

高分辨质谱X500R应用于动物源食品中189种兽药残留的筛查和定量分析

A Rapid Screening and Quantitative LC-MS/MS Method of 189 Veterinary Drug Residues in Animal Food by High Resolution Mass Spectrometry X500R

翟南南 (Zhai Nannan), 贾彦波 (Jia Yanbo), 刘婷 (Liu Ting)
SCIEX China

Key Words: veterinary drug residues, SWATH[®], MRM^{HR}, X500R QTOF

兽药作为养殖业重要的投入品, 在防治动物疫病、提高生产效率和维护公共卫生安全方面发挥了不可替代的作用。但是由于受养殖方式、管理水平和消费习惯的影响, 动物性食品质量安全问题一直成为制约其健康发展的重要因素, 且随着食品安全社会关注度的提高, 兽药残留问题越来越引起各方重视。

本文采用SCIEX独有的SWATH[®]方法, 在X500R QTOF系统上建立了一针进样, 快速定性和定量动物源性食品中189种兽药的方法。SWATH[®]技术 (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical mass spectra) 基于仪器的超快扫描速度, 根据样品的实际情况进行智能分段, 从而得到整个质量范围内的所有离子的高质量的二级碎片信息, 通过四关进行锁定 (一级误差、保留时间、同位素丰度匹配、二级库匹配), 简单快捷, 且软件可以通过强大的去卷积功能将二级碎片离子进行正确归属, 得到高分辨的二级谱图可以进行谱库检索, 保证筛查结果准确可靠。由于该技术是一种非依赖性采集模式, 因此可以提取化合物特征二级碎片离子进行积分定量, 也可以提取多个子离子计算离子丰度比, 即为高分辨的MRM^{HR}定量功能。因此, SWATH[®]技术是一种真正全景式的、高通量的质谱技术。

本方法具有以下特点:

1. 本方法覆盖面广, 适用性强, 包括磺胺、喹诺酮、四环素等抗生素、 β -受体激动剂类、头孢类、氯霉素类、激素类、大环内酯类等常见兽药189种
2. 本方法采用非依赖性采集SWATH[®]技术, 能够获得最全面的样品信息。一次进样得到高精度的一级和二级信息, 通过四关进行锁定 (一级误差、保留时间、同位素丰度匹配、二

级库匹配), 简单快捷, 保证筛查结果准确可靠; 另外萃取高精度的二级子离子, 不仅可以进行与三重四级杆相媲美的MRM^{HR}准确定量, 还可以计算离子丰度比, 满足欧盟法规SANTE/11945/2015要求。该技术可以做到真正的准确定性和定量分析

3. SWATH[®]技术采集样品数据, 所有化合物的全部二级碎片都被采集并记录, 具有可溯源性。无需重复进样, 可根据需求随时调用关注信息, 节省实验时间和成本。

仪器设备

SCIEX ExionLC[™]液相系统+ X500R QTOF质谱系统

SCIEX OS数据采集和处理软件



样品前处理

- 称量均质后样品2.5 g (牛肉、猪肉等)
- 加入10 mL乙腈/水=75/25 (v/v, 含0.1%甲酸) 溶液, 超声提取30分钟, 涡旋30秒
- 离心10分钟, 转速6000 r·min⁻¹
- 上清液过滤后, 进行LC-MS/MS分析

液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5 50 × 3.0 mm, 2.6 μm)

流动相: A: 水 (0.1%甲酸) ; B: 乙腈 (0.1%甲酸)

流速: 0.4 mL/min;

柱温: 40°C;

进样量: 5 μL

梯度洗脱

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	97	3
1.00	97	3
1.10	85	15
9.50	25	75
9.60	5	95
11.5	5	95
11.6	97	3
13.5	97	3

质谱方法

离子源: ESI源, 正/负离子模式

扫描方式: TOF-MS-SWATH®+MRM^{HR}

一级扫描范围: 100~1000Da

一级累积时间: 0.15 s

去簇电压: 80 V

离子源参数:

IS电压: 5500/-4500 V

雾化气 GS1: 50 psi

源温度 TEM: 550°C

气帘气 CUR: 30 psi

辅助气 GS2: 60 psi

碰撞气 CAD: 7 psi

SWATH® 工作流程

SWATH®技术 (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) 是将整个色谱洗脱程序洗脱下来的母离子智能化的分成多个质量窗口, 把窗口中所有的母离子碰撞得到该化合物的指纹图谱。独有的智能可变窗口 (Variable

Windows) , 根据样品中离子的数目多少进行分布, 在分布密集的区域设置窄的窗口, 在离子较少的区域设置宽的窗口, 保证所有母离子采集到高质量的二级质谱图。原理图如下:

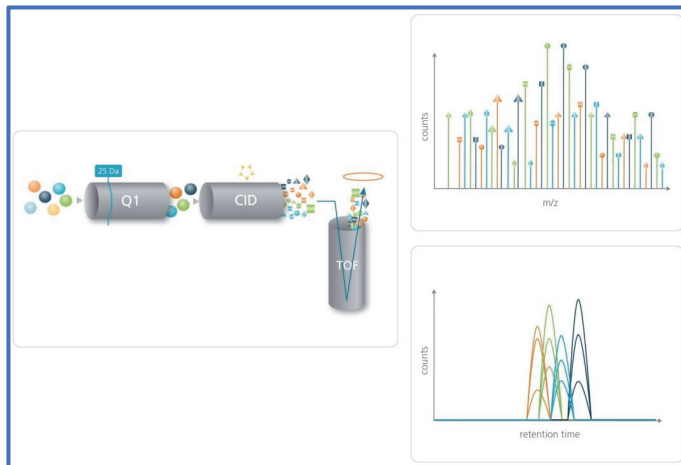


图1. SWATH®原理图。

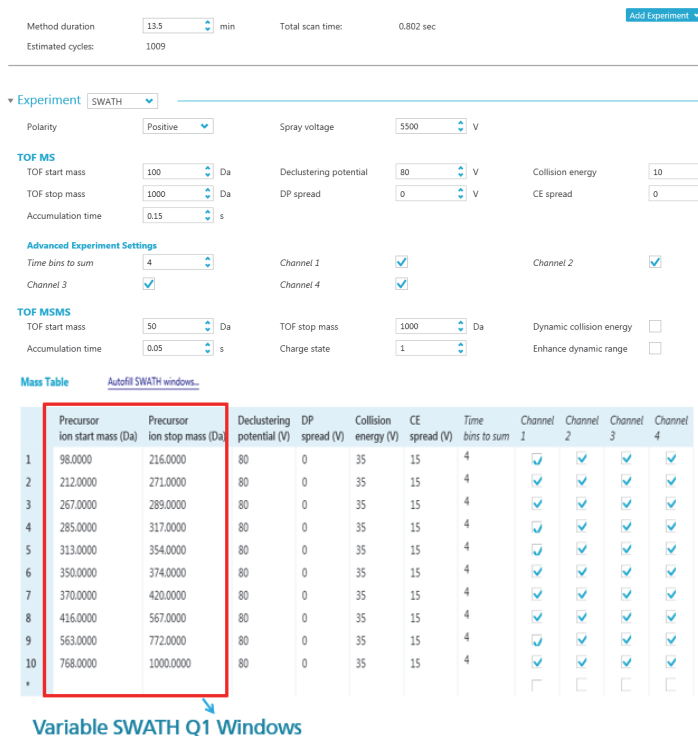


图2. SWATH®方法编辑图。

X500R MRM^{HR}工作流程

高分辨质谱仪X500R QTOF的定量能力与三重四级杆仪器MRM定量能力相媲美，SCIEX OS平台有独一无二的MRM^{HR}工作流程，在SCIEX OS软件中编辑如四级杆仪器一样的MRM离子对信息。母离子窗口设置为如四级杆一样单位分辨率，子离子是通过TOF管分离，是高分辨的二级子离子，可针对化合物自身性质，对不同化合物特异性优化DP、CE电压，实现与三重四极杆MRM媲美的定量能力。

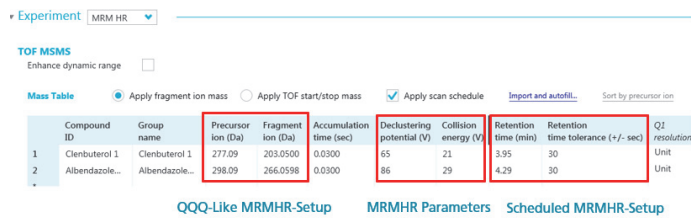
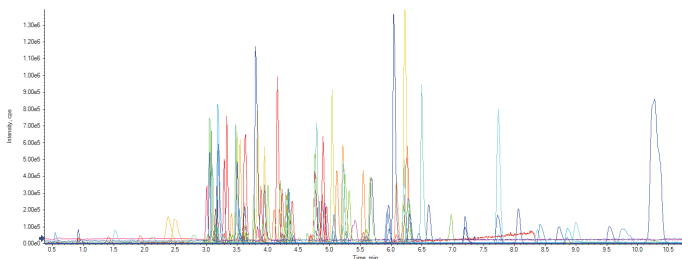


图3. MRM^{HR}方法编辑图。

实验结果

1. 189种兽药的典型色谱图

正离子



负离子

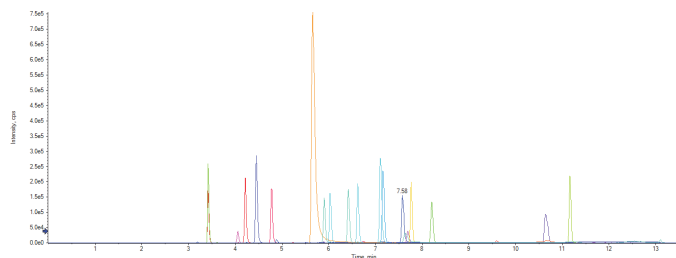


图4. 牛肉中189种兽药的色谱图。

2. 一针进样，获得全面且高质量的一级和二级质谱信息，可同时定性定量。

Component Name	Component Type	Mass Error...	Isotope Confi...	Library Confi...	RT Confi...	Mass Error (ppm)
Methyltestoste...	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	-0.2
Boldenone 1	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	0.5
Hydrocortisone...	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	-0.3
Indoprofen 1	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	-2.2
Sulfathiazole 1	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	1.3
Sulfapyridine 1	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	0.3
Sulfamerazine 1	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	-0.6
Sulfamethazine...	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	0.5
sulfanomomet...	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	-0.5
sulfamethizole 1	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	1.2
sulfamethoxy p...	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	-0.5
Sulfadoxine 1	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	0.5
Sulfadimethoxi...	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	0.7
Sulfamethoxaz...	Quantifiers	✓	✓	✓	✓	0.0

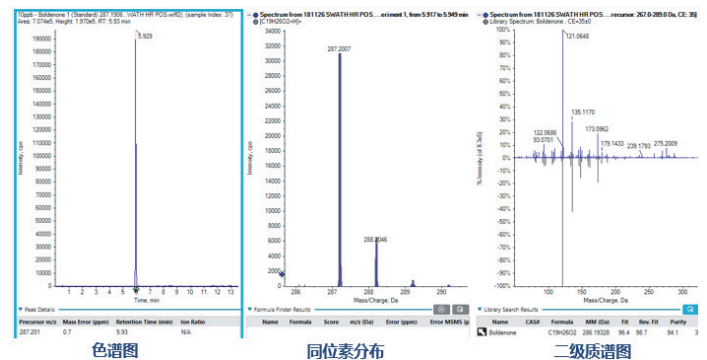


图5. SWATH®一级定性结果示例图（通过Mass Error、RT、Isotope、Library判定筛查结果）。

3. MRM^{HR}能实现很好的定量功能，且SCIEX OS软件还可以如四级杆仪器一样的计算离子丰度比，不同的化合物的定性和定量离子的丰度比值有差异，可以按照国标或者欧盟法规要求进行定义比值波动范围。

表1. 欧盟SANTE/11945/2015法规。

欧盟指导文件(SANTE/11945/2015)

MS detector / characteristics	Typical systems (examples)	Acquisition	Requirements for Identification	
			minimum number of ions	other
Unit mass resolution	quadrupole, ion trap, TOF	full scan, limited m/z range, SIM	3 ions	
MS/MS	triple quadrupole, ion trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 product ions	S/N ≥ 3 ^a
Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q)-TOF (Q)-Orbitrap FT-ICR-MS sector MS	full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof	2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm ^{b,c}	Analyte peaks in the extracted ion chromatograms must fully overlap Ion ratio within ±30% (relative) of average of calibration standards from some sequence

^a preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion
^b including at least one fragment ion
^c < 1 mDa for m/z < 200
^d no specific requirement for mass accuracy
^e in case noise is absent, a signal should be present in at least 5 subsequent scans

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Precursor Mass	Fragment Mass	Actual Concentration	Accuracy	Used
1	0.01ppb	Standard	Clenbuterol	277.087	203.050	0.010	98.65	<input checked="" type="checkbox"/>
239	0.05ppb	Standard	Clenbuterol	277.087	203.050	0.050	106.72	<input checked="" type="checkbox"/>
477	0.1ppb	Standard	Clenbuterol	277.087	203.050	0.100	100.73	<input checked="" type="checkbox"/>
715	0.2ppb	Standard	Clenbuterol	277.087	203.050	0.200	99.48	<input checked="" type="checkbox"/>
953	0.5ppb	Standard	Clenbuterol	277.087	203.050	0.500	96.15	<input checked="" type="checkbox"/>
1191	1ppb	Standard	Clenbuterol	277.087	203.050	1.000	104.83	<input checked="" type="checkbox"/>
1429	5ppb	Standard	Clenbuterol	277.087	203.050	5.000	93.88	<input checked="" type="checkbox"/>
1667	10ppb	Standard	Clenbuterol	277.087	203.050	10.000	99.56	<input checked="" type="checkbox"/>

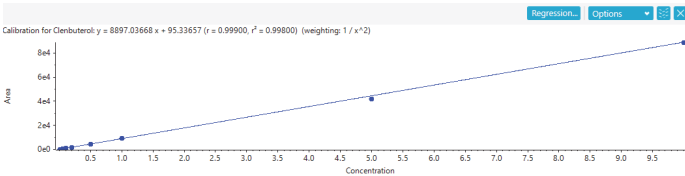


图6. MRM^{HR}定量功能展示（以克伦特罗为例）。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Ion Ratio	Formula	Precursor Mass	Fragment Mass	Ion Ratio...	Mass Error...
58	Standard	Standard	Boldenone 1	1.0000	C19H26O2	287.201	N/A	✓	✓
59	Standard	Standard	Boldenone 2	0.6308	C19H26O2	287.201	121.065	✓	✓
60	Standard	Standard	Boldenone 3	0.1928	C19H26O2	287.201	135.086	✓	✓
734	Unknown	Unknown	Boldenone 1	1.0000	C19H26O2	287.201	N/A	✓	✓
735	Unknown	Unknown	Boldenone 2	0.6393	C19H26O2	287.201	121.065	✓	✓
736	Unknown	Unknown	Boldenone 3	0.2071	C19H26O2	287.201	135.086	✓	✓

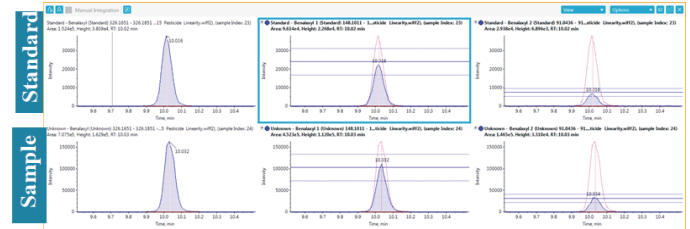


图8. SCIEX OS 软件结果列表中Ion Ratio结果展示。

Configure the confidence levels for the ion ratios, as applicable

Ion Ratios

Constant Tolerance
 Variable Tolerance

Qualitative Rule		Acceptable % Difference	Marginal % Difference	Unacceptable % Difference
Ion Ratio Lower Limit	Ion Ratio Upper Limit	(Tolerance levels based on expected ion ratio calculation)		
0	0.1	< 50	< 50	>= 50
0.101	0.2	< 30	< 30	>= 30
0.201	0.5	< 25	< 25	>= 25
0.501	1	< 20	< 20	>= 20
		< 20	< 20	>= 20

图7. MRM^{HR} Ion Ratio判定条件设置界面。

4. 实际样品测定结果

µg/kg	鸡肉 (Chicken)			牛肉 (Beef)		
	1	2	3	1	2	3
强力霉素 (Doxycycline)	NA	NA	0.797	NA	NA	NA
土霉素 (Oxytetracycline)	NA	NA	0.532	NA	NA	NA
金霉素 (Chlortetracycline)	NA	NA	0.523	NA	NA	NA

备注：NA为未检测到

总结

本方法针对动物源食品中兽药残留问题，采用SWATH[®]采集方式，在X500R QTOF平台上建立了一套测定动物源食品中189种兽药快速筛查和定量检测方法。该方法采用SCIEX独有的非依赖性数据采集模式SWATH[®]技术，可以同时获得高质量的一级母离子和所有母离子的高分辨二级碎片离子。MRM^{HR}可以实现与三重四极杆MRM媲美的定量能力且完全满足欧盟SANTE/11945/2015法规中对离子比率的要求。样品处理方法简单，分析时间仅为13.5分钟，为广大食品监测工作者提供了简单、快速且完整的解决方案。