

赛默飞兽药筛查整体解决方案

郭藤 陈冰 王伟 彭倩 温海燕 周哲 吕晨 张雅萍 徐牛生 金琦芸 江铮

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词：Orbitrap；Q-Exactive；兽药筛查；TraceFinder；HyperSep Retain-PEP；Accucore RP-MS

前言

目前常见的兽药主要有喹诺酮类、 β -受体激动剂类、磺胺类、大环内脂类、激素类、氯霉素类、头孢类、青霉素类等化合物。过量服用这些药物的畜禽可通过代谢途径进入动物体内，最终通过食物链在人体内蓄积，导致过敏反应和使人体产生抗药性的副作用，甚至是更严重的危害。相关标准和文献报道的多种类兽药同时分析尚不多见，主要原因一方面是兽药及其代谢物多达几百种，化学特性差异极大，既有强极性的水溶性化合物又有完全非极性的脂溶性化合物；另外，肉类样品含有较多的蛋白质（15-25%）、脂肪（5-25%）和磷脂（1-3%），使得基质非常复杂。开发有效、快速、化合物通量高的样品前处理方法成为实现利用LC-MS/MS对多种类兽药同时筛查和确证的必要前提；同时开发多兽药残留检测的LC/MS/MS仪器方法也具有相当的挑战性，对仪器的灵敏度、抗基质干扰能力、分辨率等性能均有较高的要求。因此，亟需一套完整可靠的分析方法对肉类食品中的多种兽药残留进行筛查，以提高食品安全监管水平，保障公众健康和安全。

HyperSep Retain SPE 小柱是一款经过官能团改性、容量大、纯度高的多孔聚苯乙烯DVB 材料，采用通过式的快速净化方法，可以清除掉肉类样品中的大部分蛋白质、脂肪及磷脂干扰物，样品前处理过程简单、方便、快速。同时可以有效地降低质谱分析中的基质效应，使实验数据更加稳定可靠，延长色谱柱寿命，减少仪器维护成本。采用Accucore RP-MS色谱柱，表面多孔增强核技术的运用，使其具有卓越的峰形、出色的分离速度和分离能力，特别优化后的高柱效和低拖尾，非常适用于 MS 检测。

Q-Exactive 是赛默飞世尔科技推出的新型高分辨质谱仪，它将高性能四极杆的离子选择与Orbitrap高分辨准确质量（HR/AM）测量技术相结合，具有高达140000FWHM的分辨率和长期稳定的高质量精度，可获得高质量的一级、二级质谱图，保证筛查结果的可靠和准确性；并提供各种高分辨扫描功能以适应不同的应用需要。同时具有媲美高端三重四极杆的定量能力，可轻松定量复杂基质中痕量兽药残留。

本应用旨在解决上述具有挑战性难题，研究开发了一套专门针对动物源食品中常见兽药残留快速筛查和确证的LC/MS/MS方法。实验选择了猪肉、猪肝、鸡肉、鸭肉、进行实验，并在样品中添加了200多种常见兽药，加标浓度为1.0ug/Kg和5.0ug/Kg。实验采用酸化乙腈/水进行提取并沉淀蛋白，使用HyperSep Retain-PEP SPE小柱对样品进行快速有效的净化，Accucore RP-MS色谱柱对多种兽药的有效分离，结合高分辨质谱Q-Exactive快速筛查和确证样品中多兽药残留。实验结果表明，1.0ug/Kg添加浓度在基质中兽药残留检出率均在84%以上，5.0ug/Kg添加浓度在基质中兽药残留检出率均在92%以上。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Dionex Ultimate UHPLC3000 超高效液相色谱；Thermo Fisher Scientific Q Exactive 四极杆轨道阱质谱，配ESI源；色谱柱Thermo Fisher Accucore RP-MS（2.1×100mm, 2.6 μ m, 17626-102130）。乙腈（色谱纯，Fisher Scientific）；甲醇（色谱纯，Fisher Scientific）；甲酸（色谱

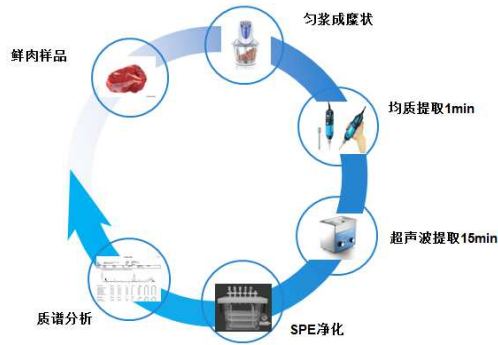
纯，Fisher Scientific）；HyperSep Retain-PEP SPE(60mg/3ml, 60107-203)柱。所用水均为超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

准确称取 2.5g 样品至 50mL 离心管中，先加入 1mL 水混匀，再加入 9mL 含 0.5%甲酸-乙腈，涡旋分散混匀；用手持均质器提取 1~2min（若无均质器建议用震荡提取 20min 代替），40℃超声波提取 15min，4℃12000r/min 离心 5min，上清液待净化。。

依次用 3mL 甲醇，3mL 水活化 SPE 柱，把水抽干，取 2mL 上清液上样，收集滤液，（抽干）准确取 1mL 至 1.5mL 离心管中，氮吹至近干，用 0.2mL 甲醇/水（4:6）复溶，15000r/min 离心 5min，取上清液质谱分析。



1.2.2 仪器条件

色谱柱：Accucore RP-MS（2.1×100mm，2.6μm）；正模式流动相 A：水（0.1%甲酸）；流动相 B：乙腈（0.1%甲酸）；负模式流动相 A：水（0.03%氨水）；流动相 B：乙腈（0.03%氨水）流速：0.3 mL/min；进样量：5μL；柱温：30℃。流动相洗脱梯度见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A	B	流速： μL/min
0.00	95	5	300
15.0	5	95	300
17.0	5	95	300
17.1	95	5	300

质谱条件：ESI源，不同于三重四极杆，Orbitrap 高分辨质谱不需要对每个化合物优化质谱条件和碰撞能量，因此在方法开发方面花费的时间大大减小。离子源参数和质谱扫描参数见表2。

表 2 质谱扫描参数

参数名称	设置
喷雾电压	3500/3000v（+/-）
雾化温度	400℃
离子传输管温度	350℃
鞘气	40
辅助气	5
反吹气	1
Full Scan Resolution	70000
Full Scan Mass Range	100~1000m/z
ddMS2 Resolution	17500

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法

实验比较了乙腈/水（8:2）和乙腈/水（9:1）的提取效果，结果表明两种溶剂对大多数目标物提取效率影响不明显，但是乙腈/水（8:2）需要花费几倍时间和更高的氮吹温度才能挥干。因此最终选用乙腈/水（9:1）作为提取溶剂，可以节约大量时间。同时比较了 2%、0.5%、0.2% 甲酸浓度对提取效果的影响，实验结果表明 2% 甲酸蛋白沉淀效果最好，对激素类化合物提取效果更好，但对碱性化合物提取效果比 0.5% 和 0.2% 提取效果差，而且较高浓度的甲酸会残留在样品中使得一些极性化合物受溶剂效应影响明显，峰形很差。另外实验比较了只沉淀蛋白、QuEChERS、HyperSep Retain-PEP SPE 柱之间的去除干扰效果，实验结果如图 1，表明经 HyperSep Retain-PEP SPE 柱净化的样品本底和脂类干扰物明显低于另外两种净化方式，可以有效地去除大部分脂肪和磷脂，并且采用样品通过式的净化方式可以极大的提高样品处理通量。HyperSep Retain-PEP SPE 柱为采用高纯多孔聚苯乙烯 DVB 为基质，并通过化学修饰，使该填料对极性和非极性化合物都具有良好的保留特性。与传统的硅胶填料不同，Hypersep Retain PEP 填料即使在柱床干涸的情况下，也能保持较高的回收率，有利于进行快速的样品制备和方法开发。同时该填料还具有载样量高的特点，因此可以使用比硅胶更少的填料量分离更多的样品。

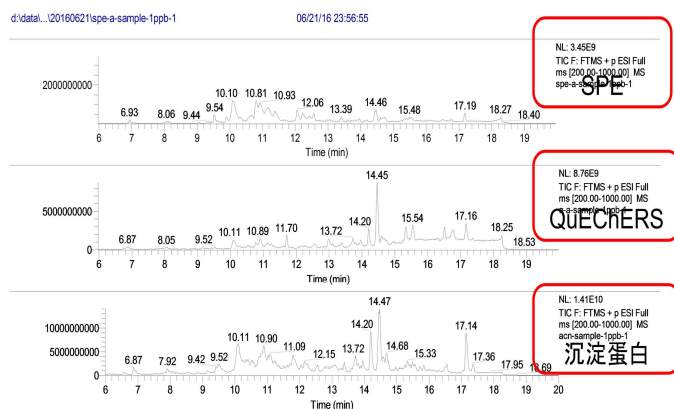


图 1：三种净化方式效果比较

2.2 高分辨质谱 Q Exactive 用于大规模化合物筛查

2.2.1 数据采集模式

针对不同的应用需求，Q-Exactive 可以提供多种不同扫描模式。本实验数据采集模式为 full scan+ddms2（一级全扫描+自动触发二级），一针进样同时得到高质量的一级、二级质谱数据用于筛查结果的定性。此种扫描方式几乎不需要任何方法开发即可用于大规模（个数不受限制）目标和非目标物筛查，另外，无需重新采集数据即可进行回顾性数据挖掘，可帮助发现不在监控范围内的新型药物。

2.2.2 超高分辨率

分辨率通常用来衡量质谱仪器区分两个相近质量数的能力，分辨率越高表示这方面能力越强。Q-Exactive 分辨率最高可达 140000，如此高分辨率可以很好的对精确质量极为接近的化合物进行有效区分。这一特性使得 Q-Exactive 分析复杂基质时，可以有效避免相近共流出基质对目标物确证的干扰，提高筛查准确性和速度。同时，超高分辨可以提高仪器精确质量数测定的准确性，尤其在有基质干扰存在时。实验中分别用分辨率 17500、35000、70000、140000 对基质中睾酮进行测定，结果表明在四种分辨率下睾酮的峰面积 RSD% 为 4.7%，差异在

合理的可接受范围内；并且四种分辨率下睾酮的测定质量精度均<1ppm，如图 2 所示。因此，Q-Exactive 提高分辨率可以增强选择性，但不会损失灵敏度和质量精度。

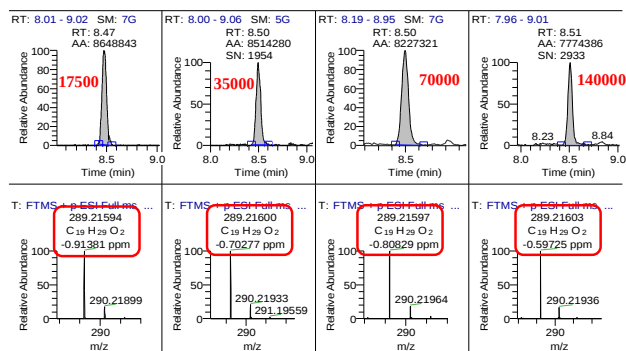


图 2：不同分辨率下基质中睾酮峰面积和质量精度测定结果

2.2.3 质量精度和稳定性

质量精度通常用来衡量质谱仪测定质量数与理论值的偏差，以 ppm 表示，该数值越小表明质量精度越高，即偏差越小。图 3 表示了允许质量偏差分别为 20ppm、10ppm、3ppm 时对同一样品中马布特罗峰提取结果的影响，可以看出，当允许质量偏差≤3ppm 时可以很好的去除基质干扰，定性的准确性也就越高。而数据分析时允许质量偏差的设定范围取决于仪器本身的质量精度。实验中测定了所添加的 200 多种常见兽残，其实测值与理论值的质量偏差均≤1ppm。不仅如此，实验中考察了目标物色谱峰的每个扫描点的质量精度，如图 4 所示：每一个数据点的质量精度均≤1ppm，表明 Q-Exactive 具有非常好的质量精度。并可以看出，即使在 70000 分辨率下，Q-Exactive 仍然可以保证色谱峰在 8~10s 出峰时间内有 20 个扫描点，扫描速度完全可以满足定量和定性需要。

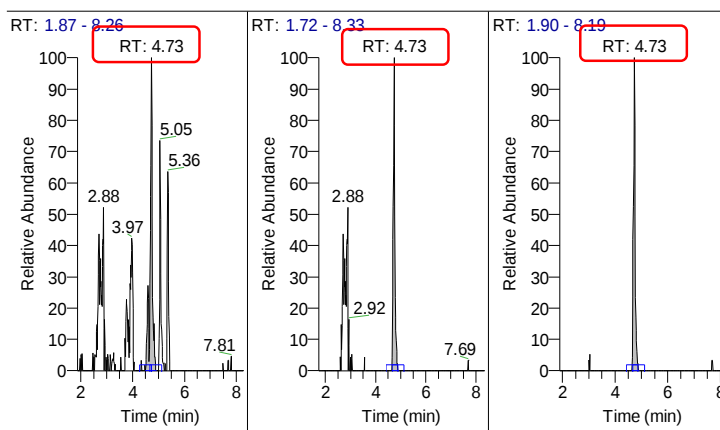


图 3：不同允许质量偏差对基质样品中马布特罗峰提取结果的影响

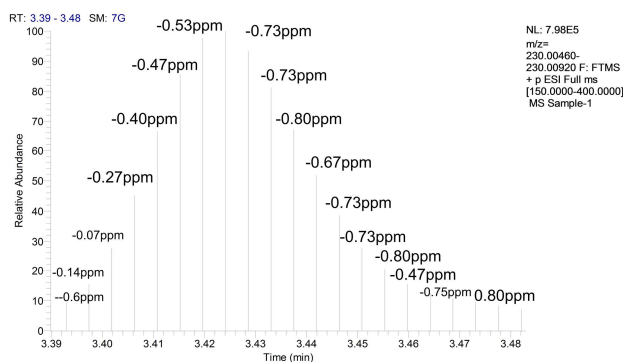


图 4：色谱峰中每个数据点的质量精度

虽然超高分辨率使质谱仪器质量精度测定得到更好的发挥，但仪器质量精度仍然容易受到硬件、外部环境等因素的影响，一台真正高质量精度的高分辨质谱，同时还应该具备长期的质量轴稳定性，以充分保证在长达数日的实验周期内得到的数据质量。因此我们考察了 Q-Exactive 长期质量轴稳定性，即仪器经过校正后中间不再进行校正，采用正负切换的采集模式，连续 60h 进样克伦特罗和氯霉素，每隔 10h 监测仪器质量精度。结果如图 5：在 60h 内，克伦特罗和氯霉素的质量偏差均 $\leq 1\text{ppm}$ ，表明 Q-Exactive 具有长期的质量轴稳定性。

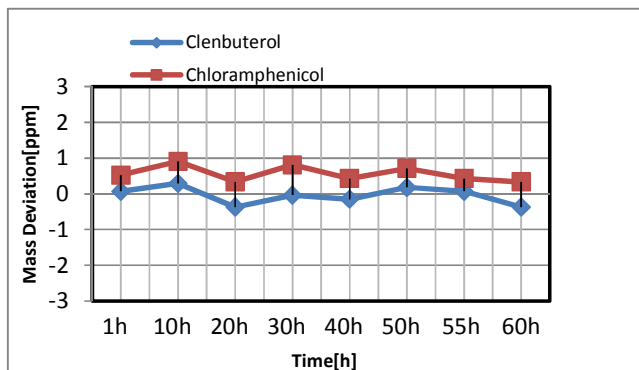


图 5：Q-Exactive 长期质量轴稳定性测试结果

2.3 筛查流程和方法

兽残快速筛查方法包基于高分辨质谱 Q-Exactive 建立，包括样品前处理方法、仪器方法、筛查方法和兽残数据库，适合肉类等基质中多兽药残留筛查，20min 即可完成一个样品分析。数据库涵盖 400 余种兽残，有化合物名称、离子化类型、一级精确质量数、保留时间、二级碎片等信息。

兽残大规模筛查数据理由 TraceFinder 3.3 自动完成，TraceFinder 应用程序为高通量分析提供面向工作流程的方法，用于特定的数据分析、仪器控制和方法开发等。可自动快速创建方法、加载样品、自动生成数据、手动查看和编辑结果，并完成数据查看和报告处理。利用 TraceFinder 进行筛查流程非常简单，只需勾选所需的 Database 和筛选条件，即可快速自动完成大批量样品的筛查。如图 6 所示。

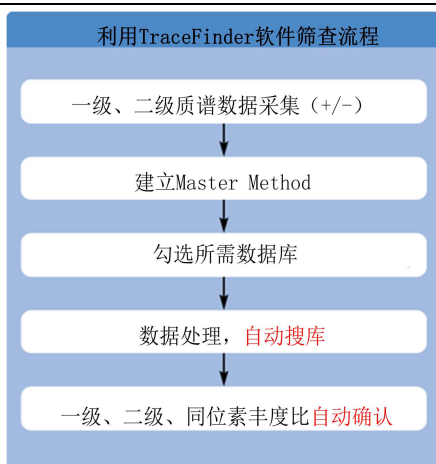


图6 利用 TraceFinder 进行大规模兽药筛查流程

TraceFinder会从多个维度对目标物进行“严格审查”，包括一级精确质量数、保留时间、同位素丰度比、二级碎片、二级质谱图。在实验中，利用Q-Exactive在高质量精度方面的优势，设置一级质量允许偏差为 $\leq 3\text{ppm}$ 进行提峰，可大大提高筛查的准确度，减少假阳性结果；保留时间RT在色谱维度具有唯一性，往往可以帮助准确的对化合物进行“鉴定”，考虑到基质、流动相配制、色谱柱批次等因素引起的RT微弱漂移，实验中设定RT窗口为0.5min；化合物在自然界的同位素分布与同位素丰度信息对定性具有重要贡献，其通常作为一项重要的参数和判断依据，Q-Exactive可以准确的测定化合物的同位素信息，而TraceFinder可根据化合物的化学式自动生成相应的同位素峰理论信息，然后将测定值与其进行比对，并根据匹配度给出相应的得分；化合物的二级质谱图因为具有很强的专属性和特征性，在定性确证中有着举足轻重的地位。Q-Exactive为四级杆与Orbitrap的串联质谱，同时采用阶梯碰撞能量，full ms-ddms2采集模式可以自动触发二级得到高分辨、高质量精度的二级质谱图。TraceFinder 兽残Database中收录了每个化合物主要二级碎片，并根据标准品建立了化合物的二级质谱库，在数据分析时，TraceFinder可以将样品的二级质谱图与Database中碎片离子进行比对，或者检索二级质谱库进行相似度的分析。

2.4 实际样品筛查和结果

实验选择猪肉、猪肝、鸡肉、鸭肉进行实验，并在样品中添加了194种常见兽药，加标浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 和5.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ，利用本文所建立的整体方案进行样品前处理，并对所添加兽药进行快速的筛查和确证。TraceFinder可自动生成筛查结果，图7为部分兽药筛查结果截图。在结果中可以查看化合物名称列表及其提取离子色谱图，并以不同颜色标识出各筛查指标的匹配情况，绿色表示通过，红色表示失败，具有很好的可视化效果。下方则显示色谱图、同位素峰的匹配结果、二级碎片的匹配结果。实验中对194中所添加兽药的检出情况进行了统计，结果表明：添加浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ，基质中所有化合物的检出率 $>84\%$ ；添加浓度为5.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ，基质中所有化合物的检出率 $>92\%$ 。

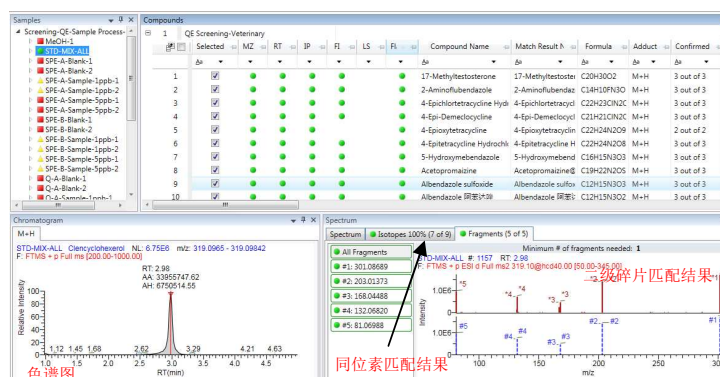


图4 TraceFinder筛查结果截图

2.5 回收率数据结果

对猪肉、猪肝、鸡肉、鸭肉等基质中添加了194种常见兽药，加标浓度为1.0 μ g/Kg和5.0 μ g/Kg的回收率做了统计，回收率基本在50-120%之间，以下列出了部分化合物的回收率数据结果。

英文名称	中文名称	Add 1ppb		Add 5ppb	
		测定值	Recovery(%)	测定值	Recovery(%)
17-Methyltestosterone	甲基睾酮	0.68	68%	3	60%
2-Aminoflubendazole	2-氨基氟苯咪唑	0.74	74%	4.2	84%
4-EPICHLORTETRACYCLINE HYDROCHLORIDE	差向金霉素	0.62	62%	3.3	66%
Albendazole-2-Aminosulfoxide	阿苯哒唑-2-氨基砜	0.72	72%	4.3	86%
AZAPEROL	阿扎哌醇	0.53	53%	3.1	62%
Azaperone	阿扎哌隆	0.55	55%	3.3	66%
Buquinolate	丁喹酯	0.7	70%	4.64	93%
Ciprofloxacin	环丙沙星	0.55	55%	3.6	72%
Danooxacin	达氟沙星	0.6	60%	3.3	66%
Diaveridine	二甲氧苄氨嘧啶	0.61	61%	3.2	64%
Difloxacin	二氟沙星	0.56	56%	3.1	62%
difurazone	硝呋烯腙	0.65	65%	3.7	74%
Dimetridazol	地美硝唑	1	100%	5.5	110%
Enoxacin	依诺沙星	0.64	64%	3.8	76%
Enrofloxacin	恩诺沙星	0.51	51%	3	60%
Halofuginone	常山酮	0.5	50%	3.9	78%
Labetalol	拉贝特罗	0.52	52%	3.3	66%
Meloxicam	美洛昔康	0.63	63%	3.7	74%
Methylprednisolone	甲基泼尼松龙	0.8	80%	3	60%
Nafcillin	萘夫西林	0.5	50%	3.9	78%
Nafcillin	萘夫西林	0.5	50%	3.9	78%
Nandrolone	去甲睾酮	1.1	110%	3	60%
Nandrolone-17-propionate	丙酸诺龙	0.5	50%	3.6	72%
Nequinat	奈喹酯	0.6	60%	3.9	78%
Norfloxacin	诺氟沙星	0.6	60%	3.6	72%
Pefloxacin	培氟沙星	0.59	59%	3.03	61%
Penbutolol	喷布特罗	0.62	62%	3.3	66%
Phenylethanolamine A	苯乙醇胺 A	0.54	54%	3	60%
Pipemidic Acid	吡哌酸	0.6	60%	4	80%
Praziquantel	吡喹酮	0.51	51%	3	60%
Premarin	Premarin	0.82	82%	3.2	64%
Propylthiouracil	丙硫氧嘧啶	0.63	63%	3.1	62%
Roxithromycin	罗红霉素	0.54	54%	3.2	64%

Salmeterol	沙美特罗	0.6	60%	3.9	78%
Terbutaline	特布她林	0.5	50%	4.6	92%
Thiamphenicol	甲矾霉素	0.69	69%	4	80%

3 结论

本应用针对目前多兽药残留的各种挑战，开发了一种专门针对动物源食品中常见兽药残留快速筛查和确证的LC/MS/MS方法，并取得了满意的效果。结果表明：添加浓度为1.0μg/Kg，基质中所有化合物的检出率>84%；添加浓度为5.0μg/Kg，基质中所有化合物的检出率>92%。化合物回收率在50–150%之间。该方法使用HyperSep Retain-PEP SPE小柱对样品进行快速有效的净化处理，然后由高分辨质谱Q Exactive分析，结合Accucore RP-MS 低流失质谱柱和TraceFinder软件从多个维度对目标物进行确证，从而实现对动物组织样品中多兽药残留的准确、快速筛查。

HyperSep Retain-PEP SPE小柱能够去除动物源性食品中的大部分磷脂、蛋白、脂肪等干扰物，Accucore RP-MS选择性与C18类似，且同时具备高效率和低拖尾因子，是MS检测的首选。Q Exactive具有高达140000的分辨率、出色的质量精度、高灵敏度和宽动态范围等特点，具有非常优异定性和定量表现，是食品安全领域未知残留物的大范围筛查和定性定量分析的最佳平台。