

海鲜组织中的兽药分析

实时直接分析 (DART) 和高效液相色谱 (HPLC) 与 Agilent 6400 系列三重四极杆质谱仪 (QQQ-MS) 联用系统

作者

Cheryl L. Lassitter
首席化学家, DOC、NOAA、
NMFS、NSIL

Sheher Bano Mohsin
高级应用科学家
安捷伦科技有限公司

Joan M. Stevens
高级应用科学家
安捷伦科技有限公司

前言

水产养殖是一个不断增长的全球性行业；预计 2030 年以后全球产量可能超过 93000 吨¹。随着产量提高而不断增加的兽药使用量已成为全球关注的问题。虽然针对水产养殖用兽药和非处方抗生素的使用有相应的控制和监管措施，但某些国家对耐药性和毒性的担忧仍在不断增加。美国食品进口量持续增长，因而愈发需要一种快速灵敏的筛查技术，用于检测海鲜中未经批准的水产养殖用兽药。多家制造商已经开发出使用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 来测定兽药残留的快速筛查方案。性能最佳、灵敏度最高的仪器方法当选高效液相色谱 (HPLC) 与串联质谱 (MS/MS 或三重四极杆/MS) 联用系统，该仪器平台可显著降低背景信号，还能够准确定量测定样品基质中浓度极低的兽药²。

另一方面，IonSense, Inc. 的实时直接分析质谱 (DART-MS) 有利于对组织制品中的各类兽药进行实时实验室分析，同时省去了典型 HPLC-MS 所需的标准方案和程序。通常采用费时的 ELISA 试剂盒分析个别的目标兽药，借助 DART-MS 进行分析可以实时、同步地检测多种兽药类别。

开发如 DART-MS 的离子源技术，以便在大气压/地电位（分子电离至带电状态所消耗的最低能量）对材料和样品基质进行快速、非接触分析。将挥发性样品引入到一个真空中，在那里与亚稳态原子相反应而发生电离。该技术诞生于 2005 年，首先在州和联邦实验室中用于筛查人用非法药物，并且已通过 HPLC-MS 技术验证为确证性方法。它已经有一些成功应用的示例，包括药物、代谢物、肽和低聚糖、合成有机物、有机金属化合物、滥用药物、爆炸物和有毒工业化学品等的检测。DART-MS 当前用于混凝土、沥青、人体皮肤、货币、航空公司登机牌、名片、水果、蔬菜、香料、饮料、体液、园艺树叶、鸡尾酒杯和服装等各种表面，它可以实时地提供瞬间响应，这对于提高通量和增强分析能力至关重要³。

三重四极杆 (QQQ) MS 技术已得到成功应用。它以 Agilent iFunnel 技术的高性能为基础，其中包括 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统，该系统能够检测极低浓度的兽药。6495 系统将分析灵敏度、动态范围、耐用性、精密度和准确度提升至前所未有的水平⁴。本应用简报介绍了安捷伦专利技术 iFunnel QQQ 与 DART 离子源的实时分析能力结合的新用途，即，对添加兽药混标至海鲜组织中的虾和鱼类海鲜基质进行分析。

使用 Agilent 6400 系列三重四极杆/MS，以全面考察 DART 和 HPLC-ESI（电喷雾离子化）的功能，这是通过 Agilent 1290 HPLC-6495 系统和 DART-6495 系统并行地分析一系列兽药来实现（图 1）。

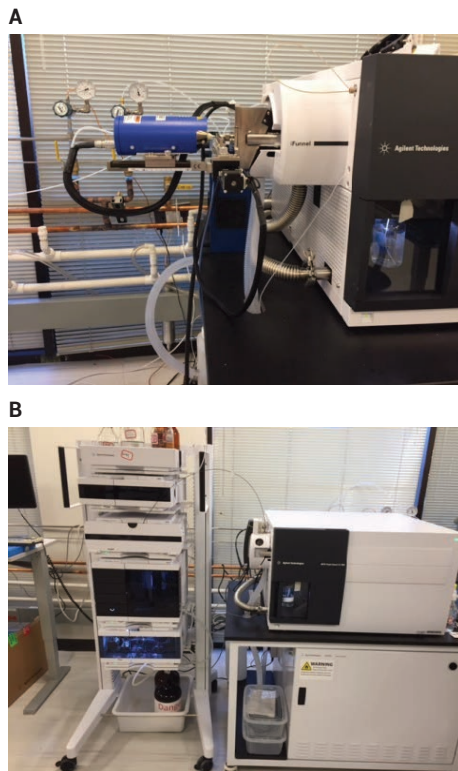


图 1. A) Ionsense, Inc. SVP-DART 与 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪联用系统。B) Agilent 1290 HPLC 与 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪联用系统

实验部分

使用 Agilent 6495 iFunnel（三重四极杆质谱仪，型号 G6495A）和 Ionsense, Inc. 带 Vapor 接口的 SVP-DART 对分析物进行分离。分析九种兽药的混合标样（图 2，Sigma-Aldrich），测定 DART-QQQ 平台对这些组分的定量限、检测限、线性动态范围和分析灵敏度等基准资料。

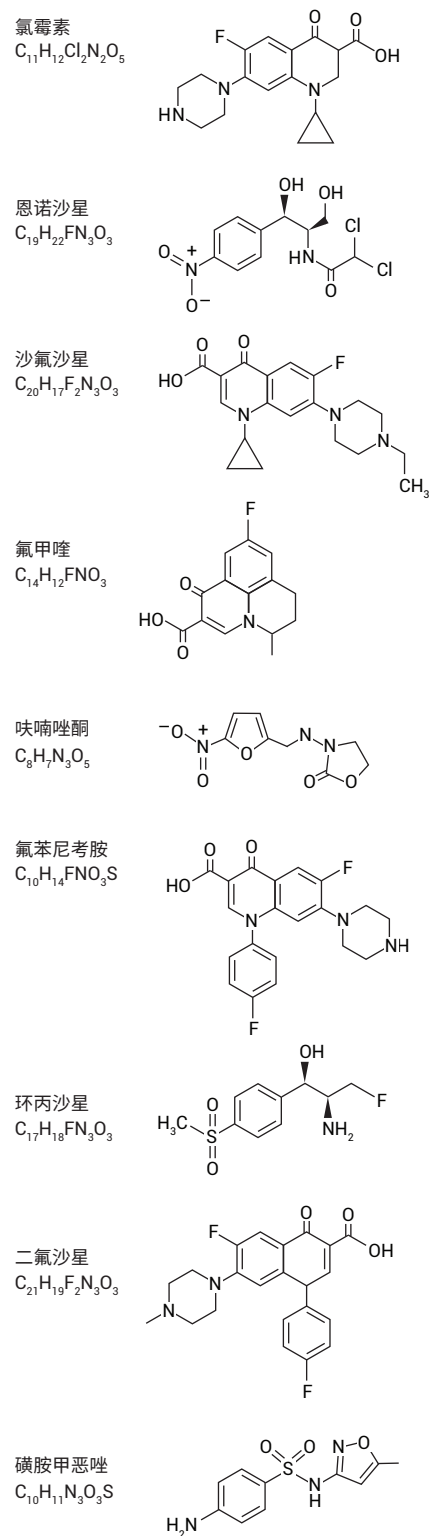


图 2. 使用 DART-MS 和 HPLC-MS 分析的水产养殖用兽药

采用 Agilent Bond Elut 增强型脂质去除产品 (EMR-Lipid) 萃取鱼虾组织。EMR-Lipid dSPE 试剂盒包括分散吸附剂, 其被预称量置于 15 mL 离心管中 (EMR-Lipid, 部件号 5982-1010), 还包括经过预包装的 $MgSO_4$ 抛光粉 (部件号 5982-0102)。将大约 15 g 的白虾 (*I. setiferus*) 和 5 g 罗非鱼 (*Oreochromis spp*) 转移至陶瓷研钵中, 将其彻底浸软以裂解组织的细胞壁。将 2 g 浸软的组织转移至 50 mL 聚丙烯离心管中。在水中制备各个加标化合物之后 (例外: 氯霉素使用购自 Fisher Chemical 的 LC/MS 级乙醇进行配置), 使用去离子水为图 2 中列出的 9 种药物配置混合加标溶液。该混合溶液的加标浓度为: 500 ppb、250 ppb、100 ppb、50 ppb 和 10 ppb。

组织加标后, 静置样品 15 分钟。接着, 将加标组织涡旋混合 30 秒, 然后将 10 mL 含 5% 甲酸的乙腈溶液 (Fisher Chemical, LC/MS 级) 加入离心管中。将离心管涡旋混合 1 分钟, 并在 4000 rpm 的转速下离心 10 分钟。离心后, 另将 5 mL 的 5 mM 乙酸铵加到已预装分散固相萃取剂的 15 mL 聚丙烯管 (部件号 5982-1010) 中涡旋混合 1 分钟, 活化 EMR-Lipid 分散吸附剂。也可以在后续实验中使用 18 Ω 纯水, 得到更出色的结果。在分散步骤中用纯水替代乙酸铵的方案将在随后的文章中发布。

涡旋混合分散吸附剂和乙酸铵后, 立即将所提取样品管中的 5 mL 上清液加到包含分散吸附剂和乙酸铵的离心管中, 涡旋混合 1 分钟, 并在 4000 rpm 的转速下离心 10 分钟。然后将全部萃取液从 EMR-Lipid 离心管中倾析到一个 50 mL 离心管中, 并加入一整袋 $MgSO_4$ 抛光粉。先摇晃该离心管, 再涡旋混合 1 分钟, 并在 4000 rpm 的转速下离心 10 分钟。然后将包含 $MgSO_4$ 粉末的离心管上层转移到干净的 15 mL 聚丙烯管中, 并在 65 \pm 5 $^{\circ}C$ 的水浴上使用 N_2 进行吹扫蒸发, 直至管中留有 10 μ L 内容物。

将 15 mL 聚丙烯管中的内容物复溶于 100 μ L 1:1 的 5 mM 甲酸铵/甲醇 (Fisher Chemical, LC/MS 级) 中。将管中复溶物涡旋混合 30 秒。DART QuickStrip 卡的每个筛查点上用 5 μ L 溶液进行点样。要完成 HPLC 分析, 将 50 μ L 复溶溶液转移至 2 mL 微量离心管中离心 30 秒。随后, 将 30 μ L 离心后溶液转移至带有聚合物内插管 (部件号 5180-1270) 的安捷伦 HPLC 样品瓶中。图 3 展示了 Agilent Bond Elut EMR-Lipid dSPE 的流程图。图 4 以图形方式展示了 Bond Elut 增强型基质去除试剂盒增强的净化效果。

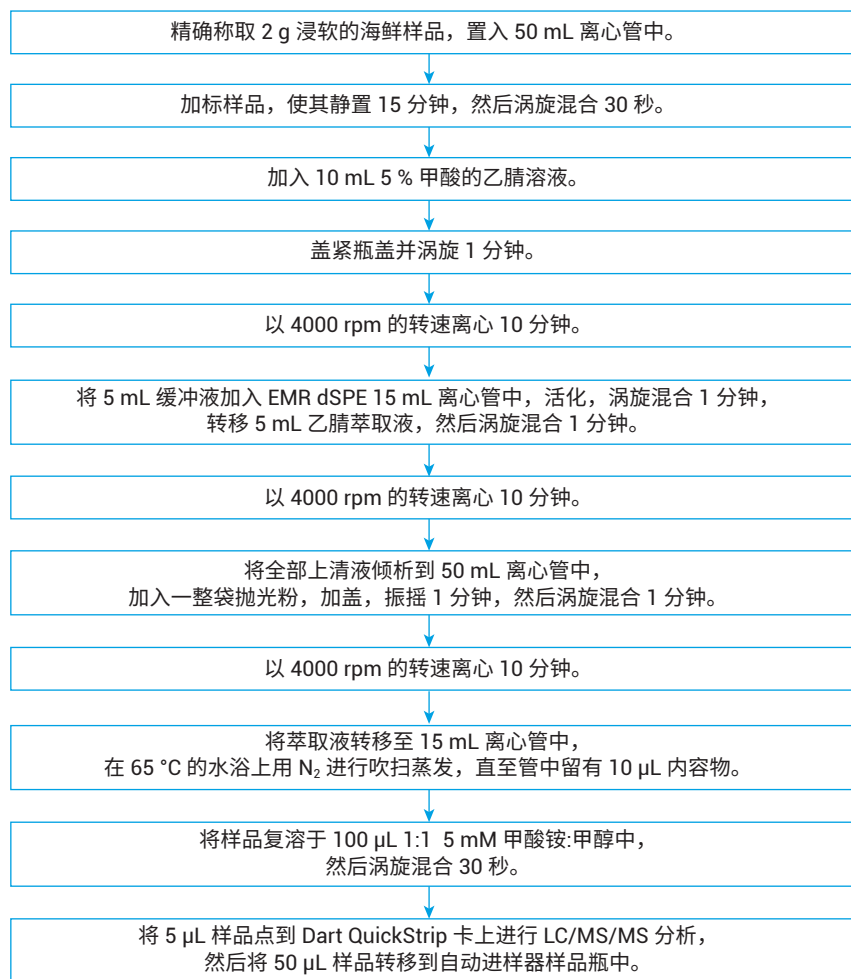


图 3. 使用 Agilent Bond Elut EMR-Lipid dSPE 分析海鲜中兽药的样品前处理过程

使用 DART – Agilent 6495 三重四极杆/MS 的仪器平台分析

图 5 展示了 DART 离子源所用的参数。根据目标分析物设置正/负极性。使用 QuickStrip 的采样配置，运行温度 400 °C，加热器等待时间 30 秒，采样速度 0.5 mm/s，触点闭合延迟时间 2 秒。在迭代实验后，发现同一个 DART QuickStrip 的第二次分析结果得到了最佳峰高和分辨率（磺胺甲恶唑，50 ppb，图 6）。图 7 显示了 6495 QQQ/MS 软件优化后的程序设置。图 8、9 和 10 列出了分析水产养殖用兽药所用的 MRM 离子对。图 5 展示了 DART 离子源 (lonsense, Inc.) 使用的程序设置。

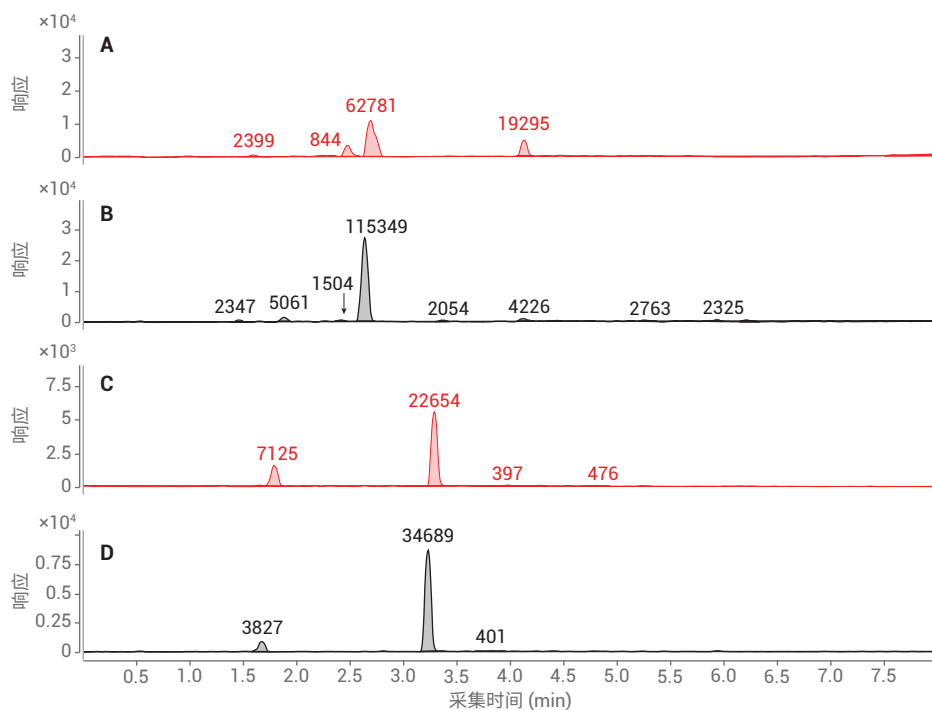


图 4. 经过 EMR—Lipid 净化前后的吡喃唑酮和氯霉素。请注意：净化前色谱图中出现的额外峰在净化后大大减少

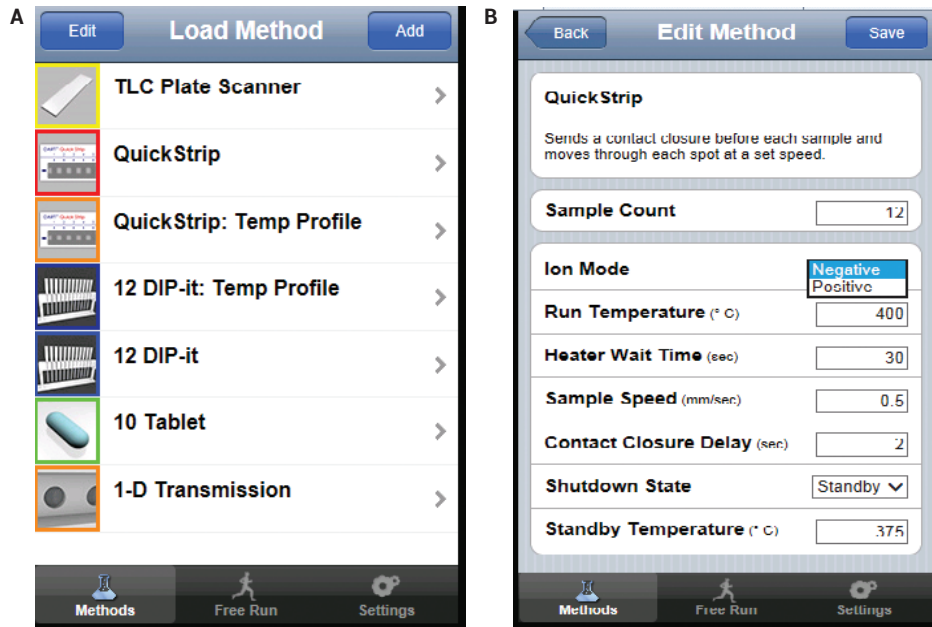


图 5. DART 离子源的软件程序设置

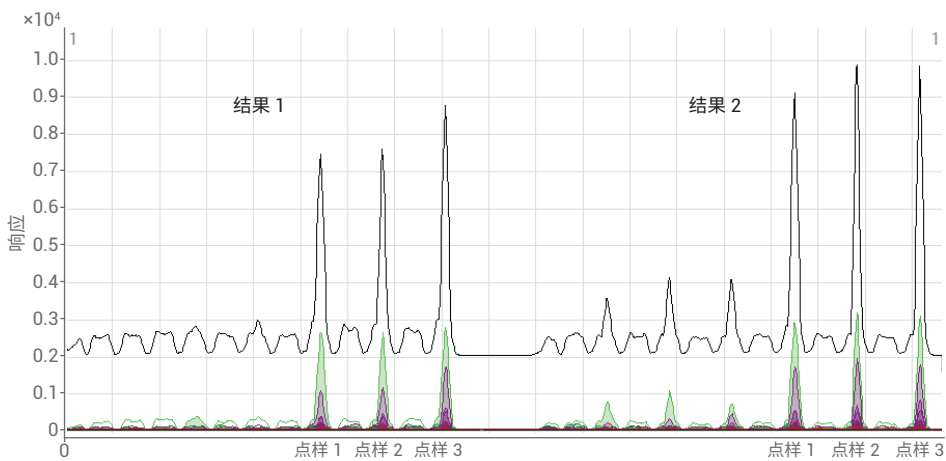


图 6. 50 ppb 磺胺甲恶唑 ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$) 的第一次和第二次 DART QuickStrip 分析结果

Acquisition Source Chromatogram Instrument Diagnostics

Source parameters:

Gas Temp: 200 °C 200 °C

Gas Flow: 11 l/min 11.0 l/min

Nebulizer: 0 psi 1.0 psi

Capillary: Positive 100C V Negative 1000 V 1575 nA

Chamber Current: 0.24 μA

iFunnel parameters:

High Pressure RF: Positive 150 V Negative 90 V

Low Pressure RF: 60 V 60 V

Copy Paste

Paste to All Segments

图 7. Agilent 6495 三重四极杆/MS 优化后的程序方法设置

Acquisition Source Chromatogram Instrument Diagnostics

Scan segments

Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
▶	Difloxacin	<input type="checkbox"/>	400.1	Unit	382.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Difloxacin	<input type="checkbox"/>	400.1	Unit	356.2	Unit	5	380	16	2	Positive
	Difloxacin	<input type="checkbox"/>	400.1	Unit	334.1	Unit	5	380	32	2	Positive
	Difloxacin	<input type="checkbox"/>	400.1	Unit	306.1	Unit	5	380	36	2	Positive
	Difloxacin	<input type="checkbox"/>	400.1	Unit	299.1	Unit	5	380	32	2	Positive
	Sarafloxacin	<input type="checkbox"/>	386.1	Unit	368.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Sarafloxacin	<input type="checkbox"/>	386.1	Unit	348.1	Unit	5	380	40	2	Positive
	Sarafloxacin	<input type="checkbox"/>	386.1	Unit	342.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Sarafloxacin	<input type="checkbox"/>	386.1	Unit	320.1	Unit	5	380	40	2	Positive
	Sarafloxacin	<input type="checkbox"/>	386.1	Unit	299.1	Unit	5	380	40	2	Positive
	Enrofloxacin	<input type="checkbox"/>	360.2	Unit	342.2	Unit	5	380	20	2	Positive
	Enrofloxacin	<input type="checkbox"/>	360.2	Unit	316.2	Unit	5	380	16	2	Positive
	Enrofloxacin	<input type="checkbox"/>	360.2	Unit	286.1	Unit	5	380	36	2	Positive
	Enrofloxacin	<input type="checkbox"/>	360.2	Unit	245.1	Unit	5	380	32	2	Positive
	Enrofloxacin	<input type="checkbox"/>	360.2	Unit	203.1	Unit	5	380	44	2	Positive
	Ciprofloxacin	<input type="checkbox"/>	332.1	Unit	314.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Ciprofloxacin	<input type="checkbox"/>	332.1	Unit	288.2	Unit	5	380	20	2	Positive
	Ciprofloxacin	<input type="checkbox"/>	332.1	Unit	245.1	Unit	5	380	20	2	Positive

图 8. 二氟沙星 ($C_{21}H_{19}F_2N_3O_3$)、沙氟沙星 ($C_{20}H_{17}F_2N_3O_3$)、恩诺沙星 ($C_{19}H_{22}FN_3O_3$) 和环丙沙星 ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$) 的 MRM 离子对

Acquisition											
Source	Chromatogram	Instrument									
Scan segments											
Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
	Chloramphenicol	<input type="checkbox"/>	321	Unit	46.1	Unit	5	380	60	4	Negative
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	244.1	Unit	5	380	12	4	Positive
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	202	Unit	5	380	32	4	Positive
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	126	Unit	5	380	52	4	Positive
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	99.1	Unit	5	380	70	4	Positive
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	75.1	Unit	5	380	70	4	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	156	Unit	5	380	12	4	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	108.1	Unit	5	380	24	4	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	92.1	Unit	5	380	24	4	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	80.1	Unit	5	380	56	4	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	65.1	Unit	5	380	48	4	Positive
	florfenicol amine	<input type="checkbox"/>	248.1	Unit	230	Unit	10	380	12	4	Positive
	florfenicol amine	<input type="checkbox"/>	248.1	Unit	130.1	Unit	10	380	24	4	Positive
	Furazolidone	<input type="checkbox"/>	226	Unit	95	Unit	5	380	20	3	Positive
	Furazolidone	<input type="checkbox"/>	226	Unit	83	Unit	5	380	20	3	Positive
	Furazolidone	<input type="checkbox"/>	226	Unit	67	Unit	5	380	40	3	Positive

图 9. 环丙沙星 (C₁₇H₁₈FN₃O₃)、氯霉素 (C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅)、氟甲喹 (C₁₄H₁₂FNO₃)、磺胺甲恶唑 (C₁₀H₁₁N₃O₃S) 和氟苯尼考胺 (C₁₀H₁₄FNO₃S) 的 MRM 离子对

Acquisition											
Source	Chromatogram	Instrument									
Scan segments											
Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
	Ciprofloxacin	<input type="checkbox"/>	332.1	Unit	245.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Ciprofloxacin	<input type="checkbox"/>	332.1	Unit	231.1	Unit	5	380	40	2	Positive
	Chloramphenicol	<input type="checkbox"/>	321	Unit	257	Unit	5	380	0	2	Negative
	Chloramphenicol	<input type="checkbox"/>	321	Unit	152.1	Unit	5	380	4	2	Negative
	Chloramphenicol	<input type="checkbox"/>	321	Unit	121	Unit	5	380	36	2	Negative
	Chloramphenicol	<input type="checkbox"/>	321	Unit	46.1	Unit	5	380	60	2	Negative
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	244.1	Unit	5	380	12	2	Positive
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	202	Unit	5	380	32	2	Positive
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	126	Unit	5	380	52	2	Positive
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	99.1	Unit	5	380	70	2	Positive
	Flumequine	<input type="checkbox"/>	262.1	Unit	75.1	Unit	5	380	70	2	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	156	Unit	5	380	12	2	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	108.1	Unit	5	380	24	2	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	92.1	Unit	5	380	24	2	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	80.1	Unit	5	380	56	2	Positive
	Sulfamethoxazole	<input type="checkbox"/>	254.1	Unit	65.1	Unit	5	380	48	2	Positive
	florfenicol amine	<input type="checkbox"/>	248.1	Unit	230	Unit	10	380	12	2	Positive
	florfenicol amine	<input type="checkbox"/>	248.1	Unit	130.1	Unit	10	380	24	2	Positive

图 10. 氯霉素 (C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅)、氟甲喹 (C₁₄H₁₂FNO₃)、磺胺甲恶唑 (C₁₀H₁₁N₃O₃S) 和呋喃唑酮 (C₈H₇N₃O₅) 的 MRM 离子对

使用 Agilent 1290 Infinity HPLC 和 Agilent 6495 三重四极杆/MS 的仪器平台分析

表 1 列出了所用的 Agilent 1290 Infinity HPLC 色谱柱及方法参数。HPLC 分析所用的 6495 QQQ/MS 程序优化方法设置与 DART-QQQ/MS 分析使用的相同。

结果与讨论

要校正样品的基质干扰效应，可通过分析虾和鱼组织与基质匹配的混合标样（使用兽药标样加标的组织样品），确定所检组织中兽药的检测限。根据第二次分析的 DART 结果（图 6），所有与基质匹配的兽药标样在浓度为 50 ppb 时均可检出，且若干与基质匹配的兽药还可在浓度低至 1 ppb 时检出。图 11 和 12 展示了使用浓度为 1 ppb 的基质匹配标样得到的环丙沙星和氟甲喹的 DART-QQQ/MS 数据结果。

要校正样品基质干扰效应，可使用 HPLC-QQQ/MS 方案分析中的与基质匹配的混合标样，确定所检组织中兽药的检测限。如恩诺沙星示例所示（图 13），基质匹配标样浓度为 10 ppt 时，其中的目标分析物可轻松检出。

表 1. 色谱柱和方法参数

参数	值		
色谱柱	Agilent Pursuit 3 PFP 色谱柱, 100 × 3 mm, 3 μm (部件号 A3051100X030)		
流动相	乙腈/水 (含 0.1% 甲酸)		
进样量	2 μL		
HPLC 分离程序	时间 (min)	%水	%乙腈
	0.10	95.00	5.00
	1.00	80.00	20.00
	5.00	40.00	60.00
	5.10	10.00	90.00
	6.00	10.00	90.00
	6.10	100.00	0.00

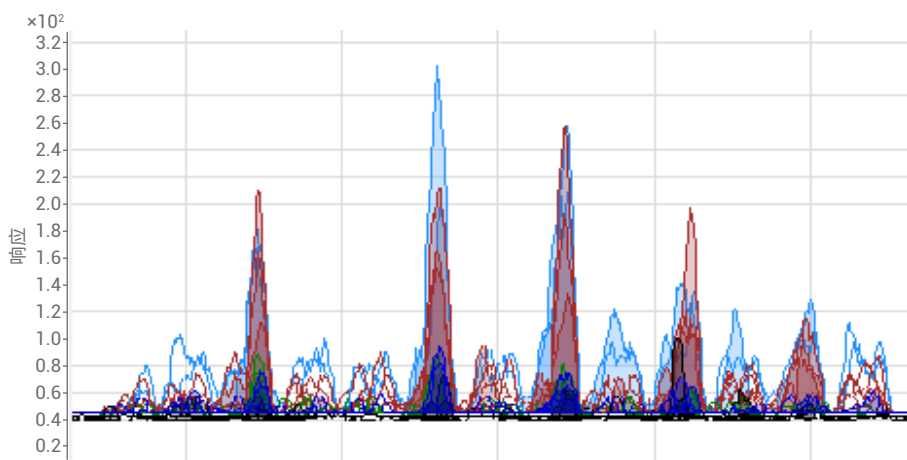


图 11. 环丙沙星 ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$) 与基质匹配的混合标样, 1 ppb

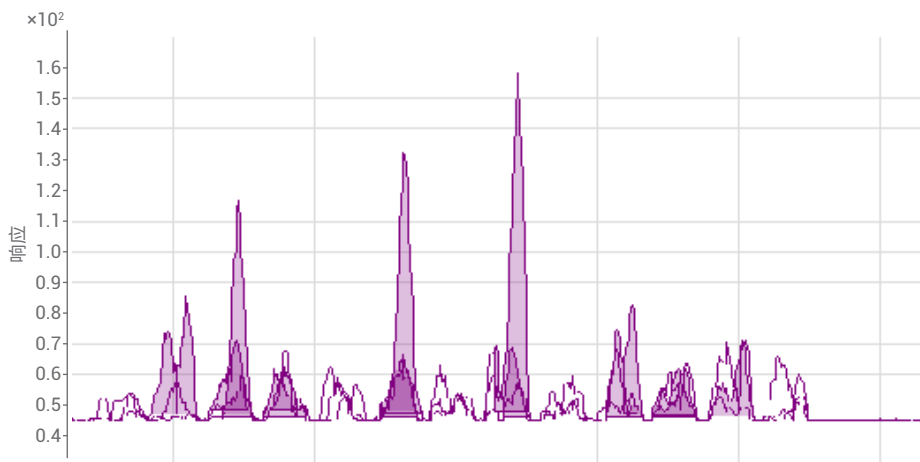


图 12. 氟甲喹 ($C_{14}H_{12}FNO_3$) 与基质匹配的混合标样, 1 ppb

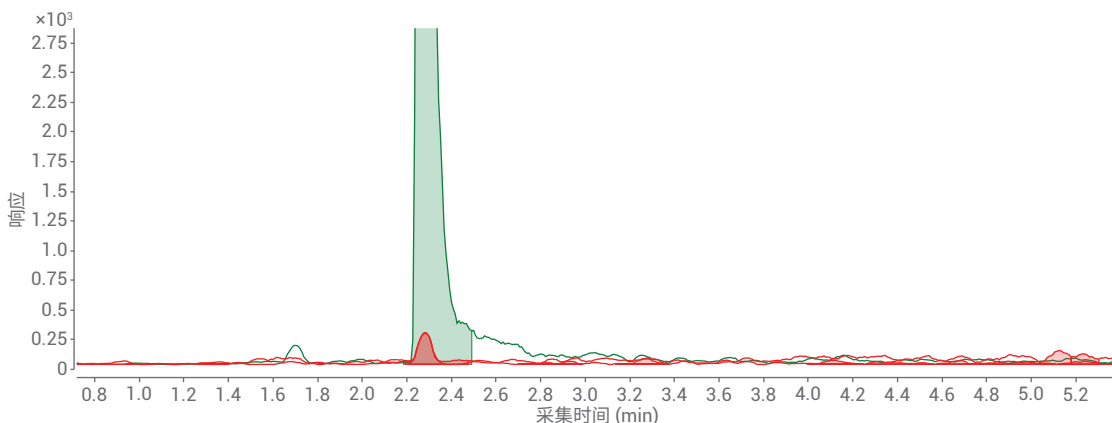


图 13. 恩诺沙星 ($C_{19}H_{22}FN_3O_3$), 10 ppb 标样 (绿色峰) 和 10 ppt 基质匹配标样 (红色峰)

结论

DART-MS/MS/MS 分析平台用于检测海鲜中兽药有害浓度时操作简便、速度极快且试剂用量极低, 是进行初步评估筛查, 尤其是与确证性 HPLC-QQQ/MS 方法联用时的理想之选。DART-QQQ/MS 和 HPLC-QQQ/MS 均为使用 Agilent 6400 系列三重四极杆/MS 检测兽药而开发的方法; 其中一种分析方法是与 Agilent 6495 三重四极杆/MS 联用的 DART 作离子源从而实现快速、多类别分析的药物筛查, 而另一种低浓度定量技术则使用配备 ESI 源的 Agilent 1290 HPLC 样品分离系统和 6495 系列三重四极杆/MS。进一步的系列实验, 应是使用本应用简报中介绍的两种方法来加强对水产养殖药物的分析。

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

DOC、NOAA、NMFS、NSIL 免责声明: 本应用简报中提到的参考文献、意见或数据不针对任何特定的商业产品、服务或实验室耗材。文中所述科学成果和结论以及任何观点或意见均为作者的观点或意见, 并不一定反映 NOAA 或商务部的观点或意见。

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 11 月 28 日, 中国出版
5991-8748ZHCN

预计未来的方案测试将包括: 在分散萃取步骤中, 比较水和乙酸铵作为缓冲液时的不同影响; 进一步优化 DART 离子源采样方法和程序配置文件以改善筛查结果。

参考文献

1. Fish to 2030 Prospects for Fisheries and Agriculture, Agricultural and Environmental Services Discussion Paper 03, for Fisheries and Aquaculture, World Bank Report Number 83177-GLB A
2. Detection and Confirmation of Veterinary Drug Residues in Commercially Available Frozen Shrimp, A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The School of Nutrition and Food Sciences by Jessica Danielle Johnson B.S., Louisiana State University, May **2014**

3. Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 2297–2302
4. 安捷伦科技有限公司, 出版号 5991-4541EN, **2014**

致谢

Andre Szczesniowski (应用科学家, 安捷伦科技有限公司)、Jon W. Bell (主任, DOC、NOAA、NMFS、NSIL)、Janet E. Whaley (兽医学博士, NOAA、海鲜检查办事处)、Angela D. Ruple (首席分析人员, DOC、NOAA、NMFS、NSIL)、Gregory L. Feister (化学家, DOC、NOAA、NMFS、NSIL)、Greg Bartosiewicz (安捷伦科技有限公司)、Michael Woodman (应用科学家, 安捷伦科技有限公司)、Shannara N. Lynn (微生物学家, DOC、NOAA、NMFS、NSIL) 和 Johnathan M. Likens (样品管理员, DOC、NOAA、NMFS、NSIL)