

Application News

No. C161

液相质谱联用仪

LC-MS/MS 测定 200 多种兽药残留

近年来，兽药被广泛用于治疗、预防感染以及促进动物生长发育等用途。为保证动物源性食品的安全，监管部门针对各种对象药物、组织以及动物种类，规定了食品中兽药残留的最大残留量标准（Maximum Residue Limits (MRL's)）。此外，监管部门禁止部分在一定程度上被认为存在危险性的药理活性化合物的使用（EU regulation EC37/2010; Commission Decision 2003/181/EC; 21CFR Part556 Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food）。在本报告中，介绍了如何使用高灵敏度和高选择性的三重四极杆质谱仪的MRM 质谱模式，来减少假阳性和假阴性结果的出现。在MRM 质谱模式下，采集到每个目标化合物产生的大量碎片离子，这些碎片离子峰可用于建立质谱库，利用谱库搜索得到匹配度，进而确认化合物。

David Baker¹⁾, Laetitia Fages²⁾, Eric Capodanno²⁾, Neil Loftus¹⁾

1) Shimadzu, Manchester, UK

2) Phytocontrol, Nimes, France

■ 样品和分析条件

分别向牛肉、鸡蛋、蜂蜜及鲑鱼片的提取液中加入浓度为0.001~0.1mg/kg的兽药，作为待测样品溶液。用低浓度样品和高浓度样品进行重复性试验。测试仪器为岛津超高效液相色谱仪 Nexera X2 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用（表1和表2）。在12分钟内分析200多种兽药，采集2000多个的MRM 正负离子通道。

表1 液相条件

液相色谱	
超高效液相色谱	Nexera X2
色谱柱	Restek Biphenyl (100mm × 2.1mm, 2.7 μm)
柱温	40°C
流速	0.4 mL/min
流动相 A	0.5 mM 甲酸铵溶液 (0.1 % 甲酸)
流动相 B	甲醇 (0.1 % 甲酸)
	Time (min) B% Time (min) B%
梯度洗脱程序	0.00 2 14.60 2
	12.50 100 17.50 Stop
	14.50 100

表2 质谱条件

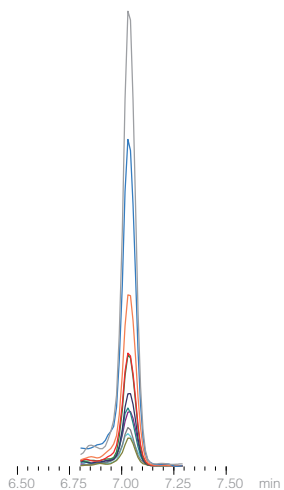
质谱	
三重四级杆质谱仪	LCMS-8060
驻留时间	1 msec/3 msec
正负极切换时间	5 msec
范围	正模式下 218 种药物 (包含内标物) 负模式下 11 种药物 结构分析 (内部开发工具)
源参温度 (离子源; 加热模块; DL)	350°C; 300°C; 150°C
气流速度 (雾化气; 加热气; 干燥气)	3 L/min; 10 L/min; 10 L/min

■ MRM 质谱模式的优点

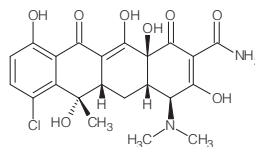
在 LabSolutions LCMS 工作站中的使用 MRM 参数优化工具和测试窗口 (MRM 同步) 来轻松完成方法设定, 实现了高通量的数据与样品采集。本方法将建立合适的循环时间和采样率, 以获得可靠的定量结果和峰值积分。此外, 自由选择定量离子对和定性离子对, 为日常兽药分析提供了极大的便利。一个前体离子产生的多少碎片离子仅受兽药化学结构的限制。

■ 结果

利用 MRM 质谱模式可实现每个化合物有多对产物离子的同时分析。例如金霉素 (Chlortetracycline), 通过优化碰撞能力, 可采集到 11 个产物离子对 (图 1) 利用产物离子质谱图, 建立质谱库, 用于目标化合物确认 (金霉素是一种四环素类的抗菌剂)。根据 2016 年发布的第 6 号 ESVAC 报告, 2014 年 29 个欧盟成员国的抗菌药物销售量中 (以 mg/PCU 的比例表示) 四环素类药物占比最高, 为 33.4%; 其次为青霉素类药物 (25.5%) 和磺胺类药物 (11.0%), 因此选择金霉素作为代表例)。



Compound name Chlortetracycline
 Accurate mass 479.1216 [M+H]⁺
 Formula C₂₂H₂₃ClN₂O₈
 CAS 57-62-5



MRM Spectrum Mode

11 MRM^s acquired for chlortetracycline at 10pg/uL in egg.
 1:479.10>444.00(+) CE: -23V
 2:479.10>461.95(+) CE: -35V
 3:479.10>154.00(+) CE: -34V
 4:479.10>98.05(+) CE: -45V
 5:479.10>260.05(+) CE: -60V
 6:479.10>303.05(+) CE: -37V

7:479.10>300.80(+) CE: -45V
 8:479.10>287.90(+) CE: -53V
 9:479.10>274.95(+) CE: -44V
 10:479.10>370.95(+) CE: -31V
 11:479.10>285.85(+) CE: -56V

MRM Spectrum mode

Higher specificity
 Higher reporting confidence
 Library searchable fragment data.

The number of precursor-fragment ion transitions monitored is limited only by the structural chemistry of the molecule. Typically more than 10 precursor-fragment ion transitions were monitored for each veterinary drug.

图 1 金霉素 (Chlortetracycline) MRM 参数

金霉素 (Chlortetracycline) 碎片结构及 MRM 参数如图 2 所示。MRM 质谱模式是一种结合了 MRM 和产物离子扫描的测试模式。产物离子图谱可用于谱库搜索, 对目标化合物进行鉴定。

由于各碎片离子的产物离子图谱是通过优化碰撞能量生成的, 因此谱库具有非常高的特异性和选择性。

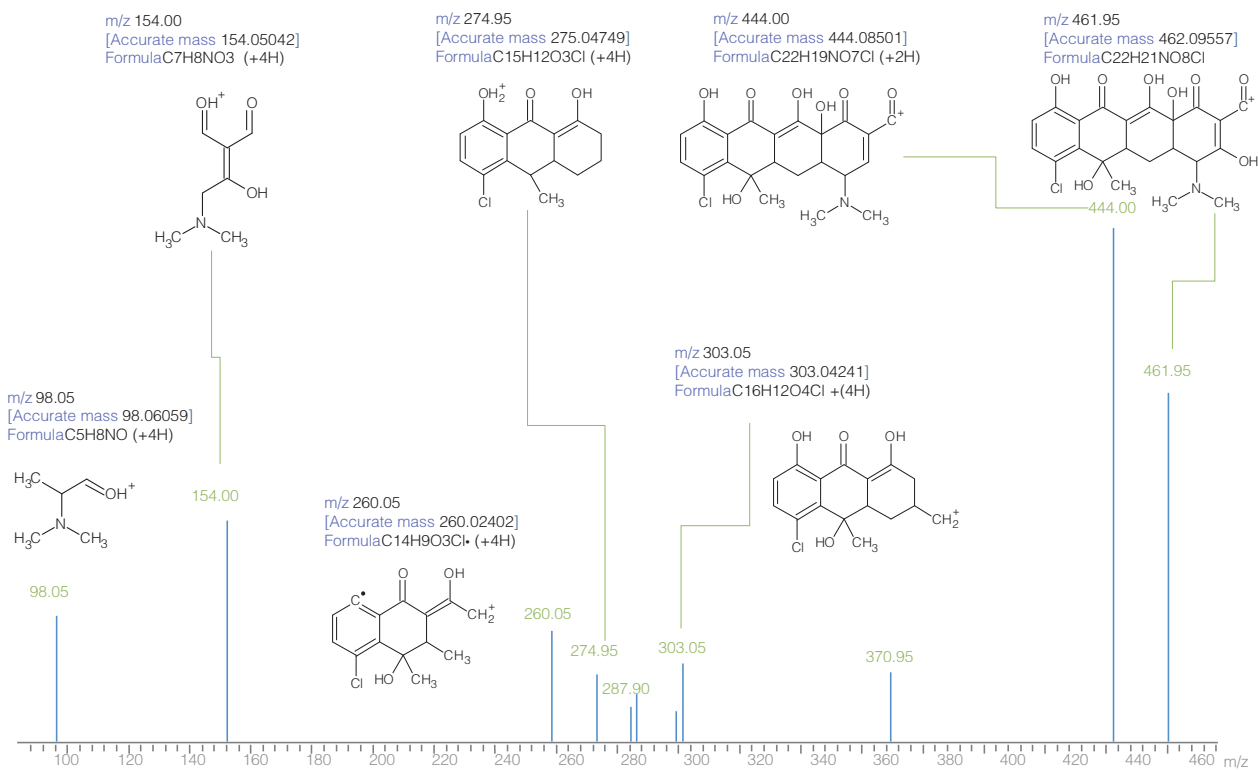


图 2 金霉素 (Chlortetracycline) MRM 参比质谱图及碎片结构式

■ 利用 MRM 质谱模式进行谱库搜索

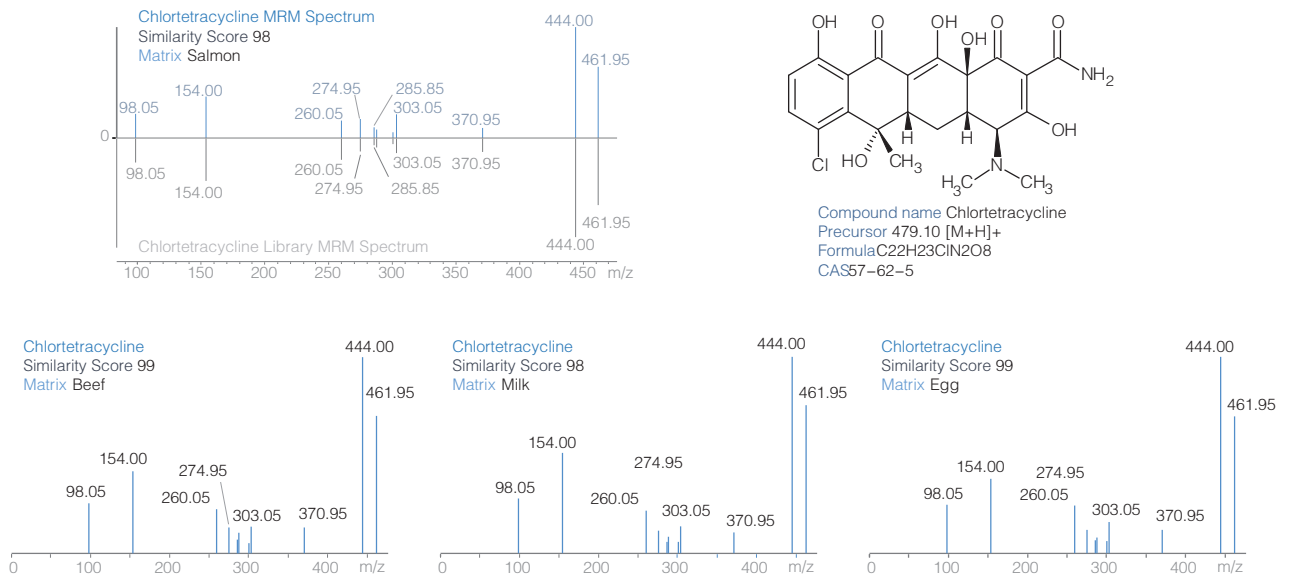


图 3 谱库中不同样品基质中加入 10 pg/μL 金霉素 (Chlortetracycline) 的 MRM 质谱图

鲑鱼片提取液中加入 10 pg/μL 浓度的维吉尼亚霉素 (Virginiamycin) S1 时的 MRM 质谱图及提取液中 4 种化合物在 n=10 时的测定结果如图 4 所示。所有测试样品的相似性评分均超过 99 (第 1 次、第 5 次及第 10 次进样的 MRM 质谱图进行了图示)。另外, 向鲑鱼片提取液中分别加入

10 pg/μL 的土霉素 (Oxytetracycline)、磺胺二甲氧嘧啶 (Sulfadimethoxine)、奥美他定 (Ormetoprim) 及维吉尼亚霉素 (Virginiamycin), 作为待测样品溶液 (n=10), 并采用常规的 MRM 方法 (MRM: 2 个) 对其进行测定, 与 MRM 质谱模式的 RSD% 进行比较。

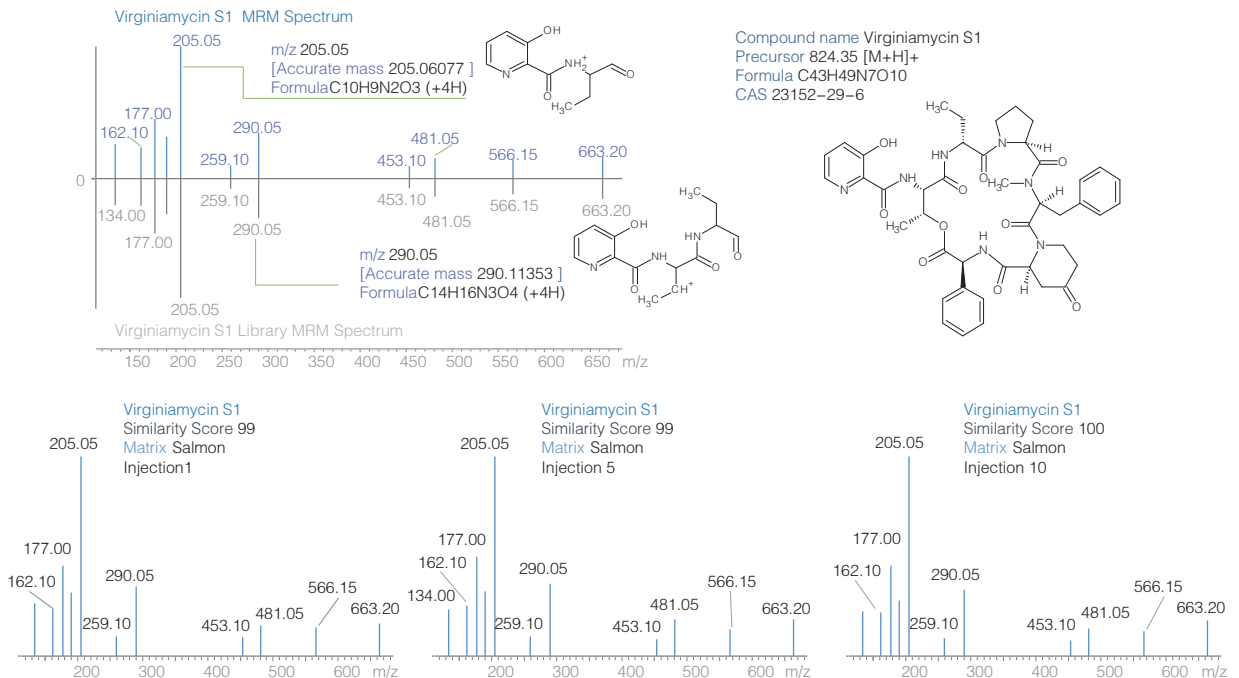


图 4 鲑鱼片提取液中加入 10 pg/μL 维吉尼亚霉素 (Virginiamycin) S1 的 MRM 质谱结果 (n=10)

项目	土霉素 (Oxytetracycline)		磺胺二甲氧嘧啶 (Sulfadimethoxine)		奥美他定 (Ormetoprim)		维吉尼亚霉素 (Virginiamycin)	
MRM 数量	2MRM' s	8MRM' s	2MRM' s	11MRM' s	2MRM' s	11MRM' s	1.18	11MRM' s
主峰面积	1890170	1729171	7809989	7809989	11MRM' s	8160952	2232967	1956045
定量离子 RSD%	3.74	3.04	1.49	1.46	1.54	1.18	0.91	1.65

■ 利用 MRM 质谱模式进行定量测定

为评估 MRM 质谱模式的稳定性，对同一样品进行重复进样测试。所使用的评估方法参照 EU 指南：SANTE/11945/2015 规定的鉴定标准（判断保留时间以及至少 2 个 MRM 的离子比是否处于允许范围内）。同时就绝对强度和信号变异性与 MRM

质谱模式进行了比较（图 4）。结果表明，两种方法的 RSD% 均低于 4%（n=10，10 pg/μL 添加浓度）。图 5 所示为定量结果的代表例，磺胺嘧啶（Sulfamerazine）的 MRM 质谱图和校准曲线结果。

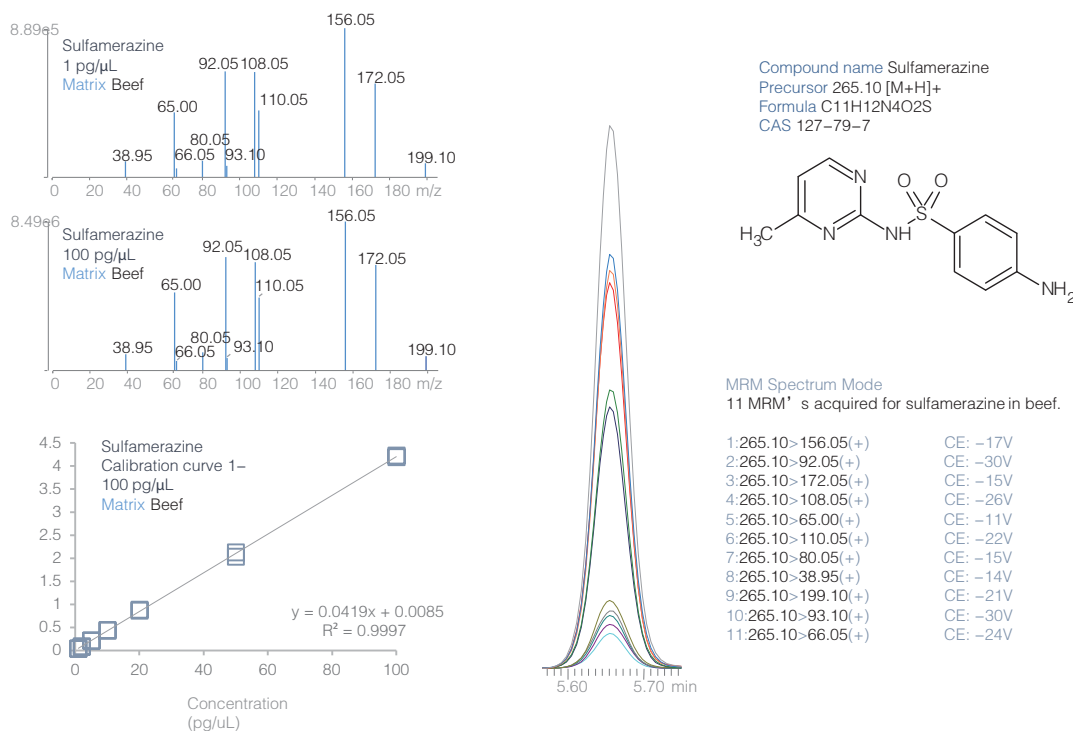


图 5 磺胺嘧啶的 MRM 质谱图及校准曲线（1 pg/μL~100 pg/μL）

■ 总结

使用 MRM 多离子通道测定兽药残留，可有效减少假阳性和假阴性结果，并提高了化合物定性和确认的可靠性。虽然各目标化合物的产物离子通道多少取决于目标化合物的化学结构，但通常每个化合物可以监测到 10 对产物离子通道。MRM 质谱模式结合了常规的产物离子扫描的定量方法，并可通过谱库搜

索进行化合物定性及确认。本文利用 MRM 多离子通道模式对 212 种兽药（MRM 数：2,009）进行定性和定量测定。与一般定量方法（MRM：2 个 / 化合物数）相比，该方法测得检测限、线性和重复性结果良好。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2017 年 8 月