

使用 Q Exactive Focus 液相色谱质谱联用系统快速灵敏测定肉、血浆和牛奶中的多类兽药残留

Olaf Scheibner, Maciej Bromirski, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany

关键词

Q Exactive Focus, Orbitrap, 兽药, HRAM 定量, HRAM 筛查, vDIA, 未知物筛查, 回顾性数据分析

目的

本实验利用可变数据非依赖采集 (vDIA), 建立了一种兽药分析的新方法。该法具备高灵敏度和高选择性, 能够获得被测样品全面而高质量的数据, 并可定量分析与非目标物和未知物筛查相结合。

引言

考虑到样品预处理和质谱分析的复杂性, 动物源食品中的兽药残留分析通常是一个费时的过程。利用传统方法对动物源食品 (包括肉、奶和血浆) 中多类兽药残留进行定量分析, 常常需要多次进样以获得各类成分的最佳分析条件, 包括针对不同种类化合物而开发的不同色谱和质谱方法。并且所获数据仅仅包含目标化合物的信息, 而不适用于其它化合物的回顾性分析。

本实验使用超快速液相色谱和 Thermo Scientific™ Q Exactive Focus™ 台式 Orbitrap™ 质谱联用系统建立了一种新方法, 其包含快速色谱方法和可变数据非依赖采集 (vDIA) 质谱方法。该法具有总分析时间短、选择性高和灵敏度高等优点, 并且其采集的数据能够用于其它目标物和非目标物筛查。本实验利用 vDIA 方法制作标准曲线, 并对样品中已知和未知目标化合物进行分析。vDIA 允许设置多个 MS/MS 隔离窗口, 窗口宽度可从 50Da 到 800Da。通常较小的窗口宽度用于低质量区域以扩展动态范围和提高灵敏度, 较大的窗口宽度用于更高质量区域以改善工作周期。该法的典型方法设置如本文所示, 用 5 组 MS/MS 隔离窗口覆盖全扫描的整个质量数范围, 同时保持 MS/MS 分析速度与快速色谱分离相匹配。



图 1 Q Exactive Focus 台式 Orbitrap 质谱仪

如表 1 所示, 分析成分为 44 个不同种类的兽药残留, 分析样品包括肌肉、肾脏、牛奶和血浆提取物, 所有样品均采用相同的标准化色谱和质谱方法进行分析。为了进行绝对定量分析, 44 个浓度已知的兽残标准品被配制成 8 个不同浓度的标准品溶液 (从 100pg/mL (ppt) 到 500ng/mL (ppb))。采用高分辨、高质量精度的 (HRAM) LC-MS/MS 方法, 分析基质加标样品 (肌肉和肾脏中加入抗生素标样、牛奶中加入阿维菌素类标样、血浆中加入硝酸咪唑类标样) 以评价方法。

表 1 目标化合物及其定量限 (LOQ)

化合物	LOQ (ppb)	化合物	LOQ (ppb)
阿维菌素	5.0	马波沙星	5.0
阿莫西林	1.0	甲硝唑	0.5
氨苄西林	0.5	羟基甲硝唑	0.5
头孢氨苄	0.5	莫西菌素	0.5
头孢洛宁	0.5	奈夫西林	0.5
氧氟羟苯唑头孢菌素	1.0	苯唑西林	0.1
Cefapirim	0.1	青霉素 G	0.5
头孢唑肟	5.0	青霉素 V	0.5
氯四环素	1.0	洛硝哒唑	0.5
环丙沙星	0.5	盐酸沙拉沙星	0.5
氯西林	0.1	磺胺嘧啶	0.1
达氟沙星	5.0	磺胺二甲氧基嘧啶	0.5
氨苯砜	0.5	磺胺二甲嘧啶	0.1
二氟沙星	0.5	磺胺多辛	0.5
二甲硝咪哇	5.0	磺胺甲基嘧啶	0.1
多拉菌素	10.0	磺胺甲恶唑	0.5
多西环素	0.5	磺胺甲氧吡嗪	0.1
恩诺沙星	1.0	磺胺塞唑	0.5
埃普利诺	5.0	四环素	0.5
红霉素	1.0	硫霉素	0.5
氟甲喹	1.0	甲氧苄氨嘧啶	0.5
羟基异丙硝唑	0.5	泰乐菌素	1.0

实验方法

液相色谱方法

所有样品均采用以下液相色谱方法:

仪器	Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 Rapid Separation LC (RSLC)
色谱柱	Thermo Scientific™ Accucore™ aQ 100 x 2.1 mm, 粒径 2.6 μm (p/n 17326-102130)
流动相 A	含 0.1% 甲酸的水溶液 (Fisher Chemical)
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (Fisher Chemical)
梯度	6 分钟 5%B 梯度变化到 95%B
流速	300 μL/min
总色谱周期	15 min

质谱分析方法

质谱方法采用全扫描和宽隔离窗口的可变数据非依赖采集 (FS-vDIA) 方法:

仪器	Q Exactive Focus MS 系统
全扫描 分辨率设置 质量范围 (<i>m/z</i>)	70,000 (FWHM) @ <i>m/z</i> 200 100–1000
vDIA 分辨率设置 隔离窗 (<i>m/z</i>)	17,500 (FWHM) @ <i>m/z</i> 200 100–205, 195–305, 295–405, 395–505, 495–1000
喷雾电压	4.4 kV
鞘气	30.0 arb.
辅助气	5.0 arb.
离子传输管温度	250°C
雾化温度	300°C
射频透镜水平	50
HCD 碰撞能量	35 eV

数据处理方法

使用 Thermo Scientific™ TraceFinder™ 3.2 版软件进行数据处理。提取离子流色谱图采用 5ppm 的提取窗口。为了进行非目标筛查, 使用一个包括 450 种组分的数据库, 该库中内置了各种组分及其碎片 *m/z* 值。

分析物的定量基于全扫描信息 (准分子离子)。另外, 根据欧盟的法规要求 (EC/657/2002), 1 至 5 个碎片离子用于定性确认, 在上述浓度范围内获得线性标准曲线。

结果和讨论

本文介绍的 vDIA 方法能够将全扫描数据依赖 MS² (FS-ddMS²) 和全范围碎片扫描模式 (比如全部离子碎裂 AIF 模式) 二者有机结合起来。如图 2 所示, 其将一个全扫描和数个宽范围隔离窗口的 MS² 扫描相结合。在此设置中, MS² 隔离窗口的宽度从 100Da 到 500Da 不等, 几个隔离窗口共同覆盖了先前全扫描的整个质量范围。



图 2. 一个典型的 FS-vDIA 实验设置

FS-ddMS² 方法的 MS² 扫描是对全扫描中检出的目标化合物（在母离子列表中）进行 MS² 扫描，其获得的碎片离子信息具有很高的选择性和灵敏度。对于其它关注的化合物，由于缺乏 MS/MS 定性确认，FS-ddMS² 方法的回顾性数据分析仅基于精确质量数的全扫描定量。

全范围碎片扫描模式如 AIF，其全扫描中所有化合物的碎片都在一次 MS² 扫描中检测，其优势在于可以采集样品中所有可能的全扫描和 MS² 扫描信息，因此，该方法尤其适用于回顾性数据分析。但是由于分析物本身的复杂性，导致每种化合物的碎片离子数量有限，因此，该方法的动态范围、选择性和检出限等方面存在一定局限性。

在 vDIA 方法中，碎片离子分布在多个宽范围隔离窗口中，这些窗口覆盖了完整的质量数范围。该方法具备相当高的灵敏度和选择性，同时保持了样品信息的完整性，因而非常适用于

回顾性数据分析。表 1 中的定量限（LOQs）是以逐级稀释法进行全扫描定量并结合碎片离子定性确认得出的。定量限此处定义为，至少能以一个碎片离子进行定性确认的最低化合物浓度。

对于准确定量和定性确认，用于定性确认的碎片离子需在保留时间和质量数两方面均能充分分辨，以免受到升高的背景或干扰峰的影响。图 3 举例说明，使用 vDIA 扫描模式和 TraceFinder 软件自动化处理所提取的定性碎片离子（右边面板）与定量母离子的离子色谱图重叠度和匹配度均很高。所有的定性离子不受干扰，且和定量离子同时流出，使定性结论毋庸置疑，这点对于复杂基质样品的分析特别重要。在 vDIA 模式下，能得到所有共流出碎片的轮廓图，因此通过碎片色谱峰积分并计算碎片离子比，也能够对定性结果进行更可靠的确认。

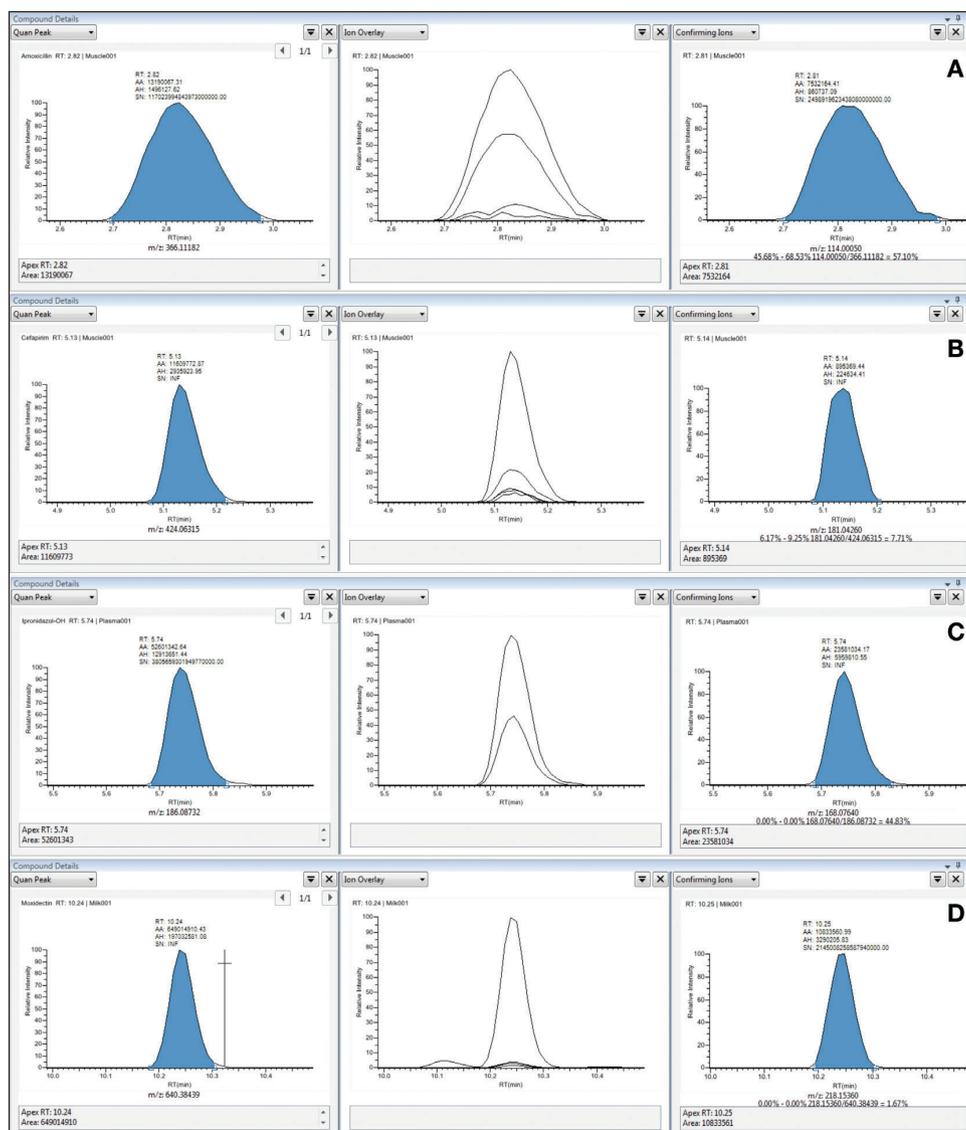


图 3. 基质中所选化合物的选择性: A. 猪肉中加入 5ppb 氨苄西林; B. 猪肾脏中加入 5ppb 碳青霉烯类; C. 猪血中加入 1ppb 洛硝哒唑; D. 牛奶中加入 1ppb 莫西菌素。

图 4 显示，在 vDIA 扫描模式下所选组分的线性动态范围。标准曲线范围从 0.5ppb 到 500ppb，所有的线性相关系数 R^2 均大于 0.99。

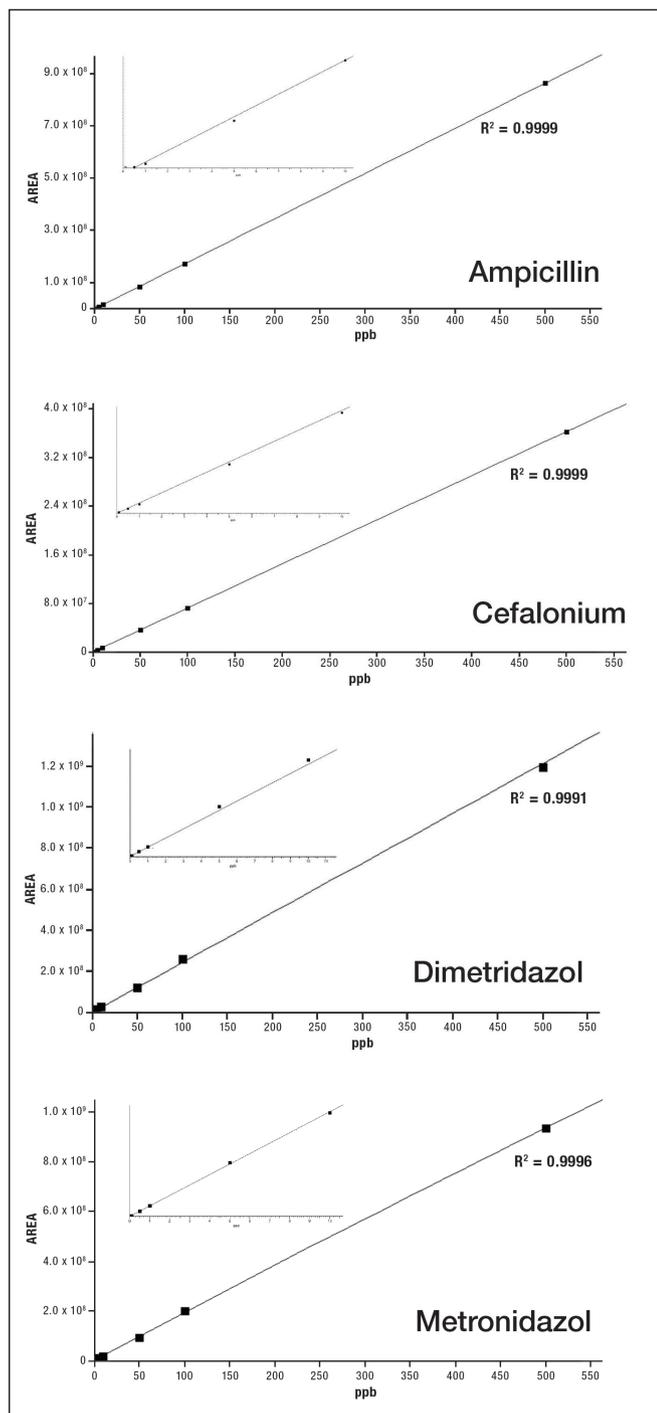


图 4. 所选化合物的线性

对于阿维菌素和多拉菌素，实验发现准分子离子稳定性不好，因此全扫描检测的灵敏度不高。这种不稳定性可能是由于采用了该通用方法的平均参数。在这种情况下，vDIA 方法可以选用阿维菌素和多拉菌素的几个碎片离子进行定量，在这种模式下，相比全扫描模式而言，即使离子浓度远远低于准分子离子浓度，也能够完成可靠的定量和定性确认。

建立了定量曲线后，对低浓度基质加标样品中所有组分进行定量分析。肌肉和肾脏样品中加入 5ppb 抗生素，牛奶中加入 1.0ppb 阿维菌素，血浆中加入 1.0ppb 硝基咪唑类兽药。

在以保留时间进行全扫描识别的分析中，TraceFinder 处理软件为组分检测提供很高的选择性（使用 5 ppm 的窄提取窗口）。该软件还提供另外三种自动定性确证方式。第一种方式是通过全扫描中母离子的同位素信息进行确证。图 5 为环丙沙星实测（红色）和理论（蓝色）的同位素分布叠加图。将分辨率设定为 70,000，即使在如肌肉提取物的复杂基质中，某个化合物的浓度低至 5ppb，其同位素分布的匹配仍不受干扰，确保了定性结果的可靠性。

第二种方式是通过 MS/MS 数据检测已知碎片离子进行定性确证。以下结果为 0.5ppb 肌肉组织加标样的检测结果。图 6 为 vDIA 模式下碎片离子确证的结果。由于 vDIA 谱图采用一个宽隔离窗口生成，因此可以检测多个母离子产生的碎片离子。Orbitrap MS/MS 具备的高分辨率和高质量精度特性，使得碎片离子的选择性识别成为可能，结合保留时间，可获得可靠的确认结果。

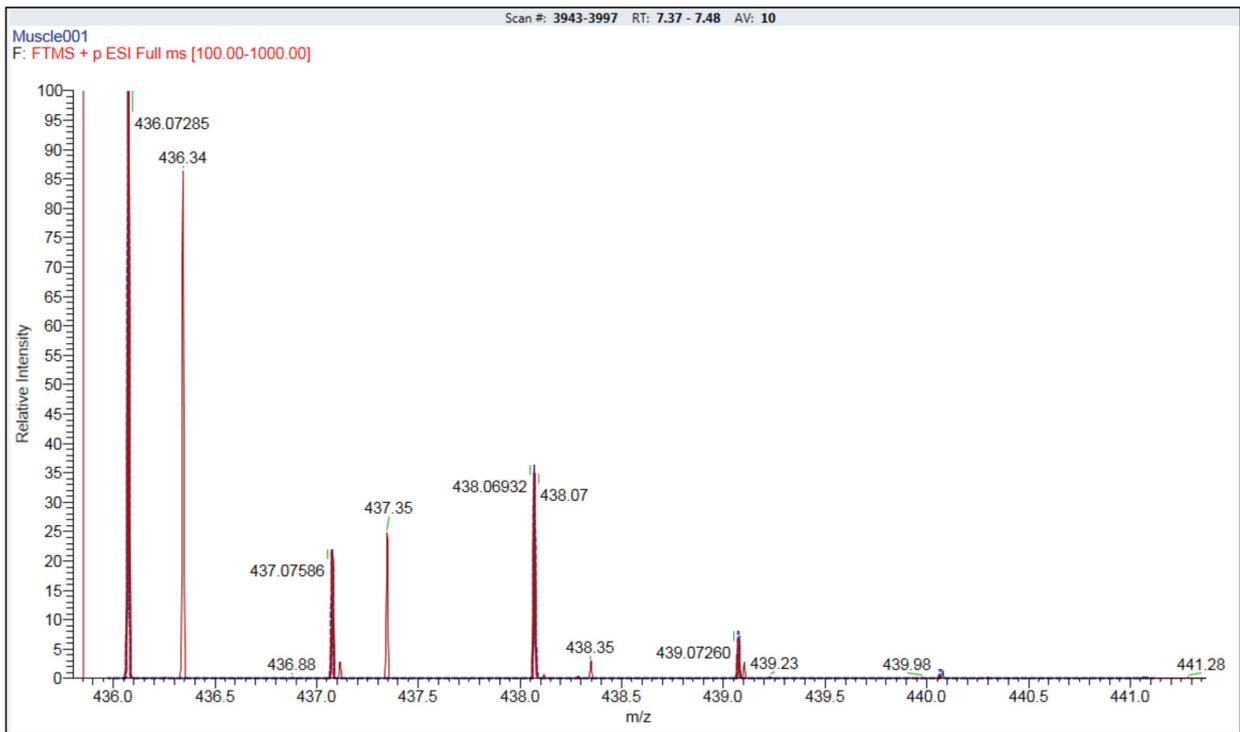


图 5. 环丙沙星的同位素谱图匹配，红色为实测谱图，蓝色为理论同位素分布图

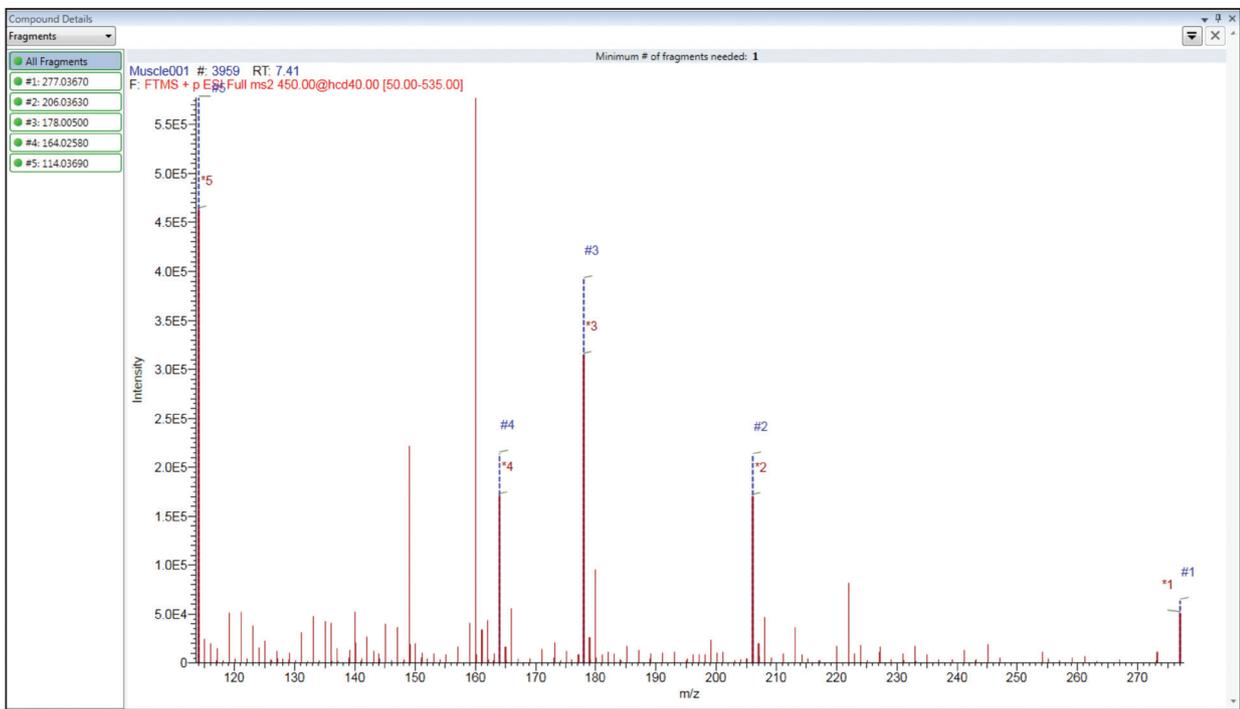


图 6. 环丙沙星的碎片匹配结果，红色为实测谱图，蓝色为确证碎片离子质量数

大多数常规方法能够分析的目标化合物数量有限。因此，对候选药物进行“后质谱分析”的再分析能力，有利于节省仪器/实验时间和样品。为了演示数据文件的回顾性分析，对肌肉组织加标样品的 vDIA 数据文件进行宽范围筛查。利用内置的 1500 种化合物数据库进行未知物筛查，结果发现，数据库中的部分结果与样品中出现的其他组分高度匹配。图 7 以皮质醇（氢化可的松）为例，展示了通过同位素匹配、碎片搜索和谱库匹配得到的确证结果。

结论

本文利用 Q Exactive Focus MS 和 UltiMate 3000 HPLC，建立了用于 44 个不同种类兽药残留筛查定量的可变数据非依赖采集方法。该方法满足所需的 LOD 灵敏度，并且能够根据保留时间、精确 m/z 、同位素比和碎片离子等进行定性确认，性能优于欧盟的法规要求（EC/657/2002）。vDIA 为非目标化合物和未知物的筛查确证提供了一种新方法，具备高灵敏度和高选择性。TraceFinder 软件简单易用，可应用在化合物识别和定性确证的全过程。vDIA 方法达到了预期目标，能够准确而灵敏地检测非目标化合物（例如，44 种组分列表中的物质），并能对未知化合物进行回顾性分析筛查。

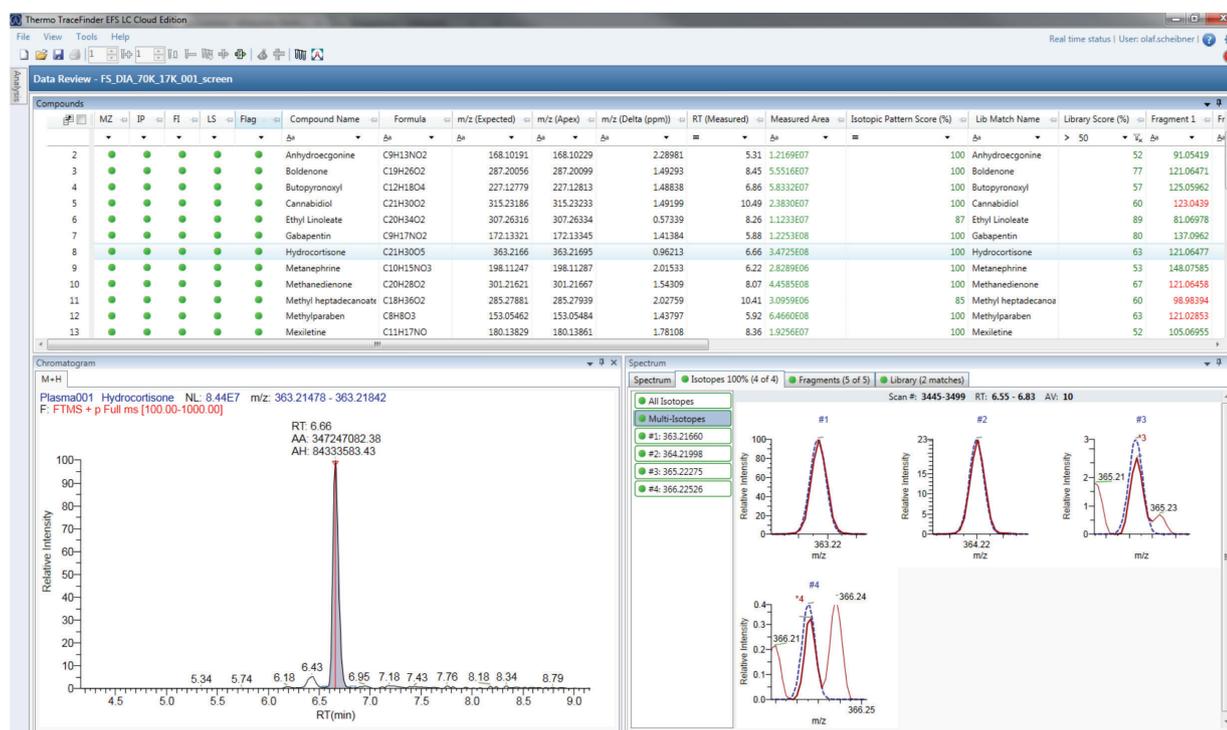


图 7. TraceFinder 软件的非目标筛查结果