

利用 MRM 谱模式和库检索功能提升 LCMSMS 在多兽残分析中数据可靠性

LCMSMS-823

摘要：多反应监测模式（MRM）是三重四极杆质谱法对目标化合物进行定量分析的首选方法，传统 MRM 方法针对一种兽药仅可观察 2-3 个碎片离子对，但随着样品基质复杂性的增加，该方法易造成假阳性，在此基础上，开发了多反应监测谱模式（MRM Spectrum Mode）的方法，与传统 MRM 方法相比，该方法在不影响检测灵敏度、线性和重现性的基础上，能有效降低数据假阳性。在本文中，采用 LCMS-8050 建立了 214 个离子对的多兽残分析的 MRM Spectrum Mode 方法，该方法灵敏度高、准确、线性良好。

关键词：MRM Spectrum Mode 库检索 兽残 假阳性 误测

技术特点：

- ❖ 相较于传统 MRM 法，在 MRM Spectrum Mode 下能观察到多个碎片离子对，提高化合物的特异性，同时丰富了化合物的质谱信息。
- ❖ 使用 MRM Spectrum Mode 得到的质谱图与参照质谱图对比检索，计算其类似性评分，能准确对化合物定性，避免假阳性和误测，提高数据可靠性。

三重四极杆质谱的多反应监测（MRM）常被广泛运用于提高化合物的灵敏度，并对其做准确定量分析，比如在兽药残留检测中，一种兽药常采用 2~3 对 MRM 离子对，用于肉制品中兽残的定性和定量。但由于肉制品基质的复杂性，检测结果可能出现假阳性，故在食品安全法规的高要求下，在保证灵敏度的同时，也要提高化合物鉴定的可靠性，避免假阳性，并减少

误测。

本文区别于传统 MRM 方法，旨在建立多种兽药残留的 MRM Spectrum Mode 测定方法，通过对目标化合物监测多个 MRM 离子对，并由此获得目标化合物在不同基质中的碎片离子对，与参照质谱库对比检索，计算其类似性评分，进行定性和定量。该方法准确、灵敏度高，适合不同基质中的兽残的定性和定量。

■ 实验部分

1.1 仪器配置

岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统 LCMS-8050。具体配置为

输液泵：	LC-30AD×2	系统控制器：	CBM-20A
自动进样器：	SIL-30AC	质谱仪：	LCMS-8050
柱温箱：	CTO-20AC	色谱工作站：	LabSolutions Insight Explore

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack Velox (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm)，
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-32001-03

流动相：A 相 -0.1% 甲酸 5mM 乙酸铵水溶液；B 相 - 甲醇

流速：0.3 mL/min 进样量：2 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	Pump B Conc.	20
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
7.00	Pumps	Pump B Conc.	80
7.20	Pumps	Pump B Conc.	20
9.00	Controller	Stop	

质谱条件:

质谱仪 :	LCMS-8050	脱溶剂管温度 :	150°C
离子源 :	ESI+(1kv)	加热模块温度 :	400°C
雾化气 :	氮气 3 L/min	接口温度 :	300°C
干燥气 :	氮气 10 L/min	扫描模式 :	MRM
加热气 :	空气 10 L/min	切换时间 :	2 msec

1.3 样品前处理

取 2.0 g 猪肉试样置于 50 mL 离心管中, 加入 0.2 mol/L 乙酸铵溶液 (pH=5.2) 8 mL, 再加入 40 μ L β - 盐 酸葡萄糖醛甘酶 - 芳基硫酸酯酶, 涡旋混匀, 在 37 °C 下避光水浴条件下振荡 16 h。酶解完成, 静置至室温, 8000 r/min 离心 5 min, 将上清液倒入另一 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 0.1 mol/L 高氯酸水溶液, 涡旋混匀后, 接着用高氯酸调 pH 值至 1.0 \pm 0.5, 8000 r/min 离心 5 min 后, 将上清液倒入另一 50 mL 离心管中。用饱和 NaOH 溶液调节 pH 至 9.5 \pm 0.5, 加入 10 mL 乙酸乙酯, 涡旋混匀后, 振荡 10 min, 8000 r/min 离心 5 min 后, 将有机相倒入另一 50 mL 离心管内, 再在水相中加入乙酸乙酯 5 mL 提取一次, 合并有机相, 氮吹近干, 20% 的 0.1% 甲酸甲醇水复溶, 过尼龙滤膜, 待测。

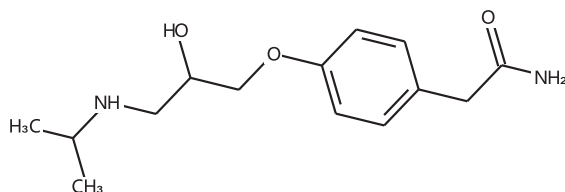
1.4 基质标准溶液制备

标准系列工作液的制备: 在空白试样中加入一定量的混合标准溶液, 经 1.3 样品前处理, 得到浓度为 0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的标准工作曲线, 待上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 方法原理

相较于传统的 MRM 法 (2 个离子对), 本文该方法采用多反应监测谱模式 (MRM Spectrum Mode), 即每种化合物使用多个 MRM 离子对的方式, 以阿替洛尔为例, 通过比较, 两种方式得到的定量离子强度几乎一致, 且通过 MRM Spectrum Mode 方法化合物可以呈现多对离子对, 具有较高的选择性, 可以用于库检索, 用于定性。



化合物名称: 阿替洛尔
分子式: C₁₄H₂₂N₂O₃
CAS: 29122-68-7
保留时间: 0.964 min

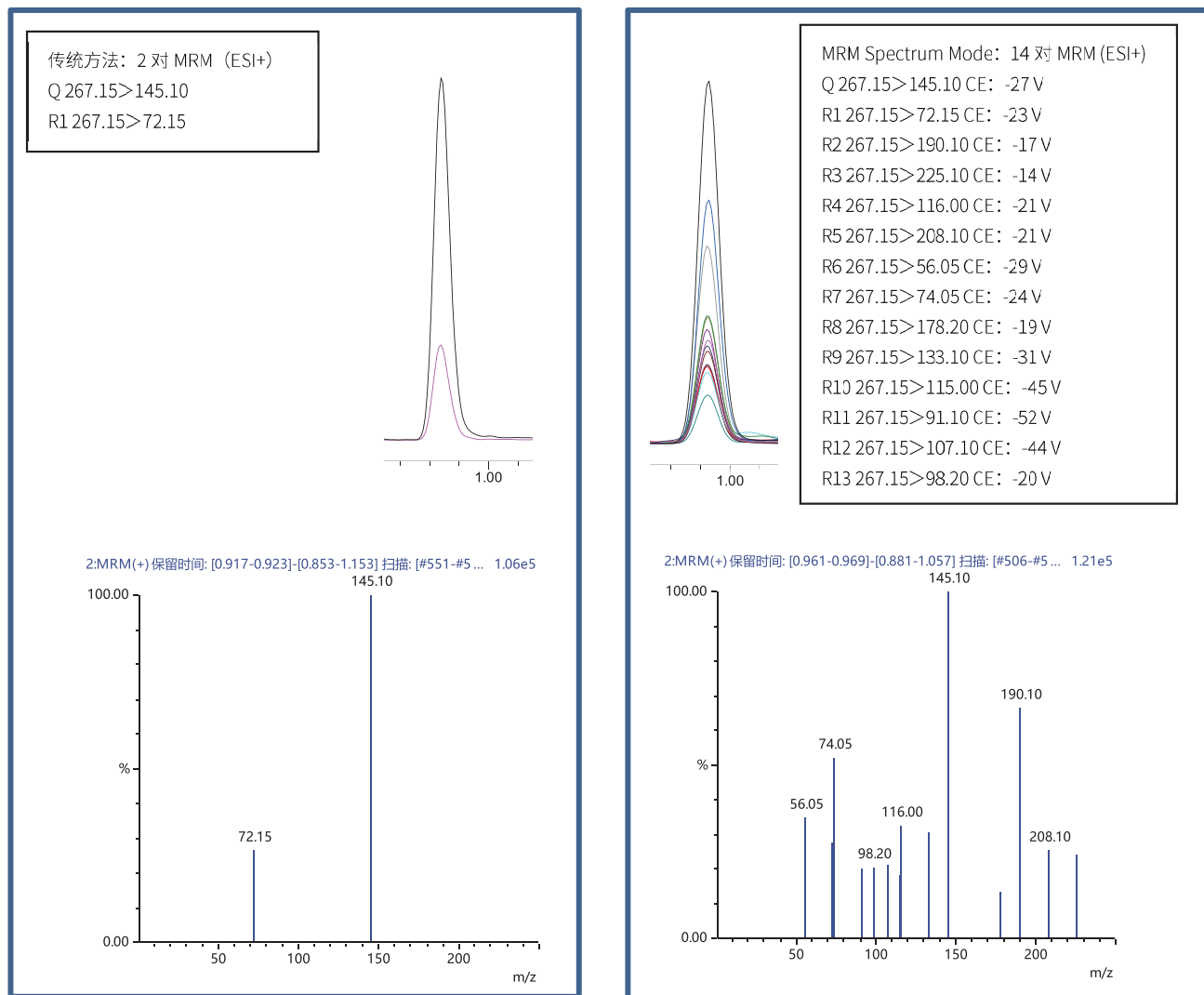


图 1 猪肉中阿替洛尔 (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的 MRM 色谱图 (左: 常规 MRM; 右: MRM 谱模式)

2.2 基于谱库定性

由于基质的复杂性, 在实际样品兽药残留检测常常容易出现假阳性, 为了减少误测, 我们开发了对一种化合物使用多个 MRM 离子对的方法, 即 MRM Spectrum Mode, 在该方法下能观察到 10 个左右碎片离子对, 并使用库检索功能, 与此前建立的参照质谱库比较评估计算其相似度, 避免了误测的产生。以化合物比索洛尔为例, 对鸡肉和猪肉基质中含有的目标物进行定性分析, 比索洛尔添加量仅为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 在两种基质中该化合物均能准确定性, 其相似度均为 99% 以上。

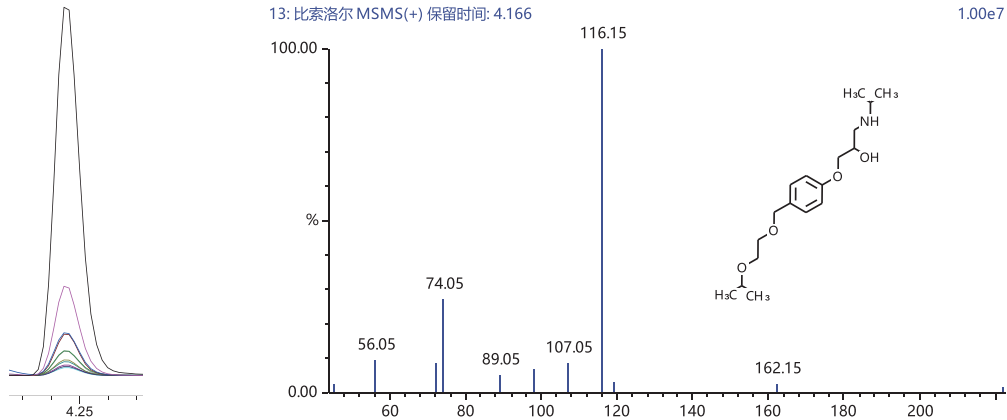


图 2 比索洛尔 MRM 色谱图和参照二级谱图 (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

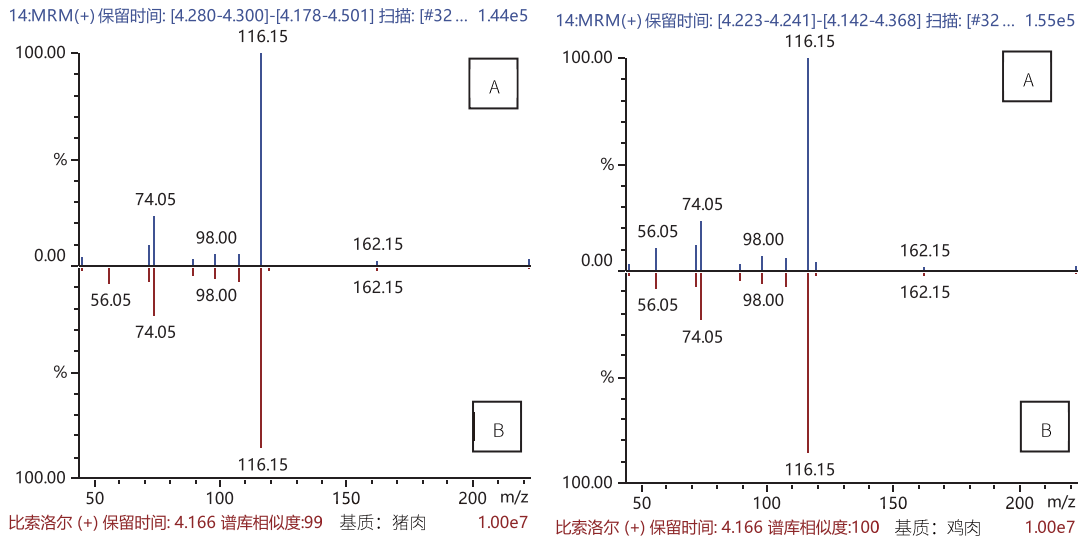
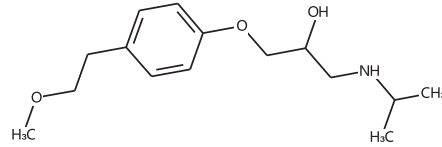


图 3 使用 MRM Spectrum Mode 对猪肉和鸡肉基质中的比索洛尔的定性 (标准品的添加量为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, A: 来自于实际样品, B: 来自于为标准库)

2.3 定量分析

得益于 UFMS 的超高速性能, 保证了使用多个碎片离子以及离子之间的相对比例关系用于定性的 MRM 谱模式的同时, 还可进行灵敏和准确的定量分析。以美托洛尔为例, 在猪肉基质中, 以 6 个不同浓度建立校准曲线并进行回收率验证。如图 4、表 2、表 3 所示, 该化合物浓度在 0.5 ng/mL 时, 各 MRM 离子对 S/N 均大于 10, 在线性范围 0.5~20 ng/mL 内该化合物线性良好, 相关系数 r 值为 0.998, 准确度在 88.2~109.0% 之间, 同时对于不同添加量 (0.5、1、2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的加标验证, 回收率在 80.79~94.29% 之间。



化合物名称: 美托洛尔
 分子式: $C_{15}H_{25}NO_3$
 CAS: 37350-58-6
 保留时间: 3.350 min

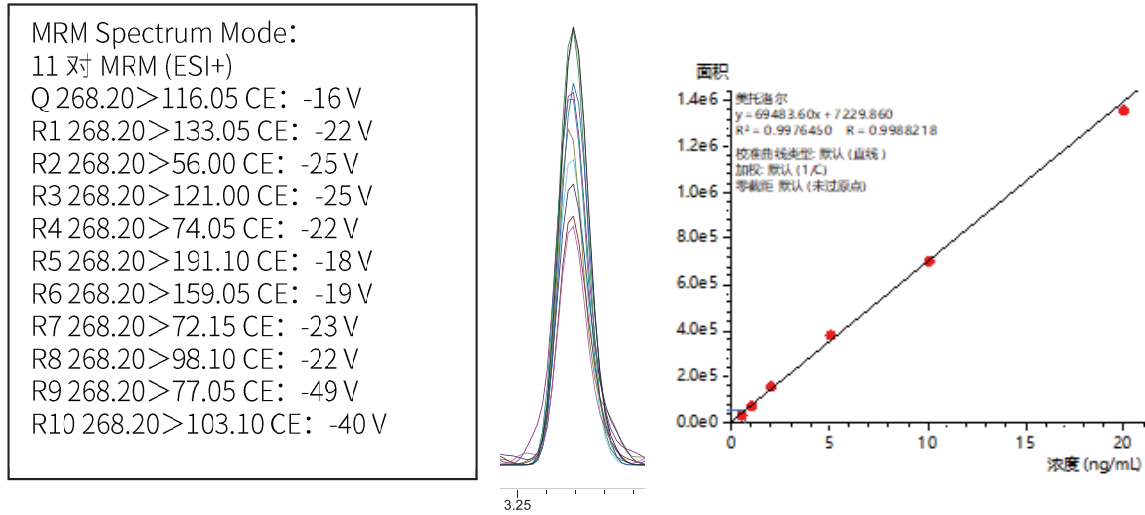


图 4 美托洛尔的 MRM 色谱图和校准曲线 (0.5 ng/mL)

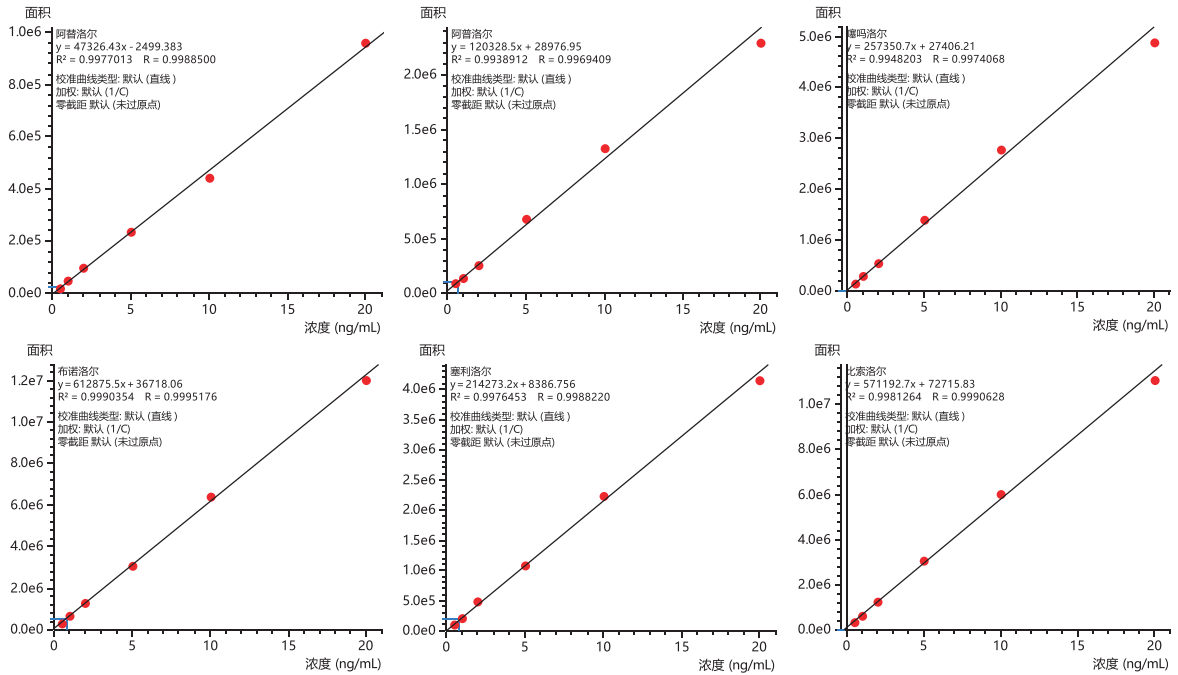


图 5 部分化合物的校准曲线

表 2 化合物校准曲线的线性关系 (线性范围 0.5~20 ng/mL)

编号	化合物	线性方程	相关系数 r	准确度 (%)	检出限 ng/mL	定量限 ng/mL
1	普萘洛尔	$Y = 42715.31X + 1448286$	0.997	86.2-113.5	0.03	0.10
2	阿替洛尔	$Y = 47326.43X - 2499.383$	0.998	89.5-108.4	0.07	0.21
3	美托洛尔	$Y = 69483.60X + 7229.860$	0.998	88.2-109.0	0.01	0.03
4	卡替洛尔	$Y = 359204.8X + 8388.250$	0.999	90.6-104.8	0.01	0.02
5	阿普洛尔	$Y = 120328.5X + 28976.95$	0.996	91.5-108.6	0.02	0.07
6	倍他洛尔	$Y = 115310.3X + 2731.673$	0.996	86.0-108.8	0.06	0.18
7	噻吗洛尔	$Y = 257350.7X + 27406.21$	0.997	88.7-107.8	0.02	0.06
8	醋丁洛尔	$Y = 186157.4X + 11130.34$	0.998	87.4-109.5	0.03	0.10
9	布诺洛尔	$Y = 612875.5X + 36718.06$	0.999	95.1-103.1	0.03	0.10
10	艾司洛尔	$Y = 95758.99X + 13191.16$	0.996	88.3-111.3	0.04	0.13
11	塞利洛尔	$Y = 214273.2X + 8386.756$	0.998	87.4-111.7	0.03	0.10
12	比索洛尔	$Y = 571192.7X + 72715.83$	0.999	93.9-104.4	0.04	0.13
13	氧烯洛尔	$Y = 287351.3X + 38581.09$	0.997	87.3-107.8	0.03	0.09
14	喷布洛尔	$Y = 125182.8X + 51061.83$	0.993	85.5-112.4	0.06	0.19
15	索他洛尔	$Y = 67761.90X + 20851.50$	0.999	94.4-106.7	0.13	0.42
16	卡拉洛尔	$Y = 94629.44X + 3572.315$	0.996	89.0-116.1	0.06	0.20
17	吲哚洛尔	$Y = 43251.72X - 5111.466$	0.999	87.4-106.2	0.15	0.48
18	纳多洛尔	$Y = 173001.3X - 23579.10$	0.998	87.2-111.0	0.03	0.10

表 3 回收率

编号	化合物	0.5 µg/kg		1 µg/kg		2.5 µg/kg	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	普萘洛尔	91.92	10.32	79.93	0.50	101.93	5.97
2	阿替洛尔	96.62	0.96	88.77	3.72	79.87	5.27
3	美托洛尔	80.79	3.25	84.71	1.29	94.29	9.23
4	卡替洛尔	94.72	0.92	93.03	1.93	99.19	3.63
5	阿普洛尔	69.64	16.14	73.69	0.63	82.09	8.09
6	倍他洛尔	87.62	7.49	93.53	5.27	94.57	9.72
7	噻吗洛尔	76.93	3.48	79.42	5.31	88.86	4.28
8	醋丁洛尔	81.68	8.45	81.62	5.12	88.85	6.73
9	布诺洛尔	88.01	2.35	84.63	4.02	90.63	4.97
10	艾司洛尔	74.58	6.50	76.80	6.71	77.79	3.77
11	塞利洛尔	86.61	3.50	88.15	2.59	90.69	4.70
12	比索洛尔	79.68	2.33	77.94	2.64	85.19	2.72

13	氧烯洛尔	80.48	7.62	81.31	5.04	88.95	2.15
14	喷布洛尔	68.50	6.35	75.52	6.85	95.45	6.82
15	索他洛尔	64.41	6.49	75.43	7.28	88.14	1.92
16	卡拉洛尔	92.46	7.96	75.65	4.89	97.97	1.05
17	吲哚洛尔	112.36	6.20	90.17	10.90	90.22	7.36
18	纳多洛尔	98.92	2.57	92.89	4.24	95.85	9.66

■ 结论

本实验使用岛津 LCMS-8050 液质联用系统，建立了兽药残留分析的 MRM Spectrum Mode 检测方法，并采用库搜索，与参照质谱库比较可以进行不同基质中化合物定性。该方法能有效地减少兽药残留检测的误测和假阳性，提高数据的准确度和可靠性，实现化合物的定性定量。

岛津应用云

