

Q-Exactive液相色谱-高分辨质谱联用同时检测 动物源食品中81种兽药残留

刘鑫¹李建辉¹杜伟²张朝晖¹

1 (北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心食品实验室)

2 (赛默飞世尔科技)

关键词:

• Q Exactive
• 兽药残留

近年来,以瘦肉精为代表的兽药残留已逐渐成为人们普遍关注的一个社会热点问题。药物残留不仅可以对人体产生急慢性毒性作用,引起细菌耐药性的增加,还可以通过环境和食物链的作用间接对人体健康造成潜在危害。动物源食品中兽药残留的检测具有待测物质浓度低,样品基质复杂,干扰物质多、动物种类多样,对药物代谢存在差异等问题,一直以来是食品安全检测中的难点。因此为保证人们健康和食品安全,必须建立一套快速、有效、覆盖面广的动物源食品中兽药残留的筛查方法。

Q-Exactive是赛默飞世尔科技在2011年推出的新型四极杆和轨道阱杂交高分辨质谱仪,它将高选择性四极杆的离子过滤与Orbitrap高分辨准确质量数(HR/AM)测量技术相结合,在分辨率、扫描速度和灵敏度性能上进一步提升,并提供各种高分辨扫描功能,适应不同的应用需要。Q Exactive质谱仪能进行高通量的目标物或非目标物筛选,能够实现高可靠性的确证和定量分析, Q Exactive的高性能、稳定性和可操作性为前沿研究和常规检测提供更加可靠的分析结果。本文利用Q-Exactive液相色谱质谱联用系统,建立了动物源中多组分兽药残留同时筛查的快速分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Q-Exactive液相色谱质谱联用系统(美国Thermo Fisher Scientific公司); Hypersile Gold C18色谱柱(100mm x 2.1 mm, 1.9 μ m, 美国Thermo Fisher Scientific公司); 乙腈(色谱纯, 美国Thermo Fisher Scientific公司); 甲酸(色谱纯, 美国Tedia公司); 乙酸铵(美国Thermo Fisher Scientific公司); 实验用水为去离子水。

1.2 样品制备

动物组织样品先绞碎, 均质。称取2.5g样品放入50mL离心管中, 加入5g无水硫酸钠和10mL乙腈提取液, 超声提取30分钟, 8000转离心15分钟, 取上清液氮气吹干, 使用50%乙腈水溶液定容至1mL, 待测。

1.3 液相色谱条件

色谱柱: Hypersile Gold C18色谱柱, 100mm x 2.1 mm, 1.9 μ m

流动相A: 含5mM乙酸铵、0.1%甲酸的水溶液

流动相B: 乙腈

流速: 300 μ L/min

梯度:

Time (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
2	70	30
6	50	50
8	5	95
11	5	95
11.1	90	10
15	90	10

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样体积: 10 μ L

1.4. 质谱条件

离子源: HESI-II

喷雾电压: 3800V (正离子模式)

气化温度: 300 $^{\circ}$ C

鞘气压(N₂): 35 arb

辅助气压(N₂): 10 arb

离子传输管管温度: 320 $^{\circ}$ C

质量范围: m/z 50-900 (R 70000)

二级质谱: 基于母离子列表的数据依赖采集 (R 17500)

2. 实验结果

2.1 色谱图

取动物组织中常见的喹诺酮、磺胺、 β 受体激动剂等81种兽药标准品, 配制混合标样, 在空白猪肉基质液中添加适当浓度混合标样, 按上述实验条件进样10 μ L。图1为猪肉基质中加标500 ng/mL的部分兽药色谱图。

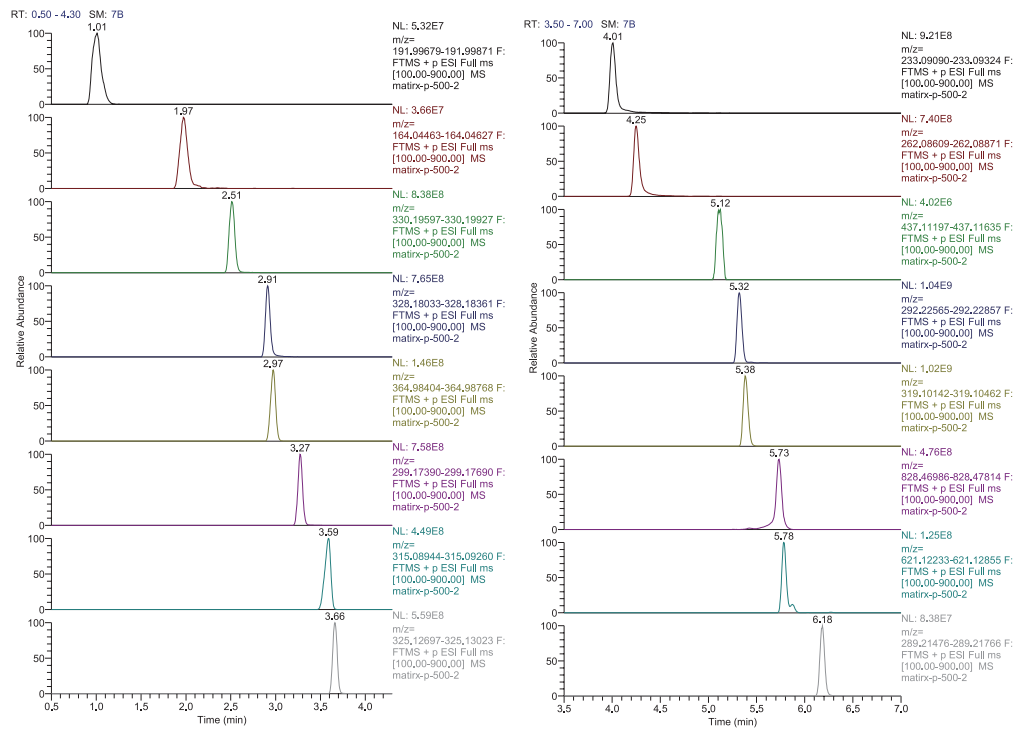


图1 猪肉基质中部分兽药Q Exactive色谱图

2.2 线性 and 重复性

在空白猪肉基质液中分别加入混合标准样品，配置浓度为5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 500 ng/mL的基质加标溶液，按上述方法进行样10μL，在各组分精确质量提取色谱图上积分峰面积，外标

法制作校准曲线，权重取1/X，结果如表1所示，各组分线性关系良好，线性回归系数均在0.98以上。取10ng/mL基质加标液，重复进样5次，各组分重复性良好，RSD均在15%以内。

表1 猪肉基质中81种兽药残留分析结果

化合物	保留时间 (min)	校准曲线	线性 (r2)	RSD (% , 10 ng/mL, n=5)
salbutamol	0.69	Y = 1.0911e+006+1.72189e+006*X	0.9903	14.4
olaquinox	0.70	Y = 3.97233e+006+1.12926e+006*X	0.9889	8.74
Terbutaline	0.70	Y = 1.72733e+006+1.11977e+006*X	0.9895	8.53
cimaterol	0.74	Y = 463305+662920*X	0.9916	10.9
metronidazole	0.95	Y = -82189.3+540348*X	0.9978	9.76
clopidol	1.00	Y = 748865+761256*X	0.9972	11.3
cimbuterol	1,08	Y = 6.59592e+006+2.27003e+006*X	0.9856	3.07
ronidazole	1.12	Y = -241916+152095*X	0.9943	7.91
sulfadiazine	1.14	Y = -455511+556239*X	0.9929	9.01
Ampicillin	1.37	Y = -305984+61882.5*X	0.9933	10.9
cefradine	1.37	Y = -309490+62201.5*X	0.9936	11.1
sulfathiazole	1.37	Y = 1.62724e+006+1.42366e+006*X	0.9940	3.56
lincomycin	1.41	Y = 8.81634e+006+3.14453e+006*X	0.9943	5.51
sulfapyridine	1.48	Y = 3.46635e+006+2.83833e+006*X	0.9935	4.09
corbadox	1.62	Y = 8.50654e+006+1.64441e+006*X	0.9862	2.73
sulfamerazine	1.64	Y = 1.25932e+007+4.42528e+006*X	0.9932	4.25
ornidazole	1.67	Y = -303239+61176.8*X	0.9934	13.3
Enoxacine	1.83	Y = -863489+1.00125e+006*X	0.9868	4.88
marbofloxacin	1.83	Y = 414674+2.473e+006*X	0.9934	7.32
trimethoprim	1.86	Y = 5.12279e+006+4.44543e+006*X	0.9866	4.67
sulfamoxol	1.97	Y = 9.96558e+006+4.4951e+006*X	0.9937	2.39
b-nitrobenzimidazole	1.98	Y = -450213+449817*X	0.9980	4.78
oxytetracycline	2.00	Y = -594933+325824*X	0.9950	7.89
fleroxacin	2.01	Y = 16347.3+565366*X	0.9953	7.80
norfloxacin	2.01	Y = 66080+1.11746e+006*X	0.9929	4.13
ofloxacin	2.02	Y = 1.07174e+006+3.39421e+006*X	0.9929	3.83

pefloxacin	2.07	$Y = 2.85078e+006+5.07533e+006*X$	0.9936	1.29
sulfamethazine	2.07	$Y = 4.89222e+006+6.50088e+006*X$	0.9880	1.57
ciprofloxacin	2.11	$Y = 273778+1.37291e+006*X$	0.9915	4.25
sulfamethizole	2.14	$Y = 3.11832e+006+1.07495e+006*X$	0.9926	5.86
sulfameter	2.17	$Y = 7.50346e+006+7.24601e+006*X$	0.9840	2.61
Danofloxacin	2.24	$Y = 4.94509e+006+3.99437e+006*X$	0.9802	2.94
lomefloxacin	2.25	$Y = 2.80651e+006+2.65896e+006*X$	0.9831	4.07
clorprenaline	2.26	$Y = 7.84952e+006+3.65347e+006*X$	0.9935	5.50
N-sulfanilylacetamide	2.32	$Y = -35806.3+10008.5*X$	0.9916	8.79
Enrofloxacin	2.34	$Y = 2.40998e+006+5.7831e+006*X$	0.9982	3.65
azaperol	2.53	$Y = 8.56824e+006+7.82533e+006*X$	0.9881	4.24
Sulfamonomethoxine	2.54	$Y = 724474+2.1728e+006*X$	0.9918	4.09
xylazine_hydrochloride	2.59	$Y = 2.84591e+006+9.52224e+006*X$	0.9958	2.33
sulfachloropyridazine	2.60	$Y = 3.55563e+006+790309*X$	0.9912	6.89
demeclocycline	2.63	$Y = 648.198+607907*X$	0.9912	9.47
clenbuterol	2.65	$Y = 7.40752e+006+1.92231e+006*X$	0.9908	4.23
tulobuterol	2.67	$Y = 2.12063e+006+3.42185e+006*X$	0.9881	3.96
sarafloxacin	2.69	$Y = 188155+1.41024e+006*X$	0.9924	4.71
difloxacin	2.73	$Y = 1.24514e+006+4.11903e+006*X$	0.9929	8.83
sparfloxacin	2.73	$Y = 3.48607e+006+4.62843e+006*X$	0.9903	4.81
sulfadimethoxine	2.82	$Y = 5.78936e+006+8.27076e+006*X$	0.9902	2.93
sulfamethoxazole	2.83	$Y = 4.47484e+006+2.0722e+006*X$	0.9949	5.94
azaperone	2.90	$Y = 984103+5.78274e+006*X$	0.9967	2.26
brombuterol	2.96	$Y = 4.8939e+006+1.23159e+006*X$	0.9877	9.67
chlorotetracycline	3.05	$Y = -1.3724e+006+398597*X$	0.9931	13.0
sulfisoxazole	3.08	$Y = 5.57443e+006+979267*X$	0.9873	4.17
ractopamine	3.11	$Y = 1.86034e+007+3.54649e+006*X$	0.9844	3.96
Spiramycin	3.15	$Y = -641867+322189*X$	0.9952	6.98
oxolinic_acid	3.19	$Y = 265565+279385*X$	0.9873	9.76
doxycycline	3.20	$Y = 331770+465773*X$	0.9918	10.7
mabuterol	3.21	$Y = 1.40672e+007+3.30641e+006*X$	0.9832	3.73
carazolol	3.27	$Y = 5.38514e+006+5.91246e+006*X$	0.9869	2.17
clindamycin	3.30	$Y = 4.6082e+006+1.37983e+006*X$	0.9964	6.10
mafenide	3.31	$Y = 1.02781e+006+332578*X$	0.9944	2.75
sulfadoxine	3.51	$Y = 3.65063e+007+5.57585e+006*X$	0.9872	1.70
sulfachinoxalin	3.54	$Y = 1.16465e+006+662177*X$	0.9815	3.96
Sulfaphenazole	3.58	$Y = 1.75994e+007+4.35032e+006*X$	0.9911	2.88
mapenterol	3.62	$Y = 2.0374e+007+4.19466e+006*X$	0.9823	2.12
propranolol	3.64	$Y = 2.32572e+006+8.31737e+006*X$	0.9915	2.29
tilmicosin	3.75	$Y = -126274+1.10758e+006*X$	0.9959	5.97
nalidixic_acid	4.00	$Y = 3.76392e+006+8.3126e+006*X$	0.9935	5.21
erythromycin	4.08	$Y = 1.16759e+006+3.83316e+006*X$	0.9973	5.20
flumequine	4.25	$Y = 9.01806e+006+6.68523e+006*X$	0.9853	3.84
penicillin_potassium	4.65	$Y = -325631+23349*X$	0.9825	10.2
cloxacillin	4.83	$Y = -289274+57406.9*X$	0.9956	8.10
propionyl_promazine	5.03	$Y = -2.26437e+006+8.28556e+006*X$	0.9934	3.23
nafcillin	5.12	$Y = -147688+35058.4*X$	0.9898	12.7
19-Nortestosterone	5.26	$Y = -26038.8+345899*X$	0.9968	7.73
penbutolol	5.32	$Y = 3.2882e+006+1.01537e+007*X$	0.9897	3.46
chlorpromazine	5.38	$Y = -1.97102e+006+7.2044e+006*X$	0.9925	2.67
leucomycin	5.40	$Y = 962769+1.00294e+006*X$	0.9891	3.16
dicloxacillin	5.51	$Y = -463611+32704.7*X$	0.9890	4.92
josamycin	5.72	$Y = -5.11659e+006+4.21502e+006*X$	0.9948	1.87
cefditoren_pivoxil	5.78	$Y = -3.65349e+006+889975*X$	0.9863	4.03
epitestosterone	6.18	$Y = -2.16703e+006+561163*X$	0.9830	5.14

2.3 定性确认

实际样品分析中各组分阳性样品的确认，在Thermo公司的高分辨筛查软件Exactfinder的辅助下完成。Exactfinder是一款基于高分辨质谱质联用的数据处理辅助软件，用于多组分同时筛查及完全未知物的定性定量分析。对化合物的定性确认，除了精确质量数外，Exactfinder还提供保留时间、同位素分布、主要二级碎片确认和二级质谱图相识度比对等多种方法，综合判断，以得到准确度定性结果，避免假阳性检测

结果的出现。

Q-Exactive能够得到化合物准确的同位素峰形，可以用来作定性确认。图2为基质加标样品中氯丙嗪的同位素分布确认结果，右上图为氯丙嗪标准的同位素分布图，右下图为实际样品质谱图中氯丙嗪同位素分布情况，可见各同位素峰无论在精确质量上还是在强度分布上基本一致，可以确认检测结果的可靠性。

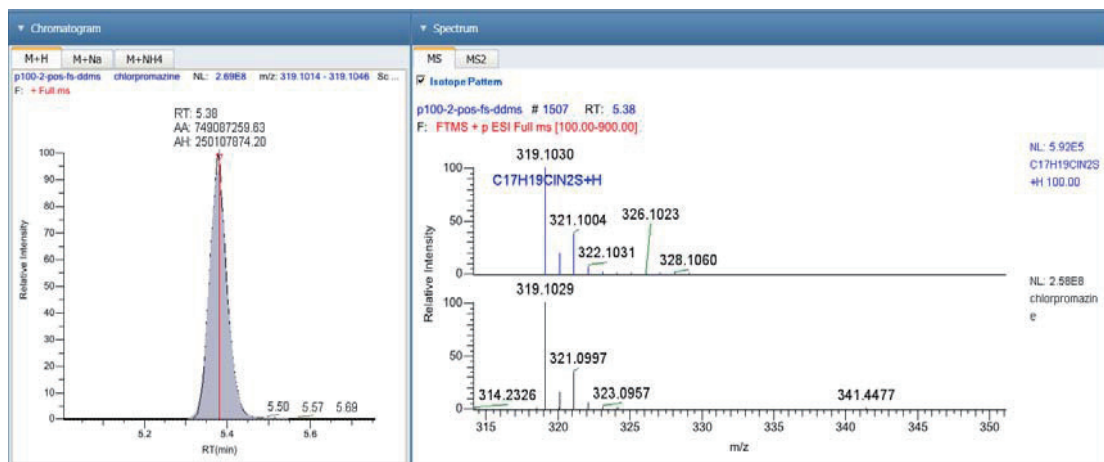


图2 氯丙嗪 (Chlorpromazine) 同位素分布确认

(右上图为氯丙嗪标准的同位素分布图，右下图为实际样品质谱图中氯丙嗪同位素分布情况)

Q-Exactive为四级杆与Orbitrap的串联质谱，可以得到高分辨、高质量精度的二级离子质谱图。在Exactfinder中可以将所有标准样品的二级谱图建立二

级质谱库，实际样品分析可以通过二级谱图的库搜索进行定性确认。图3为基质加标样品中克仑特罗的二级谱图确认结果。

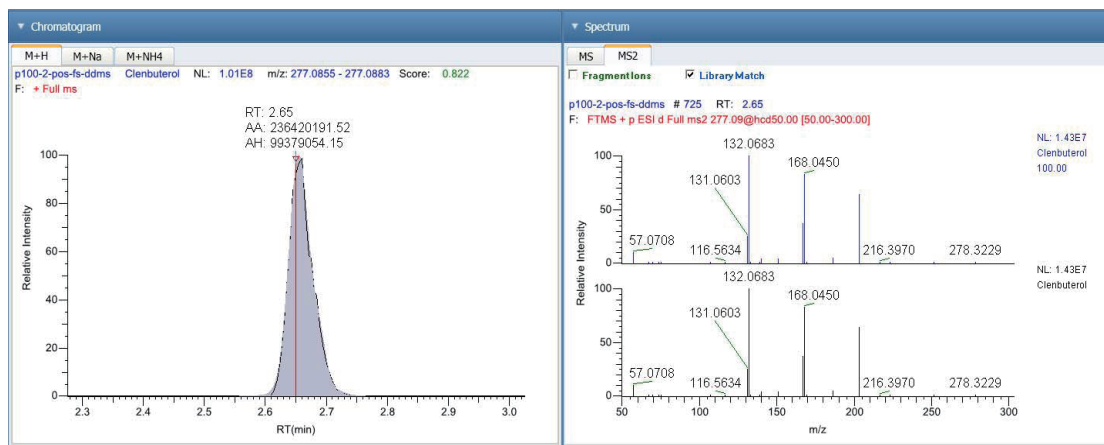


图3 克仑特罗 (clenbuterol) 二级谱图确认

3 结论

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，是兼具定性和定量功能的质谱分析平台，适合食品安全领域未知残留物的大范围筛查和定性定量分析。本文采用

Q-Exactive，在筛查软件Exactfinder的辅助下，建立了动物源食品中81种兽药残留同时筛查的方法，该方法简单、快速、准确、灵敏度高，能同时完成对81种兽药的定性定量分析。

赛默飞世尔科技

上海
上海浦东金桥路27号6号楼
电话: 021-6865 4588
传真: 021-6445 7830

北京
北京市东城区安定门东大街28号雍和大厦西楼七层
电话: 010-8419 3588
传真: 010-6621 0851

广州
广州东风中路410-412号时代地产中心3003-04室
电话: 020-8314 5188
传真: 020-8314 5288

服务热线
800 810 5118
400 650 5118

analyze.cn@thermofisher.com
www.thermo.com.cn

ISO REGISTERED
9001
CERTIFIED COMPANY

Thermo Fisher Scientific,
San Jose, CA USA is ISO Certified.

ANCM0075 2/1