

动物来源产品中兽药残留的筛查

目的

为动物源性产品中 150 多种兽药残留的筛查提供一种有效的解决方案。

前言

兽药广泛的应用于治疗或预防动物疾病，但会带来肉、鱼、奶、蛋和蜂蜜等动物性产品中的痕量药物残留。由于对人体健康存在潜在的危害，食品链中药物残留的存在也引起了广泛的关注。确实，污染的动物产品可能导致过敏反应或由于细菌抵抗的发展导致临床治疗上间接的问题。为了保护消费者的健康并确保动物性产品的质量，在世界范围内设立了动物产品中药物允许的最高含量，即最大残留量（MRLs）1-3.

传统上，生物材料中兽药残留由微生物和免疫组化技术进行分析⁴。而这些方法可以为特定类别的化合物提供一种快速经济的筛查方法，每种测试盒一般仅对一种化合物有效，对模糊物质的鉴定缺乏选择性，且结果仅近似定量。至于阳性结果，政府法规部门通常要求更加精确的色谱分析方法以确定抗生素的存在及含量。

由于 MRLs 相关法规变得更加严格，发展定量方法以及确认和鉴定技术以使假阳性结果最小化就更为重要。飞行时间质谱法（TOF MS）筛查具有一定的优势，如历史数据追踪、简化仪器方法设定和在增加化合物数量时方法的效果无需折衷，因而受到广泛欢迎。然而，处理和检查 TOF 筛查数据通常包含一个复杂的工作流程，当阳性峰首次确定后，随后对消费者风险进行定量。定性向定量过程的转化通常是手工完成的，它设置了一个明显的检查资源渠道及较高的误差率。

该应用实例描述了 Waters® 的 ACQUITY UPLC®及四级杆飞行时间 Xevo™ QToF 质谱用于超过 150 种兽药残留及代谢物，包括阿凡曼菌素、苯咪唑类、β-

激动剂、 β -内酰胺类、皮质类固醇、大环内酯类、硝基咪唑类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类和其它兽药产品的定点筛查。ACQUITY UPLC 分离分析速度较快，同时保持高效率 and 分离度。ACQUITY UPLC 与 Xevo QToF 质谱相结合，以便保持高灵敏度的分离效率、检测的选择性和准确质量。数据采用 POSITIVE™ 软件处理，使得准确质量数据可在一个简单通道中进行定性和定量，对阳性检测物质则直接得出重要的定量结果。

实验

样品制备

此前曾有报道描述了牛奶的样品准备方法 4。对于肝脏、血、鱼和肉样品，采用 5g 样品与 20 mL 乙腈和 5 g 无水 Na₂SO₄。离心后，在 4ml 上清液中加入 0.4 mL DMSO。挥干乙腈，样品加入 0.8g 水配成原来浓度，进样前离心。附录 1 列举了筛查的兽药残留物质。

UPLC 条件

LC 系统: ACQUITY UPLC

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18

1.7 μ m, 2.1 x 100 mm

柱温: 40°C

流动相 A: 0.1% 甲酸 (无水)

流动相 B: 乙腈 + 0.1% 甲酸

梯度: 时间 (min) %A

0.00 95

0.25 95

6.00 5

7.00 5

7.20 95

9.00 95

流速： 0.40 mL/min

进样量： 20 μ L 满定量环

MS 条件

MS 系统： XEVO QToF MS

采集模式： MSE

离子模式： ESI 正

毛细管压： 2.4 kV

锥孔电压： 30 V

MS 碰撞能量： 6 V

MSE 碰撞能量范围： 25 to 35 V

离子源温度： 120 $^{\circ}$ C

脱溶剂化温度： 400 $^{\circ}$ C

脱溶剂化气体流速： 800 L/hr

锥孔气流： 20 L/hr

采集范围： m/z 50 to 1000 for 0.1 s

Xevo QToF 质谱(采用甲酸钠和锁定质量检测进行质量校准)采用 IntelliStart™ 软件进行自动设置。

数据获得及处理

数据采用 Waters MassLynx™ 4.1 版本获得，采用 POSITIVE 软件处理。在 MSE 采集模式下，数据一直通过两个通道进行收集：低碰撞能量（CE）用于分子离子信息；及高 CE 用于子离子。图 1 显示了 TOF 筛选工作流。

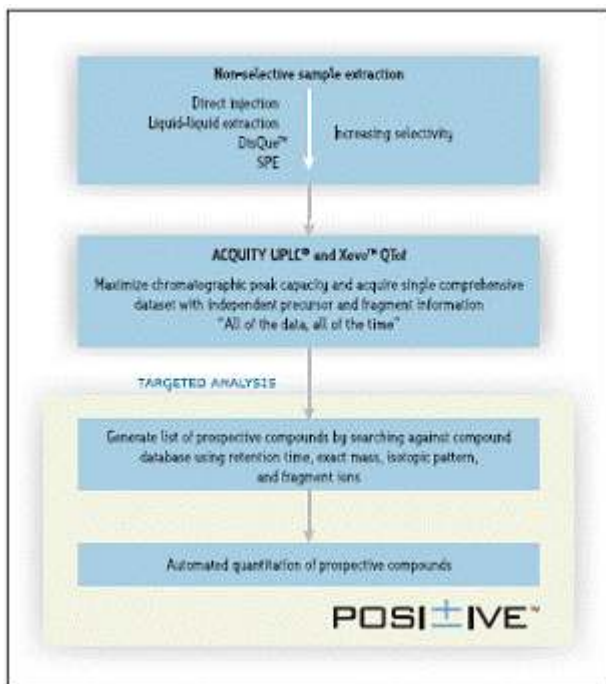


图 1. TOF 筛查工作流程，自样品准备至数据分析的理论步骤，包含确保该流程无缝运行所整合的仪器和软件

结果和讨论

对复杂材料的选择性来源于 ACQUITY UPLC 的高色谱分离度和 Xevo QToF 质谱的高质谱分离率及其在较窄质量窗内重现质谱图的能力。图 2 显示了牛肝脏提取物中达氟沙星的总离子流色谱图（TIC）及其对应的精确质谱图， 并以此为例。

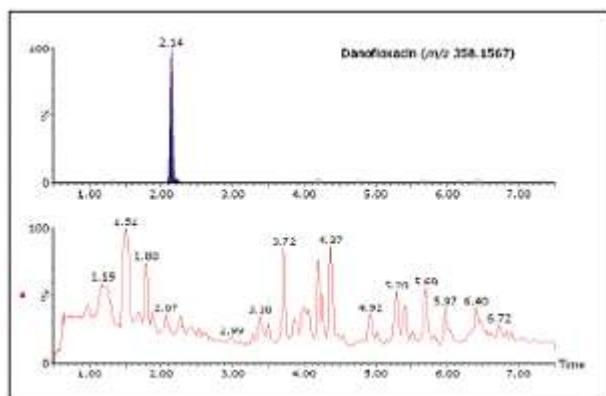


图 2. 牛肝脏中达氟沙星的总离子流色谱图（TIC）及其相应的质谱图

高分离度对获得结果的选择性和提升可信性非常有帮助。然而，在一些情况下，额外的信息，如子离子，将可能对待检的不确定化合物产生显著的益处。图 3 显示了赛拉嗉和莫仑太尔监测结果中增加的可信性，两种物质精确质量（m/z

221.1112) 和元素组成 (C₁₂H₁₆N₂S) 相同, 保留时间相似 (2.44 和 2.52 min)。赛拉嗪和莫仑太尔子离子相同 (m/z 164.0536), 但可由指定的唯一的子离子 (m/z 90.0366 和 150.0381) 进行鉴定。非常高的质谱分辨率将无法分离这些物质, 因此结构信息对待检残留的模糊鉴定非常重要。

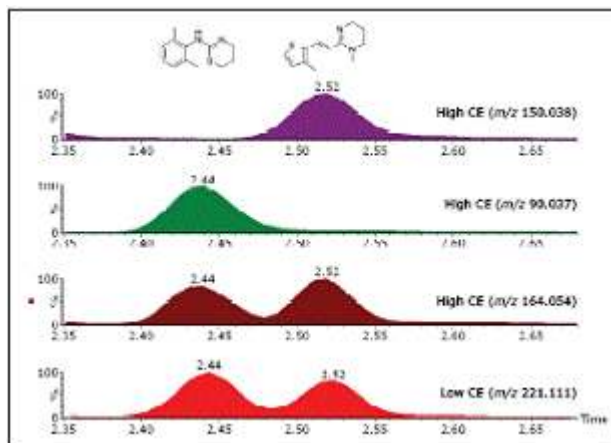


图 3. 对相同精确质量相同的残基进行清晰的鉴定, MSE 下赛拉嗪 (2.44 min) 和莫仑太尔 (2.52 min)

子离子信息可通过进行源内裂解, MS/MS 或 MSE 获得:

源内裂解是一种直接获得产品离子的方式, 但与 MS 模式相比灵敏度较低, 且由于离子源条件随着流动相和基质的改变难于控制。

MS/MS 是一种基于数字的技术, 它可以提供高质量的子离子谱, 但工作周期较低, 高丰度残留时产生偏移, 且必须在预先知道样品的成分的情况下使用。

MSE 是一种专利的基于数字的技术, 可提供简单、无偏移、平行的途径, 传递每个可检测成分的准确质量分子 (MS) 及子离子 (MSE) 信息, 无需多次进样。这些信息仅在子离子可于基质中相应水平被检测到时有效。图 4 显示了牛血提取物中磺胺多辛在 MSE 模式下低碰撞能和高碰撞能质谱图, 证明了子离子可在基质中相应水平上被检测。

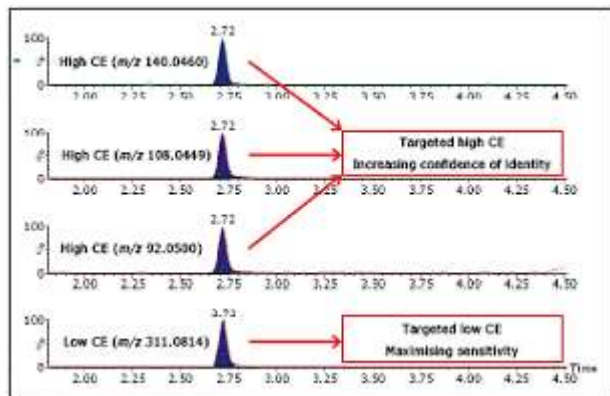


图 4. 牛血中磺胺多辛在低 CE 和高 CE 下的 MSE 模式质谱图，显示子离子可在基质中的相关水平上可检测。

图 5 显示了低 CE 和高 CE 在 MSE 模式下获得的光谱的差异，低 CE 谱由分子离子主导，而高 CE 谱包含子离子，这增加了鉴定的可信性。

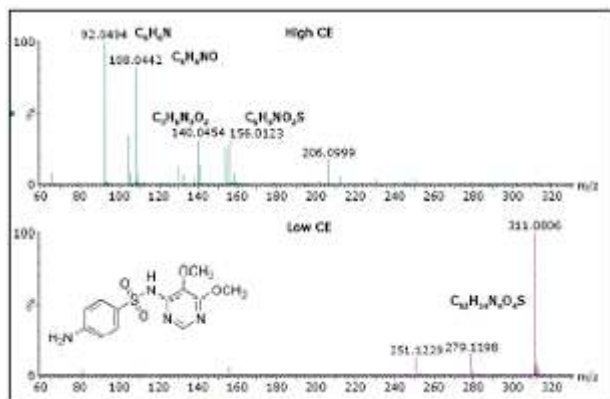
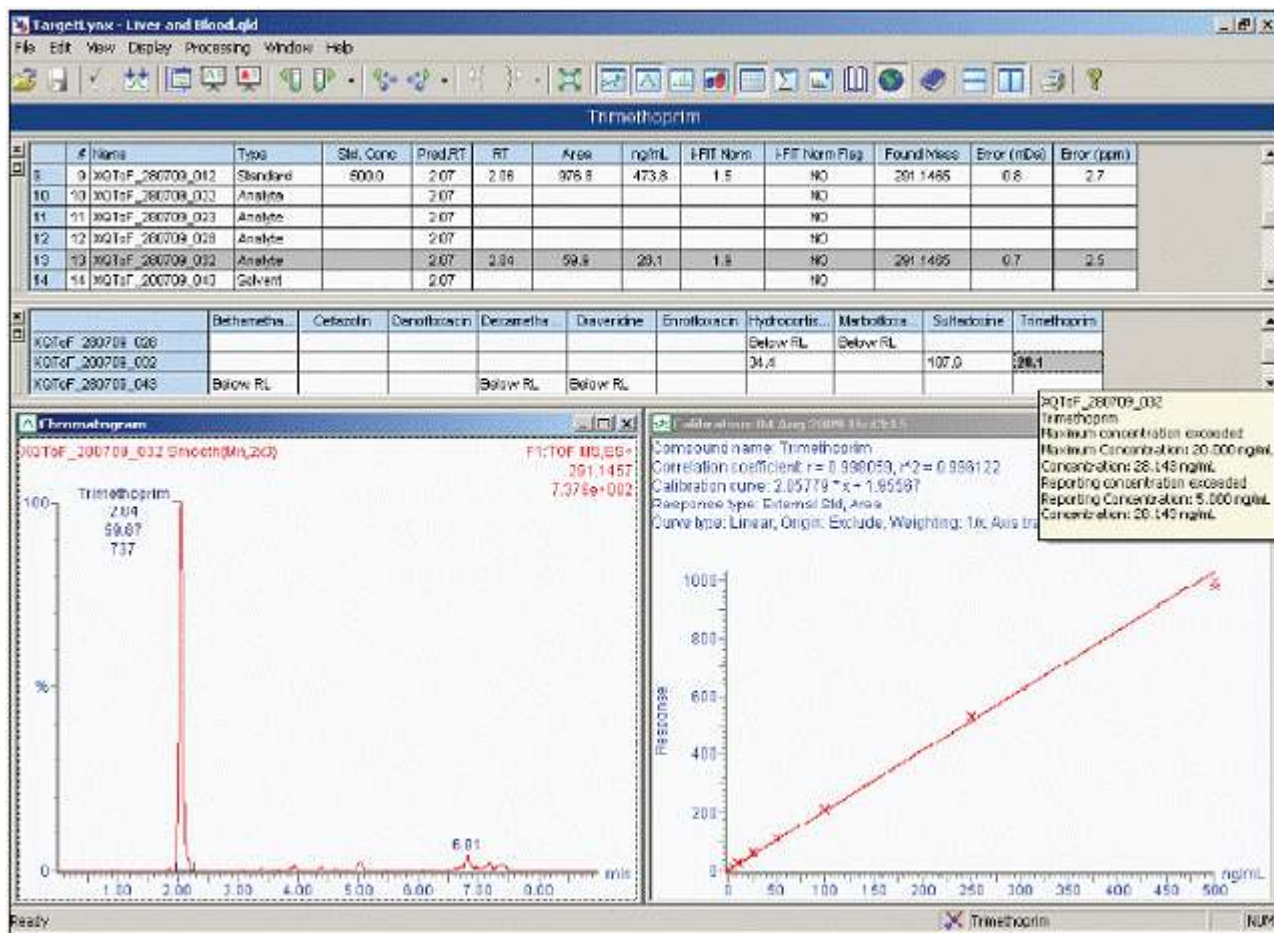


图 5.牛血中磺胺多辛在低 CE 和高 CE 中 MSE 模式谱图

分析样品以便获得 9min 的总循环时间（包括平衡时间）。这使得每天实际样品处理量超过 100 种样品。然而，这种样品处理量以及每种样品 150 种残留物给数据处理和运算带来了明显的问题。

POSITIVE 软件是专为降低检查 TOF 质谱筛选数据的数据运算时间而研发的，确保仅有阳性（准确质量和保留时间在预定的偏差内）及暂时的（保留时间尚可，但标识为准确质量超限）检测将自动定量。仅需要一张包含化合物名称、结构式和保留时间的目标化合物列表 A，而这一列表的长度不受限制。



在自动运算过程中，POSI±IVE 软件执行定性搜索，采用质量准确度和保留时间决定化合物是否为阳性、暂时或未检出，以生成目标列表中化合物存在/不存在的信息。所有阳性和暂时检测随后被自动定量，并采用 TargetLynx 浏览器报告，含有同位素组成(iFit™)检测的方式列出。图6显示了牛血提取物 POSI±IVE Xevo QToF 质谱筛查结果，超过 150 种兽药中仅定性及定量检测出 3 种：氢化可的松、磺胺多辛和甲氧苄啶。受试样品中显示出血样中甲氧苄啶阳性鉴定和定量结果。

由于其不包括在运算方法内，氢化可的松在原始定向分析中未有报告。POSI±IVE 半定向方式的优势之一是残留物列表的长度没有限制，且无强制性校准标准。记录的数据档案将被新的信息重新运算，氢化可的松随后即被检测并在原始数据档案中量化。

Quantity sample summary report: Masslynx 4.1 SP1 7/4

Dataset: C:\Masslynx\Projects\1181\PRO\MethOB\FDQ Liver and Blood.d

Last Aquired: Tuesday, August 04, 2009 16:43:15 GMT Standard Time
Printed: Thursday, August 06, 2009 12:42:15 GMT Standard Time

Method: C:\Masslynx\Projects\1181\PRO\MethOB\FDQ Generated Method.mtb 04 Aug 2009 16:11:55
Calibration: 04 Aug 2009 16:43:15

Name: XQTof_288706_032; Date: 28-Jul-2009; Time: 19:40:55; ID: Blood 28308
Description: Cow Blood Extract 30308

Name	Retention	RT	Experimental	Found Mass	Scan #	Area	RT	LFZ Mass
Triclocarban	2.11	2.11	281.2011	281.200	14	24.9	81.2	1.7
Hexachloro	2.14	2.12	211.0194	211.020	14	101.0	200.0	9.2
Tetrahydrop	2.87	2.84	281.1927	281.188	17	28.1	41.5	1.3

图 7.牛血 POSI±IVE Xevo QToF MS 筛查报告表明存在 3 种残留物

图 7 牛血提取物生成报告中的一部分，其中 150 中残留物范围被缩小至 3 种经保留时间，精确分子量和 iFIT 鉴定为阳性。

结论

由于其对人体健康存在潜在危害，食品链中兽药残留的存在受到广泛关注。v

ACQUITY UPLC 和 Xevo QToFv 质谱方案简化了动物源性产品中超过 150 种兽药残留物在适当的 MRLs 下的筛查。

v 在对待检残留物指定鉴定时，MSE 信息增加了额外的可信性，并克服了常规数据依赖性途径的局限性。

TOFv MS 数据信息丰富的特性增加了其对数据处理软件的要求，因此降低手工处理并自动重复性任务对提高结果的质量和 TOF MS 的接受性非常必要。

v POSI±IVE 通过确保仅有阳性和暂时的检测可被自动定量，显著降低检查 TOF 质谱筛查数据处理的瓶颈。自动处理的性质通过在工作流程中除去了人工转录步骤，而降低了发生错误的可能性。

参考文献

1. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/index_en.htm
2. <http://www.foodsafety.gov/%7Efs/g/animal.html>
3. <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist/index.html>
4. D Ortelli, E Cognard, P Jan, and P Edler. J Chrom B. **877** (2009) 2363-2374.
5. POSITIVE: Improving the Workflow for TOF Pesticide Screening. (2009) Waters Technical Note No. 720003053en.

附录 1:

甲泼尼龙	克仑特罗	马波沙星	舒喘灵	
阿苯达唑	克伦普罗	甲苯达唑	沙氟沙星	
阿苯达唑	氯吡多	5-羟基甲苯咪唑	螺旋霉素-1	
砒	氯唑西林	2-氨基-5-苯甲酰苯	磺胺苯酰	
阿苯达唑	环苯达唑	并咪唑	磺胺醋酰	托芬那酸
亚砒	达氟沙星	美洛昔康	磺胺氯吡嗪	三氯苯达唑
阿莫西林	氨苯砒	甲硝唑	钠	三氯苯达唑
氨苄西林	去甲金霉素	羟基甲硝唑	磺胺氯达嗪	砒
阿奇霉素	地塞米松	盐酸米诺环素	磺胺嘧啶	三氯苯达唑
苯佐卡因	二氢藜芦啶	莫仑太尔	磺胺地索辛	亚砒
倍他米松	双氯西林	莫仑太尔	磺胺多辛	三氟丙嗪
溴布特罗	乙胺嗪	萘啶酸	磺胺噻唑	甲氧苄啶
溴己新	二氟沙星	萘啶酸	磺胺脒	三乙酰竹桃
卡拉洛尔	二甲硝唑	那他霉素	磺胺甲噻啶	霉素
卡巴多司	羚基二硝基	诺氟沙星	磺胺甲氧嘧	妥洛特罗
羧苄西林	咪唑	新生霉素	啶	泰洛星
头孢克洛	脱氧土霉素	氧氟沙星	磺胺二甲嘧	维及霉素
头孢羟氨	依诺沙星	奥喹多司	啶	M1
苄	恩氟沙星	磷酸竹桃霉素	磺胺二甲嘧	赛拉嗪
头孢氨苄	红霉素	苯唑西林	啶	折仑诺
头孢洛宁	非班太尔	奥芬达唑	磺胺甲噁唑	
头孢孟多	芬苯达唑	奥苯达唑	磺胺甲噁唑	
头孢唑林	芬苯达唑砒	奥索利酸	磺胺间甲氧	
头孢哌酮	氟罗沙星	盐酸土霉素	嘧啶	

头孢噻肟	氟苯达唑	培氟沙星	磺胺噻唑
头孢西丁	氟苯咪唑	青霉素 G	磺胺硝苯
硫酸头孢	氟甲唑	青霉素 v	磺胺吡啶
喹肟	氟甲唑	吡喹酮	磺胺喹恶啉
头孢磺啶	氢化可的松	泼尼松龙	磺胺噻唑
头孢噻吩	异丙硝唑	泼尼松龙	磺胺曲沙唑
头孢曲松	羟基异丙硝	异丙嗪	磺胺索嘧啶
头孢呋辛	唑	乙胺嘧啶	磺胺异恶唑
头孢乙腈	交沙霉素	噻嘧啶	特硝唑
头孢噻吩	酮洛芬	利福昔明	四环素
头孢匹林	柱晶白霉素	罗硝唑	四米唑
头孢拉定	A1	罗沙肿	噻苯哒唑
金霉素	左旋咪唑	罗红霉素	5-羟基噻苯
塞布特罗	左旋咪唑		哒唑
西诺沙星	洛美沙星		硫姆林
环丙沙星			硫姆林
			替米考星
			甲苯磺丁脲