

使用SPE改善LC-MS法测定猪和牛肝脏中莱克多巴胺的性能：使用Otto SPEcialist的Oasis MCX方法

Nathan Stebbins, Jessica Lance, Joe Bruton, Jeremy Shia, Marina Obradovic, Kathryn Brennan, Claire Rhodes

Tyson Foods and WBA Analytical Laboratories, Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报介绍了一种简单、快速、有效的净化策略，用于去除猪和牛肝提取物中的共提取物。该净化步骤在使用UPLC-MS/MS定量总莱克多巴胺（一种 β -激动剂兽药，检测限0.1 ng/g）之前，通过由Otto SPEcialist（一种半自动正压萃取装置）处理的Oasis MCX 96孔SPE板进行。该方法可定量莱克多巴胺和莱克多巴胺-葡萄糖醛酸代谢物，准确测量动物组织中的莱克多巴胺。使用带96孔板的Otto SPEcialist处理样品不仅可以提高样品通量和重现性，还能消除使用手动真空萃取装置时发生交叉污染的风险。

优势

- 使用带Oasis MCX 96孔板的Otto SPEcialist处理样品可改善猪肝提取物的净化效果，提高目标 β -激动剂兽药的回收率
- Otto SPEcialist正压萃取装置改进了工作流程并缩短了数据周转时间，让分析人员有更多时间履行其他职责

，同时提高不同分析人员之间的重现性和日间重现性

- 与使用手动真空萃取装置在SPE小柱中处理的改良方法相比，使用带96孔板的Otto SPEcialist制备的样品具有更高的峰面积计数和信噪比

简介

莱克多巴胺是一种 β -肾上腺素药物（ β -激动剂），在美国和加拿大作为一种合法的生长促进剂用于牛的饲养。猪肝脏中莱克多巴胺的MRL（最大残留量）为50 ng/g（美国）和40 ng/g（加拿大）。欧盟和世界上许多其他国家/地区都禁止在畜牧业中使用这些物质。一些国家/地区对这些化合物持零容忍态度，出口要求分析证书显示莱克多巴胺含量低于0.1 ng/g (ppb)。为保障公众健康和安全，我们需要采用可靠的分析方法来测定食用动物组织中残留的这些化合物。本技术简报展示了一种测定猪和牛肝脏及内脏产品中莱克多巴胺的方法，该方法结合了甲醇萃取、SPE净化和UPLC-MS/MS分析，操作非常简单。

实验

在本研究中，我们描述了将AOAC方法2011.23¹加以修改得到的样品净化方法，即用Otto SPEcialist正压萃取装置取代真空萃取装置，用Oasis MCX 96孔板取代Oasis MCX小柱。

样品前处理

称取5 g匀浆样品装入50 mL离心管中。加入5 mL甲醇并漩涡混合60秒。在4000 rpm下离心5分钟。将上清液转移至适当的聚丙烯容器中（萃取物1）。再取5 mL甲醇重新悬浮沉淀物，然后按前文所述方法涡旋并离心。收集上清液（萃取物2），并与萃取物1混合。取5 mL甲醇重新悬浮沉淀物，然后按前文所述方法涡旋并离心。收集上清液（萃取物3），并与萃取物1和萃取物2混合。用甲醇将混合提取物的体积准确调整至20 mL，然后离心5分钟。取8 mL混合提取物转移到15 mL管中，并在氮气冲洗下蒸发以除去甲醇。用0.8 mL 25 mM醋酸钠复溶并加入20 μ L β -葡糖醛酸糖苷酶，然后在65 °C下培养2小时。加入0.8 mL甲醇并以4000 rpm离心5分钟，然后进行SPE净化。

注：该萃取方案对目标化合物的回收率极佳，但同时也会萃取出大量磷脂。

SPE净化

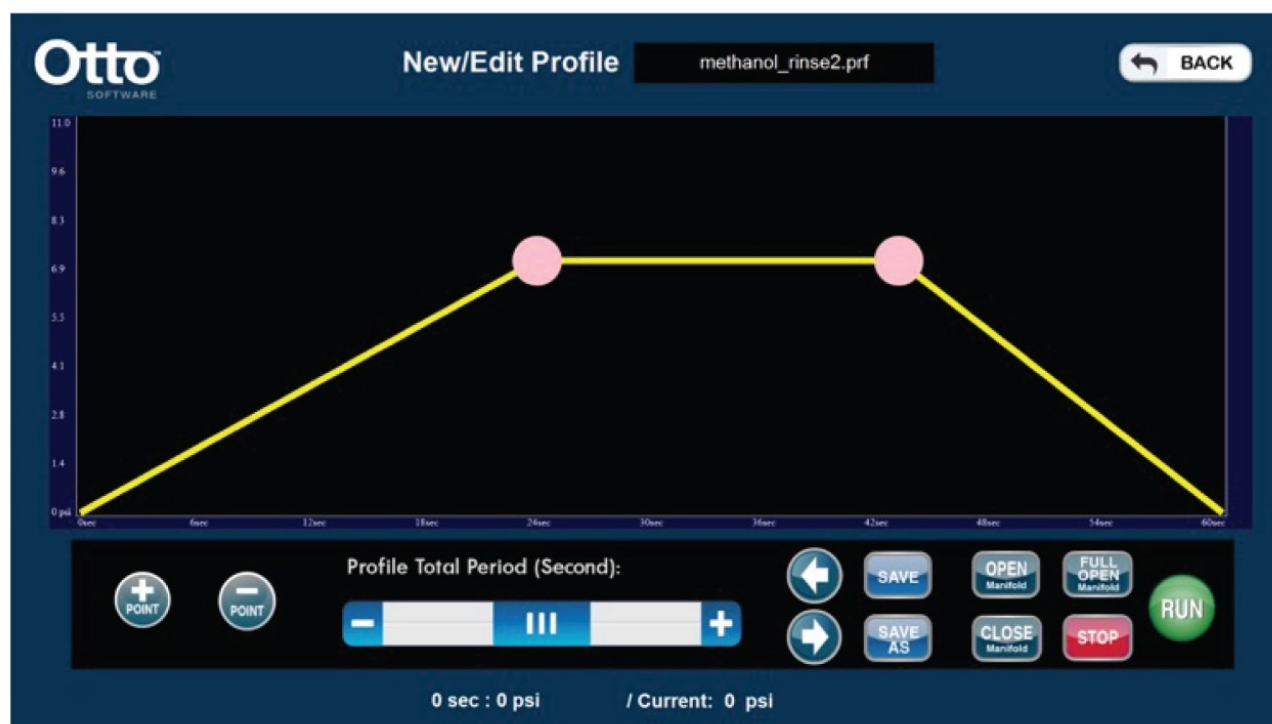
Oasis MCX 96孔板（60 mg，60 μm ，部件号：[186000678 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186000678-oasis-mcx-96-well-plate-60-mg-sorbent-per-well-60--m-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186000678-oasis-mcx-96-well-plate-60-mg-sorbent-per-well-60--m-1-pk.html)）安装在废液容器上，用于老化、上样和清洗步骤。然后将废液容器更换为2 mL收集板（部件号：[186002482 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/vials-containers--collection-plates/186002482-96-well-sample-collection-plate-2-ml-square-well-50-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/vials-containers--collection-plates/186002482-96-well-sample-collection-plate-2-ml-square-well-50-pk.html)），用于收集洗脱步骤的洗脱液。按照以下方案进行SPE净化：

老化：	1 mL甲醇
上样：	所有合并的上清液(1.62 mL)
清洗：	1 mL甲醇
洗脱	0.8 mL 5%氢氧化铵的甲醇溶液



图1.Otto SPEcialist

压力曲线如下所示：



老化步骤



上样步骤



清洗步骤



洗脱步骤

UPLC条件

液相色谱系
统： ACQUITY
UPLC I-
Class PLUS

色谱柱： ACQUITY
UPLC BEH,
1.7 μm , 2.1
x 50 mm

流动相A： 0.1%甲酸的
水溶液

流动相B: LCMS级甲醇

进样体积: 4 μ L

柱温: 40 $^{\circ}$ C

弱清洗液: 10:90甲醇:水
(600 μ L)

强清洗液: 50:50甲醇:水
(800 μ L)

密封件清洗液: 10:90甲醇:水

梯度表

时间 (mL/min)	流速	%A	%B
0.0	0.4	90	10
3.0	0.4	10	90
3.4	0.4	10	90
3.5	0.4	90	10
4.5	0.4	90	10

质谱条件

质谱仪:	Xevo TQ-XS
模式:	正离子电喷雾, MRM
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	550 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
锥孔气流速:	150 L/h
碰撞气体流速:	0.15 mL/min
数据管理:	MassLynx v4.2

化合物	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
莱克多巴胺	302.2>164.1	35	14
	302.2>121.0	35	22

监测的通道

结果与讨论

使用LC-MS/MS测定莱克多巴胺的回收率。条件如图2所示。

莱克多巴胺回收率

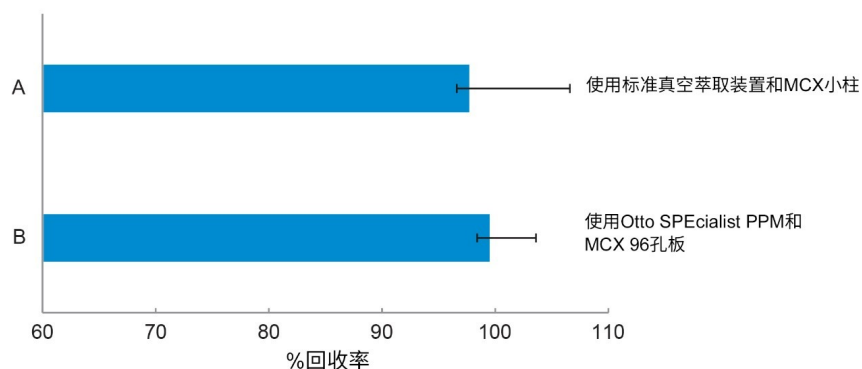


图2.(A)使用标准真空萃取装置和Oasis MCX小柱与(B)使用Otto SPEcialist半自动正压萃取装置(PPM)和Oasis MCX96孔板之间的加标猪肝样品回收率数据比较

图2显示了六次重复分析加标0.1 ng/g莱克多巴胺的猪肝提取物获得的SPE回收率数据。样品净化采用两种固相萃取(SPE)方法：(A)使用标准真空萃取装置和Oasis MCX小柱；(B)使用Otto SPEcialist半自动正压萃取装置(PPM)和Oasis MCX96孔板。这两种方法都得到了优异的莱克多巴胺回收率。值得注意的是，Otto SPEcialist的标准偏差不到Oasis MCX小柱的一半，表明前者的数据精密度更高。这对于痕量水平的准确定量至关重要。提取前向猪肝基质空白样和样品中加入了标准品。

图3的色谱图显示了基质样品净化后莱克多巴胺的典型响应，A和B的猪肝中加标浓度相当于0.1 ng/g，C和D相当于0.01 ng/g。可以通过这些色谱图比较在Otto SPEcialist PPM上使用MCX 96孔板制备的样品（A和C）与在标准真空萃取装置上使用MCX小柱制备的样品（B和D）。使用OttoSPEcialist制备的样品的峰面积计数增加了87%，信噪比也得到改善，从而可以通过TargetLynx更准确地积分峰并缩短分析人员读取数据的时间。使用Oasis MCX小柱的峰面积计数较低可能是由于样品富集过程中额外的蒸发和复溶步骤导致损失。在使用Otto SPEcialist进行洗脱步骤后，将收集板加盖并直接插入LC-MS/MS系统，无需通过0.2 μm过滤器过滤。该方法省去了蒸发/浓缩步骤，减少了消耗品使用，并缩短了周转时间。96孔板的另一个显著优势是，与使用手动真空萃取装置相比，它消除了交叉污染的风险。对于高通量实验室，Otto SPEcialist的投资回报时间仅数月，之后即可长期节省大量成本。

LC梯度在0-0.6分钟和2-4分钟输送至废液中，从而减少离子源和检测器上共提取物的污染。这会导致基线突然上升，在图3D中尤为明显。

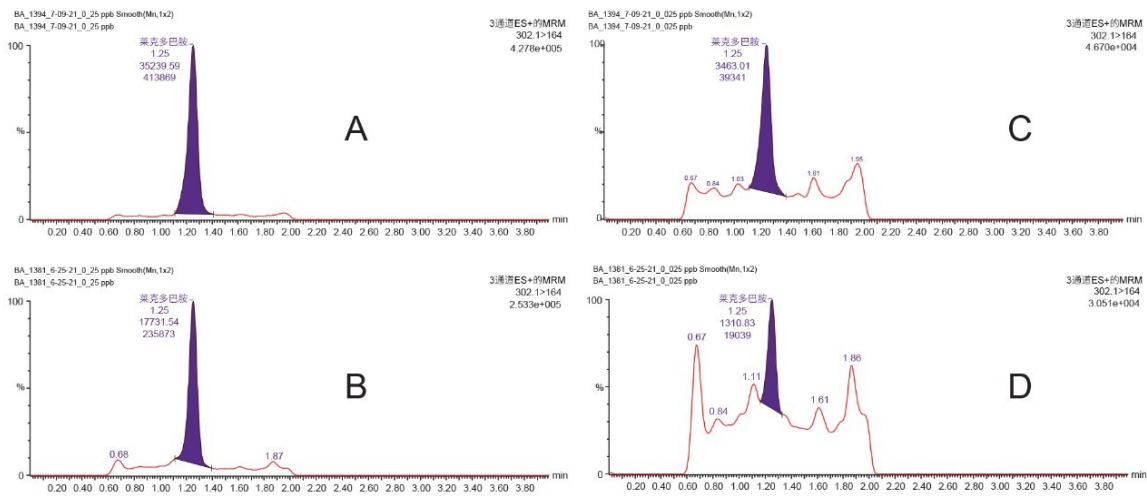


图3.显示基质样品净化后莱克多巴胺响应的色谱图：(A)和(C)使用Otto SPEcialist和MCX 96孔板，(B)和(D)使用真空萃取装置和MCX小柱。(A)和(B)加标样品相当于猪肝中含0.1 ng/g莱克多巴胺；(C)和(D)加标样品相当于猪肝中含0.01 ng/g莱克多巴胺。

结论

- Otto SPEcialist（一种正压萃取装置）联合Oasis MCX 96孔板是一种极为有效的方法，能够在使用LC-MS/MS法测定0.1 ng/g莱克多巴胺之前对猪和牛肝脏及内脏样品的甲醇提取物进行净化和富集。
- 与在真空萃取装置上使用Oasis MCX小柱相比，将Otto SPEcialist与样品板一起使用可在更短时间内提供重现性更好的结果，并增加峰响应和信噪比。
- 此方法不需要使用0.2 μm过滤器和离心管等消耗品进行样品富集，可显著节省成本。

参考资料

1. AOAC Official Method 2011.23. Determination and Confirmation of Parent and Total Ractopamine in Bovine, Swine, and Turkey Tissues.

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)

[Otto SPEcialist <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135073532>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135073532)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

720007443ZH, 2021年12月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.