而有下降趋势。

红霉素浓度从 1.0ppb 到 500.0ppb 时，线性关系良好，线性系数为 0.9902

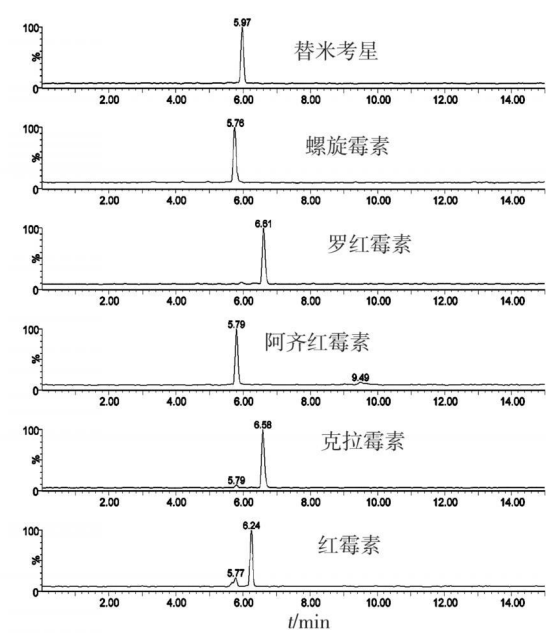


图 1 添加了 0.5 ppb 的牛奶的提取离子色谱图

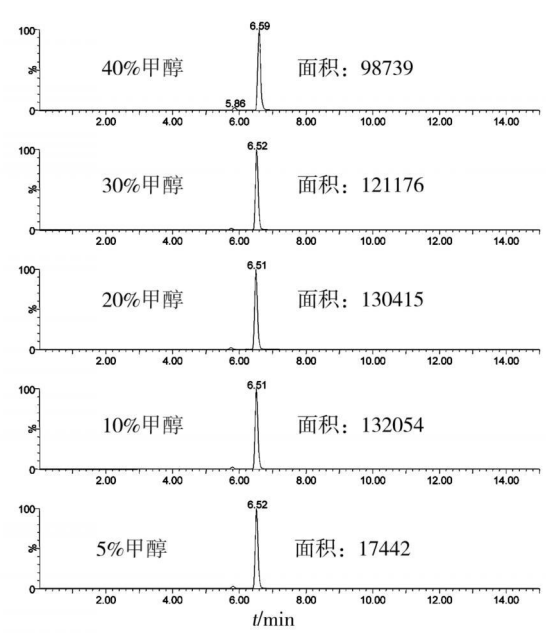


图 2 牛奶提取的优化清洗

表 2是在线和离线 SPE萃取方案的对比。当评价在线 SPE/LC/MS/MS和离线方案时，通常的萃取程序和溶剂、实验室人员和时间的整体应用都是很重要的。牛奶样品在用 SPE装置进一步净化前需要简单的蛋白沉淀和离心。对于像水果和蔬菜这样的固体样品，使用萃取缓冲液的低温碾磨或均质化步骤是优先考虑的方法。通常，使用 SPE方案，上样、清洗和洗脱体积都根据 SPE装置的床台尺寸估量。这可以首先保证在每个步骤中 SPE吸附剂的整体润湿。一旦这个数值定下来，这可以增加数倍(依赖于化合物)确保多个个体积置换以使清洗步骤最小化清除干扰和洗脱步骤最大化回收率。在实际的操作中，柱床上样量诱捕能力的增加需要 SPE程序中体积的增加，这最终会增加样品制备的时间和溶剂消耗量。

表 2 牛奶样品的离线和在线萃取方案的溶剂消耗量和处理时间

|        | 在线                                                 | 离线 A <sup>6</sup>          | 离线 B <sup>5</sup>                                                 | 离线 C <sup>4</sup>                                     |
|--------|----------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 样品     | 1 ml                                               | 1 ml                       | 5 ml                                                              | 5 ml                                                  |
| 蛋白沉淀   | 2 ml 乙腈,<br>18 ml 水                                | 1 ml 乙腈<br>9 ml 0.1% 甲酸    | 20 ml 0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷<br>15 ml 3mol/L 醋酸钠<br>5 mL 0.15mol/L 钨酸钠 | 15 ml 乙腈<br>20 ml 正己烷<br>15 mL 0.1mol/L 磷酸钠           |
| 处理时间   | 20 min                                             | 30 min                     | 1.7 h                                                             | 2.5 h                                                 |
| SPE 装置 | Oasis 柱 (60 mg)                                    | Oasis HLB 3cc (60 mg)      | Oasis HLB 6 cc (200 mg)                                           | Oasis HLB plus (225 mg)                               |
| SPE 活化 | 12 mL 40/40/20 乙酸<br>酯/正己烷/丙酮<br>12 ml 甲醇, 12 ml 水 | 5 ml 乙腈<br>5 mL 5/95% 乙腈/水 | 10 ml 甲醇<br>10 ml 水                                               | 10 ml 甲醇 10 ml 水<br>10 mL 2% 氯化钠<br>2 mL 0.1mol/L 磷酸钠 |
| SPE 清洗 | 12 mL 20% 甲醇                                       | 5 mL 0.1% 甲酸               | 20 mL 3% 甲醇,<br>5 ml 正己烷                                          | 5 ml 水, 10 mL 40% 甲醇                                  |
| SPE 洗脱 | 3 ml 乙腈 + 0.5% 甲酸                                  | 2 ml 乙腈<br>1 mL 0.1% 甲酸    | 5 mL 95% 甲醇                                                       | 5 mL 95% 甲醇                                           |
| SPE 时间 | 5 min                                              | 42 min                     | 1.06 h                                                            | 1.26 h                                                |

随着最小化溶剂使用量和最大化实验室人员使用的需求增加，自动化平台的使用会满足这些要求。与牛奶样品中抗生素的自动化萃取和分析相比较，传统的萃取前处理步骤消耗时间更多，需要更大数量的化学品和各种各样的试剂。使用 Waters Acquity 系统处理牛奶样品的时间大约为 20 min，这与离线方案相比可以减少 70%—90% 的时间。