

超高效液相色谱-四极杆串联飞行时间高分辨质谱法筛查和确证猪肉中 117 种兽药残留

王 聪, 赵晓宇, 董 喆, 张会亮*, 曹 进, 王海燕

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘 要: **目的** 建立应用超高效液相色谱-四极杆串联飞行时间高分辨质谱对猪肉中多种类兽药残留进行筛查和确证的定性分析方法。**方法** 均匀分散的样品经提取、净化后, 通过 Acquity HSS T3 超高效液相色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 分离, 经流动相梯度洗脱后进入高分辨质谱仪检测。在正离子模式下, 通过高分辨质谱一级全扫描对样品进行分析, 与数据库中目标化合物的精确质量数、保留时间进行匹配。对疑似阳性样品进一步通过二级碎片离子扫描进行确证。**结果** 建立的分析方法对目标化合物选择性良好, 检出限在 1~80 μg/kg, 满足对快速筛查分析的方法学要求。**结论** 该方法简单、灵敏、分析速度快, 适用于猪肉中 117 种兽药化合物的筛查和确证。

关键词: 超高效液相色谱-四极杆串联飞行时间高分辨质谱法; 兽药; 筛查; 确证; 猪肉

Screening and confirmation of 117 kinds of veterinary drugs residues in pork by ultra performance liquid chromatography-quadrupole tandem time-of-flight mass spectrometry

WANG Cong, ZHAO Xiao-Yu, DONG Zhe, ZHANG Hui-Liang*, CAO Jin, WANG Hai-Yan

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish a qualitative analysis method for screening and confirming multiple veterinary drug residues in pork by ultra performance liquid chromatography-quadrupole tandem time-of-flight mass spectrometry. **Methods** The uniformly dispersed samples were extracted and purified, and then separated by an Acquity HSS T3 ultra performance liquid chromatography column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The mobile phase was eluted by gradient. In positive ion mode, the samples were analyzed by full scan of high resolution mass spectrometry. Retention time and exact mass measurements of target compounds in samples were compared with those in database. Suspected positive samples were further confirmed by product ion scanning. **Results** The established analytical method had good selectivity for the target compounds and the detection limits were in the range of 1-80 μg/kg, meeting the methodological requirements for rapid screening analysis. **Conclusion** This method is simple, sensitive and rapid, and is suitable for screening and confirming 117 veterinary drug compounds in pork.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-quadrupole tandem time-of-flight mass spectrometry;

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题资助项目 (2018C4)

Fund: Supported by the National Institutes for Food and Drug Control Foundation for Youth Development and Research Project (2018C4)

*通信作者: 张会亮, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品化妆品理化检测。E-mail: 13581817765@163.com

*Corresponding author: ZHANG Hui-Liang, Master, Assistant Professor, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: 13581817765@163.com

veterinary drugs; screening; confirmation; pork

0 引言

兽药对减少畜类动物发病^[1-2]、促进动物生长、提高产量发挥着重要作用^[3-4]。但兽药的不当使用可使其在动物体内残留,进入动物性食品中,危害食用者健康^[5-6]。现行有效的动物性食品中兽药残留检测国家标准多为液相色谱法或液相色谱-质谱法,此外还有气相色谱-质谱法、酶联免疫吸附法等,按不同种类对兽药化合物进行分类测定,其优点是适用范围较广、回收率好,缺点是实验过程复杂,一次可检测的化合物数量较少、检测耗费时间长^[7]。我国《“十三五”国家食品安全规划》中指出,现阶段我国存在“食品安全标准基础研究滞后,科学性和实用性有待提高,部分农药兽药残留等相关标准缺失、检验方法不配套”等问题^[8]。建立对动物食品中多种类兽药同时分析检测的高通量快速筛查方法具有重要意义^[9-10]。

高分辨质谱由于具有较高的分辨率(≥ 10000)和质量准确度($< 5 \times 10^{-6}$),抗基质干扰能力更强^[11-14],可简化前处理,并且同时实现对数百种化合物的快速筛查和分析,提高检验效率^[15-16]。目前我国唯一一个将高分辨质谱技术应用于多兽药残留检测的国家标准是农业农村部公告197号-9-2019《畜禽血液和尿液中150种兽药及其它化合物鉴别和确认 液相色谱-高分辨串联质谱法》,其适用范围是禽畜类血液和尿液。本研究应用超高效液相色谱串联四极杆-飞行时间高分辨质谱,依据 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》和农业农村部公告第250号规定的禁限用兽药化合物,建立了117种兽药化合物的标准数据库和标准谱库,在此基础上建立了适用于流通环节的肉类产品中兽药残留筛查和确证方法,比常规的检测方法具有更高的筛查效率,且省去了大量随行标准品,节约实验成本。该方法用于日常检测可进一步提升对食品中兽药及其他化合物的筛查检测能力,为全面加强食品污染物和食品中有毒有害物质监测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1290超高效液相色谱仪串联6540四极杆-飞行时间质谱仪,配电喷雾离子源Dual-ESI(美国Agilent公司);XP205十万分之一分析天平、AL204万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);Vortex Genie涡旋振荡仪(美国Scientific Industries公司);AriumPro超纯水系统(德国

Sartorius公司)。

甲醇、乙腈(质谱纯,美国Fisher公司);甲酸(质谱纯,美国Sigma公司);117种兽药(见表1)标准溶液(纯度高于94%,浓度约为100 $\mu\text{g/mL}$,阿尔塔科技有限公司);氯化钠、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)二钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);嘌呤乙腈-水溶液(90:10, V/V;浓度为5.0 mmol/L)、六(1H,1H,3H-全氟丙氧基)磷氮乙腈溶液(浓度为2.5 mmol/L)(美国Agilent公司);多兽残专用净化包(天津博纳艾杰尔科技有限公司);Acquity HSS T3 UPLC色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm , 美国Waters公司)。

1.2 试剂及标准溶液的配制

1.2.1 标准工作溶液的配制

用甲醇对混合标准溶液进行稀释,配制质量浓度约为20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液,作为建立标准谱库及方法学考察的标准工作液。

1.2.2 参比溶液配制

测定时对质谱质量轴进行实时校正,分别量取嘌呤乙腈-水溶液1.0 mL、六(1H,1H,3H-全氟丙氧基)磷氮乙腈溶液0.45 mL,用乙腈-水(90:10, V/V)溶液定容到1 L。

1.2.3 试剂配制

0.1 mol/L 乙二胺四乙酸二钠水溶液:取乙二胺四乙酸二钠约3.72 g至100 mL容量瓶中,加水溶解并定容。

5%甲酸-乙腈提取液:取甲酸5 mL与乙腈95 mL混合均匀。

1.3 仪器条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Acquity HSS T3 UPLC色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm);柱温30 $^{\circ}\text{C}$;进样体积2 μL ;流速0.2 mL/min;流动相A为含0.1%甲酸的水,B为乙腈,梯度洗脱程序:0~1.0 min, 5% B;1.0~9.0 min, 5%~50% B;9.0~13.0 min, 50%~95% B;13.0~15.0 min, 95% B;15.0~15.1 min, 95%~5% B;15.1~18.0 min, 5% B。保留时间(retention time, RT)及检出限(limit of detection, LOD)等见表1。

1.3.2 质谱条件

采集模式:正离子;离子源:带双喷雾器的电喷雾离子源;检测方式:MS Scan, Targeted MSMS Scan;碰撞气:氮气;干燥气温度:350 $^{\circ}\text{C}$;干燥气流速:10 L/min;喷雾气压力:40 psi;毛细管电压:3500 V;毛细管出口电压:125 V;锥孔电压:65 V;碰撞能量:10、20、40 eV;参比离子: m/z 121.0509和 m/z 922.0097。质荷比见表1。117种化合物的提取色谱图见图1。

表 1 117 种兽药化合物的分子式、保留时间、质荷比及检出限
Table 1 Molecular formula, retention times, mass/charge ratio and detection limits of 117 veterinary drug compounds

序号	中文名称	分子式	质荷比(<i>m/z</i>)	RT/min	LOD/(μg/kg)
1	阿奇霉素	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	749.5171	7.2	13
2	红霉素	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	734.4685	8.9	28
3	林可霉素	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	407.2217	5.3	20
4	罗红霉素	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837.5318	10.2	5
5	维吉尼霉素 M1	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₇	526.2548	11.1	20
6	维吉尼霉素 S1	C ₄₃ H ₄₉ N ₇ O ₁₀	824.3630	12.4	10
7	二甲氧甲基苯氨嘧啶	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₂	275.1508	6.2	2
8	磷酸竹桃霉素	C ₃₅ H ₆₁ NO ₁₂	688.4267	8.5	4
9	吉他霉素	C ₄₀ H ₆₇ NO ₁₄	786.4634	10.5	60
10	泰乐菌素	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916.5264	9.2	5
11	替米考星	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	869.5752	8.7	26
12	磺胺胍	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	215.0599	1.6	3
13	甲氧苄啶	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	291.1452	5.9	3
14	磺胺二甲异嘧啶	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279.0913	5.0	16
15	磺胺醋酰	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	215.0486	5.1	13
16	磺胺嘧啶	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	251.0599	5.5	5
17	磺胺吡啶	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	250.0646	5.9	5
18	磺胺噻唑	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	256.0211	5.8	10
19	磺胺甲基嘧啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	265.0757	6.2	2
20	磺胺恶唑	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	268.0755	6.5	30
21	磺胺二甲基嘧啶	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279.0910	6.8	9
22	磺胺甲氧哒嗪	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281.0717	7.0	2
23	磺胺甲噻二唑	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	271.0319	6.9	7
24	磺胺对甲氧嘧啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281.0720	7.1	3
25	磺胺间甲氧嘧啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281.0706	7.6	2
26	磺胺氯哒嗪	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	285.0210	7.9	4
27	磺胺多辛	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311.0812	8.1	1
28	磺胺甲恶唑	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	254.0597	8.3	3
29	磺胺二甲异噁唑	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	268.0754	8.6	4
30	磺胺苯酰	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	277.0645	9.2	3
31	磺胺间二甲氧嘧啶;	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311.0812	9.3	3
32	磺胺喹恶啉	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	301.0756	9.3	13
33	磺胺苯吡唑	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	315.0914	9.5	5
34	磺胺硝苯	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₅ S	336.0652	11.2	48
35	磺胺异唑	C ₉ H ₉ N ₃ O ₃ S	240.0439	7.3	5
36	磺胺氯吡嗪	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	285.0211	9.2	10
37	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₂	189.0659	6.8	16
38	达氟沙星	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	358.1567	6.4	8
39	恩诺沙星	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	360.1724	6.6	4
40	西诺沙星	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₅	263.0665	8.2	2

表1(续)

序号	中文名称	分子式	质荷比(m/z)	RT/min	LOD/($\mu\text{g/kg}$)
41	环丙沙星	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$	332.1405	6.2	9
42	依诺沙星	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}_3$	321.1357	5.9	21
43	加替沙星	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_4$	376.1669	6.8	3
44	吉米沙星	$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_5\text{O}_4$	390.1576	7.3	15
45	马波沙星	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{FN}_4\text{O}_4$	363.1479	5.9	26
46	莫西沙星	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_4$	402.1827	7.4	4
47	那氟沙星	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}_4$	361.1561	9.8	4
48	萘啶酸	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$	233.0923	10.3	4
49	氧氟沙星	$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$	362.1511	6.1	5
50	奥比沙星	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$	396.1530	6.7	1
51	恶喹酸	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_5$	262.0711	8.8	2
52	司帕沙星	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3$	393.1739	7.1	2
53	沙拉沙星	$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$	386.1314	7.1	3
54	双氟沙星	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$	400.1474	7.2	2
55	氟甲喹	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FNO}_3$	262.0876	10.6	4
56	吡哌酸	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$	304.1409	5.4	24
57	氟苯尼考胺	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FNO}_3\text{S}$	248.0755	1.4	27
58	噻苯咪唑	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$	202.0436	5.5	10
59	阿苯达唑	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$	266.0961	9.4	1
60	阿苯达唑砒	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	298.0862	8.1	2
61	阿苯达唑亚砒	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	282.0911	6.6	3
62	阿苯达唑-2-氨基砒	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$	240.0806	5.5	7
63	5-硝基苯并咪唑	$\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$	164.0454	5.9	5
64	噻苯咪唑酯	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	303.0914	7.7	2
65	卡硝唑	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$	245.0699	8.7	23
66	氯甲硝咪唑	$\text{C}_4\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}_2$	162.0064	6.5	23
67	地美硝唑	$\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$	142.0611	5.2	12
68	芬苯达唑;	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$	300.0801	10.9	1
69	奥芬达唑砒	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	332.0703	9.5	3
70	氟苯咪唑	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_3$	314.0940	10.0	1
71	羟甲基甲硝咪唑	$\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3$	158.0560	4.7	20
72	异丙硝唑	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$	170.0926	8.6	2
73	羟基异丙硝唑	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$	186.0875	7.0	5
74	甲苯咪唑	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$	296.1035	9.5	2
75	5-羟基甲苯咪唑	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$	298.1190	7.3	1
76	5-羟基噻苯咪唑	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{OS}$	218.0383	5.0	3
77	奥芬达唑	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	316.0754	7.9	2
78	奥苯达唑	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$	250.1189	8.0	1
79	氨苄西林	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	350.1160	5.7	8
80	头孢氨苄	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	348.1019	5.9	14

表 1(续)

序号	中文名称	分子式	质荷比(<i>m/z</i>)	RT/min	LOD/($\mu\text{g/kg}$)
81	青霉素 G 钾	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	335.1062	9.8	18
82	苯唑西林	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	402.1118	11.0	21
83	头孢噻吩	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_3$	524.0365	8.6	6
84	杀虫脒	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2$	197.0841	6.7	1
85	孔雀石绿	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2$	331.2169	11.0	11
86	环丙氨嗪	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_6$	167.1041	2.3	30
87	二嗪农	$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$	305.1089	14.1	1
88	三氮脒	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_7$	282.1462	4.3	20
89	乙氧酰胺苯甲酯	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$	238.1077	9.0	7
90	左旋咪唑	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$	205.0796	5.5	7
91	氯苯胍	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_5$	334.0621	11.8	10
92	二硝托胺	$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_5$	226.0461	8.3	7
93	甲基三嗪酮	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	426.0736	13.3	20
94	蝇毒磷	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClO}_5\text{PS}$	363.0220	14.0	15
95	倍硫磷	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{PS}_2$	279.0273	13.8	56
96	倍硫磷砒	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{PS}_2$	311.0175	11.9	21
97	马拉硫磷	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{PS}_2$	331.0434	13.2	4
98	辛硫磷	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$	299.0617	14.1	80
99	巴胺磷	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{PS}$	282.0922	6.5	1
100	敌百虫	$\text{C}_4\text{H}_8\text{Cl}_3\text{O}_4\text{P}$	256.9296	7.1	6
101	2,4-二甲基苯胺	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$	122.0965	5.4	4
102	3-氨基-2-甲基-5-硝基苯甲酰胺	$\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$	196.0720	5.3	25
103	氨丙啉	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4$	243.1606	1.3	5
104	癸氧唑酯	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_5$	418.2597	14.6	2
105	苯硫氨酯	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$	447.1339	13.1	1
106	氢溴酸常山酮	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_3$	416.0193	7.9	3
107	多西环素	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$	445.1605	7.9	13
108	土霉素	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$	461.1554	6.1	14
109	金霉素	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_8$	479.1218	7.6	18
110	四环素	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$	445.1609	6.5	8
111	呋喃它酮	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6$	325.1148	5.2	7
112	呋喃唑酮	$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_5$	226.0459	7.7	7
113	安眠酮	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$	251.1179	11.1	1
114	氯丙嗪	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{S}$	319.1030	10.5	3
115	地西洋	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$	285.0793	12.0	1
116	塞拉嗪	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}$	221.1110	6.9	2
117	氮哌醇	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}$	330.1976	5.9	29

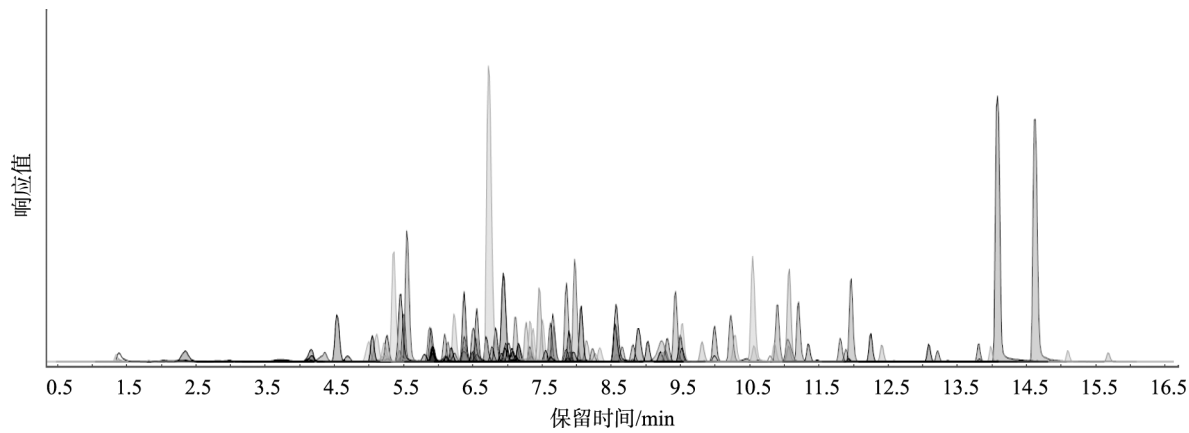


图 1 117 种化合物的提取色谱图
Fig.1 Extraction chromatograms of 117 compounds

1.3.3 标准数据库及谱库的建立

用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨质谱对标准工作液在 MS Scan 模式下进行一级全扫描, 根据获得的精确质量数及保留时间等信息, 建立一级标准数据库。标准数据库包含化合物的中、英文名称, CAS 号, 精确质量数, 质荷比(m/z), 保留时间等信息。

通过 Targeted MSMS 模式对标准工作液进一步进行二级碎片离子扫描, 分别获取 10、20、40 eV 3 个碰撞能级下的二级碎片离子质谱图, 根据精确质量数和生成分子式等信息对碎片离子进行过滤, 获得二级标准指纹图谱, 形成标准谱库。

1.3.4 样品筛查与确证

对样品进行 MS Scan 一级全扫描, 根据建立的标准数据库中的保留时间和 m/z 的精确质量数对目标化合物进行筛查。当保留时间在 ± 0.5 min 且 m/z 的精确质量数偏差在 10^{-5} 范围内时, 检测结果为疑似阳性样品, 否则判定为阴性样品。

根据欧盟 2002/657/EC 准则^[17], 应用高分辨质谱对目标化合物进行分析时, 有 1 个母离子和 1 个子离子、或 2 个子离子匹配则确证分析的样品含有该化合物。对于疑似阳性样品, 进一步在 Targeted MSMS 模式下针对疑似含有的化合物进行二级特征碎片离子扫描, 当有 2 个或以上丰度较高的碎片离子与标准谱图中相应的碎片离子精确质量数偏差小于 10^{-5} , 且碎片离子的相对丰度比在表 2 的最大允许偏差范围内时, 确证含有该化合物。

1.4 样品制备

取搅碎后的样品 2.5 g, 精密称定, 置于 50 mL 离心管中, 加入 0.1 mol/L 的 EDTA-2Na 溶液 5 mL, 涡旋使样品分散, 加入含 5% 甲酸的乙腈提取液 9.5 mL, 涡旋混匀后加入氯化钠 5 g, 涡旋 1 min, 于 8000 r/min 的转速下离心 5 min,

上清液定容至 10 mL。取上清液 1 mL 加入多兽残专用净化包, 涡旋混合 30 s, 于 8000 r/min 离心 5 min。上清液过 0.22 μm 滤膜后, 经超高效液相色谱分离后进入高分辨质谱分析。

表 2 定性分析确证时相对离子丰度的最大允许偏差
Table 2 Maximum permissible deviation of relative ionic abundance in qualitative analysis and confirmation

相对离子丰度/%	$k > 50$	$50 \geq k > 20$	$20 \geq k > 10$	$k \leq 10$
允许的相对偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

2 结果与分析

2.1 仪器条件优化

对高分辨质谱的检测模式进行了考察, 比较了常用的扩展动态范围模式(2 GHz)和高分辨模式(4 GHz)对检测的影响。结果表明, 参比离子(m/z 121.0509 和 m/z 922.0097)在高分辨模式下的测量偏差较扩展动态范围模式低, 因此选择高分辨模式(4 GHz)进行检测。

对进样量进行优化, 分别考察了进样量为 2、5、8、10 μL 时的色谱峰情况。实验结果表明, 增加进样量可能使溶剂效应增加, 不同化合物受进样量变化的影响不同, 例如对保留时间均为 5.2~5.3 min 的化合物, 林可霉素受进样量变化影响较小, 地美硝唑的色谱峰受溶剂效应影响较大, 随进样量增加出现峰前延等改变, 见图 2。另外, 进样量增加时, 尽管进入检测器的目标化合物的量增加, 但是基质也随之增加, 因此增加进样量不一定会显著增加目标化合物的响应。最终选择进样量为 2 μL , 降低溶剂效应的影响, 目标化合物具有较好的峰形。

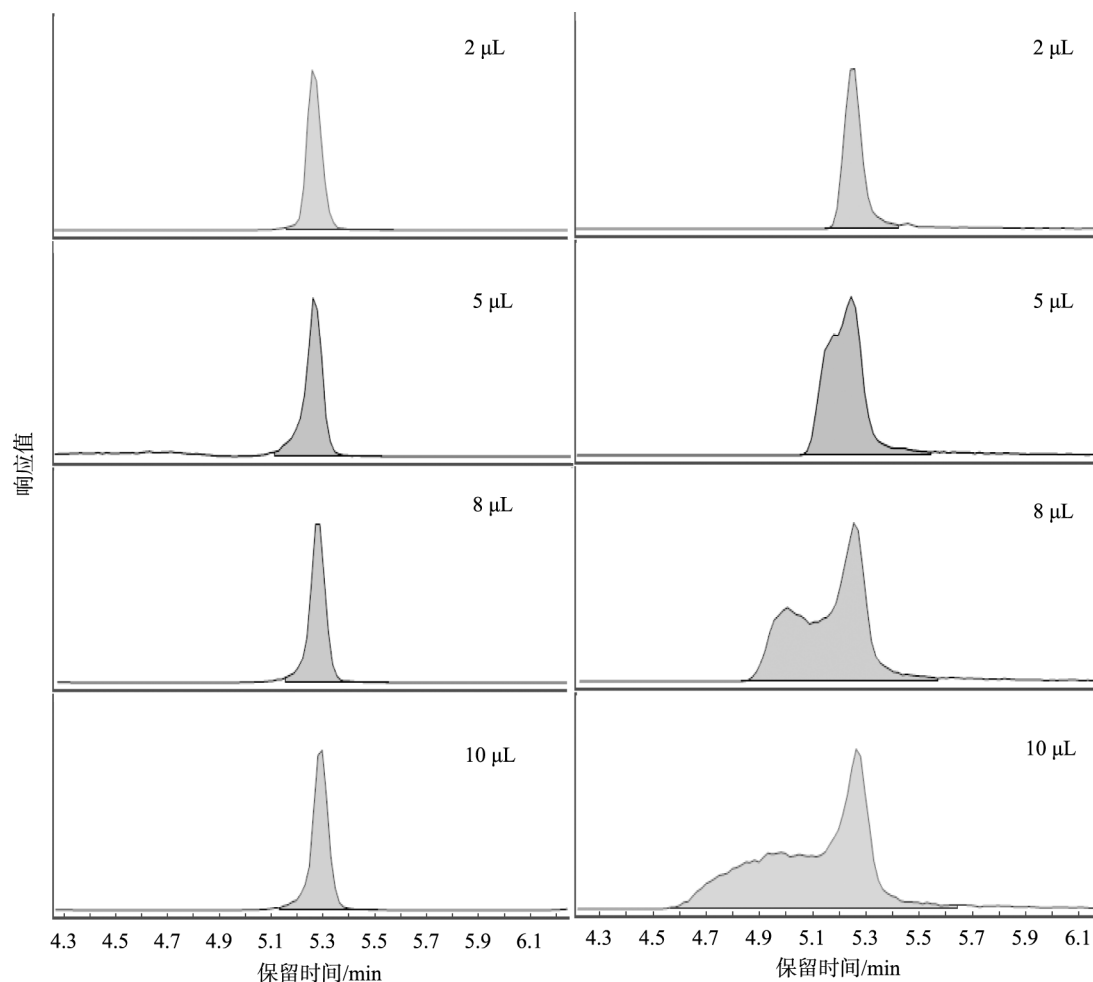


图2 进样量对林可霉素(左)、地美硝唑(右)色谱峰形的影响

Fig.2 Effect of injection volume on chromatographic peak shape of lincomycin (left) and demidazole (right)

2.2 前处理方法优化

对分散溶剂进行考察。实验中发现,当搅碎的肉类样品中直接加入有机溶剂提取时,样品发生团聚而无法分散,不利于提取。在样品中加入水后涡旋,样品的分散情况较好。根据文献报道,四环素类化合物与钙离子、镁离子等金属离子络合后进一步与大分子位点结合起作用^[18-19],该类化合物与肉中的金属离子和蛋白结合使其提取率下降。乙二胺四乙酸二钠可作为螯合剂与金属离子络合,将四环素类化合物从结合物中解离^[20]。本研究使用 0.1 mol/L 乙二胺四乙酸二钠水溶液对样品进行分散。

对提取溶剂中酸的浓度进行了优化。用外标一点法考察了乙腈中甲酸浓度分别为 0、1%、2%、5%、8%时目标化合物的提取率。实验结果表明,当乙腈中甲酸浓度为 5%时,部分 β -内酰胺类抗生素、咪唑类化合物、四环素类抗生素及部分喹诺酮类化合物、杀虫剂的提取率较好(图 3A); β -受体激动剂、大环内酯类抗生素、磺胺类化合物、部分 β -内酰胺类抗生素及部分喹诺酮类化合物在甲酸浓度为

2%、5%时的提取率较为接近,且优于其他几个浓度,见图 3B;个别化合物当甲酸为 0 或 1%时具有较好的提取率,如氯丙嗪当乙腈中不加甲酸时的提取率较好。经综合考虑,本研究采用 5%甲酸-乙腈作为提取液。

在此基础上对提取溶液的体积进行了考察。分别考察了 2.5 g 样品经 9.5 mL 提取液提取后定容至 10 mL(A 组)、5 g 样品经 9.5 mL 提取液提取后定容至 10 mL(B 组)及 5 g 样品经 24 mL 提取液提取后定容至 25 mL(C 组)时的提取率。在不同种类的化合物中各选取响应较高的几种化合物作为代表,分别按照上述样品组的设置进行实验。结果表明,43 种化合物中有 37 种化合物在 A 组的提取率(67%~89%)高于 B 组(49%~81%)和 C 组(53%~75%),因此选择样品量为 2.5 g,提取液体积为 9.5 mL。

2.3 方法学确认

2.3.1 选择性

选取猪肉空白基质,按样品前处理方法和仪器条件进行分析,考察空白基质对目标化合物检测的干扰,结果

表明空白基质中均未检出目标化合物, 空白基质对检测无干扰; 在空白基质中加入 117 种兽药化合物的混合标准溶液, 经前处理和仪器分析后, 提取色谱图见图 1, 各兽药化合物检测互不干扰, 方法选择性较好。

2.3.2 检出限

用猪肉空白基质配制不同浓度的混合标准溶液, 以 3 倍信噪比考察方法检出限, 结果见表 1。在 117 种化合物中, 有 80 种化合物的检出限不高于 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 除磺胺硝苯、倍硫磷、吉他霉素、辛硫磷外, 其他化合物的检出限均在 1~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 可满足对多残留筛查的需求。

2.4 实际样品的测定

在超市购买猪肉样品 25 份, 用建立的定性筛查方法对样品进行检测, 1 批样品中疑似含有地西洋, 进一步对其进行二级碎片离子扫描, 在 20 eV 的碰撞能量下, 样品图谱中 2 个丰度较高的碎片离子分别为 285.0791、154.0418, 标准图谱中对应的 2 个碎片离子精确质量数为 285.0789、154.0418, 其偏差分别为 0.7×10^{-6} 、0, 均小于 10^{-5} ; 2 个离子的相对丰度比分别为 11.9%、12.1%, 符合表 2 的要求, 确证该样品中含有地西洋(见图 4)。

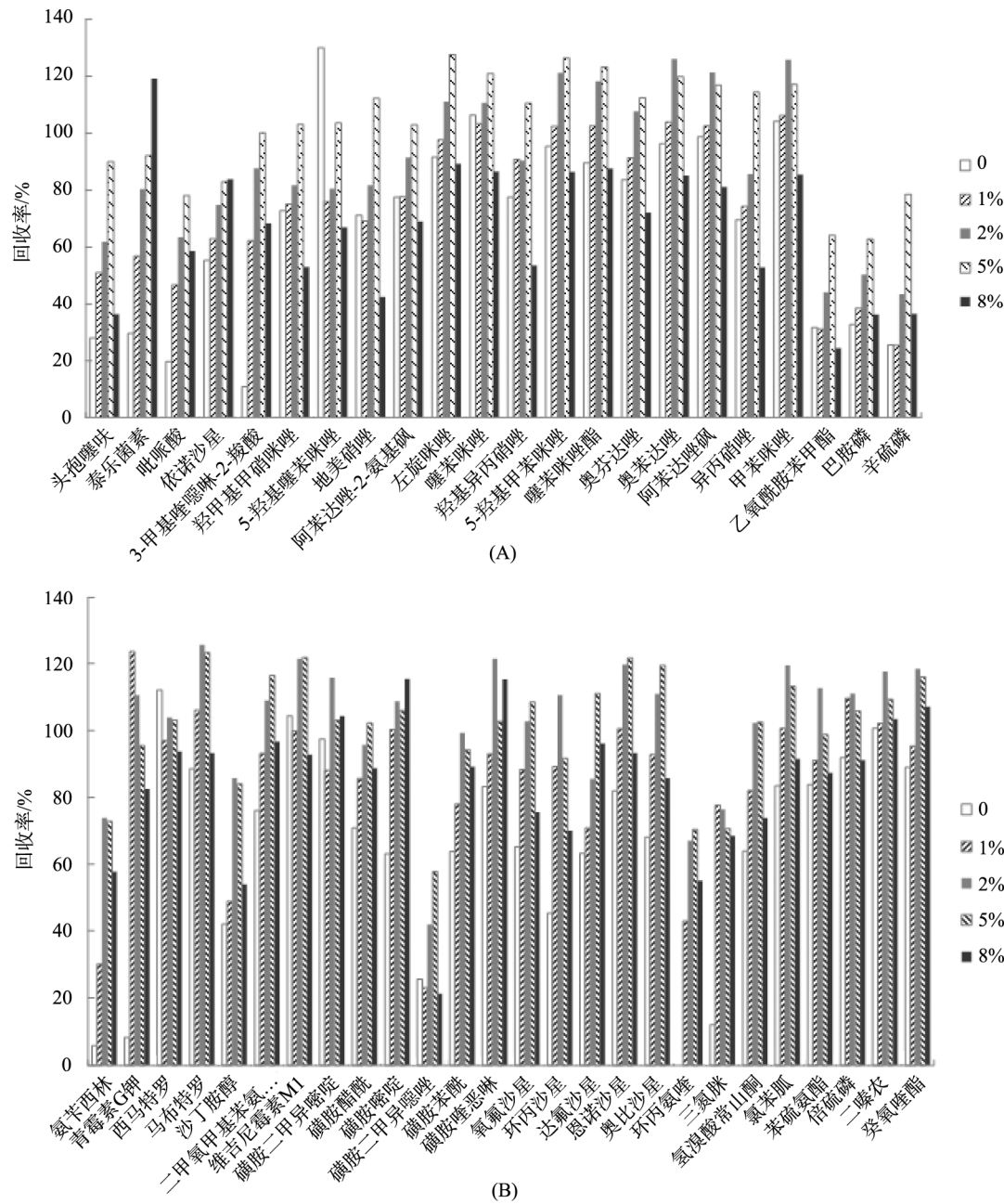
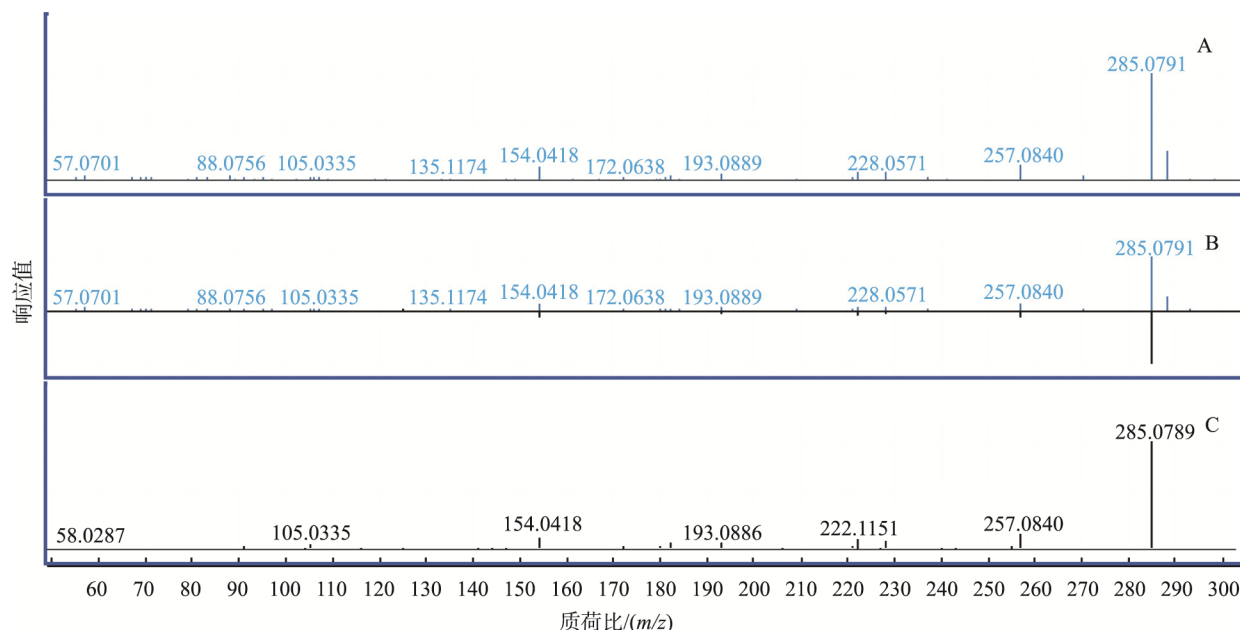


图 3 不同浓度的甲酸对提取效率的影响
Fig.3 Effect of different concentrations of formic acid on extraction efficiency



注: A: 样品质谱图; B: 镜像图; C: 标准谱图。

图 4 阳性样品与标准图谱的比对

Fig.4 Comparison spectrum between positive samples and standards

3 结论与讨论

本研究应用超高效液相色谱串联四极杆-飞行时间高分辨质谱建立了 117 种禁限用兽药的标准数据库和谱库, 可通过将样品与标准谱库进行比对完成筛查和确证, 实现了实际标物向电子标物的转化。此外, 建立了可对肉中 117 种化合物进行筛查和确证的分析方法, 前处理简单, 借助高分辨质谱的快速扫描分析及定性能力强的特点, 提高筛查效率, 为食品中兽药残留筛查和分析提供了参考, 也为食品安全监管提供了技术支持。

参考文献

- [1] GOETTING V, LEEK A, TELL LA. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2011, 34(6): 521–556.
- [2] Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Eighty-first report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives [J]. *World Health Organ Tech Rep*, 2016, 815(997): 1.
- [3] IBARRA IS, MIRANDA JM, PÉREZ-SILVA I, *et al.* Sample treatment based on molecularly imprinted polymers for the analysis of veterinary drugs in food samples: A review [J]. *Anal Methods*, 2020, 12: 2958–2977.
- [4] 赖秀梅, 李亚, 梁剑锋, 等. UPLC-MS/MS 测定鱼肉中 4 种硝基呋喃类药物代谢物残留量的方法研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2020, 4: 65–70.
LAI XM, LI Y, LIANG JF, *et al.* Determination of four metabolites of nitrofurans in fish by UPLC-MS/MS [J]. *Cereal Feed Ind*, 2020, 4: 65–70.
- [5] 范赛, 张楠, 刘平, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物性食品中 20 种 β -阻断剂残留[J]. *卫生研究*, 2020, 49(5): 839–835, 867.
FAN S, ZHANG N, LIU P, *et al.* Determination of 20 kinds of β -receptor blockers in animal foods by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Hyg Res*, 2020, 49(5): 839–835, 867.
- [6] AGUILERA-LUIZ MM, VIDAL JLM, ROMERO-GONZ LR, *et al.* Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2012, 132(4): 2171–2180.
- [7] 李云飞, 张薇, 高燕, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定动物源性食品中 33 种兽药残留及质谱库的建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(2): 629–635.
LI YF, ZHANG W, GAO Y, *et al.* Detection of veterinary drug residues in animal-derived foods by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and establishment of mass library [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 629–635.
- [8] 国务院. “十三五”国家食品安全规划 [EB/OL]. [2020-02-21]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-02/21/content_5169755.htm. [2020-12-29].
The state council of the People's Republic of China. 13th five-year plan for national food safety [EB/OL]. [2020-02-21]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-02/21/content_5169755.htm. [2020-12-29].
- [9] 祝伟霞, 杨冀州, 李睢, 等. 液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速分析动物源性食品中多肽类药物残留[J]. *色谱*, 2017, 35(2): 156–161.
ZHU WX, YANG JZ, LI S, *et al.* Quick determination of polypeptide drug residues in animal-origin foods by high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(2): 156–161.
- [10] 郭添荣, 叶梅, 柯欢, 等. 高分辨质谱在动物源食品兽药残留检测中的应用[J]. *食品科技*, 2020, 45(7): 371–377.
GUO TR, YE M, KE H, *et al.* Application of high resolution mass

- spectrometry in the detection of veterinary drug residues in animal foods [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(7): 371–377.
- [11] 李露青, 李双, 王春芳, 等. 92种工业染料在四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱中的离子化规律[J]. 理化检验(化学分册), 2020, 56(3): 308–314.
- LI LQ, LI S, WANG CF, *et al.* Regularities of ionization of 92 industrial dyes by Q-orbitrap-high resolution mass spectrometry [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2020, 56(3): 308–314.
- [12] AVAGYAN R, WESTERHOLM R. Target and suspect screening of OH-PAHs in air particulates using liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Talanta, 2017, 165: 702–708.
- [13] 贺美莲, 郭常川, 石峰, 等. Orbitrap 高分辨质谱技术在药物分析领域中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 105–110.
- HE ML, GUO CC, SHI F, *et al.* Application progress of orbitrap high resolution mass spectrometry in the field of pharmaceutical analysis [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(1): 105–110.
- [14] TAN HJ, GUO CC, XING S, *et al.* Application of orbitrap high resolution mass spectrometry for the screening and identification of 15 adulterated weight loss compounds in dietary supplement [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(9): 969–976.
- [15] DOMINGUEZ I, FRENICH AG, ROBERTO RG. Mass spectrometry approaches to ensure food safety [J]. Anal Methods, 2020, 12(9): 1148–1162.
- [16] GUO Z, ZHU Z, HUANG S, *et al.* Non-targeted screening of pesticides for food analysis using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry-A review [J]. Food Addit Contam: Part A, 2020, 37(7): 1–22.
- [17] EU. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 [S].
- [18] VARTANIAN VH, GOOLSBY B, BRODBELT JS. Identification of tetracycline antibiotics by electrospray ionization in a quadrupole ion trap [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 1998, 9(10): 1089–1098.
- [19] 杨旭, 王建华. 四环素类金属离子配合物应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, (11): 362–366.
- YANG X, WANG JH. Research of current situations and development of the complexes of tetracyclines with metal ions [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, (11): 362–366.
- [20] 方从容, 高洁, 王雨昕, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中125种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(11): 1119–1131.
- FANG CR, GAO J, WANG YX, *et al.* Determination of 125 veterinary drugs residues in eggs by QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(11): 1119–1131.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



王 聪, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品化妆品理化检测。
E-mail: wangcong351@126.com



张会亮, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品化妆品理化检测。
E-mail: 13581817765@163.com