

液相色谱-高分辨质谱在兽药残留分析中的应用进展

夏 曦, 李晓薇, 丁双阳, 沈建忠

(中国农业大学动物医学院, 国家兽药残留基准实验室, 北京 100193)

摘要:液相色谱-高分辨质谱(LC-HRMS)技术在兽药残留分析领域的研究已经显示出巨大的发展潜力。本文阐述了 LC-HRMS 技术的特点,并总结了近几年来 LC-HRMS 在兽药多残留筛选分析中的应用实例,展望了 LC-HRMS 技术的发展前景。应用高分辨质谱的全扫描和精确质量测定功能,结合超高效液相色谱技术,优化样品前处理方法,可以实现 100 多种兽药残留的同时检测。与四极杆质谱相比,高分辨质谱的参数设定简单,并适用于非定向和未知化合物的筛选,需要增加目标化合物时,不必再次处理样品和进样,重新分析已有的全扫描数据即可。UHPLC-HRMS 作为最有潜力的分析技术,仍有很大的发展空间,TOF 的分辨率和 Orbitrap 的扫描速度有待提高,简便易用的数据处理软件也需要完善。

关键词:兽药残留;液相色谱;高分辨质谱

中图分类号:O 657. 63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2011)06-0333-08

Advances on Application of Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry in Veterinary Drug Residues Analysis

XIA Xi, LI Xiao-wei, DING Shuang-yang, SHEN Jian-zhong

(National Reference Laboratory for Residues of Veterinary Drugs,

College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) has shown great potential of application in the field of veterinary drug residues analysis. This review focuses on the technical characteristics of LC-HRMS, and especially addressed its applications and prospect in the multi-residue screening of veterinary drugs.

Key words: veterinary drug residues; liquid chromatography; high resolution mass spectrometry

食品安全已经引起了全社会的广泛关注,其中兽药残留是影响动物源性食品安全的主要因素之一。在畜牧养殖上,各种抗生素、激素等药物不但被用于动物疾病的治疗,同时还添加到动

物日粮或饮水中用于非治疗性的目的,主要表现为发病率及死亡率的下降、促生长、提高饲料转化率、改善产品品质等效果。这些药物的过量和违禁使用不可避免的产生了兽药残留。兽药残

收稿日期:2011-08-19;修回日期:2011-10-14

作者简介:夏 曦(1980~),男(汉族),讲师,兽医药理毒理专业。E-mail: xxia@cau.edu.cn

通信作者:沈建忠(1963~),男(汉族),教授,兽医药理毒理专业。E-mail: sjz@cau.edu.cn

留的危害严重,会引起敏感人群的中毒反应,可能导致各种慢性、蓄积毒性,长期低剂量用药还容易诱导细菌耐药性的产生。因此,加强兽药残留监控已是刻不容缓的事情。

常用的兽药有 10 多类,上百种,同时检测多类兽药是残留分析工作者面临的巨大挑战。现阶段,高通量的筛选结合准确的确证是广泛采用的兽药残留检测方法。酶联免疫吸附试剂盒是最常用的筛选方法,一次能够检测至少几十个样品,操作相对简单,其缺点是一种试剂盒只能针对一种药物,而且无法避免假阳性。目前,色谱-质谱联用是唯一有效的残留检测确证技术。单四极杆质谱、离子阱质谱和三重四极杆质谱运用选择离子扫描(SIM)或多反应监测(MRM)扫描方式,具有极高的灵敏度和选择性,气相色谱-质谱(GC/MS)和液相色谱-三重四极杆质谱(LC-QqQ-MS)被广泛用于确证检测^[1-4]。同时,LC-QqQ-MS也被用于已知化合物的筛选,但是当检测多个目标化合物时,为了保证每个MRM通道的驻留时间,需要根据化合物的色谱保留时间分段设定参数,能够同时检测的化合物数量有一定的限制。如果要进行未知化合物的筛选,则需要全扫描模式采集数据,单位分辨的四极杆质谱在全扫描模式下的灵敏度很差,不能满足残留分析的要求。

与低分辨质谱不同,高分辨质谱(HRMS)(如飞行时间质谱(TOF-MS)、轨道阱质谱(Orbitrap-MS)等)能够提供高质量准确度、高质量分辨率的全扫描数据。液相色谱与高分辨质谱联用(LC-HRMS)能够提取目标化合物的精确质量色谱图,理论上可以分析的化合物没有数量限制。如果需要增加新的目标化合物,HRMS的全扫描数据还可以随时进行重新处理。仪器方法的设定也相对简单,不会因为目标化合物的增加而损失灵敏度。在实际应用中,研究人员已经建立了能够同时检测上百种兽药的方法,显示了LC-HRMS法在兽药残留筛选方面的巨大潜力。本工作总结了近年来的研究成果,综述了LC-HRMS的发展及其在兽药残留分析中的应用。

1 液相色谱-高分辨质谱的发展

液相色谱能够用于分析几乎所有的兽药,但是如果一次分析多种药物,如进行多类化合物

的筛选,色谱运行的时间会相对较长。液相色谱的分离度不如气相色谱,需要优化梯度洗脱来获得适当的分离,尤其是兽药残留需要检测的动物组织样品成分复杂,由色谱的共流出物引起的基质效应几乎不可避免,分离度越好,越可以有效降低离子抑制效应。研究人员一直期望能够同时提高液相色谱的分离度和分析速度。区别于传统的高效液相色谱(HPLC),超高效液相色谱(UHPLC)的出现使人们看到了希望,其解决分离度和速度的途径有以下几种:1)提高柱温以降低流动相的粘度和极性;2)用整体柱替代颗粒填充柱;3)使用小颗粒填料^[5-7]。目前,应用最广泛的是亚 2 μm 颗粒填料技术,自问世以来已有 600 篇以上相关文献的报道。总体来说,UHPLC可以保持在原有的或更好的分离度下,提高 3~5 倍分析速度,并增加峰容量^[8-10]。

常见的高分辨质谱包括磁质谱、傅里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS)和 TOF-MS 等,其中磁质谱和 FT-MS 的购买、运行和维护价格昂贵,操作繁琐,分析速度较慢,不适合于兽药残留的常规检测,因此不做详述。TOF-MS 能够达到 5 ppm 的质量精度和较快的采样速度(10 次/秒),被越来越多的应用于兽药残留的筛选分析。TOF-MS 一直以来受人诟病的主要问题是动态范围较小,影响精确质量的测定和定量结果的准确性。当化合物的浓度过高,检测器由于信号溢出不能测定其精确质量,动态范围增强(DRE)功能的出现能有效地解决这一问题。开启 DRE 功能时,如果检测到大量的某个离子,仪器会切换到低灵敏度的模式以测定其精确质量,并根据放大因子校正响应值。Leandro 等^[11]比较了是否应用 DRE 对精确质量测定的区别,测试的药物浓度为 1.0 mg/L,如果关闭 DRE,获得的质谱图显示信号饱和,质量误差为 14 mu,而应用 DRE 后,质量误差小于 1 mu。随着 TOF-MS 离子光学系统的优化,检测器的设计运用了高速模拟数字转化技术(ADC),使 TOF-MS 从根本上获得了更宽的动态范围,在同时检测低浓度和高浓度化合物时更为精确。

LC-TOF-MS 的精确质量测定在复杂样品检测中有很好的选择性和灵敏度,同时也需要保证足够的质谱分辨率,否则在筛选时容易出现假阴性^[12]。文献中的 TOF-MS 基本上都能达到 5 ppm 的质量精度和最高 15 000 FWHM 的分

分辨率,但在分析复杂基质样品时仍会稍显不足。Orbitrap-MS 是一种结合静电场离子阱和快速傅里叶变换技术的新型质谱,2000 年首次报道^[13],并迅速得到商品化应用。Orbitrap 台式质谱拥有 100 000 FWHM 的分辨率和 2~5 ppm 的质量精度,成功的把 FT-MS 小型化,在检测兽药残留时可以降低复杂背景的干扰。但是,Orbitrap-MS 的高分辨率会牺牲扫描速度,在与 UHPLC 联用时遇到了瓶颈。UHPLC 的峰宽一般为 2~5 s,因此质谱的速度至少需要达到 5 Hz,每个色谱峰才能采集到足够的数据点,而 Orbitrap-MS 在此情况下的分辨率没有优势可言。不过 Orbitrap-MS 的发展很快,相信扫描速度更快的仪器不久将会问世。

2 液相色谱-高分辨质谱在兽药残留分析中的应用

多类药物的筛选方法在农药残留检测中早已得到广泛应用^[14-15],而在兽药残留分析中才逐渐兴起。不同种类的兽药理化性质差别较大,同时分离纯化多类药物的前处理比较困难,检测不同动物基质中兽药残留的方法也具有各自的特点。

2.1 尿液中兽药残留的检测

很多药物经肾脏排出体外,在尿液中的残留量通常很高,文献中已有大量检测尿液中兽药残留方法的报道^[16-19]。药物在尿液中大多不是游离状态,而且经常与内源性的小分子(如葡萄糖醛酸、硫酸等)形成轭合物,这为尿液中兽药残留的检测增加了难度,需要进行较长时间的酶解反应后才能有效地提取药物。活体动物的尿液采集非常困难,屠宰时动物受到惊吓产生排尿反应,膀胱中剩余的尿液已很少,不论是方法学建立时空白对照尿液的来源,还是实际样品的采集都不易解决。

Touber 等^[20]建立了牛尿中 22 种药物的 UHPLC-TOF-MS 检测方法,其中包括 17 种糖皮质激素、类固醇以及 β -受体激动剂。以含 0.1%甲酸的水和乙腈为流动相进行梯度洗脱,整个色谱运行时间为 5.5 min。UHPLC 的分离效果很好,其中作为同分异构体的地塞米松和倍他米松都得到分离。TOF-MS 的分辨率为 10 000 FWHM,每个化合物可以提取 50 mu 质量精度的质量色谱图,糖皮质激素的质量误差在

6 ppm 之内。牛尿中方法的检出限(LOD)为 0.1~3.3 $\mu\text{g/L}$,定量限(LOQ)为 0.4~4.4 $\mu\text{g/L}$ 。该方法可以很容易的扩展到别的违禁药物,当添加另外 21 种 β -受体激动剂时,对原有药物的检测没有影响。

Kaufmann 等^[21]认为 UHPLC-TOF-MS 是兽药残留筛选的新手段,并建立了检测尿液中上百种兽药的方法,包括喹诺酮类、磺胺类、硝基咪唑类、头孢类、大环内酯类、苯并咪唑类、镇静剂类、四环素类以及孔雀石绿等药物。尿样经过稀释后不用处理直接进样,单次进样的梯度洗脱总时间为 7.5 min,显示了极高的样品通量。该方法开发时使用的是常规 5 μm 颗粒色谱柱的 HPLC,进样量为 20 μL ,一般在分析 120 个样品后,由于质谱接口受到基质的干扰灵敏度会降低。最终采用了 1.7 μm 的 UHPLC,进样量减少为 5 μL ,能有效的克服灵敏度下降的问题。90%以上药物的 LOQ 都低于 10 $\mu\text{g/L}$,LOQ 值最高的乙酰磺胺和洛硝哒唑为 45 $\mu\text{g/L}$ 。提取精确质量的质量色谱图可以减少背景的干扰,但是如果提取色谱图的窗口太窄,则会丢失目标化合物,因此精确质量的窗口应该根据仪器的分辨率来选择。对于尿样中药物的确证,检测到其代谢物是强有力的证据,但是一般这些代谢物难以获得标准物质进行对照,而运用 TOF-MS 的精确质量测定和元素组成分析对代谢物的定性有很大帮助。

Stolker 等^[22]同时运用 LC-QqQ-MS 和 LC-QTOF-MS 检测牛尿中的皮质激素,并对两种技术的定性定量分析结果进行比较。研究中所用的三重四极杆和飞行时间质谱分别为 Quattro Ultima 和 Ultima API,二者均能满足兽药残留检测的要求。其中 LC-QTOF-MS 在定性分析方面具有一定的优势,一次进样的质谱图就可以定性;而 LC-QqQ-MS 有时则需要二次进样,并且 LC-QTOF-MS 的精确质量测定能够有效提高质量色谱图的选择性,排除干扰。在方法学的验证方面(如线性范围和重现性等),LC-QqQ-MS 和 LC-QTOF-MS 的性能相似,LC-QqQ-MS 仅在灵敏度上比 LC-QTOF-MS 更好。

2.2 毛发中兽药残留的检测

很多兽药和激素在动物组织内的消除速度很快,为监控违禁添加物的滥用增加了难度。区

别于肉、肝、肾等组织,毛发样品可以活体采集,不会引起动物的死亡或疼痛,运输和保存也较为容易。更为重要的是,很多药物在毛发中残留的含量高于肉、肝、肾等组织,消除趋势也很缓慢^[23-26]。在检测同化激素、 β -受体激动剂等药物残留时,选择毛发作为检测的靶组织值得推广。但是,毛发样品作为靶组织的问题在各个环节的质量控制有一定困难,难以确定目标化合物是否完全被提取出来,也不易区分阳性样品确实是药物残留还是由毛发的外部污染造成的^[27]。

Van der Heeft 等^[28]运用UHPLC-TOF-MS和UHPLC-Orbitrap-MS进行牛毛中激素残留的全扫描精确质量测定,TOF和Orbitrap的型号分别为LCT Premier TOF MS和LTQ Orbitrap XL MS。空白对照的牛毛样品经过清洗、干燥后,剪碎为1 cm左右的小段,再进行粉碎。毛发经磷酸盐缓冲液振荡提取后,加入甲醇并离心。上清液加入纯水稀释,然后用Bond Elut固相萃取柱净化,洗脱液干燥后用甲醇-乙腈-水溶液复溶,并添加14种类固醇。UHPLC-Orbitrap-MS在分辨率为60 000 FWHM时,能够检测到全部的低浓度(ng/g)添加的药物,并且质量误差小于3 ppm。对于毛发样品的分析,质量误差要小于5 ppm,提取的质量色谱图才能有效地排除基质本底的干扰。当UHPLC-TOF-MS的分辨率为10 000 FWHM或者UHPLC-Orbitrap-MS的分辨率只有7 500 FWHM时,就不能检测到所有添加的化合物。为了降低检测的假阴性率,在进行复杂样品的精确质量测定时,必须保证质谱的高分辨率。

2.3 牛奶中兽药残留的检测

牛奶的营养丰富,奶制品在人民的膳食结构中占有重要地位,牛奶中的兽药残留一直是监控的重点。集约化饲养的奶牛极易发生乳房炎等疾病,用药不当或者没有严格执行休药期就会导致牛奶中的药物残留。Stolker 等^[29]建立了牛奶中101种化合物的定量筛选方法,覆盖了苯并咪唑、大环内酯、 β -内酰胺、喹诺酮、磺胺、吡啶、四环素、硝基咪唑、镇静剂、非甾体类抗炎药、离子载体和氯霉素等12类药物。样品经乙腈提取和蛋白沉淀后,用Strata X固相萃取柱净化,然后用UHPLC-TOF-MS测定。采集全扫描的数据,根据每个药物的相对分子质量提取精确质量色谱图进行定性定量分析。按照欧盟法规中对

定量筛选方法的要求验证方法学性能,在最高残留限量的浓度水平,86%目标化合物的重复性低于20%,96%目标化合物的重现性低于40%,88%目标化合物的回收率在80%~120%之间,方法的灵敏度和线性范围也符合定量方法的标准。该方法能够准确的分辨疑似样品和阴性样品,判断药物含量是否超过最高残留限量。在运用该方法进行实际样品检测时,分析了100份牛奶样品,没有发现阳性样品,只是检验出了含有磺胺的质量控制样品。

为了提高样品的分析速度,Ortelli 等^[30]运用超滤离心技术简化样品前处理步骤,每天可以分析50个样品。牛奶样品加入乙腈沉淀蛋白,经17 000 g离心后,吸出上清液转移至3 kD的超滤离心管中,再用17 000 g离心60 min,进一步清除提取溶液中的大分子物质。超滤后的提取液经浓缩蒸发乙腈,这样就完成了样品的制备。该方法能够筛选150种常见的兽药及其代谢物,LOD在0.5~25 $\mu\text{g/L}$ 之间,远低于大部分药物的最高残留限量。乙腈沉淀蛋白结合超滤离心的方法比固相萃取法要快很多,基质效应也严重一些,不过不同来源的牛奶样品引起的基质效应基本一致,只有非班太尔和红霉素受到的影响随不同的样品而变化较大。喹诺酮类药物显示了离子增强效应,其中恩诺沙星增强了1 300%。在进行实际样品验证时,所有的阴性样品与ELISA的结果相同,而检测到含有喹诺酮类药物的疑似阳性样品与ELISA有区别。

2.4 组织中兽药残留的检测

Hermo 等^[31]应用LC-TOF-MS(型号:MSD Sciex MassHunter TOF MS)检测猪肝中8种喹诺酮类药物的多残留方法,并在方法性能上与LC-Q-MS(LC-quadrupole-MS)和LC-QqQ-MS(型号:PE Sciex API 3000)进行比较。LC-TOF-MS方法的定量限能达到1.5~6 $\mu\text{g/kg}$,所有喹诺酮的回收率均在60%以上,检测限低于2 $\mu\text{g/kg}$,在灵敏度、线性范围、准确度、精密度方面都能满足兽药残留检测的要求。LC-TOF-MS的灵敏度介于LC-Q-MS和LC-QqQ-MS之间,其LOQ值比LC-Q-MS的低1~4倍,但比LC-QqQ-MS的高1.5~6倍。不论是LC-TOF-MS和LC-QqQ-MS方法,在绘制标准曲线时,个别目标化合物高浓度点(250~300 $\mu\text{g/kg}$)的响应值会影响曲线的相关性。

LC-TOF-MS 较 LC-QqQ-MS 的优点在于化合物精确质量的测定。当运用 LC-QqQ-MS 分析恶喹酸和氟甲喹时,这两个化合物的准分子离子都是 m/z 262,有相同的碎片离子 m/z 244,色谱的保留时间也相同;而用 LC-TOF-MS 检测时,分别提取 m/z 262.071 0 和 m/z 262.087 4 就能够将二者区别开来。

同样是应用 LC-TOF-MS 检测喹诺酮类药物的残留,Zheng 等^[32]研究了固相微萃取技术纯化牛奶、鸡蛋、鸡肉和鱼肉中 7 种喹诺酮的方法。样品提取后,经在线固相微萃取净化并直接进行 LC-TOF-MS 分析。在鸡蛋、牛奶、鸡肉、鱼肉中,7 种喹诺酮的 LOD 分别为 0.3~1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.2~3.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.2~0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.2~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,标准曲线的相关系数都在 0.995 以上。在 4 种不同基质中,喹诺酮的回收率在 80~115% 之间,相对标准偏差小于 14.5%。该方法结合内标和基质添加标准曲线进行定量分析,回收率较好,但是选择氧氟沙星作为内标较为不妥,因为在实际样品中可能有氧氟沙星的残留而影响定量结果。

经反相液相色谱分离后,Carrasco-Pancorbo 等^[33]运用紫外和 TOF-MS 检测蜂蜜中 8 种四环素。不同的药物在正离子和负离子模式下灵敏度不一致,但是产生的主要碎片离子都是脱水或/或脱氨基形成的。在负离子模式下,8 种四环素的 LOD 为 0.05~0.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$,优于已有的报道,能够分析的四环素药物种类也最多。添加回收实验的浓度为 10~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率在 72%~91% 之间,相对标准偏差不超过 7%。在 LOQ 浓度附近时,检测到的四环素类药物的质量偏差基本上在 5 ppm 以下。该文指出,单独依靠高精确质量(< 1 ppm)难以有效确定化合物,结合同位素丰度比进行过滤,才能把几千种可能的化合物减少为几种候选化合物。

Hernando 等^[34]报道了检测鲑鱼中 3 种喹诺酮、红霉素、孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿、埃玛菌素的 LC-TOF-MS 方法。样品前处理采用固液萃取的方法,回收率高于 80%,恩诺沙星的回收率偏低,只有 40% 左右。在最高残留限量浓度附近进行精密度测定时,批内和批间变异系数为 2%~15%。方法的 LOD 为 1~3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,LOQ 为 3~9 $\mu\text{g}/\text{kg}$,远低于这些药物的最高残留限量,但是孔雀石绿和隐色孔雀石绿的

LOQ 分别为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,高于欧盟法规中最低要求执行限(MRPL)的标准(孔雀石绿和隐色孔雀石绿二者之和为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。该方法的线性范围从 LOQ 到 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$,相关系数大于 0.999。TOF-MS 能够增强方法的选择性,当提取质量色谱图的质量窗口由 0.2 u 变为 0.01 u 时,可以把孔雀石绿的基质干扰消除。同时,目标化合物的信噪比也从 31 提高到 120,但是继续缩小质量范围至 0.001 u 时,灵敏度变化不大。

关于高通量的兽药残留前处理方法的文献较少,分析动物组织比处理尿液和牛奶等液体样品的难度更大,Kaufmann 等^[35]优化了肉、肝、肾等组织中 100 多种兽药残留的提取和纯化方法。提取液为乙腈和 McIlvaine 缓冲溶液,加入硫酸铵使乙腈和水相提取液分层。乙腈可以沉淀蛋白,提取的杂质较少,缓冲溶液能够有效地提高极性化合物(如四环素类、青霉素类)的提取效率,并且有机相和水相分离有利于浓缩,降低乙腈在旋转蒸发时引起的损失。提取液经 Oasis HLB 固相萃取柱进一步净化,单独使用乙腈洗脱时,一些极性很强的青霉素类药物难以洗脱下来。该方法分两步洗脱,先用乙腈洗脱下大部分的目标化合物,并使固相萃取柱上吸附的蛋白变性,然后再用乙腈缓冲液洗脱,提高极性化合物的回收率,效果很好。在样品前处理的复溶、转移等步骤中,使用二甲基亚砜可以提高非极性化合物的回收率。在用 UHPLC-TOF-MS 测定时,Kaufmann 等认为 ADC 和 DRE 等技术已经显著改善了 TOF-MS 的动态范围,而选择性是 TOF-MS 的主要局限,在分析复杂样品中低质量的化合物时问题尤为突出,需要注意仪器的分辨率和质量轴稳定性。该文同时提出,快速实用的数据处理软件也有待开发,因为在分析每个样品的数据时,必须提取上百种化合物的精确质量色谱图并进行判断,工作量很大。虽然 TOF-MS 的分辨率达到 12 000 FWHM(LCT Premier TOF MS),在分析肝脏样品时干扰很多,并且不能适用于蜂蜜样品,因此考虑应用分辨率更高的 Orbitrap-MS (Orbitrap Exactive HCD) 代替 TOF-MS,却发现 Orbitrap-MS 的离子抑制非常严重,有些化合物甚至检测不到^[36]。造成这种现象的原因是离子源后起离子聚焦作用的 C-trap 捕捉到大量基质中的多电荷蛋白质而过

饱和,引起低质量离子的损失。为了解决这个问题,Kaufmann 等重新优化样品前处理方法,更彻底地沉淀样品中的蛋白质,并使用填料颗粒孔径更小的固相萃取柱。优化后的方法能够检测肌肉、肝脏、肾脏、鱼肉和蜂蜜中 100 多种兽药残留,线性范围、精密度、灵敏度均优于原来的 TOF-MS 方法,除了前处理方法的改进外,Orbitrap-MS 提供的 50 000 FWHM 分辨率和出色的质量稳定性也发挥了重要作用。

Peters 等^[37]建立了肉、鱼、鸡蛋中 100 种兽药的 UHPLC-TOF-MS 检测方法,在方法学验证时有所改进,需要制备的样品量少于原有样品量的 1/2。样品用 $V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 6 : 4$ 的溶液提取,用 Strata X 固相萃取柱净化,洗脱时肌肉和鱼肉样品用 $V(\text{甲醇}) : V(\text{乙腈}) = 1 : 1$ 的溶液洗脱,而鸡蛋样品需要 $V(\text{甲醇}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 1 : 1$ 的溶液才能有效地将吸附的药物洗脱。在 $4 \sim 400 \mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内,目标化合物的平均质量误差为 3 ppm,中值为 2.5 ppm,浓度越高误差越小,不同组织之间的差别不大。色谱的共流出物和药物相互之间也会影响测定的精确质量误差,目标化合物在杂质和药物较集中的阶段洗脱时,测定的质量误差相对较大。对化合物的定性分析同时也使用了同位素匹配的方法,用 SigmaFit 值来判断,SigmaFit 值越小则匹配度越高。SigmaFit 也是随着浓度升高而降低的,但是不同的组织对 SigmaFit 有影响,基质越复杂 SigmaFit 越高。SigmaFit 的平均值为 0.04,中值为 0.01,说明某些药物的偏差较大。方法重复性的中值在 $8\% \sim 15\%$ 之间,随着浓度升高而降低,而重现性的中值为 $15\% \sim 20\%$,不随样品和浓度的变化而变化。准确度的中值为 $70\% \sim 100\%$,92% 目标化合物的线性相关系数大于 0.99。

3 结论与展望

动物源性样品中多类兽药的大规模筛查和定量方法是解决样品通量、减少消耗的有效途径。应用高分辨质谱的全扫描和精确质量测定功能,结合超高效液相色谱技术,优化样品前处理方法,可以实现 100 多种兽药残留的同时检测。与四极杆质谱相比,高分辨质谱的参数设定简单,并适用于非定向和未知化合物的筛选,需要增加目标化合物时,不必再次处理样品和进

样,重新分析已有的全扫描数据即可。UHPLC- HRMS 作为最有潜力的分析技术,仍有很大的发展空间,TOF 的分辨率和 Orbitrap 的扫描速度有待提高,简便易用的数据处理软件也需要完善。

参考文献:

- [1] HO C, SIN D W M, WONG K M, et al. Determination of dimetridazole and metronidazole in poultry and porcine tissues by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 530: 23-31.
- [2] SHEN J Z, XIA X, JAING H Y, et al. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 1 523-1 529.
- [3] XIA X, LI X W, DING S Y, et al. Determination of 5-nitroimidazoles and corresponding hydroxyl metabolites in swine kidney by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 637: 79-86.
- [4] CHU P S, LOPEZ M I. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 8 934-8 939.
- [5] WREN S A C, TCHELITCHEFF P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1 119: 140-146.
- [6] GUILLARME D, NGUYEN D T T, RUDAZ S, et al. Recent developments in liquid chromatography: Impact on qualitative and quantitative performance[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1 149: 20-29.
- [7] WU N, CLAUSEN A M. Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations[J]. *J Sep Sci*, 2007, 30: 1 167-1 182.
- [8] NGUYEN D T T, GUILLARME D, RUDAZ S, et al. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure[J]. *J Sep Sci*, 2006, 29: 1 836-1 848.
- [9] YU K, LITTLE D, PLUMB R, et al. High-throughput quantification for a drug mixture in rat plasma - a comparison of ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass*

- Spectrom, 2006, 20: 544-552.
- [10] PETROVIC M, GROS M, BARCELO D. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2006, 1124: 68-81.
- [11] LEANDRO C C, HANCOCK P, FUSSELL R J, et al. Quantification and screening of pesticide residues in food by gas chromatography-exact mass time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2007, 1166: 152-162.
- [12] NIELEN M W F, VAN ENGELEN M C, ZUIDERENT R, et al. Screening and confirmation criteria for hormone residue analysis using liquid chromatography accurate mass time-of-flight, Fourier transform ion cyclotron resonance and orbitrap mass spectrometry techniques [J]. Anal Chim Acta, 2007, 586: 122-129.
- [13] MAKAROV A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis [J]. Anal Chem, 2000, 72: 1156-1162.
- [14] FERRER I, GARCIA-REYES J F, FERNANDEZ-ALBA A. Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry[J]. Trends Anal Chem, 2005, 24: 671-682.
- [15] GARCIA-REYES J F, HERNANDO M D, MOLINA-DIAZ A, et al. Comprehensive screening of target, nontarget and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS[J]. Trends Anal Chem, 2007, 26: 828-841.
- [16] ANTIGNAC J P, MARCHAND P, LE BIZEC B, et al. Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultra-trace level using liquid chromatography - positive electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2002, 774: 59-66.
- [17] VAN POUCKE C, VAN PETEGHEM C. Development and validation of a multi-analyte method for the detection of anabolic steroids in bovine urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2002, 772: 211-217.
- [18] KOOTSTRA P R, ZOONTJES P W, VAN TRICHT E F, et al. Multi-residue screening of a minimum package of anabolic steroids in urine with GC-MS[J]. Anal Chim Acta, 2007, 586: 82-92.
- [19] ANDERSEN J H, HANSEN L G, PEDERSEN M. Optimization of solid phase extraction clean up and validation of quantitative determination of corticosteroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2008, 617: 216-224.
- [20] TOUBER M E, VAN ENGELEN M C, GEORGAKOPOULOS C, et al. Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2007, 586: 137-146.
- [21] KAUFMANN A, BUTCHER P, MADEN K, et al. Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF): A novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine[J]. Anal Chim Acta, 2007, 586: 13-21.
- [22] STOLKER A A M, NIESING W, FUCHS R, et al. Liquid chromatography with triple-quadrupole and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for the determination of micro-constituents-a comparison[J]. Anal Bioanal Chem, 2004, 378: 1754-1761.
- [23] HOOIJERINK H, LOMMEN A, MULDER P P J, et al. Liquid chromatography - electrospray ionization - mass spectrometry based method for the determination of estradiol benzoate in hair of cattle[J]. Anal Chim Acta, 2005, 529: 167-172.
- [24] QIANG Z Y, SHENTU F Q, WANG B, et al. Residue depletion of ractopamine and its metabolites in swine tissues, urine, and serum [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 4319-4326.
- [25] ANIELSKI P, THIEME D, SCHLUPP A, et al. Detection of testosterone, nandrolone, and precursors in horse hair [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 383: 903-908.
- [26] DUNNETT M, LEES P. Retrospective detection and deposition of potentiated sulphonamides in equine hair by liquid chromatography[J]. Chromatographia, 2004, 59: S69-S78.
- [27] GRATACOS M, CASTELLARI M, VALERO A, et al. Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production[J]. J Chromatogr B, 2006, 834: 14-25.
- [28] VAN DER HEEFT E, BOLCK Y J C, BEUMER B, et al. Full-scan accurate mass selectivity of ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight and orbitrap mass spectrometry in hormone and veterinary drug residue analysis[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2009, 20: 451-463.
- [29] STOLKER A A M, RUTGERS P, OOSTERINK E, et al. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391: 2309-2322.

- [30] ORTELLI D, COGNARD E, JAN P, et al. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2009, 877: 2 363-2 374.
- [31] HERMO M P, BARRON D, BARBOSA J. Determination of multiresidue quinolones regulated by the European Union in pig liver samples high-resolution time-of-flight mass spectrometry versus tandem mass spectrometry detection[J]. J Chromatogr A, 2008, 1 201: 1-14.
- [32] ZHENG M M, RUAN G D, FENG Y Q. Evaluating polymer monolith in-tube solid-phase micro-extraction coupled to liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of quinolone antibacterials in edible animal food[J]. J Chromatogr A, 2009, 1 216: 7 510-7 519.
- [33] CARRASCO-PANCORBO A, CASADO-TERRONES S, SEGURA-CARRETERO A, et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples[J]. J Chromatogr A, 2008, 1 195: 107-116.
- [34] HERNANDO M D, MEZCUA M, SUAREZ-BARCENA J M, et al. Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon[J]. Anal Chim Acta, 2006, 562: 176-184.
- [35] KAUFMANN A, BUTCHER P, MADEN K, et al. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2008, 1 194: 66-79.
- [36] KAUFMANN A, BUTCHER P, MADEN K, et al. Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices[J]. Anal Chim Acta, 2010.
- [37] PETERS R J B, BOLCK Y J C, RUTGERS P, et al. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2009, 1 216: 8 206-8 216.

2012 年《质谱学报》征订启示

国内统一连续出版物号:CN 11-2979/TH
邮发代号:82-349

国际标准连续出版物号:ISSN 1004-2997
国外发行代号:Q 1717

《质谱学报》(双月刊)是经国家科委批准,北京中科科仪技术发展有限责任公司、中国物理学会质谱分会共同主办,中国原子能科学研究院承办的学术期刊,中国科学院《核心期刊》之一。

本刊的宗旨是刊登物理、化学、生物化学、材料化学、核科学、地球科学、生命科学等基础学科中质谱法的新理论、新方法、新技术及其在各领域的应用研究成果;介绍质谱学及其相关技术在上述前沿课题研究中的最新进展。

本刊先后被美国《化学文摘,CA》(光盘版 CODEN ZXHUBO)、英国《分析文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国科学引文数据库》、《中国科技论文数据库》、《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》、《中国期刊全文数据库(CJFD)》等多个数据库收录。

本刊国内外公开发售,大 16 开,单价:15.00 元/册,全年 90 元,全国各地邮局均可订阅,未在邮局订到者可直接向本编辑部补订,电话:010-69357734, E-mail: jcmss401@163.com, 质谱学报网址: <http://www.jcmss.com.cn>。