



# 利用 Agilent 1290/6545 UHPLC-Q-TOF 系统通过全离子 MS/MS 分析肉类中的 122 种兽药

## 应用简报

### 作者

Tarun Anumol、Joan Stevens、  
Dan-Hui Dorothy Yang 和  
Jerry Zweigenbaum  
安捷伦科技有限公司  
Wilmington, DE

### 摘要

肉类中存在的兽药 (VD) 可能在人们食用肉类时构成健康风险；因此，在执法和风险评价过程中通常需要监测 VD 残留。可能的 VD 有几百种，涵盖化学特性差异极大的多类化合物。这通常需要立足于 LC-MS/MS 的先进分析方法和仪器、复杂的工作流程，以及大多繁琐的数据处理。本研究针对肉类中的 122 种重点 VD 开发出了一种用时 12 分钟的分析方法。为实施该方法，使用了安捷伦 Q-TOF 液质联用仪上的安捷伦全离子 MS/MS，并结合了安捷伦兽药个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 测试该方法。以每种药物最大容许浓度的 0.5、1 和 2 倍将全部 122 种 VD 加入牛肝、牛肾和牛肉组织中。然后使用 Agilent 6545 Q-TOF 液质联用仪在全离子数据采集模式下分析这些加标样品。利用 Agilent MassHunter 分子式查找软件检出和确认这些化合物的存在。PCDL 提供了每种化合物的 MS/MS 谱图和保留时间信息，以便通过数据审查过程快速而可靠地过滤出假阳性结果。在所有三种加标浓度下，每种基质中均检出了 92% 以上的 VD。为证明该系统提供定量分析结果的能力，得到了碎牛肉和牛肝低至 ng/g 浓度起的校准曲线。在未采用任何内标进行校正的情况下，85% 以上的 VD 具有高于 0.99 的  $R^2$ ，因此该方法可用于在一次分析运行中对动物基质中的 VD 进行筛查和定量分析。



Agilent Technologies

## 前言

饲养食用家畜需要以受控方式使用兽药 (VD) 达到预防疾病或促进快速生长的目的。然而, 药物管理策略不当以及对家畜的不合理给药可能会使药物残留于动物的肉及其他器官中, 在人食用过程中对其构成健康风险。耐药性是农业中使用抗生素过程中出现的另一个引人关注的问题。因此, 肉类及其他食品中的 VD 浓度受到最大残留限量 (MRL) 或容许浓度的监管, 而对各种药物来说, 最大残留限量或容许浓度的差异很显著 [1-3]。已知畜牧业中采用的 VD 有几百种, 这些药物的类别、化学结构和极性各不相同, 难以通过同一个方法进行分析。此外, 在复杂基质中对付通常很低的 MRL, 这需要灵敏而稳定的分析仪器 [4,5]。

通过多类别多残留分析方法已证明 LC/MS 技术能够提供高灵敏度和高选择性, 还能节省时间、人工和成本 [2,6]。然而, 使用精确质量的高分辨飞行时间 (TOF) 质谱仪能够为用户提供一些额外功能。全谱数据采集可确保采集到样品中所有电离化合物的信号。因此, 使用这项技术的监测方案能够无需进行任何方法开发即可用于新兴化合物。此外, 无需重新运行样品即可对新分析物进行回顾性数据挖掘。况且, TOF 谱图可检出和解析尚不存在分析标准的新型 VD 及代谢产物。

本研究旨在开发一种快速筛查方法以针对 120 多种经常监测的、跨越多种类别的 VD。所分析的 VD 表是以美国农业部的农业研究局 (USDA-ARS) 和食品安全检验局 (USDA-FSIS) 以往所实施的工作为基础 [2,7]。使用全离子 MS/MS 采集模式下运行的 Agilent Q-TOF 液质联用系统分析牛肉、牛肝和牛肾中的 VD。该数据采集模式可同时提供分子离子 (低能量通道) 和碎片离子 (高能量通道) 的高分辨率精确质量谱图。

随后采用安捷伦 PCDL 中的 MS/MS 谱图来验证分子离子及相应碎片离子是否与样品中的那些离子相匹配。本研究还包括使用商品化 Agilent QuEChERS 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 净化肉类萃取物。此前的研究已经表明, 该方法能够高效而选择性地去除高脂肪食品中的脂质。

通过 ng/g 浓度下生成的碎牛肉和牛肝基质匹配校准曲线, 对整个方法的定量分析能力进行了评估。

## 实验部分

### 标准品和试剂

大量的兽药标准品由 USDA-ARS 东部地区研究中心 (Wyndmoor, PA) 以乙腈 (MeCN)、甲醇、水或三者组合配制的溶液形式提供, 浓度为 214-1200 mg/L。阿维菌素、伊维菌素、硫尿嘧啶以及  $\beta$ -内酰胺类 (阿莫西林、氨苄青霉素、头孢唑啉、去乙酰头孢匹林、氯唑西林、萘夫西林、苯唑西林和青霉素) 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。超纯水来自 Millipore (Billerica, MA) 系统且  $>18.2$  M $\Omega$ -cm。乙腈 (LC-MS 级) 购自 VWR International (Radnor, PA), 甲酸 (88%, 经二次蒸馏) 购自 GFS Chemicals (Powell, OH)。

### 样品提取

向牛肉、牛脏和牛肾的预混匀样品 (各 2 g) 中加标 122 种 VD 以及之前选择的两种内标 (氟尼辛- $d_3$  和磺胺二甲嘧啶- $^{13}C_6$ ) [2]。在所有三种基质中, 加标浓度为 USDA 容许浓度的 0.5、1 和 2 倍 ( $x$ , 如表 1 所示)。使用 Agilent Bond Elut 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 进行样品前处理, 流程如此前的应用简报所述 (5991-6096CHCN) [8]。将最终萃取物稀释至 80/20 水/乙腈的比率, 在进样至 LC/MS 之前储存于 2 mL 聚丙烯自动进样器样品瓶中。以 0.5 倍、1 倍和 2 倍浓度将加标溶液加入溶剂和空白基质萃取液中 (后萃取) 以评估仪器方法和分析方法的性能以及基质效应。所有萃取物均储存于  $-10$  °C 的冷冻冰箱中, 并在样品前处理两周之后进行分析。

表 1. PCDL 中监测的兽药及其容许浓度

兽药	类别	1x 容许 浓度 (ng/g)	兽药	类别	1x 容许 浓度 (ng/g)
2-氨基氟苯咪唑	抗蠕虫药	10	多西环素	四环素	100
2-氨基甲苯咪唑	抗蠕虫药	10	埃玛菌素	抗蠕虫药	10
2-羟基二甲硝咪唑	抗球虫药	50	恩诺沙星	氟喹诺酮	100
2-巯基苯并咪唑	硫氧嘧啶类	25	依普菌素 B1a	抗蠕虫药	100
2-硫脲嘧啶	硫氧嘧啶类	400	红霉素 A	大环内酯类/林可胺类	100
5-羟基噻苯咪唑	抗蠕虫药	100	芬苯达唑	抗蠕虫药	400
6-甲基硫氧嘧啶	硫氧嘧啶类	400	芬苯达唑砒	抗蠕虫药	400
6-苯基硫尿嘧啶	硫氧嘧啶类	400	氟甲砒霉素	苯丙醇	300
6-丙基-2-硫尿嘧啶	硫氧嘧啶类	50	氟苯尼考胺	苯丙醇	300
阿维菌素	抗蠕虫药	20	氟苯咪唑	抗蠕虫药	10
乙酰丙嗪	镇静剂	10	氟尼辛	抗炎药	25
阿苯达唑	抗蠕虫药	50	氟尼辛-d3	内标	250
阿苯达唑亚砒	抗蠕虫药	50	加米霉素	大环内酯类/林可胺类	100
阿苯达唑砒	抗蠕虫药	50	氟哌啶醇	镇静剂	10
阿苯达唑-2-氨基砒	抗蠕虫药	50	哈洛克酮	抗蠕虫药	100
阿莫西林	$\beta$ -内酰胺	10	羟基异丙硝唑	抗球虫药	10
氨苄青霉素	$\beta$ -内酰胺	10	异丙硝唑	抗球虫药	10
阿扎哌隆	镇静剂	10	伊维菌素 B1a	抗蠕虫药	10
杆菌肽	其他	500	酮洛芬	抗炎药	10
倍他米松	抗炎药	100	左旋咪唑	抗蠕虫药	100
坎苯达唑	抗蠕虫药	10	林可霉素	大环内酯类/林可胺类	100
卡拉洛尔	镇静剂	10	甲苯咪唑	抗蠕虫药	10
卡巴多	其他	30	醋酸美伦孕酮	其他	25
头孢唑啉	$\beta$ -内酰胺	100	美洛昔康	抗炎药	100
头孢匹林	$\beta$ -内酰胺	100	甲硝唑	抗球虫药	10
氯霉素	苯丙醇	10	甲噻嘧啶	抗蠕虫药	100
氯丙嗪 (托拉嗪)	镇静剂	10	莫西菌素	抗蠕虫药	50
金霉素	四环素	1000	萘夫西林	$\beta$ -内酰胺	100
西马特罗	$\beta$ -激动剂	10	诺氟沙星	氟喹诺酮	50
环丙沙星	氟喹诺酮	50	新生霉素	其他	1000
克仑特罗	$\beta$ -激动剂	10	奥比沙星	氟喹诺酮	50
克林霉素	大环内酯类/林可胺类	100	苯唑西林	$\beta$ -内酰胺	100
氯唑西林	$\beta$ -内酰胺	10	奥吩达唑	抗蠕虫药	800
达氟沙星	氟喹诺酮	200	奥苯达唑	抗蠕虫药	10
DCCD (头孢噻吩的标记物)	$\beta$ -内酰胺	400	羧布宗	抗炎药	100
去乙酰头孢匹林	$\beta$ -内酰胺	100	土霉素	四环素	1000
去乙酰环丙沙星	氟喹诺酮	100	青霉素 G	$\beta$ -内酰胺	50
双氯芬酸	抗炎药	200	保泰松	抗炎药	100
双氯青霉素	$\beta$ -内酰胺	100	吡利霉素	大环内酯类/林可胺类	300
二氟沙星	氟喹诺酮	50	泼尼松	抗炎药	100
二甲硝咪唑	抗球虫药	10	异丙嗪	镇静剂	10
安乃近 (代谢物)	抗炎药	200	丙酰丙嗪	镇静剂	10
多拉菌素	抗蠕虫药	30	噻啉-2-羧酸	其他	30

兽药	类别	1x 容许浓度 (ng/g)
莱克多巴胺	$\beta$ -激动剂	30
罗硝唑	抗球虫药	10
沙丁胺醇	$\beta$ -激动剂	10
沙氟沙星	氟喹诺酮	50
塞拉菌素	抗蠕虫药	200
磺溴嘧啶	磺胺类	100
磺胺氯吡嗪	磺胺类	100
磺胺嘧啶	磺胺类	100
磺胺地托辛	磺胺类	100
磺胺多辛	磺胺类	100
磺胺乙氧基吡嗪	磺胺类	100
磺胺甲噁啶	磺胺类	100
磺胺二甲噁啶	磺胺类	100
磺胺二甲噁啶- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	内标	250
磺胺甲二唑	磺胺类	100
磺胺甲恶唑	磺胺类	100
磺胺甲氧吡嗪	磺胺类	100
磺胺	磺胺类	100
磺胺硝苯	磺胺类	100
磺胺吡啶	磺胺类	100
磺胺喹恶琳	磺胺类	100
磺胺噻唑	磺胺类	100
四环素	四环素	1000
噻菌灵	抗蠕虫药	100
甲矾霉素	苯丙醇	10
泰地罗新	大环内酯类/林可胺类	100
替米考星	大环内酯类/林可胺类	100
托芬那酸	抗炎药	200
三氯苯达唑	抗蠕虫药	50
三氯苯达唑亚砷	抗蠕虫药	50
三氟丙嗪	镇静剂	10
醋竹桃霉素	大环内酯类/林可胺类	1000
土拉霉素 A	大环内酯类/林可胺类	5500
泰乐菌素	大环内酯类/林可胺类	200
维吉尼霉素	其他	100
塞拉嗪	镇静剂	10
玉米赤霉醇 ( $\beta$ -玉米赤霉醇)	其他	100
齐帕特罗	$\beta$ -激动剂	12

## 仪器分析

该方法使用配有 40  $\mu$ L 定量环 HiPALS 自动进样器的 Agilent 1290 Infinity 超高效液相色谱仪 (UHPLC)。利用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18 (2.1  $\times$  150 mm, 1.8  $\mu$ m) 色谱柱以及水 + 0.1% 甲酸 (A) 和乙腈 + 0.1% 甲酸 (B) 的梯度进行分离。安捷伦在线过滤器 (部件号 5067-4638) 安装于自动进样器之后, 并且在分析柱之前采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 保护柱 (部件号 959757-902) 保护色谱柱并延长柱寿命。表 2 列出了用于本分析的液相色谱条件。图 1 示出了 80/20 水/乙腈中的 50 ng/mL VD 标准品获得的样品色谱图。

表 2. 液相色谱条件

参数	值												
仪器	Agilent 1290 Infinity LC												
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18, 2.1 $\times$ 150 mm, 1.8 $\mu$ m (部件号 959759-902)												
流动相	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸												
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.0</td><td>2</td></tr> <tr><td>1.0</td><td>2</td></tr> <tr><td>10</td><td>100</td></tr> <tr><td>11</td><td>100</td></tr> <tr><td>11.1</td><td>2</td></tr> </tbody> </table>	时间 (min)	B (%)	0.0	2	1.0	2	10	100	11	100	11.1	2
时间 (min)	B (%)												
0.0	2												
1.0	2												
10	100												
11	100												
11.1	2												
流速	0.5 mL/min												
后运行时间	3.0 min												
柱温	30 $^{\circ}$ C												
进样量	15 $\mu$ L												

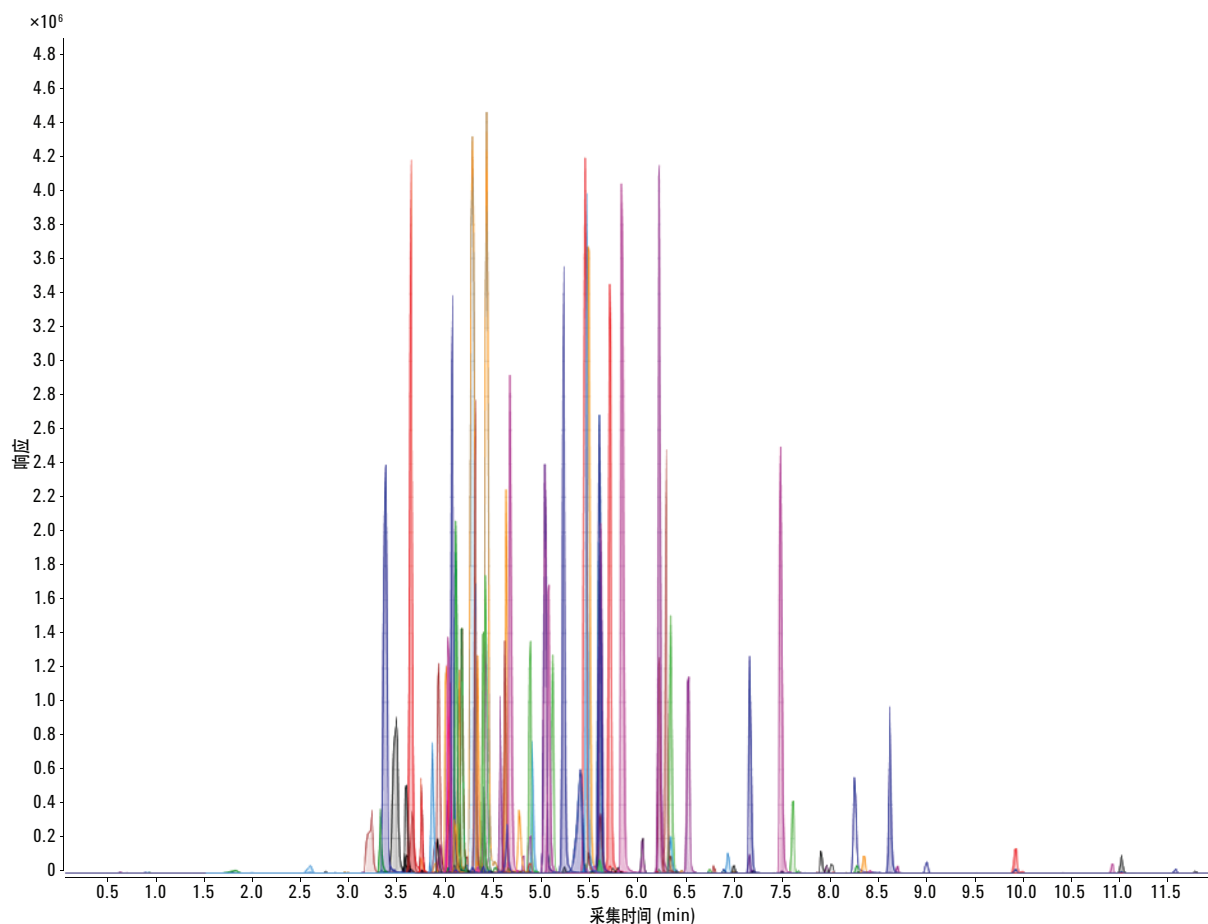


图 1. 122 种 50 ng/g 兽药的样品色谱图

该分析使用了正离子模式下运行的 Agilent 6545 精确质量四极杆飞行时间液质联用仪，此系统配备有安捷伦喷射流双电喷雾离子源。质谱仪运行条件详细列于表 3 中。使用安捷伦调谐溶液（部件号 G1969-85000）在整个质量数范围内对 6545 Q-TOF 液质联用系统进行调谐。使用 6545 Q-TOF 液质联用仪的“群集”调谐功能，在 2 GHz 扩展的动态范围内用易碎裂离子调谐法对仪器的  $m/z$  50-750 质量范围进行调谐。在分析过程中，包括嘌呤 ( $m/z$  122.0509) 和 HP-921 ( $m/z$  922.0098) 的参比离子由质谱仪的参比瓶 A 被输送至质谱仪中。

表 3. 质谱仪条件

参数	值
仪器	Agilent 6545 精确质量数 Q-TOF LC/MS 系统
电离模式	采用喷射流的正离子电喷雾电离
仪器模式	2 GHz, 扩展的动态范围
仪器调谐范围	采用易碎裂离子 ( $m/z$ 50-750) 进行“群集”调谐
质量数范围	$m/z$ 50 – 1000
干燥气温度	200 °C
干燥气流速	11 L/min
鞘气温度	375 °C
鞘气流速	11 L/min
雾化器压力	35 psi
碎裂电压	135 V
毛细管电压	3500
喷嘴电压	300 V
锥孔电压	45
碰撞能量	0、10、40 V

## 全离子 MS/MS 工作流程和数据分析

设计全离子 MS/MS 工作流程是为了在低碰撞能量和高碰撞能量通道中同时采集高分辨率质谱数据，其收集原理为：(A) 从低碰撞能量 (CE) 通道收集假分子离子或母离子数据，以及 (B) 从高碰撞能量通道收集碎片离子信息。在本实验中将仪器 CE 设置为 0 V、10 V 和 40 V。利用 0 V 设置采集母离子信息，而 10 V 则足以使大多数 VD 获得良好的碎片离子信息。一些分子量较大的 VD（如菌素类）需要较高的 CE 才可使母离子碎裂；因此采用 40 V 通道收集第三个通道数据。

使用 Agilent MassHunter 软件 (B.06.01 版) 进行数据采集，而 Agilent MassHunter 定性分析软件 (B.07.00 版) 则用于数据分析。将 MassHunter 定性分析软件中的分子式查找功能与数据搜索功能配合使用，以充分利用 PCDL 信息。PCDL 给予本研究所所需的所有 VD，以分子式、单同位素精确质量、CAS 号、在用于  $[M+H]^+$  离子的 0、10、20 和 40 V 下所采集的 MS/MS 谱图以及采用开发出来的液相色谱分析方法运行标准品所获得的保留时间。这能够显著提高鉴定的特异性。图 2 示出了全离子 MS/MS 工作流程，包括本研究中用于分析 VD 的数据处理过滤器。

## 结果与讨论

### 肉类中兽药的鉴定

全离子 MS/MS 工作流程用于鉴定母离子质量数，并使用安捷伦 PCDL 中可利用的谱图数据寻找高碰撞能量通道中的共流出碎片离子。在展示高通量情形下如何查看此类数据之前，图 3 示出了数据组成部分，这些数据被用来自动验证 MassHunter 定性分析软件中全离子 MS/MS 方法的结果。插图 3A 显示了从牛肉中鉴定出 1x 容许浓度新生霉素的质谱图，红括号内的预期同位素丰度和质量间距与实际数据（垂直红色条）相符。质量准确度、同位素质量间距、同位素丰度和保留时间 (RT) 与 PCDL 的匹配总得分达到了 98.41。图 3 中的插图 B 为安捷伦 PCDL 中包含的 CE 10 V 的新生霉素 MS/MS 谱图，图中标注了  $[M+H]^+$  母离子 (I) 和三个丰度最高的碎片离子 (II、III 和 IV)。图 3C 显示了在四个离子的正确 RT 下，从牛肉样品中测得的实际色谱峰。碎片离子 II ( $m/z$  189.0910) 和 III ( $m/z$  218.1023) 是合格的，但  $S/N < 9.0$  的 IV ( $m/z$  396.1442) 未能落入合格之列（根据数据分析方法所设定的  $S/N$  阈值：图 2）。在 MassHunter 定性分析软件中通过共流出得分和曲线图评估碎片离子数据。

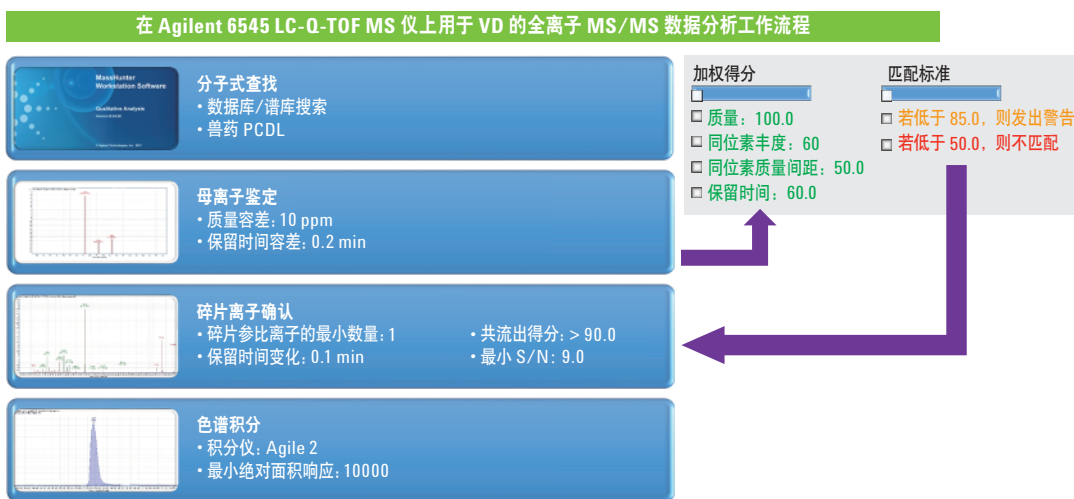


图 2. 安捷伦全离子 MS/MS 数据分析工作流程

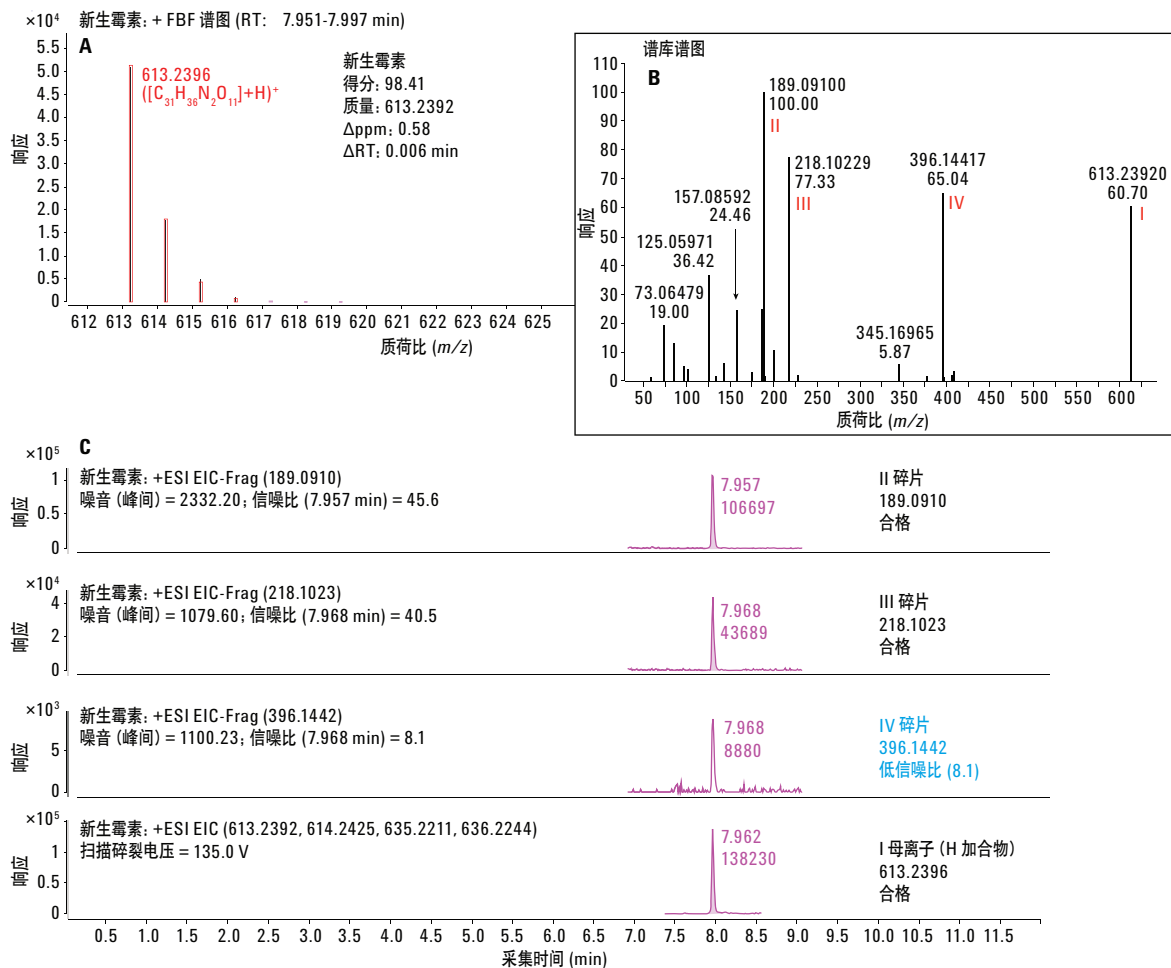


图 3. A) 牛肉中新生霉素的质谱图 and 同位素质量间距。B) 安捷伦 PCDL 中 CE 10 eV 下的新生霉素谱库谱图, 其中包括母离子 (I) 和三个最高丰度碎片 (II、III 和 IV) 与 (C) 实际样品数据的对比。化合物得到了可靠鉴定

在图 4A 中，将牛肉中新生霉素的分子离子峰与碎片离子峰的提取离子色谱图进行了叠加。根据每个碎片离子与洗脱时间范围内经过归一化的参比离子间的强度比值计算其共流出得分（值为 0-100，其中 100 为最高可能得分），并应用加权因子弱化参比离子峰开始与结束处的贡献。RT 偏移、不同峰宽或不同峰对称性（前沿、拖尾）均对共流出得分有不良影响。图 4B 显示了牛肉样品中新生霉素的离子共流出曲线图。通过叠加归一化（使碎片离子与参比离子在参比离子的洗脱时间范围内均获得最大强度）后的每个碎片离子与参比离子（LC/MS 中的母离子）的色谱图以及在参比

离子的时间范围内对强度比率绘图得到该共流出曲线。在参比离子峰中心得到 1 或接近 1 的比率，表明碎片离子具有很强的共流出现象。该曲线为评估碎片离子信号的有效性提供了一种强大而直观的手段。

相关的离子共流出得分也是一种验证软件中匹配结果可靠性的有效途径。此外，可通过设置阈值来过滤出可能的假阳性结果。在该方法中，数据分析需要至少有一个碎片离子得到高于 90.0 的共流出得分。因此，能够可靠鉴定出此样品中含有图 4 中的新生霉素。

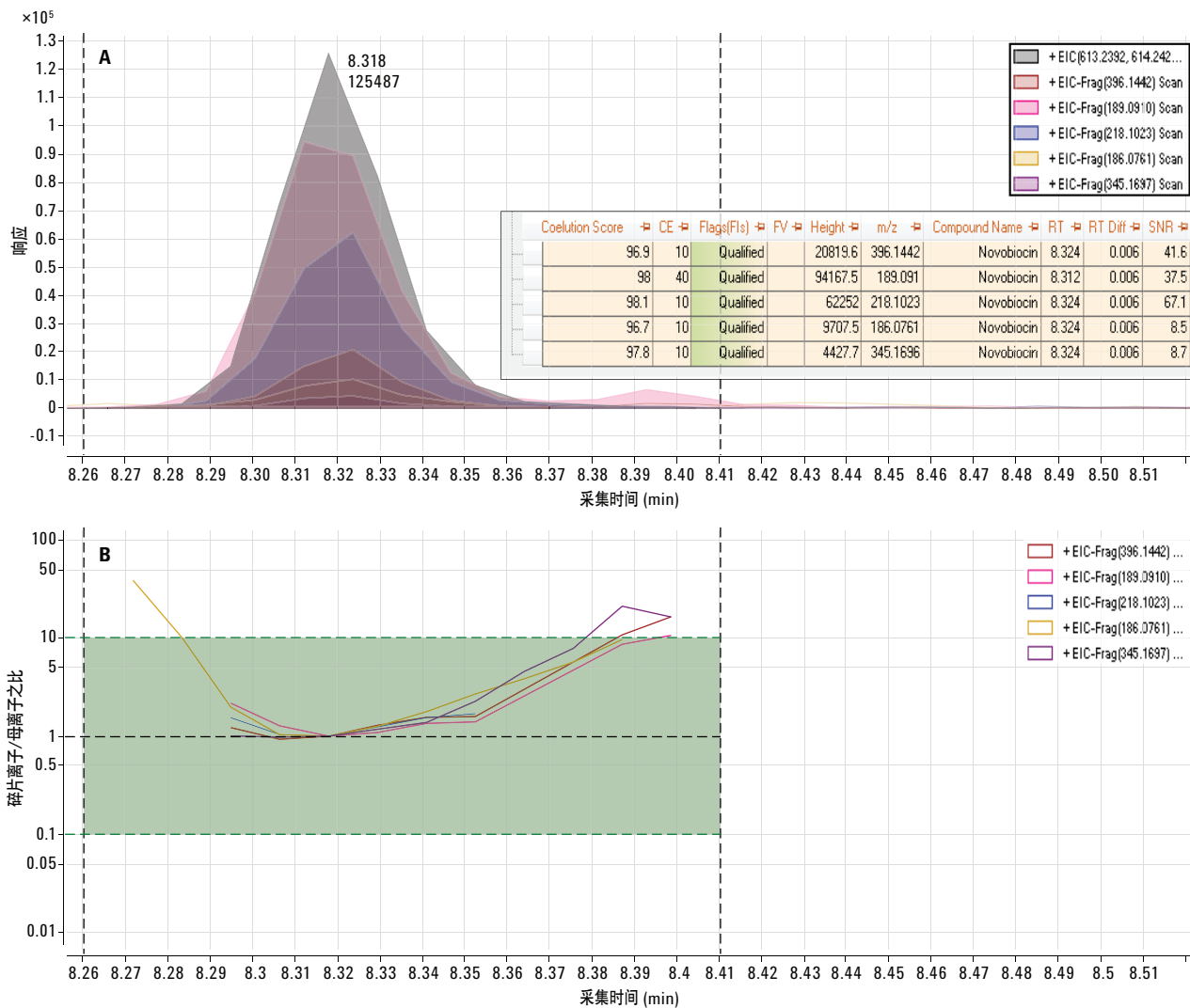


图 4. A) 牛肉中新生霉素的母离子和碎片离子的 EIC. B) 碎片离子与母离子的归一化比值对保留时间的作图

## 减少假阳性结果

实际样品中存在的异构体、同质异构化合物、干扰物和共流出基质元素通常意味着仅母离子精确质量的测定结果并非为明确的化合物鉴定结果。上述全离子 MS/MS 工作流程是实现这一目标的强大工具。不过，只有与 RT 需要相结合功能才最强大。因此，我们使用的兽药 AMRT PCDL 就包括了本研究所述的液相色谱方法的特定 RT。在安捷伦 PCDL 中包括保留时间在内的高分辨碎片离子质谱图的可用性大大降低了假阳性结果的检出率，且无需连续不断地注射分析标准品。

图 5 展示的是使用安捷伦 VD PCDL 中可用的 RT 匹配和碎片离子验证来防止产生假阳性结果的示例。在肾萃取物的加标样品中，分别于 4.088 分钟和 6.015 分钟处检出了恩诺沙星（一种氟喹诺酮类药物）。与恩诺沙星的  $[M+H]^+$  离子 (360.1718) 相比，两种物质的质量数误差小于 2.0 ppm，这两种物质甚至在 5.0 ppm 的窄质量容差窗口中也被视为检出物。然而，采用 MassHunter 定性分析软件中的“碎片离子验证法”选项时，恩诺沙星的四个最高丰度碎片离子均未在 6.015 分钟处出现峰，而所有离子碎片均在 4.088 分钟处的峰中检出。

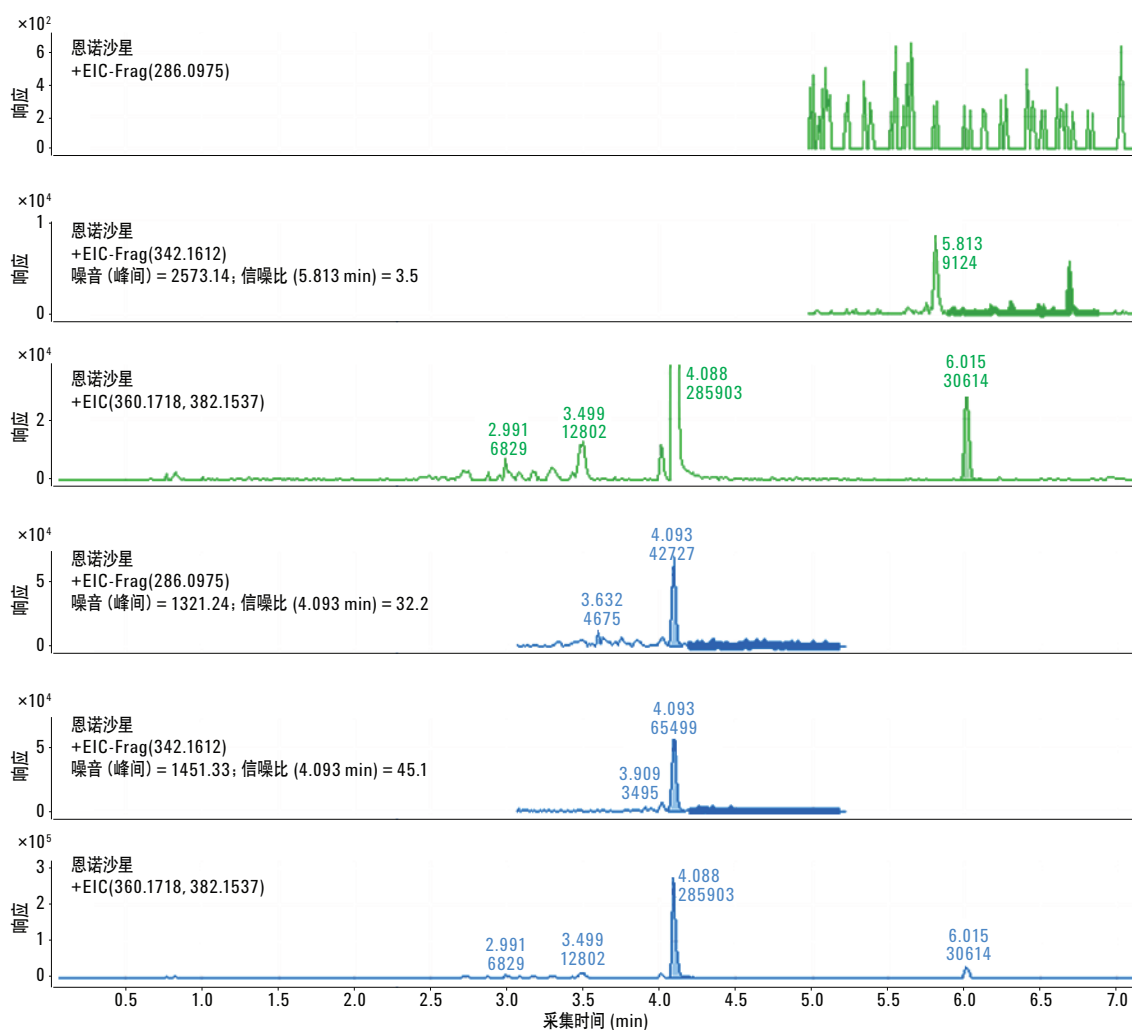


图 5. 使用安捷伦全离子工作流程通过碎片离子确认功能鉴定恩诺沙星可能的假阳性结果

如前所述，保留时间也可作为一种有力的定性手段，也可用于通过 PCDL 中记录的数据对结果进行验证。在该方法中，采用包含这些化合物 RT 信息的安捷伦兽药 PCDL 对预计出现于 4.23 分钟的恩诺沙星峰进行验证。通过在 MassHunter 定性分析软件中利用“质量数和保留时间”功能选择定性离子来实现这一目的，RT 设置为  $\pm 0.2$  分钟。因此，无需在每次运行时对所有分析标准品进样，这一特点对于包含 100 多种化合物的样品非常有利。这还意味着其他实验室极易采用这种方法和使用与该方法相关联的带保留时间的 PCDL，此外，运行该方法经济有效且简单直接。

### 牛肾、牛脏和牛肉萃取物中兽药的高灵敏度检测

如果 VD 在分子质量的容差限值内 ( $< 10.0$  ppm) 匹配，在信噪比  $> 9.0$  的情况下存在至少一种共流出碎片离子，并且 RT 处于 0.2 分钟内，则将该 VD 归类为已检出物质。如果母离子处于 10.0 ppm 的容差以内但 RT 偏移大于 0.2 分钟，或未找出碎片离子或离子共流出得分低于 90.0，则将化合物视作为得到初步鉴定。图 6 显示了全部三种基质以及三种加标浓度下的试剂空白的结果。在所有样品中，至少 92% 的 VD 得到了可靠鉴定或初步鉴定。在标准品中分别检出了 98% (2x)、96% (1x) 和 94% (0.5x) 的 VD。在基质加标样品中，牛肝、牛肉和牛肾中的检出率分别为 94%-96%、94%-97% 和 93%-97%。在全部三个加标浓度下，标准品中可靠检出的 VD (通过碎片离子和 RT 匹配) 为 88%-90%。类似地，在基质样品中，81%-88% (牛肝)、82%-88% (牛肉) 和 79%-86% (牛肾) 的 VD 得到了可靠鉴定。

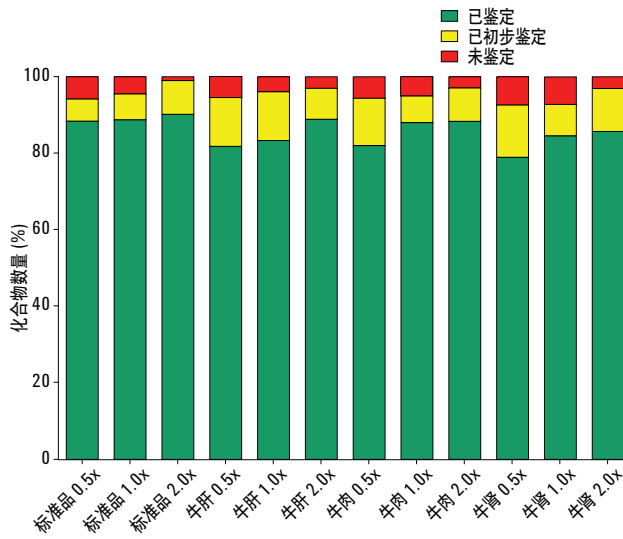


图 6. 在三种不同浓度的试剂空白和基质加标样品中鉴定出的兽药百分比 (x: 容许浓度)

在所有样品或所有加标浓度的标准品中，仅有两种化合物（头孢匹林和西马特罗）未检出。表 4 列出了在一些样品中未鉴定出的几种化合物。需要通过一些额外研究来确定这九种化合物能够利用现有方法进行分析。多数情况下（即使不是全部），可能是由于在加标样品或标准品中这些化合物本身发生了降解，其中一些化合物仅可作为溶液中的混合物形式存在。在两种情况下，从配制加标萃取物和标准品到仪器进样之间均不可避免地存在 2 周延迟。在另一台安捷伦 Q-TOF 仪器上执行的单独项目中，采用相同方法对所述基质中加标浓度为一半的所有六种正在讨论的  $\beta$ -内酰胺类均可实现可靠检测。若是这样，应采用更新鲜的样品和标准品。计划开展进一步研究的内容为确定所有这九种化合物能否使用上述筛查方法以其一半的容许浓度与其他化合物共同实现检测和鉴定。

在三种基质的每种基质中，约 10% 的化合物得到了初步鉴定。我们计划重新研究这些化合物中的某些化合物，以通过分析更新鲜的加标样品和标准品考察它们除实现母离子检测外，根据该方法规定的前述要求还能得到全面验证所需的诊断碎片离子。

总之，三种基质中的结果相似，所有化合物在不到 15 分钟的单次运行中均获得了较高检出率。

表 4. 样品中未鉴定出的 VD 列表

类别	标准品 0.5x	标准品 1.0x	标准品 2.0x	牛肝 0.5x	牛肝 1.0x	牛肝 2.0x
$\beta$ -激动剂	西马特罗	西马特罗	西马特罗	西马特罗	西马特罗	西马特罗
$\beta$ -内酰胺	头孢匹林	头孢匹林	头孢匹林	头孢匹林	头孢匹林	头孢匹林
$\beta$ -内酰胺	氯唑西林	氯唑西林	✓	氯唑西林	氯唑西林	氯唑西林
$\beta$ -内酰胺	阿莫西林	阿莫西林	✓	阿莫西林	阿莫西林	阿莫西林
$\beta$ -内酰胺	氨苄青霉素	氨苄青霉素	✓	氨苄青霉素	氨苄青霉素	✓
$\beta$ -内酰胺	萘夫西林	✓	✓	萘夫西林	✓	✓
$\beta$ -内酰胺	苯唑西林	✓	✓	苯唑西林	✓	✓
所有其他化合物	✓	✓	✓	✓	✓	✓
类别	牛肾 0.5x	牛肾 1.0x	牛肾 2.0x	牛肉 0.5x	牛肉 1.0x	牛肉 2.0x
$\beta$ -激动剂	西马特罗	西马特罗	西马特罗	西马特罗	西马特罗	西马特罗
$\beta$ -内酰胺	头孢匹林	头孢匹林	头孢匹林	头孢匹林	头孢匹林	头孢匹林
$\beta$ -内酰胺	氯唑西林	氯唑西林	氯唑西林	氯唑西林	氯唑西林	氯唑西林
$\beta$ -内酰胺	阿莫西林	阿莫西林	阿莫西林	阿莫西林	阿莫西林	阿莫西林
$\beta$ -内酰胺	氨苄青霉素	氨苄青霉素	✓	氨苄青霉素	氨苄青霉素	✓
$\beta$ -内酰胺	萘夫西林	萘夫西林	✓	萘夫西林	✓	✓
$\beta$ -内酰胺	苯唑西林	苯唑西林	✓	苯唑西林	✓	✓
其他	玉米赤霉醇	玉米赤霉醇	✓	✓	玉米赤霉醇	✓
硫氧嘧啶类	丙基硫氧嘧啶	丙基硫氧嘧啶	✓	✓	✓	✓
所有其他化合物	✓	✓	✓	✓	✓	✓

## 使用 Q-TOF LC/MS 对兽药的定量分析

为确定用于 VD 开发的全离子 MS/MS 方法中 LC Q-TOF 的线性度，针对 EMR-Lipid 流程所萃取的碎牛肉和牛肝样品绘制了 113 种 VD 的四点或五点基质匹配校准曲线。浓度范围为 2 (或 10) -100 ng/g。

对复杂基质中大量不同种类分析物进行定量分析通常是很难的，几乎总是需要在萃取和分析运行中使用若干种替代品和内标物来校正多变的离子抑制效应。选择合适的内标取决于多种因素，包

括分析因素和经济因素。为避免偏差，本节提供了未经内标校正的原始数据。为确定定量分析的线性度，计算了碎牛肉和牛肝基质中每种分析物的决定系数 ( $R^2$ )。在碎牛肉和牛肝中分别有超过 95% 和 93% 的目标分析物获得高于 0.90 的  $R^2$  (其中分别有 85% 和 86% 的分析物  $R^2 > 0.99$ )。牛肉和牛肝样品中仅有 5% 和 7% 的所分析 VD 的  $R^2$  小于 0.90。图 7 显示了碎牛肉和牛肝中浓度范围为 2-100 ng/g 的异丙硝唑与恩诺沙星的校准曲线。所有校准曲线均采用线性拟合，未进行加权。

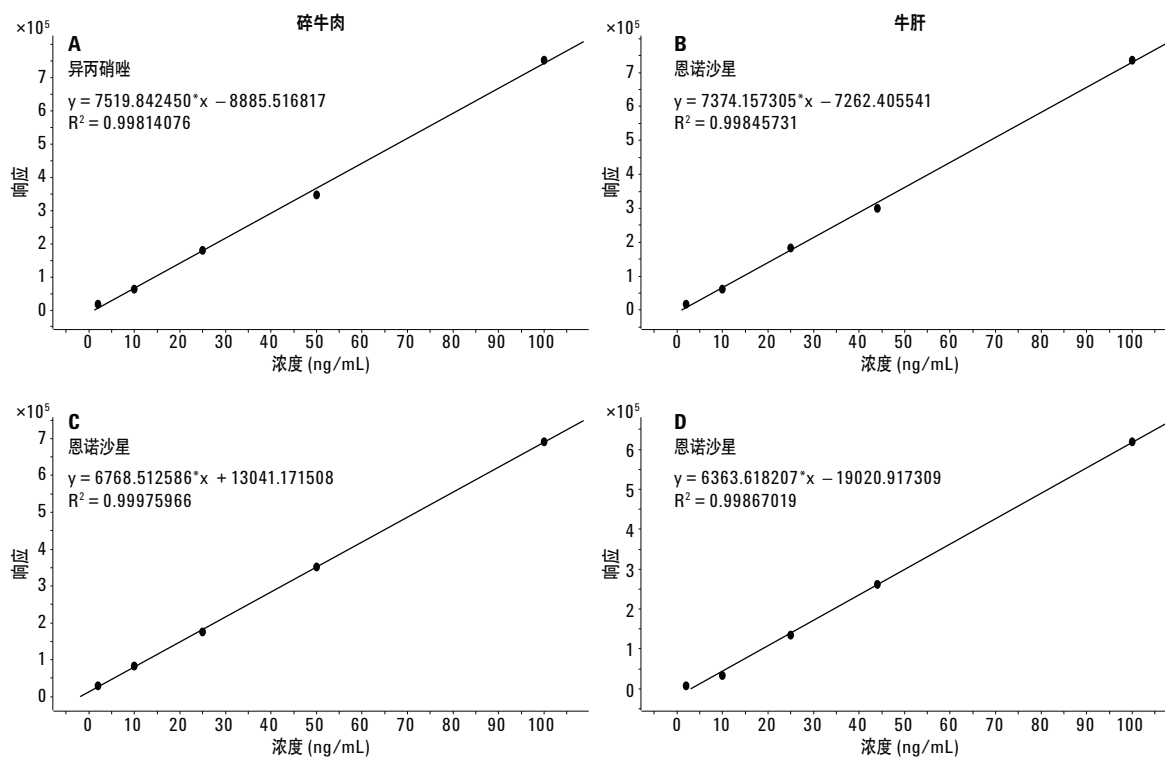


图 7. 碎牛肉和牛肝样品中异丙硝唑 (A 和 B) 和恩诺沙星 (C 和 D) 的校准曲线, 2-100 ng/g

## 结论

本应用简报证明了 Agilent 6545 Q-TOF 液质联用仪凭借其高分辨率高灵敏度，能够用于分析相关基质（包括牛肉、牛肝和牛肾）中的 120 多种 ng/g 级 VD。使用简单高效的安捷伦全离子 MS/MS 工作流程能够在同一分析运行中利用碎片离子进行分析物检测和鉴定。此举可显著减少可能的假阳性结果。安捷伦兽药 PCDL 库中的精确质量、MS/MS 谱图以及特定液相色谱条件下修正的保留时间进一步改善了复杂基质中的化合物鉴定及其稳定性。生成的校准曲线证明了该方法执行定量分析的能力。因此，使用 6545 Q-TOF 液质联用仪在单次分析运行中能够为肉类中的 VD 提供高灵敏度定性及定量信息。

## 致谢

感谢 USDA-ARS 东部地区研究中心的 Steven Lehotay 为本研究及应用简报提供兽药溶液和反馈意见。

## 参考文献

1. European Commission, Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, O.J.E.C. L221, Editor. (2002)
2. M. J. Schneider, S. J. Lehotay, A. R. Lightfield. "Validation of a streamlined multiclass, multiresidue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014)
3. Health Canada. Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada. (2012)
4. J. A. Park, *et al.* "Single-step multiresidue determination of ten multiclass veterinary drugs in pork, milk, and eggs using liquid chromatography with tandem mass spectrometry" *Journal of Separation Science* **38(16)**, 2772-2780 (2015)
5. H. Wei, *et al.* "Development and validation of a multiresidue screening method for veterinary drugs, their metabolites and pesticides in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **32(5)**, 686-701 (2015)
6. R. Yamada, *et al.* "Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry" *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **70(1)**, 54-65 (2006)
7. L. Geis-Asteggiate, *et al.* "Structural characterization of product ions by electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry to support regulatory analysis of veterinary drug residues in foods" *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **28(10)**, 1061-1081 (2014)
8. L. Zhao, D. Lucas, 采用 LC/MS/MS 进行牛肝中的兽药多残留分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-6096 (2015)

## 更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016年4月8日，中国出版

5991-6651CHCN



**Agilent Technologies**