

食品安全

应用文集



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

洞悉原料品质， 确保食品饮料安全优质。

目前许多实验室都将沃特世公司的产品作为食品饮料检测的必需工具并深深受益。创新的技术在带来安全优质产品的同时也能有效地控制成本。秉承这一理念，沃特世公司50多年来坚持关注创新，并承诺尽其所能为实验室提供分析技术、原理和实践操作层面的最大帮助。这一切努力全都是为了确保全球各地的货架上都能摆出健康美味的食品和饮料。您可以通过访问[waters.com/food](https://www.waters.com/food)来探索科学世界的无限可能。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

制药与生命科学 | 食品 | 环境 | 临床 | 化工

目录

固相萃取 (SPE) 策略以及操作方法	6
沃特世固相萃取和样品前处理产品介绍	8
样品制备解决方案.....	10
氨基酸分析完整解决方案	11
色谱分离解决方案.....	12

食品中的兽药残留分析 15

Oasis PRiME HLB-UPLC-MS/MS测定猪肉中78种兽药残留	16
Oasis PRiME HLB-UPLC-MS/MS测定牛奶中72种兽药残留	23
快速、简单、有效地净化牛肝样品用于多兽药残留UPLC-MS/MS分析.....	30
使用UPLC-MS/MS检测肉制品中常见的 β -受体激动剂的残留量	33
ACQUITY UPLC/Xevo TQ-S同时测定猪尿液中的21种 β -受体激动剂.....	35
QuEChERS-UPLC-MS/MS快速测定鸡肝中七种磺胺类药物残留	37
蜂王浆中18种磺胺残留量的测定	39
环境水样中16种磺胺类抗生素和甲氧苄氨嘧啶残留分析	41
Oasis PRiME HLB-UPLC-MS/MS测定水产品中氯霉素	43
蜂蜜中氯霉素的分析	45
蜂蜜中头孢唑啉、头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢唑肟残留量的测定	46
动物性食品中糖皮质激素类兴奋剂的测定.....	47
液相色谱-质谱联用测定乳及乳制品中29种性激素	49
牛奶中六种青霉素类抗生素残留分析	51
牛奶中大环内酯类抗生素残留分析	52
肉类和牛奶中的氨基糖苷类抗生素	53
使用QuEChERS方法检测膳食和牛奶中的阿维菌素类	55
鸡肉中的恩诺沙星(BAYTRIL).....	57
牛奶中四环素、土霉素、金霉素、强力霉素残留分析	58
鱼肉中孔雀石绿的分析.....	59
2.7 μ m CORTECS [®] C ₁₈ +色谱柱在HPLC系统分离18种磺胺类药物.....	60
牛奶中的青霉素、四环素和磺胺类药物	63

农药和污染物 64

采用Oasis [®] PRiME HLB通过式净化方式、LC/MS/MS方法测定动植物源性食品中多种农药残留	65
应用Oasis PRiME HLB小柱快速有效地净化高脂肪基质的鳄梨样品后进行APGC-MS/MS分析	67
使用DisQuE净化和Xevo TQ-S进行蔬菜中多种农药残留筛查分析.....	70
蔬菜水果中农药多残留分析.....	71

[目 录]

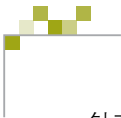
使用QuEChERS-UPLC/MS/MS分析婴幼儿食品中的多农残.....	72
茶叶中的农药多残留分析：在QuEChERS方法萃取后优化净化流程，进行UPLC-MS/MS和GC-MS/MS分析.....	74
使用QuEChERS检测牛肉中的有机磷农药	78
利用CORTECS UPLC HILIC色谱柱进行土豆与小麦中百草枯与敌草快的UPLC-MS/MS测定	79
蔬菜水果中氨基甲酸酯类农药多残留分析(柱后衍生法).....	80
土豆中苯胺灵残留的分析	82
对苯并咪唑类杀真菌剂多组分残留的检测.....	83
橙汁中的多菌灵和其它康唑类杀菌剂	84
饮用水中草甘膦的分析.....	87
饮用水中的敌草快和百草枯.....	88
Oasis® PRiME HLB净化及UPLC-MS/MS检测鸡蛋和鸡肉中的氟虫腈及其代谢物的残留	90
使用QuEChERS检测婴幼儿食品和婴儿配方奶粉中的双酚A、B和E.....	93
水和动物组织中辛烷磺酸(PFOS)的分析.....	95
使用液相荧光光谱法快速检测多环芳烃(PAHS)，确保海产品的安全	97
沃特世食品中18种邻苯二甲酸盐UPLC/MS/MS分析解决方案	99

食品测试和质量控制(QC) 101

同时测定食品中6种甜味剂和防腐剂的方法.....	102
软饮料的快速分析.....	104
食品中10种合成着色剂同时检测的方法	105
婴幼儿乳粉中的核苷酸分析	108
牛磺酸牛乳和婴幼儿配方食品中氨基酸分析.....	109
UPLC测定烟叶中的氨基酸含量.....	110
动物饲料水解产物中的氨基酸	112
啤酒生产中的氨基酸	113
掺假菠萝汁中的橙皮甙.....	114
食品和膳食补充剂中的大豆异黄酮	115
水溶性维生素、咖啡因和食用色素	117
烘烤和油炸食品中丙烯酰胺的分析	118
饮料中4-甲基咪唑和2-甲基咪唑分析方法.....	119

违禁添加物和生物毒素分析 120

Oasis PRiME HLB-DisQuE QuEChERS-UPLC-MS/MS测定谷物中真菌毒素	121
使用UPLC和荧光检测器，无需衍生反应的黄曲霉素快速分析.....	123
花生中的黄曲霉素B1,B2,G1,G2的分析	124
乳和乳制品中黄曲霉毒素M1的测定(LC-MS).....	125
苹果汁中棒曲霉素(展青霉素)的分析.....	126
水体中微囊藻毒素的分析.....	127



针对鸡肉中利巴韦林测定的沃特世整体解决方案 128

使用Oasis MCX净化和 UPLC/MS/MS分析鸡肉中金刚烷胺 129

婴幼儿配方奶粉和液态奶中三聚氰胺和三聚氰酸含量测定 130

乳及乳制品中L-羟脯氨酸残留的测定 132

火锅底料中的罂粟壳分析 133

辣椒产品中苏丹红的分析 135

应用文献索引 137

多农药残留分析 137

污染物分析 137

兽药残留分析 138

水分析 138

食品功能组分分析 139

生物毒素分析 139

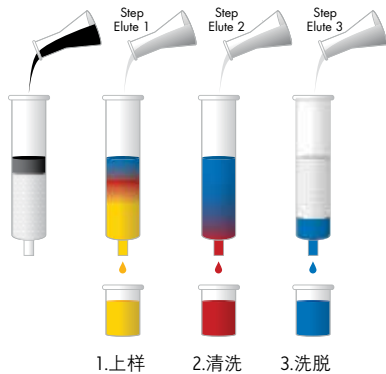
POPs(持久性污染物) 分析 139

固相萃取(SPE)一般有三个策略：

1.保留-清洗-洗脱策略：

被测物首先在吸附剂上吸附，随后用弱清洗剂除去基质干扰。最后，被测物被强溶剂洗脱。被测物的洗脱体积小于上样体积，这被称为样品富集。

- 样品上样到固相提取吸附剂上，被测物保留在吸附剂上
- 干扰基质被清洗
- 被测物被洗脱



2.通过净化策略：

被测物无保留的直接通过吸附剂，而干扰基质保留在吸附剂上。运用该策略没有样品富集效果。

- 样品直接通过吸附剂，没有富集作用
- 干扰基质保留在吸附剂上



样品量	小柱规格(以Oasis®为例)
1 - 10 mL	1 cc/30 mg 或者 3 cc/60 mg
10 - 100 mL	3 cc/60 mg 或者 6 cc/200 mg
100 - 500 mL	6 cc/200 mg 或者 6 cc/500 mg (LP)
500 - 1000 mL	6 cc/500 mg (LP) 或者 12 cc/1 g (LP)

表格1. SPE小柱规格选择指南。 LP=大颗粒(60 μm)。

3.基质分散策略：

- 吸附剂粉末加入样品后振摇
- 样品过滤和离心
- 上清液收集后分析



样品分离净化的具体步骤

1.样品的预处理

固体样品(土壤，组织，等等)

- 振摇，超声或者索氏提取
 - 用极性有机溶剂(甲醇，乙腈)提取样品中的极性化合物
 - 用非极性有机溶剂(二氯甲烷，丙酮)提取样品中的非极性的化合物

非水的液体

- 如果这个样品可溶于水，用水稀释它后上样于反相模式(或者混合模式)的SPE
- 如果这个样品可溶于正己烷，用正己烷稀释后上样于正相SPE

废水

- 根据需要过滤或者离心

2.平衡步骤

就反相吸附剂而言，需要用有机溶剂(例如甲醇，乙腈，异丙醇或四氢呋喃)对吸附剂做预处理以得到重现的结果。如果没有这一步，水溶液不能完全进入吸附剂孔内和浸湿表面。因此，只有一小部分表面积可与分析物相互作用。相同原理，对于硅胶基质吸附剂，在整个流程中不能让吸附剂干涸是非常重要的。反相吸附剂的整个平衡步骤包括用有机溶剂活化吸附剂和用水或缓冲盐等平衡吸附剂。

3.上样步骤

当吸附剂不能保留被测物时，这被称为穿透。如遇以下情况，穿透会在上样步骤发生：

- 用高比例有机溶剂上样极性化合物。解决办法是在上样之前将样品用水稀释至含有有机溶剂<10%。
- 被测物和蛋白结合，将穿透吸附剂。通过将样品酸化或碱化确保被测物不与蛋白结合。
- 吸附剂因基质而过载。因此，选择正确规格的吸附剂(参阅表格1或表格2)是重要的。
- 如果上样的流速太快。被测物和吸附剂之间没有足够的接触时间。观测并且调整真空，以便你看见分离的小滴，并非一连串液体。

样品量	小柱规格(以Spe-Pak为例)
10 - 100 mL	3 cc/200 mg 或者 6 cc/500 mg
100 - 500 mL	3 cc/200 mg 或者 6 cc/500 mg (LP)
500 - 1000 mL	6 cc/500 mg (LP) 或者 12 cc/1 g

表格2. SPE小柱规格选择指南。 LP=大颗粒(60 μm)。

4. 清洗步骤

清洗被保留在吸附剂上的比被测物保留弱的干扰杂质，并且冲洗上样带来的干扰基质。理想的清洗溶剂能除去所有干扰物而对被测物的保留和回收没有影响。因此，清洗溶剂必须强度适中，介于上样和洗脱溶剂之间。

5. 洗脱步骤

洗去干扰物后，用强洗脱剂洗脱被测物。需要精确控制洗脱溶剂的量和流速以确保重现性的结果 (参见表格3)。

	反相模式	正相模式	离子交换模式
目标分析物性质	低至中等极性/疏水性	中等至强极性/不带电荷	带电荷/可离子化
样品基质	水性样品	非极性有机溶剂	水性样品/离子强度低
活化/平衡步骤	1. 有机溶剂活化 2. 水平衡	非极性有机溶剂	低离子强度的缓冲溶液
清洗步骤	水相缓冲溶液	非极性溶剂	低离子强度的缓冲溶液
洗脱步骤	逐步提高极性有机溶剂的比例	逐步提高中等至强极性有机溶剂比例	更强的缓冲溶液-离子强度更高或者通过调节pH值来中和电荷

表格3. 不同SPE分离模式选择指南。

沃特世LC/MS检验合格样品瓶

业界唯一经LC/MS认证的样品瓶

沃特世公司深知高品质样品瓶对LC/MS分析的重要性，因此我们专门为MS用户提供LC/MS检验合格样品瓶，所有样品瓶都经过MS检验，符合对离子总数和高质量范围离子簇的规格要求。所推出的产品比我们测试过的全球供应商的任何一种产品都更洁净。

使用专业认证的样品瓶，能够避免下面的问题对分析结果的影响：

- LC图谱中的“鬼峰”以及MS图谱中无法解释的质量数峰；
- 密封垫脱落；
- 进样针损坏。

去活玻璃样品瓶 (DV) 和内插管



在进行生物样品、药物、天然产物、杀虫剂或除草剂分析时，可有效避免样品瓶对目标化合物的吸附作用。其表面改性是永久性的，无有效期限限制。

沃特世全部回收样品瓶



专门设计用于侧取样口进样针设计，以及沃特世Alliance® 2690/2695HPLC系统的出厂针头取样深度设置。此样品瓶具有最大的样品容量 (约1mL) 和最小的残留体积 (约9 µL)。

沃特世最大回收样品瓶



专门设计用于ACQUITY UPLC®和Alliance HT HPLC系统的底部取样口进样针设计。此样品瓶具有最大的样品容量 (约1.5 mL) 和最小的残留体积。9 mm瓶盖也适合用于其他品牌的HPLC和GC系统。

最新沃特世样品瓶选择软件

根据您的仪器系统和应用要求，帮助您快捷迅速地选择最合适的样品瓶！

输入包括系统类型、样品体积、检测方法以及目标分析物是否对光敏感的信息，软件会自动帮您选择出合适的样品瓶！同时沃特世将会将最新的软件更新信息以及产品信息及时发给注册用户！

欲了解更多的沃特世专业认证样品瓶信息，或者下载免费的样品瓶选择软件，请登陆 www.waters.com/vials。



Oasis 产品系列

传统 C_{18} 固相萃取产品具有下述难以解决的问题，包括硅羟基活性；吸附剂害怕“干涸”；pH局限性以及极性分析物或代谢物的“不保留”问题等，这些问题会造成分析结果重现性不好以及回收率差。Oasis® 系列产品以其高洁净度、高重现性和稳定性以及独特的保留特性独树一帜，确保用户开发出耐用的SPE方法。

- 固相萃取著名品牌
- 小柱、96孔板和 μ Elution板多种产品形式
- 吸附剂为共聚物，不怕“干涸”，重现性好
- 比传统 C_{18} 小柱载容量高3倍，解决了极性化合物保留的问题



Oasis 2x4方法 - 最简便, 快捷, 干净的SPE方法开发策略

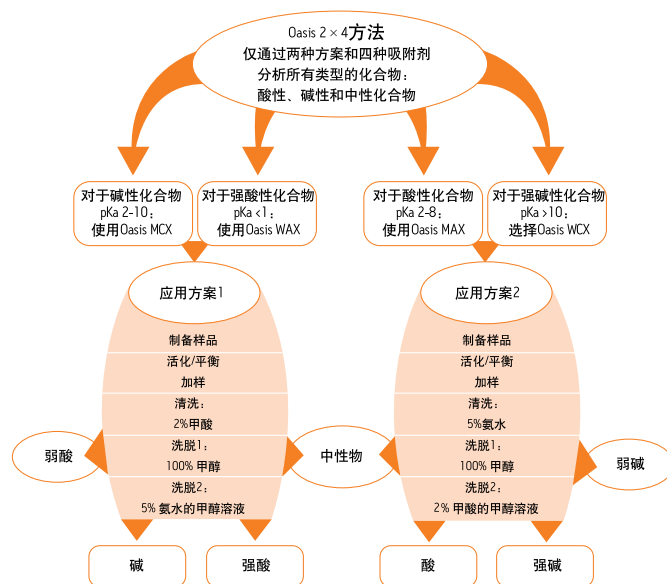
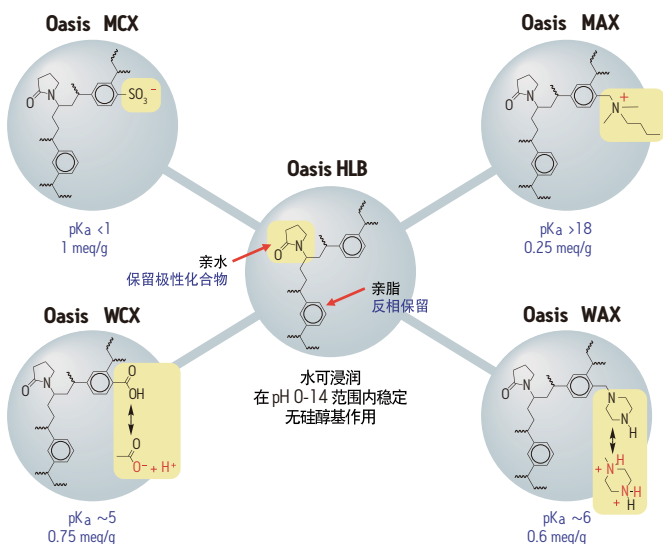
- 确定目标化合物的性质(根据结构和pKa值判断目标化合物是酸, 碱, 或中性?)
- 根据目标化合物的性质选择四种Oasis吸附剂中的一种

MCX 碱性化合物 (pKa 2-10) 选择 MCX(复合模式: 强阳离子交换和反相保留机理)

WCX 强碱性化合物 (pKa >10, 如季铵盐) 选择WCX(复合模式: 弱阳离子交换和反相保留机理)

MAX 酸性化合物 (pKa 2-8) 选择MAX(复合模式: 强阴离子交换和反相保留机理)

WAX 强酸性化合物 (pKa <1, 如磺酸) 选择WAX(复合模式: 弱阴离子交换和反相保留机理)



Sep-Pak[®]

Sample Extraction Products

- 传统的SPE相
- 产品形式多样
- 存在各类参考文献和可借鉴的有效方法
- 通过经认证的Sep-Pak提取小柱可获得超低量的可萃取物
- 更小的干扰和更高的灵敏度



Sep-Pak 固相萃取小柱的便捷设计和功能克服了传统小柱液-固萃取的程序困难，使固相萃取的巨大优势得以实现。智能的产品设计、合理的产品管理和严格的质量测试保证了吸附剂和填充层的优质、可重复性、多功能性和使用便捷性。

Sep-Pak小柱分离模式选择指南

分离模式	正相	反相	离子交换
吸附剂	Silica, Florisil, Alumina, Diol, NH ₂ , CN	C ₁₈ , tC ₁₈ , C ₈ , Diol, PoraPak, RDX, NH ₂ , CN	Accell Plus QMA, Accell Plus CM, NH ₂
吸附剂极性	高	低	高
使用溶剂极性范围	低到中等极性	中等极性到高极性	高极性
样品上样溶剂	正己烷, 甲苯, 二氯甲烷	去离子水	水或者缓冲盐
洗脱溶剂	乙酸乙酯, 丙酮, 乙腈	甲醇, 乙腈, 二氯甲烷	缓冲盐, 高离子强度盐溶液
样品洗脱顺序	低极性物质先流出	高极性物质先流出	离子交换力弱的物质先流出
可改变溶剂强度洗脱被保留物质	增加溶剂极性	降低溶剂极性	增加离子强度或者增加PH值 (阴离子交换)

DisQuE™

Dispersive Sample Preparation

- 方法实施简便, 几乎不需任何培训即可上手
- 符合AOAC和CEN果蔬农药残留测定官方方法
- 成本效益高
- 以简单的试剂盒形式提供可靠的高质量产品

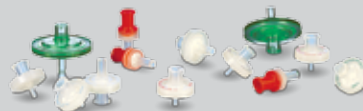


DisQuE分散样品制备试剂盒

分散样品制备通常称为“QuEChERS”，是一种简单、直接的样品制备技术，适用于多种食品和农产品中的多残留农药分析。沃特世的DisQuE™分散样品制备试剂盒含有包装便利的离心管，管内有预先称量的吸附剂和缓冲液，专为配合AOAC和欧洲标准化委员会(CEN)官方方法使用而设计。DisQuE分散样品制备技术是一种经充分验证的、可用于宽范围农药残留分析的高通量样品制备方法。

过滤器

过滤步骤可以为分析系统组件提供即时的保护，同时还能最大程度缩短停工时间。沃特世与Pall Life Sciences合作开发了通过合规性认证的过滤产品，其设计和开发均符合法规要求和质量目标。



认证样品瓶

样品瓶是样品制备的一个关键部分，在使用时应确保其中不会引入不必要的污染和干扰物。沃特世提供了各种各样的认证样品瓶选择，包括TruView LCMS认证样品瓶，经测试可以最大程度提高LC/UV/MS和LC/MS的灵敏度并改善检测限。这些样品瓶不会对您的测试结果产生任何不利影响；并且还能避免鬼峰、隔片移位和进样针的损坏。



分析标准品和试剂

沃特世非常清楚优质的分析标准品和试剂对于确保分析仪器不断进步、工作流程取得成功的重要性。这正是沃特世提供高纯度、精确配制、可重现和可追溯至具体参数的标准品和试剂的原因。无论是系统性能标准品还是特定于应用的标准品，您都可以依赖于领先的分析仪器创新者——沃特世。



AccQ•Tag™ Ultra

UPLC® Amino Acid Analysis

UPLC®氨基酸分析解决方案包括：

- Waters ACQUITY UPLC®系统和可变波长紫外检测器
- 全系统和应用级支持文档
- 特定应用的性能校验
- Connections INSIGHT®远程智能服务
- Empower® 2软件的预配置项目、方法和报告格式
- AccQ•Tag™ Ultra衍生化学品，包括色谱柱、试剂和洗脱液



氨基酸分析

氨基酸组成是体现食品和饲料营养价值的关键部分。氨基酸的定性和定量分析是为了确定蛋白质的浓度并对其进行鉴定，或根据特定商品的游离氨基酸含量，确认天然产品的来源。在食品安全测试中，氨基酸分析可确定加工食品是否缺乏蛋白质，以及检测出掩盖了实际蛋白质含量的掺假食品。

氨基甲酸酯分析试剂盒

该试剂盒内含有沃特世氨基甲酸酯色谱柱、Oasis HLB/小柱、样品瓶和参比标准品，经优化可简化分析过程，并提高结果的可靠性。



饮料分析试剂盒

该试剂盒用于分析含有乙酰磺胺酸钾(安赛蜜)、糖精、咖啡因、苯甲酸盐、山梨酸酯和阿斯巴甜的软饮料配方，经设计可提高实验室工作效率、改善数据质量、最大程度降低成本和增加产品一致性。可配合HPLC和UPLC系统使用。



三聚氰胺分析套装

这类分析套装以美国食品药品监督管理局(US FDA)实验室信息公告第4422号为基础，提供了一种用于筛查食品(包括婴儿配方奶粉和乳制品)中三聚氰胺及其相关化合物的综合解决方案。提供有HPLC和UPLC两种方案可选。



色谱柱选择指南

沃特世一直致力于材料科学研究，凭借对HPLC和HPLC色谱柱填料的不懈钻研，我们开发出了各种突破性的色谱柱技术。随着不同科学挑战的出现，沃特世始终以创新的色谱柱技术来满足不断变化的市场需求。



XSelect®	
C ₁₈	<p>选择性特征：通用型反相色谱柱，为方法开发提供了杰出的pH稳定性并可实现快速的流动相再平衡。表面带电杂化颗粒(CSH™)技术可得到完美的峰形，提高了碱性化合物加载量。</p> <p>键合：三官能化C₁₈配体，完全封端，与CSH颗粒键合。</p>
CSH 苯己基	<p>选择性特征：与通用型互补的选择性配体，可提供与多环芳烃化合物之间的π-π相互作用，并且在pH极值下能保持出色的重现性。CSH技术可获得完美的峰形，提高了碱性化合物加载量。</p> <p>键合：三官能化C₆苯基配体，完全封端，与CSH颗粒键合。</p>
CSH 氟苯基	<p>选择性特征：通用型色谱柱，拥有非常高的分离选择性，尤其是在使用低pH值流动相时。CSH技术可获得完美的峰形，提高了碱性化合物加载量。</p> <p>键合：三官能化丙基氟苯基配体，未封端，与CSH颗粒键合。</p>
HSS C ₁₈	<p>选择性特征：高性能C₁₈填料，保留时间更长，峰形完美，在低pH值下耐酸水解。专为需要硅基C₁₈选择性的UPLC分离而设计。</p> <p>键合：高覆盖率三官能化C₁₈，完全封端，与高强度硅胶(HSS) HPLC颗粒 键合。</p>
HSS C ₁₈ SB	<p>选择性特征：独特的未封端C₁₈填料，专为方法开发科学家而设计。在低pH值条件下使用时，可表现出独特的碱选择性(SB)，并且可在UPLC和HPLC之间进行转换。</p> <p>键合：三官能化键合C₁₈中等覆盖率，未封端，与HSS HPLC颗粒键合。</p>
HSS T3	<p>选择性特征：水性流动相兼容HPLC色谱柱，拥有杰出的保留性能。不仅具有对极性化合物的保留能力，还可在UPLC和HPLC分离之间进行转换。</p> <p>键合：T3(C₁₈)键合和封端，与HSS HPLC颗粒键合。</p>



XBridge®	
C ₁₈	<p>选择性特征：通用型色谱柱，由于其在极限pH下的稳定性和对多种化合物的广泛适用性，是方法开发的理想选择。</p> <p>键合：三官能化键合C₁₈，完全封端，与亚乙基桥杂化(BEH)颗粒键合。</p>
Shield RP18	<p>选择性特征：与直链C₁₈相比具有互补选择性，尤其是对于酚类分析物。与100%水相组分兼容。</p> <p>键合：单官能化内嵌极性C₁₈，完全封端，与亚乙基桥杂化颗粒键合。</p>
C ₈	<p>选择性特征：通用型色谱柱，由于其在pH极值下的稳定性和对多种化合物的广泛适用性，是方法开发的理想选择。</p> <p>键合：三官能化C₈，完全封端，与BEH颗粒键合。</p>
Phenyl	<p>选择性特征：出色的方法开发色谱柱，可提供互补选择性，尤其适合多环芳烃化合物。相对于其他苯基键合相，具有独特的pH稳定性。</p> <p>键合：三官能化C₆苯基，完全封端，与BEH基质键合。</p>
HILIC	<p>选择性特征：对于强极性、碱性、水溶性分析物具有出色的保留性能。专用于使用高浓度有机溶剂流动相的HILIC分离，并已经过测试。</p> <p>键合：未与BEH基质键合。</p>

XBridge(续)

Amide

选择性特征: 稳定的HILIC固定相, 设计用于分离多种强极性化合物。尤其适用于在高温和高pH值下, 使用高浓度有机改性剂分离碳水化合物(糖类)。兼容所有现代检测器, 包括MS、ELSD、紫外和荧光检测器。

键合: 三官能化酰胺基, 与BEH颗粒键合。



Atlantis®

T3

选择性特征: 可保留极性化合物, 兼容100%的水性流动相, 在低pH值条件下具有出色的稳定性。专为增强极性分析物保留性能而设计。

键合: T3 (C₁₈)键合和封端, 与高纯度硅胶基质键合。

HILIC

选择性特征: 对于强极性、碱性、水溶性分析物具有出色的保留性能。专用于使用高浓度有机溶剂流动相的HILIC分离, 并已经过测试。

键合: 未键合高纯度硅胶基质。

C₁₈

选择性特征: 可保留极性化合物。经设计可兼容100%的水性流动相。

键合: 双官能化C₁₈键合, 完全封端, 与高纯度硅胶基质键合。



SunFire®

C₁₈

选择性特征: 通用型方法开发色谱柱。具有非常高的加载量, 尤其适用于低pH流动相中的碱性分析物, 是纯化和杂质分析的理想选择。

键合: 双官能化C₁₈, 完全封端, 与高纯度硅胶基质键合。

C₈

选择性特征: 通用型方法开发色谱柱。具有非常高的加载容量, 尤其适用于低pH流动相中的碱性分析物。其疏水性较弱, 因此对大多数分析物的保留能力不及C₁₈。

键合: 双官能化C₈, 完全封端, 与高纯度硅胶基质键合。



ACQUITY UPLC®

CSH C₁₈

选择性特征: 通用型反相色谱柱, 为方法开发提供了杰出的pH稳定性并可实现快速的流动相再平衡。表面带电杂化颗粒(CSH)技术可得到完美的峰形, 提高了碱性化合物加载量。

键合: 三官能化C₁₈配体, 完全封端, 与CSH颗粒基质键合。

CSH
Phenyl-Hexyl

选择性特征: 与通用型互补的选择性配体, 可提供与多环芳烃化合物之间的 π - π 相互作用, 并且在pH极值下能保持出色的重现性。CSH技术可获得完美的峰形, 提高了碱性化合物加载量。

键合: 三官能化C₆苯基配体, 完全封端, 与CSH颗粒基质键合。

CSH
Fluoro-Phenyl

选择性特征: 通用型色谱柱, 拥有非常高的分离选择性, 尤其是在使用低pH值流动相时。CSH技术可获得完美的峰形, 提高了碱性化合物加载量。

键合: 三官能化丙基氟苯基配体, 未封端, 与CSH颗粒基质键合。

BEH C₁₈

选择性特征: 通用型色谱柱, 由于其在pH极值下的稳定性和对多种化合物的广泛适用性, 是方法开发的理想选择。

键合: 三官能化C₁₈, 完全封端, 与亚乙基桥杂化(BEH)基质键合。

BEH Shield RP18

选择性特征: 与直链C₁₈相比具有互补选择性, 尤其是对于酚类分析物。与100%水相组分兼容。

键合: 单官能化内嵌极性C₁₈, 完全封端, 与BEH基质键合。

ACQUITY UPLC(续)

BEH C ₈	选择性特征: 通用型色谱柱, 由于其在pH极值下的稳定性和对多种化合物的广泛适用性, 是方法开发的理想选择。 键合: 三官能化C ₈ , 完全封端, 与BEH基质键合。
BEH 苯基	选择性特征: 出色的方法开发色谱柱, 可提供互补选择性, 尤其适合多环芳烃化合物。对于苯基键合相具有独特的pH稳定性水平。 键合: 三官能化C ₆ 苯基, 完全封端, 与BEH基质键合。
BEH HILIC	选择性特征: 对于强极性、碱性、水溶性分析物具有出色的保留性能。专用于使用高浓度有机溶剂流动相的HILIC分离, 并已经过测试。 键合: 未与基质键合。
BEH HSS C ₁₈	选择性特征: 超性能C ₁₈ 填料, 保留时间更长, 峰形完美, 在低pH值下耐酸水解。专为需要硅基C ₁₈ 选择性的UPLC分离而设计。 键合: 高覆盖率三官能化C ₁₈ , 完全封端, 与高强度硅胶(HSS) UPLC颗粒基质键合。
BEH Amide	选择性特征: 稳定的HILIC固定相, 设计用于分离多种强极性化合物。尤其适用于在高温和高pH值下, 使用高浓度有机改性剂分离碳水化合物(糖类)。兼容所有现代检测器, 包括MS、ELSD、紫外和荧光检测器。 键合: 三官能化酰胺, 与BEH基质键合。
HSS C ₁₈	选择性特征: 超性能C ₁₈ 填料, 保留时间更长, 峰形完美, 在低pH值下耐酸水解。专为需要硅基C ₁₈ 选择性的UPLC分离而设计。 键合: 高覆盖率三官能化C ₁₈ , 完全封端, 与HSS UPLC颗粒基质键合。
HSS C ₁₈ SB	选择性特征: 独特的未封端C ₁₈ 填料, 专为方法开发科学家而设计。在低pH值条件下使用时, 可表现出独特的碱选择性(SB)。 键合: 中等覆盖率三官能化键合C ₁₈ , 未封端, 与HSS UPLC颗粒基质键合。
HSS T3	选择性特征: 水性流动相兼容UPLC色谱柱, 拥有杰出的保留性能。不仅具有对极性化合物的保留能力, 还可充分发挥UPLC的效率与性能。 键合: T3 (C ₁₈)键合和封端, 与HSS UPLC颗粒基质键合。

食品测试专用色谱柱

除了整个UPLC和HPLC色谱柱填料产品系列, 沃特世还提供了已针对特定食品测试分析进行优化的色谱柱。这类色谱柱是发酵分析、有机酸、酒精和碳水化合物、甘油三酸酯和胆固醇分析以及脂肪酸分析的理想之选。



保护柱

VanGuard™预柱、Sentry™保护柱和Guard-pak™柱芯可通过清除样品中的污染物, 延长色谱柱的使用寿命, 为您带来更高的重现性和性能。它们采用了与沃特世分析柱相同的高性能固定相。



食品中的兽药残留分析

对动物使用兽药是为了预防或治疗疾病, 帮助疾病或损伤的恢复, 还可以促进动物的生长。肉类、牛奶或其它供人类摄入的产品中存在这些药物或其代谢物将对人类健康构成严重的威胁。

例如, 氯霉素的残留可在易感个体中导致再生障碍性贫血。此外, 对于长时间摄入低水平抗生素后出现抗生素耐药性也存在着担忧。本章中的部分应用涉及分析在特定食品中禁止存在的抗生素。其它一些药物尽管允许使用, 但必须符合停药期规定, 以确保食品的安全性。本章还将介绍一些用于促进生长的化合物以及不同种类兽药的多残留分析。



简介

本实验使用一种新型固相萃取小柱(Oasis PRiME HLB)处理猪肉样品,建立猪肉中多兽药残留同时检测的分析方法。猪肉样品经80%乙腈水溶液提取, Oasis PRiME HLB固相萃取小柱通过式净化, UPLC®-MSMS检测。结果表明, 磺胺类、喹诺酮类、-受体激动剂类、大环内脂类、糖皮质激素类、氯霉素类、头孢类、青霉素类、性激素类等常见的9大类, 共78种兽药回收率在50~130%, 精密度RSD<20%(n=3)。该方法简单、快速、准确, 适合猪肉中多兽药残留的筛查分析。

应用优势

通过使用Oasis® PRiME HLB这种独特填料的SPE技术, 第一次实现了猪肉组织中多种兽药同时分析的样品处理方法。

采用通过式的SPE净化策略, 使得样品处理过程简单、方便、快速。该方法能清除掉样品中99%的磷脂类基质干扰物, 使得质谱分析的基质效应降到最低, 从而得到更稳定的数据结果、更长的色谱柱生命周期、更少的仪器维护和宕机时间。

样品处理

取生鲜猪肉2.50 g, 加入80%乙腈水溶液10 mL, 旋涡震荡萃取1 min, 超声波萃取3 min, 10000 r/min高速离心5 min, 取5 mL上清液直接加载到6 cc规格 PRiME HLB固相萃取柱, 无需活化和平衡, 保持一秒一滴的流速, 收集全部流出液。取4.00 mL流出液在40 °C下氮气吹至小于0.5 mL, 残留液体用10%甲醇水溶液定容至1.00 mL, 过0.2 μm微孔滤膜, 上LCMSMS测试。

UPLC条件

系统:	Waters ACQUITY UPLC I-Class FTN
色谱柱:	Waters BEH C ₁₈ 色谱柱 (2.1 x 100mm, 1.7 μm)
流动相:	母液, 1 mol/L乙酸铵溶液, pH=5; A:母液稀释100倍的水溶液; B:母液稀释100倍的甲醇溶液
梯度:	0到0.25 min, 2% B; 0.25到12.25 min, 2% B升至99% B; 12.25 min到13.00 min, 99% B; 13.00到13.01 min, 99% B到2% B; 13.01到17 min, 2% B
流速:	0.45 mL/min
柱温:	45 °C
样品温度:	10 °C
进样量:	5 μL

质谱条件

系统:	Waters Xevo TQ-S
离子源:	ESI+
采集方式:	MRM
毛细管电压:	3.5 kV
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	600 °C
脱溶剂气流速:	1000L/h
锥孔气:	150L/h
碰撞气流速:	0.15mL/min
MRM条件见表1。	

仪器方法开发

多残留分析的仪器方法开发费时耗力, 且常常带来实验室间方法开发的差异, 导致实验室间检测结果的差异。本实验UPLC/MSMS方法的建立使用的QUANPEDIA数据库。库中包含了1000多种化合物的LC-MS/MS方法, 这些化合物包含了几乎所有的食品检测所要求的农、兽药种类。QUANPEDIA数据库能够提供现成的仪器方法数据, 包括各化合物的从液相条件、采集方法到定量处理方法的完整的方法包供实验人员调用, 免去用户的方法开发流程, 最大程度的减少了方法开发的难度和误差, 减少实验室的工作量和时间、金钱成本。



ACQUITY UPLC系统与Xevo TQ-S联用

中文名	英文名	离子化方式	离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
磺胺苯吡唑	Sulfaphenazole	ESI+	315.00 > 108.00	20	25
		ESI+	315.00 > 156.00	20	18
磺胺苯酰	Sulfabenzamide	ESI+	277.10 > 92.00	30	25
		ESI+	277.10 > 156.00	30	15
磺胺醋酰	Sulfanilacetamide	ESI+	215.00 > 91.80	20	22
		ESI+	215.00 > 156.00	20	13
磺胺恶唑	Sulfamoxol	ESI+	268.00 > 91.80	20	26
		ESI+	268.00 > 155.90	20	15
磺胺二甲基嘧啶	Sulfamethazine	ESI+	279.10 > 124.10	35	25
		ESI+	279.10 > 186.00	35	15
磺胺甲恶唑	Sulfamethoxazole	ESI+	254.10 > 92.00	30	25
		ESI+	254.10 > 156.00	30	15
磺胺甲二唑	Sulfamethizole	ESI+	271.10 > 92.00	30	25
		ESI+	271.10 > 156.00	30	15
磺胺甲氧哒嗪	Sulfamethoxy pyridazine	ESI+	281.10 > 92.00	35	25
		ESI+	281.10 > 156.00	35	15
磺胺甲氧嘧啶	Sulfamer	ESI+	281.00 > 91.80	20	27
		ESI+	281.00 > 155.90	20	15
磺胺甲嘧啶	Sulfamerazine	ESI+	265.10 > 92.00	35	25
		ESI+	265.10 > 156.00	35	15
磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	ESI+	281.00 > 92.00	35	35
		ESI+	281.00 > 156.00	35	22
磺胺氯吡嗪	Sulfaclozine	ESI+	285.00 > 92.00	20	28
		ESI+	285.00 > 155.90	20	15
磺胺氯哒嗪	Sulfochlorpyridazine	ESI+	285.00 > 92.00	20	28
		ESI+	285.00 > 155.90	20	15
磺胺索嘧啶	Sulfisomidine	ESI+	279.10 > 123.90	20	20
		ESI+	279.10 > 186.00	20	15
磺胺异恶唑	Sulfisoxazole	ESI+	268.00 > 92.00	30	28
		ESI+	268.00 > 156.00	30	13
磺胺吡啶	Sulfapyridine	ESI+	250.00 > 108.00	33	25
		ESI+	250.00 > 156.00	33	16
磺胺喹噁啉	Sulfaquinoxaline	ESI+	301.10 > 92.20	32	30
		ESI+	301.10 > 156.10	32	16
磺胺嘧啶	Sulfadiazine	ESI+	251.00 > 92.00	30	27
		ESI+	251.00 > 156.00	30	15
磺胺噻唑	Sulfathiazole	ESI+	256.00 > 92.00	31	25
		ESI+	256.00 > 156.00	31	15
磺胺脒	Sulfaguanidine	ESI+	215.00 > 91.80	20	22
		ESI+	215.00 > 156.00	20	13
甲氧苄啶	Trimethoprim	ESI+	291.30 > 123.00	40	30
		ESI+	291.30 > 230.20	40	30
氨苯砒	Sulfadione	ESI+	249.00 > 107.85	20	21
		ESI+	249.00 > 155.90	20	14
噁喹酸	Oxolinic acid	ESI+	262.00 > 216.00	32	30
		ESI+	262.00 > 244.00	32	19
达氟沙星	Danofloxacin	ESI+	358.20 > 96.00	38	25
		ESI+	358.20 > 314.10	38	20
恩诺沙星	Enrofloxacin	ESI+	360.30 > 316.30	25	20
		ESI+	360.30 > 342.30	25	20

表1. 各化合物MRM方法。

中文名	英文名	离子化方式	离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
双氟沙星	Difloxacin	ESI+	400.30 > 356.20	30	20
		ESI+	400.30 > 382.20	30	20
氟甲喹	Flumequine	ESI+	262.10 > 202.00	35	35
		ESI+	262.10 > 244.00	35	15
环丙沙星	Ciprofloxacin	ESI+	332.10 > 288.10	42	18
		ESI+	332.10 > 314.10	42	22
洛美沙星	Lomefloxacin	ESI+	352.10 > 265.10	39	22
		ESI+	352.10 > 308.10	39	16
麻保沙星	Marbofloxacin	ESI+	363.10 > 72.00	35	20
		ESI+	363.10 > 320.00	35	15
诺氟沙星	Norfloxacin	ESI+	320.10 > 233.00	40	25
		ESI+	320.10 > 276.10	40	20
培氟沙星	Pefloxacin	ESI+	334.10 > 290.10	42	19
		ESI+	334.10 > 316.10	42	19
沙拉沙星	Sarafloxacin	ESI+	386.20 > 299.10	45	27
		ESI+	386.20 > 342.10	45	18
西诺沙星	Cinoxacin	ESI+	263.20 > 189.10	35	30
		ESI+	263.20 > 245.10	35	15
氧氟沙星	Ofloxacin	ESI+	362.30 > 261.30	25	30
		ESI+	362.30 > 318.30	25	20
伊诺沙星	Enoxacin	ESI+	321.10 > 232.00	40	30
		ESI+	321.10 > 303.10	40	35
萘啶酸	Nalidixic acid	ESI+	233.10 > 187.00	30	25
		ESI+	233.10 > 215.00	30	15
奥比沙星	Orbifloxacin	ESI+	396.10 > 295.10	40	22
克伦特罗	Clenbuterol	ESI+	277.10 > 132.00	25	28
		ESI+	277.10 > 140.00	25	46
莱克多巴胺	Ractopamine	ESI+	302.20 > 164.10	25	15
		ESI+	302.20 > 284.20	25	12
沙丁胺醇	Salbutamol	ESI+	240.20 > 148.10	25	20
		ESI+	240.20 > 222.10	25	12
特布他林	Terbutaline	ESI+	226.10 > 107.00	25	26
		ESI+	226.10 > 125.00	25	26
西马特罗	Cimaterol	ESI+	220.10 > 143.00	25	24
		ESI+	220.10 > 160.10	25	15
妥布特罗	Tulobuterol	ESI+	228.20 > 118.00	30	25
		ESI+	228.20 > 154.10	30	15
氯丙那林	Clorprenaline	ESI+	214.00 > 153.80	20	15
		ESI+	214.00 > 196.00	20	10
红霉素	Erythromycin	ESI+	734.50 > 158.10	30	30
		ESI+	734.50 > 576.50	30	20
吉他霉素	kitasamycin	ESI+	786.40 > 108.86	20	35
		ESI+	786.40 > 174.00	20	30
克林霉素	Clindamycin	ESI+	425.20 > 125.90	20	25
		ESI+	425.20 > 377.20	20	18
林可霉素	Lincomycine	ESI+	407.40 > 126.15	40	25
		ESI+	407.40 > 359.35	40	20
螺旋霉素	Spiramycin	ESI+	422.20 > 101.00	30	20
		ESI+	422.20 > 174.10	30	20
泰乐菌素	Tylosin	ESI+	916.50 > 101.10	60	45
		ESI+	916.50 > 174.10	60	40

表1. 各化合物MRM方法。(续)

中文名	英文名	离子化方式	离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
替米考星	Tilmicosin	ESI+	869.50 > 174.20	25	45
		ESI+	869.50 > 696.50	25	40
倍他米松	Betamethasone	ESI-	361.20 > 307.20	40	18
		ESI-	361.20 > 325.20	40	20
倍氯米松	Beclomethasone	ESI-	453.30 > 377.20	23	15
		ESI-	453.30 > 407.20	23	12
地塞米松	Dexamethasone	ESI+	393.30 > 355.20	20	10
		ESI+	393.30 > 373.20	20	10
甲基泼尼松龙	Methylprednisolone	ESI+	375.20 > 357.30	25	10
可的松	Cortisone	ESI+	361.30 > 163.10	40	25
		ESI+	361.30 > 342.20	40	20
泼尼松	Meprednisone	ESI+	373.20 > 355.10	20	11
		ESI+	373.20 > 357.10	20	12
氢化可的松	Hydrocortisone	ESI+	363.40 > 121.10	35	25
		ESI+	363.40 > 327.30	35	15
泼尼松龙	Prednisolone	ESI+	361.20 > 147.00	25	20
		ESI+	361.20 > 343.20	25	10
曲安奈德	Triamcinolone acetonide	ESI+	435.40 > 397.30	25	15
		ESI+	435.40 > 415.30	25	5
氯霉素	Chloramphenicol	ESI-	321.20 > 152.20	25	15
		ESI-	321.20 > 257.20	25	10
甲矾霉素	Thiamphenicol	ESI-	354.10 > 184.90	20	20
		ESI-	354.10 > 290.00	20	12
氟苯尼考	Florfenicol	ESI-	356.00 > 185.00	30	17
		ESI-	356.00 > 336.00	30	10
头孢噻肟	Cefotaxime	ESI+	456.10 > 167.00	30	20
		ESI+	456.10 > 396.20	30	10
头孢噻呋	Ceftiofur	ESI+	524.20 > 241.10	35	16
头孢匹林	Cephapirin	ESI+	424.20 > 152.00	35	20
		ESI+	424.20 > 292.20	35	16
青霉素 V	Penicillin V	ESI+	351.10 > 114.00	23	35
		ESI+	351.10 > 160.10	23	10
氨苄青霉素	Ampicillin	ESI+	350.20 > 106.00	30	18
		ESI+	350.20 > 160.00	30	12
邻氯青霉素	Cloxacillin	ESI+	436.20 > 160.00	27	15
		ESI+	436.20 > 277.10	27	15
双氯青霉素	Dicloxacillin	ESI+	470.00 > 211.90	40	40
		ESI+	470.00 > 254.00	40	25
左炔诺孕酮	Norgestrel	ESI+	313.20 > 109.00	38	26
		ESI+	313.20 > 245.10	38	18
17-(alpha)-羟孕酮	17-hydroxyprogesterone	ESI+	331.20 > 97.00	32	24
		ESI+	331.20 > 109.00	32	23
勃地龙	Boldenone	ESI+	287.20 > 121.00	25	22
		ESI+	287.20 > 135.00	25	15
群勃龙	Trenbolone	ESI+	271.20 > 199.00	37	22
		ESI+	271.20 > 253.10	37	19
睾酮	Testosterone	ESI+	289.20 > 96.85	38	25
		ESI+	289.20 > 109.00	38	21
甲基睾酮	Methyl testosterone	ESI+	303.20 > 97.00	33	23
		ESI+	303.20 > 109.00	33	23
诺龙	Nandrolone	ESI+	275.10 > 109.00	36	23
		ESI+	275.10 > 257.10	36	15

表1. 各化合物MRM方法。(续)

方法回收率，精密度和保留时间

在空白猪肉中进行添加回收率测定。添加1.0 g/kg, 5.0 g/kg 和10.0 g/kg 3个浓度水平，每个浓度水平添加3个平行样品，按所建立的方法进行测定。定量方法采用空白基质标准曲线，外标法定量。平均加标回收率，精密度和保留时间见表2。

中文名	英文名	1 µg/kg		5 µg/kg		10 µg/kg		保留时间 (min)
		回收率 (%)	RSD(%) n=3	回收率 (%)	RSD(%) n=3	回收率 (%)	RSD(%) n=3	
磺胺苯吡唑	Sulfaphenazole	64.0	8.9	58.7	11.0	72.1	6.3	4.73
磺胺苯酰	Sulfabenzamide	78.9	11.8	69.9	4.5	70.1	4.0	3.48
磺胺醋酰	Sulfanilacetamide	72.2	6.6	75.3	5.6	81.2	4.7	1.71
磺胺恶唑	Sulfamoxol	74.2	7.1	70.2	6.3	74.0	6.4	3.45
磺胺二甲基嘧啶	Sulfamethazine	88.4	2.0	81.0	2.4	87.0	4.5	3.64
磺胺甲恶唑	Sulfamethoxazole	87.4	6.9	78.5	1.7	82.7	3.9	3.82
磺胺甲二唑	Sulfamethizole	90.3	2.4	76.7	5.5	82.3	5.1	3.21
磺胺甲氧哒嗪	Sulfamethoxypyridazine	93.2	1.5	81.6	6.9	83.2	1.3	3.92
磺胺甲氧嘧啶	Sulfameter	80.9	7.4	75.1	6.5	78.2	8.6	3.32
磺胺甲嘧啶	Sulfamerazine	96.5	3.2	81.7	1.3	86.7	1.8	3.02
磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	87.1	3.3	79.0	1.8	82.9	1.8	3.67
磺胺氯吡嗪	Sulfaclozine	72.9	2.9	63.2	4.8	72.8	3.4	4.44
磺胺氯哒嗪	Sulfochlorpyridazine	90.2	7.9	77.0	2.3	78.2	2.6	3.69
磺胺索嘧啶	Sulfisomidine	80.1	5.1	83.8	5.2	83.0	3.9	2.60
磺胺异恶唑	Sulfisoxazole	84.8	7.7	75.8	4.8	78.8	3.0	3.77
磺胺吡啶	Sulfapyridine	82.2	1.7	73.4	2.2	74.6	1.7	2.87
磺胺喹噁啉	Sulfaquinoxaline	75.3	1.9	60.0	22.4	66.4	5.3	5.26
磺胺嘧啶	Sulfadiazine	106.6	8.4	92.1	3.3	92.6	2.2	2.36
磺胺噻唑	Sulfathiazole	83.2	6.8	71.5	3.1	76.8	4.3	2.63
磺胺脒	Sulfaguanidine	90.9	2.0	74.7	1.7	77.8	2.0	0.99
甲氧苄啶	Trimethoprim	83.5	4.6	80.9	6.9	80.7	1.4	3.71
氨苯砜	Sulfadione	-	-	-	-	58.2	7.5	3.27
噁喹酸	Oxolinic acid	94.6	2.9	81.1	2.2	86.3	1.5	5.25
达氟沙星	Danofloxacin	82.6	5.9	81.5	1.6	77.7	1.0	4.18
恩诺沙星	Enrofloxacin	83.6	6.6	75.8	1.9	80.9	1.8	4.98
双氟沙星	Difloxacin	82.5	3.2	66.8	8.4	77.7	3.3	5.52
氟甲喹	Flumequine	77.8	0.5	80.3	1.4	84.9	0.6	6.50
环丙沙星	Ciprofloxacin	75.2	4.4	72.3	2.9	76.3	0.9	3.97
洛美沙星	Lomefloxacin	72.2	2.6	74.5	0.8	77.5	2.7	4.19
麻保沙星	Marbofloxacin	79.8	1.8	78.0	2.0	74.3	1.7	3.64
诺氟沙星	Norfloxacin	90.1	1.7	72.9	3.0	75.5	0.8	3.84
培氟沙星	Pefloxacin	80.1	2.3	76.2	3.2	84.3	0.4	4.54
沙拉沙星	Sarafloxacin	79.9	2.2	65.1	5.3	77.3	2.9	4.46
西诺沙星	Cinoxacin	79.5	5.9	86.7	12.0	82.5	2.1	4.14
氧氟沙星	Ofloxacin	75.1	1.4	74.1	1.8	77.8	2.6	3.93
伊诺沙星	Enoxacin	81.6	2.7	81.7	2.1	77.5	1.1	3.76
萘啶酸	Nalidixic acid	89.9	1.4	82.0	0.5	85.7	0.8	6.24

表2. 各化合物的加标回收率、RSD(n=3)及保留时间。

中文名	英文名	1 µg/kg		5 µg/kg		10 µg/kg		保留时间 (min)
		回收率 (%)	RSD(%) n=3	回收率 (%)	RSD(%) n=3	回收率 (%)	RSD(%) n=3	
奥比沙星	Orbifloxacin	83.9	2.7	74.4	6.5	79.3	2.0	4.31
克伦特罗	Clenbuterol	91.8	5.6	81.5	3.7	86.9	2.9	4.59
莱克多巴胺	Ractopamine	92.7	5.9	86.9	4.3	81.3	2.5	4.03
沙丁胺醇	Salbutamol	85.6	3.1	81.6	3.9	80.6	2.9	2.46
特布他林	Terbutaline	85.3	1.1	79.8	6.3	77.9	4.3	2.32
西马特罗	Cimaterol	92.0	4.0	79.9	2.5	81.8	4.3	2.22
妥布特罗	Tulobuterol	102.3	1.1	86.3	1.1	91.3	4.5	5.04
氯丙那林	Clorprenaline	80.9	1.0	74.4	1.3	77.4	3.2	4.39
红霉素	Erythromycin	79.3	2.6	81.9	4.6	73.6	3.5	7.70
吉他霉素	kitasamycin	83.3	6.5	64.5	17.2	75.4	2.5	8.91
克林霉素	Clindamycin	84.9	5.1	76.9	6.6	81.9	2.2	7.78
林可霉素	Lincomycine	81.5	1.0	77.3	3.0	82.9	2.5	4.03
螺旋霉素	Spiramycin	-	-	66.3	9.3	60.0	4.3	6.53
泰乐菌素	Tylosin	94.1	7.1	77.4	1.6	77.5	0.8	8.03
替米考星	Tilmicosin	81.3	4.9	73.6	6.6	81.7	1.6	7.13
倍他米松	Betamethasone	90.8	8.3	83.3	24.3	94.8	4.8	7.68
倍氯米松	Beclomethasone	-	-	-	-	87.2	2.0	7.80
地塞米松	Dexamethasone	86.0	6.5	82.5	1.8	87.1	5.2	7.67
甲基泼尼松龙	Methylprednisolone	100.8	2.7	82.0	3.0	88.0	0.5	7.80
可的松	Cortisone	-	-	103.9	3.1	89.2	0.8	6.81
泼尼松	Meprednisone	-	-	86.6	1.2	88.3	1.2	7.66
氢化可的松	Hydrocortisone	-	-	-	-	93.1	2.0	7.08
泼尼松龙	Prednisolone	100.7	9.1	81.9	1.1	92.1	0.7	7.07
曲安奈德	Triamcinolone acetonide	68.3	14.7	78.7	5.9	84.3	4.5	7.81
氯霉素	Chloramphenicol	67.0	10.1	64.6	9.2	74.1	1.8	4.89
甲矾霉素	Thiamphenicol	-	-	72.4	20.9	82.2	10.5	3.18
氟苯尼考	Florfenicol	86.7	20.2	57.6	16.6	77.5	1.9	4.00
头孢噻肟	Cefotaxime	96.8	18.8	59.0	4.7	74.0	1.5	3.43
头孢噻呋	Ceftiofur	-	-	58.5	23.4	66.5	5.0	5.18
头孢匹林	Cephapirin	82.6	12.3	68.1	10.1	70.1	19.4	3.78
青霉素 V	Penicillin V	90.7	11.6	83.2	8.3	79.1	0.7	6.17
氨苄青霉素	Ampicillin	61.2	25.6	68.0	4.3	70.7	5.9	3.44
邻氯青霉素	Cloxacillin	69.3	14.9	76.2	7.0	77.6	1.1	6.70
双氯青霉素	Dicloxacillin	-	-	96.7	2.8	75.2	3.5	7.21
左炔诺孕酮	Norgestrel	43.4	5.0	47.8	4.1	40.9	7.2	8.84
17-(alpha)-羟孕酮	17-hydroxyprogesterone	75.8	2.5	71.1	2.5	69.5	3.0	8.73
勃地龙	Boldenone	89.3	3.0	83.1	1.1	80.2	3.2	8.04
群勃龙	Trenbolone	91.7	15.6	70.5	9.2	69.9	5.6	7.82
睾酮	Testosterone	78.8	4.8	73.7	6.0	70.0	4.1	8.53
甲基睾酮	Methyl testosterone	67.0	4.8	67.5	3.3	62.4	2.7	8.87
诺龙	Nandrolone	85.7	2.2	77.5	0.8	76.7	1.1	8.15

表2. 各化合物的加标回收率、RSD(n=3)及保留时间。(续)

结果与讨论

净化效果

猪肉中大量磷脂的存在，极大地干扰目标化合物的分析，同时降低色谱柱寿命，增大仪器系统的维护成本和难度。试验采用Oasis PRiME HLB固相萃取小柱净化样品，能有效去除磷脂等非极性干扰物。同时，采用通过式净化策略也极大地提高了样品分析通量。通过扫描m/z184的母离子，能近似得到磷脂类化合物的含量信息，图1比较了经PRiME HLB净化前后的空白猪肉样品的磷脂监测信息。

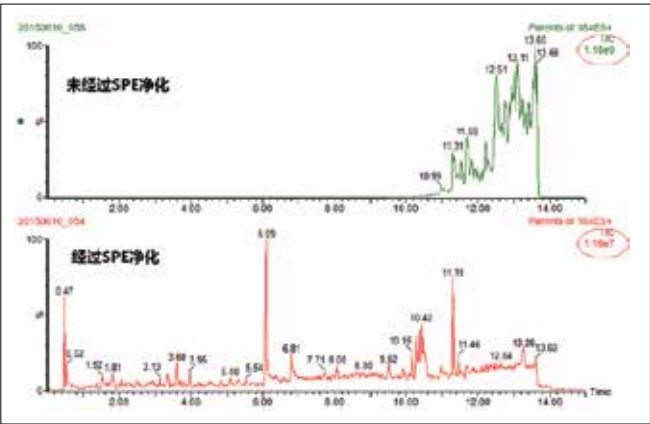


图1. 经PRiME HLB净化前后的空白猪肉样品的磷脂净化效果比较。
注：上图可以看出，经过SPE净化以后的猪肉样品，磷脂类化合物减少99%以上。

实验结论

实验建立了同时测定78种兽药残留的分析方法。分析结果满足猪肉中兽药残留相关法规的限量要求和回收率，精密度要求。

Oasis PRiME HLB是一种新型的反相SPE吸附剂，它能够去除样品中几乎所有的磷脂类非极性干扰物，而且这种柱子使用起来无需活化和平衡，整个实验流程更简单、更快速、更有效，适合大批量日常分析检测。

QUANPEDIA数据库平台包含多兽药残留分析所需要的LC-MS/MS方法，为试验室仪器方法开发带来极大的便利。

订购信息

描述	部件号
Oasis PRiME HLB 6CC /200mg	186008057
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100, 1.7 μm	186002352

简介

本实验使用一种新型固相萃取小柱 (Oasis® PRiME HLB) 处理牛奶样品，建立牛奶中多兽药残留同时检测的检测方法。牛奶样品经酸化乙腈提取并沉淀蛋白，Oasis PRiME HLB固相萃取小柱通过式净化处理，经UPLC®-MSMS检测。对样品前处理过程和液相、质谱条件进行了优化。结果表明，在0.1~10.0 µg/L的添加浓度范围内，磺胺、喹诺酮、β-受体激动剂、大环内脂类、糖皮质激素、氯霉素、头孢、青霉素类，四环素类等常见的9大类，共72种抗生素回收率在50~130%，精密度RSD < 20% (n=5)。该方法简单、快速、准确，适合牛奶中多兽药残留的筛查分析。

应用优势

样品处理方法可以同时净化不同种类的兽药残留。Quanpedia数据库方便LCMSMS方法开发。符合法规要求的方法灵敏度。稳定的回收率和精密度。

样品处理

取鲜牛奶1.00 mL，加入0.2%甲酸乙腈4 mL，旋涡震荡1 min，10000 r/min高速离心5 min，取上清液准备过 PRiME HLB固相萃取柱。取 Oasis PRiME HLB固相萃取小柱，3 mL 80%乙腈清洗*。将上清液上SPE小柱，保持一秒一滴的流速，收集全部流出液，氮气下吹干，1 mL 5%甲醇水溶液定容，过微孔滤膜，上LCMSMS测试。

【*】：Oasis系列SPE小柱不需要活化与平衡，可直接上样。本实验中预先用3 mL 80%乙腈清洗小柱的目的是该方式下不需要使用抽真空，仅在重力作用下即可完成过柱。有负压装置的试验室可省略此步骤，过柱需要2 - 3 psi的负压条件。

仪器条件

液相条件	
色谱柱:	Waters BEH C ₁₈ 色谱柱 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm)
流动相:	A: 10 mM乙酸铵 (PH=5) 水溶液 B: 10 mM乙酸铵 (PH=5) 甲醇溶液
梯度:	0到0.25 min, 2% B; 0.25到 12.25 min, 2% B升至99% B; 12.25 min到13.00 min, 99% B; 13.00到13.01 min, 99% B到 2% B; 13.01到17 min, 2% B
流速:	0.45 mL/min
柱温:	45 °C
样品温度:	10 °C
进样量:	5 µL
质谱条件	
离子源:	ESI+
采集方式:	MRM
毛细管电压:	3.5 kV
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	600 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
锥孔气:	150 L/h
碰撞气流速:	0.15 mL/min

仪器方法的优化

多残留分析的仪器方法开发费时耗力，且常常带来实验室间方法开发的差异，导致实验室间检测结果的差异。本实验UPLC/MSMS方法建立过程使用的Waters QUANPEDIA数据库。库中包含了1000多种化合物的LC-MS/MS方法，这些化合物包含了几乎所有的食品检测所要求的兽药种类。Waters QUANPEDIA数据库能够提供现成的仪器

方法数据包括：各化合物的从液相条件、采集方法到定量处理方法的完整的方法包供实验人员调用，免去用户的方法开发流程，最大程度的减少了方法开发的难度和误差，减少实验室的工作量

和时间、金钱成本。

化合物		电离模式	母离子 (m/z)	CV (V)	碎片离子 (m/z)	CE (V)	RT (min)
西马特罗	Cimaterol	ESI+	220.1	25	143.0	24	2.2
		ESI+	220.1	25	160.1	15	
盐酸克伦特罗	Clenbuterol	ESI+	277.1	25	140.0	46	4.65
		ESI+	277.1	25	168.1	25	
莱克多巴胺	Ractopamine	ESI+	302.2	25	164.1	15	4.21
		ESI+	302.2	25	284.2	12	
沙丁胺醇	Salbutamol	ESI+	240.2	25	148.1	20	2.46
		ESI+	240.2	25	222.1	12	
特布他林	Terbutaline	ESI+	226.1	25	107.0	26	2.33
		ESI+	226.1	25	125.0	26	
妥布特罗	Tilobuterol	ESI+	228.2	30	118.0	25	5.11
		ESI+	228.1	30	154.1	15	
齐帕特罗	Zilpaterol	ESI+	262.2	25	185.1	22	2.41
		ESI+	262.2	25	202.1	18	
克林霉素	Clindamycin	ESI+	425.2	20	125.9	25	7.52
		ESI+	425.2	20	377.2	18	
红霉素	Erythromycin	ESI+	734.5	30	158.1	30	7.74
		ESI+	734.5	30	576.5	20	
吉他霉素	kitasamycin	ESI+	786.4	20	108.9	35	9.09
		ESI+	786.4	20	174.0	30	
林可霉素	Lincomycin	ESI+	407.4	40	126.2	25	3.86
		ESI+	407.4	40	359.4	20	
螺旋霉素	Spiramycin	ESI+	422.2	30	101.0	20	6.36
		ESI+	422.2	30	174.1	20	
替米考星	Tilmicosin	ESI+	869.5	25	174.2	45	7.17
		ESI+	869.5	25	696.5	40	
泰乐菌素	Tylosin	ESI+	916.5	60	101.1	45	7.89
		ESI+	916.5	60	174.1	40	
土霉素	Oxytetracycline	ESI+	460.7	34	426.2	18	4.28
		ESI+	460.7	34	444.2	18	
四环素	Tetracycline	ESI+	444.7	30	410.3	18	4.16
		ESI+	444.7	30	427.3	14	
磺胺苯酰	Sulfabenzamide	ESI+	277.1	30	92.0	25	3.61
		ESI+	277.1	30	156.0	15	
磺胺氯吡嗪	Sulfachlorpyridazine	ESI+	285.0	20	92.0	28	3.77
		ESI+	285.0	20	155.9	15	

表1. 各化合物MRM信息及保留时间。

化合物		电离模式	母离子 (m/z)	CV (V)	碎片离子 (m/z)	CE (V)	RT (min)
磺胺氯吡嗪	Sulfaclozine	ESI+	285.0	20	92.0	28	4.61
		ESI+	285.0	20	155.9	15	
磺胺嘧啶	Sulfadiazine	ESI+	251.0	30	92.0	27	2.34
		ESI+	251.0	30	156.0	15	
磺胺二甲氧嘧啶	Sulfadimethoxine	ESI+	311.1	36	92.0	32	5.2
		ESI+	311.1	36	156.0	20	
磺胺脒/磺胺胍	Sulfaguanidine	ESI+	215.0	20	91.8	22	0.96
		ESI+	215.0	20	156.0	13	
磺胺甲噁唑	Sulfamerazine	ESI+	265.1	35	92.0	25	2.99
		ESI+	265.1	35	156.0	15	
磺胺甲氧嘧啶	Sulfameter	ESI+	281.0	20	91.8	27	3.34
		ESI+	281.0	20	155.9	15	
磺胺二甲基嘧啶	Sulfamethazine	ESI+	279.1	35	124.1	25	3.61
		ESI+	279.1	35	186.0	15	
磺胺甲二唑	Sulfamethizole	ESI+	271.1	30	92.0	25	3.31
		ESI+	271.1	30	156.0	15	
磺胺甲恶唑	Sulfamethoxazole	ESI+	254.1	30	92.0	25	3.92
		ESI+	254.1	30	156.0	15	
磺胺甲氧吡嗪	Sulfamethoxy pyridazine	ESI+	281.1	35	92.0	25	4.03
		ESI+	281.1	35	156.0	15	
磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	ESI+	281.0	35	92.0	35	3.7
		ESI+	281.0	35	156.0	22	
磺胺恶唑	Sulfamoxol	ESI+	268.0	20	91.8	26	3.47
		ESI+	268.0	20	155.9	15	
磺胺醋酰	Sulfanilacetamide	ESI+	215.0	20	91.8	22	1.71
		ESI+	215.0	20	156.0	13	
磺胺苯吡唑	Sulfaphenazole	ESI+	315.0	20	108.0	25	4.85
		ESI+	315.0	20	156.0	18	
磺胺吡啶	Sulfapyridine	ESI+	250.0	33	108.0	25	2.87
		ESI+	250.0	33	156.0	16	
磺胺喹噁啉	Sulfaquinoxaline	ESI+	301.1	32	92.2	30	5.38
		ESI+	301.1	32	156.1	16	
磺胺噻唑	Sulfathiazole	ESI+	256.0	31	92.0	25	2.68
		ESI+	256.0	31	156.0	15	

表1. 各化合物MRM信息及保留时间。(续)

化合物		电离模式	母离子 (m/z)	CV (V)	碎片离子 (m/z)	CE (V)	RT (min)
磺胺二甲基异噻唑	Sulfisomidine	ESI+	279.1	20	123.9	20	2.54
		ESI+	279.1	20	186.0	15	
磺胺异恶唑	Sulfisoxazole	ESI+	268.0	30	92.0	28	3.91
		ESI+	268.0	30	156.0	13	
甲氧苄啶 (TMP)	Trimethoprim	ESI+	291.3	40	123.0	30	3.79
		ESI+	291.3	40	230.2	30	
西诺沙星	Cinoxacin	ESI+	263.2	35	189.1	30	4.33
		ESI+	263.2	35	245.1	15	
环丙沙星	Ciprofloxacin	ESI+	332.1	42	288.1	18	4.13
		ESI+	332.1	42	314.1	22	
达氟沙星	Danofloxacin	ESI+	358.2	38	96.0	25	4.31
		ESI+	358.2	38	314.1	20	
双氟沙星	Difloxacin	ESI+	400.3	30	356.2	20	5.39
		ESI+	400.3	30	382.2	20	
伊诺沙星	Enoxacin	ESI+	321.1	40	232.0	30	3.86
		ESI+	321.1	40	303.1	35	
恩诺沙星	Enrofloxacin	ESI+	360.3	25	316.3	20	4.85
		ESI+	360.3	25	342.3	20	
氟甲喹	Flumequine	ESI+	262.1	35	202.0	35	6.67
		ESI+	262.1	35	244.0	15	
洛美沙星	Lomefloxacin	ESI+	352.1	39	265.1	22	4.32
		ESI+	352.1	39	308.1	16	
麻保沙星	Marbofloxacin	ESI+	363.1	35	72.0	20	3.69
		ESI+	363.1	35	320.0	15	
萘啶酸	Nalidixic acid	ESI+	233.1	30	187.0	25	6.33
		ESI+	233.1	30	215.0	15	
诺氟沙星	Norfloxacin	ESI+	320.1	40	233.0	25	4
		ESI+	320.1	40	276.1	20	
氧氟沙星	Ofloxacin	ESI+	362.3	25	261.3	30	3.99
		ESI+	362.3	25	318.3	20	
奥比沙星	Orbifloxacin	ESI+	396.1	40	295.1	22	4.39
		ESI+	396.1	40	295.1	22	
噁喹酸	Oxolinic acid	ESI+	262.0	32	216.0	30	5.44
		ESI+	262.0	32	244.0	19	
培氟沙星	Pefloxacin	ESI+	334.1	42	290.1	19	4.45
		ESI+	334.1	42	316.1	19	
沙拉沙星	Sarafloxacin	ESI+	386.2	45	299.1	27	4.59
		ESI+	386.2	45	342.1	18	
氯霉素	Chloramphenicol	ESI-	321.2	25	152.2	15	4.94
		ESI-	321.2	25	257.2	10	
氟苯尼考	Florfenicol	ESI-	356.0	30	185.0	17	4.07
		ESI-	356.0	30	336.0	10	
甲砜霉素	Thiamphenicol	ESI-	354.1	20	184.9	20	3.2
		ESI-	354.1	20	290.0	12	
阿莫西林	Amoxicillin	ESI+	366.2	27	114.0	20	1.37
		ESI+	366.2	27	349.1	8	
青霉素 V	Penicillin V	ESI+	351.1	23	114.0	35	6.24
		ESI+	351.1	23	160.1	10	

表1. 各化合物MRM信息及保留时间。(续)

化合物	电离模式	母离子 (m/z)	CV (V)	碎片离子 (m/z)	CE (V)	RT (min)
倍他米松	Betamethasone	ESI- ESI-	361.2 40	307.2 325.2	18 20	7.78
可的松	Cortisone	ESI+ ESI+	361.3 40	163.1 342.2	25 20	6.93
地塞米松	Dexamethasone	ESI+ ESI+	393.3 20	355.2 373.2	10 10	7.83
氢化可的松	Hydrocortisone	ESI+ ESI+	363.4 35	121.1 327.3	25 15	7.19
泼尼松	Meprednisone	ESI+ ESI+	373.2 20	355.1 357.1	11 12	7.78
甲基泼尼松龙	Methylprednisolone	ESI+ ESI+	375.2 25	357.3	10	7.92
氢化泼尼松	Prednisolone	ESI+ ESI+	361.2 25	147.0 343.2	20 10	7.21
曲安西龙	Triamcinolone	ESI+ ESI+	435.4 25	397.3 415.3	15 5	5.3
曲安奈德	Triamcinolone acetoneide	ESI+ ESI+	395.4 30	357.0 375.0	30 10	7.95
头孢氨苄	Cefalexin	ESI+ ESI+	348.2 40	139.9 158.0	35 20	3.36
头孢噻肟	Cefotaxime	ESI+ ESI+	456.1 30	167.0 396.2	20 10	3.43
头孢噻吩	Ceftiofur	ESI+ ESI+	524.2 35	241.1	16	5.25
头孢匹林	Cephapirin	ESI+ ESI+	424.2 35	152.0 292.2	20 16	3.68

表1. 各化合物MRM信息及保留时间。(续)

方法回收率和精密度

采用在空白牛奶处理液中添加标准溶液的方法进行添加回收率测定。分别添加0.1 µg/L, 0.5 µg/L, 1.0 µg/L, 和10 µg/L 4个浓度水平, 按所建立的方法进行样品处理及测定, 每个浓度水平进行5次重复

测定。定量方法采用空白基质标准曲线, 外标法定量。平均加标回收率和精密度见表2。

化合物	加标0.1 µg/L		加标0.5 µg/kg		加标1.0 µg/kg		加标10.0 µg/kg		基质效应 加标 10.0 µg/L
	回收率 (%)	RSD (%) n=5	回收率 (%)	RSD (%) n=5	回收率 (%)	RSD (%) n=5	回收率 (%)	RSD (%) n=5	
西马特罗	95.0	2.5	94.0	8.5	77.2	18.0	98.1	3.2	0.17
盐酸克伦特罗	81.0	15.6	84.4	3.5	92.6	5.3	113.0	5.8	0.11
莱克多巴胺	93.8	7.3	92.4	7.7	95.7	11.4	121.3	1.0	0.03
沙丁胺醇	93.8	5.5	93.2	6.9	90.0	3.3	111.3	2.6	0.11
特布他林	90.4	7.2	90.4	4.8	97.9	11.2	108.0	3.0	0.14
妥布特罗	89.4	5.5	84.8	4.9	92.7	9.9	113.7	1.0	0.16
齐帕特罗	90.2	9.8	79.6	8.8	72.1	10.0	94.9	1.5	0.27
克林霉素	-	-	111.2	12.6	73.0	18.0	86.5	5.4	0.10
红霉素	-	-	-	-	-	-	81.7	9.7	0.96
吉他霉素	-	-	53.2	11.8	66.2	8.1	80.1	2.2	0.12

表2. 各化合物的加标回收率、RSD (n=5) 及基质效应。

化合物	加标0.1 µg/L		加标0.5 µg/kg		加标1.0 µg/kg		加标10.0 µg/kg		基质效应 加标 10.0 µg/L
	回收率 (%)	RSD(%) n=5	回收率 (%)	RSD(%) n=5	回收率 (%)	RSD(%) n=5	回收率 (%)	RSD(%) n=5	
林可霉素	85.6	9.0	71.2	7.1	70.8	3.2	70.8	3.2	0.25
螺旋霉素	-	-	-	-	60.3	17.5	71.1	6.2	0.77
替米考星	60.0	6.1	63.6	4.1	50.0	5.5	91.6	9.6	1.01
泰乐菌素	58.0	13.1	55.2	9.4	63.2	2.7	73.4	11.9	0.11
土霉素	-	-	75.2	17.1	72.0	8.9	69.0	3.1	0.08
四环素	57.2	18.3	42.0	17.2	44.0	13.1	59.1	3.3	0.17
磺胺苯酰	80.8	19.0	80.4	6.9	80.2	4.2	67.1	6.4	0.06
磺胺氯哒嗪	62.4	8.9	86.0	10.5	75.9	16.3	70.4	5.5	0.01
磺胺氯吡嗪	61.6	30.6	76.4	22.9	72.9	6.4	71.1	13.0	0.04
磺胺嘧啶	-	-	126.0	6.2	60.5	11.1	69.4	2.6	0.02
磺胺二甲氧嘧啶	96.8	6.3	78.8	8.5	62.2	9.5	80.0	6.7	0.00
磺胺脒	90.4	10.2	69.6	13.4	53.8	13.0	70.9	11.5	0.46
磺胺甲噁啶	87.4	8.3	87.2	8.2	96.4	15.9	116.7	2.2	1.13
磺胺甲氧嘧啶	-	-	80.4	8.7	74.1	1.7	75.5	5.4	0.51
磺胺二甲基嘧啶	93.0	13.4	85.2	11.3	79.7	9.4	84.5	10.4	0.06
磺胺甲二唑	82.4	36.9	74.8	7.0	83.2	11.5	72.8	5.6	0.04
磺胺甲恶唑	74.8	12.4	77.2	9.1	75.2	2.9	63.6	5.4	0.05
磺胺甲氧哒嗪	73.4	11.1	79.2	17.4	61.4	17.4	73.4	8.7	0.04
磺胺间甲氧嘧啶	93.4	10.7	80.8	2.8	64.8	9.0	69.9	5.6	0.05
磺胺恶唑	76.0	17.7	70.0	7.3	68.2	4.1	51.3	3.7	0.06
磺胺醋酰	108.0	4.1	95.6	7.2	88.6	7.6	78.6	4.7	0.12
磺胺苯吡唑	72.4	24.3 6	8.8	17.3	62.4	20.0	74.4	14.4	0.03
磺胺吡啶	87.4	17.0	78.0	1.8	62.1	1.4	70.3	3.5	0.10
磺胺喹噁啉	72.4	15.2	73.6	17.1	64.5	3.5	68.9	6.6	0.04
磺胺噻唑	93.0	7.4	82.8	10.9	60.2	0.7	69.0	0.8	0.06
磺胺二甲基异噁啶	87.2	3.8	80.8	10.3	69.5	4.2	79.6	5.4	0.13
磺胺异恶唑	71.0	20.3	92.8	9.2	80.2	7.8	66.5	7.0	0.15
甲氧苄啶(TMP)	77.6	25.2	82.4	6.0	95.0	11.5	113.7	1.8	0.23
西诺沙星	89.8	30.0	94.8	13.6	75.3	7.7	113.7	5.9	0.12
环丙沙星	-	-	90.4	31.3	87.1	17.3	86.3	13.9	0.53
达氟沙星	73.2	16.1	64.4	8.9	12.9	62.4	104.1	14.0	0.31
双氟沙星	49.6	11.5	61.6	15.6	66.6	13.5	88.7	11.4	0.47
伊诺沙星	-	-	-	-	78.9	15.1	91.1	12.7	0.45
恩诺沙星	82.0	6.7	74.4	7.0	77.3	3.2	106.5	11.6	0.54
氟甲喹	69.4	8.4	79.6	5.1	75.0	8.9	92.3	3.1	0.11
洛美沙星	66.0	16.8	66.0	6.4	67.8	5.3	105.6	10.0	0.16
麻保沙星	-	-	67.2	8.0	85.8	7.9	99.9	9.8	0.65
萘啶酸	75.6	9.1	82.8	2.2	86.1	8.4	106.5	6.4	0.27
诺氟沙星	68.8	14.6	70.4	16.4	62.6	4.6	92.9	18.1	0.24
氧氟沙星	92.0	9.1	91.6	8.7	70.4	17.0	86.3	13.9	0.45
奥比沙星	88.8	11.2	78.8	4.9	74.8	16.3	100.7	2.9	0.24

表2. 各化合物的加标回收率、RSD(n=5)及基质效应。(续)

化合物	加标0.1 µg/L		加标0.5 µg/kg		加标1.0 µg/kg		加标10.0 µg/kg		基质效应 加标 10.0 µg/L
	回收率 (%)	RSD(%) n=5	回收率 (%)	RSD(%) n=5	回收率 (%)	RSD(%) n=5	回收率 (%)	RSD(%) n=5	
噻啉酸	79.4	11.5	79.6	6.5	97.3	7.2	118.7	4.0	0.08
培氟沙星	65.8	14.9	70.0	6.1	75.4	10.2	87.4	7.3	0.69
沙拉沙星	79.6	8.0	71.6	5.4	83.4	8.3	91.7	10.8	0.19
氯霉素	85.4	16.8	97.2	12.4	80.2	15.0	113.7	2.7	0.03
氟苯尼考	95.2	26.3	96.0	12.1	69.8	16.9	101.5	10.6	0.05
甲矾霉素	40.0	18.3	68.0	39.6	63.2	4.7	123.3	3.4	0.18
阿莫西林	-	-	-	-	-	-	54.1	3.2	0.15
青霉素 V	-	-	103.2	4.9	100.0	9.7	72.0	17.2	0.50
倍他米松	-	-	-	-	58.0	15.7	84.3	1.9	0.02
可的松	118.4	13.2	92.8	7.6	71.5	16.2	86.1	2.8	0.12
地塞米松	-	-	-	-	72.8	13.3	82.6	6.4	0.18
氢化可的松	-	-	100.4	11.1	71.9	13.0	83.4	3.9	0.17
泼尼松	-	-	78.0	10.9	79.6	7.6	3.0	3.0	0.01
甲基泼尼松龙	-	-	85.6	8.6	84.8	12.4	82.3	12.0	0.14
氢化泼尼松	-	-	74.4	12.7	84.8	12.4	84.8	5.3	0.08
曲安西龙	-	-	-	-	-	-	84.7	13.4	0.55
曲安奈德	70.2	7.5	79.6	10.3	61.7	18.7	101.2	7.6	0.38
头孢氨苄	-	-	-	-	-	-	63.1	18.8	0.49
头孢噻肟	97.5	24.5	77.2	47.7	79.2	13.8	75.6	9.4	0.11
头孢噻吩	76.0	33.6	70.4	7.1	69.4	10.7	77.0	8.4	0.11
头孢匹林	-	-	46.8	21.3	71.5	15.4	91.5	13.2	0.09

表2. 各化合物的加标回收率、RSD(n=5)及基质效应。(续)

结论

本实验使用一种新型固相萃取小柱(Oasis® PRiME HLB)处理牛奶样品,建立牛奶中多兽药残留同时检测的检测方法。牛奶样品经酸化乙腈提取并沉淀蛋白, Oasis PRiME HLB固相萃取小柱通过式净化处理,经UPLC®-MS/MS检测。对样品前处理过程和液相、质谱条件进行了优化。结果表明,在0.1~10.0 µg/L的添加浓度范围内,磺胺、喹诺酮、β-受体激动剂、大环内脂类、糖皮质激素、氯霉素、头孢、青霉素类、四环素类等常见的9大类,共72种抗生素回收率在50~130%,精密度RSD<20%(n=5)。该方法简单、快速、准确,适合牛奶中多兽药残留的筛查分析。

订购信息

描述	部件号
Oasis PRiME HLB 3CC/60mg	186008056
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100, 1.7 µm	186002352

简介

采用LC-MS测定兽药残留时，通常会使用乙腈溶剂对牛肉和牛肝等组织样品进行萃取。其中，最显著的共萃取物质为脂肪和极性脂质，特别是磷脂(卵磷脂)。1克牛肝中通常含有约45 mg脂肪，肌肉组织中脂肪含量通常为肝脏中的一半，但仍然很显著。牛肝还是优质卵磷脂(磷脂)的膳食来源；1克肝脏中含有约25 mg磷脂，是肌肉中常见含量的大约四倍。早期方法利用正己烷进行液液萃取或通过采用十八烷基硅胶(C₁₈)的SPE固相萃取可去除组织提取液(乙腈体系)中的脂肪。虽然反相吸附剂C₁₈能够有效去除大多数非极性脂质，但无法去除磷脂。过量的磷脂会缩短液相色谱柱的使用寿命，导致离子抑制并污染质谱仪。本研究在LC-MS/MS分析前采用新型反相吸附剂Oasis PRiME HLB实现了牛肝提取物中磷脂和脂肪的高效去除。采用该新型吸附剂所得的兽药回收率结果与通过C₁₈净化后获得的结果相类似。但是，经简单的通过式SPE流程处理后，可有效去除组织提取物中95%以上的磷脂和85%以上的脂肪。

样品制备

1. 初步萃取/沉淀:

将2 g组织样品置于带陶瓷均质器球的15 mL离心管中(该步骤使用的是Bertin Technologies公司Precellys® Evolution均质器)。对于标准品或QC样品，样品中应加入适量的所需分析物。向离心管中加入10 mL 0.2%甲酸的85:15乙腈/水溶液，样品匀浆/萃取1.5分钟，然后在3200 rcf的转速下离心5分钟。

注：萃取/沉淀步骤使大多数目标化合物能够获得良好的回收率，但是也提取了大量脂肪和磷脂。

2. 通过式SPE净化:

将Oasis PRiME HLB小柱(6 cc, 200 mg)安装在预先清洁过的真空导管上。不需要进行小柱活化，本实验也未执行此步骤。真空设置为2 psi。取0.6 mL上清液，使其通过Oasis PRiME小柱并弃去滤液。然后安装收集管，取1 mL上清液通过Oasis PRiME小柱并收集滤液。取200 L滤液，在UPLC-MS/MS分析之前用400 L 10 mM甲酸铵缓冲液(pH 4.5)进行稀释。

实验

UPLC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class 配备固定环式样品管理器
色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH™ C ₁₈ , 1.7 μm, 2.1 mm x 100 mm(内径)
流动相:	A: 0.1%甲酸水溶液 B: 0.1%甲酸的50:50乙腈/甲醇溶液
进样体积:	7 L
进样模式:	部分定量环进样
柱温:	30 °C
弱洗针液:	10:90 乙腈:水(600 L)
强洗针液:	50:30:40 水:乙腈:异丙醇(200 L)
密封清洗液:	10:90 乙腈:水
梯度:	

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
0.00	0.400	99.0	1.0
4.00	0.400	80.0	20.0
5.00	0.400	50.0	50.0
7.00	0.400	1.0	99.0
10.00	0.400	1.0	20.0
10.10	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	99.0	1.0

MS条件

质谱仪:	Xevo TQ-XS
模式:	正离子电喷雾
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	400 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
锥孔气流速:	30 L/h
碰撞气流速:	0.15 mL/min
数据管理:	MassLynx® v4.1

仪器方法的优化

多残留分析的仪器方法开发费时耗力，且常常带来实验室间方法开发的差异，导致实验室间检测结果的差异。本实验UPLC/MSMS方法建立过程使用的Waters QUANPEDIA数据库。库中包含了1000多种化合物的LC-MS/MS方法，这些化合物包含了几乎所有的食品检测所要求的兽药种类。Waters QUANPEDIA数据库能够提供现成的仪器

方法数据包括：各化合物的从液相条件、采集方法到定量处理方法的方法包供实验人员调用，免去用户的方法开发流程，最大程度的减少了方法开发的难度和误差，减少实验室的工作量

和时间、金钱成本。

化合物	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	RT (min)
阿莫西林	366.2>349.1	30	8	2.46
	366.2>114.1	30	20	
氨苄青霉素	350.2>106.1	30	18	4.14
	350.2>160.1	30	12	
氯丙啉	243.3>150.2	20	12	0.54
	243.3>94.1	20	14	
杆菌肽A	712.2>110.1	68	70	5.72
	712.2>191.1	68	40	
头孢噻吩	524.3>241.1	30	16	5.98
	524.3>285.0	30	16	
金霉素	479.3>444.2	15	22	5.28
	479.3>462.2	15	18	
氯羟吡啶	192.1>100.9	40	26	4.10
	192.1>128.0	40	24	
氯舒隆	378>342.0	22	12	5.76
	378>344.0	22	12	
邻氯青霉素	436.2>160.0	27	15	6.67
	36.2>277.1	27	15	
达氟沙星	358.2>314.1	38	20	4.65
	358.2>96.0	38	25	
去乙烯环丙沙星	305.9>268.1	32	25	3.90
	305.9>288.1	32	18	
红霉素	734.7>158.1	48	26	5.72
	734.7>576.5	48	18	
依普菌素	915.6>186.0	30	35	7.78
	915.6>154.0	30	20	
氨磺磷	326.0>217.0	32	20	6.60
	326.0>93.0	32	31	
芬苯达唑	300.0>268.0	40	23	6.52
	300.0>159.0	40	24	
氟尼辛	297.2>264.1	35	34	7.19
	297.2>279.0	35	34	
伊维菌素	892.6>307.2	15	14	8.18
	892.6>569.4	15	25	
左旋咪唑	205.0>123.0	40	27	2.31
	205.0>90.8	40	34	
醋酸美仑孕酮	397.4>337.3	10	15	7.30
	397.4>279.0	10	15	
莫能菌素	693.7>675.3	70	35	8.13
	693.7>461.1	70	50	
莫仑太尔	221.2>186.1	20	20	5.44
	221.2>108.0	20	25	
莫昔克丁	640.0>528.4	30	10	7.96
	640.0>498.3	30	10	

表1. 本研究使用化合物的MRM通道(初级通道在前)、仪器参数和保留时间(RT)。

化合物	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	RT (min)
新生霉素	613.10>188.9	45	20	7.45
	613.1>396.0	45	15	
n-甲基-1,3-丙二胺	89.1>72.2	42	5	0.41
	89.1>58.2	42	5	
奥芬达唑	316.2>191.1	40	18	5.76
	316.2>284.0	40	18	
土霉素	461.4>426.2	48	30	4.36
	461.4>365.0	48	15	
青霉素G	335.2>289.1	40	25	5.54
	335.2>158.1	40	25	
孕酮	315.2>109.0	38	24	7.30
	315.2>97.0	38	22	
莱克多巴胺	302.2>164.1	35	15	4.30
	302.2>284.2	35	12	
磺胺氯哒嗪	285.0>156.0	35	16	5.44
	285.0>92.1	35	26	
磺胺二甲氧嘧啶	311.1>156.0	36	32	5.89
	311.1>92.0	36	32	
磺胺二甲嘧啶	279.1>186.0	40	15	4.92
	279.1>124.1	40	25	
磺胺喹恶啉	301.1>156.1	32	16	5.93
	301.1>92.2	32	30	
四环素	445.1>154.0	40	26	4.43
	445.1>410.1	40	22	
噻菌灵	202.0>175.0	15	25	3.46
	202.0>131.0	15	30	
替米考星	869.5>174.2	25	45	5.35
	869.5>696.5	25	40	
曲吡那敏	256.1>211.1	21	17	3.87
	256.1>91.0	21	33	
泰乐菌素	916.5>174.1	45	40	5.78
	916.5>101.1	45	45	
齐帕特罗	262.2>202.1	25	18	0.79
	262.2>185.1	25	22	

表1. 本研究使用化合物的MRM通道(初级通道在前)、仪器参数和保留时间(RT)。(续)

快速、简单、有效地净化牛肝样品用于多兽药残留UPLC-MS/MS分析

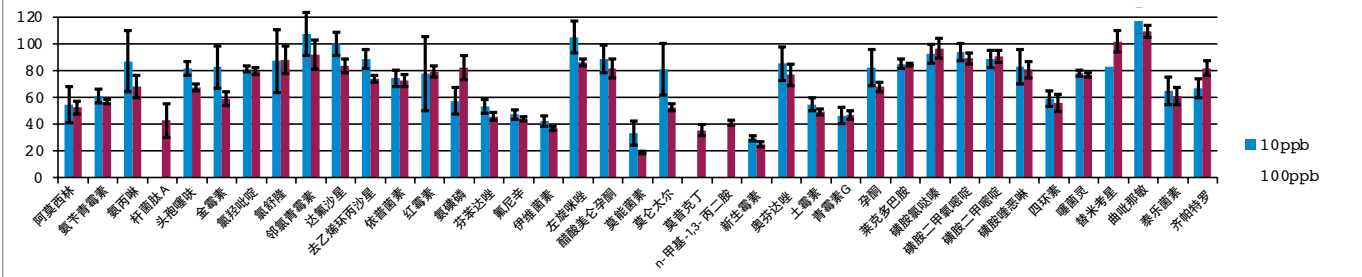


图1. 牛肝样品的加标回收率数据：低浓度(10 ng/g, 以蓝色显示)和高浓度(100 ng/g, 以红色显示)。

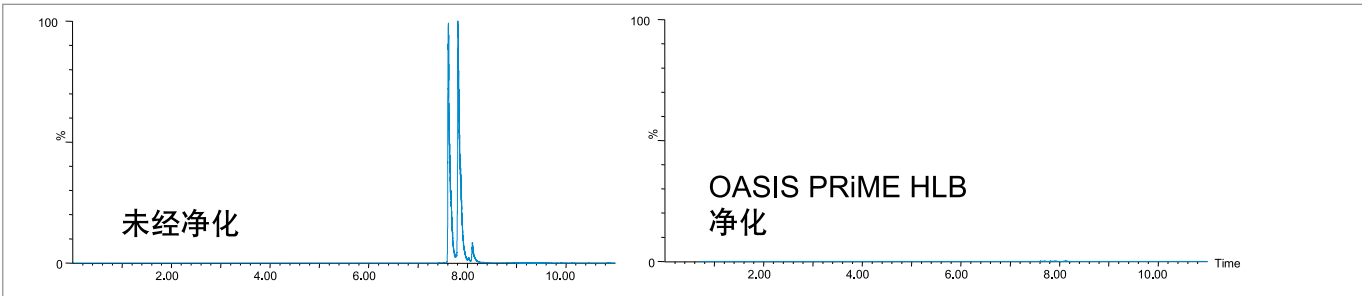


图2. LC-MS/MS色谱图显示该方法有效去除了牛肝提取物中95%以上的磷脂。

结果

图1为组织样品重复平行加标分析(n = 6)获得的回收率数据。基质效应平均值约为40%。图2所示的色谱图展示了Oasis PRiME HLB小柱的净化效果，该小柱可去除牛肝提取物中95%以上的磷脂，同时还可去除90%以上正己烷可提取的脂肪。

讨论

本研究中采用的步骤是我们综合了以前开发的方法^{1,2}。整个方法的回收率平均大于70%，但一些强极性类化合物(如四环素类)的回收率较低。尽管单溶剂萃取步骤不可能对于所有目标化合物均有效，但是对于大多数回收率较低的化合物，其信号响应和重现性对于靶向筛查分析而言是可接受的。研究人员很有必要了解样品净化步骤对任何目标物的回收率损失的影响。图3所示的SPE回收率数据是牛肝样品经过溶剂萃取后，在SPE净化前进行加标后再过柱净化得到的。这些数据表明：对于大多数目标化合物，Oasis PRiME HLB净化小柱对回收率的影响很小。然而，对于伊维菌素、莫能菌素、莫昔克丁和新生霉素，萃取后净化确实会引起明显的回收率损失。有关这些分析物的更多信息将在以后的工作中予以介绍。

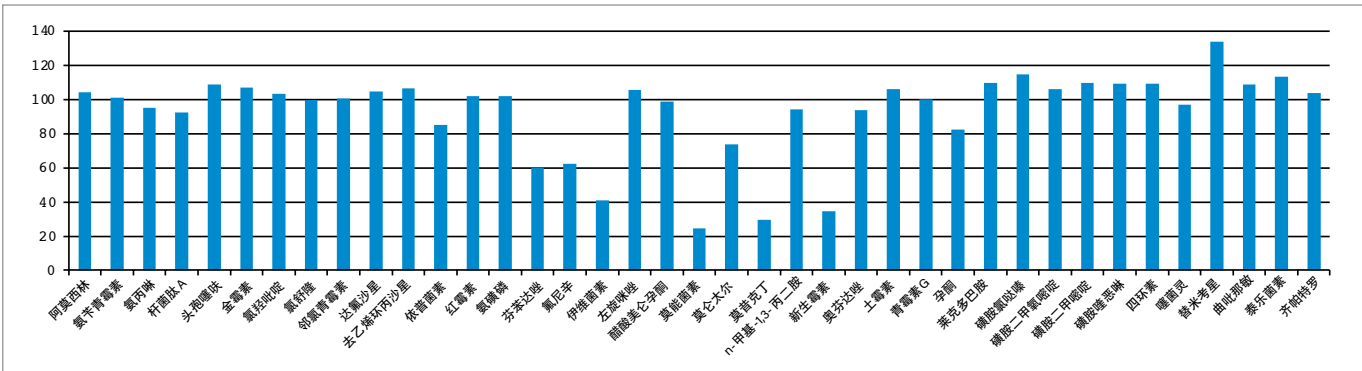


图3. 样品经初步提取后，在Oasis PRiME HLB通过式净化前加标后再过柱得到的兽药化合物回收率。

参考文献

1. M. Young and K. Tran, "Oasis PRiME HLB Cartridge for Effective Clean-up of Meat Extracts Prior to Multi-Residue Veterinary Drug UPLC-MS Analysis", Waters Application Brief, 2015.
2. S. Lehotay, "High-Throughput Screening Analysis by UHPLC-MS/MS of >60 Veterinary Drugs in Animal Tissues", 125th AOAC Annual Meeting, Presentation 2303, 21 September, 2011.

订购信息

描述	部件号
Oasis PRiME HLB 6CC /200 mg	186008057
ACQUITY UPLC CSH C ₁₈ , 2.1 x 100, 1.7 μm	186005297

简介

与当前所采用的GB/T 22286-2008 LC法相比，采用本UPLC-MS/MS法时，样品制备步骤更为简单、运行时间可减少73%(本法运行一次仅需7分钟，而目前的GB法运行时间为26分钟)、溶剂使用量更少。相当于节省了1,925小时的仪器运行时间。

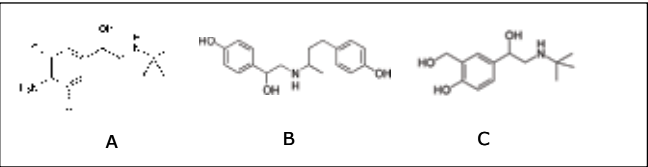


图1. 1A)盐酸克伦特罗、1B)莱克多巴胺、1C)沙丁胺醇。

样品制备

图2说明了样品制备步骤。

将5.0 g肉样品、50 μL 内标物 (50 ng/mL) 和 10 mL 醋酸钠-醋酸缓冲液 (pH=5.2) 混合。

加入100 μL β-葡萄糖醛酸酶/酰基硫酸酯酶 (30 μ/mL)，置于37℃中水解过夜。

搅匀3分钟、超声波处理30分钟、离心10分钟 (15,000 rpm)，收集上清液。

利用10 mL 0.1 M 高氯酸溶液对余下部分再萃取一次。

合并两次所得的上清液，并利用Oasis MCX色谱柱纯化：以6 mL 甲醇、6 mL 水平衡色谱柱，上样后，先以6 mL 水、后以6 mL 甲醇冲洗，随后以5%的氨甲醇溶液洗脱

利用氮气将所获得的流出液吹干，然后将残质重新溶解到1 mL 0.1%甲酸水溶液中，再利用0.22 μm过滤膜将其过滤。

图2. 样品制备步骤一览。

色谱条件

液相色谱系统：ACQUITY UPLC
运行时间：7.0 min
色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μm, 2.1 x 100 mm
柱温：30 °C
进样器温度：10 °C
进样量：5 μL
流速：0.4 mL/min

流动相

A: 含0.1% (v/v) 甲酸的水溶液
B: 含0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液梯度

时间	流速	A%	B%	梯度线型
初值	0.4	95	5	初值
1.2	0.4	95	5	1
2.5	0.4	59	41	6
3.5	0.4	59	41	1
3.7	0.4	0	100	6
4.8	0.4	0	100	1
5.0	0.4	95	5	6

质谱条件

质谱系统：Xevo TQ-S MS
电离模式：ESI+
毛细管电压：3.5 kV
锥孔电压：30 V
离子源温度：150 °C
脱溶剂温度：550 °C
脱溶剂气体流速：900 L/H
碰撞气体流速：0.19 mL/min

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
盐酸克伦特罗	276.9	167.8	25	25
		202.9		15
D9-盐酸克伦特罗	286.1	168.6	25	35
		203.9		15
莱克多巴胺	302.1	106.9	30	32
		164.0		15
D5-莱克多巴胺	307.1	107.1	30	32
		167.0		15
沙丁胺醇	239.9	147.8	25	20
		165.9		12
D3-沙丁胺醇	243.0	150.7	25	18
		168.8		12

表1. 分析β-受体激动剂及其稳定同位素内标物的MRM参数。

结果

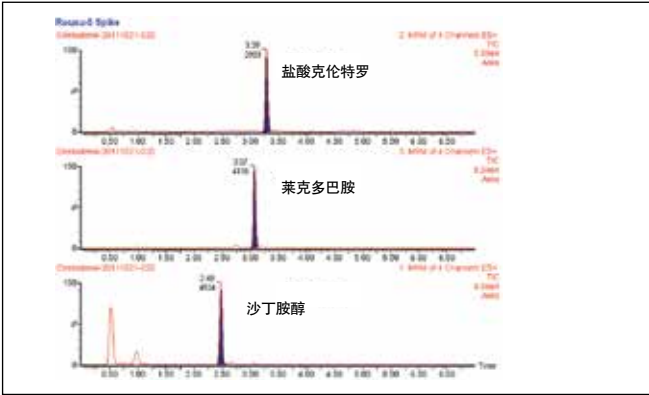


图3. 对β-受体激动剂的肉加标样品进行UPLC-MS/MS分析时所得到的色谱图实例 (β-受体激动剂的加标浓度为1 ng/mL，相当于每kg肉样中含有0.2 μg/kg)。

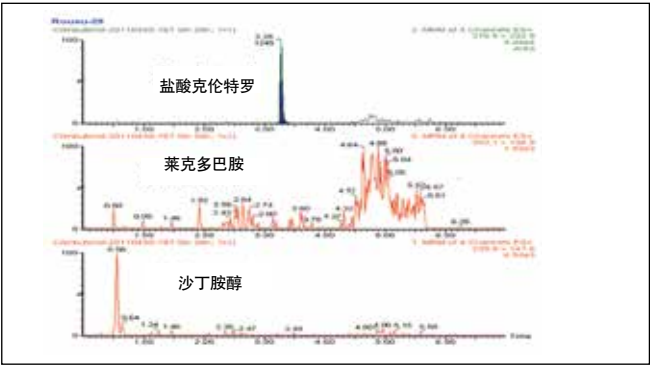


图4. 肉样品的UPLC-MS/MS色谱图。在样品中仅检测到盐酸克伦特罗。检测到盐酸克伦特罗样品的含量为1.9 µg/kg。

加标量	盐酸克伦特罗		莱克多巴胺		沙丁胺醇	
	回收率 %	相对标准偏差 %	回收率 %	相对标准偏差 %	回收率 %	相对标准偏差 %
0.10 µg/kg	92.8	5.5	81.0	4.3	90.4	10.5
1.0 µg/kg	98.7	4.3	99.1	5.0	98.1	4.8
10.0 µg/kg	99.2	4.6	96.6	4.0	100.0	6.9

表2. 三种浓度下的回收率。

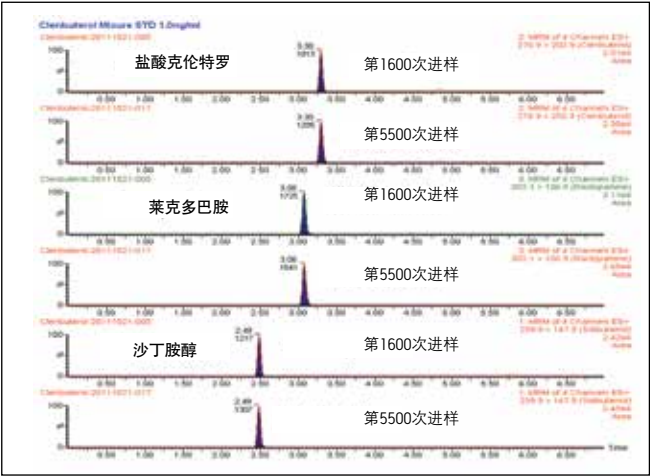


图5. 比较了在进行β-受体激动剂混标分析时，不同进样次数的UPLC-MS/MS色谱图。三种β-受体激动剂的浓度均为1.0 ng/mL。每两个色谱图分别是在第1,600次进样及第5,500次进样时，由同一根ACQUITY UPLC色谱柱上采集的数据(如色谱图中所示)。

参考文献

1. Illegal use of beta-adrenergic agonists: European Community, J. Anim. Sci.1998, 76:195-207.

2. 70 ill after eating tainted pig organs, China Daily, February 23, 2009
http://www.chinadaily.com.cn/china/2009-02/23/content_7501017.htm

3. Chinese Ministry of Agriculture Bulletin 176, February 9th, 2002. 4. Chinese Ministry of Agriculture Bulletin 235, December 24th, 2002.

5. Determination of beta-agonists residues in foodstuff of animal origin, liquid chromatography with tandem-mass spectrometric method, China National standard GB/T 22286-2008.

6. Controlling Contamination in UltraPerformance LC/MS and HPLC/MS Systems, Waters Literature 715001307EN, Rev. F.

订购信息

描述	部件号
Oasis MCX, 6cc/150mg	186000255
ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	186003539
ACQUITY UPLC HSS T3 VanGuard Pre-column, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	186003976
LC/MS认证样品瓶	600000751CV

样品预处理

- 样品制备参照GB/T 22286-2008《动物源性食品中多种β-受体激动剂残留量的测定》进行。
1. 量取2.0 mL猪尿液样品，加入8 mL 0.2 M的pH为5.2的乙酸钠缓冲液，充分混匀。
 2. 加入50 μL β-Glucuronidase/aryl sulfatase混匀，于37 °C水浴水解过夜。
 3. 水解液振荡15 min，在5000 r/min条件下离心分离10 min后，取4 mL上清液中添加100 μL 10 ng/mL的内标溶液混匀，加入5 mL 0.1 M高氯酸混合均匀，并调节溶液pH值到1±0.3。以5000 r/min条件下离心分离10 min后，移取上清液并用10 M的氢氧化钠溶液调节pH值到11。
 4. 加入10 mL饱和氯化钠溶液和10 mL异丙醇-乙酸乙酯(6:4)混合溶液，离心分离后取有机相，在40 °C水浴下用氮气将其吹干。
 5. 提取残渣中加入5 mL 0.2 M乙酸钠缓冲液(pH 5.2)，超声混匀溶解残渣。
 6. 样品净化(如下图所示)，使用Oasis® MCX(3 cc/60 mg)小柱。
 7. 净化后的洗脱液用氮气吹干，用流动相溶解定容至1.0 mL，过0.22 μm滤膜，待进样分析。

样品制备

固相萃取净化过程Oasis MCX(3 cc/60 mg)：



色谱条件

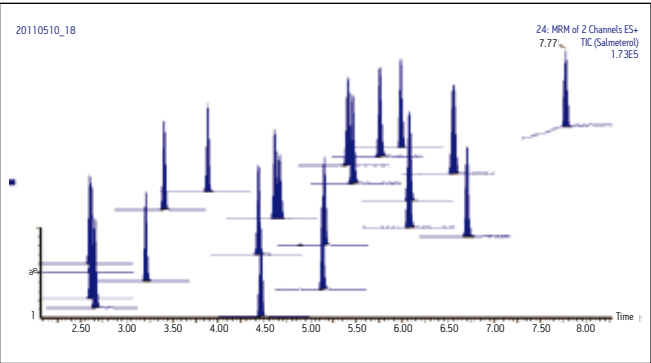
- 色谱柱：ACQUITY® BEH C₁₈ 1.7 μm, 2.1 x 100 mm
- 流动相：A: 0.1% 甲酸水
B: 乙腈
- 流速：0.40 mL/min
- 进样体积：5 μL

时间	流速	%A	%B	曲线
0	0.400	99.0	1.0	Initial
0.50	0.400	99.0	1.0	6
2.00	0.400	90.0	10.0	6
4.50	0.400	80.0	20.0	6
6.50	0.400	70.0	30.0	6
7.00	0.400	50.0	50.0	6
8.00	0.400	30.0	70.0	6
8.50	0.400	1.0	99.0	6
9.00	0.400	1.0	99.0	6
10.00	0.400	99.0	1.0	1

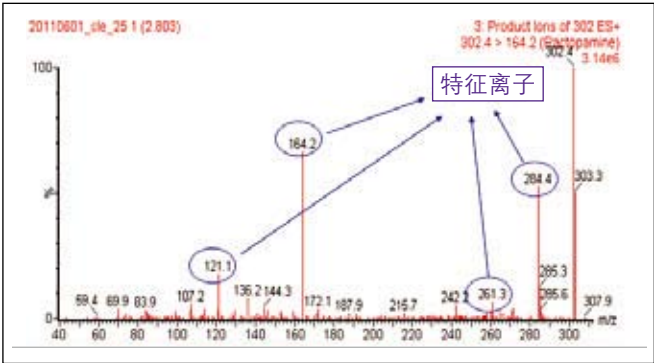
质谱条件

- MS系统：Xevo TQ-S
- 离子模式：ESI+
- 毛细管电压：3.5 kV
- 源温度：150 °C
- 雾化气温度：500 °C
- 雾化气流速：900 L/hr
- 锥孔气流速：20 L/hr

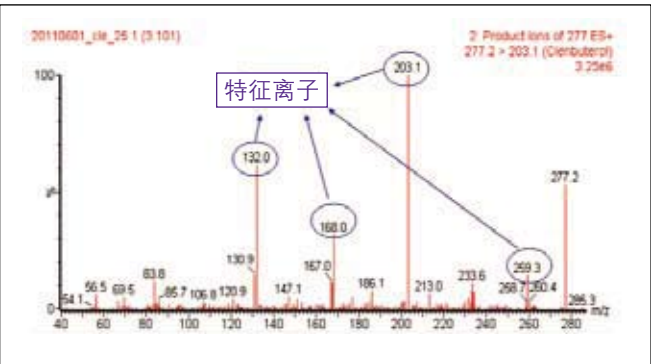
结果



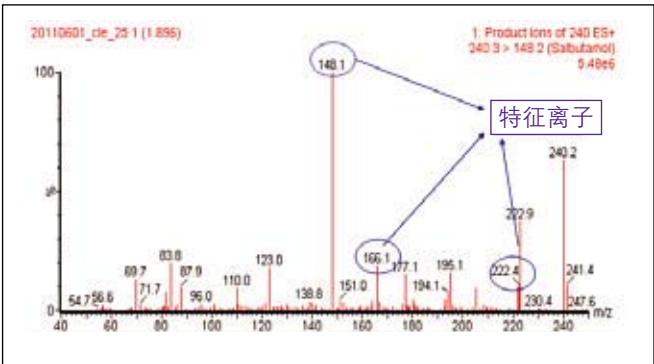
21种β-受体激动剂总离子流图。



基质中莱克多巴胺离子扫描图。



基质中克伦特罗离子扫描图。



基质中沙丁胺醇离子扫描图。

订购信息

描述	部件号
Oasis MCX, 3cc/60mg	186000254
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100 mm, 1.7 μm	186002352
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100 mm, 1.7 μm	186003975
LC/MS认证样品瓶	600000751CV

样品预处理

取适量新鲜或冷冻的空白或供试鸡肝组织，经均质器绞碎并使之均匀化。

样品制备

称取鸡肝组织试样5 g，加入DisQuE萃取管中，加入内标工作液100 μ L 和乙腈20 mL，涡旋使之充分混合，振荡提取30 min，4 $^{\circ}$ C下10000 r/min 离心5 min，移取上清液10 mL至DisQuE净化管中，振荡20 min，10000 r/min 离心5 min，取上清液5 mL，50 $^{\circ}$ C下氮气流吹干，加入2 mL 0.1%甲酸水溶液-甲醇(10:90)溶解残渣，0.45 μ m 滤膜过滤至进样瓶中UPLC-MS/MS测定。

色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18} , 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm
 流动相A: 0.1%甲酸水溶液
 流动相B: 0.1%甲酸甲醇溶液
 梯度洗脱: 0~10 min, 10% B~60% B
 10~10.2 min, 60% B~10% B
 10.2~14 min, 10% B~10% B
 流速: 0.2 mL/min
 柱温: 25 $^{\circ}$ C
 进样量: 10 μ L

质谱条件

电喷雾离子化，正离子扫描
 喷雾电压: 3500 V
 离子传输管温度: 350 $^{\circ}$ C
 鞘气流速: 10 L/min
 辅助气流速: 5 L/min
 选择性离子监测见表1。

药物名称	保留时间(min)	定性、定量离子(m/z)	碰撞能量(eV)
磺胺嘧啶	4.2	251>156*	22
		251>108	30
磺胺二甲基嘧啶	6.0	279>186*	24
		279>124	30
磺胺甲氧嘧	6.5	281>156*	25
		281>108	31
磺胺甲恶唑	7.2	254>156*	23
		254>108	29
磺胺间甲氧嘧啶	7.4	281>156*	25
		281>108	31
磺胺二甲氧嘧啶	9.2	311>156*	25
		311>108	30
磺胺喹恶啉	9.6	301>156*	24
		301>108	30
磺胺二甲氧嘧啶- D_6	9.1	317>162*	25

表1. 五种磺胺类药物的色谱保留时间和定量离子参数。

注: * 表示定量离子。

结果

七种磺胺类药物的标准溶液色谱图见图1，空白鸡肝的色谱图见图2，空白鸡肝阳性添加(100 μ g/kg)的色谱图见图3，由图可知，七种磺胺类药物分离良好，空白鸡肝中不含有干扰测定物质。

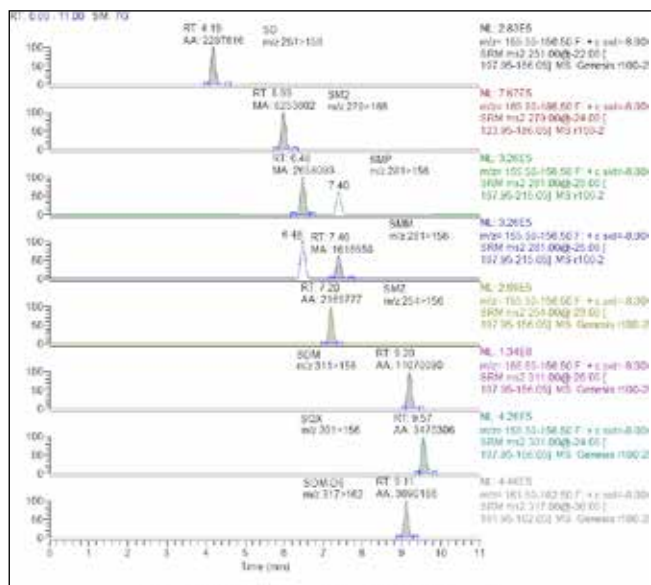


图1. 七种磺胺类药物的标准溶液色谱图(62.5 ng/mL)。

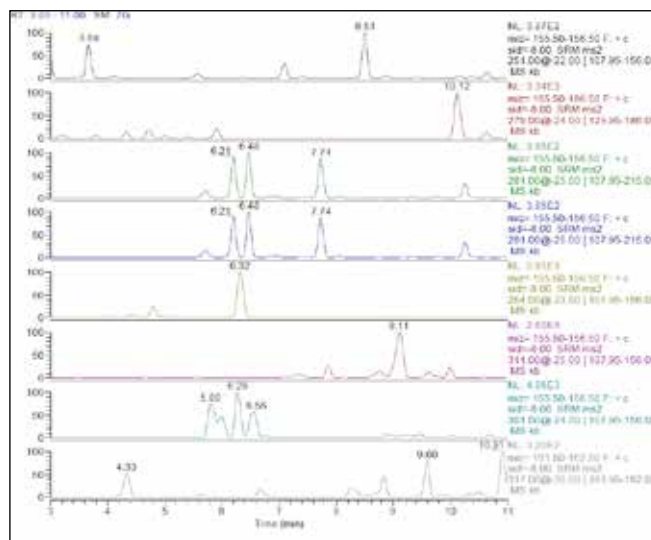


图2. 空白鸡肝的色谱图。

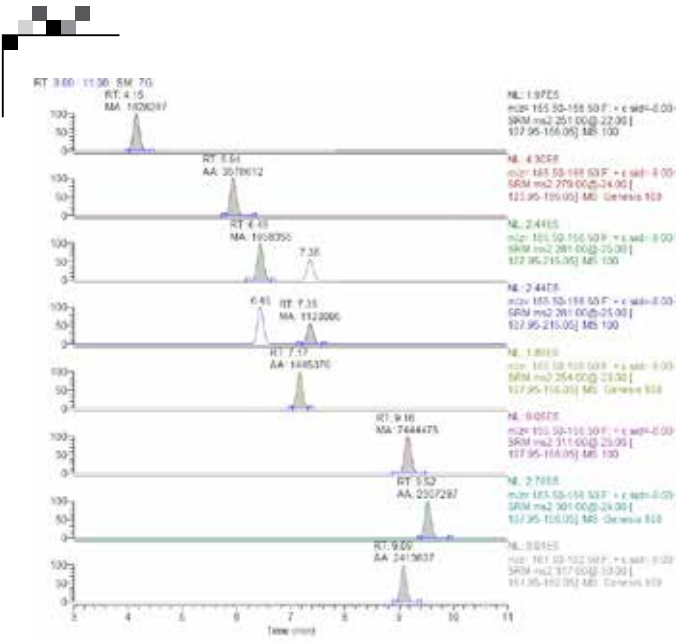


图3. 空白鸡肝阳性添加(100 µg/kg)的色谱图。

线性范围

七种磺胺类药物在20~200 µg/kg范围内线性关系良好，最低定量限在20 µg/kg，各药物的回归方程及相关系数见表2。

药物名称	标准曲线方程	相关系数(R ²)
磺胺嘧啶	y=0.0069x-0.0095	0.9947
磺胺二甲嘧啶	y=0.0152x-0.0041	0.9940
磺胺间甲氧嘧啶	y=0.0083x-0.0151	0.9931
磺胺甲恶唑	y=0.0051x-0.0319	0.9983
磺胺甲氧嗪	y=0.0065x-0.0284	0.9967
磺胺二甲氧嘧啶	y=0.0322x-0.1948	0.9977
磺胺喹恶啉	y=0.0106x-0.0746	0.9973

表2. 猪肉中五种磺胺类药物的标准曲线。

基质效应

高中低浓度的基质效应结果见表3，基质效应在90~110 %之间，说明经DisQuE净化管净化后，基本上没有基质效应。

添加浓度 (µg/kg)	药物名称	精密度 (%)		回收率 (%)		基质效应 (%)
		批内 (RSD)	批间 (RSD)	绝对	相对	
50	磺胺嘧啶	13.7	13.5	114.6	91.9	99.3
	磺胺二甲嘧啶	10.2	9.8	84.5	112.8	107.4
	磺胺间甲氧嘧啶	7.6	8.4	110.6	108.1	102.2
	磺胺甲恶唑	11.1	10.9	96.0	108.3	100.7
	磺胺甲氧嗪	10.5	14.3	100.7	95.4	91.9
	磺胺二甲氧嘧啶	9.9	10.6	103.0	110.0	101.7
	磺胺喹恶啉	8.2	12.8	94.0	105.6	98.6
100	磺胺嘧啶	9.5	11.2	103.9	99.0	99.4
	磺胺二甲嘧啶	8.7	7.7	83.9	97.8	102.4
	磺胺间甲氧嘧啶	6.4	10.1	103.3	99.6	107.1
	磺胺甲恶唑	4.4	8.6	87.8	98.5	96.5
	磺胺甲氧嗪	11.9	10.3	95.7	103.7	105.8
	磺胺二甲氧嘧啶	13.8	12.5	103.5	101.8	96.4
	磺胺喹恶啉	10.0	14.4	87.3	97.2	107.9
200	磺胺嘧啶	6.3	8.7	101.5	98.7	104.0
	磺胺二甲嘧啶	5.4	11.6	85.5	98.0	105.4
	磺胺间甲氧嘧啶	8.9	12.4	101.0	97.0	93.4
	磺胺甲恶唑	7.2	9.6	95.1	100.8	107.1
	磺胺甲氧嗪	11.0	12.9	93.0	101.3	91.3
	磺胺二甲氧嘧啶	9.4	11.4	99.7	98.3	98.9
	磺胺喹恶啉	9.5	12.8	91.1	99.7	104.7

表3. 七种磺胺类药物的精密度、回收率和基质效应测定结果。

参考资料

- 耿士伟¹，曲斌^{1*}，姜加华¹，贡玉清¹，温海燕²
- 江苏省畜产品质量检验测试中心
 - 沃特世科技(上海)有限公司

订购信息

描述	部件号
DisQuE 50 mL提取管 (4 g硫酸镁、1 g氯化钠、1 g无水柠檬酸钠、0.5 g柠檬酸二钠盐倍半水合物)	186004837
DisQuE 15 mL净化管 (900 mg 无水硫酸镁、150 mg PSA、150 mg C ₁₈)	186004834
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 µm, 2.1 x 100 mm	186002352
VVanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.7 µm, 3 pcs/pack	186003975
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

- 1. 准确称取2 g(精确到0.01 g)测试样品于50 mL离心管内，加入20 μL 内标工作溶液，然后加入20 mL水，快速混匀1 min，震荡提取10 min。
- 2. 加入0.5 mL 50% 三氯乙酸溶液，快速摇动30 s，3000 r/min离心5 min。
- 3. 移取上清液至三角瓶中，再向残渣中加入15 mL水，待净化。

固相萃取过程

Oasis MCX 固相萃取柱：6 cc/150 mg

活化/平衡
A.5 mL甲醇 B.10 mL水
上样
加入制备样品
清洗
A.5 mL 2 %甲酸 B.5 mL 甲醇
洗脱
5 mL 5% 氨水甲醇溶液
50 °C氮气吹干溶剂
加乙腈0.01 mol/L乙酸胺溶液1.0 mL
过0.2 μm 滤膜后，上机

色谱条件

色谱柱:	Atlantis® T3, 150 x 2.1 mm, 3 μm			
柱温:	35 °C			
流动相A:	乙腈			
流动相B:	0.1 %甲酸水溶液			
流动相C:	甲醇			
流速:	0.2 mL/min			
进样量:	20 μL			
梯度:	时间(min)	A%	B%	C%
	0.00	10.0	80.0	10.0
	3.00	20.0	70.0	10.0
	8.00	35.0	55.0	10.0
	12.00	70.0	20.0	10.0
	12.01	10.0	80.0	10.0
	17.00	10.0	80.0	10.0

质谱条件

离子源:	电喷雾离子源
扫描方式:	正离子扫描
检测方式:	多反应监测 (MRM)

18种磺胺的定性离子对和定量离子对

化合物中文名称	化合物英文名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)
磺胺嘧啶	sulfadiazine	251/156 251/185	251/156
磺胺噻唑	sulfathiazine	256/156 256/107	251/156
磺胺吡啶	sulfapyridine	250/156 250/184	250/156
磺胺甲基嘧啶	sulfamethoxyipyridazine	265/156 265/172	265/156
磺胺间甲氧嘧啶	sulfamonomethoxine	281/156 281/215	281/156
磺胺甲噻二唑	sulfamethizole	271/156 271/107	271/156
磺胺二甲嘧啶	sulfamethazine	279/156 279/204	279/156
磺胺甲氧哒嗪	sulfamethoxyipyridazine	281/156 281/215	281/156
磺胺对甲氧嘧啶	sulfameter	281/156 281/215	281/156
磺胺氯哒嗪	sulfachloropyridazine	281/156 285/108	285/156
磺胺甲基异噻唑	sulfamethoxazole	254/156 254/147	254/156
磺胺邻二甲氧嘧啶	sulfadoxine	311/156 311/108	311/156
磺胺二甲异噻唑	sulfisoxazole	268/156 268/113	268/156
磺胺苯酰	sulfabenzamide	277/156 277/108	277/156
磺胺氯吡嗪	sulfachloropyrazine	285/156 285/108	285/156
磺胺苯吡唑	sulfaphenazole	315/156 315/160	315/156
磺胺间二甲氧嘧啶	sulfadimethoxine	311/156 311/218	311/156
磺胺喹噁啉	sulfaquinoxaline	301/156 301/208	301/156

蜂王浆中18种磺胺残留量的测定

18种磺胺添加浓度及其平均回收率实验数据

化合物名称	添加浓度/(μg/kg)	平均回收率%
磺胺嘧啶	5.0	104.9
	10.0	109.6
	20.0	99.0
	50.0	107.0
磺胺噻唑	5.0	99.5
	10.0	98.5
	20.0	95.8
	50.0	108.0
磺胺吡啶	5.0	92.8
	10.0	89.0
	20.0	94.4
	50.0	91.3
磺胺甲基嘧啶	5.0	92.8
	10.0	89.0
	20.0	94.4
	50.0	91.3
磺胺间甲氧嘧啶	5.0	92.2
	10.0	91.5
	20.0	93.0
	50.0	98.2
磺胺甲噻二唑	5.0	95.4
	10.0	97.9
	20.0	96.1
	50.0	100.2
磺胺二甲嘧啶	5.0	97.4
	10.0	94.5
	20.0	94.1
	50.0	97.4
磺胺甲氧哒嗪	5.0	95.3
	10.0	94.7
	20.0	92.2
	50.0	92.9
磺胺对甲氧嘧啶	5.0	94.4
	10.0	97.5
	20.0	98.1
	50.0	94.9
磺胺氯哒嗪	5.0	96.5
	10.0	97.3
	20.0	95.9
	50.0	110.5
磺胺甲基异噁唑	5.0	105.8
	10.0	109.1
	20.0	97.9
	50.0	112.6
磺胺邻二甲氧嘧啶	5.0	86.5
	10.0	93.4
	20.0	91.6
	50.0	96.9
磺胺二甲异噁唑	5.0	92.1
	10.0	88.9
	20.0	93.0
	50.0	93.2
磺胺苯酰	5.0	93.4
	10.0	91.6
	20.0	94.8
	50.0	102.5
磺胺氯吡嗪	5.0	91.0
	10.0	90.5
	20.0	89.3
	50.0	96.1
磺胺苯吡唑	5.0	98.6
	10.0	86.7
	20.0	80.2
	50.0	84.4

磺胺间二甲氧嘧啶	5.0	105.5
	10.0	102.3
	20.0	87.4
	50.0	82.6
磺胺噻恶啉	5.0	86.4
	10.0	83.4
	20.0	84.2
	50.0	85.8

订购信息

描述	部件号
Oasis MCX, 6 cc/150 mg	186000256
Atlantis T3, 2.1 x 150 mm, 3 μm	186003719
VanGuard Pre-column, Atlantis T3, 2.1 x 10 mm, 2 pcs/pack	186003756
Sentry Guard Holder	WAT097958
全部回收样品瓶	600000750CV

固相萃取过程

固相萃取柱1 (Oasis® HLB 6 cc/500 mg)

活化/平衡

A. 6 mL 二氯甲烷 B. 6 mL 甲醇
C. 12 mL 50 mM的Na₂EDTA水溶液

上样

0.25至1 L水样 (预先用玻璃纤维过滤除去悬浮颗粒杂质),
流速5-10 mL/min

清洗

10 mL水

通氮气将小柱吹干

洗脱

6 mL 二氯甲烷/甲醇 2/1 (v/v)

氮气流吹干, 用0.2 mL氯仿溶解,
加入1.8 mL正己烷用于第二步固相萃取

固相萃取过程

固相萃取柱2 (Sep-Pak® Silica 3 cc/500 mg)

活化/平衡

4 mL 正己烷

上样

2 mL 第一步固相萃取得到的溶液

清洗

A. 3 mL 正己烷 B. 3 mL 正己烷/乙酸乙酯 90/10 (v/v)
C. 3 mL 正己烷/乙酸乙酯 3/2 (v/v)

洗脱

A. 3 mL 甲醇/丙酮 1/1 (v/v) B. 3 mL 丙酮

氮气流吹干, 用0.5 mL甲醇将残渣重新溶解,
经0.2 µm滤膜过滤后进行LC/MS/MS分析

色谱条件

仪器:	沃特世ACQUITY UPLC®系统			
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1×100 mm, 1.7 µm			
流动相A:	0.1 %甲酸水溶液			
流动相B:	甲醇, 含0.1 %甲酸			
梯度:	时间(min)	A%	B%	曲线
	0.00	40	60	
	2.50	35	65	6
	3.50	30	70	6
	3.51	0	100	11
	4.60	0	100	6
	4.61	40	60	6
	6.00	40	60	6
流速:	0.3 mL/min			
柱温:	40 °C			
进样量:	5 µL			

质谱条件

仪器:	沃特世ACQUITY TQD检测器
电离源:	ESI+
毛细管电压:	3.0 kV
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	400 °C
锥孔气流速:	50 L/h
脱溶剂气流量:	900 L/h

16种磺胺类抗生素和甲氧苄氨嘧啶的MRM参数:

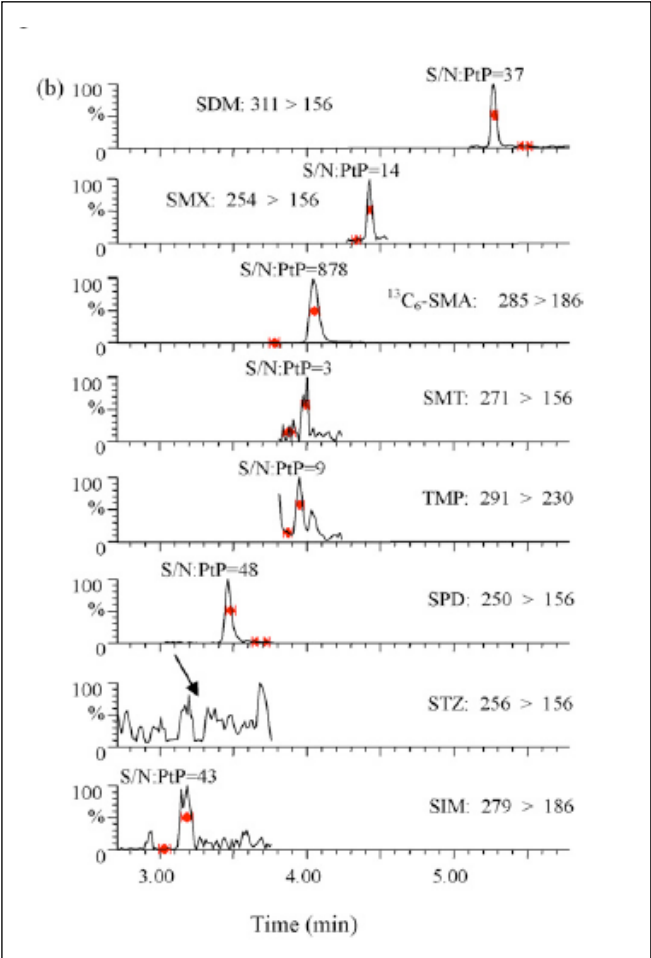
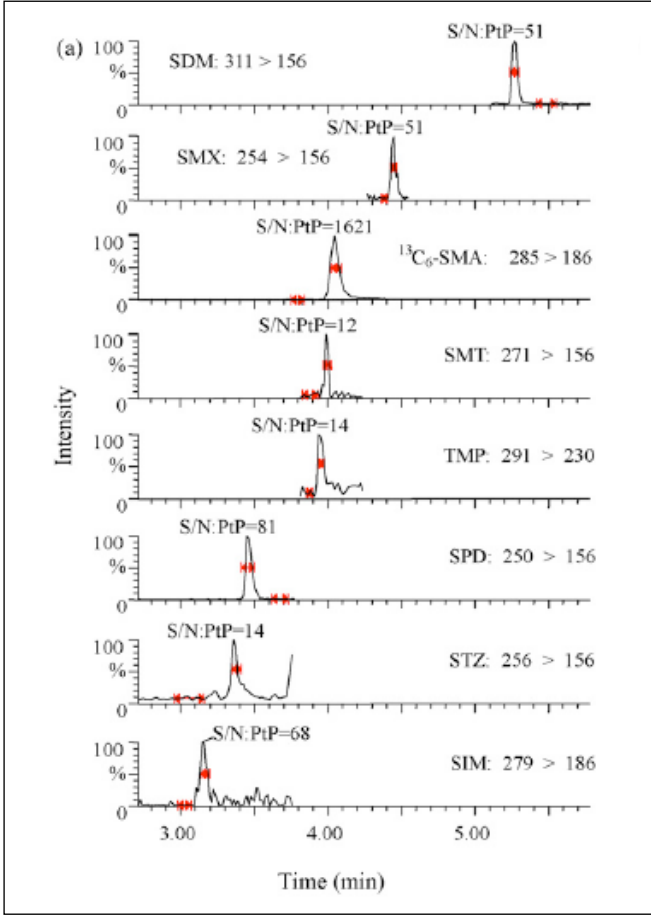
化合物	MRM
SCP	285>156
	285>207
SDM	311>156
	311>92
SDMD	279>156
	279>124
SDZ	251>156
	251>92
SIA	268>156
	268>113
SIM	279>124
	279>186
SME	281>156
	281>108
SMO	268>156
	268>108
SMP	281>156
	281>108
SMR	265>156
	265>110

16种磺胺类抗生素和甲氧苄氨嘧啶的MRM参数(续):

化合物	MRM
SMT	271>156 271>92
SMX	254>156 254>92
SNT	336>156 336>198
SPD	250>156 250>184
SQX	301>156 301>108
STZ	256>156 256>108
TMP	291>230 291>123
¹³ C ₆ -SMA	285>186

结果

河水样品的UPLC®/MS/MS MRM图谱: (a) 经过SPE净化; (b) 没有经过SPE净化。



其它详细信息请参考原文。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 6 cc/500 mg	186000115
Sep-Pak Silica, 3 cc/500 mg	WAT020810
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 1.7 μm	186002350
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.7 μm, 3 pcs/pack	186003975
LC/MS认证样品瓶	600000751CV

实验步骤

样品提取：先将鲚鱼肉样品预先切碎，取2.5 g样品于50 mL离心管中，然后添加一定浓度的标准品或QC样品，加入10 mL的80:20乙腈/水溶液，漩涡混合30 s，置于摇床上30 min。在4000 rpm下，离心10 min。

样品净化：将Oasis PRiME HLB小柱(6 cc, 200 mg, 部件号186008057)安装在预先清洁过且设置为最小真空度(大约2 psi)的真空萃取装置上。无需执行小柱活化步骤。取2.0 mL上清液，使其通过Oasis PRiME并收集滤液。取1 mL滤液，在35℃水浴温度下用温和的氮气流中挥发至近干，然后定容在250 µL甲醇/水(50:50)中。

仪器条件

UPLC-MS/MS条件图下。表1列出了氯霉素的MRM多反应监测通道和质谱参数。使用空白样品基质配置标准曲线，在5个不同浓度的范围内具有良好的线性关系，相关系数R² > 0.999。

- UPLC
- LC 系统: ACQUITY UPLC I-Class (FTN)
- 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 1.7 µm, 50 x 2.1 mm
- 流动相: A: 甲醇/水 (2:98) 溶液
B: 甲醇

梯度洗脱程序:

Time	%A	%B	Cure
Initial	95	5	
0.5	95	5	6
1.6	10	90	6
1.9	19	90	6
2.05	95	5	6
4	95	5	6

- 进样体积: 10 µL
- 柱温: 30 °C
- 洗针液和样品 甲醇/水 (90:10) 溶液
- 管理器冲洗液:
- 密封清洗液: 甲醇/水 (10:90) 溶液

MS条件

- 质谱仪: Waters Xevo TQ-S micro
- 离子源: ESI-
- 离子源温度: 150 °C
- 脱溶剂气温度: 500 °C
- 脱溶剂气流速: 1000 L/Hr
- 锥孔气流速: 50 L/Hr
- 数据管理系统: MassLynx® v4.1

化合物名称	保留时间 (m/z)	MRM通道	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
氯霉素	1.62	321.0>152.1	25	18
		321.0>257.1		12

表1. 目标化合物的MRM通道和质谱条件。

实验结果

本应用测定了氯霉素在低、中和高三种不同添加浓度的样品回收率，每个浓度水平添加3个平行样品。低浓度(0.1 µg/kg)为方法的检出限，低于农业部的检测限量(0.3 µg/kg)。图1为氯霉素标准溶液的MRM色谱图。平均回收率结果及精密度见表2。

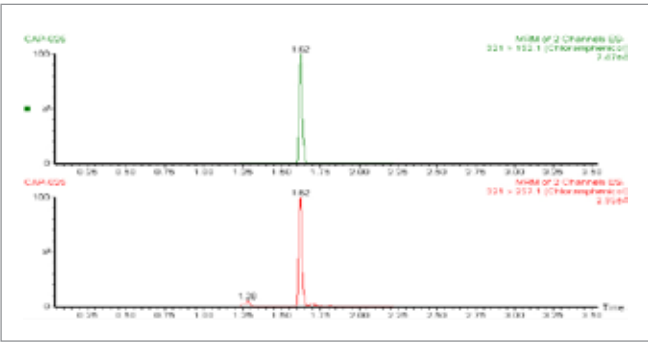


图1. 氯霉素标准溶液的MRM色谱图。

化合物名称	0.1 µg/kg		0.5 µg/kg		1.0 µg/kg	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
氯霉素 Chloramphenicol	77.9	10.8	94.5	8.9	89.0	6.1

表2. 三个添加水平的回收率及精密度(n=3)的结果。

通过扫描m/z184的母离子，能近似得到磷脂类化合物的含量信息，图2为比较了经PRiME HLB净化前后的空白鱼肉样品的磷脂监测信息。使用Oasis PRiME小柱成功去除了95%以上的磷脂和80%以上的总脂肪。

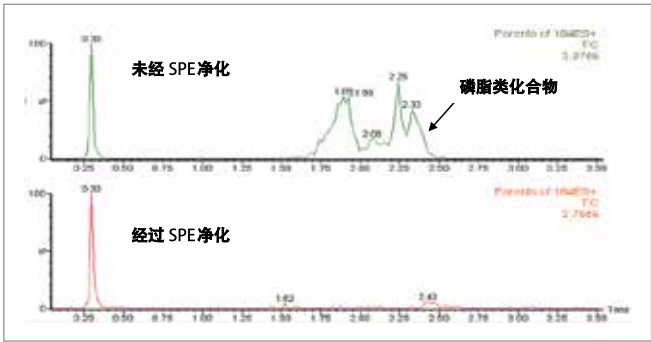


图2. 经PRiME HLB净化前后的空白鱼肉样品的磷脂净化效果比较图。

结论

提取后经过Oasis PRiME HLB固相萃取小柱净化，可以在有效去除基质中的脂肪、磷脂等干扰物的同时又能保证待测物较高的回收率；LC-MS/MS技术因灵敏度高，无需衍生化等特点，已成为动物源性食品中氯霉素类药物残留量的主要检测确证技术手段，被广泛应用于监督监管；按本应用进行样品制备，并使用Xevo TQS micro质谱仪进行LC-MS/MS分析，可在无内标的情况下可满足欧盟法规标准的定量限LOQ的要求。

订购信息

描述	部件号
Oasis PRiME HLB 6CC /200 mg	186008057
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 50, 1.7 μm	186002350

样品制备

- 1. 精称5 g蜂蜜，(添加内标D₅-CAP)溶解在5 mL水中。
- 2. 加入15 mL乙酸乙酯提取，离心。
- 3. 转移上清液至另一试管中，50 °C氮气吹干。
- 4. 用1 mL甲醇再定容，用20 mL水稀释。

固相萃取过程

(Oasis® HLB 6 cc/200 mg)

活化/平衡

A. 5 mL甲醇 B. 5 mL水

上样

20 mL样品 (速度: 2 滴/秒)

清洗

5 mL水

洗脱

2 x 2.5 mL甲醇

在 50 °C氮气吹干

用9:1水/甲醇(500 µL)再定容

色谱条件

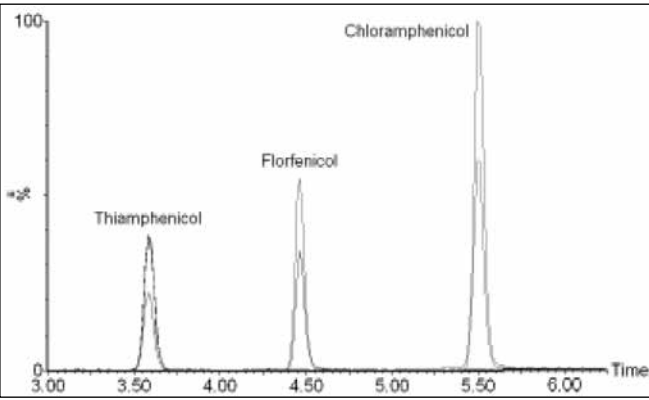
仪器:	沃特世Alliance® 2695系统		
色谱柱:	Symmetry C ₈ , 2.1 x 50 mm, 3.5 µm		
色谱柱温度:	30 °C		
保护柱:	Symmetry® Sentry C ₈ , 2.1 x 10 mm, 3.5 µm		
流动相A:	水		
流动相B:	甲醇		
流速:	0.3 mL/min		
进样量:	20 µL		
梯度:	时间(min)	A%	B%
	0.00	90	10
	8.00	10	90
	10.00	10	90
	10.10	90	10
	15.00	90	10

质谱条件

仪器:	沃特世Quattro micro™ API
电离模式:	ESI
	多反应监测 (MRM)

分析物	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
氯霉素 (CAP)	321→152	25	18
	321→257	25	12
甲枫氯霉素 (TAP)	354→185	30	23
	354→290	30	14
氟苯尼考 (FP)	356→336	25	11
	356→185	25	22
内标D ₅ -CAP	327→157	25	18

结果



CAP, TAP, FP 2 µg/kg 的叠加图谱。

分析物	平均回收率 (%)	% RSD (n = 5)
氯霉素	91.1	2.2
甲枫氯霉素	91.9	5.9
氟苯尼考	104.6	1.7

CAP, TAP, FP 0.3 ug/kg的回收率。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 6 cc/200 mg	WAT106202
Symmetry C ₈ , 2.1 x 50 mm, 3.5 µm	WAT200624
Symmetry Sentry 保护柱C ₈ , 2.1 x 10 mm, 3.5 µm, 2/pk	WAT106128
Sentry Guard Holder	WAT097958
全部回收样品瓶	600000750CV

蜂蜜中头孢唑啉、头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢喹肟残留量的测定

样品制备

准确称取5 g(精确到0.01 g) 测试样品于150 mL三角瓶中，加入25 mL 0.15 mol/L 磷酸二氢钠缓冲溶液，混匀，用氢氧化钠溶液，调节PH= 8.5。

固相萃取过程

Oasis® HLB固相萃取柱：6 cc/500 mg

活化/平衡

A.5 mL 甲醇 B.5 mL水 C.10 mL 磷酸二氢钠

上样

加入25 mL 样品制备液

清洗

A.5 mL 磷酸二氢钠 B.2 mL 水

洗脱

2 mL 乙腈

40 °C 氮气吹干溶剂

2 mL 水溶解残渣，摇匀

过 0.2 µm 滤膜，上机

色谱条件

色谱柱:	XBridge C ₁₈ , 2.1x150 mm, 3.5 µm			
柱温:	30 °C			
流动相A:	0.1 %甲酸水溶液			
流动相B:	乙腈溶液			
流速:	0.2 mL/min			
进样量:	20 µL			
梯度:	时间 (min)	流速 (µL/min)	水/%含0.1%乙酸	乙腈/%
	0.00	200	95.0	5.0
	2.00	200	95.0	5.0
	2.01	200	40.0	60.0
	8.00	200	40.0	60.0
	8.01	200	95.0	5.0
	15.00	200	95.0	5.0

质谱条件

离子源:	电喷雾离子源
扫描方式:	正离子扫描
检测方式:	多反应监测(MRM)

5种头孢菌素的定性离子对和定量离子对

化合物中文名称	化合物英文名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)
头孢唑啉	cefazolin	456/324 456/156	456/324
头孢匹林	cephapirin	424/292 424/152	424/292
头孢氨苄	cephalexin	348/158 348/174	348/158
头孢洛宁	cefalonium	459/152 459/123	459/152
头孢喹肟	cefquinome	529/134 529/396	529/134

5种头孢菌素添加浓度及其平均回收率实验数据

化合物名称	添加浓度/(µg/kg)	平均回收率%
头孢唑啉	10.0	85.6
	20.0	89.1
	40.0	89.6
	100.0	91.7
头孢匹林	10.0	86.7
	20.0	92.4
	40.0	95.4
	100.0	93.8
头孢氨苄	5.0	84.2
	10.0	95.3
	20.0	98.1
	50.0	94.3
头孢洛宁	2.0	87.2
	4.0	91.7
	8.0	102.5
	20.0	94.1
头孢喹肟	2.0	93.7
	4.0	96.5
	8.0	91.5
	20.0	97.9

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 6 cc/500 mg	186000115
XBridge C ₁₈ , 2.1 x 150 mm, 3.5 µm	186003023
VanGuard Pre-column, XBridge C ₁₈ , 2.1 x 10 mm, 3.5 µm, 2 pcs/pack	186003059
LC/MS认证样品瓶	600000750CV

样品制备

- 1. 称取5 g的处理均匀的猪肉样品，依次加入10 g无水硫酸钠，20 mL乙酸乙酯，混合均匀后均质1 min，振荡提取10 min，在10000 rpm下离心5 min。
- 2. 上清液转移至浓缩瓶中，再向残渣中加入10 mL乙酸乙酯重复上述操作一次，合并两次提取液，在40 °C下旋转蒸发至干。
- 3. 将浓缩后的样品用5 mL 30 %甲醇水溶液溶解。

固相萃取过程

(Oasis® HLB 6 cc/500 mg)



色谱条件：

- 仪器：

沃特世ACQUITY UPLC® 系统
- 色谱柱：

ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm
- 柱温：

30 °C
- 流速：

0.5 mL/min
- 流动相A：

水
- 流动相B：

乙腈
- 梯度：

时间(分钟)	A%	B%
0.00	80	20
5.00	75	25
5.30	50	50
5.50	40	60
5.60	80	20
6.50	80	20
- 进样量：

10 µL

质谱条件

- 质谱系统：

沃特世ACQUITY® TQD检测器
- 电离模式：

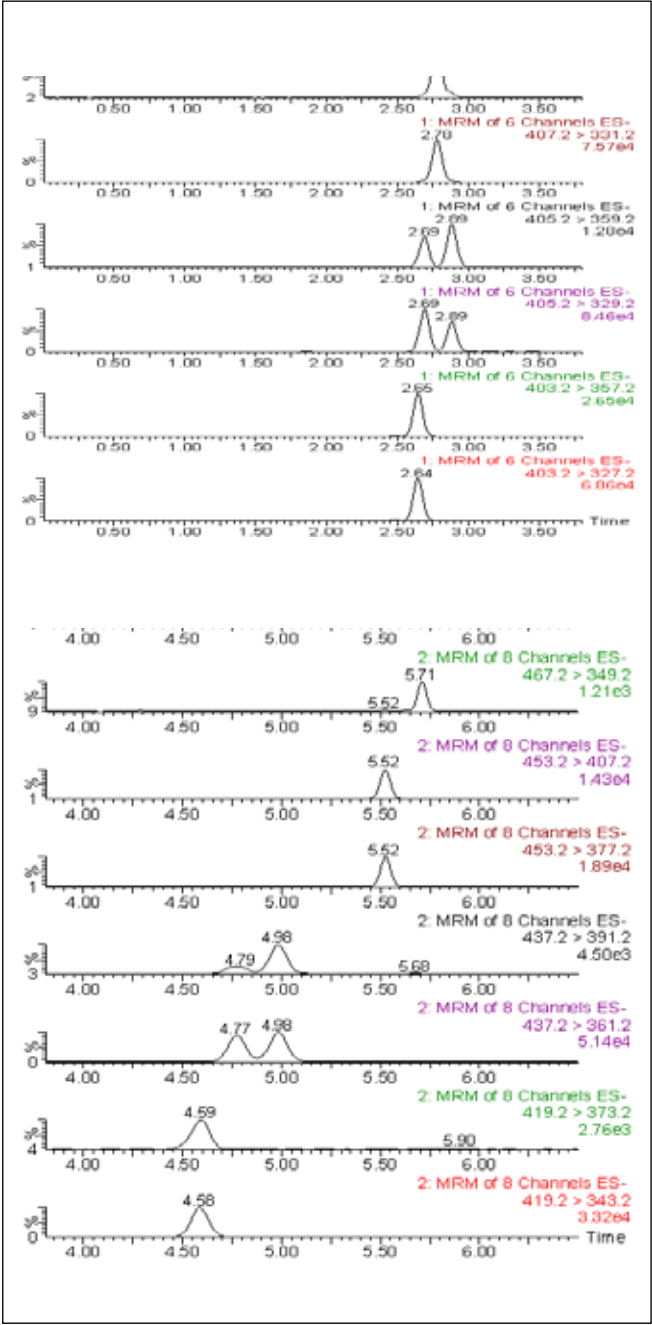
ESI-

MassLynx®4.1软件用于数据采集，TargetLynx™应用管理软件用于数据处理。调节ACQUITY TQD使得母离子和子离子在半峰宽的分辨率为0.7 Da以内。本实验的多反应监测(MRM)、驻留时间、锥孔电压和碰撞能量列表参见表1。标注下划线的离子对用于定量分析。

	MRM 变化区间	保留 时间 (min)	典型 离子 比值	驻留 时间 (s)	锥孔 电压 (V)	碰撞 能量 (eV)
泼尼松	403.2>327.2 403.2>327.2	2.65	2.7	0.05	20	15 8
泼尼松龙	405.2>329.2 405.2>359.2	2.68	9.8	0.05	28	17 11
氢化可 的松	407.2>331.2 407.2>361.2	2.79	9.8	0.05	25	16 11
可的松	405.2>329.2 405.2>359.2	2.90	4.6	0.05	25	14 10
甲基泼 尼松	419.2>343.2 419.2>373.2	4.59	13.0	0.05	28	15 11
倍他米松	437.2>361.2 437.2>391.2	4.76	28.5	0.05	26	17 11
地塞米松	437.2>361.2 437.2>391.2	5.00	11.0	0.05	28	16 11
倍氯米松	453.2>377.2 453.2>407.2	5.52	1.35	0.05	25	16 12
氟氢可 的松	467.2>421.3 467.2>349.2	5.71	10.0	0.05	30	12 23

表1. ACQUITY TQD MRM参数。

结果



糖皮质激素类混合标准品MRM色谱图。

9种糖皮质激素混合标准品在1 ng/mL-100 ng/mL浓度范围内进样分析，得到线性方程和相关系数。采用空白样品添加10 µg/kg水平下，平行6次，计算添加回收率及RSD，结果如表2。

化合物	线性方程	相关系数	相对标准偏差RSD%	回收率%
泼尼松	$Y=55.1594x-107.197$	0.9994	3.27	73.4
泼尼松龙	$Y=65.9314x-113.202$	0.9994	2.79	75.4
氢化可的松	$Y=65.6897x-116.869$	0.9994	2.97	73.6
可的松	$Y=44.1831x-84.8531$	0.9993	4.03	80.2
甲基泼尼松	$Y=34.9512x-58.3879$	0.9995	3.83	95.5
倍他米松	$Y=38.7269x-74.6360$	0.9993	4.12	92.1
地塞米松	$Y=44.6788x-87.9209$	0.9994	3.84	98.8
氟氢可的松	$Y=5.63984x-7.93426$	0.9996	3.43	70.0

表2. 糖皮质激素类兴奋剂测定方法线性方程、相关系数、相对标准偏差和回收率。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 6 cc/500 mg	186000115
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 1.7 µm	186002350
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.7 µm, 3 pcs/pack	186003975
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

样品制备: 取12.5 g奶粉于100 mL容量瓶中, 加温水溶解, 冷却至室温, 定容; 液体乳液直接取样。

样品提取: 准确称取试样5.0 g, 加入125 μ L 10 μ g/L内标混合溶液。先用10 mL乙腈沉淀蛋白, 再在超声波上提取10 min, 以15000 r/min离心, 取清液; 沉淀再用10 mL乙酸乙酯提取一次, 合并提取液, 静置待分层弃去水相, 将有机相蒸近干; 加入20 mL 10% (V/V, 下同)乙腈溶解, 待净化。

样品净化: 用6 mL甲醇、6 mL水活化Oasis® HLB小柱, 上样, 待样液流干, 分别用6 mL的2%乙酸5%甲醇 (V/V)、2%氨水5%甲醇和10%甲醇淋洗小柱, 抽干10 min; 用6 mL 5%氨化甲醇洗脱, 收集洗脱液, 40 °C以氮气吹干; 用1 mL乙腈-水 (1:1, V/V) 溶解, 过0.22 μ m滤膜, 进行LC-MS/MS分析。

色谱条件

正离子: ACQUITY UPLC® HSS T3, 2.1 x 100 mm, 1.8 μ m
负离子: BEH Shield RP18, 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m
柱温: 40 °C
样品温度: 4 °C
进样体积: 5 μ L
流动相A: 0.1%甲酸 (正)、0.08%氨水 (负)
流动相B: 甲醇 (正)、乙腈 (负)
流速: 0.3 mL/min

梯度洗脱:

正: 0-0.8min, 40%B
0.8-1.0 min 40%-67%B
1.0-6.5 min, 67%-70%B
6.5-6.6 min, 70%-100%B
6.6-7.8 min, 100%B
7.8-8.0 min, 100-40%B
总运行时间10 min
负: 0-1.0 min, 30%B
1.0-1.5 min, 30%-50%B
1.5-4.6 min, 50%B
4.6-4.8 min, 50%-100%B
4.8-5.3 min, 100%
5.3-5.5 min, 100%-30%B
总运行时间8 min

质谱条件

电喷雾电离源 (ESI+和ESI-)
毛细管电压: 3.5 kV (+)、3.0 kV (-)
锥孔电压: 30 V
离子源温度: 150 °C
脱溶剂温度: 500 °C
脱溶剂气流量: 900 L/h
碰撞池压力: 0.3 kPa
离子能1和离子能2分别为0.9和0.8
其它质谱参数参见表1。

序号	名称	保留时间(min)	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)	检出限(μ g/kg)	内标**
1	睾酮	4.40	289.4	109.1*, 97.1	34	20, 24	0.1	30
2	甲睾酮	5.15	303.2	109*, 97	17	25, 27	0.1	30
3	诺龙	3.87	275.3	109.1*, 239.3	10	22, 26	0.1	30
4	雄烯二酮	3.995	287.4	108.7*, 96.7	10	22, 26	0.1	30
5	表睾酮	5.32	289	252.8*, 97	32	23, 17	0.5	30
6	表雄酮	5.26	291.2	255.2*, 273.3	20	13, 18	0.5	30
7	17 β -羟基雄烷酮	5.70	291.4	159.1*, 255.1	28	20, 15	0.3	30
8	去氢甲睾酮	4.12	301.4	120.7*, 148.8	22	24, 16	0.2	30
9	美雄诺龙	6.98	305.3	228.8*, 269	28	18, 14	0.4	30
10	美睾酮	6.55	305.5	228.9*, 269	28	20, 16	0.4	30
11	甲基炔诺酮	4.83	313.3	109.1*, 245.2	32	26, 18	0.1	30
12	孕酮	6.95	315.3	109.1*, 97	32	20, 24	0.1	31
13	17 α -羟基孕酮	4.64	331.3	109.1*, 97.1	32	20, 22	0.1	31
14	21 α -羟基孕酮	4.14	331.3	109.1*, 97.1	32	20, 22	0.2	31
15	醋酸甲地孕酮	6.17	385.3	267.2*, 325.3	28	18, 14	0.2	31
16	醋酸甲羟孕酮	6.59	387.4	123.1*, 327.3	28	26, 14	0.3	31
17	孕二烯酮	3.91	311.3	109.1*, 81	20	25, 28	0.4	31
18	醋酸氯地孕酮	6.16	405.3	309.2*, 345.2	28	16, 12	0.2	31
19	雌二醇	4.39	271.2	145*, 183	60	38, 38	0.1	33
20	雌三醇	2.58	287.2	145.1*, 171	55	42, 35	0.3	34

表1.*为定量离子, **为对应内标序号。

表1

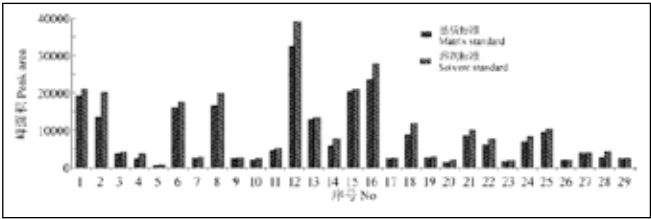
序号	名称	保留时间(min)	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)	检出限(μg/kg)	内标**
21	雌酮	4.67	269.2	145*, 159	56	53, 40	0.1	33
22	己二烯雌酚	5.67	265.1	235.1*, 249.1	42	24, 28	0.4	32
23	炔雌醇	5.00	295.2	145*, 159	55	38, 35	0.5	32
24	己烷雌酚	5.82	269.2	119*, 134.1	30	32, 16	0.3	32
25	己烯雌酚	5.84	267.2	237.1*, 251.1	40	35, 29	0.2	32
26	苯甲酸雌二醇	4.40	265.1	144.3*, 182.5	56	39, 38	0.5	33
27	玉米赤霉酮	4.03	319.3	107*, 205.1	40	30, 22	0.3	35
28	α-玉米赤霉醇	3.65	321	91*, 277.1	44	36, 23	0.3	35
29	β-玉米赤霉醇	3.04	321	91*, 277.1	44	36, 23	0.3	35
30	睾酮-d3	4.40	292.4	97, 109*	34	20, 26		
31	醋酸甲地孕酮-d3	6.17	388.4	270, 328	28	18, 14		
32	己烯雌酚-d8	5.84	275.3	228.1, 245.1*	45	35, 29		
33	雌二醇-d3	4.39	274.1	145*, 185	55	45, 40		
34	雌三醇-d3	2.58	290.1	147*, 173	55	40, 35		
35	¹³ C-玉米赤霉酮	4.03	335.1	140*, 185	42	36, 26		

表1.*为定量离子，**为对应内标序号。

结果

基质效应的评估

用空白试样基质溶液和溶剂分别配制相同浓度的标准，上机进样比较，样品经本方法提取和净化后，基质效应影响较小(下图)，在2%-32%之间，再用内标法计算，检测结果更准确。



线性关系: 以内标法计算，各化合物在0.1-50 μ/L浓度范围内的线性方程，线性关系R²均大于0.995。

回收率与重复性: 采用奶粉及牛奶基质进行加标回收实验，加标浓度为0.1, 1.0和10 μg/Kg，平行6次，各物质回收率均在70%-120%之间，RSD在0-20%之间。

参考资料

赖世云² 陶保华² 傅士姍² 何光华² 魏莹² 张京顺³ 任一平¹

¹ 浙江省疾病预防控制中心，杭州 310051

² 贝因美研究院，杭州 310057

³ 浙江大学，杭州 310057

订购信息

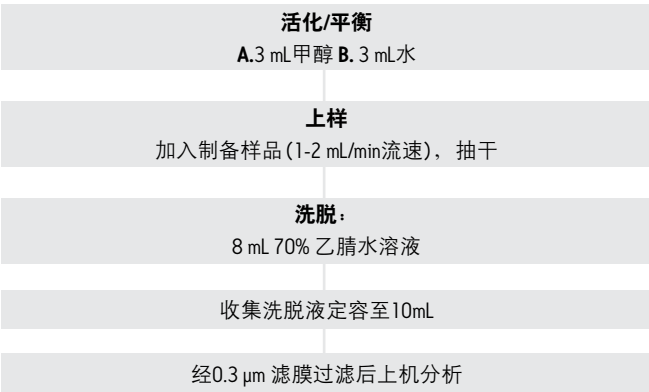
描述	部件号
Oasis HLB 6 cc/150 mg 60 μm 30/Box	186003379
ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 x 100 mm, 1.8 μm,	186003539
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 x 5 mm, 1.8 μm, 3 pcs/pack	186003976
ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 2.1 x 100 mm, 1.7 μm	186002854
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH ShieldRP18, 2.1 x 5 mm, 1.7 μm, 3 pcs/pack	186003977
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

- 1. 吸取5 mL牛奶样品于50 mL离心管中，摇匀，加入5 mL乙腈，涡流混合60 s，再加入10 mL乙腈涡流，1800 r/min离心5 min，取10 mL上清液，氮气吹干。
- 2. 加入3 mL磷酸缓冲盐(PH 4.5)，涡流15 s。

固相萃取过程

Oasis HLB固相萃取柱：60 mg/3 cc



色谱条件

系统：	Alliance® 2695系统			
色谱柱：	Atlantis T3, 2.1x150 mm, 5 μm			
柱温：	30 °C			
流动相A:	0.1%甲酸水溶液			
流动相B:	0.1%甲酸乙腈溶液			
流速：	0.2 mL/min			
进样量：	10 μL			
梯度：	时间(min)	水(含0.1%甲酸)(%)	乙腈(含0.1%甲酸)(%)	梯度变化曲线
	0.00	85	5	1
	5.00	70	30	1
	6.00	50	50	11
	17.00	50	50	1
	17.60	0	100	5
	20.00	85	15	6
	26.00	结果		

质谱条件

系统：	Quattro Ultima
离子源：	电喷雾离子源
扫描方式：	ESI+
检测方式：	多反应监测

结果与谱图

组分名称	原样中测得量(ng)	加标后测得量(ng)	标准加入量(ng)	回收率(%)
青霉素G	0.012	0.274	0.170	95.30
青霉素V	0.154	0.311	0.170	92.40
苯唑西林	0.176	0.347	0.170	100.50
氯唑西林	0.150	0.315	0.170	97.06
奈夫西林	0.132	0.286	0.170	90.59
双氯唑西林	0.249	0.412	0.170	95.88

6种青霉素类抗生素回收率测定结果。

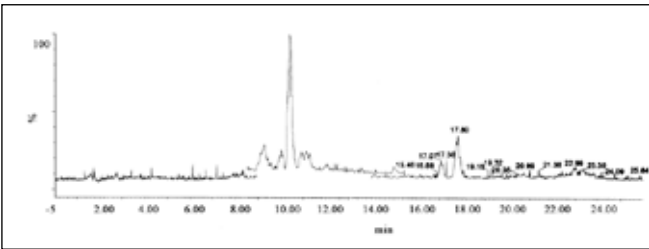


图 1. 空白牛奶样品图。

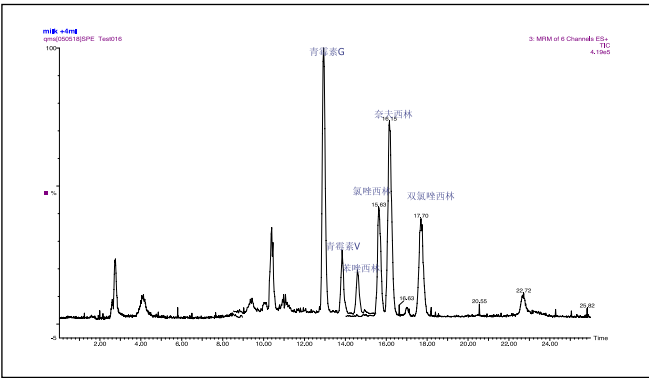


图 2. 牛奶加标样品图 (2 ng/mL)。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 3 cc/60 mg	WAT094226
Atlantis T3, 2.1 x 150 mm, 5 μm	186003736
VanGuard Pre-column, Atlantis T3, 2.1 x 10 mm, 2 pcs/pack	186003759
Sentry Guard Holder	WAT097958
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

牛奶中大环内酯类抗生素残留分析

样品制备

1. 取5mL牛奶样品放入50mL离心管中，加入15mL乙腈，摇晃，3200 rpm离心处理15min。
2. 将上清液转移到另一个50 mL离心管中，加入20 mL正己烷，摇晃15 min，3200 rpm离心处理15分钟。
3. 弃去正己烷层，将乙腈/牛奶的上清液蒸发至体积为3 mL，加入15 mL 0.1M的磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.0)。

固相萃取过程

Oasis® HLB 6 cc/150 mg

活化

- A.10 mL 甲醇 B.10 mL 水
C.10 mL 2 % 氯化钠溶液
D.2 mL 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.0)

上样

5 mL 经均质处理的牛奶

清洗1

5 mL 水

清洗2

5 mL 40 % 甲醇水溶液

抽干小柱 5 min

洗脱

5 mL 95% 甲醇水溶液

氮气吹至近干，用1 mL流动相A溶解

用0.45 µm PVDF滤膜过滤，进行LC/MS分析

在线SPE和色谱分离条件：

上样泵A路：	100% 水
上样泵B路：	100% 甲醇
上样流速：	4 mL/min
清洗：	20%甲醇/乙腈 (30/70,v/v) + 0.5% 甲酸
再平衡泵A：	50/50 甲醇/丙酮
再平衡泵B：	80/20 乙酸乙酯/丙酮
再平衡泵C：	80/20 正己烷/丙酮
流速：	4 mL/min
流动相A：	0.1% 甲酸/水
流动相B：	0.1% 甲酸/甲醇，梯度分析
电离模式：	电喷雾正离子 (ESI ⁺)， 多反应监测 (MRM)

六种大环内酯类抗生素的MRM参数如下：

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)
红霉素	734.4	158.2
克拉霉素	748.5	158.2
罗红霉素	837.5	679.4
阿奇霉素	749.6	591.3
乙酰螺旋霉素	843.6	174.2
替考米星	869.6	174.2

0.5 ppb添加水平的牛奶样品LC/MS/MS图谱 (MRM)。

在线SPE方法：

1. 取1 mL牛奶样品放入50 mL离心管中，加入20 µL浓氨水，再加入2 mL乙腈。
2. 15 min，3500 rpm离心处理15分钟。
3. 取2 mL上清液放入20 mL样品瓶中，加入18 mL 水，取5 mL进样分析。

仪器条件

仪器：	沃特世Aqua-Analysis在线SPE-LC/MS/MS水分析系统
在线SPE柱：	Oasis® HLB 2.1 x 20 mm, 25 µm
色谱柱：	XBridge® C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 3.5 µm

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 6 cc/ 150 mg	186003365
XBridge C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 3.5 µm	186002352
Oasis HLB, 2.1 x 20 mm, 25 µm	186002036
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

提取缓冲液(10 mM NH₄OOCH₃/0.4 mM Na₂EDTA/1% NaCl/2% TCA): 将0.77 g 醋酸铵(NH₄OOCH₃)加入1 L容量瓶中。加入大约900 mL试剂水以溶解醋酸铵。用1 N HCl或1 N NaOH将pH值调节至4.0。加入0.15 g乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA.2H₂O)、5 g氯化钠(NaCl)和20 g三氯乙酸(TCA)。充分混合至溶解,并用试剂水定容。

初步提取

向一支50 mL离心管中加入2 g牛肉组织匀浆或10 mL牛奶。加入20 mL提取缓冲液,涡旋混合10秒,然后充分振荡1分钟。在4000 RPM下离心样品5分钟,收集上清液。根据需要,使用稀释的HCl或NaOH将上清液的pH值调节至6.5±0.5。

SPE净化

在本研究中,使用了Oasis® HLB 96孔板(30 mg)。如有必要可以使用1 cc/30 mg的小柱。



LC 条件

系统:	ACQUITY UPLC®
色谱柱:	ACQUITY® HSS PFP, 1.7 µm, 2.1 x 100 mm
进样体积:	30 µL
柱温:	35 °C
流动相A:	20 mM HFBA水溶液
流动相B:	20 mM HFBA乙腈溶液
流速:	0.50 mL/min
梯度:	初始条件为20%的流动相B, 在7 min内以线性梯度增加至80%, 保持8 min, 在8.1 min时返回到20%。保持并重新平衡系统10 min。

MS条件

MS系统:	ACQUITY TQD
模式:	电喷雾正离子(ES+)
毛细管:	3.0 kV
提取器:	3.0 V
源温度:	130 °C
锥孔气:	20 L/h
脱溶剂气温度:	450 °C
脱溶剂气:	900 L/h
碰撞气:	氦气, 0.20 mL/min

氨基糖苷类	MRM	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
链霉素	582.3 > 246.1	70	28
	582.3 > 263.2	70	28
双氢链霉素	584.3 > 246.0	60	26
	584.3 > 263.2	60	26
庆大霉素C1a	450.4 > 160.1	35	25
	450.4 > 322.4	35	15
庆大霉素C1	478.5 > 157.2	35	30
	478.5 > 322.1	35	15
庆大霉素C2C2a	464.5 > 160.1	35	20
	464.5 > 322.4	35	15
新霉素	615.4 > 161.1	55	28
	615.4 > 293.1	55	25

本研究使用的锥孔和碰撞参数以及MRM通道。

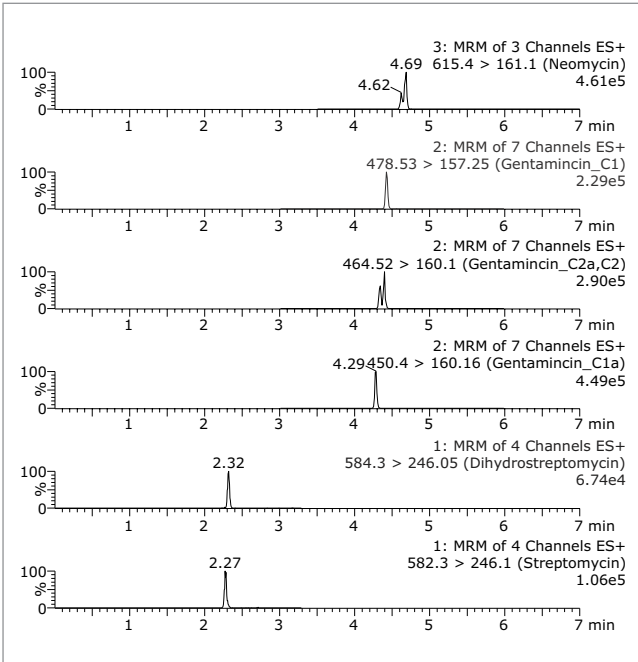
结果

氨基糖苷类	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
	n=6		n=6	
	10 ppb		200 ppb	
链霉素	77.7	12.2	81.9	13.1
双氢链霉素	93.4	3.0	81.9	14.0
Gentamicin C1a	79.4	12.0	70.4	10.0
庆大霉素C1	88.0	4.9	79.6	7.1
庆大霉素C2C2a	78.1	7.4	86.8	9.2
新霉素	75.5	11.6	78.3	10.1

加标至牛奶中的氨基糖苷类的回收率数据总结。

氨基糖苷类	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
	n=6		n=6	
	50 ppb		1600 ppb	
链霉素	102.9	11.7	97.3	4.0
双氢链霉素	88.4	5.9	89.7	6.1
庆大霉素C1a	83.6	9.6	95.3	13.3
庆大霉素C1	93.0	5.5	85.8	9.9
庆大霉素C2C2a	94.9	10.9	89.1	13.8
新霉素	86.3	3.0	83.6	11.3

加标至牛奶中的氨基糖苷类的回收率数据总结。



加标浓度为10 µg/kg (ppb)的牛奶所获得的UPLC/MS/MS色谱图。

订购信息

描述	部件号
ACQUITY HSS PFP, 1.7 µm, 2.1 x 100 mm	186005967
Oasis HLB 96孔板, 30 mg	WAT058951
Atlantis dC ₁₈ , 5 µm, 2.1 x 10 mm	186001379
Sentry™ 2.1 mm保护柱套	WAT097958
Qsert样品瓶, LCGC认证组合包	186001126C

参考资料：沃特世应用资料720004512EN
* 2012年 沃特世公司。Waters、Oasis、ACQUITY UPLC和ACQUITY是沃特世公司的注册商标。

样品制备

初步提取(QuEChERS):

向一根50 mL离心管中加入10 mL全脂牛奶(经巴氏灭菌), 或加入8 g 碎牛肉(80%瘦肉)和2 mL水。加入10 mL乙腈, 用力振荡离心管1分钟。加入欧洲标准委员会(CEN) QuEChERS用DisQuE™盐包的内容物(部件号: 186006813), 用力振荡1分钟。在4000 rpm下离心15分钟, 取1 mL 上清液(最上层)用于d-SPE纯化。

d-SPE净化

将1 mL上清液转移至一支2 mL的d-SPE净化管中, 管内含有150 mg硫酸镁和50 mg C₁₈吸附剂, 用力振荡1分钟。在12000 RPM下离心5分钟, 取0.5 mL样品用于LC-MS/MS分析。

LC条件

系统:	ACQUITY® UPLC
色谱柱:	XSelect® CSH™ C ₁₈ XP, 2.5 µm, 2.1 × 100 mm
部件号:	186006103
进样体积:	5 µL
温度:	50 °C
流动相A:	5 mM醋酸铵水溶液
流动相B:	5 mM醋酸铵甲醇溶液
流速:	0.40 mL/min
梯度:	初始条件为70%的流动相B, 在5 min内以线性梯度增加至97%, 保持8 min, 在8.1 min时返回到70%。保持并重新平衡系统10 min。
样品瓶:	最大回收样品瓶
部件号:	600000670CV

MS条件

MS系统:	Xevo® TQ-S
电离模式:	电喷雾正离子(ESI+)

结果

浓度水平	浓度范围 (ppb)		平均回收率 % (%RSD) n=5			
	低水平	高水平	碎牛肉		全脂牛奶	
Abamectin	1	10	94(3.6)	88(3.6)	86(14.0)	89(3.7)
Ivermectin	1	10	98(17.7)	85(3.1)	84(5.3)	83(14.8)
Doramectin	10	100	89(4.8)	85(4.2)	101(11.7)	90(5.0)
Epinomectin	10	100	99(2.9)	91(1.5)	94(3.9)	93(3.0)
Moxidectin	10	100	90(4.2)	87(1.8)	100(2.4)	90(5.6)

表1. 碎牛肉和全脂牛奶样品中的阿凡曼菌素回收率。

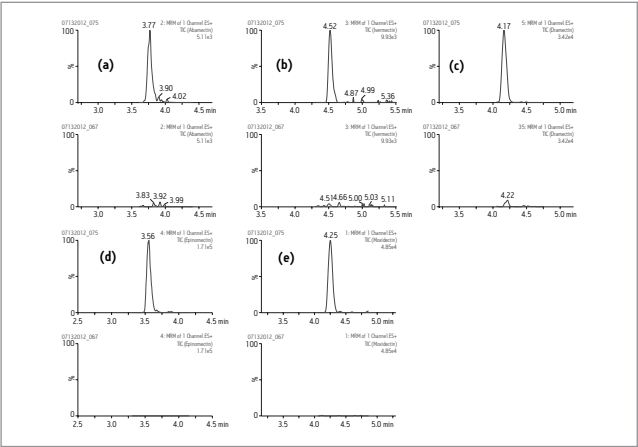


图1. 从碎牛肉样品获得的阿维菌素LC-MS/MS色谱图; 上面的谱线是低水平加标样品, 下面的谱线是碎牛肉空白样。(a)阿维菌素 (b)伊维菌素 (c)多拉菌素 (d)依普菌素 (e)莫昔克丁。

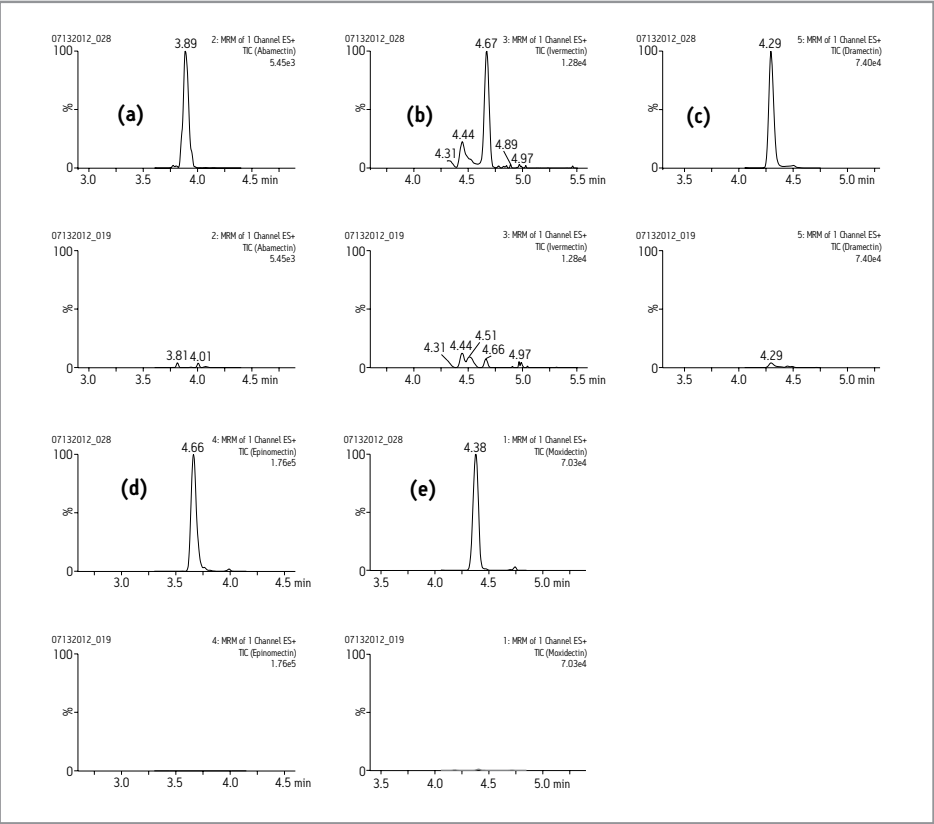


图2. 从全脂牛奶样品获得的阿维菌素LC-MS/MS色谱图; 上面的谱线是低水平加标样品, 下面的谱线是全脂牛奶空白样。(a)阿维菌素 (b)伊维菌素 (c)多拉菌素 (d)依普菌素 (e)莫昔克丁 (d) eprinomectin (e) moxidectin。

订购信息

描述	部件号
XSelect CSH C ₁₈ XP色谱柱, 2.5 μ m, 2.1 x 100 mm	186005275
CEN QuEChERS DisQuE试剂袋	186006813
DisQuE 50 mL离心管	186004837
最大回收样品瓶	600000670CV

参考资料: 沃特世应用资料720004440EN
©2013年沃特世公司。Waters、ACQUITY UPLC、XSelect 和Xevo是沃特世公司的注册商标。DisQuE是沃特世公司的商标。

前处理

1. 用30 mL乙醇/乙酸(99:1, v/v)对1.5 g匀浆样品进行提取,并在4000 rpm下离心5分钟。
2. 取10 mL上清液,用于SPE净化和富集。
3. 对于肌肉样品,在进行SPE之前用5 mL水稀释10 mL上清液;肝脏样品则无需稀释。

固相萃取过程

小柱I: Oasis® MCX, 6 cc/150 mg

活化/平衡:
A. 3 mL甲醇 B. 3 mL水 C. 3 mL乙醇

上样:
10 mL样品

清洗:
A. 3 mL 1%乙酸/乙醇 B. 3 mL水 C. 3 mL甲醇

小柱II: Sep-Pak® Accell™ QMA 3 cc/500 mg

活化/平衡:
3 mL 5%氨的甲醇溶液

将Sep-Pak Accell QMA小柱连接至MCX小柱的出口。
从MCX小柱洗脱至Sep-Pak Accell QMA小柱中。
(6 cc小柱位于顶部)

洗脱*:
3 mL (5:95, v/v) 氨的甲醇溶液

取下Oasis MCX小柱

清洗:
3 mL乙醇

洗脱:
3 mL乙醇的甲酸溶液(98:2, v/v)

蒸发溶剂并复溶于150 µL乙腈水溶液(15:85, v/v)中

*注: 分析物从小柱I中洗脱后,通过阴离子交换保留在小柱II上。
因此,来自小柱I的洗脱液成为了小柱II的上样

UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC®		
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 µm, 1 x 50 mm		
流速:	0.12 mL/min		
流动相A:	1%甲酸水溶液		
流动相B:	乙腈		
梯度:	时间(min)	A%	B%
	0.00	95	5
	3.00	50	50
	6.50	50	50
	10.50	95	5
	15.50	95	5

进样体积: 10 µL
柱温: 30 °C

MS条件

MS系统: Waters® Quattro micro™ API
电离模式: 电喷雾正离子(ESI+)

分析物	MRM通道
恩诺沙星	360→342
	360→316
环丙沙星	332→314
	332→288

MRM方法参数。

结果

比较样品制备前后加标鸡肌肉样品的结果,测得平均回收率为75%。
加标浓度为2 µg/kg的六份重复样品的精度为12%。

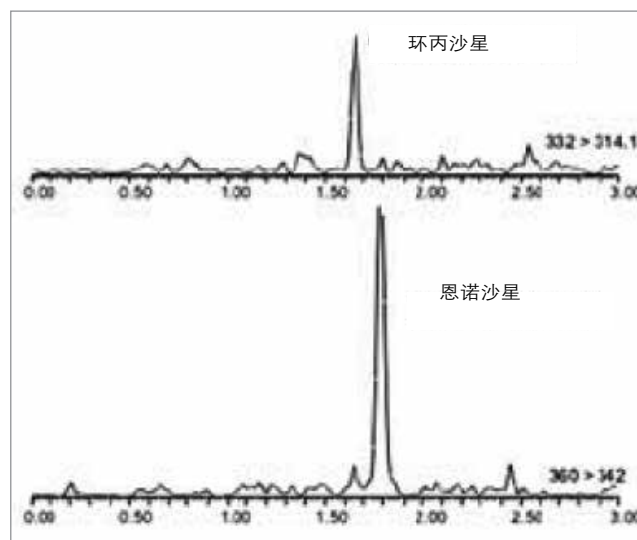


图 1. 加标(2 ng/kg)鸡肌肉的典型UPLC®/MS/MS色谱图。

订购信息

描述	部件号
Oasis MCX, 6 cc/150 mg, 60 µm, 30/盒	186000255
Sep-Pak Accell Plus QMA, 3 cc/500 mg, 50/盒	WAT020850
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 µm, 1 x 50 mm	186002344
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 µm, 1 x 50 mm, 3/包	176000861
Qsert样品瓶	186001126

参考资料: 沃特世应用WA43206

©2011年沃特世公司。Waters、Oasis、Sep-Pak、ACQUITY UPLC和UPLC是沃特世公司的注册商标。Quattro micro和Accell是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

牛奶中四环素、土霉素、金霉素、强力霉素残留分析

样品制备

1. 取1.5 mL 牛奶样品，加入6 mL pH 4 Mclivaine 缓冲液*，涡旋混匀。
2. 8000 rpm离心10分钟。
3. 取上清液，用1 M NaOH溶液将pH调节至11。

*Mclivaine 缓冲液的配制：

将1000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液与625 mL 0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液混合，必要时用NaOH或HCl调节pH值=4.0±0.05。

固相萃取过程 (Oasis® MAX 1cc/30mg)

活化/平衡
A.1 mL甲醇 B.1 mL水

上样
所有上清液

清洗1
0.5 mL5%氨水

清洗2
0.5mL100%甲醇

洗脱
0.5 mL 45:55乙腈/75 mM草酸

洗脱液用流动相A稀释3倍，
过0.2 µm滤膜后进行LC/MS/MS 分析

色谱条件

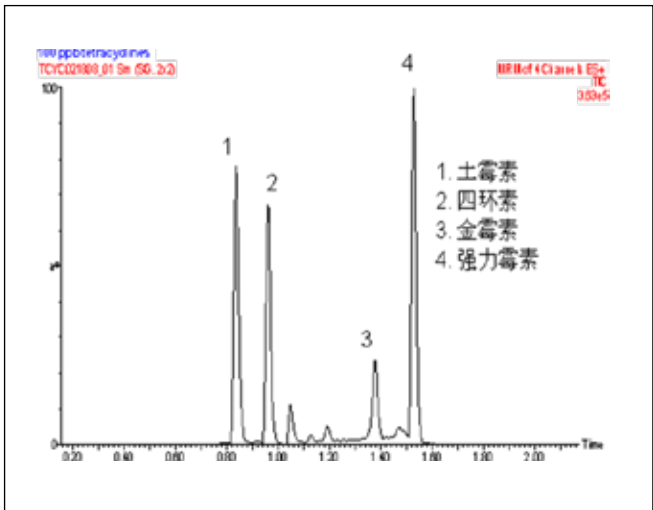
仪器：	沃特世ACQUITY UPLC® 系统		
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1x50 mm, 1.7 µm,		
流动相A：	25 mM 草酸水溶液		
流动相B：	乙腈		
流速：	0.4 mL/min		
梯度(线性梯度)：	时间(min)	A%	B%
	0.00	85	15
	2.50	50	50
	3.50	30	70
	3.60	85	15
	4.00	85	15

质谱条件

仪器：	沃特世ACQUITY® TQD检测器
电离模式：	ESI+

分析物	MRM	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
土霉素	461>426	21	20
四环素	445>410	22	20
金霉素	479>444	23	25
强力霉素	445>428	23	18

结果



总离子流图。

	20 µg/L 添加水平	80 µg/L 添加水平
化合物	% 回收率(%RSD)	% 回收率(%RSD)
土霉素	88(8.3)	83(8.6)
四环素	87(13)	84(3.2)
金霉素	65(13)	62(4.9)
强力霉素	93(5.2)	88(5.6)

添加不同浓度水平的回收率数据 (n=6)。

订购信息

描述	部件号
Oasis MAX, 1 cc/30 mg	186000366
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 1.7 µm	186002350
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.7 µm, 3 pcs/pack	186003975
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

- 1. 精称1.0±0.1 g 水产品，放入30 mL 旋口塑料离心管中。
- 2. 加入50 µL TMPD 溶液 (1 mg/mL)。
- 3. 加入标准样品溶液(孔雀石绿MG, 无色孔雀石绿LMG, 0.1 µg/mL) 及氘代内标，并放置10 min。
- 4. 加入Mclvaines缓冲液 (pH 2.6) / 甲醇 (50:50v/v) 溶液10 mL；匀浆45 s。
- 5. 离心5000 rpm, 20 min, 提取上清液，移入试管中。
- 6. 重复步骤4,5, 将两次上清液合并，该提取液即为SPE上样液 (体积约20 mL)*。

固相萃取过程

(Oasis® MCX 3 cc/60 mg)

活化/平衡

A. 2 mL 甲醇 B. 2 mL 水 C. 2 mL Mclvaines 缓冲液 (pH 2.6)

上样

加入提取液*，约20 mL

清洗

A. 2 mL 0.1 M HCl 酸化 B. 纯水清洗两次，每次2.5 mL
C. 2 mL 50% 甲醇/水 D. 3 mL 正己烷，真空抽干

洗脱

5 mL 50 % 乙酸乙酯：45 % 甲醇：5 % 氨水 (v/v/v)

50 °C，氮气吹扫至干

用50 % 乙腈/水定容 (100 µL)

缓冲液的配制：

Mclvaines 缓冲液 (pH 2.6)：

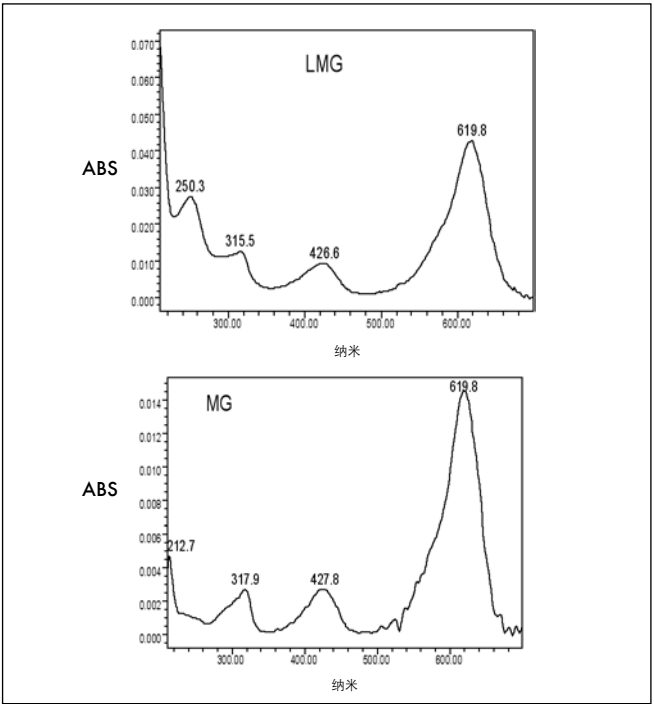
- 1. 溶液A: 0.1 M 柠檬酸单水合物 - 10.5 g 柠檬酸单水合物溶解在 500 mL 水中。
- 2. 溶液B: 0.2 M 磷酸氢二钠二水合物 - 14.2 g 磷酸氢二钠二水合物溶解在 500 mL 水中。
- 3. 用溶液B 将 500 mL 溶液A 调至 pH 2.6。

提取溶剂的配制：

250 mL Mclvaines 缓冲液 (pH 2.6) 与 250 mL 甲醇混匀。

色谱条件

仪器：	沃特世Alliance® 2695系统，2487 双波长紫外检测器		
色谱柱：	SunFire® C ₁₈ , 4.6 x 150 mm, 5 µm		
自填PbO ₂ 氧化小柱：	4.6 x 20 mm (PbO ₂ : 硅藻土=3:1)，两端覆以 2 µm 的不锈钢筛板。氧化小柱连接在色谱柱与检测器之间。		
流动相A：	125 mM 乙酸铵，用乙酸调pH 4.5		
流动相B：	乙腈		
流速：	2 mL/min		
梯度：	时间(min)	A%	B%
	0.00	45	55
	7.00	10	90
	10.00	10	90
检测波长：	619 nm		
进样量：	50 µL		



经氧化后MG-LMG的紫外光谱图。鱼肉中孔雀石绿 (MG), 无色孔雀石绿 (LMG) 的回收率为50 - 80%，精密度良好。

订购信息

描述	部件号
Oasis MCX 6 cc/150 mg	186000256
SunFire C ₁₈ , 4.6 x 150 mm, 5 µm	186002559
SunFire C ₁₈ , 4.6 x 150 mm, 5 µm 保护柱 2 pcs/pack	186002684
Sentry Guard Holder	WAT046910
全回收样品瓶	600000750CV

目的

利用CORTECS®2.7 μm实心核颗粒色谱柱的高柱效和低背压的优势，在Alliance HPLC系统上可以同时分离18种磺胺类化合物。本方法主要参照国内标准包括《GB 29694-2013 食品安全国家标准 动物性食品中13种磺胺类药物多残留的测定 高效液相色谱法》和《农业部958号公告-12-2007 水产品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱法》。

实验步骤

参照《GB 29694-2013 食品安全国家标准 动物性食品中13种磺胺类药物多残留的测定 高效液相色谱法》中样品前处理步骤。
提取：称取试样5g于50mL离心管中，加乙酸乙酯20mL，涡动2min，4000r/min离心5min，取上清液于100mL鸡心瓶中，残渣中加乙酸乙酯20mL，重复提取一次，合并两次提取液。

鸡心瓶中加0.1mol/L盐酸溶液4mL，于40℃下旋转蒸发浓缩至少于3mL，转至10mL离心管中，用0.1mol/L盐酸溶液2mL洗鸡心瓶，转至同一离心管中，再用正己烷3mL洗鸡心瓶，将正己烷转至同一离心管中，涡旋混合30s，3000r/min离心5min，弃去正己烷，再次用正己烷3mL洗鸡心瓶，将正己烷转至同一离心管中，涡旋混合30s，3000r/min离心5min，弃去正己烷，取下层液备用。
净化：Oasis MCX柱(60mg, 3cc, 部件号186000254)依次用甲醇2mL和0.1mol/L盐酸溶液2mL活化，取备用液过柱，控制流速1mL/min，依次用0.1mol/L盐酸溶液1mL和50%甲醇乙腈溶液2mL淋洗，用5%氨水甲醇溶液4mL洗脱，收集洗脱液。于40℃氮气吹干，加0.1mol/L盐酸溶液1.0mL溶解残余物，滤膜过滤，供HPLC测定。

序号	名称	英文名称	英文简称	保留时间	UPS分离度
1	磺胺二甲基异噻啉	sulfisomidine	SIM	1.84	
2	磺胺酯酰	Sulfacetamid	SAA	2.88	13.6
3	磺胺噻啉	Sulfadiazine	SD	3.18	3.2
4	磺胺吡啉	Sulfapyridine	SPD	3.56	3.8
5	磺胺甲噻啉	Sulfamerazine	SMR	4.15	5.4
6	磺胺噁唑	Sulfamoxole	SMO	4.61	4.0
7	磺胺二甲基噻啉	Sulfamethazine	SDM	5.10	4.2
8	磺胺甲氧吡嗪	Sulfamethoxypyridazine	SMP	5.82	5.9
9	磺胺-6-甲氧噻啉	Sulfamonomethoxine	SMM	7.77	15.4
10	磺胺氯吡嗪	Sulfachloropyridazine	SCP	8.44	4.9
11	磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	SMZ	9.88	10.7
12	磺胺二甲异噁唑	Sulfafurazole/ Sulfisoxazole	SFZ	10.89	8.3
13	苯酰磺胺	Sulfabenzamide	SBA	12.26	12.1
14	磺胺氯吡嗪	Sulfaclozine	GMP	12.51	2.3
15	磺胺喹噁啉	Sulfaquinoxaline	SQX	12.77	2.5
16	磺胺苯吡唑	Sulfaphenazole	SPA	12.96	1.9
17	磺胺二甲氧噻啉(吡嗪)	Sulfadimethoxine	SDT	13.23	2.7
18	磺胺硝苯	Sulfanitran	SAN	14.88	22.0

表1. 十八种磺胺类药物。

仪器条件

Alliance HPLC系统

LC 系统: Alliance e2695配2489紫外检测器
色谱柱: CORTECS C₁₈+, 2.7μm, 4.6 x 150 mm
检测波长: 270 nm
进样体积: 10 μL
柱温: 35 °C
流动相: A: 0.1%甲酸水溶液
B: 乙腈

梯度洗脱程序:

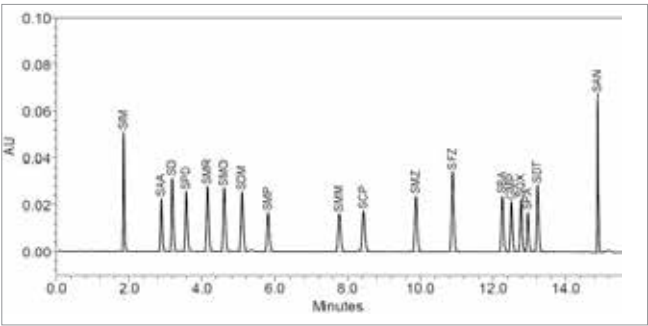
Time (min)	Flow (ml/min)	%A	%B	Curve
0	1	85	15	
1.5	1	85	15	6
6.5	1	80	20	6
12.5	1	64	36	6
13.0	1	20	80	6
15.0	1	10	90	6
25	1	85	15	1

洗针液和样品管理器冲洗液: 乙腈/水 (90:10) 溶液
密封清洗液: 乙腈/水 (10:90) 溶液

实验结果

色谱分离

CORTECS®2.7 μm 实心核颗粒色谱柱与Alliance HPLC系统结合使用，能够在15min以内分离18种磺胺类药物（分离度大于1.9）。



HPLC分离18种磺胺类药物的色谱图。

名称	相关系数R	线性方程
SIM	1.0000	Y = 5.05e+001 X + 5.64e+000
SAA	1.0000	Y = 3.13e+001 X - 7.63e+000
SD	0.9999	Y = 5.16e+001 X - 2.50e+001
SPD	1.0000	Y = 4.15e+001 X - 4.11e+001
SMR	1.0000	Y = 4.04e+001 X - 1.24e+001
SMO	1.0000	Y = 4.83e+001 X - 2.44e+001
SDM	0.9997	Y = 6.54e+001 X + 9.39e+001
SMP	0.9997	Y = 3.12e+001 X + 7.93e+001
SMM	0.9998	Y = 3.36e+001 X - 6.46e+001
SCP	1.0000	Y = 3.79e+001 X - 3.48e+001
SMZ	0.9999	Y = 3.91e+001 X + 1.07e+001
SFZ	0.9997	Y = 2.82e+001 X - 4.05e+001
SBA	0.9996	Y = 3.67e+001 X - 5.24e+000
GMP	0.9997	Y = 3.43e+001 X - 4.28e+001
SQX	0.9998	Y = 3.17e+001 X - 2.06e+001
SPA	0.9994	Y = 3.47e+001 X + 9.22e+000
SDT	0.9999	Y = 4.64e+001 X + 1.68e+001
SAN	1.0000	Y = 4.60e+001 X - 3.92e+001

表2. 磺胺类化合物的线性曲线。

回收率结果

空白猪肉样品在10、50和100 μg/kg添加回收率均得到满意结果，在70%-110%之间。使用Oasis MCX阳离子柱进行样品处理，猪肉样品的净化效果很好，基本无杂质干扰。

名称	添加浓度 10ng/g	添加浓度 50ng/g	添加浓度 100ng/g
SIM	95.2%	79.2%	71.2%
SAA	104.2%	66.2%	78.4%
SD	84.9%	78.3%	78.7%
SPD	107.0%	106.3%	69.8%
SMR	87.8%	111.5%	73.7%
SMO	87.0%	81.9%	68.9%
SDM	96.9%	96.7%	73.7%
SMP	96.1%	110.5%	72.9%
SMM	106.3%	98.2%	75.0%
SCP	84.7%	91.6%	72.5%
SMZ	109.3%	86.3%	73.9%
SFZ	113.7%	91.3%	85.6%
SBA	110.1%	96.4%	70.4%
GMP	89.5%	88.3%	71.2%
SQX	90.0%	98.3%	68.4%
SPA	89.8%	96.6%	68.5%
SDT	104.4%	94.2%	70.7%
SAN	108.6%	100.7%	80.6%

表3. 空白猪肉样品在三个添加浓度的回收率结果。

结论

CORTECS®2.7 μm 实心核颗粒色谱柱完全可兼容HPLC系统(梯度最高柱压为3300psi)，其高的分离性能仅15min就可以分离18种磺胺类药物。本方法能够覆盖国家标准(GB 29694-2013)和农业部958号公告-12-2007中涉及的磺胺类化合物，同时还增加了磺胺二甲基异噻啶、磺胺氯吡嗪、磺胺硝苯、磺胺苯吡唑。与上述两个标准相比，本应用在液相色谱的分析时间上从50min缩短至25min，大大节省溶剂用量，帮助提高实验室的工作效率。18种磺胺类化合物均可以达到基线分离(分离度均大于1.9，见表1)，同时解决了在农业部958号公告-12-2007中无法分离的磺胺二甲基异噻啶和磺胺甲氧吡嗪，及磺胺氯吡嗪和磺胺-6-甲氧噻啶。混合型Oasis MCX阳离子柱对碱性化合物具有高选择性及高灵敏度的吸附，因此可以得到更干净的提取物，适合复杂样品在液相色谱上的分析检测。

订购信息

描述	部件号
Oasis MCX 3CC/60 mg	186000254
Cortecs C ₁₈ +, 4.6 x 150, 2.7 μm	186007408

前处理

首先用3 mL乙腈提取牛奶(1 mL)(振荡1分钟)。离心样品, 收集上清液。在45°C的水浴中, 用温和的氮气流将乙腈提取液(提取液1)蒸发至刚好1 mL以下(该步骤将提取青霉素以及部分磺胺类药物)。然后用3 mL pH 5琥珀酸盐/EDTA缓冲液提取牛奶固体颗粒。离心样品并收集上清液(提取液2, 该步骤将提取四环素和剩余的磺胺类药物)。将提取液2与蒸发后的提取液1混合, 加水使体积变成10 mL。然后使用Oasis® HLB小柱处理混合后的提取液。

固相萃取过程

Oasis HLB 1 cc/30 mg

活化/平衡:
1 mL 甲醇, 1 mL 水

上样:
来自样品前处理步骤

清洗:
0.5 mL 5%甲醇/水

洗脱:
含有60 mM醋酸的60:40甲醇/水

LC条件

色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18,
1.7 µm, 2.1 x 100 mm

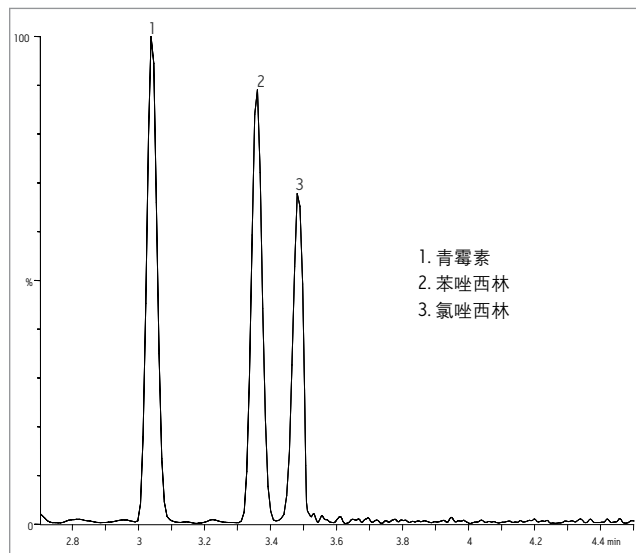
流速: 4 mL/min

流动相A: 0.1%甲酸水溶液

流动相B: 乙腈

梯度:	时间(min)	A%	B%
	初始	85	15
	2.00	60	40
	2.50	40	60
	3.00	10	90
	4.50	10	90
	4.60	85	15
	5.50	85	15

结果



100 ppb加标牛奶。

化合物	MRM通道	回收率
土霉素	461→426	78
四环素	445→410	69
金霉素	479→444	76
磺胺嘧啶	251→92	83
磺胺噻唑	256→92	87
磺胺吡啶	250→92	66
磺胺甲基嘧啶	265→92	95
磺胺二甲嘧啶	279→92	90
磺胺甲氧哒嗪	281→92	70
磺胺氯哒嗪	285→92	85
磺胺甲恶唑	254→92	97
磺胺二甲氧嘧啶	311→92	83
青霉素G	335→160	93
苯唑西林	402→160	83
氯唑西林	436→160	96

MRM方法参数和回收率数据。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 1 cc/30 mg, 100/盒	WAT094225
ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, 1.7 µm, 2.1 x 100 mm	186002854
LCMS认证样品瓶	600000751CV

©2011年沃特世公司。Waters、Oasis和ACQUITY UPLC是沃特世公司的商标。

农药和污染物

食品中存在的各种污染物，例如农药、除草剂、非法添加的染料、霉菌毒素和三聚氰胺，都是监管单位、公共卫生机构和广大民众所担心的问题。本章中包含的方法涉及：

- 样品前处理
- 样品制备
- 仪器方法和结果

这些方法达到甚至超过了政府机构所要求的检测和定量水平。

本章还包括采用QuEChERS和其它官方方法的多残留农药分析应用。此外，还提供了关于多种不同样品的QuEChERS*应用方法，以举例说明可满足以下要求：

- 不同的前处理要求，例如，在提取步骤之前浸泡干燥样品
- d-SPE吸附剂是一种选择，例如，用于去除脂肪

* 关于该方法的更多详细信息，请参见我们网站上的沃特世QuEChERS白皮书(文献编号720003643en)。



实验步骤

QUECHERS提取：

植物源性食品：称取10 g均质的蔬菜水果样品至50 mL离心管中，并加入测试目标化合物。加入10 mL乙腈，用手振摇样品1 min。然后加入QuEChERS提取盐包(部件号186006813)，用手大力振摇离心管1 min。在3200 rcf下离心5 min，上清液待Oasis PRiME HLB净化。

动物源性样品：称取2 g均质的动物源性样品至50 mL离心管中，并加入测试目标化合物。加入10 mL水和10 mL乙腈混匀，用手振摇样品1 min。然后加入QuEChERS提取盐包(部件号186006813)，并大力振摇离心管1 min。在3200 rcf下离心5 min，上清液待Oasis PRiME HLB净化。

SPE净化：

将Oasis PRiME HLB小柱安装到预先清洁过的真空萃取装置上或连接一次性注射器配合使用。无需执行小柱活化步骤。取部分(不同规格小柱上样体积见表1)上述上清液使其通过Oasis PRiME HLB并收集全部滤液。从滤液中吸取100 μ L于样品瓶中，然后加400 μ L水稀释后用于UPLC-MS/MS分析(或者从收集的滤液中定量量取部分经氮吹后用流动相定容，然后上机分析)。

	Van型		Plus型	
SPE 柱类型	3 cc 150 mg	6 cc 500 mg	Light 100 mg	Short 335 mg
部件号	186008717	186008718	186008886	186008887
上样体积	2 mL	6 mL	1.5 mL	4 mL

表1. 不同规格PRiME HLB柱的建议上样体积。

仪器条件

UPLC条件

LC 系统: ACQUITY UPLC I-Class(FTN)
 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 mm x 100 mm
 (部件号: 186003539)
 流动相: A: 10 mM 乙酸铵+ 0.05% 甲酸水溶液
 B: 10 mM 乙酸铵+0.05% 甲酸的甲醇

梯度洗脱程序:

时间(min)	流速(mL/min)	A%	梯度曲线	
初始	0.45	98	2	6
0.25	0.45	98	2	6
12.25	0.45	1	99	6
13.00	0.45	1	99	6
13.01	0.45	98	2	6
17.00	0.45	98	2	6

进样体积: 5 μ L
 柱温: 45 $^{\circ}$ C
 洗针液和样品
 管理器冲洗液: 甲醇/水(90: 10)溶液
 密封清洗液: 甲醇/水(10: 90)溶液

MS条件

质谱仪: Waters Xevo TQ-XS
 离子源: ESI+/-
 离子源温度: 150 $^{\circ}$ C
 脱溶剂气温度: 500 $^{\circ}$ C
 脱溶剂气流速: 1000 L/Hr
 锥孔气流速: 50L/Hr
 数据管理系统: MassLynx® v4.1

本实验的UPLC/MSMS方法，通过使用Waters Quanpedia数据库建立，Quanpedia库可以自动生成每种农药的数据采集方法(MS方法)、液相方法(UPLC方法)和数据处理方法(定量方法)。每种化合物选取两对离子。

本实验比较了五种样品经Oasis PRiME HLB小柱的净化效果，见图1。从图上肉眼可见Oasis PRiME HLB可以有效去除样品提取物中大部分的叶绿素和叶黄素等干扰色素。Oasis PRiME HLB小柱与QuEChERS净化效果的比较可参见应用文章“使用Oasis PRiME HLB小柱快速有效地去除QuEChERS菠菜提取物中的叶绿素”。

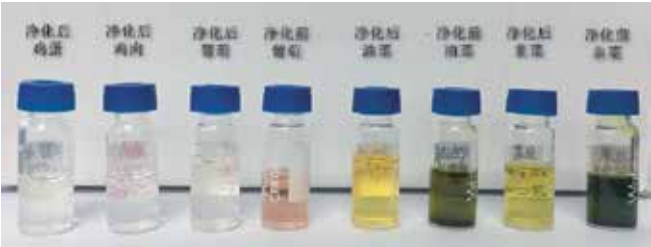


图1. Oasis PRiME HLB净化前后对比图。

本实验比较了QuEChERS净化方式和Oasis PRiME HLB对农药回收率的影响。QuEChERS净化管的GCB主要用于样品中色素的去除，尤其是GCMS分析时尤为关注。每毫升QuEChERS提取液使用含50 mg GCB填料时才能干净的去除其中的色素，然而会影响大量平面结构农药的回收率。而Oasis PRiME HLB在达到同样的净化效果时对这些农药的回收率影响很小。图2比较了Oasis PRiME HLB和50 mg GCB/mL对农药回收率的影响。

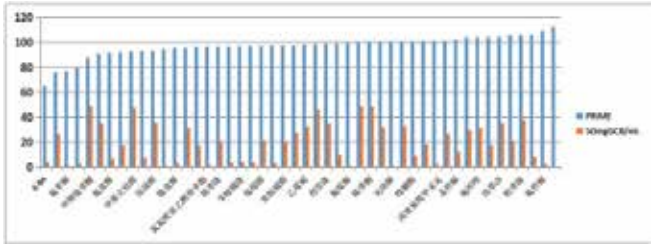


图2. Oasis PRiME HLB与每毫升50 mg GCB净化方法对农药回收率的对比。

本方法对三种植物源性样品(韭菜、油菜、葡萄)和两种动物源性样品(鸡肉、鸡蛋)进行添加回收实验。实验中做了三个不同的添加浓度，每个添加浓度做三个平行，平均回收率及RSD结果见附表。韭菜、油菜和葡萄样品在10 ng/g(中间浓度)的添加浓度下，回收率在49.2% - 122.1%之间，RSD<30%。鸡肉和鸡蛋样品在20 ng/g(中间浓度)的添加浓度下，回收率在58.3% - 134.4%之间，RSD<23%。本应用定量方法为外标法，使用空白样品基质配置标准曲线，在0.2 µg/L - 10 µg/L范围之间具有良好的线性关系，相关系数R² > 0.99。

Oasis PRiME HLB不仅可以去除样品基质中的干扰杂质，如植物源性食品中的叶绿素和叶黄素等色素，动物源性食品中的脂肪、磷脂等，又能保证待测物尤其是平面结构农药较高的回收率，实现了准确、快速测定植物源性和动物源性样品中多农药残留。

本研究中，植物源性食品韭菜、油菜和葡萄在10 ng/g的添加浓度下90%以上的农药回收率在60 - 120%之间；动物源性食品鸡蛋和鸡肉在在20 ng/g的添加浓度下平均85%的农药回收率在70 - 110%之间。

相较于传统的SPE或QuEChers对农残的净化Oasis PRiME HLB更加方便、简洁，容易实现高通量。

1. 使用Oasis PRiME HLB小柱快速有效地去除QuEChERS菠菜提取物中的叶绿素，waters技术简报，720005994ZH，2017

订购信息

描述	部件号
Oasis PRiME HLB 3CC /150 mg	186008717
Oasis PRiME HLB 6CC /500 mg	186008718
Oasis PRiME HLB Light 100 mg	186008886
Oasis PRiME HLB Short 335 mg	186008887
ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 x 100, 1.8 µm	186003539

样品制备

AOAC QuEChERS提取:

由于鳄梨的脂肪含量极高, 我们修改了AOAC QuEChERS方法, 将样品量从15 g减少到5 g。称取5 g样品加入50 mL离心管中(对于加标样品, 加入所需体积的加标标准溶液)。加入5 mL水和15 mL 99:1乙腈/乙酸。漩涡混合30 s, 然后充分振荡2 min。加入QuEChERS盐(用于AOAC的DisQuE提取盐包, 部件号 186006812)。用手大力振摇离心管1 min, 然后约2500 rcf离心力下离心5 min。取一部分上清液(最上层)进行净化。

通过式SPE净化:

将Oasis PRiME HLB小柱(3 cc, 60 mg, 部件号 186008056)安装到真空萃取装置上。设置为最低真空度(约2 in汞柱)。取0.4 mL的QuEChERS上清液, 使其通过小柱丢弃流出液。安装收集容器。取0.6 mL的QuEChERS上清液, 使其通过小柱并收集滤液。在本研究中, 将200 μ L收集到的提取物转移至Qsert样品瓶中, 直接进行APGC-MS分析。或者, 可取一部分收集到的提取物, 挥干并复溶于甲苯中, 用于不分流GC进样。

实验GC条件

GC系统: Agilent 7890
色谱柱: Restek Rxi-5 ms, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m
流速: 1.0 mL/min氦气
进样体积: 1 μ L(分流比例为15:1)
升温程序: 初始为80 $^{\circ}$ C保持0.5 min, 然后以12 $^{\circ}$ C/min的速度升至320 $^{\circ}$ C并保持8 min

MS条件

质谱仪: Xevo TQ-S
离子模式: API+ (电荷转移模式)
电晕电流: 2.8 μ A
离子源温度: 150 $^{\circ}$ C
探头温度: 450 $^{\circ}$ C
锥孔气流速: 170 L/Hr
辅助气体流速: 250 L/Hr
碰撞气体流速: 0.15 mL/min(氦气)
喷雾器: 4.0 bar
数据管理: MassLynx 4.1版
其它仪器参数列于表1中。

化合物	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	RT (min)
噻菌酯	403.0>344.2	20	12	20.9
	403.0>329.1	20	32	
唑酮草酯	410.9>312.2	20	20	16.1
	410.9>340.2	20	10	
百菌清	265.9>170.0	20	27	12.0
	265.9>230.9	20	27	
氯氰菊酯	163.1>127.0	20	10	19.3*
	163.1>127.0	20	10	
高效氯氟 氰菊酯	449.0>181.2	20	20	17.8*
	449.0>197.3	20	14	
噻菌环胺	225.1>210.1	20	20	13.9
	225.1>93.1	20	32	
敌敌畏	184.9>93.0	20	20	6.1
	220.9>109.0	20	15	
甲氰菊酯	349.1>265.2	20	10	17.1
	349.1>210.2	20	20	
咯菌腈	248.0>127.1	20	25	14.9
	248.0>182.1	20	20	
灭菌丹	259.9>130.0	20	13	14.3
	294.9>259.9	20	10	
马拉硫磷	173.1>127.1	20	6	13.2
	173.1>99.0	20	10	
甲霜灵	206.1>132.1	20	20	12.8
	206.1>162.1	20	8	
乙氧氟 草醚	361.0>300.1	20	10	15.1
	361.0>252.2	20	30	
二氯苯 醚酯	183.1>153.0	20	15	18.6*
	183.1>168.0	20	15	
吡丙醚	136.1>78.0	20	20	17.6
	136.1>96.0	20	20	
西玛津	201.1>173.1	20	10	11.2
	201.1>186.1	20	8	

表1. APMC-MS化合物的MRM通道(初级通道列在第一列)、仪器参数和观察到的保留时间(RT)。(*表示有多种异构体的化合物; 采用丰度最高的异构体进行定量。)

结果与讨论

AOAC QUECHERS提取

辨别SPE净化引起的回收率损失与初始QuEChERS提取引起的回收率损失是十分重要的。因此,在进行任何SPE回收实验之前,我们评估了改良型QuEChERS方案对目标化合物的回收率。除灭菌丹(70%)、甲氧菊酯(65%)和吡丙醚(75%)之外,其它所有化合物(加标浓度为40 ng/g)的回收率均大于80%。

OASIS PRiME HLB净化

使用经改良型QuEChERS方案处理得到的鳄梨空白样品确定SPE净化的回收率(见图1)。如图1所示,空白提取物中分别加标9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)的目标化合物,然后采用通过式SPE净化方案处理。将每种化合物的响应与SPE净化之后加标的相同空白样品的响应进行比较。结果表明,经通过式净化方案处理的样品中,只有灭菌丹(一种热不稳定且pH不稳定的物质)的回收率损失大于20%。如图2所示, Oasis PRiME HLB/小柱净化方案有效去除了鳄梨QuEChERS提取物中95%以上的磷脂。此外,该净化方案还去除了90%以上的叶绿素和大约80%的脂肪。采用此方案只需很短的时间即可完成净化,且净化效果与通常需要多个繁琐的离心步骤的传统分散SPE (dSPE)净化相当。

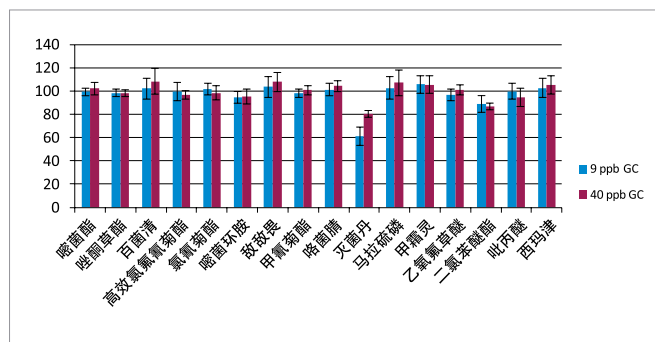


图1. SPE净化的回收率结果。

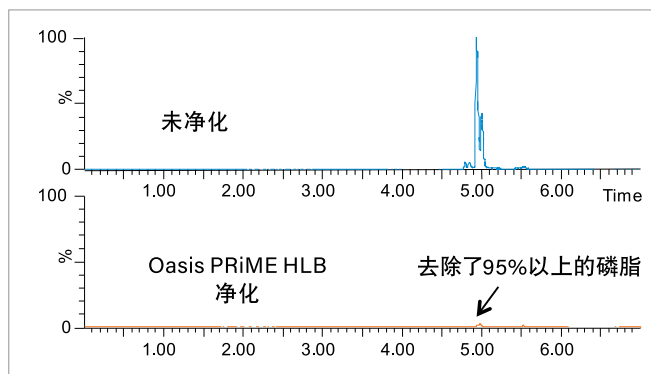


图2. 采用Oasis PRiME HLB净化方案可有效去除鳄梨QuEChERS提取物中的磷脂。

APGC-MS/MS

与传统的电子碰撞质谱(EI-MS)相比, APGC使用的API电离是一种“软”电离技术,通常极适用于串联MS。这种“软”电离技术可减少源内碎裂,更有可能获得分子离子用于随后碰撞池内的碎裂。图3展示了一个例子,比较了高效氯氟菊酯的API+和EI+质谱图。可以看到,与EI谱图相比, API谱图中分子离子的丰度较高(m/z 449)。在本研究中,我们通过监测两个MRM通道来测定高效氯氟菊酯(见表1)。这两个通道都是 m/z 449的分子离子碎裂产生的;如果使用EI-MS,将无法获得这些通道。图4所示为添加9 ng/g高效氯氟菊酯的鳄梨样品经QuEChERS提取和Oasis PRiMEHLB净化之后,采用APGC-MS/MS测定其中的高效氯氟菊酯的异构体的色谱图。在本研究中,所有目标化合物都得到了相似的低ng/g (ppb)水平的检测限。

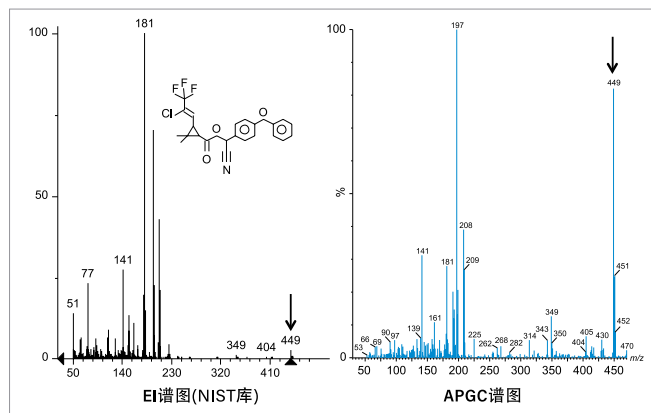


图3. 高效氯氟菊酯的质谱图比较; EI+谱图(左)中几乎没有任何分子离子,而API+谱图(右)中 m/z 449处分子离子的丰度极高。

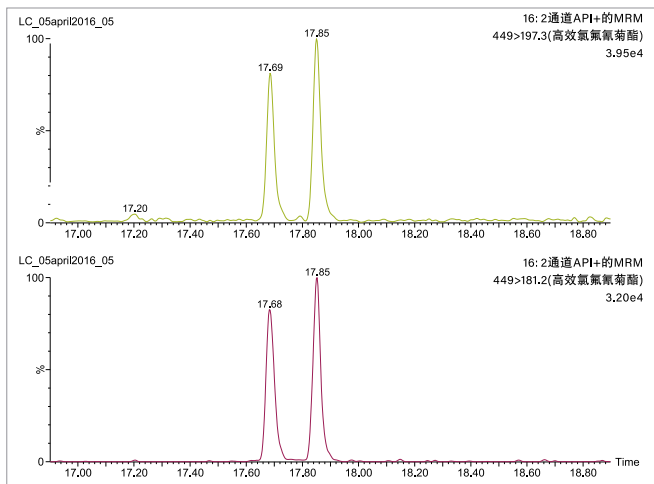


图4. APGC-MS/MS色谱图，显示了加标浓度为9 ng/g (ppb)的鳄梨样品中的高效氯氟菊酯异构体；MRM通道通过m/z 449处的分子离子碎裂获得。

结论

在进行APGC-MS/MS分析之前，采用改良型QuEChERS方案可有效提取鳄梨样品中的农药。Oasis PRiME HLB通过式净化可有效去除QuEChERS提取物中的脂肪和磷脂。Oasis PRiME HLB小柱的净化效果和回收率与繁琐费时的多步分散SPE相当。在APGC-MS/MS模式下运行的Xevo TQ-S质谱仪可有效测定鳄梨中低ppb水平的农药。

订购信息

描述	部件号
DisQuE提取盐包 (AOAC)	186006812
Oasis PRiME HLB 3CC/60mg	186008056

样品前处理

使用Waters® DisQuE Kit多农残分析前处理方案对蔬菜样品进行净化，快速高效。

样品提取

样品匀浆后，转移15 g匀浆后样品至50 mL离心管中，在离心管中加入15 mL1%乙酸乙腈，加入内标，震荡离心管1 min，在大于1500 rcf 转速下离心1 min。

净化

转移2 mL上清液至离心管2，震荡30 s，在大于1500 rcf 转速下离心1 min，LC / MC / MS 分析用流动相，稀释提取液进样分析。

ACQUITY UPLC I-Class 超高效液相色谱分离条件

- 色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm
- 流动相 A: 甲醇
- 流动相 B: 5 mM乙酸铵水溶液
- 柱温: 40°C
- 进样量: 3 μL
- 运行时间: 12 min

质谱条件

- 系统: Xevo TQ-S
- 电离模式: ESI±
- 电喷雾电压: 3.0 kV
- 脱溶剂气温度: 500 °C
- 离子源温度: 150 °C
- 脱溶剂气流速: 1000 L/hr
- 采集方法: MRM农残筛查库

结果

本实验使用DisQuE Kit 前处理方法，并用Xevo TQ-S的多农残筛查方法库，结合ACQUITY UPLC I-CLASS超高效液相色谱分离系统对不同蔬菜中49种农药残留进行了快速筛查分析。其中Xevo TQ-S的PICs(离子确认扫描)数据采集功能，在得到每种农残MRM定量色谱峰的同时得到其子离子扫描质谱图，将样品的PICs质谱图与TargetLynx™库中标准PICs参比质谱图进行匹配，对阳性样品进行定性确认。

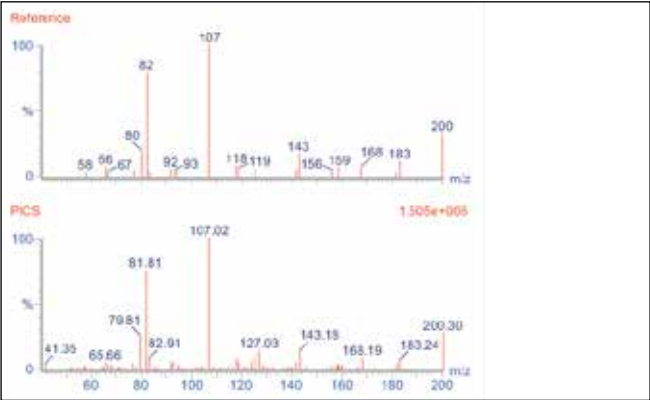


图1. 黄瓜样品中嘧霉胺的PICs图与库中标准图的匹配结果。

名称	电离模式	名称	电离模式
乙酰甲胺磷	+	氰戊菊脂	+
啉虫脒	+	氟虫腈	-
涕灭威	+	氟氰菊脂	+
涕灭威砒	+	氟胺氰菊脂	+
涕灭威	+	吡虫啉	+
阿维菌素	+	异菌脲	+
联苯菊脂	+	水胺硫磷	+
甲奈威	+	甲基异硫磷	+
多菌灵	+	马拉硫磷	+
克百威	+	甲胺磷	+
3-羟基克百威	+	灭多威	+
灭幼脲	-	氧化乐果	+
百菌灵	+	对硫磷	+
毒死蜱	+	甲基对硫磷	+
氟氯氰菊脂	+	甲拌磷	+
氯氟氰菊脂	+	伏杀硫磷	+
氟氰菊脂	+	亚胺硫磷	+
溴氰菊脂	+	辛硫磷	+
二嗪磷	+	腐霉利	+
敌敌畏	+	丙溴磷	+
苯醚甲环唑	+	哒螨灵	+
除虫脲	-	啉霉胺	+
乐果	+	三唑酮	+
杀螟硫磷	+	三唑磷	+
甲氰菊脂	+		

表1. 49种农药残留列表。

订购信息

描述	部件号
DisQuE 分散固相萃取试剂盒 (50 mL离心管: 1.5 g乙酸钠、6 g硫酸镁 2 mL离心管: 150 mg硫酸镁、50 mgPSA)	176001676
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7 μm, 2.1 x100 mm	186002352
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.7 μm, 3 pcs/pack	186003975
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

1. 将20 g蔬菜或水果样品绞碎，加入50 mL乙腈提取。
2. 过滤提取物，收集滤液并用乙腈定容至100 mL。
3. 取20 mL稀释后的提取液，加入10 g氯化钠和20 mL 0.5 M的磷酸盐缓冲液(pH 7)。
4. 振荡，然后静置使液体分层，收集乙腈层，加入无水硫酸钠进行干燥。
5. 在低于40 °C条件下旋转蒸发浓缩提取液，然后用2 mL 3:1(v/v)的乙腈/甲苯混合溶剂溶解。

固相萃取过程

Sep-Pak® Vac 石墨化炭黑/氨基小柱
6 cc/500 mg/500 mg

活化

10 mL 3:1(v/v)的乙腈/甲苯，注意小柱不得干涸

上样

将2 mL提取后的样品全部上样，然后用少量3:1(v/v)的乙腈/甲苯混合溶剂冲洗盛提取液的容器，再将冲洗液上样

洗脱

20 mL 3:1(v/v)的乙腈/甲苯混合溶剂，控制流速为2 mL/min

收集上样步骤和洗脱步骤的流出液并混合，在40 °C条件下旋转蒸发，浓缩至1 mL；加入10 mL丙酮，再浓缩至1 mL；加入5 mL丙酮，再浓缩至干；用4 mL甲醇溶解残渣，用于LC/MS/MS分析

色谱条件

仪器：沃特世Alliance 2695系统
 色谱柱：XBridge® C₁₈, 2.1 x 150 mm, 3.5 μm
 流速：0.2 mL/min
 流动相A：水
 流动相B：甲醇
 流动相C：100 mM 乙酸水溶液
 梯度：

时间(min)	A%	B%	C%
0.00	80	15	5
1.00	55	40	5
3.50	55	40	5
6.00	45	50	5
8.00	40	55	5
17.50	0	95	5
30.00	80	15	5
47.00	80	15	5

进样量：5 μL
 温度：40 °C

质谱条件

仪器：沃特世Quattro Premier™ XE
 电离模式：电喷雾正离子(ESI⁺)多反应监测(MRM)

结果

化合物名称*	添加浓度水平μg/g	回收率水平%
阿维菌素	0.1	102.0
莎稗磷	0.1	111.7
保棉磷	0.1	107.6
吡草酮	0.1	139.5
氟丙嘧草酯	0.1	104.5
氯草敏	0.1	106.0
环虫酰胺	0.1	108.2
氯甲酰胺	0.1	104.4
解草酯	0.1	108.7
噻虫胺	0.1	101.5
氟霜唑	0.1	108.3
环氟菌胺	0.1	110.1
二甲噻酚	0.1	101.0
苯氧威	0.1	108.7
啉菌胺	0.1	112.6
盐酸杀螨脒	0.1	86.7
吡啶啉	0.1	100.5
吡虫啉	0.1	111.8
茚虫威	0.1	121.2
丙森锌	0.1	106.2
异恶唑草酮	0.1	99.5
乳氟禾草灵	0.1	106.8
甲氧虫酰胺	0.1	103.3
密灭汀A3	0.1	114.5
密灭汀A4	0.1	101.2
萘丙胺	0.1	115.9
安磺灵	0.1	103.8
氧化萎锈灵	0.1	85.1
砒吸磷	0.1	108.0
甜菜宁	0.1	102.2
苄草唑	0.1	72.7
糖草酯	0.1	145.3
硅氟唑	0.1	106.0
噻虫啉	0.1	109.2
噻虫嗪	0.1	108.3
十三吗啉	0.1	94.6
灭菌唑	0.1	113.3

*每一浓度水平平行分析5个样品

订购信息

描述	部件号
Sep-Pak Vac 石墨化炭黑/氨基小柱, 6 cc, 500 mg/500 mg	186003369
XBridge C ₁₈ , 2.1 x 150 mm, 3.5 μm	186003023
XBridge C ₁₈ 保护柱, 2.1 x 10 mm, 3.5 μm, 2支/包装	186003059
Sentry Guard Holder	WAT097958
LC/GC 认证样品瓶	186000307C

简介

应用QuEChERS这种简便的萃取技术加上UPLC/MS/MS分析以水果和肉制品为基质的婴幼儿食品中的农残。这种方法超越了欧洲以致全世界法规的需求。

萃取步骤

1. 把15 g经过离心的样品加入到50 mL DisQuE™萃取管中，管中包括1.5 g 醋酸钠和6 g硫酸镁。
2. 加入15 mL1%的醋酸乙腈
3. 加入样品处理前的内标物
4. 振摇1分钟然后离心(>1500 rcf) 1分钟
5. 将250 µL的萃取液转移到2 mL DisQuE萃取管中，管中包含50 mg PSA和15 mg硫酸镁
6. 振摇30秒然后离心(>1500 rcf)1分钟
7. 将250 µL的萃取液转移到自动进样的样品瓶中
8. 加入萃取后的内标物
9. 加入适当的缓冲溶液和溶剂稀释

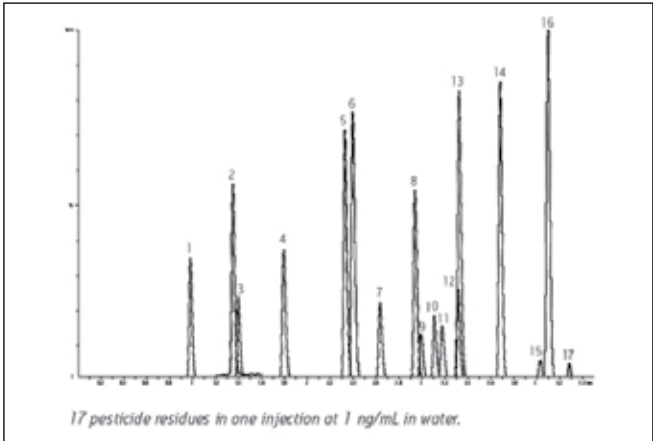
LC 条件

LC系统:	Waters® ACQUITY UPLC® System		
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 1.7 µm		
柱温:	40 °C		
样品温度:	4 °C		
流速:	0.7 mL/min		
流动相A:	水+0.1%甲酸		
流动相B:	甲醇+0.1%甲酸		
梯度:	时间(min)	A%	B%
	0.00	99	1
	5.00	1	99
	6.00	1	99
	6.10	99	1
	8.00	99	1
总运行时间:	8分钟		
进样体积:	50 µL, 满环进样		

MS条件

MS系统:	Waters Xevo® TQ MS
离子化模式:	正离子 (ESI+)
	多反应监测

结果



色谱峰序号	农药名称	RT	MRM通道	驻留时间(s)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
1	Omethoate 氧乐果	0.97	214 → 183	0.08	16	12
			214 → 155			15
2	oxydemeton-S-methyl 亚砷磷	1.35	247 → 169	0.04	18	14
			247 → 109			18
3	Demeton-S-methyl sulfone 磺吸磷	1.39	263 → 169	0.04	20	16
			263 → 121			16
4	Dimethoate 乐果	1.79	230 → 125	0.1	12	20
			230 → 171			14
5	Fensulfothion-oxon 丰索磷氧	2.32	293 → 237	0.04	22	18
			293 → 265			13
6	Fensulfothion-oxon-sulfone 丰索磷氧化砷	2.39	309 → 253	0.04	19	15
			309 → 175			25
7	Demeton-S-methyl 甲基内吸磷	2.63	231 → 89	0.1	12	12
			231 → 61			22
8	Disulfoton sulfoxide 乙拌磷亚砷	2.93	291 → 185	0.04	15	13
			291 → 97			32
9	Disulfoton sulfone 乙拌磷砷	2.98	307 → 97	0.02	16	28
			307 → 115			23
10	Fensulfothion 丰索磷	3.1	309 → 281	0.02	25	14
			309 → 157			24

Xevo TQ MS MRM方法参数。

接上表

11	Fensulfothion sulfone 丰索磷砒	3.17	325 → 269	0.02	19	15
			325 → 297			11
12	terbufos sulfone 特丁磷砒	3.3	321 → 171	0.03	19	11
			321 → 115			28
13	terbufos sulfoxide 特丁磷亚砒	3.32	305 → 187	0.03	10	11
			305 → 131			27
14	Ethoprophos 灭线磷	3.68	243 → 131	0.1	18	19
			243 → 173			14
15	Disulfoton 乙拌磷	4.03	275 → 89	0.08	14	10
			275 → 61			32
16	Cadusafos 硫线磷 (杀线磷、克线丹)	4.09	271 → 159	0.02	16	14
			271 → 131			22
17	Terbufos 特丁硫磷	4.28	289 → 103	0.06	12	9
			289 → 233			5

Xevo TQ MS MRM方法参数。

订购信息

描述	部件号
DisQuE基质分散样品制备产品 (100 pcs/pack)	176001676
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7 μm, 2.1x50 mm	186002350
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

■ QuEChERS萃取

将2 g干茶叶和10 mL水加入50 mL离心管中，浸泡、溶胀30分钟。然后加入10 mL乙腈，封盖，涡旋10秒，再充分振荡1分钟。然后加入DisQuE试剂，按照CEN QuEChERS方法萃取，充分振荡1分钟。以4000 RPM(相对离心力3250 g)离心样品5分钟，然后收集上清。取上清液进行SPE净化。

■ dSPE净化和LC-MS分析 碱性/中性农药

将1 mL QuEChERS萃取液置于2 mL DisQuE dSPE净化管(150 mg MgSO₄/25 mg PSA/25 mg C18, 部件号186004832)中，加入7 mg石墨化碳黑 (GCB)，涡旋10秒，然后振荡1分钟。以12000 RPM (相对离心力13400 g)离心样品4分钟，收集上清液。取200 µL上清液加入LC-MS认证的样品瓶中，然后使用LC-MS的流动相A稀释至1 mL。

■ Carbon/PSA和GC-MS分析碱性/中性农药

使用10 mL丙酮/甲苯(3:1)稀释1 mL QuEChERS萃取液。然后将Sep-Pak PSA/carbon萃取柱安装到真空萃取装置上，并装好收集管。将200 mg无水MgSO₄加到萃取柱筛板的上部。让全部稀释萃取液通过萃取柱并收集萃取液，然后使用2 mL丙酮/甲苯(3:1)对萃取柱进行洗脱，并收集洗脱液，与前面得到的萃取液合并。挥干至0.5 mL以下，然后加入2 mL甲苯再挥干至0.5 mL。

■ Oasis MAX和LC-MS分析酸性农药

用2 mL水稀释1 mL QuEChERS萃取液，然后使用2%氨水溶液(数滴)调pH值7.5-8.5。向Oasis MAX萃取柱(3cc, 60 mg)加入1 mL甲醇和1 mL水，使其流过萃取柱。将稀释后的QuEChERS萃取液以3 mL/分钟的流速通过萃取柱。用1 mL 1%氨水溶液和2 mL甲醇对萃取柱进行淋洗。放置收集管，使用3 mL 93:5:2的甲基叔丁基醚/甲醇/甲酸洗脱萃取柱。将洗脱液挥干后使用流动相(80:20 A/B)复溶。

实验

UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 µm, 2.1 100 mm
进样体积:	5 µL
温度:	45 °C
流动相A:	10 mM醋酸铵水溶液 (pH值为5.0)
流动相B:	10 mM醋酸铵甲醇溶液
流速:	0.45 mL/min
梯度:	初始条件为10%的流动相B保持0.25 min, 到12.25 min时以线性梯度增加至99%, 保持至13.0 min, 到13.1 min时降回10%, 保持并重新平衡系统直至17 min

UPLC的MS条件

仪器:	Waters® Xevo TQ-S
离子模式:	ESI+, ESI-
毛细管电压:	3.0 kV
提取电压:	3.0 V
源温度:	150 °C
锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气温度:	500 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
碰撞气流速(氦气):	0.18 mL/min

表1列出了本研究中所用的LC-MS/MS锥孔和碰撞参数以及MRM通道。

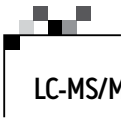
GC条件

仪器:	Agilent 7890
色谱柱:	J&W DB% MS 30 m 0.25 mm 0.25 µm
进样体积:	2 µL, 不分流
流速:	2.0 mL/min氦气(恒定气流)
程序升温:	80 °C的初始温度保持0.5 min, 然后以12 °C/min的速度升至300 °C, 并保持10 min

APGC的MS条件

仪器:	Waters Xevo TQ-S
模式:	API正离子
电晕电流:	2.2 µA
源温度:	150 °C
探头温度:	450 °C
锥孔气流速:	170 L/h
辅助气流速:	250 L/h
喷雾器气体:	4.0 Bar
碰撞气流速(氦气):	0.18 mL/min

表2列出了用于此研究的GC-MS/MS锥孔和碰撞参数，以及MRM通道。



LC-MS/MS(dSPE净化)

农药	MRL ppb (EU)	RT min	MRM m/z	(锥孔电压 V, 碰撞能量 eV)	回收率 % (n=6)@ 10, 100 ppb (% RSD)	
高灭磷	50	1.35	184.1 > 125.1 (8,18)	184.1 > 143.0 (8,8)	LOQ	101 (11)
啉虫脒	100	4.03	223.0 > 126.0 (30,20)	223.0 > 56.1 (30,15)	96 (7)	101 (2)
联苯三唑醇	100	9.81	338.1 > 70.1 (30,8)	338.1 > 99.1 (30,16)	107 (47)	87 (16)
胺甲萆	50	6.40	202.0 > 145.0 (30,10)	202.0 > 127.0 (30,26)	84 (23)	112 (11)
唑酮草酯	20	9.27	412.0 > 346.0 (30,24)	412.0 > 266.0 (30,18)	108 (11)	114 (3)
四螨嗪	50	9.72	303.0 > 138.0 (30,18)	303.0 > 102.0 (30,33)	94 (10)	97 (6)
噻虫胺	70	10.97	250.0 > 169.0 (30,12)	250.0 > 132.0 (30,17)	89 (40)	111 (9)
二嗪磷	50	9.50	305.1 > 169.0 (30,22)	305.1 > 96.9 (30,35)	108 (6)	103 (2)
敌敌畏	20	5.82	221.0 > 109.0 (30,22)	221.0 > 79.0 (30,34)	101 (8)	107 (5)
伏虫脒	100	9.10	311.1 > 158.1 (30,18)	311.1 > 141.0 (30,35)	115 (20)	107 (3)
乐果	50	3.82	230.1 > 125.0 (30,20)	230.1 > 199.0 (30,10)	105 (18)	109 (3)
敌草隆	100	9.82	233.0 > 72.1 (30,30)	233.0 > 46.3 (30,14)	83 (15)	110 (6)
甲氧菊酯	2000	11.14	350.1 > 125.0 (30,14)	350.1 > 97.0 (30,34)	74 (6)	80 (5)
唑螨酯	100	11.18	422.2 > 138.1 (30,32)	422.2 > 366.1 (30,18)	90 (10)	92 (5)
吡虫啉	50	3.50	256.1 > 209.1 (30,16)	256.1 > 175.1 (30,19)	97 (10)	105 (11)
马拉硫磷	500	8.34	331.0 > 127.0 (30,12)	331.0 > 99.0 (30,24)	98 (10)	107 (5)
久效磷	50	2.95	224.1 > 127.1 (30,16)	224.1 > 98.0 (30,12)	98 (7)	105 (5)
双苯氟脒	10	10.31	493.0 > 158.0 (30,19)	493.0 > 141.0 (30,40)	100 (21)	92 (6)
伏杀硫磷	50	9.74	367.9 > 181.9 (30,14)	367.9 > 110.9 (30,42)	90 (9)	95 (12)
吡菌胺酯	50	9.68	388.1 > 163.0 (30,25)	388.1 > 193.9 (30,12)	91 (11)	105 (2)
吡丙醚	50	10.67	322.1 > 227.1 (30,14)	322.1 > 96.0 (30,14)	95 (8)	90 (3)
西玛津	50	5.84	202.0 > 96.0 (30,26)	202.0 > 124.0 (32,22)	92 (30)	107 (4)
多杀菌素A	50	10.97	732.6 > 142.0 (40,35)	732.6 > 98.1 (40,50)	102 (7)	92 (3)
多杀菌素D	50	1.36	746.5 > 142.0 (40,38)	746.5 > 98.1 (40,48)	101 (13)	85 (5)
螺甲螨酯	50000	10.97	371.1 > 273.1 (30,10)	371.1 > 255.1 (30,24)	111 (19)	70 (8)
噻虫啉	10000	4.60	253.0 > 126.0 (30,20)	253.0 > 90.1 (30,27)	99 (14)	101 (5)
噻虫嗪	20000 (20 US)	2.71	292.0 > 211.0 (30,13)	292.0 > 181.0 (30,22)	110 (23)	108 (4)
三唑磷	20	8.62	314.1 > 161.9 (30,18)	314.1 > 118.9 (30,35)	101 (5)	112 (3)
(Oasis MAX小柱SPE净化)						
2,4-D	100	2.09	219.0 > 124.8 (15,25)	219.0 > 160.8 (15,20)	73 (5)	73 (4)

表1. LC-MS/MS回收率数据。

GC-MS/MS(PSA/carbon小柱净化)

农药	MRL ppb (EU)	RT min	MRM m/z	(锥孔电压 V, 碰撞能量 eV)	回收率% (n=6)@ 10, 100 ppb(% RSD)	
高灭磷	50	5.18	183.8 > 94.8 (10,20)	183.8 > 142.8 (10,10)	66 (9)	59 (9)
联苯菊酯	100	15.97	242.8 > 122.9 (20,10)	242.8 > 154.9 (20,10)	91 (8)	71 (10)
联苯三唑醇	100	17.63	337.9 > 98.8 (20,10)	337.9 > 268.9 (20,10)	86 (9)	78 (13)
唑草酮	20	14.86	411.7 > 276 (20,30)	411.7 > 301.8 (20,30)	101 (17)	93 (11)
甲基毒死蜱	100	10.96	321.6 > 124.7 (35, 20)	321.6 > 289.6 (35,10)	63 (14)	76 (11)
溴虫腈	50000	14.05	408.7 > 270.8 (20,20)	408.7 > 378.7 (20,10)	98 (10)	93 (12)
氟氯氰菊酯	100	18.81	433.7 > 126.8 (15,30)	433.7 > 190.8 (15,10)	101 (6)	91 (20)
氯氰菊酯	500	18.67	415.8 > 126.8 (25,25)	415.8 > 190.8 (25,10)	78 (16)	89 (18)
三氯杀螨醇	20000	16.06	352.6 > 281.7 (20,20)	352.6 > 316.6 (20,10)	65 (67)	88 (2)
二嗪磷	50	9.99	304.9 > 168.9 (20,20)	304.9 > 276.9 (20,10)	98 (16)	79 (9)
敌敌畏	20	5.17	220.8 > 108.9 (20, 10)	220.8 > 144.8 (20, 10)	87 (9)	77 (17)
溴氰菊酯	5000	20.42	505.6 > 252.7 (20,20)	505.6 > 280.7 (20,10)	63 (47)	88 (23)
乙硫磷	3000	14.44	384.6 > 142.7 (10,20)	384.6 > 170.8 (10,10)	90 (10)	90 (13)
乙螨唑	15000	16.13	359.9 > 140.8 (35,30)	359.9 > 303.8 (35,20)	77 (14)	71 (11)
硫丹	30000	13.17	406.5 > 252.6 (10,20)	406.5 > 288.6 (10,10)	145 (7)	101 (18)
甲氧菊酯	2000	16.11	349.9 > 96.8 (25,30)	349.9 > 124.8 (25, 10)	94 (7)	81 (10)
氰戊菊酯	50	19.54	419.8 > 124.8 (10,40)	419.8 > 166.8 (10,10)	72 (14)	86 (16)
高效氯氟氰菊酯	1000	16.76	449.8 > 196.8 (15,20)	449.8 > 224.8 (15,10)	61 (20)	40 (11)
马拉硫磷	500	11.67	330.8 > 126.8 (15, 10)	330.8 > 210.8 (15,20)	57 (33)	97 (30)
久效磷	5	8.88	223.8 > 97.8 (25, 10)	223.8 > 126.8 (25, 10)	85 (6)	74 (17)
克螨特	5000	15.17	230.8 > 80.8 (20, 20)	230.8 > 162.8 (20,10)	94 (21)	107 (28)
胺丙畏	100 (US)	9.78	281.9 > 137.8 (10,20)	281.9 > 194.8 (10,10)	101 (16)	88 (5)
吡丙醚	50	16.67	321.9 > 95.8 (10,20)	321.9 > 184.8 (10,20)	89 (10)	80 (10)
苯醚菊酯	50	16.45	350.9 > 182.8 (20,40)	350.9 > 248.8 (20,20)	69 (22)	72 (7)
伏杀硫磷	50	16.62	367.7 > 124.8 (15,20)	367.7 > 181.8 (15,20)	80 (8)	71 (11)
苜蓿菊酯	200	15.46	338.9 > 170.9 (25,10)	338.9 > 292.9 (25,10)	36 (22)	53 (16)
氟乐灵	50	8.76	335.9 > 235.8 (30,10)	335.9 > 251.8 (30, 20)	96 (14)	124 (24)

表2. GC-MS回收率数据。

结果与讨论

本项研究的回收率数据是通过比较样品制备前后基质中样品的峰值得到，并已列在表1和表2。

图1所示为红茶QuEChERS萃取的典型示例。图2所示为使用Oasis MAX小柱的典型QuEChERS茶叶样品萃取液净化图，图中与未进行净化处理的样品进行了对比。



图1. 离心后利用DisQuE产品进行CEN QuEChERS萃取的茶叶样品。

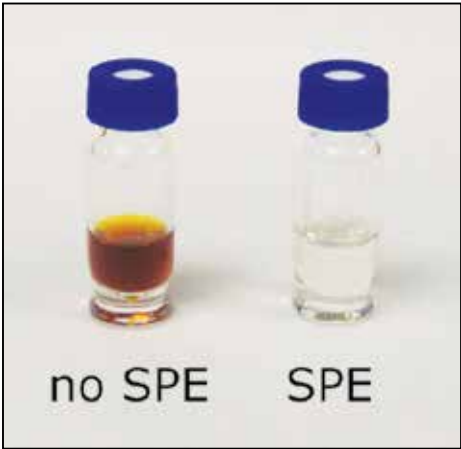


图2. QuEChERS茶叶萃取物经Oasis MAX小柱净化酸性分析物后用LC-MS分析(右图)，与未经净化处理(左图)的样品对比图。

GC-MS的SPE净化 (Sep-Pak PSA/carbon)

GC-MS的SPE净化方法十分高效，可在GC-MS分析之前去除QuEChERS萃取液中的全部有色成分。实验中，首先在SPE小柱上加载1 mL QuEChERS萃取液，然后用10 mL 丙酮/甲苯进行洗脱。但是，如果在上样之前以10 mL 丙酮/甲苯溶液对1 mL QuEChERS萃取液进行稀释，可获得更好的净化效果。对于未使用SPE净化的GC-MS分析而言，在分析较少的样品后就需要对进样口和色谱柱进行维护。使用dSPE净化后，可分析上百个样品后再进行维护。图3所示为QuEChERS萃取液的Sep-Pak PSA/carbon净化图。



图3. GC-MS分析中利用Sep-Pak PSA/carbon小柱对QuEChERS茶叶萃取液进行净化。左图所示为样品流经小柱的净化过程，右图样品瓶为两种净化结果。

结论

改良的QuEChERS方法可有效回收干燥茶叶中的多种农药；dSPE为LC-MS/MS分析提供了适用的净化操作方法；基于PSA/carbon小柱的SPE净化方法对使用APGC的GC-MS/MS分析极为有效；使用Oasis MAX小柱的净化方法对于2, 4-D的LC-MS鉴定极为有效。

订购信息

描述	部件号
DisQuE提取盐包 (CEN)	186006813
150 mg MgSO ₄ , 25 mg PSA, 25 mg C ₁₈ , 7 mg GCB	186008071
Sep-Pak PSA/Carbon 500mg/500mg/6CC	186004590
Oasis MAX 3CC/60mg	186000367
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100, 1.7 μm	186002352
DisQuE 50 mL离心管	186006814
LCMS认证样品瓶	600000751CV

使用QuEChERS检测牛肉中的有机磷农药

样品初步提取(QuEChERS):

将10 g碎牛肉匀浆加入50 mL离心管中。加入2 mL水和10 mL乙腈(ACN), 然后用力振荡试管1分钟。加入专用于CEN QuEChERS的DisQuE™试剂袋盐内容物, 再用力振荡1分钟。在4000 rpm下离心3分钟, 取1 mL上清液(最上层)用于d-SPE净化。

dSPE净化:

将1 mL上清液转移至2 mL的d-SPE净化离心管中, 管内含有150 mg硫酸镁、50 mg PSA吸附剂和50 mg C₁₈吸附剂。用力振荡1分钟。将部分上清液转移至LCMS认证样品瓶中, 用于GC/MS分析。

GC条件

GC系统: Agilent 6890
色谱柱: Rxi®-5Sil MS, 30 x 0.25 mm (内径), 0.25 µm
进样体积: 1 µL
载气: 氦气
流速: 1.0 mL/min (恒定气流)
温度程序: 初始为80 °C (持续1分钟), 然后以10 °C/min上升至280 °C, 并保持10分钟
样品瓶: LC/MS认证样品瓶 (部件号600000751CV)

MS条件

MS系统: Quattro micro™ GC
质谱仪在正电子碰撞模式(EI+)下运行。使用选择离子监测(SIR), 在70 eV电子能量下采集数据。所监测离子由以下构成, 首先列出的是主要定量离子。

化合物	SIR (m/z)	保留时间 (min)
乐果	87.0, 93.0, 125.0	11.8
甲基毒死蜱	286.1, 288.1, 125.0	13.1
马拉硫磷	173.2, 127.1, 125.0	13.7
脱叶磷	169.1, 202.2, 113.0	15.6
蝇毒磷	362.3, 226.2, 210.1	19.6

化合物	加标浓度(ppb)	回收率%	RSD%
有机磷农药			
乐果	20	89.4	7.2
甲基毒死蜱	20	74.6	6.8
马拉硫磷	20	93.9	13.8
脱叶磷	20	71.8	3.7
蝇毒磷	20	88.0	6.5
乐果	200	98.9	6.1
甲基毒死蜱	200	88.0	7.5
马拉硫磷	200	107.0	9.6
脱叶磷	200	74.8	6.9
蝇毒磷	200	95.1	7.3

表1. 使用QuEChERS DisQuE试剂袋得到的碎牛肉中有机磷农药的回收率(n=5)。

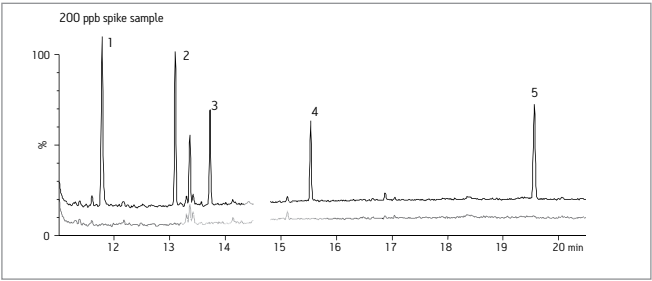


图1. 未加标碎牛肉样品(蓝色迹线)和加标200 ppb有机磷农药的碎牛肉样品(黑色迹线)的GC/MS色谱图。

订购信息

描述	部件号
CEN QuEChERS DisQuE试剂袋	186006813
DisQuE 2 mL d-SPE净化离心管 (150 mg MgSO ₄ , 50 mg PSA, 50 mg C ₁₈)	186002352
DisQuE 50 mL离心管	186006814
LCMS认证样品瓶	600000751CV

参考资料: 沃特世应用资料720004456EN
©2013年 沃特世公司。Waters是沃特世公司的注册商标。DisQuE和Quattro micro GC是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

简介

敌草快和百草枯是带双电荷的季胺盐类除草剂(图1)。它们在世界各地仍被广泛用于控制农作物和水生杂草。美国环境保护署(US EPA)规定敌草快在土豆和小麦中的含量上限分别为100 ppb($\mu\text{g}/\text{kg}$)和20 ppb。US EPA规定百草枯在土豆和小麦中的含量上限分别为500 ppb和1100 ppb。敌草快和百草枯是很难保留在 C_{18} 或其它反相LC色谱柱上的离子物质。离子对试剂可用于提高反相保留时间,但如果使用质谱仪进行检测与定量(LC-MS),此方法通常会产生显著的离子抑制作用。一种可替代的方法,即亲水作用液相色谱(HILIC)对于敌草快和百草枯的LC-MS的测定则具有明显的优势:由于无需离子对试剂,显著提高了离子化效率。本应用纪要中,我们证实了与其它现有HILIC法相比,采用了CORTECS® HILIC色谱柱的UPLC-MS/MS方法能够显著改善两种分析物的保留时间和分离度。

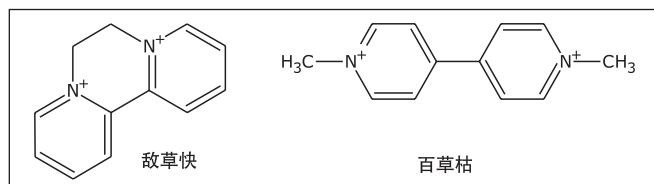


图1. 敌草快和百草枯的结构式。

应用优势

与其它现有的HILIC方法相比, CORTECS UPLC® HILIC色谱柱能针对 百草枯和敌草 提供更好的保留时间与分离度

CORTECS UPLC HILIC方法与欧盟中采用的快速筛选法兼容

CORTECS UPLC HILIC分离无需离子对试剂, 并为LC-MS分析提供了优异的灵敏度。

样品制备

注: 样品收集和所有样品制备步骤均应使用聚丙烯容器。对于UPLC分析, 建议使用聚丙烯自动进样器样品瓶(部件号186002642)。

使用最近发表的方法中描述的制备流程来处理新鲜土豆和加工全麦面粉样品1。欧盟推荐使用这种方法(可在互联网上查阅到2)进行敌草快和百草枯残留品的筛选。

土豆的分析: 称取10 g样品, 装入50 mL离心管中。向预先称量好的样品中加标水性标准品, 并平衡30 min, 制得加标样品。接下来加入10 mL的萃取液(50:50甲醇/0.1M盐酸水溶液), 然后用手震摇2 min。随后将样品在80 °C下加热15 min, 冷却后以4000 rpm(rcf 3250 g)的转速离心4 min。利用45微米PTFE注射式过滤器对上清液进行过滤。将400 μL 的过滤样品用乙腈稀释至1.0 mL, 然后进行UPLC-MS分析。

面粉的分析: 称取4 g样品, 装入50 mL离心管中。向预先称量好的样品中加标水性标准品, 并平衡30 min, 制得加标样品。然后向样品中加入10 mL的试剂水, 涡旋混合后平衡15 min。随后对样品进行与上述土豆样品相同的萃取与处理。

表1总结了本次研究中使用的MRM通道和LC-MS参数。

化合物	MRM	锥孔电压 (V)	CID (eV)
敌草快	183.1 > 157.1	50	25
	183.1 > 157.1	50	30
百草枯	185.1 > 170.1	38	22
	171.1 > 77.0	45	40

表1. UPLC-MS/MS分析中敌草快和百草枯所用的MRM通道。

实验

液相色谱条件

LC系统: ACQUITY UPLC H-Class

色谱柱: CORTECS HILIC色谱柱

1.6 μm , 2.1 x 100 mm

(部件号186007106)

流动相 B: 5 mM乙酸铵水溶液

流动相

(等度): 50:50 A/B

流动相A: 200 mM甲酸铵缓冲液, pH 3.7

流动相B: 乙腈

进样体积: 20 μL

柱温: 30 °C

清洗溶剂: 50:50乙腈/水

流速: 0.5 mL/min

流动相

MS系统: ACQUITY TQD质谱仪

电离模式: 电喷雾正离子

源温度: 150 °C

脱溶剂气温度: 350 °C

脱溶剂气流速: 800 L/h

锥孔气流速: 30 L/h

碰撞气流速: 0.20 mL/min

数据管理: Masslynx® 4.1版

结果

图2显示了全麦面粉样品(在全部样品制备步骤前将每种分析物都加标至10 ppb)的分析中获得的典型UPLC-MS/MS提取离子色谱图。土豆的离子色谱图与之类似。

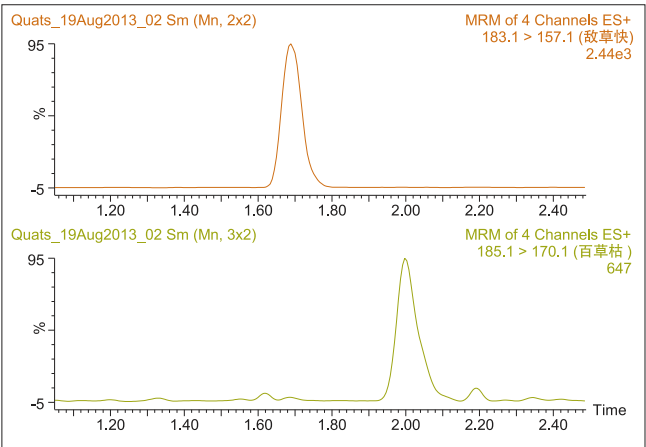


图2. 10 ppb加标小麦面粉样品的UPLC-MS/MS提取离子色谱图。

经证实，CORTECS UPLC HILIC分离适合与EU所采用的快速筛选法配合使用。在UPLC-MS/MS分析前，提取样品仅经过了过滤与稀释。CORTECS UPLC HILIC法采用了等度方法(50:50乙腈/缓冲液)。因此，萃取样品仅需使用乙腈进行1:1的稀释即可实现优异的色谱性能。土豆与小麦面粉中敌草快的定量限(LOQ)低于10 ng/g。土豆中百草枯的LOQ低于10 ppb，而小麦面粉中百草枯的LOQ约为10 ppb。

结论

使用CORTECS HILIC色谱柱可在4 min内完成敌草快和百草枯的基线分离；能够以10 ppb或更低的检测限实现新鲜土豆与小麦面粉中两种季铵盐的测定。

参考文献

1. Kohlberg, D.I.S., Mack, D., Anastassiades, M., Hetmanski, M.T., Fussell, R.J., Meijer, T., and Mol, H.G.J., Anal. Bioanal. Chem, 404, 2465-2474 (2012).
2. Anastassiades, M, Kohlberg, D.I., Mack, D., Wildgrube C., Sigalova, I., Roux, D., and Fgel, D., "Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination", EU Reference Laboratory for pesticides requiring single Residue Methods (EURL-SRM), Version 7 (Dec 2012).

订购信息

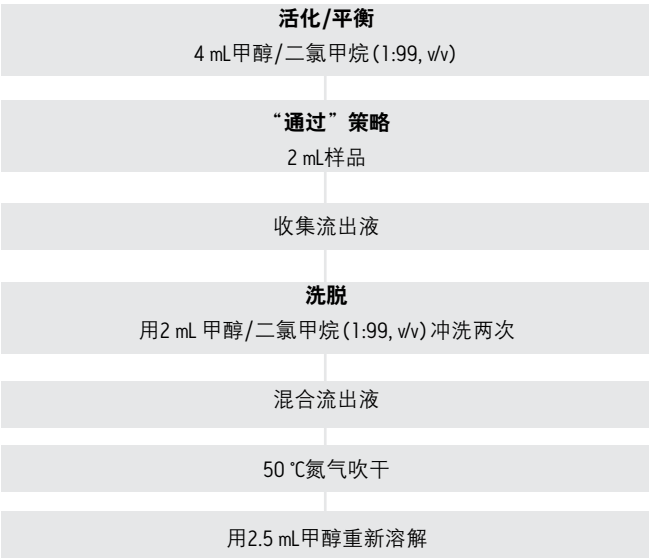
描述	部件号
Cortecs HILIC 2.1 x 100 mm, 1.6 µm	186007106
聚丙烯自动进样器进样瓶	186002642

样品制备

- 1. 将50 mL乙腈加入25 g蔬菜或水果样品中，均质化处理2 min，过滤。
- 2. 取40~50 mL滤液，加入已经放有5~7 g氯化钠的长颈瓶中。
- 3. 用力摇晃长颈瓶1 min，在室温条件放置。
- 4. 从乙腈层取10 mL上清液，80 °C氮气空气条件下吹干，再用2 mL 甲醇/二氯甲烷 (1:99, v/v) 重新溶解后进行SPE处理。

固相萃取过程

Sep-Pak® NH₂ 6 cc/500 mg

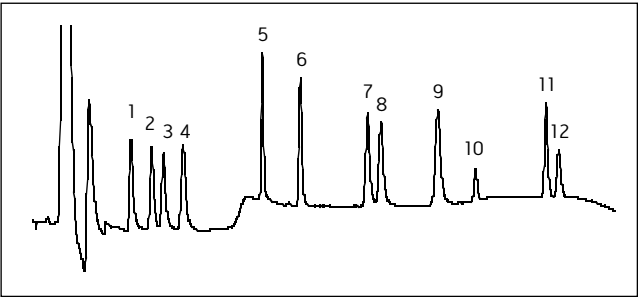


色谱条件

仪器:	Alliance® 2695 系统			
色谱柱:	沃特世氨基甲酸酯分析专用色谱柱, 3.9 x 150 mm			
流速:	1.5 mL/min			
流动相A:	水			
流动相B:	甲醇			
流动相C:	乙腈			
梯度:	时间(min)	A%	B%	C%
	0.00	88	12	0
	5.30	88	12	0
	5.40	68	16	16
	14.00	68	16	16
	16.10	50	25	25
	20.00	50	25	25
	22.00	88	12	0
	30.00	88	12	0

样品: 色谱柱上每种分析物 10 ng
进样量: 400 µL
柱后加入: OPA/NaOH, 0.5 mL/min
检测器: 2475 多波长荧光检测器
激发波长: 339 nm
发射波长: 445 nm
*OPA: 邻苯二甲醛

结果



12种氨基甲酸酯标准品的色谱图。

色谱峰序号	化合物	保留时间
1	涕灭威亚砷	3.77
2	涕灭威砷	4.66
3	杀线威	5.17
4	灭多威	6.03
5	3-羟基-呋喃丹	9.83
6	涕灭威	11.46
7	残杀威	14.35
8	呋喃丹	14.94
9	西维因	17.37
10	1-萘酚	18.99
11	灭虫威	22.02
12	BDMC	22.56

氨基甲酸酯标准品保留时间。

订购信息

描述	部件号
Sep-Pak NH ₂ , 6 cc/500 mg	WAT054560
沃特世氨基甲酸酯分析专用色谱柱, 3.9 x 150 mm	WAT035577
LC/GC 认证样品瓶	186000307C

土豆中苯胺灵残留的分析

样品制备

- 1. 在50 mL离心管中加入15 g磨碎的马铃薯；
- 2. 加入15 mL 含1% 乙酸的乙腈溶液，1.5 g无水乙酸钠和6 g无水硫酸镁；
- 3. 剧烈摇动离心管1 min；
- 4. >1500 rcf离心1 min，取上清液用于固相萃取净化。

固相萃取过程

Sep-Pak® Light NH₂

将5 mL上清液转移到另一根离心管中，加入0.5 mg无水硫酸镁
涡旋，使粉末沉降下来
取2 mL上清液，通过Sep-Pak Light NH ₂ 小柱
取流出液200 µL，用800 µL水进行稀释
进行LC/MS分析(10 µL)

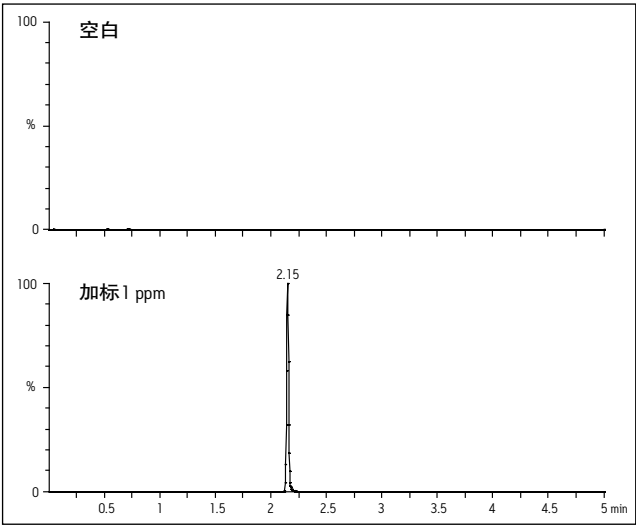
色谱条件

仪器：	沃特世ACQUITY UPLC®系统		
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100 mm, 1.7 µm		
流动相A：	0.1 %甲酸水溶液		
流动相B：	0.1 %甲酸的乙腈溶液		
梯度：	时间(min)	A%	B%
	0.00	80	20
	3.00	20	80
	3.20	80	20
	5.00	80	20

质谱条件

仪器：	沃特世Quattro micro™
电离模式：	ESI ⁺
	多反应监测 (MRM)
多反应监测转换1：	180.3 → 120.3
多反应监测转换2：	180.3 → 138.3

结果



1 µg/g添加水平马铃薯样品的LC/MS/MS图谱。

苯胺灵 180.3 → 138.3	保留时间	峰面积
1 ppm添加1	2.15	5895.34
1 ppm添加2	2.15	6424.93
1 ppm添加3	2.15	6996.63
1 ppm添加4	2.15	7557.80
1 ppm添加5	2.15	7567.60
平均值		6888.46
相对标准偏差 (%)		7.97
回收率 (%)		84.43

苯胺灵 180.3 → 120.3	保留时间	峰面积
1 ppm添加1	2.15	1849.85
1 ppm添加2	2.15	1950.71
1 ppm添加3	2.15	2091.40
1 ppm添加4	2.15	2276.40
1 ppm添加5	2.15	2306.56
平均值		2094.98
相对标准偏差 (%)		9.5
回收率 (%)		81.35

在马铃薯样品中添加1 ppm苯胺灵标准品的五次平行回收率结果。

订购信息

描述	部件号
Sep-Pak Light NH ₂	WAT023513
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100 mm, 1.7 µm	186002352
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.7 µm, 3 pcs/pack	186003975
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

SPE条件

固相萃取小柱: Oasis MCX 3cc/60mg

样品制备

样品溶液用甲酸调节至pH3

活化/平衡

A: 1 mL 甲醇 B: 1 mL 水

上样

以 5 mL/min 速度上样

清洗

1 mL 20:89:1 甲醇/水/浓氨水

洗脱

2 mL 2% 氨水甲醇

因氨基甲酸酯类在碱溶液中不稳定,
将洗脱液挥干, 用流动相溶解

色谱条件

色谱柱: SunFire® C₁₈ 2.1 x 100 mm, 3.5 μm
 流动相A: 水
 流动相B: 乙腈
 流动相C: 500 mM 甲酸铵缓冲液 (pH3.7)
 柱温: 30 °C
 仪器: Alliance® 2695, 沃特世 Xevo TQ MS

质谱条件

锥孔电压: 25 V; ESI+模式(源温度120 °C, 去溶剂化温度
350 °C)

分析物	母离子[M+1] ⁺
多菌灵 (Carbendazim)	192
涕必灵 (Thiabendazole)	202
甲基硫菌灵 (Thiophanate Methylate)	343
硫菌灵 (Thiophanate)	371
腈菌唑 (Myclobutanil)	289
丙环唑 (Propiconazole)	342

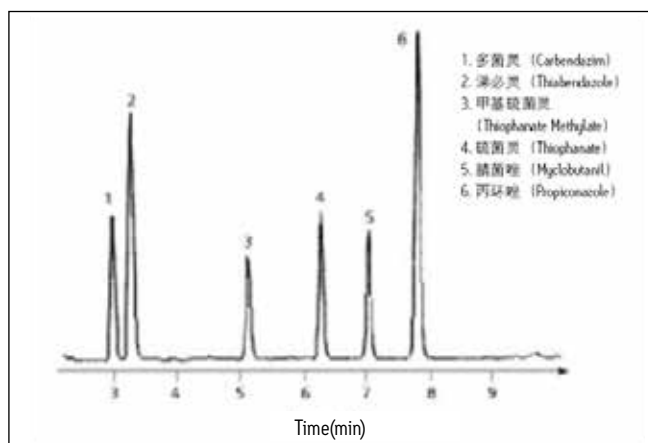


图 1. 使用SunFire C₁₈柱对6种杀真菌剂进行梯度分析(50 ng/mL混标。进样10 μL)。梯度条件: 90:5:5 (A/B/C) 在10 min内到0:95:0 (A/B/C)。

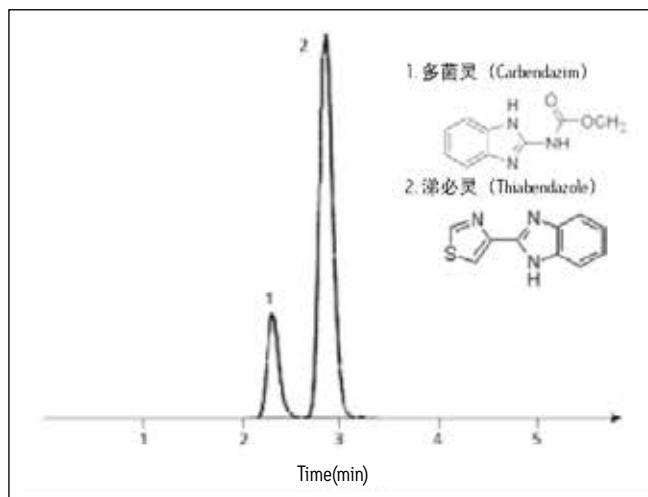


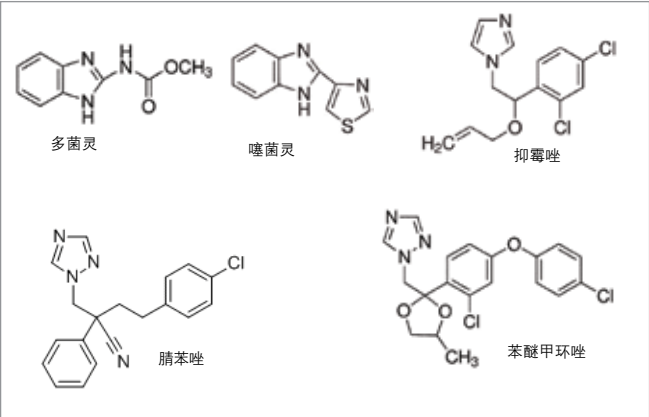
图 2. 使用SunFire C₁₈柱对多菌灵和涕必灵进行等梯度分析(1 μg/mL混标。进样10 μL)。洗脱条件: 75:20:5 (A/B/C)。

订购信息

描述	部件号
SunFire C ₁₈ 2.1x100 mm, 3.5 μm	186002534
Oasis MCX 3 cc/60 mg 30 μm, 100/Box	186000254
LC/MS认证样品瓶	600000751CV
SunFire C ₁₈ 2.1x10 mm Sentry	186002530
Universal Sentry 保护柱套 2.1x10 mm	WAT097958

样品描述

所研究的杀菌剂包括：多菌灵、噻菌灵、抑霉唑、腈苯唑和苯醚甲环唑。这些分析物的结构如图1所示。这些化合物均为碱性，可以保留在Oasis® MCX混合模式阳离子交换吸附剂上进行SPE纯化。



康唑类杀菌剂的结构。

样品制备

使用QuEChERS进行初步提取。向50 mL离心管中加入15 mL橙汁样品。加入15 mL 1%乙酸的乙腈(ACN)溶液，振荡离心管1分钟。加入用于AOAC QuEChERS方法的DisQuE试剂袋的内容物，用力振荡1分钟。然后在3000 rpm下离心5分钟。对于不使用SPE的UPLC/MS/MS分析，用水将0.5 mL上清液稀释至1.0 mL。基本QuEChERS提取方案如图2所示。

QuEChERS提取DisQuE试剂袋

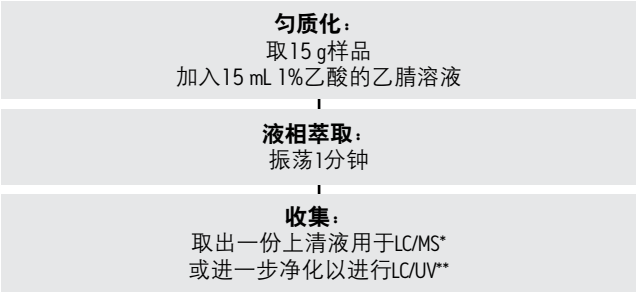


图1. 使用专用于AOAC方法的DisQuE产品进行QuEChERS提取。

* 0.5 mL，用水按1:1稀释

** 2.0 mL，用0.01N HCl稀释至8 mL以进行SPE

SPE净化

采用Oasis MCX固相萃取小柱可以对碱性化合物进行纯化，例如对康唑类杀菌剂。对于LC/UV分析(或者，当UPLC/MS/MS分析也需要进行纯化时)，从QuEChERS提取物中取2 mL上清液，加入6 mL 0.01 M HCl水溶液，混合均匀。然后使用3 cc Oasis MCX小柱实施SPE纯化方案，如图3所示。用酸性水溶液稀释QuEChERS提取物，以增强混合模式SPE保留性能，同时水溶液稀释还能增强反相保留。

Oasis MCX 方案



图2. 本研究中方案采用3 cc规格的Oasis MCX SPE小柱。

用于质谱分析的UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC® H-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 μm, 2.1 x 100 mm
进样体积:	10 μL
柱温:	40 °C
流动相A:	0.1% NH ₄ OH水溶液
流动相B:	0.1% NH ₄ OH甲醇溶液
流速:	0.40 mL/min
梯度:	初始条件为10%的流动相B，在4 min内以线性梯度增加至90%，保持5 min，在5.1 min时返回到10%。保持并重新平衡系统至7 min时。

用于UV检测的HPLC条件(采用XP色谱柱)

系统: ACQUITY UPLC H-Class
检测条件: 光电二极管阵列 (PDA)
色谱柱: XBridge® C₁₈ XP, 2.5 μm, 4.6 x 100 mm
进样体积: 50 μL
柱温: 40 °C
流动相A: 20 mM磷酸钾水溶液 (pH 6.8)
流动相B: 乙腈
流速: 1.3 mL/min
梯度: 初始条件为25%的流动相B, 保持3.4 min, 然后以线性梯度增加, 在9.7 min时达到65%, 保持至11.0 min时, 再以线性梯度增加, 在11.7 min时达到95%, 保持至13.0 min时, 然后线性返回25%至13.2 min。保持并重新平衡系统至18.3分钟时。

结果

化合物	加标	回收率	抑制
康唑类杀菌剂	浓度(ppb)	% (RSD%)	%
多菌灵	10	98.7 (1.3)	16.1
噻菌灵	100	94.9 (2.3)	28.9
抑霉唑利	100	97.3 (0.9)	4.0
苯醚甲环唑	100	96.4 (0.6)	9.7
腈苯唑	100	97.6 (1.6)	8.6
多菌灵	1	94.5 (4.2)	11.2
噻菌灵	10	97.8 (4.1)	34.0
抑霉唑抑霉唑利	10	104 (3.7)	15.2
苯醚甲环唑	10	92.6 (6.5)	12.1
腈苯唑	10	95.2 (4.9)	5.0

表 1. 使用专用于AOAC QuEChERS的DisQuE试剂袋得到的康唑类杀菌剂回收率数据总结 (n = 4)。采用Oasis MCX净化时, 离子抑制显著减少 (<2%) (未显示数据)。

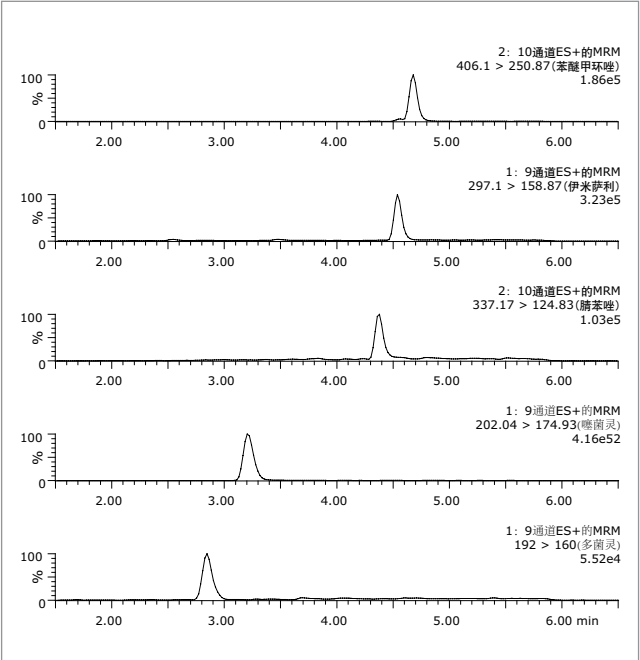


图 3. 每种杀菌剂以10 ng/g (ppb)(仅多菌灵为1 ppb)加标的橙汁, 经DisQuE试剂袋提取物净化后的UPLC/MS/MS色谱图。

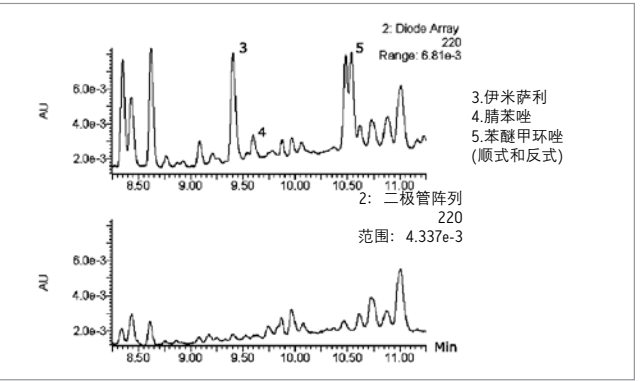


图 4. 经Oasis MCX纯化后按100 ng/g (ppb)加标的橙汁的DisQuE试剂袋提取物在XP色谱柱上获得的LC/UV (220 nm)色谱图。

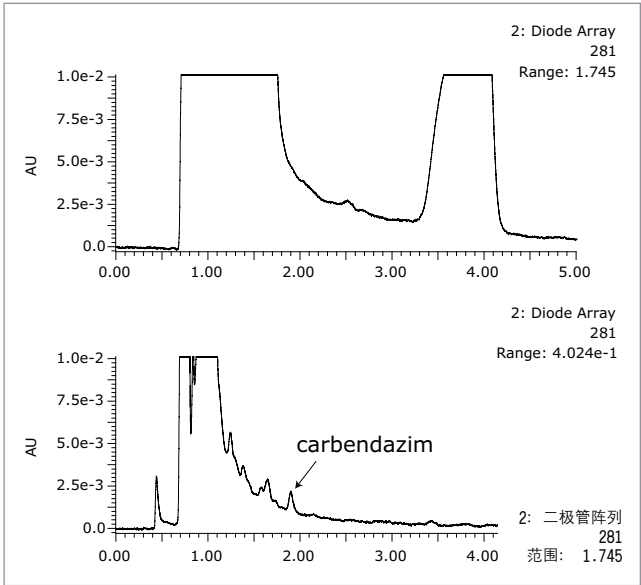


图 5. 用加入多菌灵的橙汁样品的DisQuE试剂袋提取物得到的LC/UV色谱图(281 nm)。上方的色谱图未经SPE纯化, 下方的色谱图采用Oasis MCX小柱进行了纯化。

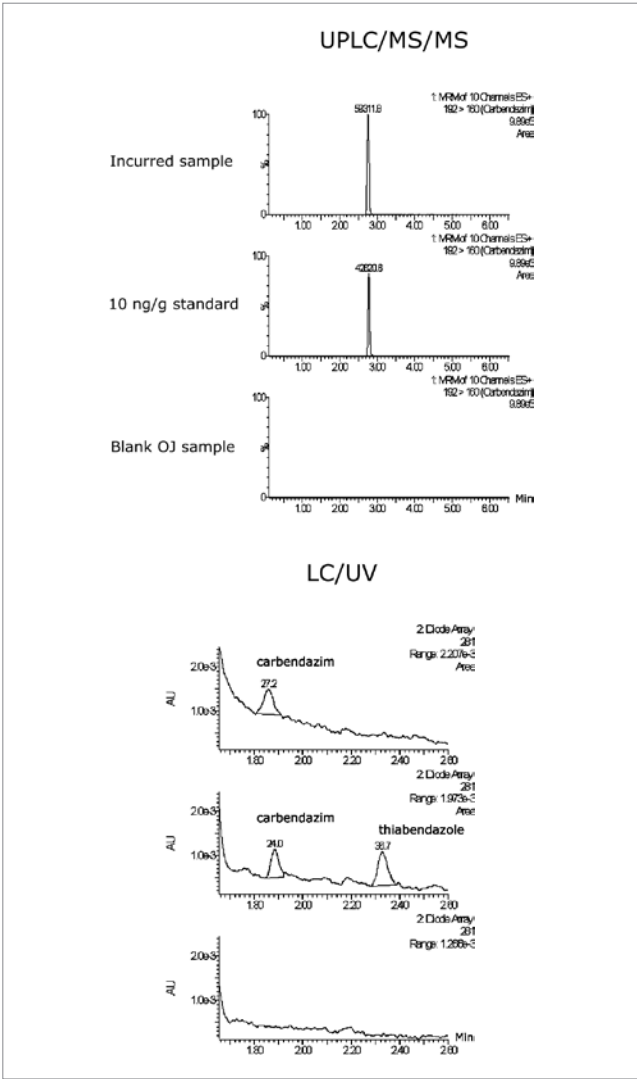


图 6. 加入多菌灵的市售橙汁的UPLC/MS/MS和LC/UV对比。

订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 µm, 2.1 x 100 mm	186002352
Xbridge C ₁₈ XP, 2.5 µm, 4.6 x 100 mm	186006039
专用于AOAC QuEChERS方法的DisQuE试剂袋	186006812
Oasis MCX 3 cc小柱	186000253

参考资料: 沃特世应用资料720004457EN

©2012年 沃特世公司。Waters、ACQUITY UPLC、Xbridge和Oasis是沃特世公司的注册商标。DisQuE是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

样品制备

样品的制备请参阅EPA547方法。该法描述了用0.45 μm的Acrodisc过滤器的方法。

其他样品制备方法

使用Oasis® MAX固相萃取法提取草甘膦及其代谢物，此法适用的Oasis MAX 固相萃取小柱规格为6 cc，150 mg规格。当样品含量大于50 mL时需用6 cc，500 mg规格的Oasis MAX固相萃取小柱。

样品制备 pH 6-8
条件 2 mL MeOH, 4 mL 0.5 M NaOH, 2 mL H ₂ O
淋洗 4 mL 0.5 M NaOH
淋洗 2 mL H ₂ O
上样 25 mL 样品
洗涤 2 mL H ₂ O
洗脱 4 mL 0.5 M HCl 乙腈溶液*
蒸馏和重新溶解 与LC分析适应

*交替的洗脱液为4 mL 0.6 M 柠檬酸钠。

标准品混合物的制备

用移液管移取100 μL AccuStandard 标准品混合物(M-547)到100 mL的酸化水中，使其浓度为100。酸化水的制备方法是通过滴加盐酸(HCl)将色谱级水的pH值调节为3.0。使用如上的EPA547-02方法，制备AMPA(氨基膦酸)溶液。

洗脱液的制备

将0.5 mL85%的磷酸(H₃PO₄)稀释至1L，混匀，过滤、脱气。

柱后试剂的制备

试剂1: 次氯酸盐

将1.35 g KH₂PO₄、11.6 g NaCl、0.4 g NaOH和0.2 mL Clorox次氯酸钠(纯)溶于水，稀释至1L，过滤，脱气。

试剂2: 邻苯二甲醛(OPA)

将0.8 g OPA溶于10 mL甲醇中，将这些混合物加入含有19.1 g硼砂的水溶液中。补充溶剂直至最终容量达到1 L，过滤并脱气。在所得的溶液中，加入2 mL2-巯基乙醇，轻摇，混合。操作过程需避光。

注：两种试剂的柱后流速均为0.5 mL/min，柱后反应的温度为38℃。在荧光检测器前面并排插入第二根反应管。

色谱条件

仪器:	沃特世Alliance® 氨基甲酸酯分析系统
洗脱液:	0.05%磷酸
色谱柱:	离子排阻色谱柱，7.8 x 150 mm, 55 °C
保护柱:	Guard-Pak™ 组件和附件
进样量:	200 μL标准品混合物
流速:	1.5 mL/min
检测:	荧光检测，激发波长-340 nm， 吸收波长-455 nm，增益-10

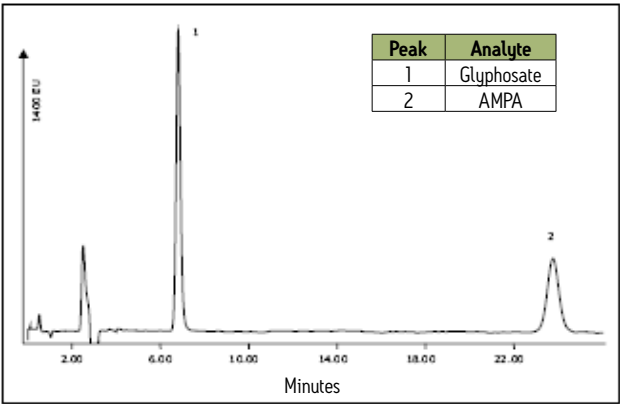


图 1. 标准品色谱图，每种分析物浓度为100 ppb。

订购信息

描述	部件号
IC-PAK™ 离子排阻色谱，7.8 X 150 mm	WAT010295
Guard-Pak保护套	WAT88141
Semivolatiles #2 除草剂标准品	186004271
Oasis MAX小柱，6 cc，150 mg	186000370
Oasis MAX小柱，6 cc，500 mg	186000865
环境系统解决方案	720001601EN
甘草膦和氨基膦酸的饮用水溶液	WA31764
饮用水中有害有机物的LC/MS/MS多分析物检测方法	720001090EN

样品制备

注：样品收集和所有样品制备步骤应当使用聚丙烯容器。UPLC分析推荐使用聚丙烯材质的自动进样器样品瓶。

1.样品前处理

将10 mL样品转移至适当的聚丙烯容器中(本研究中使用的是15 mL离心管)。对于氯化样品, 加入10 mg硫代硫酸钠并混合均匀。向所有样品加入400 mM pH 7磷酸盐缓冲液25 μ L以调整pH值。

2.SPE富集和净化

用Oasis WCX小柱进行SPE富集和净化(有关SPE的详细信息, 请参见图2)。在每个小柱上连接一个30 cc聚丙烯储液器, 以便加载10 mL样品。



图 1. 用于分析敌草快/百草枯的Oasis WCX小柱方案。

结果

按40 ng/L加标的三种水的敌草快/百草枯回收率数据(n=7)

样品类型	回收率(RSD%)	回收率(RSD%)
	敌草快	百草枯
地下水	82 (8)	89 (16)
自来水	84 (5)	88 (8)
河水	83 (4)	89 (19)

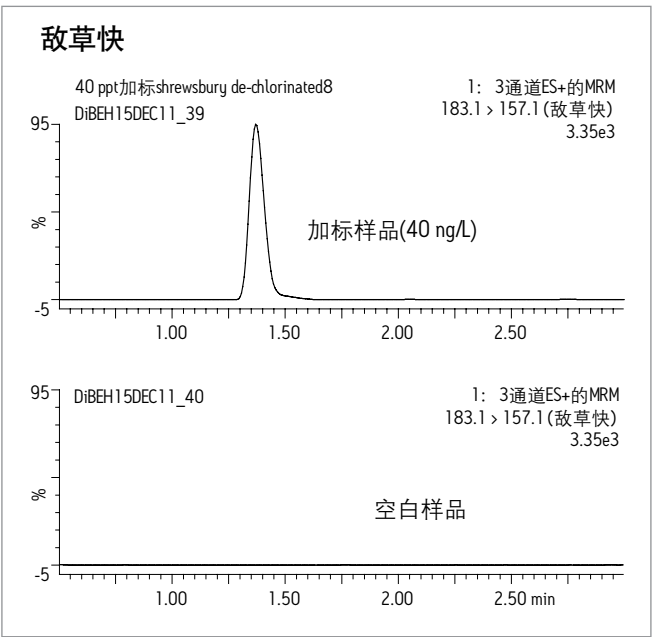


图 2. 敌草快典型LC-MS(MS)色谱图。

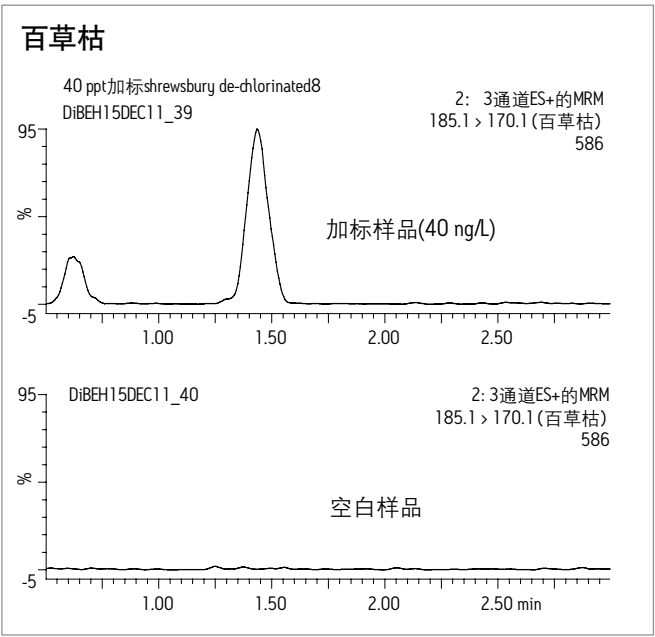


图 3. 百草枯典型LC-MS(MS)色谱图。

敌草快

相关系数: $r = 0.996129$, $r^2 = 0.992272$

校准曲线: $0.000420002 * x + -0.00197468$

响应类型: 内标(参比3), 峰面积*(内标浓度/内标峰面积)

曲线类型: 线性, 原点: 包含, 加权: $1/x$, 轴转: 无

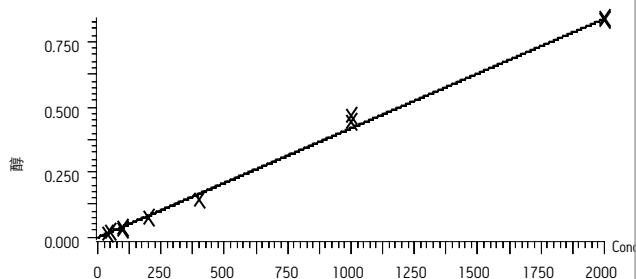


图 4. 敌草快典型LC-MS(MS)校准曲线。

百草枯

相关系数: $r = 0.995100$, $r^2 = 0.990223$

校准曲线: $0.000575997 * x + -0.000150743$

响应类型: 内标(参比4), 峰面积*(内标浓度/内标峰面积)

曲线类型: 线性, 原点: 排除, 加权: $1/x$, 轴转: 无

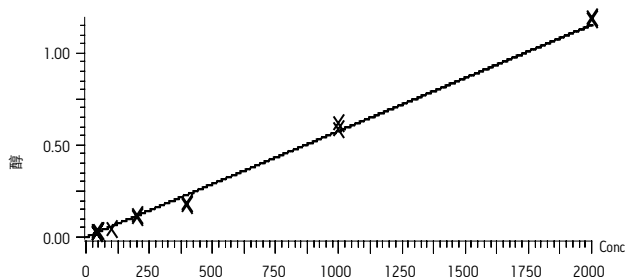


图 5. 百草枯典型LC-MS(MS)校准曲线。

订购信息

描述	部件号
Oasis WCX, 3 cc/60 mg, 30 μ m	186002495
ACQUITY BEH HILIC, 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm	186003461
聚丙烯自动进样器样品瓶	186002642
30 cc聚丙烯储液器	WAT011390

参考资料: 沃特世应用资料720004220EN

©2013年 沃特世公司。Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、UPLC和Oasis是沃特世公司的注册商标。

样品前处理

样品提取：取2.0 g均质样品(鸡蛋或鸡肉样品)于50 mL离心管中，然后添加一定浓度的标准品或QC样品，加入10 mL水溶液，漩涡混合30 s，再加入10 mL乙腈，涡旋振荡10 min，加入QuEChERS盐包(用于CEN方法的DisQuE提取盐包，部件号186006813)后大力振摇1 min，在6000 rpm的转速下，离心5 min。

样品净化：将Oasis® PRiME HLB小柱(6 cc，200 mg，部件号186008057)安装在预先清洁过真空萃取装置上。无需打开真空泵及执行小柱活化步骤。取约0.5 mL上清液，使其通过Oasis® PRiME小柱并弃去滤液。然后再取1.5 mL上清液，使其靠重力再次通过小柱并收集滤液过膜后待上机分析。

化合物名称	英文名称	保留时间 min	离子对 m/z	锥孔电压/V	碰撞能量/V
氟甲腈	Fipronil Desulfingyl	2.67	387.1/282.1 387.1/351.1*	20	48 14
氟虫腈	Fipronil	2.80	435.1/250.1 435.1/330.1*	8	32 22
氟虫腈硫醚	Fipronil Sulfide	2.92	419.1/262.0* 419.1/383.1	8	34 16
氟虫腈砜	Fipronil Sulphone	3.15	451.1/281.9 451.1/415.1*	26	32 24

*为定量离子

表1. 每种目标化合物的MRM通道和质谱条件。

UPLC条件

LC 系统: ACQUITY UPLC
色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈,
1.7 µm, 100 mm x 2.1 mm
流动相: A: 水(含5mM乙酸铵和0.1%甲酸)
B: 甲醇

梯度洗脱程序:

时间(min)	流速(mL/min)	A%	B%	梯度曲线
初始	0.4	50	50	6
0.5	0.4	25	75	6
3.0	0.4	25	75	6
3.5	0.4	1	99	6
4.5	0.4	1	99	6
6.0	0.4	50	50	1

进样体积: 2 µL
柱温: 35 °C
洗针液和样品
管理器冲洗液: 甲醇/水(50: 50)溶液
密封清洗液: 甲醇/水(10: 90)溶液

MS条件

质谱仪: Waters Xevo® TQ-S
离子源: ESI-
离子源温度: 150 °C
脱溶剂气温度: 450 °C
脱溶剂气流速: 800 L/Hr
锥孔气流速: 150 L/Hr
数据管理系统: MassLynx® v4.1

实验结果

基质匹配校准曲线和基质效应
每种化合物使用空白基质配置标准曲线，在0.1 µg/L - 5µg/L范围内 6 个不同浓度具有良好的线性关系，相关系数R² > 0.99，见表2。

化合物名称	R ²	鸡蛋 基质效应%	R ²	鸡肉 基质效应%
氟虫腈	0.999	2.6	0.993	16.9
氟虫腈砜	0.998	-21.4	0.994	-8.5
氟虫腈硫醚	0.996	-6.2	0.996	-5.6
氟甲腈	0.997	-8.6	0.992	-3.6

*该值为正是离子增强效应，负为离子抑制效应
表2. 相关系数及基质效应。

方法回收率和稳定性

使用空白鸡蛋和鸡肉样品进行添加回收实验。三个不同的添加浓度分别为2 µg/kg、5 µg/kg、10 µg/kg，每个添加浓度平行三次重复测定，平均回收率及RSD结果见表3和表4.谱图见图1-2。

化合物名称	添加浓度 2 µg/kg		添加浓度 5 µg/kg		添加浓度 10 µg/kg	
	回收率%	RSD%(n=3)	回收率%	RSD%(n=3)	回收率%	RSD%(n=3)
氟虫腈	72.3	6.4	84.1	11.1	81.8	8.3
氟虫腈砒	71.8	4.4	76.1	9.6	73.4	4.2
氟虫腈硫醚	75.8	6.8	85.5	8.5	87.2	7.4
氟甲腈	78.3	4.5	79.5	1.3	76.9	3.8

表3. 鸡蛋样品回收率及RSD结果。

化合物名称	添加浓度 2 µg/kg		添加浓度 5 µg/kg		添加浓度 10 µg/kg	
	回收率%	RSD%(n=3)	回收率%	RSD%(n=3)	回收率%	RSD%(n=3)
氟虫腈	84.5	7.7	89.3	9.4	95.9	6.1
氟虫腈砒	85.8	4.4	94.4	1.9	103.2	1.1
氟虫腈硫醚	83.2	4.6	88.4	4.2	101.1	1.5
氟甲腈	91.2	6.2	82.4	6.6	103.6	3.7

表4. 鸡肉样品回收率及RSD结果。

图1、2分别为鸡蛋和鸡肉空白样品的色谱图及样品添加谱图(出峰顺序分别为氟甲腈、氟虫腈、氟虫腈硫醚、氟虫腈砒)。

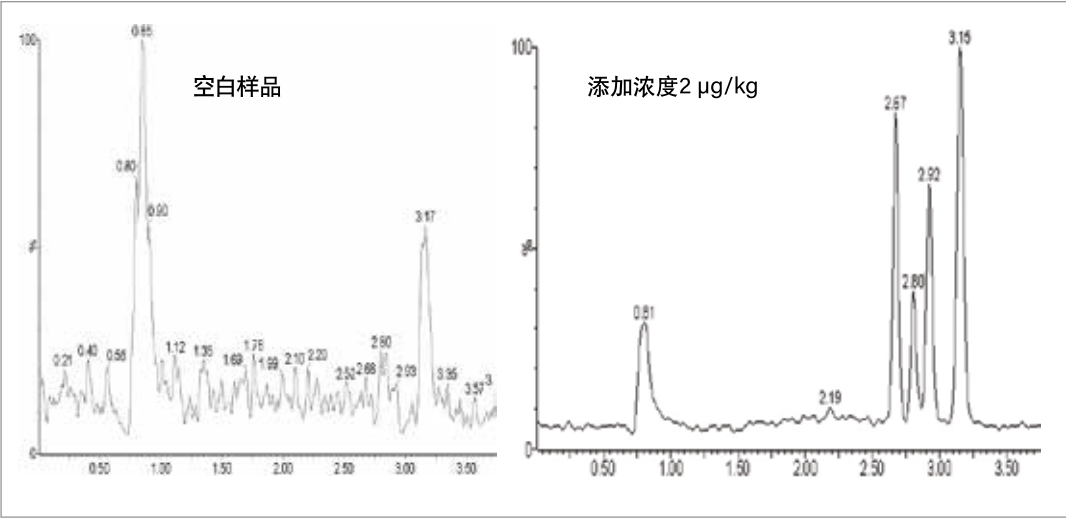


图1. 空白鸡蛋样品和鸡蛋样品添加四种目标物总离子流图。

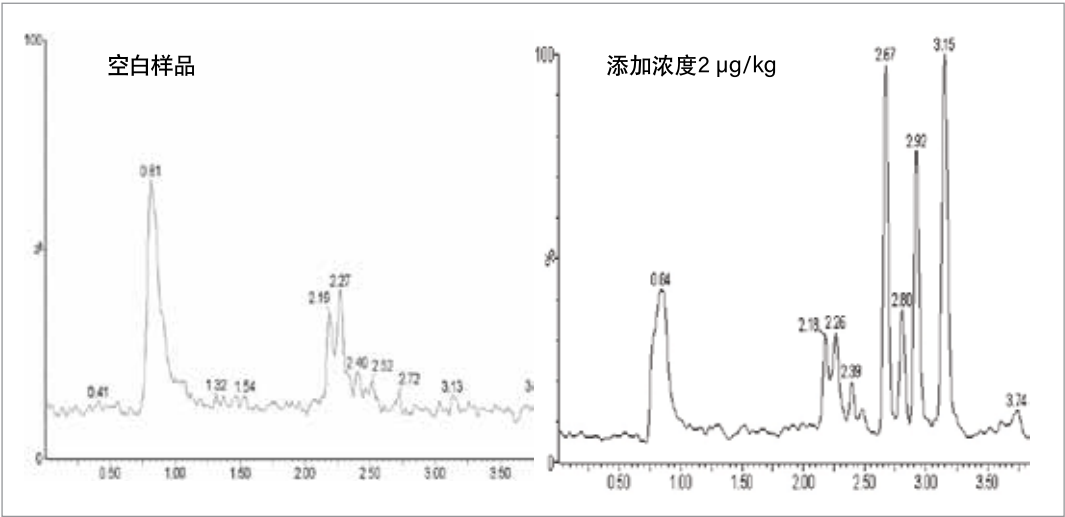


图2. 空白鸡肉样品和鸡肉样品添加四种目标物的总离子流图。

净化效果

图3为Oasis® PRiME小柱去除磷脂的效率的比较色谱图；显示了使用Oasis® PRiME小柱成功去除了95%以上的磷脂和80%以上的总脂肪。

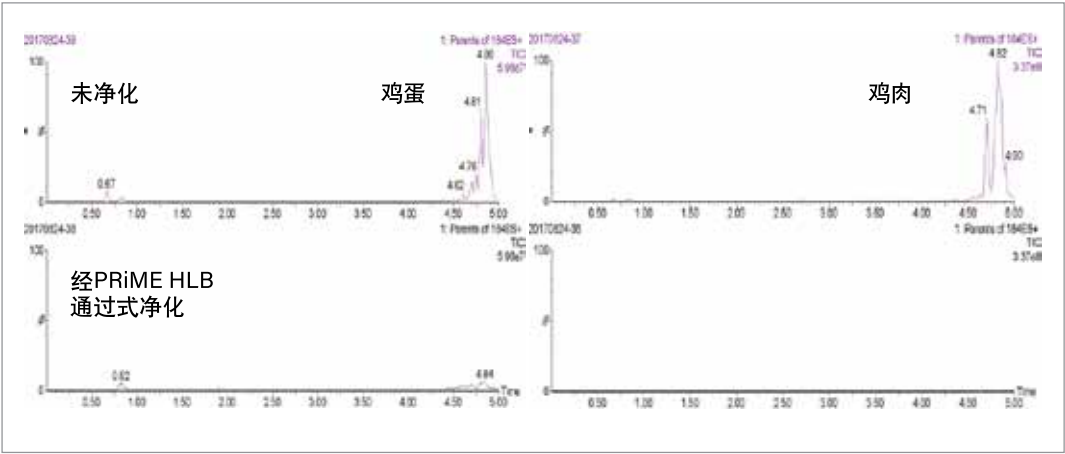


图3. 使用Oasis® PRiME HLB进行通过式净化；几乎完全去除了样品提取物中的磷脂。

结论

本方案使用简单有效的样品净化方法，可以同时检测动物源性样品中氟虫腈及其3种代谢物的残留。在三个不同添加浓度下，氟虫腈及其3种代谢物在鸡蛋和鸡肉样品中的方法回收率在72-103%之间，RSD < 10%，方法定量限为2 µg/kg，基质效应的结果均<22%；采用Oasis® PRiME HLB小柱的简单通过式净化方案能够去除提取液中80%以上的总脂肪和95%以上的磷脂，能够保证最小的基质效应；使用ACQUITY UPLC® BEH C₁₈色谱柱进行梯度洗脱既保证四种目标物的分离，同时有达到了将其与杂质的分离，尽可能的减小基质对目标峰干扰。

订购信息

描述	部件号
DisQuE提取盐包 (CEN)	186006813
Oasis PRiME HLB 6CC /200mg	186008057
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100, 1.7 µm	186002352

样品制备条件

DisQuE™

吸附剂试剂袋: DisQuE试剂袋 (CEN方法),
4.0 g MgSO_4 , 1.0 g NaCl, 1.5 g 柠檬酸钠
dSPE: 15 mL 部件号 186004834
900 mg MgSO_4 , 150 mg
PSA, 150 mg C_{18}

SPE

小柱: Oasis® HLB 30 mm, 60 mg/3 cc
调整: 2 mL 甲醇
平衡: 2 mL 水
上样: 70 mL 稀释提取物
流速: < 5 mL/min
清洗: 2 mL 40% MeOH 水溶液
洗脱: 1 mL 100% MeOH

LC条件

系统: ACQUITY UPLC®
运行时间: 5.0 min
色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18} , 1.7 μm , 2.1x 50 mm
柱温: 40 °C
流动相A: 0.5% NH_4OH 水溶液
流动相B: 0.5% NH_4OH 甲醇溶液
洗脱: 流动相B在3 min内以线性梯度从5%增加至95%
流速: 0.5 mL/min
进样体积: 50 μL

MS条件

MS系统: Xevo® TQD
电离模式: ESI-
毛细管电压: 3.5 kV
锥孔电压: 30.0 V
源温度: 140 °C
去溶剂化温度: 350 °C
去溶剂化气流速: 550 L/h
锥孔气流速: 50 L/h



图 1. 最终样品制备方案。

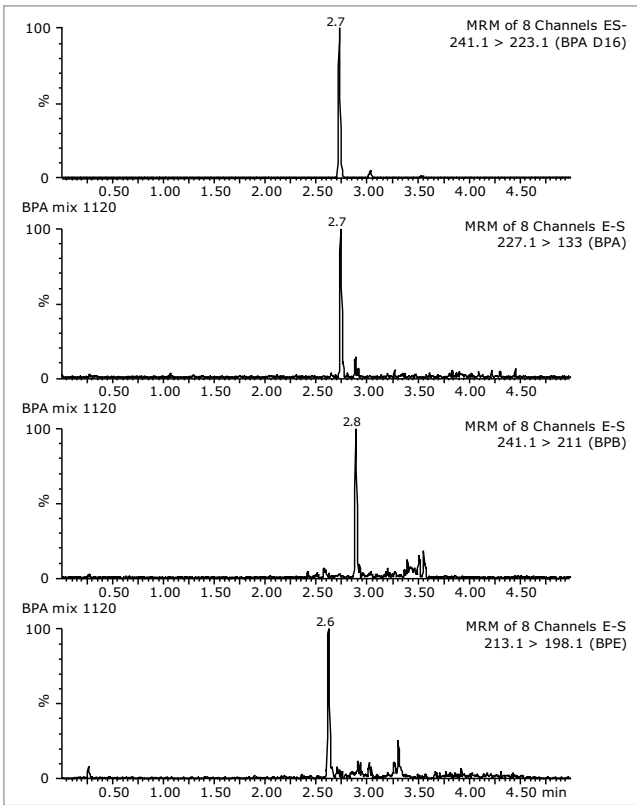


图 2. 1 ppb加标婴儿配方奶粉提取物的MRM色谱图。

双酚	配方奶粉	婴儿食品
BPA	102% (3.2%)	110% (7.8%)
BPB	95% (5.5%)	112% (6.7%)
BPE	81% (4.6%)	99% (6.1%)

表 1. 婴儿配方奶粉和绿豆泥中加标BPA、BPB和BPE的回收率和RSD (n = 3)计算结果。

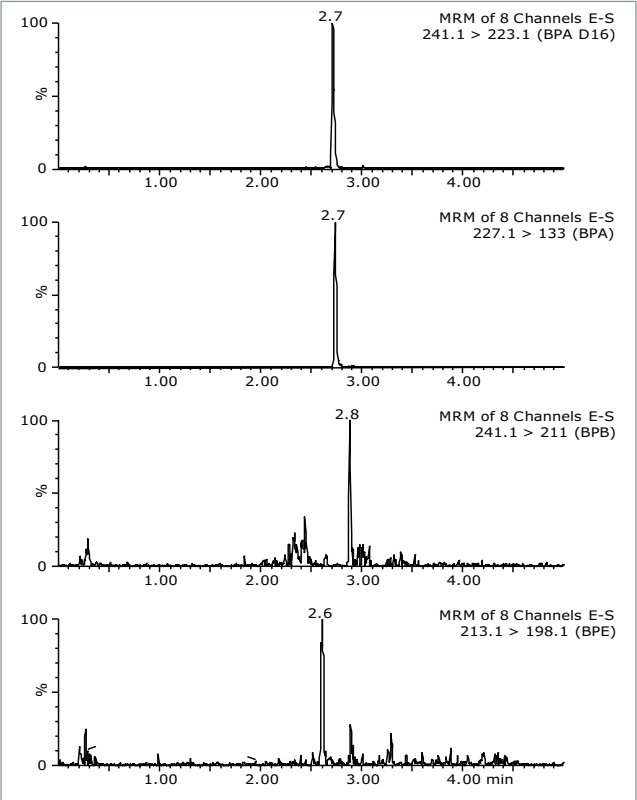


图 3. 1 ppb加标婴儿食品提取物的MRM色谱图。

订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 色谱柱, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm	186002350
DisQuE 50 mL 离心管	186004837
DisQuE 试剂袋 (CEN 方法)	186006813
DisQuE 15 mL dSPE 净化离心管 (900 mg MgSO ₄ , 150 mg PSA, 150 mg C ₁₈)	186004834
Oasis HLB, 3 cc/60 mg, 30 μm 小柱	WAT094226
LCMS 认证样品瓶	600000751CV

参考资料：沃特世应用资料720004192EN
©2013年 沃特世公司。Waters、ACQUITY UPLC、Oasis、Xevo和UPLC是沃特世公司的注册商标。DisQuE是沃特世公司的商标。

样品制备

水样品

1. 在100 mL水样添加适当的化合物，用甲酸调节到pH 3。

鸡肝样品

1. 取1 g磨粉碎样品，加入10 mL 10 mM氢氧化钾的甲醇液，均浆，振摇提取16 hrs。
2. 样品8000 rpm 离心10 min。
3. 取1 mL上清液，用水稀释至20 mL，用2%甲酸调节pH值到4-5。

固相萃取过程

(Oasis® WAX 3 cc/60 mg)

预处理好的样品

活化/平衡

A. 2 mL 甲醇 B. 2 mL 水

上样

100 mL 水样品或 20 mL 组织样品

清洗

A. 1 mL 2%甲酸 B. 2 mL 甲醇

洗脱

2 mL 含1% 氨水的甲醇

注意:

1. 洗脱液收集在聚丙烯试管中，用2 mL含2%甲酸水溶液稀释再用水定容至5 mL。
2. 或者，洗脱液蒸干后用1 mL流动相再定容。必须用聚丙烯试管。

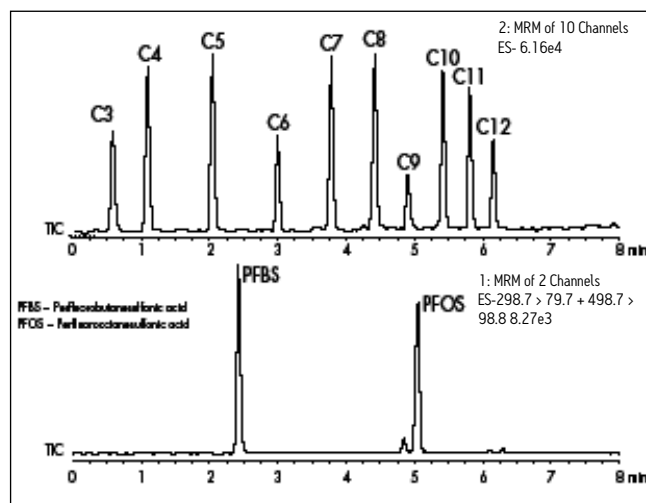
色谱条件

仪器：沃特世ACQUITY UPLC®系统
 色谱柱：沃特世ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 2.1 x 50 mm, 1.7 μm
 柱温：40 °C
 流动相A：20 mM醋酸铵水溶液/乙腈(90:10)
 流动相B：乙腈
 流速：0.4 mL/min
 梯度：8 min内，B相从15% - 95%
 进样体积：10 μL(满环进样)

质谱条件

仪器：沃特世 Quattro Premier™ XE
 电离模式：ESI-
 毛细管电压：3 kV

分析物	MRM	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
PFBS	299 > 80	40	30
PFOS	499 > 80	50	40
C3	163 > 119	20	13
C4	213 > 169	15	10
C5	263 > 219	15	9
C6	313 > 269	15	12
C7	363 > 319	15	10
C8	413 > 369	15	10
C9	463 > 419	15	10
C10	513 > 469	15	10
C11	563 > 519	15	10
C12	613 > 569	15	10



分析物:

C3 = (perfluoropropanoic) C8 = (perfluorooctanoic)
 C4 = (perfluorobutyric) C9 = (perfluorononanoic)
 C5 = (perfluoropentanoic) C10 = (perfluorodecanoic)
 C6 = (perfluorohexanoic) C11 = (perfluoroundecanoic)
 C7 = (perfluoroheptanoic) C12 = (perfluorododecanoic)

结果

饮用水的回收率(%)											
添加浓度 (µg/L)	PFBS	PFOS	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
0.10	122	109	108	119	97	184	107	83	121	101	101
0.30	110	117	95	132	105	110	119	126	137	118	94
0.70	102	98	91	107	93	118	100	78	103	126	119
1.0	113	94	128	106	98	130	100	88	100	110	117
4.0	104	86	101	99	99	102	102	92	115	99	84
10	104	100	98	101	100	87	89	82	103	99	101

饮用水中PFCs 的回收率。

鸡肝中的回收率(%)											
添加浓度 (µg/kg)	PFBS	PFOS	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
2	LOQ	–	81	LOQ	–	108	132	165	100	97	–
5	98	LOQ	138	148	LOQ	97	100	133	89	73	LOQ
10	93	50	102	134	121	99	87	123	95	101	33
20	102	50	128	144	94	96	110	117	90	80	25
30	87	51	104	102	124	89	86	103	91	84	20
50	92	54	92	92	118	94	97	97	86	86	22

鸡肝中PFCs 的回收率。

订购信息

描述	部件号
Oasis WAX, 3 cc/60 mg	186002492
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 1.7 µm	186002350
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 1.7 µm, 3/pk	176000863
300 µL Polypropylene Vial	186002639
PFS Column Kit(含PFC isolator)	176001692

样品预处理

用食品加工机对鱼肉块(比目鱼)、带壳虾以及带水的去壳牡蛎分别进行均质化处理。每个样品取15 g均质后的组织到离心管中，按三种不同水平加入认证的PAH标准溶液。向鱼和虾样品中加入5 ml水来帮助混合，牡蛎不需要另外加水。加标后的各种样品彻底混合，并允许在室温下放一个小时。

样品制备

向每个离心试管中加入DisQuE管的试剂，即6 g硫化镁 +1.5 g醋酸钠以及15 mL乙腈。用力摇动试管至少1分钟，从而形成海产食品组织、缓冲盐和乙腈的一种乳浊液。按3000 rpm的转数离心5 min后，取一部分乙腈层转移至一个自动进样瓶中进行进样。

1 µg/g和10 µg/g浓度的加标样品分别用1:10和1:100的乙腈稀释。用6点线性校正曲线对样品进行定量。标准曲线是用乙腈稀释认证的标准品来制备。

色谱条件

系统：带大容量流动池(LVFC)的ACQUITY UPLC H-Class
色谱柱：PAH 4.6 x 50 mm, 3 µm
柱温：35 °C
进样量：10 µL
采样率：20 点/秒
检测：采用程序定时控制荧光检测波长变化
软件：Empower 2
流动相A：Milli-Q 水
流动相B：甲醇，费舍尔最优级
流动相C：乙腈，费舍尔最优级
标准品：PAH认证标准，AccuStandard M 8310
流速：2.0 mL/min

梯度程序:

时间 (分钟)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	梯度线型
0.00	2.0	30	70	0	
2.25	2.0	0	70	30	6
3.50	2.0	0	0	100	6
3.60	2.0	30	70	0	6

结果

分散样品制备通常也称为QuEChERS，是用于食品中农药分析的一种行之有效和快速的样品制备方法。就在最近，该方法已被用来从食品基质中萃取其他污染物，包括多环芳烃。

利用ACQUITY UPLC H-Class系统，在短短的3.5 min内就将被US EPA列为重点污染物的15种荧光PAHs分离出来了。分析物的分离如图2所示，箭头所指向的是程序定时控制波长的变化。

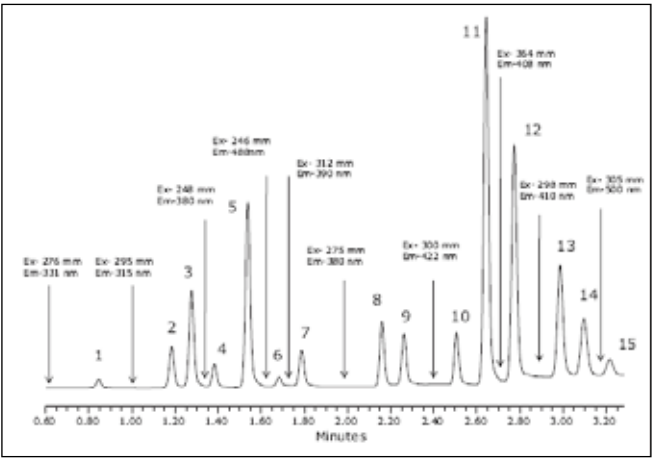


图2. PAH分析物 (0.1 mg/L) 的分离，采用程序定时控制波长变化，如箭头所示。PAH分析物被确定如下：(1) 萘；(2) 苊；(3) 苊；(4) 菲；(5) 蒽；(6) 荧蒽；(7) 苝；(8) 苯并[a]蒽；(9) 屈；(10) 苯并[b]蒽；(11) 苯并[k]荧蒽；(12) 苯并[a]苝；(13) 二苯并[a,h]蒽；(14) 苯并[g,h,i]苝；(15) 茚并[1,2,3-c]苝。



图1. 配有荧光检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统。

图3所示为以10 µg/g的浓度加标的虾、鱼和牡蛎基质的色谱图实例。如图3D中所示，同样通过样品制备程序制备出的空白水样显示了非常清晰的色谱图。

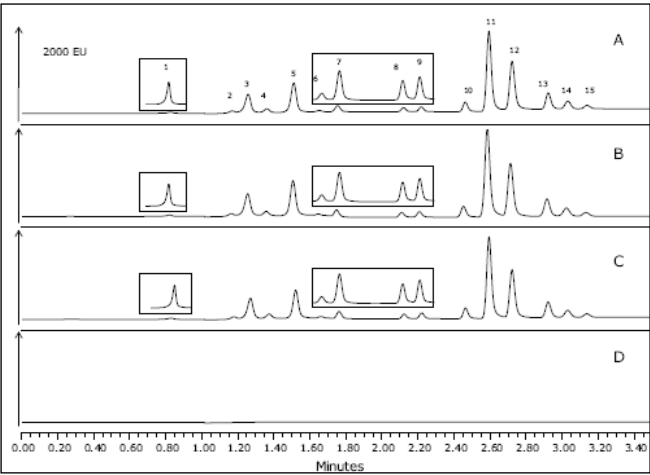


图3. 按10.0 µg/g加入标品到(A) 虾，(B) 鱼和(C) 牡蛎中的PAHs的色谱图(萃取后用乙腈按1:100稀释)。插图显示的是(1) 萘、(6) 荧蒽、(7) 苊、(8) 苯并(a) 蒽和(9) 屈的放大后的色谱峰。还显示了通过萃取程序得到的空白水样(D)。

通过Waters® DisQuE基质分散样品制备试剂盒，从三种不同的海产品基质中提取多环芳烃。虾、鱼和牡蛎的回收率范围68%-149%。

订购信息

描述	部件号
DisQuE 50 mL样品提取管	186004571
Waters PAH专用柱 4.6 x 50 mm, 3 µm	186001260
LC/MS认证样品瓶	6000000751CV

简介

本方法介绍了两种基于沃特世超高效液相色谱技术 (UPLC®) 分析18种邻苯二甲酸盐的方法，方法一为采用沃特世超高效液相色谱质谱联用技术 (UPLC/MS/MS)，该方法具有分析速度快、灵敏度高的特点，适用于实验室拥有质谱系统并追求检测灵敏度的用户。方法二采用沃特世超高效液相色谱系统和二极管阵列检测器 (UPLC/PDA) 分析方法，适用于暂时还不具有质谱系统的用户。

邻苯二甲酸二甲酯	DMP
邻苯二甲酸丁基苯基酯	BBP
邻苯二甲酸二乙酯	DEP
邻苯二甲酸二异丁酯	DIBP
邻苯二甲酸二丁酯	DBP
邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯	DMEP
邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯	DEEP
邻苯二甲酸二戊酯	DPP
邻苯二甲酸二己酯	DHXP
邻苯二甲酸二(2-丁氧基)乙酯	DBEP
邻苯二甲酸二环己酯	DCHP
邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯	DEHP
邻苯二甲酸二正辛酯	DNOP
邻苯二甲酸二壬酯	DNP
邻苯二甲酸二(2-丙基庚)酯	DPHP
邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯	DMPP
邻苯二甲酸二异壬酯	DINP
邻苯二甲酸二异癸酯	DIDP

目标物：18种邻苯二甲酸酯类。

样品制备

1. 液体样品类，Oasis® HLB Glass柱。如含有酒精，先适度旋蒸。



2. 固体、半固体样品等含脂肪较高的样品(蛋糕、酱类)，Certified Sep-Pak® Sillica柱。



方法一：UPLC/MS/MS方法
色谱条件

LC系统：ACQUITY UPLC H-Class系统
色谱柱：ACQUITY UPLC HSS C₁₈, 1.8 μm, 2.1 x 100 mm
流动相A：0.1% FA水溶液
流动相B：乙腈
流速：0.4mL/min
梯度洗脱：梯度表

时间(分钟)	流速 (mL/min)	A(%)	B(%)	曲线
0.00	0.40	65	35	
1.50	0.40	25	75	6
2.00	0.40	0	100	6
6.20	0.40	0	100	6
7.50	0.40	65	35	1

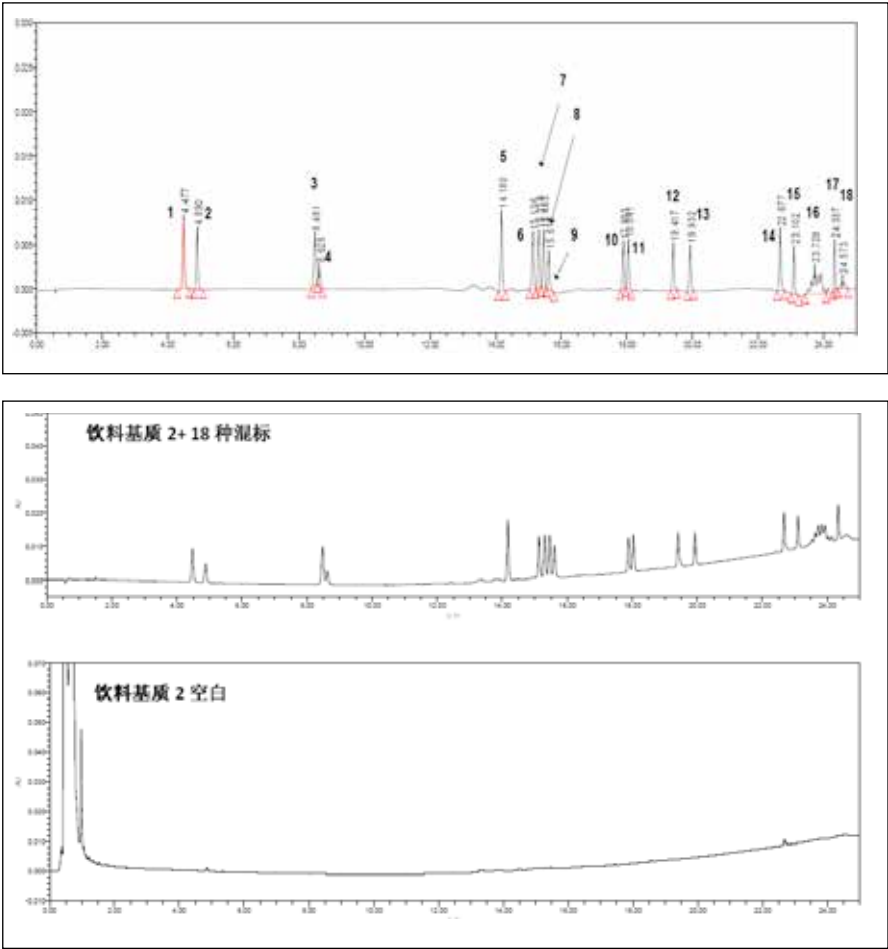
进样体积：10 μL
柱温：35 °C
样品温度：10 °C
强洗溶剂：ACN
弱洗溶剂：H₂O:CAN=95:5
运行时间：7.5分钟

质谱条件

系统：ACQUITY UPLC TQD
离子化模式：ESI+
电离电压：3.2 kV
离子源温度：120 °C
脱溶剂气温度：400 °C
脱溶剂气流量：650 L/Hr

方法二：UPLC/PDA方法
色谱条件

仪器系统：沃特世 UPLC H-Class/PDA
色谱柱：ACQUITY UPLC HSS C₁₈, 1.8 μm, 2.1 x 100 mm
波长：225 nm
柱温：45 °C
流速：0.4 mL/min
流动相：A-水，B-乙腈，进行梯度洗脱



饮料基质2加标与空白结果

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB Glass柱 5 cc/200 mg	186000683
Certified Sep-Pak Sillica 柱 6 cc/500 mg	18600461
ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ , 1.7 μm, 2.1 x 100 mm	186003533
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.8 μm, 3 pcs/pack	186003981
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

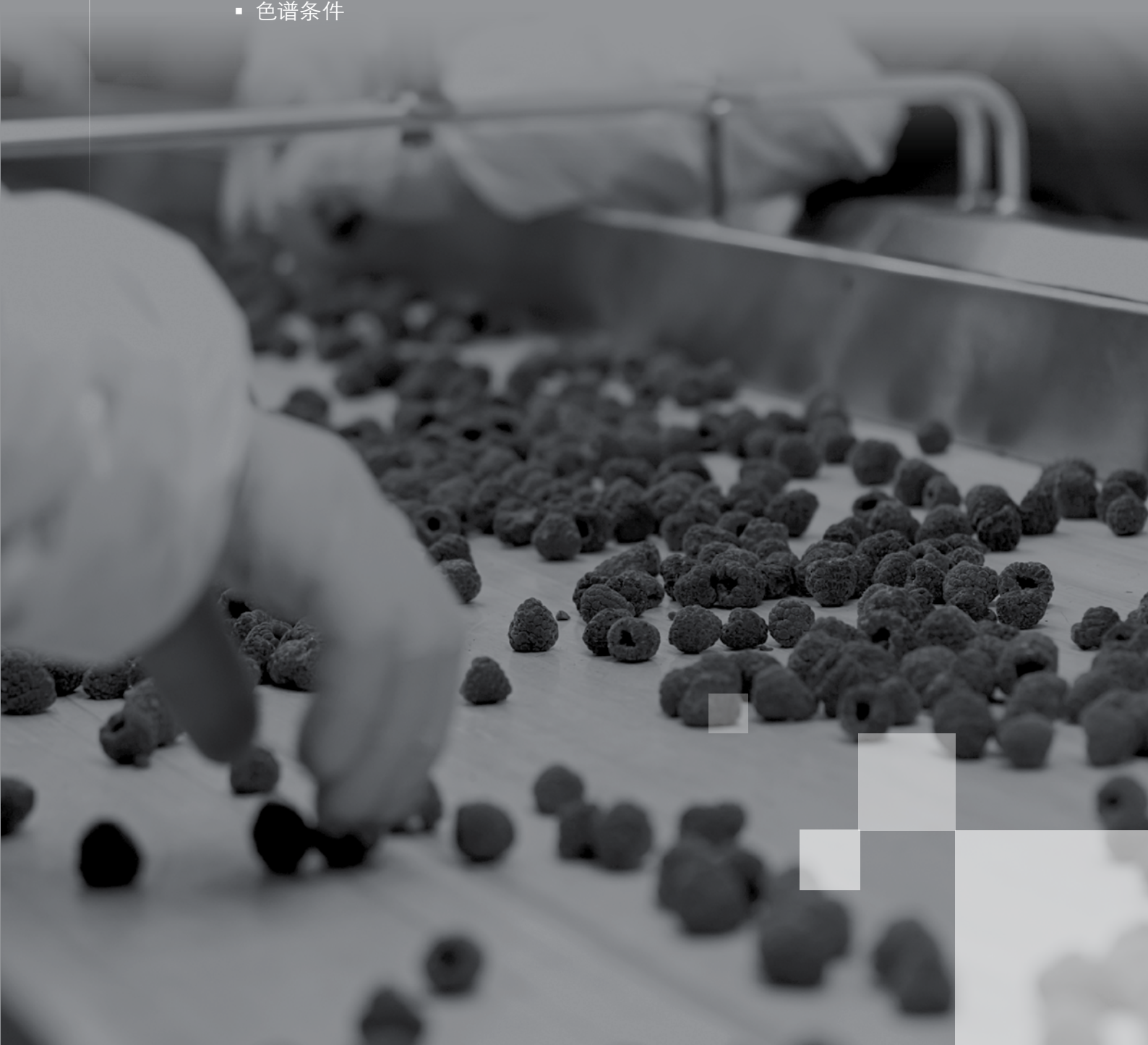


食品测试和质量控制(QC)

本章中的方法可用于简单QC测试或检测掺伪产品。

这些方法涉及:

- 样品提取
- 样品制备
- 色谱条件



样品制备

一般性样品：准确称取2 g试样于离心管中，加水25 mL，涡旋混匀后于50 ℃水浴超声20 min。冷却至室温后加亚铁氰化钾溶液2 mL和乙酸锌溶液2 mL，涡旋混匀后于8000 r/min离心5 min，将水相转移至50 mL容量瓶中，残渣加水20 mL溶解，涡旋后超声5 min，离心后将水相转移至同一容量瓶，用水定容至刻度，混匀。取适量上清液过0.22 μm GHP滤膜，待测定。

高油脂试样：准确称取2 g试样于离心管中，加正己烷10 mL，于60 ℃水浴加热约5min，并不时轻摇以溶解脂肪，然后加氨水溶液(1+99) 25 mL，乙醇1 mL，涡旋混匀后于50 ℃水浴超声20 min。冷却至室温后加亚铁氰化钾溶液2 mL和乙酸锌溶液2 mL，混匀，于8000 r/min离心5 min，将水相转移至50 mL容量瓶中，残渣加水20 mL，涡旋超声5 min，弃去有机相，水相转移至50 mL容量瓶中，残渣按一般性试样再提取一次后测定。

实验步骤

仪器条件

HPLC条件

LC 系统: Alliance e2695
高效液相色谱仪配2489
双波长紫外检测器

色谱柱: Symmetry Shield RP18,
4.6mm x 150mm, 5μm
(部件号: 186000109)

流动相: A: 水(含有20mM乙酸铵和
0.1%乙酸溶液)
B: 乙腈

梯度洗脱程序:

Time (min)	Flow (mL/min)	A%	B%	Curve
0.0	1.0	95	5	6
2.0	1.0	95	5	6
18	1.0	65	35	6
25	1.0	95	5	1

检测波长: 210nm, 230nm

进样体积: 20 μL

柱温: 30 ℃

洗针液: 甲醇/水(90: 10)溶液

密封清洗液: 甲醇/水(10: 90)溶液

实验结果与讨论

标准品谱图及线性

图1为6种添加剂浓度为5μg/mL的标准品谱图，其中安赛蜜、糖精钠、苯甲酸钠、山梨酸、脱氢乙酸的检测波长为230 nm，阿斯巴甜的检测波长为210nm。

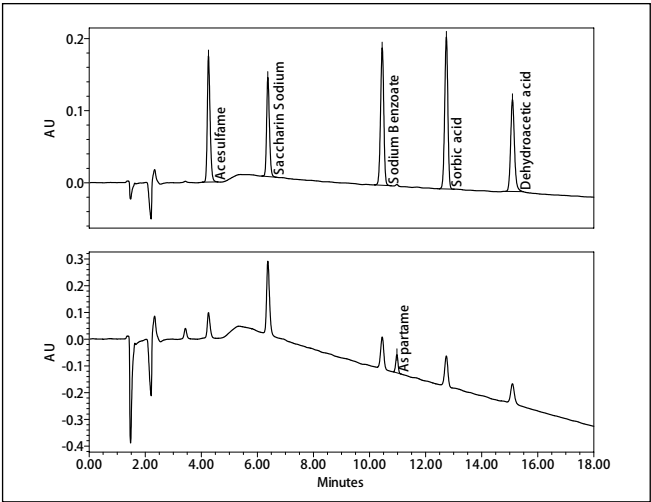


图1. 浓度为5 μg/mL的六种添加剂标准品谱图。

线性范围及保留时间

6种添加剂在1 mg/L - 20 mg/L浓度之间, 相关系数 $R^2 > 0.999$ 。

名称	英文名称	保留时间	校准曲线	R^2
安赛蜜	Asesulfame	4.26	$Y=6.10e+004 X-7.34e+003$	0.999961
糖精钠	Saccharin Sodium	6.37	$Y=4.74e+004 X+1.62e+003$	0.999011
苯甲酸钠	Sodium Benzoate	10.45	$Y=7.59e+004 X-2.14e+003$	0.999979
阿斯巴甜	Aspartame	10.93	$Y=1.98e+004 X-6.44e+003$	0.995155
山梨酸	Sorbic acid	12.74	$Y=8.34e+004 X-4.92e+003$	0.999991
脱氢乙酸	Dehydroacetic acid	15.10	$Y=6.10e+004 X-2.39e+003$	0.999683

样品结果谱图

图2、3为6种不同样品中添加剂的检测结果图。

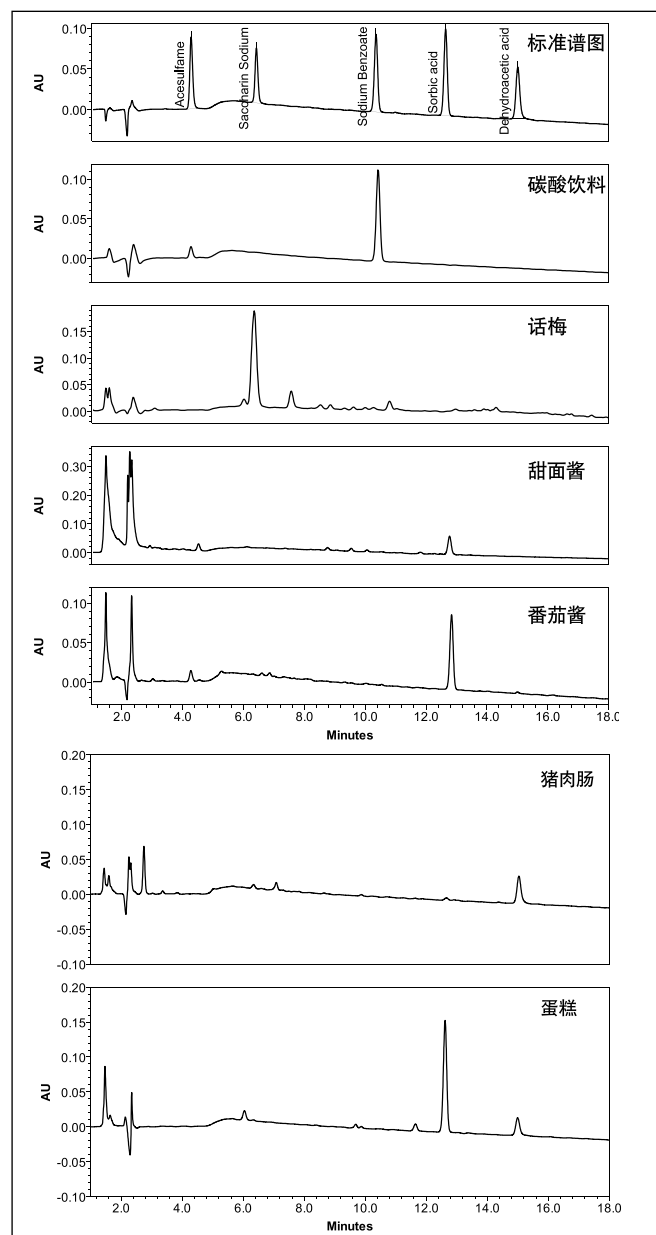


图1. 不同样品在230 nm下五种添加剂的色谱图。

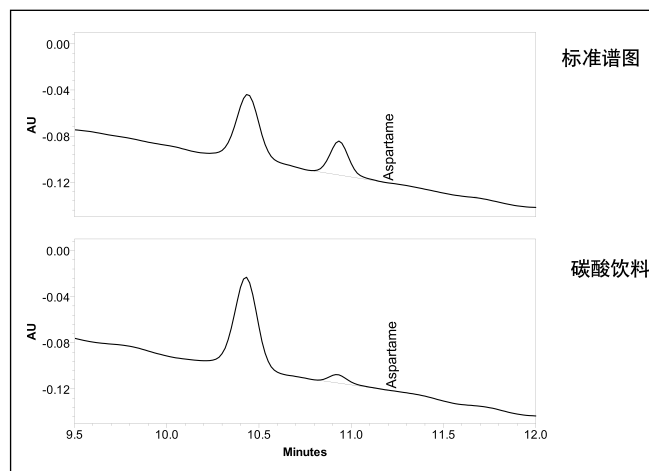


图3. 饮料中阿斯巴甜的色谱图。

结论

国家标准对上述6种添加剂需要四种方法检测(GB 5009.28-2016、GB 5009.121-2016、GB 5009.263-2016和GB 25540-2010), 本方法可以一次进样即可完成6种食品中添加剂的检测; 六种甜味剂的在1 mg/L - 20 mg/L线性范围内, 相关系数 $r^2 > 0.999$; 安赛蜜、糖精钠、苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸方法定量限2 mg/kg, 阿斯巴甜的定量限为10 mg/kg; Symmetry Shield RP18色谱柱嵌入极性官能团, 是一款能够耐受100%水相流动相的色谱柱。所以不仅在高水相流动相实验(如添加剂实验)中具有更长柱寿命, 还能对碱性化合物有更好的峰型。

订购信息

描述

Symmetry Shield RP18, 4.6 x 150 mm, 5 μ m

部件号

186000109

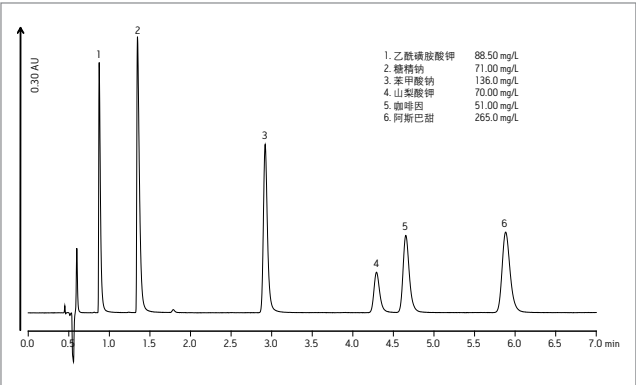
简介

软饮料市场是一项重要的全球业务，为几家主要的制造商带来了可观的利润。要确保产品一致性、满足质量控制要求，对添加剂的准确定量至关重要。常用的六种添加剂包括作为防腐剂的苯甲酸钠和山梨酸钾；乙酰磺胺酸钾；作为甜味剂的阿斯巴甜和糖精(减肥饮料)；以及咖啡因。在各种饮料中，可能仅含有部分上述化合物，也可能全部包含，具体取决于特定饮料的配方。

LC条件

- 系统：ACQUITY UPLC H-Class
- 运行时间：7.0 min
- 色谱柱：ACQUITY UPLC BEH Phenyl, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm
- 柱温：35 °C
- 流动相：沃特世饮料流动相(包含在试剂盒内)
- 流速：0.5 mL/min
- 进样体积：1 μL
- 检测条件：UV 214 nm

结果



标准品的色谱图。

分析物	保留时间(min)	%RSD RT	理论量	测定量	%RSD 含量	偏差%
乙酰磺胺酸钾	0.87	0.04	88.5	89.0	0.24	0.56
糖精钠	1.35	0.03	71.0	71.3	0.21	0.42
苯甲酸钠	2.92	0.01	136.0	136.3	0.28	0.22
山梨酸钾	4.30	0.01	70.0	70.7	0.32	1.00
咖啡因	4.67	0.01	51.0	51.3	0.30	0.59
阿斯巴甜	5.90	0.01	265.0	265.4	0.42	0.15

QC 标准品七次进样的重现性数据。

订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC BEH Phenyl, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm	186004869
沃特世饮料分析试剂盒	WAT200512

参考资料: 沃特世应用资料720004016EN
©2010年沃特世公司。Waters和ACQUITY UPLC是沃特世公司的注册商标。

简介

人工合成着色剂因其色彩亮丽、性质稳定、价格低廉，成为食品工业常用的添加剂之一，它们通常以苯、甲苯、萘等化工原料合成，长期食用对人体健康具有一定毒性。

我国规定允许使用的人工合成色素有11种。国标GB/T 21916-2008和GB/T5009.35-2016只检测了9种色素，本文实现了10种着色剂的同时检测。



Waters Symmetry 色谱柱

应用优势

利用Oasis® WAX小柱可以同时进行10种合成着色剂的净化，相较于国标方法更简单、快速、高效；该方案能够同时检测食品中常用的10种合成着色剂，并可以将新红和柠檬黄达到极好的分离；合成着色剂对很多类型的过滤膜都比较敏感，尤其是赤藓红。本应用用PTFE的滤膜成功解决了这个问题。

前处理方法

提取：

液体样品(饮料、酒等)：取样品10mL(含二氧化碳样品加热或超声驱除二氧化碳)，pH调节至6后，待OASIS WAX小柱(6cc, 150 mg, 部件号186002493)净化。

固体样品(肉)：取样品1 g，加8 mL的80 °C热水，振荡提取10 min，在4000 rpm下离心5 min，收集上清液，剩余固体样品加入2 mL的1%氨水乙醇溶液，振荡提取10 min，在4000 rpm下离心5 min，合并两次上清液，pH调节至6后，待OASISWAX小柱(6 cc, 150 mg, 部件号186002493)净化。

净化：

先将OASIS WAX小柱分别用5 mL甲醇和5 mL超纯水进行活化。取10 mL待净化的样品溶液过柱，弃去滤液。再分别用5 mL超纯水和5 mL甲醇溶液清洗OASISWAX小柱。最后用5 mL 5%氨化甲醇溶剂洗脱SPE小柱，收集洗脱液，在50 °C水浴下，氮气吹干后，用1 mL的5%甲醇水溶液复溶，过0.45 μm PTFE滤膜(部件号：WAT200536)过滤，待HPLC上机分析。

实验步骤

仪器条件

高效液相色谱条件

液相系统： Alliance e2695 配光电二极管阵列检测器2998

柱温： 30 °C

进样量： 20 μL

流速： 1.0 mL/min

流动相 A： 含有20 mM乙酸铵的水溶液

流动相 B： 甲醇

色谱柱： Symmetry C18, 4.6 x 150 mm, 5 μm (货号：WAT045905)

检测波长： 254nm

梯度：

Time (min)	Flow (mL/min)	A%	B%	Curve
0.0	1.0	90	10	6
5.0	1.0	90	10	6
10.0	1.0	75	25	6
15.0	1.0	55	45	6
20.0	1.0	2	98	6
25.0	1.0	2	98	6
35.0	1.0	90	10	1

实验结果

标准溶液谱图

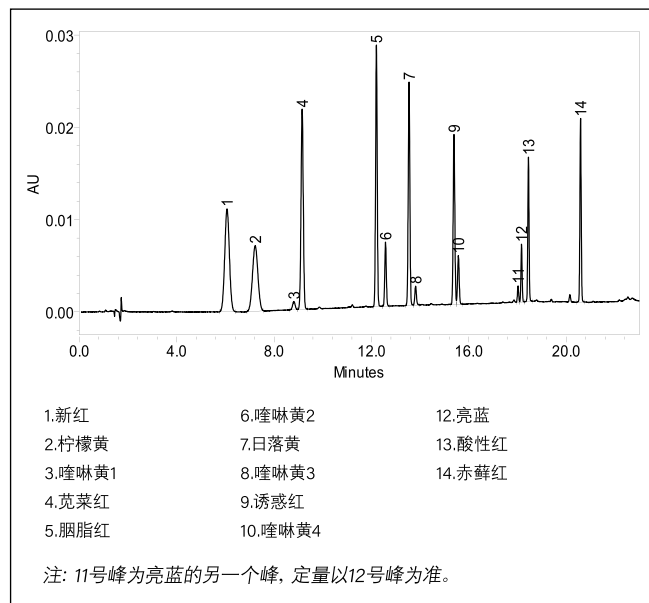


图1. 10种色素混标在254 nm下的色谱图(浓度为5 μg/mL)。

标准工作曲线

10种合成色素在0.5 mg/L - 10 mg/L浓度之间，相关系数 $R^2>0.999$ 。

名称	英文名称	保留时间	线性方程	相关系数 R^2
新红	New red	6.07	$Y = 3.03e+004 X - 2.89e+003$	0.999874
柠檬黄	Tartrazine	7.22	$Y = 2.28e+004 X - 4.53e+003$	0.999871
苋菜红	Amaranth	9.15	$Y = 2.74e+004 X - 1.38e+003$	0.999891
胭脂红	Ponceau 4R	12.20	$Y = 2.70e+004 X - 8.31e+002$	0.999883
喹啉黄2	Quinolone yellow	12.58	$Y = 5.96e+003 X - 227e+002$	0.999003
日落黄	Sunset yellow FCF	13.54	$Y = 2.27e+004 X - 2.20e+002$	0.999862
诱惑红	Allura res AC	15.39	$Y = 1.67e+004 X - 2.13e+002$	0.999847
亮蓝	Brilliant blue FCF	18.16	$Y = 4.57e+003 X - 1.95e+003$	0.999994
酸性红	Carmosine	18.45	$Y = 1.11e+004 X + 1.99e+003$	0.999419
赤藓红	Erythroseine	20.59	$Y = 3.26e+003 X + 1.67e+003$	0.999985

表1. 10中色素的保留时间，线性方程和相关系数 R^2 。

样品分离谱图

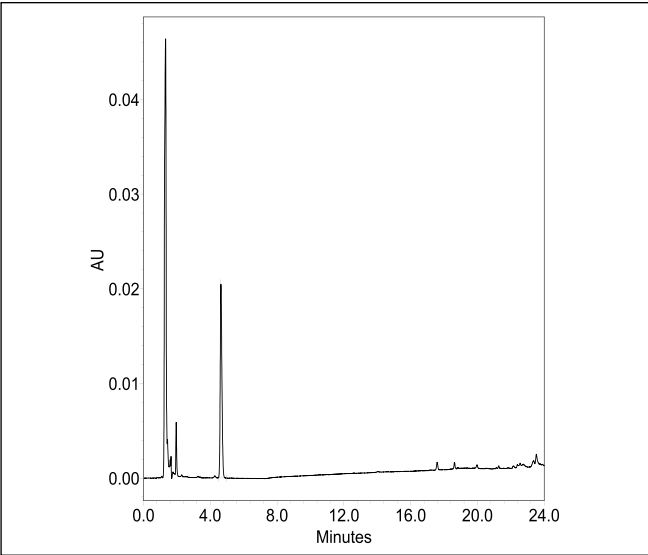


图2. 碳酸饮料的色谱图。

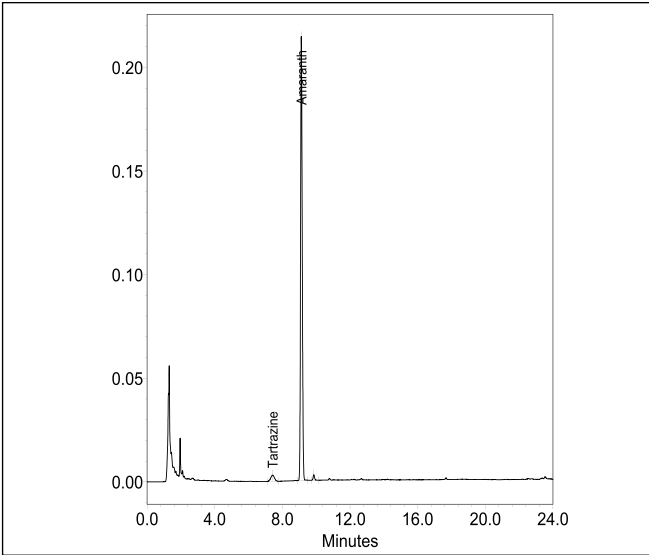


图4. 红酒的色谱图。

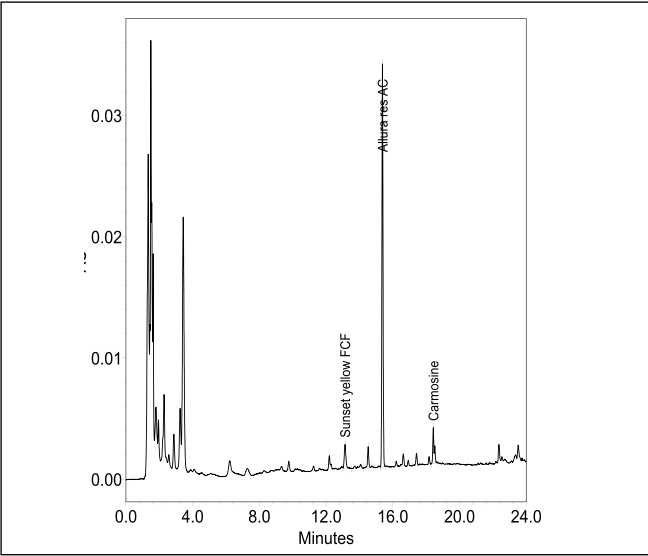


图2. 熏肠的色谱图。

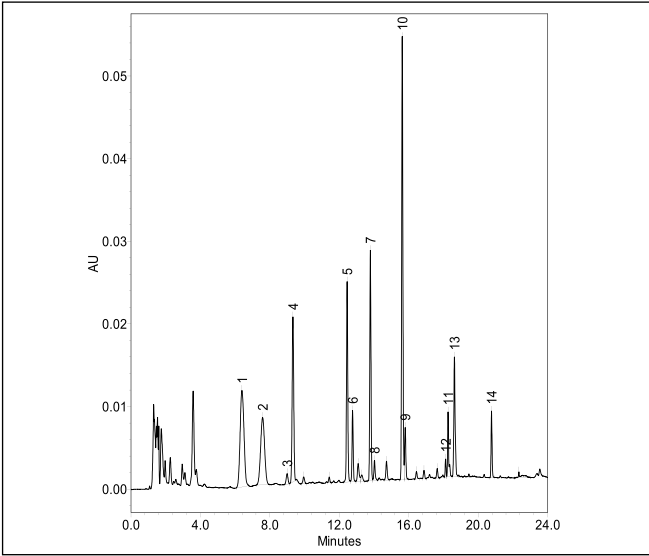


图5. 熏肠在10mg/kg添加浓度的色谱图。

回收率结果

下表是10种着色剂三种添加浓度下，不同样品的回收率结果。

名称	0.5 mg/L		2 mg/L		5 mg/L	
	回收率 %	RSD% n=3	回收率 %	RSD% n=3	回收率 %	RSD% n=3
新红	87.6	5.4	88.2	1.6	88.7	2.5
柠檬黄	92.0	5.1	87.8	1.8	97.6	5.8
苋菜红	77.5	3.8	86.6	2.4	87.3	6.2
胭脂红	67.4	4.0	73.2	6.1	76.1	4.8
喹啉黄2	100.2	2.4	89.4	1.2	93.2	4.4
日落黄	90.4	6.5	88.2	1.8	88.6	5.6
诱惑红	89.6	6.3	88.5	2.7	88.0	3.4
亮蓝	88.8	2.4	88.5	2.5	87.0	5.0
酸性红	86.3	7.3	83.6	2.3	81.0	3.6
赤藓红	46.2	7.4	50.1	5.9	51.4	5.6

表2. 碳酸饮料在不同添加浓度的回收率。

名称	2 mg/L		5 mg/L		10 mg/L	
	回收率 %	RSD% n=3	回收率 %	RSD% n=3	回收率 %	RSD% n=3
新红	75.4	2.6	75.0	4.0	77.5	4.3
柠檬黄	65.8	1.8	74.3	7.4	60.8	5.7
苋菜红	47.2	3.3	74.4	5.2	69.6	2.5
胭脂红	46.1	3.5	64.6	3.0	47.7	5.7
喹啉黄2	65.4	3.8	84.7	7.8	78.8	2.7
日落黄	61.9	3.0	76.8	2.4	80.1	2.2
诱惑红	-	-	-	-	90.1	4.0
亮蓝	69.9	9.2	84.5	1.4	80.6	6.1
酸性红	82.6	2.0	93.9	2.4	85.9	2.3
赤藓红	24.1	1.9	28.5	5.2	24.3	5.4

表3. 熏肠在不同添加浓度的回收率。

名称	1 mg/L		2.5 mg/L		10 mg/L	
	回收率 %	RSD% n=3	回收率 %	RSD% n=3	回收率 %	RSD% n=3
新红	93.3	4.6	96.4	4.5	96.8	5.0
柠檬黄	105.7	5.6	86.5	5.6	100.1	4.8
苋菜红	-	-	-	-	-	-
胭脂红	103.7	4.8	101.9	4.1	100.0	2.9
喹啉黄2	87.9	7.6	102.7	5.7	111.7	6.1
日落黄	97.7	3.8	97.6	3.2	97.0	2.6
诱惑红	98.4	4.0	101.7	3.3	99.1	2.3
亮蓝	95.9	3.8	91.3	4.0	91.1	4.8
酸性红	103.6	3.6	97.3	3.9	94.3	4.8
赤藓红	50.9	4.0	52.9	3.3	51.3	5.1

表4. 红酒在不同添加浓度的回收率。

结论

本方法应用Symmetry C₁₈色谱柱实现了10种色素的同时检测。10种色素达到很好的分离度。食品中喹啉黄在国内尚无相应的检测标准，喹啉黄有四个组分，本方法使用其中一个组分峰进行定量；对于不同基质样品，采用OASIS WAX小柱进行样品净化，选择性好，能够有效去除杂质干扰，除赤藓红回收率偏低以外，其他9种色素在饮料和红酒中的回收率在67.4-111.7%。熏肠样品因基质复杂，加标回收率某些组分偏低；赤藓红为四碘荧光钠盐，易溶于水，其溶解性与溶液的pH有关，样品在最后定容时有红色沉淀产生，因此回收率不高。同时赤藓红在滤膜过滤易产生吸附，故过滤样品溶液时应选择吸附作用小的PTFE的滤膜。

订购信息

描述	部件号
Oasis WAX 6CC /150 mg	186002493
Symmetry C ₁₈ , 4.6 x 150, 5 µm	WAT045905
PTFE滤膜, 0.45 µm	WAT200536

样品制备

取乳粉5.0 g，加水复溶，调节pH至4.6，振荡5 min，完全溶解后用水定容至25 mL，过滤后取清液5 mL，过Oasis® HLB SPE柱利用通过净化方式。

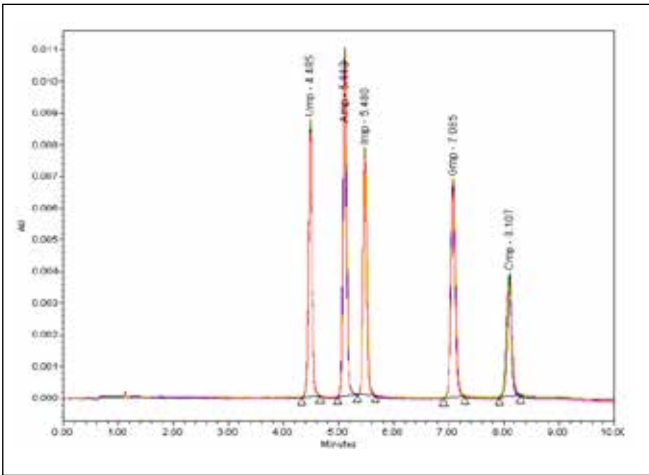
色谱条件

LC系统: ACQUITY UPLC® H-Class System
检测器: PDA
波长: 254 nm
色谱柱: ACQUITY UPLC BEH Amide, 1.7µm, 2.1 x 100 mm
色谱柱温度: 50 °C
流动相A: ACN
流动相B: 10 mM NaH₂PO₄
流动相C: 0.1 % H₃PO₄水溶液

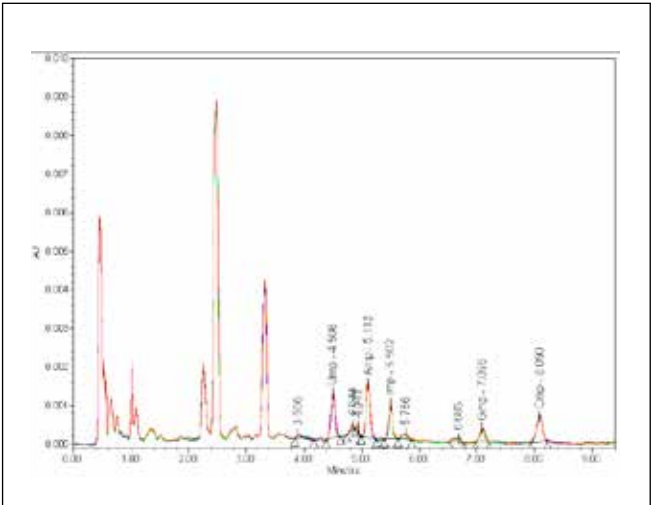
采用AutoBlend™功能，梯度表如下

时间(min)	流速 (mL/min)	A%	B%	C%	梯度曲线
初值	0.5	88.0	7.0	5.0	初值
6.0	0.5	80.0	17.5	2.5	5
8.0	0.5	77.0	22.0	1.0	8
9.0	0.5	65.0	35.0	0.0	6
10.7	0.5	55.0	45.0	0.0	6
10.8	0.5	88.0	7.0	5.0	6
13.0	0.5	88.0	7.0	5.0	6

实验结果及色谱图



5种核苷酸混合标准品的6针连续进样分析结果。



实际样品6针连续进样分析图谱。

小结

本实验采用沃特世ACQUITY UPLC H-Class系统，BEH Amide 1.7 µm，2.1 x 100 mm色谱柱，对婴幼儿奶粉中的5种核苷酸进行分析方法的开发，实验结果表明：

1. 在沃特世ACQUITY UPLC H-Class 系统上，采用BEH Amide 1.7 µm，2.1 x 100 mm色谱柱能迅速分离奶粉中5种核苷酸标准品，且5种化合物的分离度均在3.0以上；对于实际的奶粉样品，5种核苷酸样品及杂质之间的分离度均在1.6以上。
2. 该分析方法重现性好。其中，奶粉样品6次连续进样分析结果中，5种核苷酸保留时间RSD值均小于0.12%。
3. 沃特世ACQUITY UPLC H-Class 系统，具有四元溶剂的Auto-Blend Plus™功能，因此，在该系统上进行方法开发非常灵活、方便，节约了溶剂配置的大量时间，大大提高了实验的效率，从而大幅度的降低了实验的溶剂消耗，降低了实验成本。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB 6 cc/150 mg	186003379
XBridge Amide 3.5 µm, 4.6 x 150 mm	186004869
UPLC BEH Amide 1.7 µm, 2.1 x 100 mm	186004801

简介

沃特世UPLC®氨基酸分析方案将成熟的AccQ-Tag™柱前衍生技术与ACQUITY UPLC®系统合二为一, 可以确保对氨基酸的精准测定。该方法可作为测定婴儿配方奶粉和乳制品中牛磺酸(及其他氨基酸)的一种简单而可靠的解决方案。

样品制备

- 牛乳和婴儿配方奶粉分别按1:25和1:100用0.1 M盐酸稀释。吸取100 mL稀释后的样品, 转移到装有90 mL 6N浓盐酸的水解试管中, 在105 °C条件下水解24小时
- 用移液管准确吸取10 mL水解后的样品, 转移到装有60 mL 硼酸盐缓冲液和10 mL 0.1M氢氧化钠溶液的样品瓶中, 混合均匀。
- 加入20 mL AccQ-Tag试剂, 盖上瓶盖, 混合均匀
- 在55 °C下加热10分钟, 取1 mL反应液进样

色谱条件

- 仪器: 沃特世ACQUITY UPLC系统
- 色谱柱: AccQ-Tag Ultra, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm
- 柱温: 55 °C
- 样品温度: 20 °C
- 流速: 700 μL/min
- 流动相A: AccQ-Tag Ultra 浓缩洗脱液A的1:20倍稀释液
- 流动相B: AccQ-Tag Ultra 洗脱液B
- 进样针冲洗: 弱洗-95:5 水:乙腈
强洗-5:95 水:乙腈
- 梯度洗脱: AccQ-Tag Ultra水解产物(参见UPLC氨基酸分析解决方案指南)
- 总运行时间: 9.5 min
- 进样量: 1 μL
- 检测: 紫外检测(TUV或PDA)260 nm
- 荧光检测: 激发波长266 nm
发射波长473 nm

结果与谱图

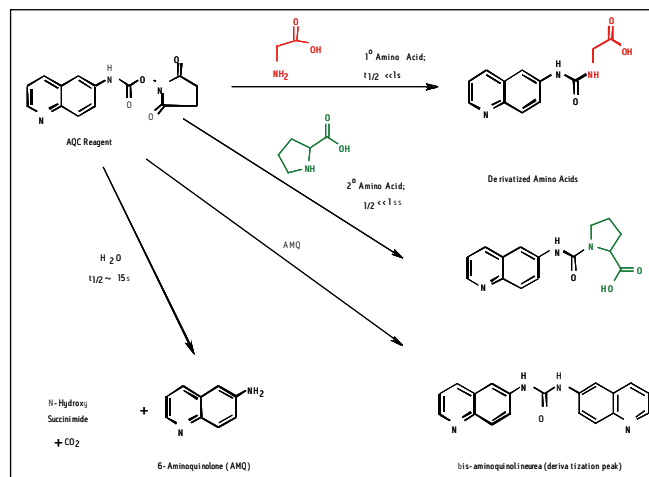


图1. 在AccQ-Tag衍生过程中, AQC试剂可在以水为主的环境中与未质子化的一级氨基酸和二级氨基酸快速反应, 进而形成易被紫外检出的稳定衍生物。多余的试剂可在较慢的时标下与水反应形成易与所分析氨基酸分离开来的副产物。

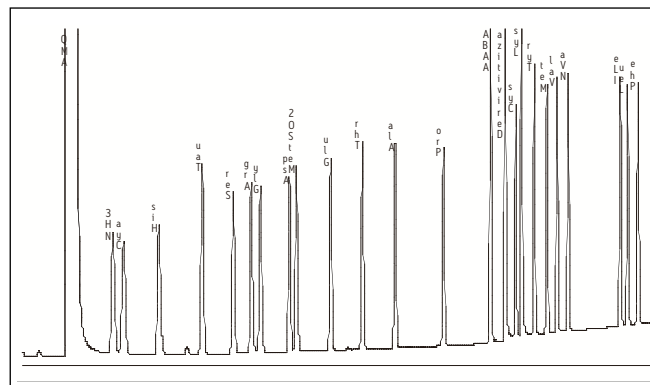


图2. 10 pmol标准品的色谱图。

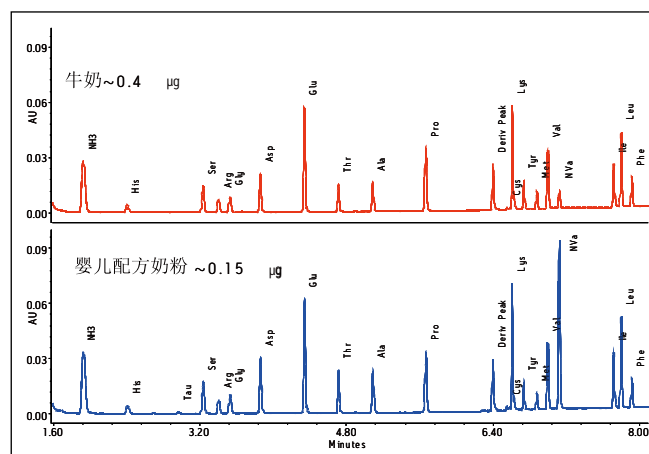


图3. 水解后牛奶和婴儿配方奶粉中的氨基酸分离。对于牛磺酸分析, 不需要对样品进行水解。

订购信息

描述

UPLC氨基酸分析的附加产品套装

部件号

1760901279

样品溶液的制备及衍生

将烟叶在烘箱中恒温40℃烘干至恒重，粉碎，过80目筛，筛下物为实验用烟样粉末。准确称取烟样粉末1.000 g于干燥的洁净试管中，用80%的乙醇水溶液10 mL在室温下超声波提取0.5 h，过滤，滤渣加入10 mL相同体积分数的乙醇再提取一次，滤液合并，倒入732型阳离子交换柱中，用95 mL 4 M/L氨水淋洗，淋洗液于80℃下浓缩至干，再用3 mL 0.1 M/L稀盐酸溶解，溶液离心分离20 min，用0.45 μm微孔滤膜过滤，滤液中取10 μL按衍生标准法操作。进样量1 μL。

对照品储备液的制备

1 mM/L 色氨酸标准液：称取色氨酸20.4 mg，加超纯水溶解至100 mL。含色氨酸的标定标准：取1支沃特世氨基酸水解液标品，打开后吸取1 mL，放在一支干净的1.5 x 15 cm 试管中，加2.5 mL 色氨酸标准液、6.5 mL 超纯水，旋涡混匀，每支Eppendorf 管分装1 mL 备用。浓度见表2。

名称	名称	分子量	C(mM/L)	C(mg/mL)
1	天门冬氨酸	133.10	0.25	0.03328
2	丝氨酸	105.09	0.25	0.2627
3	谷氨酸	147.13	0.25	0.03678
4	甘氨酸	75.067	0.25	0.01877
5	组氨酸	155.15	0.25	0.03879
6	精氨酸	174.20	0.25	0.04355
7	苏氨酸	119.12	0.25	0.02978
8	丙氨酸	89.093	0.25	0.02227
9	脯氨酸	115.13	0.25	0.02878
10	胱氨酸	240.30	0.125	0.03004
11	酪氨酸	181.19	0.25	0.04530
12	缬氨酸	117.15	0.25	0.02929
13	蛋氨酸	149.21	0.25	0.03730
14	赖氨酸	146.19	0.25	0.03655
15	异亮氨酸	131.17	0.25	0.03279
16	亮氨酸	131.17	0.25	0.03279
17	苯丙氨酸	165.19	0.25	0.04130
18	色氨酸	204.23	0.25	0.0510

表1. 氨基酸使用液浓度。

衍生试剂制备

将烘箱预热至55±1℃，取一瓶衍生剂粉2A，轻轻敲动以确保打开前所有粉在瓶底；移取1 mL稀释液2B至2A瓶中，盖紧瓶盖，旋涡混匀10 s，55℃加热5-10 min使衍生剂粉溶解(加热不得超过10 min)。将溶解后的衍生试剂放入干燥器中，可在室温保存1星期。

衍生标准品

将烘箱预热至55±1℃；用微量进样器吸取10 μL标定标准至一支干净的样品管底部；移取70 μL 硼酸缓冲液至样品管中，短暂旋涡混匀；移取20 μL衍生试剂至样品管中，立即旋涡混匀数秒钟；室温放置1 min；用封口膜封口，55℃加热5 min。

色谱条件

色谱柱：沃特世ACQUITY UPLC® BEH C₁₈, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm
紫外检测波长：248 nm
柱温：55℃

梯度洗脱条件见表1。理论塔板数以谷氨酸计算不低于5000。

时间 (min)	流速 (mL/min)	淋洗液A (%) (V/V)	淋洗液B (%) (V/V)	梯度洗脱曲线
0	0.7	99.9	0.1	6
0.54	0.7	99.9	0.1	7
5.74	0.7	90.9	9.1	6
7.74	0.7	78.8	21.2	6
8.04	0.7	40.0	60.0	6
8.64	0.7	40.0	60.0	6
8.73	0.7	99.9	0.1	6
9.5	0.7	99.9	0.1	6

表2. 梯度洗脱。
淋洗液A：取AccQ•Tag™ Ultra Eluent A 50 mL加入超纯水950 mL。
淋洗液B：取AccQ•Tag Ultra Eluent B

结果

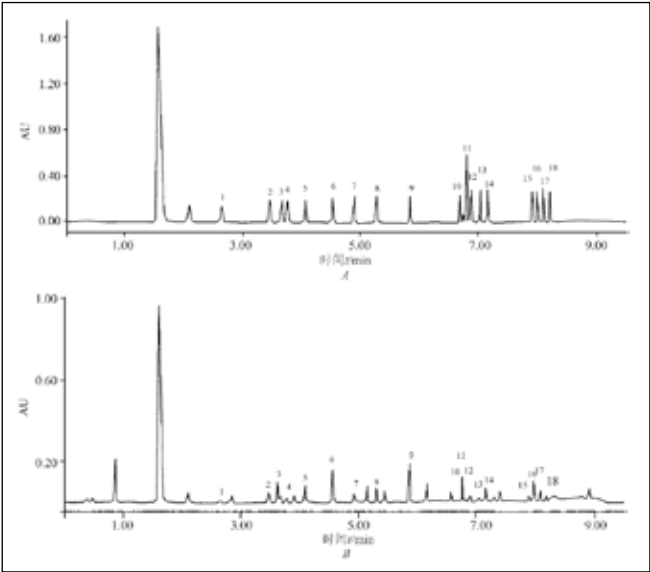


图1. 氨基酸对照品 (A) 和烟叶 (B) UPLC色谱图。

烤烟	组氨酸	丝氨酸	精氨酸	甘氨酸	天冬氨酸	谷氨酸	苏氨酸	丙氨酸	脯氨酸	胱氨酸	赖氨酸	酪氨酸	甲硫氨酸	缬氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	苯丙氨酸	色氨酸	总量
1	0.085	0.128	0.485	0.014	0.128	0.273	0.089	0.101	1.128	0.011	0.418	0.052	0.061	0.112	0.05	0.158	0.241	0.157	3.691
2	0.097	0.157	0.569	0.012	0.206	0.314	0.092	0.102	1.562	0.011	0.334	0.048	0.062	0.102	0.06	0.175	0.334	0.138	4.375
3	0.09	0.134	0.678	0.021	0.135	0.238	0.087	0.118	1.084	0.012	0.329	0.026	0.012	0.141	0.067	0.171	0.128	0.108	3.579
4	0.088	0.152	0.632	0.028	0.178	0.501	0.096	0.109	1.068	0.015	0.336	0.038	0.083	0.139	0.082	0.214	0.139	0.09	3.988
5	0.099	0.157	0.558	0.025	0.210	0.331	0.100	0.117	1.021	0.013	0.365	0.091	0.052	0.128	0.07	0.168	0.15	0.119	3.774
6	0.078	0.181	0.648	0.027	0.201	0.426	0.097	0.112	1.129	0.012	0.320	0.089	0.053	0.135	0.069	0.164	0.241	0.165	4.147
7	0.096	0.154	0.748	0.029	0.188	0.551	0.101	0.098	1.111	0.011	0.401	0.425	0.061	0.143	0.081	0.202	0.234	0.091	4.724
8	0.085	0.167	0.806	0.021	0.176	0.290	0.108	0.111	0.994	0.010	0.476	0.095	0.052	0.131	0.07	0.164	0.351	0.131	4.238
9	0.079	0.182	0.624	0.026	0.199	0.384	0.109	0.105	0.984	0.009	0.485	0.105	0.055	0.135	0.073	0.18	0.173	0.166	4.073
10	0.105	0.207	0.593	0.029	0.175	0.347	0.112	0.121	1.327	0.013	0.423	0.092	0.055	0.154	0.074	0.174	0.201	0.155	4.357
11	0.084	0.169	0.674	0.027	0.134	0.317	0.189	0.134	1.546	0.097	0.442	0.088	0.041	0.151	0.089	0.251	0.218	0.171	4.822

表3. 烟叶中氨基酸的测定结果。

氨基酸	线性方程	相关系数	线性范围 (mg/mL)	检出限 (ng)
组氨酸	$y=2.60 \times 10^6 x$	0.9995	0.0078-0.156	0.02
丝氨酸	$y=3.93 \times 10^6 x$	0.9996	0.0053-0.105	0.02
精氨酸	$y=2.16 \times 10^6 x$	0.9995	0.0038-0.075	0.05
甘氨酸	$y=5.41 \times 10^6 x$	0.9996	0.0053-0.105	0.06
天冬氨酸	$y=3.04 \times 10^6 x$	0.9995	0.0067-0.133	0.21
谷氨酸	$y=2.60 \times 10^6 x$	0.9995	0.0074-0.147	0.38
苏氨酸	$y=3.49 \times 10^6 x$	0.9995	0.0060-0.119	0.03
丙氨酸	$y=4.59 \times 10^6 x$	0.9996	0.0045-0.089	0.02
脯氨酸	$y=3.33 \times 10^6 x$	0.9996	0.0058-0.115	0.04
胱氨酸	$y=5.48 \times 10^6 x$	0.9997	0.0030-0.060	0.27
赖氨酸	$y=4.56 \times 10^6 x$	0.9996	0.0073-0.146	0.25
酪氨酸	$y=2.39 \times 10^6 x$	0.9997	0.0091-0.181	0.07
甲硫氨酸	$y=2.80 \times 10^6 x$	0.9997	0.0077-0.149	0.06
缬氨酸	$y=3.60 \times 10^6 x$	0.9997	0.0059-0.117	0.12
异亮氨酸	$y=3.21 \times 10^6 x$	0.9994	0.0066-0.131	0.13
亮氨酸	$y=3.12 \times 10^6 x$	0.9995	0.0066-0.131	0.15
苯丙氨酸	$y=2.48 \times 10^6 x$	0.9994	0.0083-0.165	0.03
色氨酸	$y=1.93 \times 10^6 x$	0.9994	0.0102-0.204	0.11

表4 氨基酸的检出限及线性范围。

订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7μm, 2.1 x100mm	186002352
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈	186003022
2.1 x 5 mm, 1.7 μm, 3 pcs/pack	186003975
AccQ-Tag Ultra衍生试剂, 可进行250次分析	186003836
AccQ-Tag Ultra洗脱液A (浓缩液), 950 mL	186003838
AccQ-Tag Ultra洗脱液B, 950 mL	186003839
水解氨基酸标样, 10 x 1 mL安瓿管	WAT088122
全回收样品瓶, 100个样品瓶/包	186000384C
或可单独订购AccQ-Tag Ultra ACQUITY UPLC氨基酸分析方法包 (包括AccQ-Tag Ultra试剂包、色谱柱、洗脱液A和B、衍生管、氨基酸标准品、全回收样品瓶)	176001235
或UPLC AAA 应用功能拓展套件 (配合标准ACQUITY UPLC系统用于氨基酸分析、包括包括AccQ-Tag Ultra 试剂包、色谱柱、洗脱液A和B、衍生管、氨基酸标准品、全回收样品瓶、应用手册和所需要的配件)	176001279

简介

氨基酸分析一直在食品和饲料行业中被用于材料或工艺的验证和表征。氨基酸总量以及生长限制性氨基酸的比例是饲料营养价值的关键特征。

样品

作为合作研究的一部分，一家独立实验室对猪饲料、家禽饲料、全豆和大豆粉样品进行了酸解。样品以估计浓度为1.0 mg/mL的0.1 M HCl溶液形式提供，并用氩气密封在安瓿瓶中。分析前将样品储存在-80 °C下。采用的标准品为NIST 2389氨基酸的0.1 mol/L HCl参比溶液，将其稀释为5、100和250 pM/μL。

样品衍生化

在衍生化处理前，先用0.1 M HCl以1:16稀释样品。经过改良后，标准品衍生化方案包括使用0.1 M NaOH中和过量的酸。预柱衍生化处理和条件详见沃特世UPLC®氨基酸分析解决方案系统指南(部件号71500129702)。这些衍生化条件经过改良后涉及额外的碱。

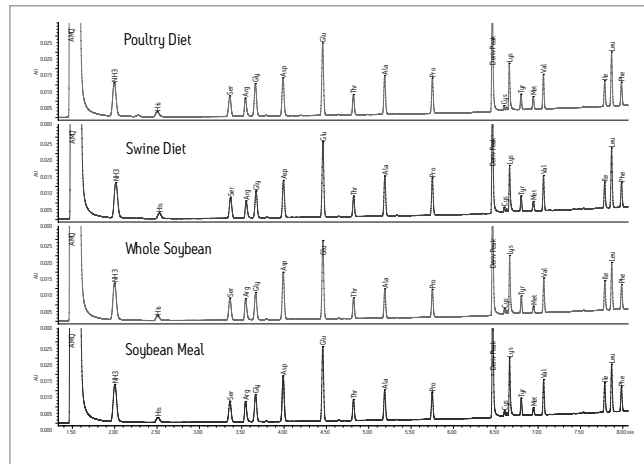
1. 60 μL AccQ•Tag™ Ultra硼酸盐缓冲液
2. 10 μL稀释过的样品
3. 10 μL 0.1 N NaOH
4. 20 μL配置好的AccQ•Tag Ultra衍生试剂

色谱条件

系统: ACQUITY UPLC®
色谱柱: AccQ•Tag Ultra, 1.7 μm, 2.1 x 100 mm
柱温: 55 °C
样品温度: 20 °C
流速: 700 μL/min
流动相A: AccQ•Tag Ultra洗脱液A按1:20稀释于MilliQ®水中(每天新鲜制备)
流动相B: AccQ•Tag Ultra洗脱液B
梯度: AccQ•Tag Ultra水解法(在UPLC氨基酸分析解决方案中提供)
总运行时间: 9.5 min
进样体积: 1 μL, 针溢出的部分定量环进样
检测: UV(TUV), 260 nm

氨基酸	% RSD	氨基酸	% RSD	氨基酸	% RSD
His	1.03	Thr	0.26	Met	0.21
Ser	0.43	Ala	0.27	Val	0.22
Arg	0.60	Pro	0.30	Ile	0.23
Gly	0.39	Cys	0.18	Leu	0.24
Asp	0.24	Lys	0.23	Phe	0.23
Glu	0.23	Tyr	0.17		

五天内水解标准品的保留时间(分钟)重现性。



动物饲料水解产物, 6 ng柱上进样量, 采用UPLC氨基酸分析解决方案。

氨基酸	家禽饲料	猪饲料	全豆	大豆粉	平均值	标准偏差
His	2.513	2.504	2.526	2.534	2.521	0.016
Ser	3.363	3.358	3.370	3.373	3.367	0.008
Arg	3.546	3.544	3.553	3.555	3.551	0.006
Gly	3.665	3.661	3.671	3.673	3.668	0.006
Asp	3.990	3.987	3.995	3.997	3.993	0.005
Glu	4.457	4.455	4.461	4.462	4.459	0.004
Thr	4.820	4.819	4.823	4.823	4.822	0.002
Ala	5.189	5.187	5.190	5.191	5.189	0.002
Pro	5.752	5.751	5.750	5.751	5.751	0.001
Cys	6.599	6.601	6.602	6.603	6.602	0.001
Lys	6.661	6.663	6.662	6.663	6.663	0.001
Tyr	6.799	6.800	6.801	6.801	6.801	0.001
Met	6.944	6.945	6.945	6.945	6.945	0.000
Val	7.064	7.065	7.064	7.066	7.065	0.001
Ile	7.787	7.788	7.787	7.787	7.787	0.001
Leu	7.868	7.869	7.868	7.869	7.869	0.001
Phe	7.985	7.985	7.985	7.986	7.985	0.001

来自一个分析日的不同样品类型的保留时间重新性(分钟)。每个报告值代表了十五次进样的平均值。

订购信息

描述	部件号
氨基酸分析试剂盒	176001235
AccQ•Tag Ultra色谱柱, 1.7 μm, 2.1 x 100 mm	186003837
氨基酸标准品, 水解产物, 10 x 1 mL安瓿瓶	WAT088122
LCMS认证样品瓶	600000751CV

参考资料: 沃特世应用资料720002804EN

©2011年沃特世公司。Waters、UPLC和ACQUITY UPLC是沃特世公司的注册商标。AccQ•Tag是沃特世公司的商标。

样品处理

起始大麦麦芽

- 1. 二棱浅色麦芽; 六棱浅色麦芽; 二棱皮尔斯尼麦芽
- 2. 从麦芽的早期悬液中采集样品, 并在分析前储存于-80 °C下。
- 3. 将每份样品解冻后, 在16110 RCF x g下离心一分钟, 然后用0.1 M HCl按1:10稀释上清液。
- 4. 衍生化体积: 70 µL 硼酸盐缓冲液, 10 µL 稀释样品, 20 µL AccQ•Tag™ Ultra试剂

酿造发酵

- 1. 样品: 初始、24小时、第4天和一级发酵结束
- 2. 在一级发酵期间以一定间隔从发酵罐采集样品, 分析前将样品储存于-80 °C下。
- 3. 将每份样品解冻后, 在16110 RCF x g下离心一分钟, 然后用0.1 M HCl按1:10稀释上清液。
- 4. 衍生化体积: 70 µL 硼酸盐缓冲液, 10 µL 稀释样品, 20 µL AccQ•Tag Ultra试剂

市售淡色麦芽

- 1. 两种品牌的淡色麦芽分别取两个批次
- 2. 12 oz.瓶中采集样品, 并在分析前储存于-80 °C下。
- 3. 将每份样品解冻后, 在16110 RCF x g下离心一分钟, 然后用0.1 M HCl按1:10稀释上清液。
- 4. 衍生化体积: 50 µL 硼酸盐缓冲液, 10 µL 稀释样品, 20 µL 0.1 M NaOH (用于中和过量的酸)
- 5. 20 µL AccQ•Tag Ultra试剂

样品衍生化

衍生化试剂在最佳PH值8.5下与伯胺和仲胺反应。在瓶盖盖紧的情况下, 批次衍生化样品可在室温下最多稳定保存一周。沃特世 UPLC 氨基酸分析解决方案系统指南(部件号71500129702)详细介绍了柱前衍生化和分析的条件。

LC条件

系统:	ACQUITY UPLC®
色谱柱:	AccQ•Tag Ultra, 1.7 µm, 2.1 × 100 mm
柱温:	60 °C
样品温度:	20 °C
流速:	700 µL/min
流动相A:	AccQ•Tag Ultra洗脱液A按1:10稀释于Milli-Q水中
流动相B:	AccQ•Tag Ultra洗脱液B
弱洗针液:	95:5水/乙腈
强洗针液:	5:95水/乙腈
梯度:	AccQ•Tag Ultra细胞培养液法(在UPLC氨基酸分析解决方案中提供)
总运行时间:	9.5 min
进样体积:	1 µL, 针溢出的部分定量环进样
检测:	UV(TUV), 260 nm

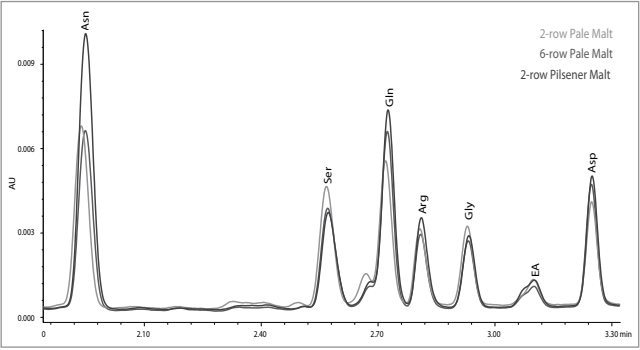


图1. 不同起始大麦麦芽之间的氨基酸差异。

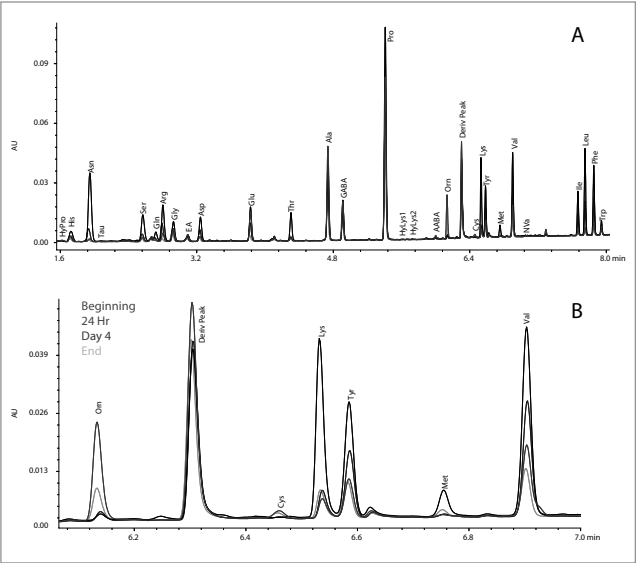


图2. (A)采用UPLC氨基酸分析解决方案, 啤酒一级发酵过程中不同阶段的氨基酸水平。(B)放大区域显示了发酵过程中呈时间依赖性的变化。

简介

食品和饮料掺假是一个非常严重的问题,它涉及多种不同的食用产品。本研究使用超高效液相色谱(UPLC®)分析了菠萝汁样品,该分析方法可实现高分辨率分离、光电二极管阵列(PDA)检测和精确质量数MS和MS/MS。通过多变量分析(MVA)和数据库检索对数据进行解析,以便发现真正的菠萝汁与掺假菠萝汁之间的关键差异。

前处理

在分析前,使用配有PDA检测器的沃特世 ACQUITY UPLC®系统,并与Xevo® G2四极杆飞行时间质谱仪(QToF MS)联用,将所有菠萝样品离心、过滤和稀释。

色谱条件

系统:	ACQUITY UPLC		
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 \times 100 mm		
柱温:	45 $^{\circ}$ C		
进样体积:	3 μ L		
流速:	0.4 mL/min		
流动相A:	10 mM醋酸铵水溶液		
流动相B:	乙腈		
梯度:	时间 (min)	%A	%B
	0.00	99	1
	0.75	99	1
	2.00	95	5
	3.00	95	5
	6.50	45	55
	8.50	10	90
	9.00	10	90
	9.10	99	1

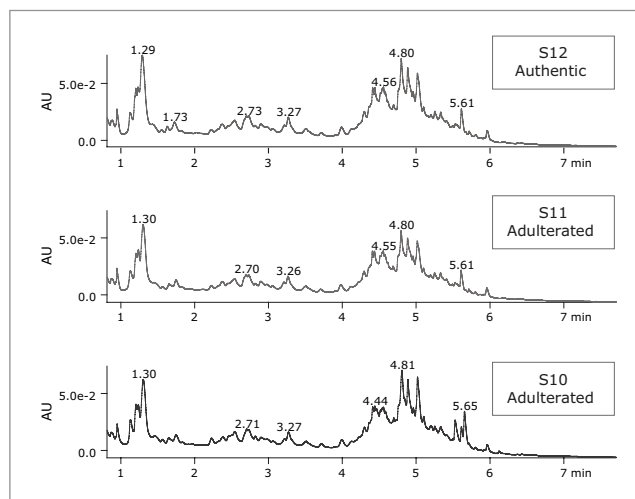
UV条件

UV系统:	ACQUITY® PDA检测器
范围:	210-500 nm
采样速率:	20点/秒

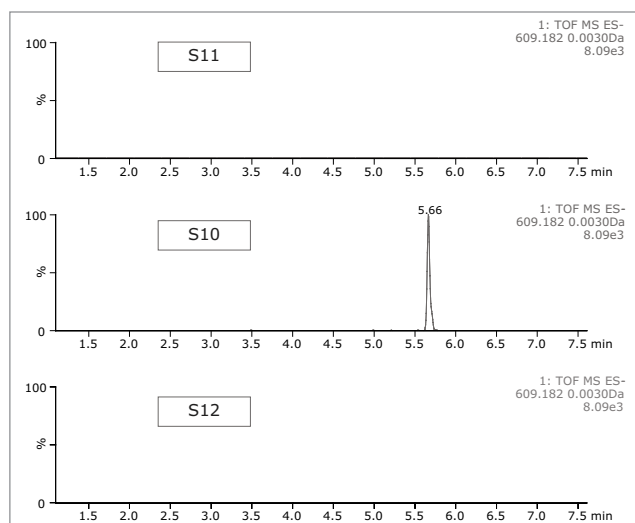
质谱条件

MS系统:	Xevo G2 QToF MS
电离模式:	电喷雾负离子(ESI-)

结果



三种菠萝汁的UV对比(提取波长-283 nm): S10、S11和S12(正品)。



S10、S11和S12中m/z 609.1816(橙皮苷)的提取离子色谱图(XIC)。

订购信息

描述

ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 \times 100 mm

部件号

186003539

参考资料: 沃特世应用资料720004193EN

2012年沃特世公司。Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY、UPLC和Xevo是沃特世公司的注册商标。

样品制备

标准溶液: 使用黄豆苷(25 ppm)、黄豆黄苷(25 ppm)、染料木苷(15 ppm)、黄豆苷原(25 ppm)、黄豆黄素(25 ppm)和染料木素(15 ppm), 用10:90乙腈/水稀释剂制备。备选标准参比物质来自美国国家标准技术研究所。称量每份样品, 放入12 mL离心管中(表1)。在每根离心管中, 加入4 mL 80:20甲醇/水, 然后超声处理1小时。在3000 rpm下离心2分钟。从每根离心管中取2 mL上清液, 并用0.45 μ m GHP注射式过滤器过滤, 再进行分析。每根离心管中剩余的样品用150 μ L 2N氢氧化钠水解。混合10分钟后, 用50 μ L冰醋酸中和溶液。在3000 rpm下再次将样品离心5分钟, 将收集到的上清液在分析前用0.45 μ m GHP注射式过滤器过滤。

样品	重量
大豆粉 (cSRM)	104.2 mg
大豆片 (cSRM)	111.9 mg
大豆蛋白分离物 (cSRM)	365.6 mg
大豆浓缩蛋白 (cSRM)	973.7 mg
大豆蛋白婴儿配方奶粉 (市售)	1119.2 mg

表1. 用于分析的样品。

色谱条件

系统: 配有PDA检测器的ACQUITY® SQD
色谱柱: ACQUITY UPLC® HSS Cyano, 1.8 μ m, 2.1 \times 50 mm
流动相A: 0.1%甲酸水溶液
流动相B: 0.1%甲酸的乙腈溶液
柱温: 30 $^{\circ}$ C
梯度: 流动相B在10%保持0.36 min, 在3.6 min内从10%增加至30%, 在30%下保持0.36 min, 每次进样之间以10%重新平衡系统1.8 min
流速: 0.58 mL/min
检测条件: UV 260 nm
进样体积: 3 μ L
强洗针液: 50:50乙腈/水
弱洗针液: 10:90乙腈/水

这些UPLC条件是使用ACQUITY UPLC方法转换器直接从5 μ m HPLC方法放大而来。对于5 μ m和2.5 μ m, 可使用该计算器将这些条件缩放放回HPLC条件。

质谱条件

MS系统: 沃特世 SQD
电离模式: ESI+
采集范围: 单离子记录(SIR)
毛细管电压: 3.19 kV
锥孔电压: 50 V
脱溶剂气: 600 L/h
锥孔气: 0 L/h
源温度: 100 $^{\circ}$ C
脱溶剂气温度: 350 $^{\circ}$ C

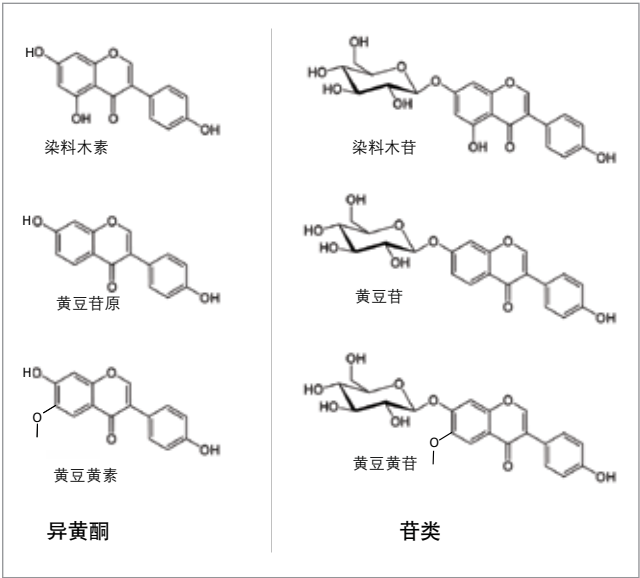


图1. 三种主要大豆异黄酮(染料木素、黄豆苷原、黄豆黄素)及其相应的苷类(染料木苷、黄豆苷、黄豆黄苷)的结构。

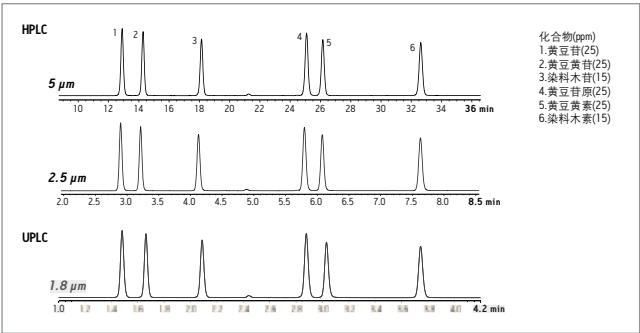


图2. Cyano色谱柱上大豆异黄酮标准品的HPLC和UPLC分离(UV): XSelect® HSS Cyano, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm(上); XSelect HSS Cyano XP, 2.5 μ m, 4.6 \times 75 mm(中); ACQUITY UPLC HSS Cyano, 1.8 μ m, 2.1 \times 50 mm(下)。采用ACQUITY UPLC方法转换器缩放每种方法的梯度、流速和进样体积。流速分别为1.0 mL/min、2.0 mL/min和0.58 mL/min。

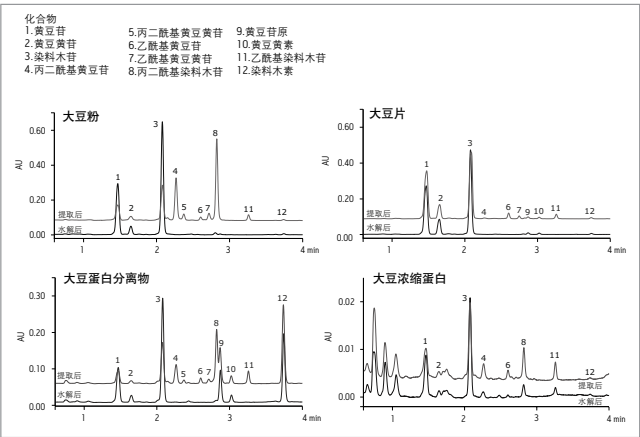


图3. 提取后(上方色谱图)和水解后(下方色谱图)的备选标准参比物质(cSRM)的UPLC分析。

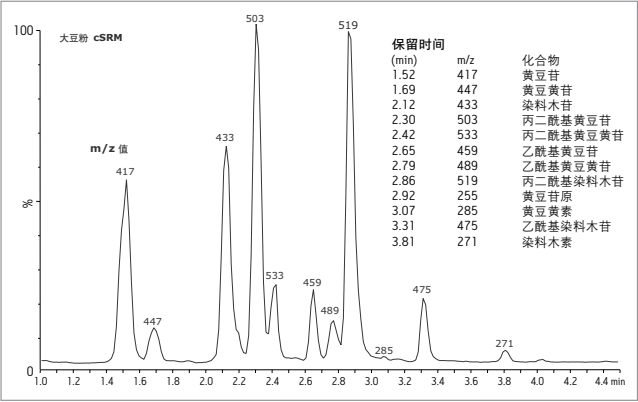


图4. 使用单离子记录(SIR), 经ESI+ LC/MS确认大豆粉cSRM的峰。

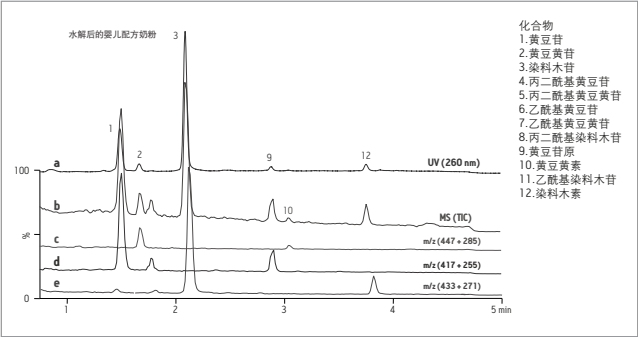


图5. 市售大豆蛋白婴儿配方奶粉(水解后)中异黄酮的UPLC分析; a) UV [260 nm], b) MS—总离子色谱图[TIC], c)提取离子色谱图, m/z 447 + 285 [黄豆苷和黄豆黄素], d)提取离子色谱图, m/z 417 + 255 [黄豆苷和黄豆苷原], e)提取离子色谱图, m/z 433 + 271 [染料木苷和染料木素]。

订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC HSS Cyano, 1.8 µm, 2.1 × 50 mm	186005986
XSelect HSS Cyano XP色谱柱, 2.5 µm, 4.6 × 75 mm	186006194

参考资料: 沃特世应用资料720004193EN

©2013年沃特世公司。Waters、ACQUITY UPLC、UPLC 和 XSelect是沃特世公司的注册商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

简介

配有紫外检测器的沃特世 ACQUITY®超高效液相色谱(UPLC®)提供了一种快速、简单的方法,可利用水/甲醇梯度,在7.5分钟的检测中,同时分析10种水溶性微生素化合物,以及咖啡因和六种常见的食用色素。

色谱条件

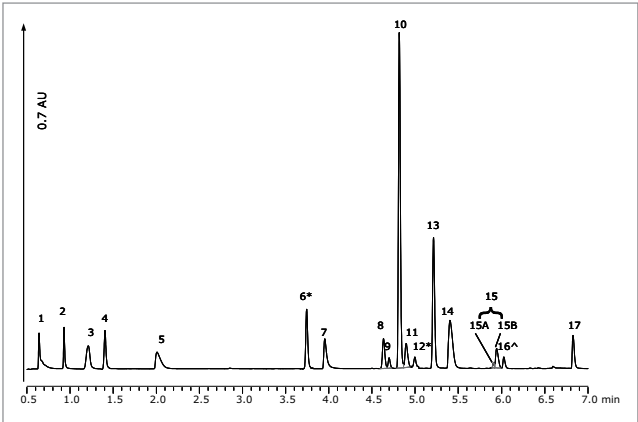
系统: ACQUITY UPLC®
色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 µm, 2.1×100 mm
柱温: 30 °C
样品温度: 4 °C
流速: 0.45 mL/min
流动相A: 水(0.1%甲酸)
流动相B: 甲醇(0.1%甲酸)
弱洗针液: 3:1:1水/甲醇/乙腈(1000 µL)
强洗针液: 5:1:1乙腈/异丙醇/水(500 µL)
梯度运行时间: 7.5 min
进样体积: 2 µL, 满环进样

(min)	A%
0.00	99
1.50	99
1.60	95
3.00	80
5.50	45
5.60	45
5.80	02
7.50	02
7.60	99

PDA条件

检测器: ACQUITY PDA
波长: 630 nm、270 nm和205 nm
分辨率: 1.2 nm
滤波器响应: 0.1 s
采样速率: 20点/秒
曝光时间: 自动

结果



浓度大约为5 ng/µL的溶剂标准品的色谱图。除化合物6、12和16之外,全部在270 nm下提取。*在205 nm下提取。16在630 nm下提取。

化合物编号	化合物名称	保留时间 (min)	紫外提取波长 (nm)
1	硫胺素(B1)	0.64	270
2	抗坏血酸(C)	0.93	270
3	烟酸(B3-OH)	1.21	270
4	烟酸(B3-OH)	1.40	270
5	吡哆醇(B6)	2.01	270
6	泛酸钙(B5)	3.74	205
7	FD&C黄色5号(E102)	3.97	270
8	氰钴胺(B12)	4.63	270
9	叶酸(B9)	4.70	270
10	咖啡因	4.81	270
11	FD&C黄色6号(E110)	4.89	270
12	生物素(B7)	4.99	205
13	核黄素(B2)	5.21	270
14	FD&C红色40号(E129)	5.40	270
15	FD&C绿色3号(E143)	5.94	270
16	FD&C蓝色1号(E133)	6.02	630
17	FD&C蓝色1号(E133)	6.83	270

图1. 色谱图中化合物的鉴定, 以及保留时间和紫外提取波长信息。(水溶性维生素化合物、食用色素等)。

订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱, 1.8 µm, 2.1 × 100 mm	186003539

参考资料: 沃特世应用资料720003188EN
©2013年沃特世公司。Waters、ACQUITY、UPLC和ACQUITY UPLC是沃特世公司的注册商标。

样品制备

- 1. 称取1克经粉碎处理的油炸马铃薯产品，放入离心管中。
- 2. 加入15 mL 2 M的氯化钠溶液和10 µL 丙烯酰胺-D₃内标溶液，涡旋30 min。
- 3. 10000 rpm条件下离心12 min。
- 4. 取1.5 mL上清液进行后续的固相萃取处理。

固相萃取过程

固相萃取柱1(Oasis® HLB 6 cc/200 mg)

活化

A.2 mL 甲醇 B.2 mL 2 M氯化钠

上样

1.5 mL 上清液

清洗

0.8 mL 水

洗脱

3 mL 1 % 甲酸甲醇溶液

固相萃取过程

固相萃取柱2 (Oasis MCX 3 cc/60 mg)

活化

2 mL 甲醇 2 mL 水

- 1. 将Oasis HLB柱的洗脱液全部上样
- 2. 用0.5 mL 甲醇冲洗盛洗脱液的小瓶，上样
- 3. 一起收集

氮气吹干，用0.4 mL 水重新溶解

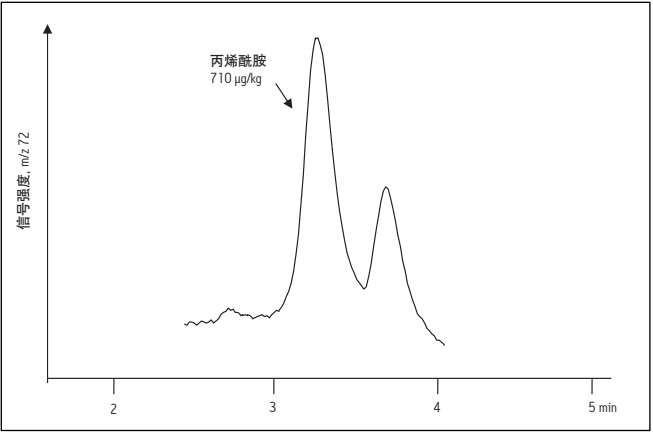
色谱条件

仪器：沃特世Alliance® 2695系统
色谱柱：Atlantis® dC₁₈, 2.1 x 150 mm, 5 µm
流速：0.2 mL/min
流动相：0.1%甲酸水溶液
进样量：20 µL
色谱柱温度：30 °C

质谱条件

仪器：沃特世ZMD质量检测器
电离模式：电喷雾正离子 (ESI⁺)
选择性离子监测 (SIR)
化合物：质量 锥孔电压 (V)
丙烯酰胺 72 20
55 40
丙烯酰胺-D₃ 75 20
58 40

结果



油炸薯条中丙烯酰胺的LC/MS图谱。

添加水平 (µg/kg)	测量结果 (µg/kg)	RSD (%)
100	96	12
200	211	8.7
500	488	5.8
1000	1010	8.0
2000	2000	6.5

*每个添加水平平行分析5个样品。

订购信息

描述	部件号
Atlantis dC ₁₈ , 2.1 x 150 mm, 5 µm	186001301
Oasis HLB, 6 cc/200 mg	WAT106202
Oasis MCX, 3 cc/60 mg	186000254
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

简介

焦糖色素是一种允许使用的着色剂，而以加氨或其铵盐制成的焦糖会产生4-甲基咪唑，4-甲基咪唑是一种能够诱发肿瘤的高水平的化学物质。由于4-甲基咪唑分子极性很大，含量很低，所以如何快速、准确地检测出其含量，就成为人们现阶段研究的重点。

样品前处理

固相萃取SPE解决方案——Oasis® MCX(3 cc/60 mg)小柱净化取3g饮料样品，超声5分钟，后待净化。

活化/平衡
3 mL 甲醇 /3 mL 水
上3 mL样品
清洗 A: 2%甲酸水溶液/B: 100%甲醇
洗脱5%氯化甲醇
氮气挥干
乙腈: 甲醇(9:1)定容
上机分析

UPLC H-Class PDA方法:

色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH HILIC Column, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm
流动相 A:	乙腈
流动相 B:	5 mM 甲酸铵
柱温:	35 °C
检测波长:	215 nm
进样量:	5 μL
运行时间:	3 min
流速:	0.5 mL/min

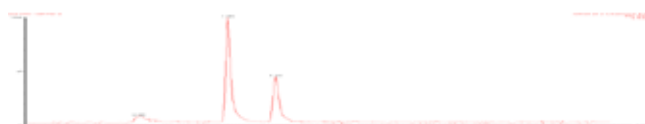
ACQUITY UPLC XEVO TQ MS

超高效液相色谱-串联质谱法:

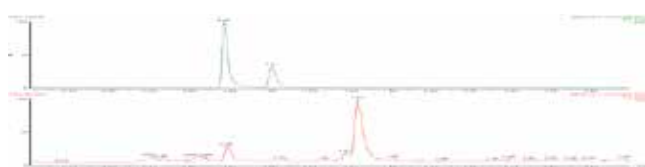
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH HILIC Column, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm
流动相 A:	乙腈
流动相 B:	5 mM 甲酸铵
柱温:	35 °C
进样量:	2 μL
运行时间:	3 min
流速:	0.5 mL/min

目标化合物	检测离子	电离模式	离子对	锥孔电压	碰撞能量
4-甲基咪唑	[M+H] ⁺	ES ⁺	83>56 83>42	38V	14V
2-甲基咪唑	[M+H] ⁺	ES ⁺	83>42 83>56	38V	14V

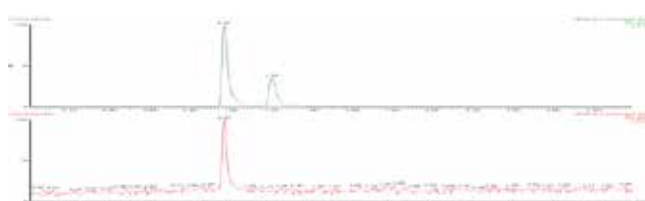
结果



混合标准品TIC。



茶饮料样品加标与空白对比分析。



可乐样品加标与空白对比分析。

结论

采用ACQUITY UPLC H-Class-PDA和沃特世ACQUITY UPLC / Xevo TQ MS可以快速高效地对4-甲基咪唑和2-甲基咪唑的含量进行测定，ACQUITY UPLC H-Class-PDA灵敏度可以达到1 mg/kg，沃特世ACQUITY UPLC / Xevo TQ MS灵敏度可以达到1 μg/kg。应用沃特世的固相萃取SPE解决方案配合Waters® HILIC模式色谱保留，对于大极性的小分子有很好的保留以及分离提取的作用，达到理想净化效果以及色谱分离效果。

订购信息

描述	部件号
BEH HILIC Column, 2.1 x 100 mm 1.7 μm	186003461
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH HILIC, 2.1 x 5 mm, 1.7 μm, 3 pcs/pack	186003980
Oasis MCX 3 cc/60 mg 30 μm, 100/Box	186000254
LC/MS认证样品瓶	600000751CV



违禁添加物和生物毒素分析

食品、保健品或化妆品中违禁添加药物的现象屡禁不止,这些化合物的毒副作用严重影响了人们的身体健康。

加大对这些项目的监管力度,是监管部门及检测部门要面临的问题。

本章内容中介绍了利用最新的仪器设备及色谱技术进行的热点应用。例如: 邻苯二甲酸酯, 三聚氰胺, 黄曲霉毒素等。

解决方案

使用Oasis® PRiME HLB小柱进行通过式净化以去除脂肪和磷脂；通过dSPE(分散SPE)净化去除残留的糖类和其它极性物质。应用上述净化方案可以得到满意的回收率。

实验步骤

QuEChERS提取：取市购小麦粉。称取2 g样品，装入50 mL离心管中。加入10 mL水和10 mL甲酸/乙腈(10:90)溶液，将样品置于自动振荡器中振荡1 h。然后加入QuEChERS盐(用于CEN方法的DisQuE提取盐包，部件号186006813)，用手大力振摇1 min。离心(3200 转/分钟，5 min)后，取出一部分上清液进行净化。

净化：将Oasis PRiME HLB小柱(3 cc, 150 mg, 部件号186008717)安装在预先清洁过且设置为最小真空度(大约2 psi)的真空萃取装置上。无需执行小柱活化步骤。取约0.4 mL上清液，使其通过Oasis PRiME小柱并弃去滤液。然后再取1 mL上清液，再次通过小柱并收集滤液。然后将收集到的流出液转移到含有混合吸附剂的2mL dSPE管(部件号186008081)中。在13500 转/分钟下离心1 min，取500 L上清液，在温和的氮气流中挥干，然后复溶于250 L乙腈/水(15:85)中。

仪器条件

UPLC-MS/MS仪器条件如右侧所示。表1列出了本应用的目标化合物、MRM多反应监测通道和质谱参数。每种真菌毒素使用空白基质配置标准曲线，在6个不同浓度的范围内具有良好的线性关系，相关系数 $R^2 > 0.99$ 。

UPLC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC® I-Class (FTN)
色谱柱:	CORTECS® UPLC T3, 1.6 m, 100 x 2.1 mm
流动相:	A: 含有0.5%甲酸和5 mM甲酸铵的水溶液 B: 含有0.5%甲酸和5 mM甲酸铵的 甲醇/乙腈(50:50)溶液

流动相梯度洗脱程序:

时间	% A	% B
起始	95	5
1	95	5
6	30	70
6.5	5	95
7.5	1	99
9.7	1	99
10	95	5
11	95	5

进样体积:	10 L
柱温:	30 °C
洗针液和样品管理器冲洗液:	1%甲酸, 10 mM柠檬酸的水溶液/ 甲醇/异丙醇/乙腈(1:1:1:1)
密封清洗液:	甲醇/水(10:90)

实验结果

本应用测定了12种毒素在低浓度和高浓度下的回收率。高浓度为欧盟规定的黄曲霉毒素、伏马菌素、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的最高允许浓度，以及T2和HT2毒素的推荐浓度(见图1)。低浓度为高浓度的1/4 (黄曲霉毒素的浓度为0.25 ng/g)。小麦面粉中在低浓度和高浓度加标样品中除玉米赤霉烯酮(回收率在73%)外，所有目标化合物的方法回收率均大于80%。大米和玉米面粉样品的结果与之相当。应用通过式净化或dSPE净化步骤对真菌毒素的损失极小。图1显示了加标浓度为1 ng/g (ppb)黄曲霉毒素的小麦面粉样品的色谱图。图2为Oasis PRiME小柱去除磷脂的效率的比较色谱图；显示了使用Oasis PRiME小柱成功去除了95%以上的磷脂和80%以上的总脂肪。

真菌毒素	保留时间 (min)	MRM通道	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (eV)
脱氧雪腐镰刀菌 烯醇	3.02	297.1 > 249.1	15	15
		297.1 > 231.1	15	18
黄曲霉毒素G2	4.80	331.2 > 245.1	20	25
		331.2 > 257.1	20	30
黄曲霉毒素G1	4.99	329.2 > 283.1	20	25
		329.2 > 243.1	20	35
黄曲霉毒素B2	5.10	315.2 > 259.1	20	33
		315.2 > 287.1	20	30
黄曲霉毒素B1	5.27	313.2 > 241.1	15	40
		313.2 > 285.1	15	28
伏马菌素B1	5.70	722.4 > 334.2	30	40
		722.4 > 352.2	30	35
HT-2毒素	5.72	442.2 > 263.1	20	15
		442.2 > 215.2	20	15
赭曲霉毒素B	6.06	370.1 > 205.1	20	25
		370.1 > 205.2	20	24
T-2毒素	6.30	484.2 > 305.1	25	9
		484.2 > 245.1	25	9
伏马菌素B2	6.47	706.4 > 318.2	35	40
		706.4 > 336.2	35	40
玉米赤霉烯酮	6.57	319.2 > 187.1	15	15
		319.2 > 283.1	15	13
赭曲霉毒素A	6.60	404.2 > 239.1	20	25
		404.2 > 358.2	20	16

表1. 每种目标化合物的MRM通道和质谱条件 (注: HT-2和T-2毒素的MRM监测通道采用其铵加合物; 为了增强响应, 流动相中添加了甲酸铵)。

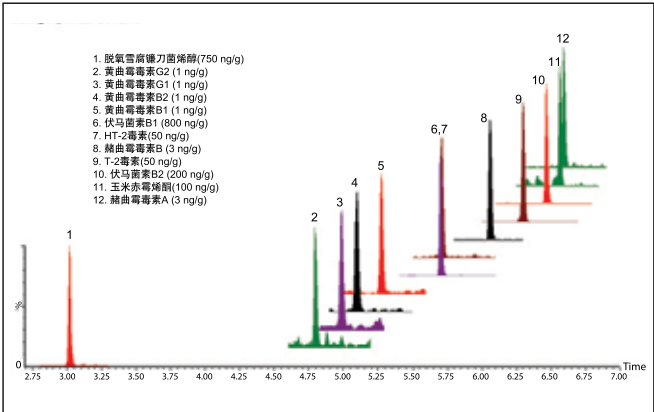


图1. 小麦面粉样品中添加了相应浓度的12种真菌毒素的色谱图。

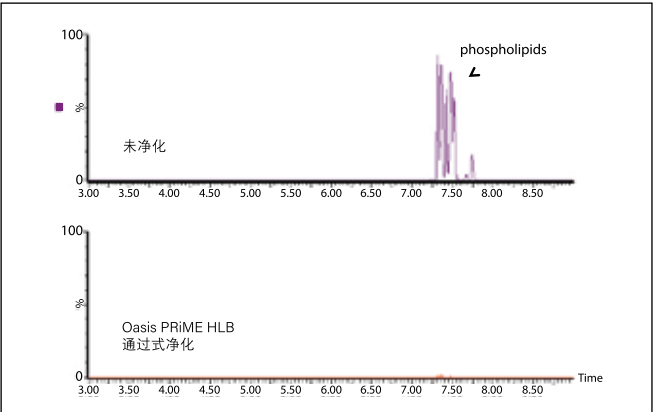


图2. 使用Oasis PRiME HLB进行通过式净化; 几乎完全去除了小麦面粉QuEChERS提取物中的磷脂。

结论

实验证明, 经改良的QuEChERS提取方案能够有效地从小麦、大米和玉米面粉中同时提取出12种真菌毒素; 使用Oasis PRiME HLB小柱进行通过式净化可有效去除QuEChERS提取液中80%以上的脂肪和95%以上的磷脂; 使用混合吸附剂的dSPE净化能有效去除QuEChERS提取液中的极性共提取物; 按本应用进行样品制备, 并使用Xevo TQ-S micro质谱仪进行LC-MS/MS分析, 可满足欧盟法规标准的定量限LOQ的要求。

订购信息

描述	部件号
DisQuE 提取盐包(CEN)	186006813
Oasis PRiME HLB 3CC /150mg	186008717
dSPE净化包	186008081
CORTECS UPLC T3, 2.1x 100mm, 1.6 µm	186008536

简介

黄曲霉毒素由一组由黄曲霉和寄生曲霉真菌所产生的代谢物霉菌毒素组成。它们存在于各种食品中，如谷物、干果、食用香料和乳制品。天然存在的黄曲霉毒素有四种：B1、B2、G1和G2。另有两种，M1和M2，是当奶牛食入受到黄曲霉毒素B类污染的谷物时，所产生的代谢副产物。这些代谢副产物可造成乳制品的污染。国家标准5009.24-2010规定了一种使用液-液萃取和薄层色谱(TLC)测定食品中的黄曲霉毒素M1和B1的方法。

本例介绍了利用免疫亲和柱(Vicam AflaTest净化柱)制备样品，使用配有大流量池的ACQUITY®荧光检测器，对麦片粥、谷物、干果和其它食品中的黄曲霉毒素含量(M1、M2、B1、B2、G1和G2)进行测定的方法。与国家标准相比，本方法可同时分析各种黄曲霉毒素，且分析过程更简单、更快速、更可靠。

样品制备

用混合器将25 g样品， 5 g氯化钠和100 mL 80/20甲醇/水混合液高速混合1分钟
用Whatman槽过滤纸过滤上述混合物(滤液1)
将10 mL滤液1与40 mL水混合，经玻璃纤维滤纸过滤(滤液2)
将10 mL滤液2过柱(Vicam AflaTest WB柱)
用10 mL水(HPLC级)洗柱2次
用1 mL甲醇(HPLC级)洗脱
用1%乙酸水溶液等体积稀释

色谱条件

液相色谱系统:	配备ACQUITY UPLC荧光检测器的沃特世 ACQUITY UPLC H-Class系统
流通池:	大体积荧光流通池(部件编号205000609)
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 柱2.1x100 mm, 1.7 μm(186002352)
柱温:	30 °C
流速:	400 μL/min
流动相:	水/甲醇/乙腈(体积比64:18:18)
进样体积:	20 μL(使用50 μL定量环)
运行时间:	4.0分钟
检测:	荧光
激发波长:	365 nm
反射波长:	429 nm, 适用于M1、M2、B1和B2 455 nm, 适用于G1和G2

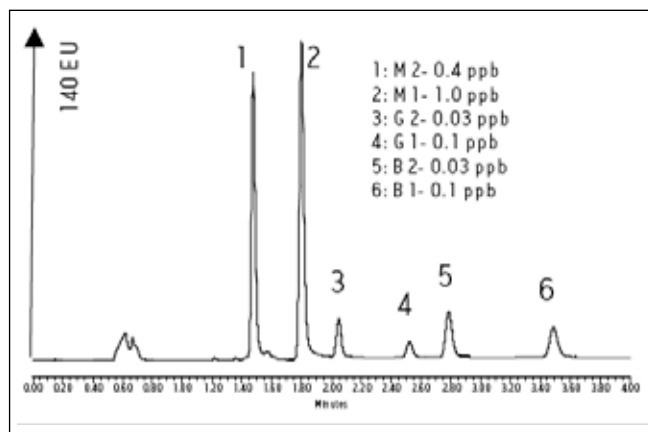


图1. 使用配备大体积流通池的荧光检测器和ACQUITY UPLC H-Class系统得出的黄曲霉毒素标准品混合物的色谱图。

订购信息

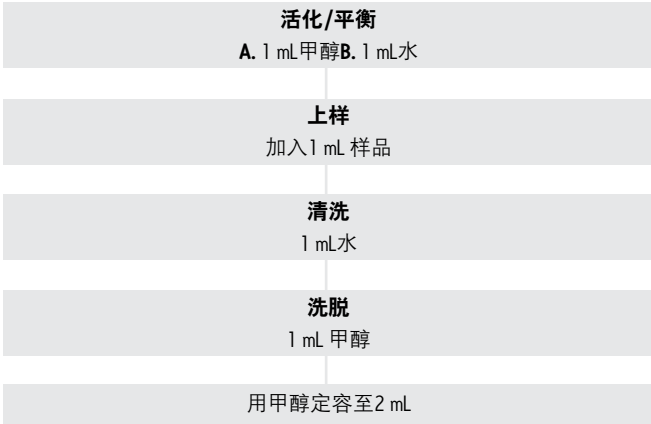
描述	部件号
ACQUITY 荧光检测器(大体积流通池)FLR Large Volume	205000609
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 2.1 x 100 mm, 1.7 μm	186002352
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.7 μm, 3 pcs/pack	186003975
Vicam AflaTest wb Column	G1024
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV
或可直接购买黄曲霉毒素分析方法包: 包括UPLC色谱柱、大体积流通池荧光检测器、免疫亲和柱、分析方法CD及相关的应用文献	
	205000614

花生中的黄曲霉素B1,B2,G1,G2的分析

样品制备

- 1. 称取粉碎过筛(10 目)样品20 g, 加入5 g氯化钠, 30 mL正己烷。
- 2. 准确加入 100 mL 60% 甲醇水溶液, 摇匀。
- 3. 用超声提取30 min。
- 4. 提取后, 用直径15 cm 快速定性滤纸过滤。
- 5. 待静止分层后, 取1 mL 甲醇水溶液净化。

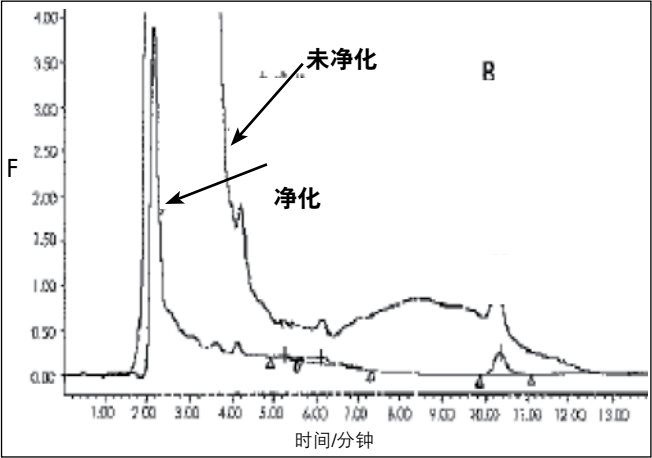
固相萃取过程
(Oasis® HLB 1 cc/30 mg)



色谱条件

- 仪器: 沃特世Alliance® 2695系统, 2475荧光检测器
- 色谱柱: SymmetryShield™ RP₁₈, 4.6 x 150 mm, 5 μm
- 柱温: 30 °C
- 流动相A: 甲醇
- 流动相B: 水35 % A :65 % B, 保持20 min
- 流速: 1 mL/min
- 进样量: 10 μL
- 柱后衍生剂: 用10 mL 甲醇溶解200 mg碘, 待碘完全溶解后, 用纯水稀释至1000 mL,0.45 μm水相滤膜过滤
- 碘的流速: 0.2 mL
- 衍生反应温度: 80 °C
- 激发波长: 365 nm
- 发射波长: 455 nm

结果



样品进入Oasis HLB 小柱后, 基体的干扰比直接进样大大减小。

方法讨论

化合物	回收率	含量 μg/kg
黄曲霉素 G2	101± 7.18	0.11
黄曲霉素 G1	72.8±3.63	0.20
黄曲霉素 B2	97.5±5.48	0.12
黄曲霉素 B1	68.8±5.48	0.24

花生样品黄曲霉素B1, B2, G1, G2 的分析结果N=5。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 1 cc/30 mg	WAT094225
SymmetryShield RP ₁₈ , 4.6 x 150 mm, 5 μm	186000109
SymmetryShield RP ₁₈ 保护柱芯, 3.9 x 20 mm, 5 μm	186000107
Sentry Guard Holder	WAT046910
LC/GC 认证样品瓶	186000307C

简介

国家食品安全标准GB 5413.37-2010规定了四种对婴儿食品和乳品中黄曲霉毒素M1的测定方法。第一法使用免疫亲和柱净化样品，用液相色谱-质谱(LC-MS)对黄曲霉毒素M1进行定量分析。该法适合用沃特世ACQUITY UPLC®系统配TQ质谱仪进行检测。

样品制备

乳样

称取50 g(精确到0.01g)混匀的式样。在水浴中加热到35-37 °C。在6000转/分钟下离心15 min。收集全部上清液，供净化用。

按照免疫亲和柱的使用说明书要求。将50 mL上述提取液以2-3 mL/min稳定的流速过柱。用10 mL水以稳定的流速洗柱。然后，抽干亲和柱。用4 mL乙腈洗脱黄曲霉毒素M1。

然后用氮气缓缓地于30°C下将洗脱液蒸发至近干(如果蒸发至干会损失黄曲霉毒素M1)。用乙腈-水溶液(1+9)稀释至1 mL。

注: 其它样品的制备、如发酵乳、乳粉和粉状婴幼儿配方食品、干酪、奶油等, 请参考食品安全国家标准GB5413.37-2010

GB参考色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 X 100 mm, 1.8 µm
柱温: 35 °C
样品温度: 20 °C
流动相A: 0.1% 甲酸水溶液
流动相B: 乙腈/甲醇(50/50 v/v)
流速: 300 µL / min
进样体积: 10 µL
梯度:

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)	曲线
0	68.0	32.0	
4.20	55.0	45.0	6
5.00	0	100	6
5.70	0	100	1
6.00	68.0	32.0	6

质谱条件

离子化模式: ESI+
MRM 参数
化合物: 黄曲霉毒素M1
MRM1(m/z): 329.0>273.5
碰撞能量(V): 22
MRM2(m/z): 329.0>259.5
碰撞能量(V): 22

标准工作溶液: 黄曲霉毒素M1在空白基质中浓度为0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 ng/mL。

推荐使用: 沃特世ACQUITY UPLC系统配TQ质谱仪。

参考资料

1. 国家食品安全标准: 婴幼儿食品和乳品中黄曲霉毒素M1的测定 (GB5413.37-2010)。
2. Rapid analysis of aflatoxins without derivatization using ultra performance liquid chromatography and fluorescence detection, Waters literature code: 720002644en

订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC HSS T3 column, 2.1x100 mm, 1.8 mm	186003539
Vicam AflaTest wb Column	G1024
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 x 5 mm, 1.8 µm, 3 pcs/pack	186003976
LC/MS认证样品瓶	600000751CV

苹果汁中棒曲霉素(展青霉素)的分析

固相萃取过程

(Oasis® HLB 3 cc/60 mg)

活化/平衡
A.3 mL 甲醇 B.3 mL 水

上样
2.5 mL 苹果汁

清洗1
3 mL 1%的碳酸氢钠水溶液 (1 g/100 mL)

清洗2
1 mL 0.1% 的乙酸水溶液

真空抽干小柱

洗脱
2 x 1.5 mL 10 %乙酸乙酯/叔丁基甲醚溶液

氮气流吹干, 用500 µL水溶解定容

色谱条件

仪器: ACQUITY UPLC®系统
色谱柱: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18
2.1 x 100 mm, 1.7 µm
流速: 0.6 mL/min
流动相A: 含0.1 %氨水的水溶液
流动相B: 含0.1 %氨水的乙腈溶液
梯度:
时间(min) A% B%
0.00 99 1
1.80 99 1
2.30 10 90
2.80 10 90
2.81 99 1
进样量: 20 µL, 满环进样
色谱柱温度: 40 °C
样品温度: 4 °C
检测器: ACQUITY UPLC PDA
检测波长: 276 nm

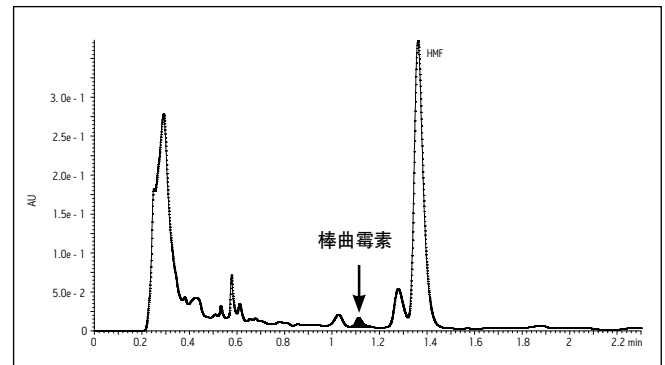
质谱条件

仪器: 沃特世ACQUITY® TQD 检测器
电离模式: 电喷雾负离子 (ESI)
多反应监测 (MRM)

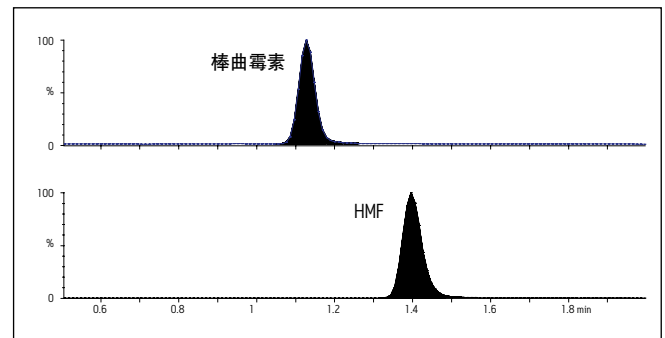
MRM参数

化合物	MRM
棒曲霉素	153 → 109 153 → 81
5-Hydroxymethylfurfural (HMF)	125 → 95

结果



棒曲霉素和HMF浓度水平为50 µg/kg的苹果汁提取液的LC/UV图谱 (276 nm)。



棒曲霉素和HMF浓度水平为50 µg/kg的苹果汁提取液的LC/MS/MS图谱 (MRM)。

浓度水平 (µg/kg)	平均回收率 (RSD%)
5 µg/kg	86.1 % (13.6)
50 µg/kg	95.4 % (5.9)
500 µg/kg	89.9 % (17.5)

*考察用Oasis HLB提取苹果汁中的棒曲霉素的回收率数据, 每个浓度水平平行分析4个样品。

订购信息

描述	部件号
Oasis HLB, 3 cc/60 mg	WAT094226
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 100 mm, 1.7 µm	186002352
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 5 mm, 1.7 µm, 3 pcs/pack	186003975
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

吸取经0.45 μm滤膜过滤的水样10 mL，加入100 μL(浓度为10 μg/L)的脑腈肽内标液，混匀。

固相萃取过程

(Oasis® HLB 3 cc/60 mg)

活化/平衡

A. 3 mL 甲醇 B. 6 mL 水

上样

10 mL 水样 (1 mL/min)

清洗

A. 3 mL 水 B. 5 mL 20% 甲醇

减压抽干1 min

洗脱

5 mL 甲醇

50 °C下氮气吹干

用50 % 甲醇水溶液定容至1 mL

色谱条件

仪器:	沃特世Alliance® 2695系统		
色谱柱:	Symmetry300™ C ₁₈ , 4.6 x 75 mm, 3.5 μm		
柱温:	30 °C		
流动相A:	0.2 %甲酸的水溶液		
流动相B:	0.2 %甲酸的甲醇溶液		
流速:	0.2 mL/min		
进样体积:	10 μL		
梯度:	时间(min)	A%	B%
	0.00	45	55
	12.00	10	90
	12.50	0	100
	15.00	0	100
	15.10	45	55
	25.00	45	55

质谱条件

仪器:	沃特世 Quattro Ultima Pt™
电离模式:	ESI+
锥孔电压:	50 V

分析物	MRM	分子量	[M+H] ⁺	[M+H] ²⁺ 离子	特征碎片离子	停留时间 (s)	碰撞能量 (eV)
脑腈肽	556.1	555.6	556.1 ^a	N.D	278.0 ^b	0.25	23
	278.0				397.1	0.20	20
MCYST-LR	519.9	994.5	995.7	498.4 ^a	135.0 ^b	0.25	11
	135.0				861.5	0.15	10
MCYST-RR	498.4	1037.6	1038.4	519.9 ^a	135.0	0.25	28
	135.0				620.0	0.15	30
MCYST-LW	1025.8	1024.5	1025.8 ^a	N.D	897.1 ^b	0.25	25
	891.7				583.2	0.15	33
MCYST-LF	986.8	985.5	986.8 ^a	N.D	852.5	0.25	20
	852.5				544.0	0.15	30

a 为选择的母离子，b 为定量离子。

结果

分析物	添加浓度 (μg/L)	平均回收率 (%)	RSD(%)
MCYST-RR	0.10	100.0	6.45
	0.20	95.2	4.02
	0.40	90.0	4.35
MCYST-LR	0.02	105.0	5.40
	0.05	96.0	4.53
	0.08	93.8	4.22
MCYST-LW	0.40	103.8	5.30
	1.00	102.7	5.87
	1.60	93.8	5.67
MCYST-LF	0.20	103.0	7.03
	0.50	109.8	5.69
	0.80	102.3	4.57

(n=6)

订购信息

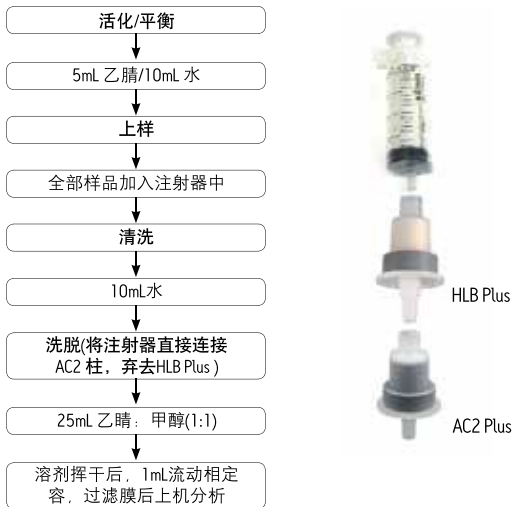
描述	部件号
Oasis HLB, 3 cc/60 mg	WAT094226
Symmetry300™ C ₁₈ , 4.6 x 75 mm, 3.5 μm	186000189
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

针对鸡肉中利巴韦林测定的沃特世整体解决方案

样品处理方法

取2g鸡肉加入20mM乙酸铵(PH=4.5)5mL, 振荡后加入磷酸酯酶酶解(37℃孵育1小时), 加入0.5%三氯乙酸沉淀离心后, 上清液待净化。使用沃特世 Oasis® HLB Plus+ Sep-Pak AC2 Plus, 同时完成利巴韦林富集浓缩和净化的过程。

连接方式如下图



ACQUITY UPLC®/Xevo® TQ-S分析条件

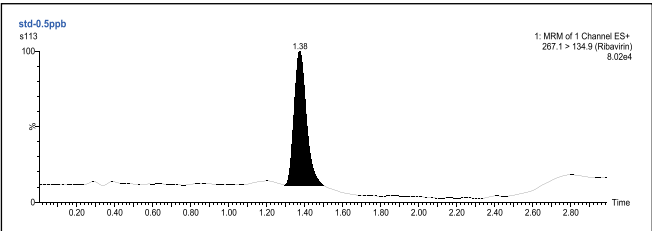
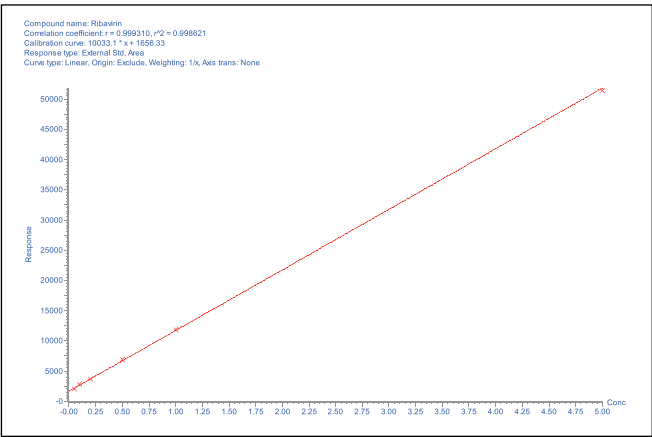
流动相: 乙腈: (10 mM乙酸铵+0.1%甲酸)
色谱柱: BEH Amide 2.1*100 mm 1.7 μm
柱温: 35 °C
进样量: 2 μL

Time(min)	FlowRate	%A	%B	Curve
Initial	0.500	5.0	95.0	Initial
0.50	0.500	5.0	95.0	6
1.20	0.500	23.0	77.0	6
1.80	0.500	50.0	50.0	6
2.00	0.500	50.0	50.0	6
3.00	0.500	5.0	95.0	1

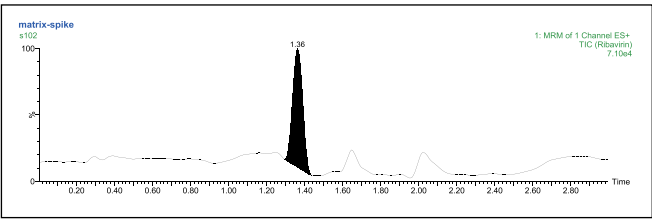
目标化合物	检测离子	电离模式	离子对	锥孔电压	碰撞能量
利巴韦林	[M+Na] ⁺	ES ⁺	267>135 267>155	34	12

实验结果

利巴韦林50ppt-5ppb的范围内, 线性相关系数大于0.9993。



图为利巴韦林标准图谱 浓度0.5ppb



图为利巴韦林基质加标图谱

加标水平	平均回收率% (n=5)	RSD% (n=5)
1 ng/g	87.8	1.44
2 ng/g	93.5	1.37
5 ng/g	94.3	1.22

总结

由于利巴韦林为核苷类结果, 极性非常大, 传统C₁₈色谱柱很难保留, 而沃特世公司Amide系列色谱柱通过亲水作用色谱的原理, 使得利巴韦林得到非常好的色谱分离和保留。同时提供了HLB+AC2双Plus净化方式, 将鸡肉中的利巴韦林得到很好的富集和净化, 最后通过ACQUITY UPLC/Xevo TQ-S的超高性能, 将监控水平大大的提升一个层次。

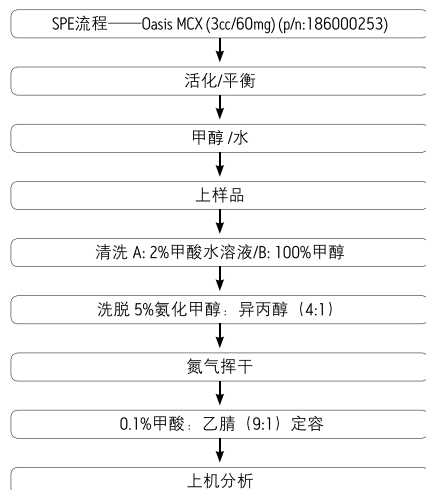
订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC BEH Amide 2.1 x 100mm, 1.7 μm	186004801

实验方案

样品前处理方案

鸡肉样品中加入0.5%三氯乙酸乙腈(1:1)提取, 离心后Oasis MCX净化。



ACQUITY UPLC超高效液相色谱分离方案

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ Column; 2.1 × 100 mm, 1.7 μm (p/n: 186002352)

流动相 A: 甲醇

流动相 B: 0.1%甲酸水溶液

柱温: 45 °C

进样量: 1 μL

运行时间: 4.5 min

UPLC/MS/MS质谱检测方案

电离模式: ESI+

电喷雾电压: 3.0kv

脱溶剂气温度: 500 °C

离子源温度: 150 °C

脱溶剂气流速: 1000 L/hr

采集方法: 多反应监测

实验结果

食品安全检测实验室面临的首要挑战是满足立法机构规定的检测限要求, 迫切需要针对鸡肉中金刚烷胺残留的样品前处理技术和仪器分析方法。

本文应用UPLC/MS/MS结合使用沃特世Oasis MCX前处理方法, 对鸡肉样品中的金刚烷胺进行了快速分析, 在0.1-10ppb浓度测试范围内线性良好。

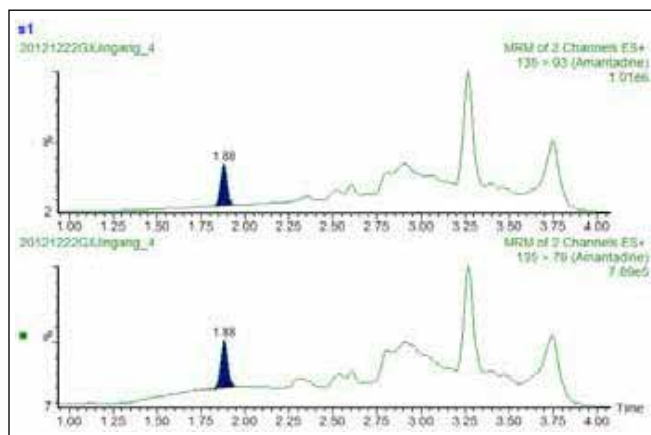


图1: 1ppb鸡肉样品中金刚烷胺定量色谱图

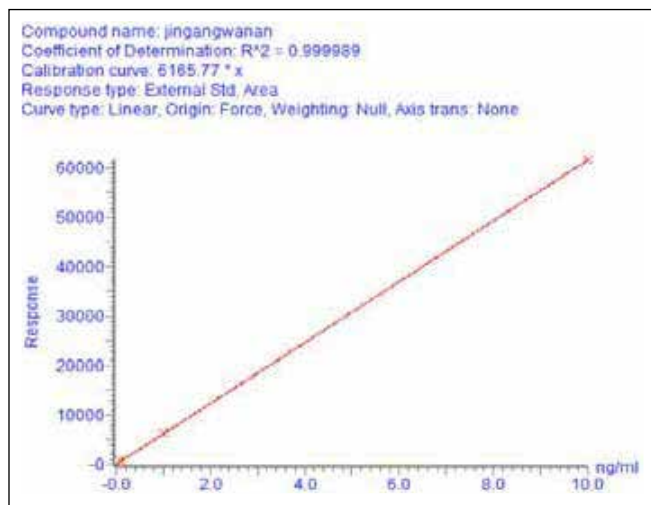


图2: 0.1-10ppb浓度校准曲线

结论

从Oasis MCX前处理方法到UPLC/MS/MS定量分析, 简单, 快速, 灵敏度高, 完全满足当前鸡肉中金刚烷胺残留的检测监管需求, 帮助从容应对食品安全事件。

订购信息

描述	部件号
Oasis MCX 3cc/60 mg	186000253
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 × 100, 1.7 μm	186002352

样品制备

- 1. 取婴幼儿配方奶粉1 g (或液态奶5 g)，加入4 mL水。
- 2. 加入500 ng (500 µL浓度为1 µg/mL的储备液)三聚氰胺同位素内标。
- 3. 加入2500 ng (250 µL浓度为10 µg/mL的储备液)三聚氰酸同位素内标。
- 4. 加入20 mL 乙腈/水 (1/1, v/v)。
- 5. 涡旋20分钟，3400 rpm转速离心10分钟，取上清液。

固相萃取过程

(Oasis® MCX 6 cc/150 mg)

清洗

A. 5 mL 0.1 M NaOH乙腈 B. 5 mL 0.1 M 盐酸乙腈

活化/平衡

A. 5 mL 乙腈 B. 5 mL 4 % 甲酸水溶液

上样

3 mL 4 % 甲酸水溶液 + 2 mL 上清液

清洗

A. 5 mL 乙腈 B. 5 mL 0.2 % DEA乙腈

洗脱

4 mL 2 % DEA 乙腈

洗脱液用0.2 µm PTFE滤膜过滤入样品瓶，
进行LC/MS/MS分析

固相萃取过程

(Oasis MAX 6 cc/150 mg)

清洗

A. 5 mL 0.1 M 盐酸乙腈 B. 5 mL 0.1 M NaOH乙腈

活化/平衡

A. 5 mL 乙腈 B. 5 mL 5 % 氨水溶液

上样

3 mL 5 % 氨水溶液 + 2 mL 上清液

清洗

5 mL 乙腈

洗脱

2 mL 4 % 甲酸乙腈

洗脱液用0.2 µm PTFE滤膜过滤入样品瓶，
取950 µL滤液与5 µL水混匀后进行LC/MS/MS分析

色谱条件

仪器：	沃特世ACQUITY UPLC®系统
色谱柱：	ACQUITY® BEH HILIC 2.1 x 100 mm, 1.7 µm
流动相A：	10 mM 乙酸铵
流动相B：	含10 mM 乙酸铵的95/5 乙腈/水
进样体积：	5 µL
梯度：	时间 (min) 流速 A% B% 曲线

	0.60	0.0	100.0	
0.80	0.600	0.0	100.0	6
2.30	0.600	22.0	78.0	6
2.80	0.600	22.0	78.0	6
2.90	0.600	0.0	100.0	6
4.00	0.600	0.0	100.0	6

质谱条件

仪器：	沃特世ACQUITY TQD检测器
软件：	沃特世MassLynx® v.4.1
电离模式：	ESI ⁺ (三聚氰胺和三聚氰胺同位素内标 ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃)
	ESI ⁻ (三聚氰酸和三聚氰酸同位素内标 ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃)

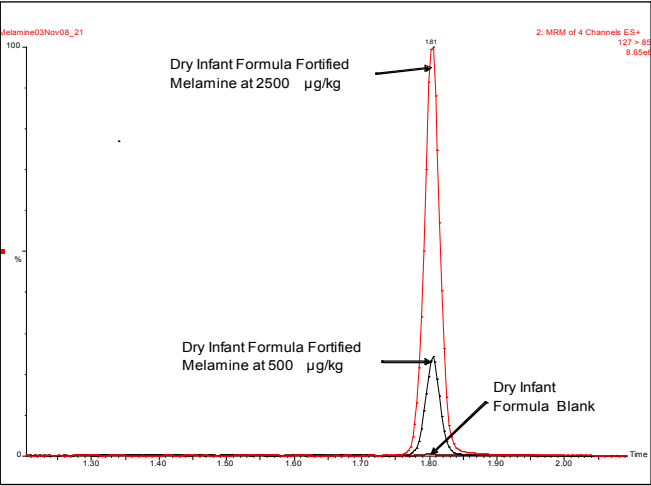
待分析物	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
三聚氰胺	127 > 85	40	17
	127 > 68	40	25
三聚氰胺同位素 内标物 ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	133 > 89	40	17
	133 > 45	40	25

ESI⁺三聚氰胺参数。

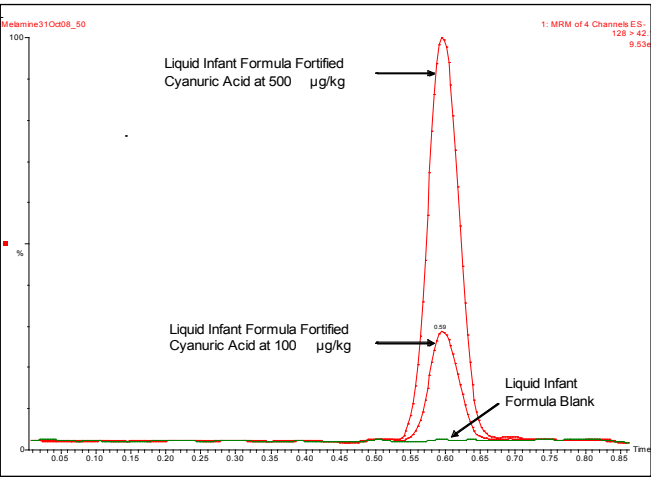
待分析物	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
三聚氰酸	128 > 42	30	13
	128 > 85	30	11
三聚氰酸同位素 内标物 ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	134 > 44	30	13
	134 > 89	30	11

ESI⁻三聚氰酸参数。

结果



婴幼儿配方奶粉中加标500 ppb和2500 ppb三聚氰胺得到的图谱。



液态奶中加标100 ppb和500 ppb三聚氰酸得到的图谱。

	日内重现性	日间重现性
添加水平	平均回收率 % ± % RSD (n)	平均回收率 %±% RSD (n)
500 µg/kg	115.0 ± 4.7 (n = 5)	110.7 ± 6.9 (n = 11)
2500 µg/kg	109.6 ± 3.1 (n = 5)	-

婴幼儿配方奶粉中添加三聚氰胺的回收率数据。

	日内重现性	日间重现性
添加水平	平均回收率 % ± % RSD (n)	平均回收率 %±% RSD (n)
10 µg/kg	103.9 ± 10.5 (n = 5)	104.7 ± 8.2 (n = 8)
100 µg/kg	105.7 ± 3.2 (n = 5)	105.1 ± 4.5 (n = 8)

液态奶中添加三聚氰胺的回收率数据。

	日内重现性	日间重现性
添加水平	平均回收率 % ± % RSD (n)	平均回收率 %±% RSD (n)
500 µg/kg	114.9 ± 3.9 (n = 5)	116.1 ± 4.8 (n = 8)
2500 µg/kg	109.6 ± 3.1 (n = 5)	104.9 ± 4.8 (n = 8)

婴幼儿配方奶粉中添加三聚氰酸的回收率数据。

	日内重现性	日间重现性
添加水平	平均回收率 % ± % RSD (n)	平均回收率 %±% RSD (n)
100 µg/kg	117.7 ± 4.0 (n = 5)	115.0 ± 5.0 (n = 8)
500 µg/kg	103.8 ± 5.9 (n = 5)	103.1 ± 2.9 (n = 8)

液态奶中添加三聚氰酸的回收率数据。

订购信息

描述	部件号
Oasis MCX, 6 cc/150 mg	186000256
Oasis MAX, 6 cc/150 mg	186000369
ACQUITY UPLC BEH HILIC, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm	186003461
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH HILIC, 2.1 x 5 mm, 1.7 µm, 3 pcs/pack	186003980
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

液相色谱法

样品制备

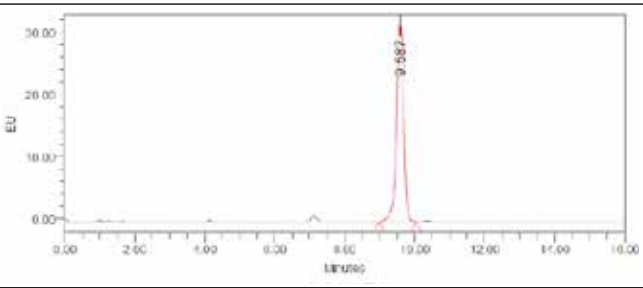
- 1. 准确称取5 g 于50 mL 刻度试管中, 加40 mL 水溶解、混匀。
- 2. 加入60 %高氯酸2.5 mL, 用水定容至刻度, 超声波震荡10 min。
- 3. 样品于20000 rpm下离心10 分钟, 取中间清液, 经0.22 μm 的滤膜过滤后备用。
- 4. 用AccQ•Tag方法, 对于上述滤液进行衍生后, 待测。

色谱条件

色谱柱: UPLC BEH C₁₈ 2.1 x 150 mm, 1.7 μm
流动相A: AccQ•Tag™
流动相B: 乙腈
流速: 0.45 mL/min
柱温: 40 °C
进样量: 5 - 20 μL
荧光检测波长: 激发波长250 nm
发射波长395 nm

梯度:

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)	曲线
0	95	5	0
6.0	95	5	1
9.0	94.5	5.5	6
10.0	94.5	5.5	1
10.5	40	60	6
12.5	40	60	1
12.7	95	5	6



标准色谱图。

液相色谱串联质谱法

样品制备

- 1. 准确称取5 g 于50 mL 刻度试管中, 加40 mL 水溶解、混匀。
- 2. 加入60 %高氯酸2.5 mL, 用水定容至刻度, 超声波震荡10 min。
- 3. 样品于20000 rpm下离心10 分钟, 取中间清液, 经0.22 μm 的滤膜过滤后备用。
- 4. 用AccQ•Tag方法, 对于上述滤液进行衍生后, 待测。

色谱条件

色谱柱: UPLC BEH C₁₈ 2.1x100 mm, 1.7 μm
流动相A: 10 mM 乙酸铵水溶液
流动相B: 乙腈
流速: 0.3 mL/min
柱温: 40 °C
进样量: 5-10 μL
梯度:

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)	曲线
0	90	10	0
1.0	90	10	1
3.0	10	90	6
3.8	10	90	1
4.0	90	10	6

质谱条件

L-羟脯氨酸离子选择参数表

L-羟脯氨酸	母离子	定量子离子	碰撞能量	定性子离子	碰撞能量	离子化方式
L-Phe	302.00	170.70	20	131.80	15	ESI+

订购信息

描述	部件号
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 2.1x100 mm, 1.7 μm	186002352
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 2.1x150 mm, 1.7 μm	186002353
VanGuard Pre-column, ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1x5 mm, 1.7 μm, 3 pcs/pack	186003975
AccQ•Tag Ultra衍生化试剂	186003836
AccQ•Tag Ultra洗脱液A (浓缩液), 950 mL	186003838
全回收样品瓶100个/包	186000384C

样品制备

取1 g 样品，加入5 mL 0.1 M/L HCl 溶液后超声10 min，4000 r/ min 离心10 min 后取下层清液，再加入5 mL 0.1 M/L HCl 溶液重复上述操作，合并2 次提取液，加入5 mL 正己烷摇匀，4 000 r/ min离心5 min 后弃去正己烷层。

固相萃取过程
(Oasis® MCX 3 cc/60 mg)



色谱条件

- 色谱柱：Atlantis® T3, 2.1 x 150 mm, 5 μm
- 柱温：30 °C
- 样品温度：室温
- 进样体积：10 μL
- 流速：0.2 mL/ min
- 流动相A：10 mM/L 醋酸铵溶液
- 流动相B：甲醇
- 色谱洗脱条件：

0- 6 min40 %-100%B

6-10 min100 %B

10-10.5 min100%-40 %B

10.5-20 min40 %B

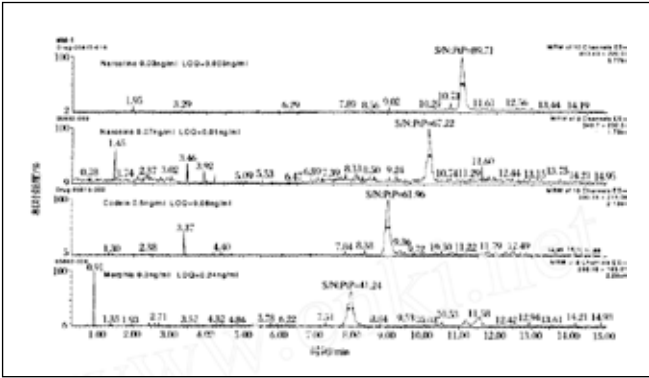
质谱条件

- 电离模式：ESI +
- 毛细管电压：3180 kV
- 锥孔电压：70 V
- 离子源温度：100 °C
- RF 透镜1：40.0
- 光圈：0.0
- RF 透镜2：0.0
- 锥孔反吹气流量：50 L/h
- 脱溶剂气温度：350 °C
- 脱溶剂气流量：400 L/h
- 碰撞池压力： 3.0×10^{-3}
- 质量分析器：低端分辨率LF Lens1, 12.0 V
高端分辨率HM Lens1,12.0 V
- 离子能量1：0.3
- 入口透镜电压：10 V
- 碰撞梯度：1.0
- 出口电压：12 V
- 质量分析器：低端分辨率LF Lens2 , 12.0 V
高端分辨率HM Lens2 , 12.0 V
- 离子能量2：0.6 eV ;质量条件参数详见表1 。

名称	母离子	子离子 ¹⁾	停留时间/s	碰撞能量/eV
咖啡	286.2	165.0*	0.1	29
		181.1	0.1	29
可待因	300.2	215.1*	0.1	26
		165.1	0.1	32
罂粟碱	340.7	202.5*	0.1	26
		324.7	0.1	28
那可丁	413.4	220.0*	0.1	19
		353.1	0.1	27
吗啡(D ₃)	289.3	201.1*	0.1	24
		165.0	0.1	28

表1.*为定量离子。

结果



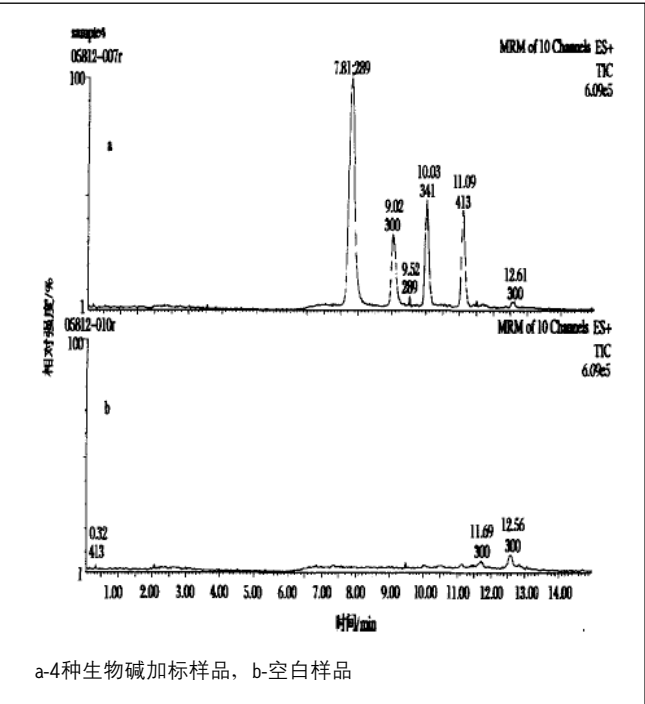


图2. 咖啡、可卡因、罂粟碱、那可丁标准混合物和空白样品的总离子流图。

结论

采用MCX固相萃取柱对汤料、油样、烤禽类等提取液中的罂粟壳成分进行富集和提纯,达到了浓缩、净化的目的。

采用三重四极杆的ESI+离子源,对吗啡、可待因、罂粟碱和那可丁分别确定M+1为母离子和2个子离子,经碰撞能量优化,使用MRM方式检测,方法检出定量限(LOQ)分别是0.24、0.08、0.01、0.003 µg/L,使吗啡、可待因、罂粟碱和那可丁可获得极高的检测灵敏度,满足了低含量样品的测定。经方法学验证,在低浓度范围内r=0.999,回收率在95 %-110 %之间,天内精密度与天间精密度RSD < 10 %,实际样品测定结果表明,可适用于食品中生物碱的测定。该方法具有准确、灵敏度高、适用范围广等优点。

订购信息

描述	部件号
Waters Atlantis T3, 2.1 x 150mm, 5 µm	186003736
Oasis MCX 3 cc/60 mg 30 µm, 100/Box	186000254
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

样品制备

水性辣椒酱/新鲜辣椒

1. 称1 g 辣椒, 用10 mL 丙酮均浆, 提取。
2. 取1 mL 提取液, 用氢氧化钠溶液稀释至5 mL (调到pH 11)。

固相萃取过程

(Oasis® MAX 3 cc/60 mg)

活化/平衡

A. 2 mL 乙酸乙酯 B. 2 mL 甲醇
C. 1 mL 0.1 M 氢氧化钠 D. 2 mL 水

上样

5 mL 稀释的提取液

清洗

A. 2 mL 含70%甲醇的水溶液 B. 1 mL 1M 氢氧化钠
C. 2 mL 甲醇 D. 1 mL 乙酸乙酯

洗脱

2 mL (89:9:2) 乙酸乙酯/甲醇/甲酸

蒸发再定容于200 µL (90:10) 乙腈/水中

注意: 极性酚类化合物如辣椒素在pH 11无离子交换作用, 用70%甲醇水溶液清洗。进一步推高pH使苏丹红类化合物以离子交换和反相作用牢牢保留在吸附剂上, 再用甲醇和乙酸乙酯清洗杂质(除去非极性碱和中性化合物)。

辣椒粉/辣椒油

1. 0.1 g 辣椒油, 用1 mL 正己烷溶解。
2. 1 g 辣椒粉/油, 用10 mL 丙酮均浆, 提取。
3. 1 mL 提取液吹干, 残渣定容于1 mL 正己烷。

固相萃取过程

(Sep-Pak® Alumina B 3 cc/500 mg)

活化/平衡

A. 2 mL 甲醇 B. 2 mL 乙酸乙酯 C. 3 mL 正己烷

上样

1 mL 提取液

清洗

A. 3 mL 正己烷 B. 1 mL 乙酸乙酯

洗脱

4 mL (90:10) 乙酸乙酯/甲醇

蒸发再定容于200 µL 乙腈/水中

注意: 用正己烷和乙酸乙酯能完全除去脂肪。胡萝卜素类色素亦被乙酸乙酯清洗掉。在10%甲醇-乙酸乙酯中, 苏丹红类染料被洗脱, 但更极性的辣椒素仍被吸附。

色谱条件

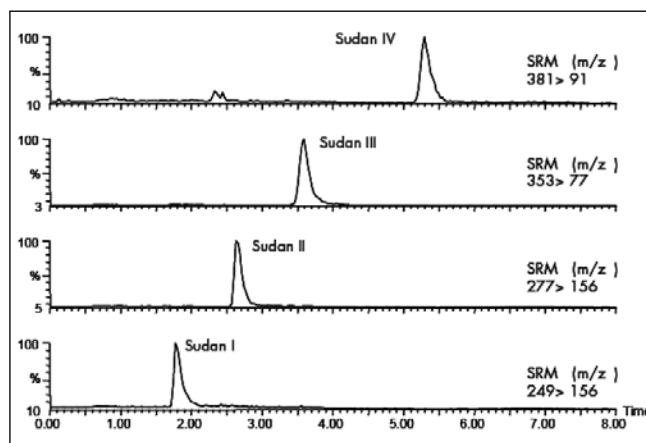
仪器: 沃特世Alliance® 2695系统
色谱柱: Atlantis® dC₁₈ 2.1 x 100 mm, 3.0 µm
柱温: 30 °C
流动相A: 0.1 % 甲酸水溶液
流动相B: 乙腈
梯度: 80 % B 到 95 % B, 10 min
流速: 0.4 mL/min
进样体积: 15 µL

质谱条件

仪器: 沃特世 Quattro micro™ API
电离模式: ESI+

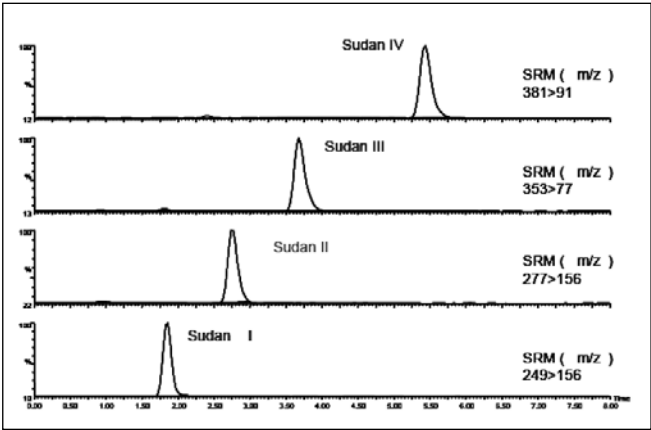
分析物	MRM	锥孔电压(V)	碰撞能量 (eV)
Sudan I	249 → 156	20	15
	249 → 93	20	24
	249 → 128	20	25
Sudan II	277 → 156	28	15
	277 → 121	28	18
	277 → 106	28	40
Sudan III	353 → 77	45	28
	353 → 120	45	23
	353 → 196	45	23
Sudan IV	381 → 91	45	26
	381 → 106	45	40
	381 → 224	45	20

结果



LC/MS 分析添加辣椒结果(80 µg/kg), Oasis MAX 方法。

辣椒产品中苏丹红的分析



LC/MS 分析添加辣椒粉结果 (80 µg/kg), Sep-Pak® Alumina B 方法。

分析物	回收率(%)	RSD (%)
Sudan I	83	9
Sudan II	83	1
Sudan III	77	3
Sudan IV	75	4

辣椒酱结果(n = 6, 80 µg/kg) 。

分析物	回收率(%)	RSD (%)
Sudan I	99	11
Sudan II	91	11
Sudan III	93	6
Sudan IV	122	11

辣椒油结果(n = 6, 80 µg/kg) 。

订购信息

描述	部件号
Oasis MAX, 3 cc/60 mg	186000368
Sep-Pak Alumina B, 3 cc/500 mg, 50/box	WAT020825
Atlantis dC ₁₈ , 2.1 x 100 mm, 3 µm*	186001295
Atlantis dC ₁₈ , 2.1 x 10 mm, 3 µm 保护柱 2 pcs/pack	186001377
Sentry Guard Holder	WAT097958
LC/MS 认证样品瓶	600000751CV

* 可用Atlantis T3 色谱柱替代(部件号: 186003718)

多农药残留分析

待分析物	应用文章	沃特世应用资料编号
Pesticides	Determination and Confirmation of Priority Pesticides in Baby Food (Xevo)	720002812EN
Pesticides	A Rapid Method for the Screening and Confirmation of Over 400 Pesticide Residues in Food	720002628EN
Pesticides	Application of ACQUITY TQD for the analysis of pesticide residues in baby food	720002122EN
Pesticides	Targeted and non-targeted pesticide screening in food using elevated resolution GC-ToF-MS - fruit-based baby food	720002027EN
Pesticides	Application of Elevated Resolution GC-TOF-MS for the Multi-Residue Analysis of Pesticides in Food - multiple commodities	720001607EN
Pesticides	Determination of pesticides in food using UPLC with polarity switching tandem quadrupole LC/MS/MS	720001995EN
Pesticides	Determination of priority pesticide residues in baby food by tandem quadrupole LC/MS/MS and GC/MS/MS	720001436EN
Pesticides	New technologies for the simultaneous analysis of multiple pesticide residues in agriculture produce	720001172EN
Pesticides	Application of GC-triple quadrupole MS/MS for multiresidue analysis of pesticides in complex matrices	720000987EN
Pesticides	UPLC with oa-TOF MS for Rapid Screening of Multiple Pesticide Residues	720001437EN
Pesticides	An enhanced LC/MS/MS method for the determination of 81 pesticide residues in fruit and vegetables using the Quattro Premier mass spectrometer	720000840EN
Pesticides	Determination of pesticide residues in complex matrices using the Waters micromass Quattro Premier: a method combining extreme sensitivity and unmatched robustness	720000839EN
Pesticides	The Confirmation of the presence of incurred pesticide residues detected using a multi-residue surveillance method to screen for 81 target analytes	720000692EN
Pesticides	The advantages of multiple reaction monitoring (MRM) over Single Ion Recording (SIR) for the analysis of 81 pesticide residues in fruit and vegetables	720000693EN
Pesticides	A multi-residue LC/MS/MS method for the determination of 81 pesticide residues in fruit and vegetables: Part 1, method overview	720000686EN
Pesticides	Comparison of SIM and MRM for the Quantitative Confirmation of Pesticide Residues in Food	720001439EN

污染物分析

待分析物	应用文章	沃特世应用资料编号
melamine, cyanuric acid	A Rapid and Sensitive Method for the Simultaneous Determination of Melamine and Cyanuric Acid in Infant Formulas, Adult Nutritional Products, and Protein Powders	720002889EN
melamine, ammeline, cyanuric acid	Analysis of Melamine and its Degradation Products in Milk-based Products Using GC-MS/MS	720002887EN
melamine	A Rapid Method to Detect Melamine in Liquid Milk and Infant Formula Using UPLC/MS/MS	720002823EN
acrylamide	The determination of acrylamide using the Waters micromass Quattro Premier LC/MS/MS system	720000846EN
dioxin	Dioxin and furan analysis in animal feedingstuffs to EU limits using the Waters Autospec Ultima NT	720000739EN
melamine	Melamine, ammeline and cyanuric acid analysis by UPLC/MS/MS and UPLC/PDA	720002300EN
PAH	The Use of Tandem Quadrupole GC/MS/MS for the determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in food Products	720001899EN
PCBs	Determination of Ocs, PCBs and synthetic pyrethroids in animal fat	720001329EN
Sudan Dyes	Effective SPE strategies for LC/MS determination of Sudan dyes in chili products	720001440EN
Sudan Dyes	A rapid and sensitive analysis method of Sudan Red I, II, III & IV in tomato sauce using UPLC MS/MS shellfish	720001293EN

兽药残留分析

待分析物	应用文章	沃特世应用资料编号
corticosteroids, β -agonists and rbST	Xevo TQ Facing Some New Challenges in the Field of Growth Promoters in Biological Samples	720002972EN
macrolides	Automated Analysis of Macrolides Antibiotics in Milk	720002960EN
aminoglycosides	Analysis of Aminoglycoside antibiotics with Waters 2465 electrochemical detector	720000803EN
Anabolic Steroids	Application of GC/MS/MS for the Analysis of Anabolic Steroids in Meat Products	720001764EN
chloramphenicol	A confirmatory method for the determination of chloramphenicol, tiamphenicol and florfenicol in honey	720001015EN
chloramphenicol	Determination of chloramphenicol using the ACQUITY UPLC and the Quattro Premier XE in ES negative ion mode MS/MS	720001483EN
chloramphenicol	Application of ACQUITY TQD for the analysis of chloramphenicol residues in honey extracts	720002329EN
chloramphenicol	A Rapid Method for the Determination of Chloramphenicol Residues in Black Tiger Shrimp	720000767EN
hormones	Application of GC/MS/MS for the analysis of banned growth promoters	720001124EN
hormones	Comparing SIT to MRM for the Quantitative confirmation of steroid growth promoters in bovine urine	720001287EN
nitrofurans	Application of ACQUITY TQD for the analysis of nitrofurantoin veterinary drug residues in shrimp	720002299EN
nitrofurans	LC/MS/MS determination of nitrofurantoin metabolite residues in honey	720001034EN
nitrofurans	Determination of Nitrofurantoin Veterinary Drug Residues Using Waters Micromass Quattro Premier: Tandem Mass Spectrometer	720000847EN
nitrofurans	Analysis of Nitrofurantoin Veterinary Drug Residues using ACQUITY UPLC and Quattro Premier XE	720001951EN
Screening	Advanced Multi-Residue Screening in Veterinary Drug Analysis Using UPLC ToF MS	720001675EN
streptomycin	A confirmatory LC/MS/MS method for the determination of streptomycin in honey	720000981EN
sulfonamide	A rapid multiresidue method for the determination of sulfonamide and β -lactam residues in bovine milk	720001065EN

水分析

待分析物	应用文章	沃特世应用资料编号
N-Nitrosamines	Complete System Solution for the Determination of N-Nitrosamines in Drinking Water	720002627EN
Phenyl Urea herbicides	ON-Line SPE LC/MS/MS Part IV: US EPA Method 532 Phenyl Urea Compounds in Drinking Water	720002701EN
pharmaceuticals	Emerging Contaminants in Drinking Water Part I: Painkillers and Illicit Drugs	720002702EN
Endocrine-Disrupting Compounds	A Sensitive Method for the Determination of Endocrine-Disrupting Compounds in River Water by LC/MS/MS	720001296EN
estriol, bisphenol A, estrone, estradiols	Determination of Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) in River Water by ACQUITY UPLC Tandem Quadrupole MS	720002335EN
Alachlor, acetochlor, metolachlor, propachlor, flufenacet & dimethamid	Analysis of Chloroacetanilide and Acetamide Herbicide Degradates in Drinking Water by UPLC/MS/MS	720001999EN
Perchlorate	The Determination of Perchlorate in Water Using LC/MS/MS	720000941EN
Perchlorate	The Determination of Perchlorate in Drinking Water using Single Quadrupole Mass Spectrometry	720001285EN
Priority pollutants	Multi-Residue Analysis of Priority Pollutants in Drinking and Surface Waters Using Solid Phase Extraction and GC Tandem Quadrupole MS/MS	720001438EN
Priority pollutants	Priority pollutants, including PAHs & PCBs, in surface waters	720001521EN
Synthetic pyrethroids	A Confirmatory Method for the Determination of Synthetic Pyrethroids in Waste Water	720001093EN
	On-line SPE LC/MS/MS Part I: System Classification	720002421EN
	On-line SPE/LC/MS/MS Part II: Waters AquaAnalysis System	720002450EN
	On-line SPE LC/MS/MS Part III: Waters AquaAnalysis System Performance	720002451EN

食品功能组分分析

待分析物	应用文章	沃特世应用资料编号
Peppermint essential oils	Automated Qualitative Analysis of Complex Mixtures Using ChromaLynx XS Software	720002643EN
Fat soluble vitamins	Rapid separation of key fat soluble vitamins in butter using UPLC/MS/MS on ACQUITY SQD with PDA	720002021EN
Fat soluble vitamins	Chromatographic Separation of Fat-Soluble Vitamins, Including the Two Vitamers D2 and D3	720002154EN
Fat soluble vitamins	A Rapid and Sensitive UPLC-MS (APCI) Method for the Determination of CoQ10	720002316EN
Water soluble vitamins	A Novel Method for the Analysis of Water-Soluble Vitamins by UPLC	720002001EN
Water soluble vitamins	"UPLC/PDA/MS Analysis of Riboflavin and Related Compounds"	720001447EN
Water soluble vitamins	LC/MS Analysis of Vitamin B12	720000758EN
Anthocyanidins	ACQUITY UPLC for the Rapid Analysis of Anthocyanidins in Berries	720001870EN
Isoflavones	Analysis of isoflavones from soy products using ACQUITY SQD with PDA	720002101EN

生物毒素分析

待分析物	应用文章	沃特世应用资料编号
mycotoxins	Rapid Analysis of Aflatoxins without Derivatization Using UPLC and Fluorescence Detection	720002644EN
mycotoxins	Application of ACQUITY TQD for the analysis of mycotoxins contaminants in pistachio, almond and cashew nuts	720002244EN
mycotoxins	Rapid multi-mycotoxin analysis using ACQUITY UPLC and Quattro Premier XE	720001996EN
mycotoxins	The analysis of milk aflatoxins by HPLC using fluorescence detection	720001397EN
mycotoxins	Multi-analyte mycotoxin analysis	720001050EN
mycotoxins	A method for the rapid and sensitive determination of ochratoxin A in red wine	720000792EN
Patulin	Rapid analysis of patulin contamination in apple juice	720002410EN
biotoxins	A fast and sensitive UPLC/MS/MS method for the detection of lipophilic marine biotoxins in shellfish	720001918EN

POPs(持久性污染物)分析

待分析物	应用文章	沃特世应用资料编号
PAHs & explosives	The Science of ACQUITY UPLC Applied to Environmental Analyses of PAHs and Explosives in Water	720001398EN
BFRs	Analysis of Brominated Flame Retardants (BFRs) using AutoSpec	720000270EN
BFRs	Analysis of BFR diastereomers HBCD & TBBP-A using UPLC/MS/MS	720002445EN
dioxin	Dioxin and furan analysis in animal feedingstuffs to EU limits using the Waters Autospec Ultima NT	720000739EN
Dioxin and furan	The Analysis Of Dioxins And Furans Using HRGC-High Resolution MS With The Autospec Ultima NT	720000556EN
Dioxin and furan	Ultra Trace Analysis Of Dioxins And Furans In Human Adipose Tissue Using SFE-LC Extraction/Cleanup and the Waters AutoSpec Ultima NT	720000829EN
N/A	The Advantages of Using GC/MS/MS for the Analysis of Trace Components in Complex Matrices (Carp samples)	720000876EN
PAH	The Use of Tandem Quadrupole GC/MS/MS for the determination of Polycyclic Aromatics Hydrocarbons (PAHs) in food Products	720001899EN
PAHs	Fast GC/MS/MS Analysis of Polyaromatic Hydrocarbons using the Waters Quattro micro GC	720001910EN
Aldehydes & Ketones	Fast Analysis of Aldehydes and Ketones by ACQUITY UPLC	720001500EN
PCBs	The analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) by GC-High resolution MS using Autospec Ultima NT	720000520EN
PCDD	A single injection screening method for tetra-octa chlorinated PCDD/FS in fish and flyash matrices using triple quadrupole MS/MS	720000759EN
Pesticides	Comparison of SIM and MRM for the Quantitative Confirmation of Pesticide Residues in Food	720001439EN
Polybrominated Diphenyl Ether Flame Retardants	A Study of the Analysis of Polybrominated Diphenyl Ether Flame Retardants by GC/MS/MS	720001021EN
POPs, PCBs & Dioxins	Technical Note: Dual column analysis of POPs, PCBs and dioxins	720000768EN
PFCs	Analysis of Perfluorinated Compounds (PFCs) on the ACQUITY UPLC System and the Quattro Premier XE in ES- MS/MS	720001761EN
PFOs	Separation of Branched PFOS Isomers by UPLC with MS/MS Detection	720001694EN

Oasis PRiME系列

✓ 更快速 ✓ 更洁净 ✓ 更简单



OASIS
SAMPLE EXTRACTION PRODUCTS

- 去除95%的常见基质干扰物, 例如盐类、蛋白质和磷脂等
- 可浓缩分析物
- 分析速度更快, 节约分析时间
- 样品经预处理后即可直接上样, 无需活化和平衡

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

制药 ■ 健康科学 ■ 食品 ■ 环境 ■ 化工材料

©2018年 沃特世公司。Waters和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。

沃特世科技(上海)有限公司

地址: 上海市浦东新区金海路1000号
金领之都13栋

邮编: 201206

电话: 021-6156 2666

传真: 021-6156 2777

北京分公司

地址: 北京市朝阳区铜牛国际大厦
光华路15号院2号楼9层

邮编: 100026

电话: 010-5209 3866

传真: 010-5293 2298

广州分公司

地址: 广州市荔湾区中山七路50号
西门口广场1707-08室

邮编: 510170

电话: 020-2829 6555

传真: 020-2829 6556

成都分公司

地址: 成都市高新区科园南路88号
天府生命科技园孵化楼C1栋411室

邮编: 610023

电话: 028-6765 3588

传真: 028-6765 3580

沃特斯中国有限公司

地址: 香港新界沙田香港科学园
科技大道西2号生物资讯中心6楼608室

电话: 852-2964 1800

传真: 852-2549 6802



扫一扫, 关注沃特世微信

全国免费售后服务热线:

800(400)820 2676

www.waters.com

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, UPLC, ACQUITY, ACQUITY UPLC, UPC², Connections INSIGHT, SYNAPT, Xevo, XBridge, XSelect, Sunfire, Symmetry, Alliance, Atlantis, Oasis, Sep- Pak, Empower, Masslynx, XTERRA, The Science of What's Possible, DisQuE, ACQUITY UPC², Ostro, CSH, XPOsure, VanGuard, Sentry, Guard-pak, Quattro micro, Quattro Premier, Q-ToF, Quattro Ultima Pt, Accell, StepWave, Auto•Blend, Auto•Blend Plus, Targetlynx, Positive, SymmetryShield, Symmetry300, IntelliStart, AccQ•Tag, QUANPEDIA和RADAR是沃特世公司的商标。

所有其他商标属于各自拥有者所有。

©2018年 沃特世公司 中国印刷

2018年5月 720002565ZH