

动物源食品中兽药残留高通量快速分析检测技术

孙兴权, 董振霖, 李一尘, 代弟, 苏明明, 曹际娟^{*}

(辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

摘要: 随着养殖业的迅猛发展, 动物源食品兽药残留问题日益成为食品安全领域的重要内容。动物源食品基质复杂, 而其中残留的兽药含量甚微, 传统的样品制备及检测方法大多存在检测样品基质种类单一、检测兽药种类范围小、耗时长、重现性差等问题, 缺乏一定的通用性和准确性, 已不能满足当前社会发展的需要。近年来, 随着 QuChERS 法和高分辨质谱等先进样品制备和检测技术在兽药残留检测分析领域的应用, 一批高通量、自动化乃至可视化的快速高效分析检测方法也随之而起, 该文即对这些高通量快速样品制备和检测方法进行综述, 同时对动物源食品中兽药残留的检测和监控等工作提出建议并进行了展望。

关键词: 食品产品; 动物; 净化; 高通量; 快速分析; 检测; 兽药残留

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2014.08.033

中图分类号: O65; O656.22

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2014)-08-0280-13

孙兴权, 董振霖, 李一尘, 等. 动物源食品中兽药残留高通量快速分析检测技术[J]. 农业工程学报, 2014, 30(8): 280—292.

Sun Xingquan, Dong Zhenlin, Li Yichen, et al. High-throughput and fast analysis detection technology of veterinary drug residues in food products of animal origin[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(8): 280—292. (in Chinese with English abstract)

0 引言

随着现代养殖业日趋集约化、规模化地快速发展, 为了追求更大的商业利益和减少高密度饲养带来的风险, 常常出现养殖户滥用兽药的情况。如果动物源食品中残留有兽药, 就会通过食物链对人体产生不同程度的毒害作用。由于动物源食品基质复杂, 含有蛋白质、脂肪、糖类等多种化合物, 而残留其中的兽药含量甚微, 这就使得动物源食品中兽药残留的检测成为一种复杂样品基质中痕量组分的分析技术。

样品制备是整个兽药残留分析检测过程中耗时最长、劳动强度最大、同时也是产生误差最多的一个环节, 其完善与否直接决定着整个分析检测方法的成败, 是目前实现兽药残留高通量快速检测必须要突破的重要瓶颈之一。近年来, 兽药残留检测领域出现了固相萃取(solid phase extraction, SPE)、基质固相分散萃取(matrix solid-phase dispersion, MSPD)、快速溶剂萃取(accelerated solvent

extraction, ASE)、微波辅助萃取(microwave-assisted extraction, MAE)、分子印迹技术(molecular imprinted technology, MIT)等样品提取和净化新技术^[1-2], 而随着液质联用技术的发展和推广, 一次分析检测完成多个或多类残留已成为可能。为了能够同时分析检测不同物理和化学性质的多种化合物, 需要发展一般性的、非选择性的高通量样品制备方法^[3]。样品用量少、试剂消耗少、在线自动化、高通量地快速分析是兽药残留检测技术的发展趋势^[4]。本文将就动物源食品中兽药残留高通量快速分析检测技术的研究进展情况进行综述。

1 高通量样品制备和净化技术

1.1 QuChERS 法

QuChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe) 法因其具有快速、简单、便宜、有效、耐用和安全可靠等特点而得名, 一般采用以乙腈或酸化乙腈为提取剂, 通过加入氯化钠或乙酸钠等缓冲盐减少极性杂质的干扰; 加入无水硫酸镁在提取步骤中促进溶剂分配并提高样品分布, 在净化步骤中可去除有机相中的多余水分; 加入伯仲胺(primary secondary amine, PSA) 去除糖类和脂肪酸、有机酸、脂类和一些色素等方式来进行农药多残留物分析的样品制备和净化。大量应用实践证明, QuChERS 法其实是一个高通量样品处理的“模板”方法, 可以根据待测物理化特性和试样基质组

收稿日期: 2013-09-17 修订日期: 2014-03-26

基金项目: 质检公益性行业科研专项项目 (No. 01310141)

作者简介: 孙兴权 (1972—), 男, 博士, 高级工程师, 主要从事食品安全检测分析方面研究。大连 辽宁出入境检验检疫局技术中心, 116001。Email: xingquan-s@163.com

^{*}通信作者: 曹际娟 (1968—), 女, 博士, 研究员, 主要从事食品安全方面研究。大连 辽宁出入境检验检疫局技术中心, 116001。

Email: cjj0909@163.com

成的不同而选取适宜的提取剂和吸附剂来完成抽提和除杂净化任务。正是 QuEChERS 法这种可以根据实际需要采用不同提取剂、吸附剂组合进行样品处理的灵活性，决定了其具有无比的应用前景。

随着应用推广的不断展开，QuEChERS 法在兽药残留检测方面的应用也日趋增多。对于脂肪和蛋白含量高的动物组织，可以采用 PSA、C₁₈ 粉和中性氧化铝粉等进行净化处理，还可以通过加入正己

烷脱脂和提取液浓缩等动物源食品中常用的分析手段对 QuEChERS 法进行改良，在提高待测物的分辨率和灵敏度的同时提高方法的适用性和实用性，表 1 概括了 QuEChERS 法分析不同种类动物源食品中多种兽药残留的应用情况。由这些应用事例可见，改良的 QuEChERS 法结合传统的兽药残留样品前处理方法是建立高通量兽药残留检测方法的有效途径。

表 1 QuEChERS 法高通量提取净化不同类型基质中多残留分析案例

Table 1 Extraction and purification methods of multi-residues or multiclass residual veterinary drugs in different matrices by QuEChERS

基质 Matrix	分析物 Analyte	样品制备 Sample pretreatment	检测方法 Detection method	参考文献 Reference
猪肝 Pig liver	20 种磺胺类兽药	乙腈在 DisQuE 萃取管中提取，DisQuE 净化管净化	LC-MS/MS	[5]
鸡肝 Chicken liver	磺胺类、喹诺酮类、苯并咪唑类兽药及其代谢物	1%乙酸-乙腈溶液提取，NH ₂ 吸附剂净化，正己烷脱脂	LC-MS/MS	[6]
牛肾 Bovine kidney	11 类 120 种兽药	80%乙腈溶液提取，正己烷分配净化	LC-MS/MS	[7]
鸡肉 Chicken muscle	硝基咪唑、磺胺、氟喹诺酮、喹诺酮等 11 类兽药	1%乙酸-乙腈溶液提取，NH ₂ 吸附剂净化	LC-MS/MS	[8]
小牛肉 Veal muscle	氨基糖苷等 8 类 39 种兽药	86%乙腈溶液和甲酸提取，正己烷脱脂净化	LC-MS/MS	[9]
猪肉 Pork	磺胺类、硝基咪唑类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类和吡唑酮等 54 种兽药	乙腈提取，正己烷脱脂，C ₁₈ 固相萃取柱净化	LC-MS/MS	[10]
鱼肉 Fish	雌激素、雄激素、孕激素、糖皮质激素和氯霉素等 5 类 30 种兽药	乙腈提取，硫酸镁、氧化铝及 PSA 粉等净化	LC-MS/MS	[11]
虾 Shrimp	磺胺类、喹诺酮类等 72 种兽药	5%乙酸-乙腈溶液提取，乙腈沉淀蛋白，C ₁₈ 粉净化	LC-MS/MS	[12]
蛋 Egg	四环素、离子载体、抗球虫药、青霉素、头孢菌素、喹诺酮、磺胺等 7 类兽药	甲醇-水-乙酸(体积比 80:20:1)溶液提取，过膜净化	LC-MS/MS	[13]
奶 Milk	四环素类、磺胺类、喹诺酮类等 29 种兽药	1%甲酸-乙腈溶液和 0.1 g EDTA-Na ₂ 提取，硫酸钠、C ₁₈ 粉净化	LC-Q-TOF-MS	[14]
蜂蜜、动物饲料 Honey, animal feed	151 种农药、兽药、真菌毒素和植物毒素	1%甲酸-乙腈溶液提取，离心净化	LC-Orbitrap-MS	[15]
奶、蜂蜜 Milk, honey	氨基糖苷、杀螨剂、氟喹诺酮、离子载体、β-内酰胺、青霉素、大环内酯等 10 类兽药	1%乙酸-乙腈溶液和乙酸钠、EDTA-Na ₂ 、硫酸镁混合提取	LC-Q-TOF-MS	[16]
奶、肝 Milk, liver	苯并咪唑、大环内酯类和杀虫剂等 38 种兽药	乙腈提取，硫酸镁和 C ₁₈ 粉净化	LC-MS/MS	[17]
鸡肉、肝 Chicken muscle, liver	克球酚、地克珠利、磺胺类等 7 种兽药	乙腈-氯仿(体积比 10:1)溶液提取，C ₁₈ 、PSA、氧化铝等分散固相萃取净化	HPLC	[18]
奶、肉 Milk, meat	β-内酰胺类、氟喹诺酮类和大环内酯类等 20 种兽药	样品与 C ₁₈ 填料(粒径 40~75 μm)混合进行基质固相分散法提取，甲醇洗脱	LC-MS/MS	[19]
牛肉、猪肉、鸡肉和蛋 Bovine/swine/chicken muscle and egg	磺胺类、喹诺酮类、抗球虫药类和抗寄生虫药类等 43 种兽药	乙腈和 1%甲酸-乙腈溶液进行提取	LC-MS/MS	[20]
猪肉、虾、奶、肝、蛋 Pork, shrimp, milk, liver, egg	β-受体激动剂类、三苯甲烷类、苯二氮卓类、硝基咪唑类、苯并咪唑类、磺胺类等 76 种兽药	乙腈和含 Mg ²⁺ 的柠檬酸缓冲液提取，聚苯乙烯-二乙烯基苯固相萃取柱和阳离子交换固相萃取柱串联净化，甲醇和甲醇-氨水(体积比 95:5)分步洗脱	LC-MS/MS	[21]
肉、奶、蛋 Meat, milk, egg	β-受体激动剂、苯并咪唑、类固醇激素和三苯甲烷等 9 类 105 种兽药	0.1%甲酸-乙腈溶液提取，HLB 固相萃取柱净化	LC-Q-TOF-MS	[22]

尽管目前 QuEChERS 法在兽药残留高通量分析检测方面的成功案例较多，但高通量样品制备方法通常会存在一定的基质效应^[23]，这不仅会对方法的检测限、选择性，以及测试结果的准确定量产生影响，同时还会增加仪器的维护成本。因此，新净化体系和新净化材料的研究开发将是提高

QuEChERS 法在兽药残留检测方面净化效果的一个新的研究方向^[24]。此外，与其他分析方法相比，QuEChERS 法还存在一定的可提升空间，比如 Frenich 等^[25]比较了溶剂萃取法和 QuEChERS 法对蛋类样品中四环素类、大环内酯类等多种兽药残留的提取分析效果，结果发现前者结合亲水亲脂平衡

(hydrophile-lipophile balance, HLB) 固相萃取柱净化处理所得效果更佳, 而后者所能提取待测物的数量相对有限。Blasco 等^[26]利用加压力液体萃取法 (pressurized liquid extraction, PLE) 和 QuEChERS 法分别对牛肉中 16 种兽药残留进行分析, 结果表明前者检出限 (limit of detection, LOD) 更低 ($5\sim 30\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 后者为 $10\sim 100\ \mu\text{g}/\text{kg}$), 回收率范围为 $69\%\sim 103\%$ (后者为 $19\%\sim 89\%$)。PLE 法利用 70°C 水在 1 500 psi 压力下对样品进行提取, 不使用也不产生毒害性物质, 突显了其优越性所在。对于肉类产品, 除 PLE 法外, 近年来还出现了一些非常简便有效的样品制备方法。比如 Lopes 等^[27]利用低温快速分配液液萃取法 (liquid-liquid extraction with partition at very low temperature, LLE-FPVL) 对猪肉中四环素、磺胺等 6 类共 34 种兽药残留进行了检测分析, 试样经乙腈均质提取, 10°C 低温离心后, 浸入液氮冷冻 15s, 收集未冻结的有机相并吹干, 残渣经 0.1% 甲酸溶液复溶后过膜上 LC-MS/MS 测定。该法具有较高的特异性、灵敏度和选择性, 无需净化且所用溶剂较少, 可以应用于日常的兽药残留筛选检测。

1.2 日本一齐分析法

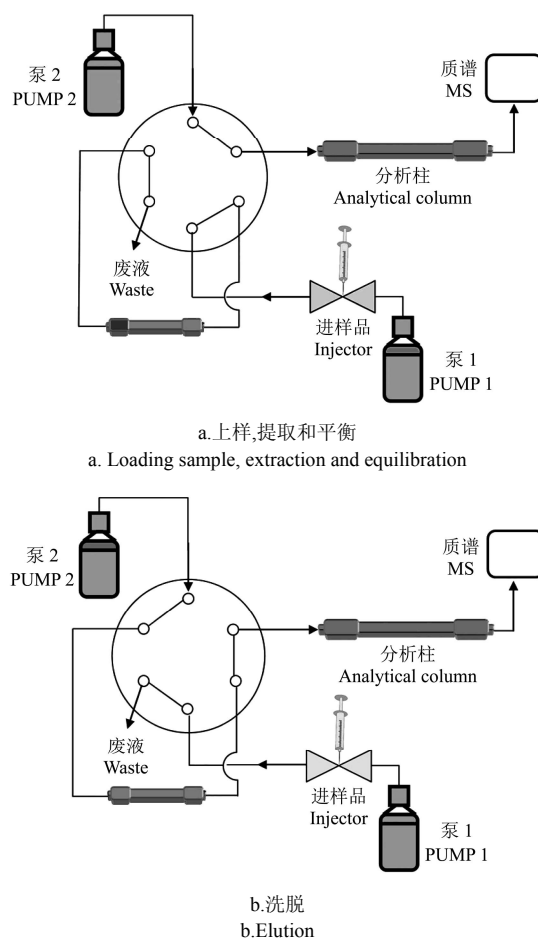
2005 年日本厚生劳动省出台了《食品中残留农药兽药饲料添加剂检测方法》, 即一齐试验法。该方法涵盖了乙腈提取, 正己烷和无水硫酸钠相继进行脱脂和除水等除杂处理的第 1 法; 95% 乙腈提取, 合成硅酸镁柱色谱法、乙腈/正己烷分配等手段进行净化的第 2 法; 以及乙腈-甲醇-0.2% 偏磷酸 (体积比 1:1:3) 混合溶液提取, 二乙烯基苯-N-乙烯吡咯烷酮共聚合体固相萃取柱净化的第 3 法等 3 套检测分析方法, 可以分别对畜、水产品中 107、68 和 33 种化合物进行同时检测分析。从整个试验来看, 不同方法涉及的化合物种类有交叉, 同一化合物在不同方法中的检测条件不同。此外, 从试验结果来看, 有些化合物回收率偏低 (小于 50%), 这可能与一齐法样品处理步骤多, 要求净化程度高等因素有关。

目前, 一齐法在实际应用中也得到了一定的改良, 与改良 QuEChERS 法相当。Yoshida 等^[28]利用 LC-MS/MS 法分析了饺子、炸鸡、香肠和调味炸鲭鱼等样品中四环素类、磺胺类等 69 种兽药的残留情况。样品经乙腈-甲醇-0.25% 甲酸 (体积比 2:2:3) 溶液与玻璃珠和 EDTA- Na_2 组成的混合体系振摇提取, 冷冻离心, 上清液再经 PSA、 C_{18} 粉净化处理。该方法简便快速, 准确率高, 在 $0.01\ \text{mg}/\text{kg}$ 的定量限 (limit of quantitation, LOQ) 下, 平均回收率范围为 $70\%\sim 120\%$, RSD 不超过 25%, 适合于

动物源食品中多残留的快速检测。

1.3 柱切换在线净化-色谱/质谱联用技术

柱切换技术又称顺序色谱、多柱色谱, 是一种在线固相分离技术, 可以经过简单的样品处理或直接进样的方式来测定复杂样品基质中的待测物^[29]。柱切换系统通常由多个泵、多种流动相、一个或多个预柱、分析柱和切换阀组成。试样进入分析柱分离之前, 先在预柱上浓缩富集, 待测物被保留在预柱上, 杂质则被洗脱进入废液池。然后通过切换阀改用新的流动相冲洗预柱, 待测物即被反冲进入分析柱分离, 进而进入检测器进行检测分析, 柱切换在线净化流路模式示意图见图 1。



注: 引自文献[30]。

Note: Cited from the literature [30].

图 1 柱切换在线净化流路模式示意图

Fig.1 Flow diagram of column switching on-line cleanup mode

目前, 柱切换技术主要包括在线固相萃取 (SPE on-line) 和涡流色谱 (turbulent flow chromatography, TFC) 2 种模式, 二者均可根据实际需要选择填料性质不同的预柱以串联或并联的方式进行相应的在线分析。柱切换技术在简化样品前处理步骤, 减少有机溶剂用量, 缩短分析时间和扩大分析对象范围的同时可实现自动化程度较高的样品在线浓缩

和纯化, 有利于提高样品检测的回收率和重现性, 并可降低检出限和定量限, 但也存在峰展宽等问题^[31]。

1.3.1 在线固相萃取技术

SPE on-line 技术以液相自动进样器平台为基础, 通过在线固相萃取模块, 试样先经高效 SPE 柱 (长度 2~15 mm, 内径 1~4.6 mm, 可重复使用) 净化分离, 然后再切换到 LC 流路中进行分析, 可实现全自动、高通量、灵敏高效的复杂样品基质中待测物分离分析^[32]。

针对肉、蛋、奶、蜂蜜等动物源食品, 无需或经简单的样品处理, 均可利用 SPE on-line 技术取得良好的分析效果。Tang 等^[33]先用乙腈对不同动物组织样品进行简单地提取和去蛋白处理, 再将上清液直接进亲水亲脂 SPE 柱在线净化, 借助 LC-MS/MS 法检测了试样中大环内酯类、喹诺酮类等 13 种兽药残留, 整个分析检测 6 min 内完成。Li 等^[34]利用 SPE on-line 技术分析测定了蜂蜜中四环素类药物残留。1 mL 稀释的蜂蜜样品直接进样, 经乙腈和 0.8% 甲酸组成的流动相梯度洗脱, 在线 C₁₈ SPE 柱 3 min 内即将蜂蜜基质洗出, 8 min 内完成 5 种四环素类兽药残留的检测, 方法 LOD 为 5~12 $\mu\text{g/kg}$, 日内和日间精密度均小于 10%。Jing 等^[35]以土霉素、金霉素为模板合成分子印迹聚合物 (molecular imprinted polymer, MIP), 将其作为固相萃取材料, 通过分子印迹固相萃取和 HPLC 联用技术在线分析了蛋中微量四环素类兽药的残留情况。整个方法分析时间 18 min, LOD 为 0.8~1.3 $\mu\text{g/kg}$, 回收率为 91.6%~107.6%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 均小于 4.0%。Kantiani 等^[36]利用 SPE-LC-MS/MS 技术分析了牛奶中多种 β -内酰胺类兽药残留情况, 样品经高速离心, 取中间层上机测定, 选用高密度键合型 C₁₈ HD 填料进行在线 SPE 净化, 内标法定量。结果 LOQ 为 0.09~1.44 $\mu\text{g/L}$, 回收率为 80%~116%。该方法灵敏准确, 自动化程度高, 是食品安全领域值得推荐的方法。

1.3.2 涡流色谱

TFC 技术是一种在内径细, 填料粒径大 (30~60 μm) 的柱子中, 利用流动相在高流速 (1.5~5.0 mL/min) 下产生的涡流来快速净化和分离生物样品的新型在线固相萃取技术, 其分析原理为: 通过高流速的涡流冲洗, 蛋白、脂类和糖类等大分子化合物未扩散入填料颗粒内部就被先行冲出, 而小分子化合物则进入填料颗粒的孔穴中, 孔穴中的固定液选择性地吸附适合极性的化合物, 极性差异大的同样被冲出而不予保留, 从而实现待测物与基质的分离^[37]。TFC 的操作模式与 SPE on-line 的基本

相同, 只是分析过程中流速较高, 且需一个容量至少 10 倍于 TFC 柱的 Transfer(solvent holding)loop, 其中根据 TFC 柱填料性质不同加载不同的溶液, 以完成把待测物从 TFC 柱洗脱出来并传送至分析柱的任务^[38-39]。

Aguilera-Luiz 等^[40]采用 0.1mol/L EDTA-Na₂ 溶液稀释后, 直接上 TFC-Orbitrap-MS 系统的方式测定了蜂蜜中多种兽药残留, 回收率为 68%~121%, LOQ 为 5~50 $\mu\text{g/kg}$, 多数分析物日内和日间精密度均不超过 25%。Stolker 等^[41]采用稀释液 (含 50 mmol/L 乙酸铵和 7.5 mmol/L EDTA-Na₂ 的水溶液-乙腈 (体积比 1:1)) 进行去蛋白处理, 高速离心后上清液直接进 TFC-LC-MS/MS 系统分析的方式, 对牛奶中阿苯达唑、磺胺二甲嘧啶等 7 类抗生素进行了检测, LOD 为 0.1~5.2 $\mu\text{g/L}$, RSD 不超过 12%。Bousova 等^[42]则采用乙腈提取并沉淀蛋白的方式处理牛奶样品, 离心过膜净化后, 利用 TFC-LC-MS/MS 法自动在线分析了其中氨基糖苷、磺胺等 7 类共 36 种不同兽药的残留情况。该方法实用性强, 适合于不同来源、不同脂肪含量牛奶中多种兽药残留的检测。

2 高通量样品检测技术

2.1 高分辨率质谱技术 (high resolution mass spectrometry, HRMS)

近年来, 动物源食品中兽药残留检测正逐渐由目标型 LC-QqQ-MS 检测向精确质量非目标型 HRMS 全扫描检测转变。LC-QqQ-MS 技术在定量分析上有一定的优势, 但也存在不足, 如: 只有质谱方法中涵盖的化合物才可被检测到, 分析化合物数量有限, 需要对每种化合物进行参数优化, 比较耗时, 对基质的干扰比较敏感, 相关的样品制备方法较为复杂; 分辨率低, 不能有效区分分子量相近的化合物, 会造成假阳性结果^[43]等。与 QqQ MS 相比, HRMS 主要依靠精确质量数 (可精确到小数点第 4 位) 和保留时间来对待测物进行定性识别。HRMS 的参数设定简单, 基于真实高分辨能力的高准确度, 真实的同位素峰型分布测定能力, 其精确质量数可以给出元素组成, 从而提供待测物结构信息, 能够更彻底地排除基质干扰, 将质量数非常相近的样品背景基质干扰物质和待测物区分开, 大大降低了分析检测中对色谱分离的要求。HRMS 可通过全扫描进行非定向和未知化合物的筛选^[15], 需要增加目标化合物时, 不必再次处理样品和进样, 重新分析已有的全扫描数据即可^[44]; 还可进行多级扫描, 通过再打碎得到 MS/MS 谱图进行谱库检索或者与标准物质比对来确证待测物, HRMS 的分析流

程图见图 2。

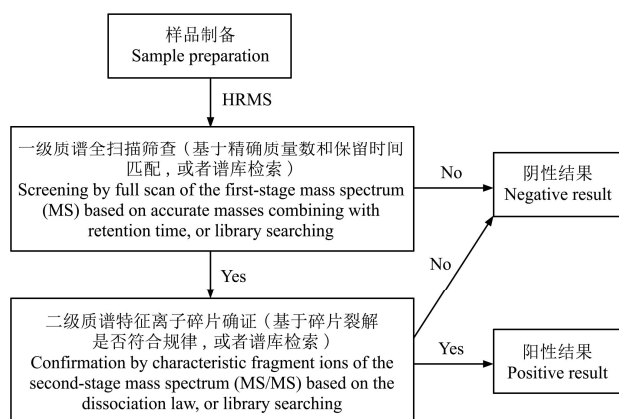


图 2 高分辨质谱的分析流程图

Fig.2 Technological process of high resolution mass spectrometry

目前，兽药残留分析中应用较多的 HRMS 主要有飞行时间（time-of-flight, TOF）质谱和静电场轨道阱（orbitrap）质谱，二者在全扫描模式下选择性好、灵敏度高，可在单次分析中同时进行定性和定量，能够充分保证待测物从复杂基质中有效分离出来，是兽药残留分析中极具潜力的分析检测手段。

2.1.1 飞行时间质谱

TOF MS 分析技术是利用动能相同而质荷比不同的离子在恒定电场中运动，经过恒定距离所需时间不同的原理对物质成分或结构进行分析的一种质谱方法。TOF MS 全扫描方式检测的离子质量准确度要比一般质谱高 100 倍以上，精确质量测定其准确度可达 5×10^{-6} ，甚至更低^[45]。此外，扫描速度快和质量范围宽也是 TOF MS 较为突出的优势，充分保证了其一次全扫描即可同时筛查几百种甚至上千种未知物质功能的实现。

Hermo 等^[46]应用 LC-TOF-MS 分析检测了猪肝中多种喹诺酮类药物的残留情况，方法 LOQ 为 1.5~6.0 $\mu\text{g/kg}$ ，回收率高于 60%。该方法所得结果与 LC-MS 和 LC-MS/MS 的相比较表明：TOF MS 适合于食品样品中的多残留分析，并具有极好的确证功能。Peters 等^[47]利用 UPLC-TOF-MS 建立了猪肉、鱼肉和鸡蛋中 100 种兽药的检测方法，试样经体积分数 50%乙腈溶液提取，Strata X 固相萃取柱净化，方法回收率范围为 70%~100%，重复性和再现性变异系数（coefficient of variation, CV）分别为 8%~15%和 15%~20%。Villar-Pulido 等^[48]利用 QuEChERS 法对虾中苯扎氯铵、乙氧喹等 14 种兽药残留进行检测分析，样品的识别、确证和定量通过 LC-TOF-MS 完成，方法 LOD 为 0.06~7 $\mu\text{g/kg}$ ，回收率为 58%~133%。

2.1.2 静电场轨道阱质谱

Orbitrap MS 是近年来新兴的一种傅里叶转换质谱，其分析原理为：样品进入离子源离子化后，在只有射频电压的多级杆作用下，被引入 C 形离子阱（C-trap）压缩至狭窄一束后送入 Orbitrap，再通过快速增加 Orbitrap 中心电极的电压将其捕获；捕获的离子围绕中心电极做环形运动并沿中心电极轴向振动，在此通过检测镜像电流而获得质谱图^[49]。相比于 TOF MS 等其他类型质谱，Orbitrap MS 在分辨率、质量准确度、灵敏度、线性范围和稳定性等方面均具有领先优势^[50]，其分辨率可达 100 000 半峰宽（full width at half maximum, FWHM）^[51]。此外，Orbitrap MS 在全扫描模式下采集的数据可以根据检测需求反复调用，其数据依赖性扫描（data dependent scan, DDS）模式可以在筛查的同时，通过触发 MS/MS 二级扫描得到待测物 2 级质谱的确认信息^[52]。

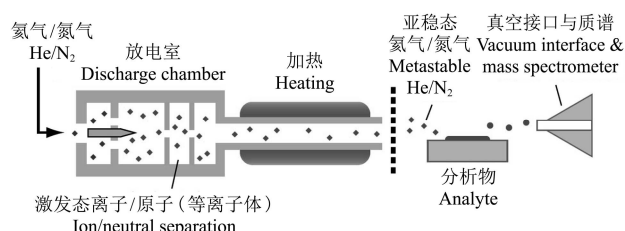
刘鑫等^[53]利用 Q-Orbitrap-MS 同时检测了动物源食品中喹诺酮类、磺胺类、 β -受体激动剂类等 81 种兽药残留，试样经乙腈超声提取，浓缩后用体积分数 50%乙腈溶液定容即可上机测定。试验结果表明：各组分线性关系良好，线性回归系数均在 0.98 以上。取 10 ng/mL 基质加标液，重复进样 5 次，各组分重复性良好，RSD 均在 15%以内。实际样品中待测组分的结果确认借助通过标准物质建立的二级质谱库检索比对来完成。Hurtaud-Pessel 等^[54]通过两步萃取，利用 LTQ-Orbitrap-MS 全扫描方式筛查了肉类样品中青霉素、先锋霉素、磺胺类等多种兽药的残留情况。该方法以各分析物的精确质量和保留时间进行定性识别，利用全自动筛选应用软件快速处理数据，除了可以对实际样品中的目标抗生素进行明确地识别鉴定外，还可对其代谢物等非待测物进行分析。Kaufmann 等^[55]利用 UPLC-TOF-MS 和 UPLC-Orbitrap-MS 分别对动物肌肉、肝脏、肾脏、鱼肉、蜂蜜等多种动物源食品基质中残留的 100 多种兽药进行测定分析，结果表明：Orbitrap MS 因更高的分辨率和质量稳定性而在线性、重现性和检出限等指标上表现更好。

尽管 HRMS 具有依靠精确质量数一次全扫描即可完成定性定量分析的优势，但目前其还不能完全替代 QqQ MS，比如与对目标物离子均进行了优化的 QqQ MS 相比，HMRS 只采用一般通用的碰撞能来进行全扫描，所以就目标型化合物分析而言，前者的灵敏度更高。Vanhaecke 等^[56]比较分析了 QqQ MS 和 Orbitrap MS 对猪肉中合成类固醇（同化激素）的检测效果，结果表明：二者的 CC α 范围分别为 0.04~0.88 和 0.07~2.50 $\mu\text{g/kg}$ ，且前者 RSD

值均低于 20%，而对于某些雌激素，Orbitrap MS 的检测结果高于该值，致使其精密度降低。Kaufmann 等^[57]通过动物组织和蜂蜜基质中 100 多种兽药残留的测定比较了 HRMS 和 QqQ MS 的定量和确证功能，结果表明：在定量方面二者相当或者 HRMS 稍好；但对于低浓度水平下的分析物确证，通过离子丰度比来进行定性确证的 QqQ MS 效果更好，具有更高的准确度。

2.1.3 实时直接分析质谱

实时直接分析 (direct analysis in real time, DART) 质谱是近年来新兴的一种敞开式离子化质谱 (ambient mass spectrometry, AMS, 又称常温常压离子化质谱)^[58]，其分析原理为：在环境空气条件下，将引入腔体的载气（中性或惰性气体，如氦气或氮气）通过 3~5 kV 的放电针产生等离子体，等离子体打在样品表面，与样品发生能量转移、质子转移和电子捕获等作用，样品表面的化合物瞬间脱附并离子化后进入质谱进行检测^[59]。DART MS 的非接触型表面采样离子化技术，更像一种“开放式的直接探针”，无需或仅需简单的样品前处理，可以省略样品净化和液相分离等分析步骤^[60]。该技术可以结合不同类型的质谱对固体样品表面、溶液和气体等复杂基质中的微量化学成分进行高通量的目标型或非目标型分析研究^[61]，具有抗基质干扰、无溶剂效应、分析周期短（2~3 s）、可原位实时直接分析等特点，是一种无损耗的分离、离子化和脱附技术，其结构示意图见图 3。



注：引自文献^[62]。

Note: Cited from the literature ^[62].

图 3 实时直接分析质谱表面采样离子化技术结构示意图

Fig.3 Schematic diagram of surface sampling-ionization technique of direct analysis in real time mass spectrometry

实际应用中，DART MS 可用于动物油脂种类的区分^[63]，中药保健品中添加西药的快速鉴定^[64]，各种表面滥用药物的快速检测^[65]等研究。在兽药残留监测方面，Martínez-Villalba 等^[66]利用 DART-Orbitrap-MS 对牛奶中苯并咪唑类和饲料中抗球虫药类兽药进行了高通量筛查研究。试样经改良的 QuEChERS 法提取，5 μ L 提取液点于玻璃棒后，移至 DART MS 离子源枪出口前端合适的位置，气流温度 450℃ 下解吸 10 s 进行检测，基质匹配标

准曲线定量。结果牛奶中苯并咪唑类兽药的 LOQ 为 1 μ g/kg，2 个添加浓度水平 10 和 100 μ g/kg 下的回收率均高于 65%，RSD 小于 25%；饲料中抗球虫药的 LOQ 为 0.25 mg/kg，2 个添加浓度水平 1 和 10 mg/kg 下的回收率均高于 72%，RSD 小于 20%。该方法数秒内即完成了不同基质中多种待测物的正负离子扫描，高效快速，充分体现了 DART-HRMS 的优越性。

虽然 DART MS 具有诸多优点，但其应用还存在一定的局限性，比如更偏重于定性分析，检测过程中易受到周围环境温度、空气湿度等因素干扰，离子化机理有待进一步研究等^[67]。

2.2 生物芯片及生物传感器技术

2.2.1 蛋白芯片技术

生物芯片是 20 世纪 80 年代发展起来的一项融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术。生物芯片上集成着成千上万密集排列的分子微阵列，可在短时间内分析大量的生物分子，效率远高于传统检测手段。

程京课题组研发的“兽药残留蛋白芯片检测系统”根据抗原和抗体特异性结合的荧光标记竞争免疫法对目标物进行检测，其分析原理为：先通过将载体蛋白偶联的兽药分子固定到基片上制成兽药残留蛋白芯片，试样经提取后与兽药抗体同时加入芯片，待测物与固定在基片上的兽药分子针对兽药抗体进行竞争免疫反应，没能结合在芯片上的抗体在洗涤步骤中被除去，然后加入荧光标记的二抗进行孵育，再次洗涤后通过激光共焦扫描仪检测，最后利用特定软件自动判断残留是否超标^[68]。该课题组^[69]采用蛋白芯片检测试剂盒对猪和鸡组织样品中的克伦特罗、链霉素、磺胺等兽药进行检测，所得检测结果与酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法所得结果相当，而芯片技术具有并行性、高通量和快速准确等特点，更具优势。近年来，程京课题组已经研制出能够检测磺胺类、喹诺酮类等 9 种兽药残留的第 2 代蛋白芯片，每套试剂盒可检测 24 个样品。通过对大量实际样品的检测表明：兽药残留蛋白芯片检测平台系统操作简单、检测速度快、检测通量高，能在同一张芯片上并行检测多份样品中的多种兽药残留，且检测灵敏度达到了中国最高残留限量的要求，检测结果与确证方法相比有很好的符合率^[70]。

兽药残留蛋白芯片技术虽然灵敏度高、操作简便快速，但也存在造价昂贵、使用周期短等不足^[71]，而且目前能够检测的兽药种类还相对较少。

2.2.2 悬浮芯片技术

悬浮芯片技术 (suspension array technology,

SAT)是将流式细胞技术和酶标检测技术有机整合而成的一种新型多功能生物芯片技术平台,是继基因芯片、蛋白芯片之后的新一代高通量分子检测技术平台,具有操作简单、灵敏快速和成本低廉等优点,其分析原理为:先把高分子材料微球($5.6\mu\text{m}$)用荧光染色的方法进行编码,每一种编码的小球可标记一种可以捕获相应目标分子的配体;分析应用时,任选几种或多至100种标记好的小球,混合后与样品中待测分子作用;然后在液流带动下逐个通过一个微细石英管。2束不同波长的激光对每个小球进行检测,一束激光检测小球的色标编码,从而区分小球种类并进而确定检测的是何种分子;另一束激光检测与配体结合的目标分子上的荧光标记进行定量,通过计算机分析和标准曲线拟合,直接给出每一种待测分子的量。

SAT多应用于临床检验和诊断等领域,目前在动物源食品中兽药残留检测分析中也有所应用。刘天龙等^[72]利用SAT建立了牛奶中头孢氨苄和莱克多巴胺的检测方法,二者LOD分别是20.59和23.51 $\mu\text{g/L}$,回收率范围在70%~110%之间,分析效果良好。郭浩等^[73]利用SAT与ELISA法对牛奶、鸡肉、鸡肝、猪肉和猪肝中残留的庆大霉素进行检测,结果表明二者回收率范围均在80%~120%之间。但SAT的 IC_{10} , IC_{50} 值更低,且与其他氨基糖苷类抗生素基本无交叉反应,说明其特异性更好。而高志贤课题组^[74]利用SAT与ELISA法对氯霉素、克伦特罗和雌二醇等3种兽药残留进行分析检测时,试验结果也同样表明: SAT在检测技术、检出限、检测区间、盲样测定和多元分析等方面均具有明显优势。

2.2.3 表面等离子共振生物传感器技术

近年来,表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)生物传感器技术在兽药残留中的应用受到关注^[75],其基本原理为:先将能够与待测物结合的物质固定在芯片表面形成配基,当待测物连续注射至芯片表面时二者发生特异性结合,从而导致芯片表面光学参数变化,并以电信号的形式表现出来,特异结合待测物的量不同,信号的响应强度不同^[76-78]。与传统的分析方法相比,SPR技术具有以下优点:检测样品一般不需要进行预处理,除缓冲液外无需其他试剂;样品中被测组分的分离和检测可以同时完成,分析操作简单且无须进行标记;可实现连续监测,容易实现自动化测量;响应快,样品用量微;敏感物质经固定化可重复使用;可以检测较混浊的样品,而不影响测定结果;成本低,便于推广普及^[79]。

罗进等^[80]采用磷酸缓冲盐溶液均质提取,高速

离心净化,上清液过膜后直接SPR技术测定的方式研究了肉类食品中泰乐菌素和磺胺类等兽药的残留情况。结果表明:泰乐菌素、磺胺类兽药分别在1~32 $\mu\text{g/L}$, 0.5~50 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内,在传感芯片表面所产生的相对共振强度与目标分子浓度呈线性关系。二者的LOD分别为0.27和4.5 $\mu\text{g/kg}$,平均回收率范围分别为80.0%~98.8%和77.3%~98.4%, $\text{RSD}(n=6)$ 分别为4.8%和2.0%,所建方法快速灵敏,且样品制备简便,具有较好的准确性、重现性和稳定性。Keegan等^[81]利用SPR技术分别分析了11种苯并咪唑氨基甲酸酯类和4种氨基苯并咪唑类兽药在肝脏中的残留情况。试样采用改良的QuEChERS法先经乙腈提取后,前者用含 C_{18} 填料的基质扩散固相萃取柱净化,后者则通过简单的环己烷脱脂进行净化。试验结果表明:苯并咪唑氨基甲酸酯类和氨基苯并咪唑类兽药LOD分别为32和41 $\mu\text{g/kg}$, $\text{CC}\beta$ 分别为50和75 $\mu\text{g/kg}$,平均回收率范围分别为77%~132%和103%~116%。实际样品检测过程中,所建生物传感器法与UHPLC-MS/MS确证方法检测效果相当,所有阳性样品SPR技术均检出。Keegan等^[82]还曾采用类似的方式方法对牛奶样品中11种苯并咪唑氨基甲酸酯类兽药的残留情况进行分析,结果表明了SPR技术在兽药残留检测中的实用性。

测试过程中,须注意SPR技术的检测效果会受到待测物质量浓度、流速、试验温度、环境酸碱度和配制溶液用水等因素的影响^[83]。

2.3 可视化快速检测技术

可视化快速检测技术是根据介质与目标物作用引起的特定颜色变化进行快速定性、定量分析的技术,具有直观、便携、快速、实用等优点,在大批量样品抽检中发挥着重要作用^[84]。荣获2012年度国家科学技术进步二等奖的“食品安全危害因子可视化快速检测技术”项目基于半抗原对抗体特异性的决定理论,制备出小分子化学危害因子高特异性抗体,通过多抗体共包被多残留检测技术和试纸条定区域循迹扫描涂布及化学危害物稳定色差梯度显色技术,开发出了一系列基于目视判别颜色变化的可视化快速检测技术和产品。实际应用中,试样经磨碎并与少许提取液混匀后,滴入快速检测试纸,几分钟后以肉眼观察检测线颜色深浅变化来判断检测结果:若试纸呈现两条红线,则该样品中有农药、兽药或其他毒素残留,一条红线,则可确定其安全性达标。该技术所用试纸是有分类和针对性的,每种试纸只能检测某一种或几种特定的化学物质,而不是全部。

可视化快速检测技术主要是以辣根过氧化物

酶和胶体金为标记示踪物, 根据免疫学原理来进行检测的。王硕课题组^[85]采用直接竞争酶联免疫吸附的方式对猪肉和牛奶中7种磺胺类兽药残留进行了快速检测。试验结果表明: 以包被抗磺胺抗体和D₂-辣根过氧化物酶标记磺胺半抗原的膜为固相载体所制的酶标记渗滤式(flow-through)试纸和浸蘸式(dipstick)试纸测试的视觉LOD范围分别为1~5和1~10 $\mu\text{g/L}$; 前者用时5 min完成检测, 后者用时15 min。通过对添加有磺胺类兽药的样品进行检测, 所建可视化快速检测方法的检测结果与HPLC法的具有较好的一致性, 进一步验证了该方法的有效性和实用性。王硕课题组^[86]还利用胶体金免疫层析法检测了猪肉、鸡肉、鲫鱼中5种磺胺类兽药, 该方法视觉LOD为0.01 mg/kg, 检测时间小于10 min。以上2种方法均具有较高的灵敏度及特异性, 操作快速、简单, 结果稳定可靠, 可作为磺胺类药物多残留现场监控的有效筛检手段。此外, 该课题组还采用类似的方式方法分别快速检测了原料奶、脱脂奶粉、蜂蜜、鱼、虾^[87]和猪肉、鸡肉和鲑鱼^[88]中氯霉素的残留情况, 结果表明前者LOD为1 $\mu\text{g/L}$, 而后者采用的渗滤式和侧流式(lateral flow)2种胶体金标记试纸的LOD分别为0.8和1 $\mu\text{g/L}$ 。

3 结论与讨论

动物源食品中兽药残留的高通量快速检测是一项极具挑战性的课题, 本文所述的相关分析技术和方法各具特色, 对于该难题的解决提供了有益的参考。可视化快检技术简便实用, 适用于大批量样品的抽检; 生物芯片及生物传感器技术自动化程度高, 灵敏高效, 但两者与HRMS一次可检测上百种药残相比, 其检测范围还相对较窄。HRMS具有高通量检测的特点, 但仪器昂贵, 操作复杂, 用于定性确证的谱库一定程度上还有赖于使用者借助标准物质来自己建立。尽管如此, HRMS强大的筛查和确证功能还是使其成为众多复杂样品基质中痕量组分检测技术中的佼佼者, 而DART MS的表面采样离子化技术, 几乎无需样品制备即可快速高效地完成相关的分析检测任务。可以预见: 根据实际需要, HRMS与改良QuEChERS法、柱切换在线净化等技术的有机结合一定会成为动物源食品中兽药残留检测的利器, 高通量样品制备、净化和检测技术以其“检测样品基质范围广、分析物种类多, 检测速度快, 效果好, 节省试剂和时间”的特点将势必在动物源食品安全检测领域发挥越来越重要的作用。

食品安全工作任重而道远, 该问题的解决, 除

了技术层面的完善提高, 还有赖于管理层面的严格把关。加强兽药等化工产品注册和生产方面的管理指导, 加大对养殖户相关法律法规的宣传力度并提供必要的用药指导和技术支持, 同时做好动物饲料、毛发和排泄物中药残的企业自检和监控等工作应该是实现动物源食品安全的一条有效途径。

[参 考 文 献]

- [1] 李冰, 李剑勇, 周绪正, 等. 动物性食品中兽药残留分析检测技术研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(5): 82—86.
- [2] 陈冬梅, 陶燕飞, 余欢, 等. 兽药残留分析中样品前处理技术研究进展[J]. 化学通报, 2009, 8: 713—719. Chen Dongmei, Tao Yanfei, Yu Huan, et al. Progress of sample pre-treatment in analysis of veterinary drug residues[J]. Chemistry, 2009, 8: 713—719. (in Chinese with English abstract)
- [3] Berendsen B J A, Stolker A A M, Nielen M W F. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS[J]. TrAC: Trends in Analytical Chemistry, 2013, 43: 229—239.
- [4] Kinsella B, O'Mahony J, Malone E, et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(46): 7977—8015.
- [5] 曲斌, 朱志谦, 陆桂萍, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS快速测定猪肝中20种磺胺类药物残留[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8): 1457—1467. Qu Bin, Zhu Zhiqian, Lu Guiping, et al. UPLC-MS/MS via QuEChERS rapid determination of twenty sulphonamide residues in pig liver[J]. Chinese J Pharmaceutical Analysis, 2012, 32(8): 1457—1467. (in Chinese with English abstract)
- [6] 李锋格, 苏敏, 李晓岩, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肝中磺胺类、喹诺酮类和苯并咪唑类药物及其代谢物的残留量[J]. 色谱, 2011, 29(2): 120—125. Li Fengge, Su Min, Li Xiaoyan, et al. Determination of sulfonamides, quinolones, benzimidazoles and the metabolites of benzimidazoles in chicken livers by dispersive solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese J Chromatography, 2011, 29(2): 120—125. (in Chinese with English abstract)
- [7] Schneider M J, Lehotay S J, Lightfield A R. Evaluation of a multi-class, multi-residue liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for analysis of 120 veterinary drugs in bovine kidney[J]. Drug Test Anal, 2012, 4(Suppl 1): 91—102.
- [8] Stubbings G, Bigwood T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach[J]. Anal Chim Acta, 2009, 637(1/2): 68—78.

- [9] Martos P A, Jayasundara F, Dolbeer J, et al. Multiclass, multiresidue drug analysis, including aminoglycosides, in animal tissue using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(10): 5932—5944.
- [10] 侯建波, 谢文, 陈笑梅, 等. 液相色谱-串联质谱-同位素稀释法同时测定猪肉中 54 种药物残留[J]. *质谱学报*, 2012, 33(1): 42—54.
Hou Jianbo, Xie Wen, Chen Xiaomei, et al. Simultaneous determination of 54 drugs residues in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and isotopes dilution technique[J]. *J Chinese Mass Spectrometry Society*, 2012, 33(1): 42—54. (in Chinese with English abstract)
- [11] 罗辉泰, 黄晓兰, 吴慧勤, 等. QuEChERS/液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中 30 种激素类及氯霉素类药物残留[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(12): 1329—1337.
Luo Huitai, Huang Xiaolan, Wu Huiqin, et al. Simultaneous determination of 30 hormones and chloramphenicols residues in fish using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Instrumental Analysis*, 2011, 30(12): 1329—1337. (in Chinese with English abstract)
- [12] 卜明楠, 石志红, 康健, 等. QuEChERS 结合 LC-MS/MS 同时测定虾肉中 72 种兽药残留[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(5): 552—558.
Piao Mingnan, Shi Zhihong, Kang Jian, et al. Simultaneous determination of 72 veterinary drugs in shrimp by modified QuEChERS and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Instrumental Analysis*, 2012, 31(5): 552—558. (in Chinese with English abstract)
- [13] Capriotti AL, Cavaliere C, Piovesana S, et al. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg[J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1268: 84—90.
- [14] 高馥蝶, 赵妍, 邵兵, 等. 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱法快速筛查牛奶中的农药和兽药残留[J]. *色谱*, 2012, 30(6): 560—567.
Gao Fudie, Zhao Yan, Shao Bing, et al. Determination of residues of pesticides and veterinary drugs in milk by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. *Chinese J Chromatography*, 2012, 30(6): 560—567. (in Chinese with English abstract)
- [15] Kellmann M, Muenster H, Zomer P, et al. Full scan MS in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: How much resolving power is required? [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(8): 1464—1476.
- [16] Wang J, Leung D. The challenges of developing a generic extraction procedure to analyze multi-class veterinary drug residues in milk and honey using ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Drug Test Anal*, 2012(Suppl 1): 103—111.
- [17] Kinsella B, Whelan M, Cantwell H, et al. A dual validation approach to detect anthelmintic residues in bovine liver over an extended concentration range[J]. *Talanta*, 2010, 83(1): 14—24.
- [18] 董静, 宫小明, 张立, 等. QUECHERS-高效液相色谱法同时检测动物组织中的克球酚, 地克珠利和磺胺类药物残留量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(1): 26—28.
Dong Jing, Gong Xiaoming, Zhang Li, et al. Determination of clodolol, diclazuril and sulfonamides in animal tissues by QUECHERS-HPLC[J]. *Chinese J Health Laboratory Technology*, 2008, 18(1): 26—28. (in Chinese with English abstract)
- [19] 王炼, 黎源倩, 王海波, 等. 基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉和牛奶中 20 种兽药残留[J]. *分析化学*, 2011, 39(2): 203—207.
Wang Lian, Li Yuanqian, Wang Haibo, et al. Simultaneous determination of twenty veterinary drug residues in milk and meat using matrix solid phase dispersion-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2011, 39(2): 203—207. (in Chinese with English abstract)
- [20] Nakajima T, Nagano C, Sasamoto T, et al. Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS[J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2012, 53(5): 243—253.
- [21] 郭德华, 邓晓军, 赵善贞, 等. 固相萃取-高效液相色谱/串联质谱同时检测动物源性食品中 76 种兽药残留[J]. *分析化学*, 2010(3): 318—324.
Guo Dehua, Deng Xiaojun, Zhao Shanzhen, et al. Simultaneous determination of 76 veterinary drug residues in foodstuffs of animal origin by solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2010(3): 318—324. (in Chinese with English abstract)
- [22] Deng X J, Yang H Q, Li J Z, et al. Multiclass residues screening of 105 veterinary drugs in meat, milk, and egg using ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2011, 34(19): 2286—2303.
- [23] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. *质谱学报*, 2011, 32(6): 321—332.
Wang Liqi, He Limin, Zeng Zhenling, et al. Progress in matrix effect of veterinary drug residues analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chinese Mass Spectrometry Society*, 2011, 32(6): 321—332. (in Chinese with English abstract)
- [24] 朱坚. 食品中有害物质的检测新技术[J]. *检验检疫学刊*, 2012, 22(5): 1—7.
Zhu Jian, The new technology in analysis of harmful substances in food[J]. *J Inspection and Quarantine*, 2012, 22(5): 1—7. (in Chinese with English abstract)
- [25] Frenich A G, Aguilera-Luiz M D, Vidal J L M, et al. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 661(2): 150—

- 160.
- [26] Blasco C, Masia A, Morillas F G, et al. Comparison of the effectiveness of recent extraction procedures for antibiotic residues in bovine muscle tissues[J]. *J AOAC Int*, 2011, 94(3): 991—1003.
- [27] Lopes R P, Augusti D V, Oliveira A G, et al. Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2011, 28(12): 1667—1676.
- [28] Yoshida E, Shibuya T, Kurokawa C, et al. Quick simultaneous determination of residual veterinary drugs in processed food[J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2011, 52(1): 59—65.
- [29] Kataoka H, Saito K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis[J]. *Bioanalysis*, 2012, 4(7): 809—832.
- [30] 刘朋, 周建良, 安婧婧, 等. 涡流色谱技术在生物样品分析中的应用[J]. *色谱*, 2010, 28(2): 168—174.
Liu Peng, Zhou Jianliang, An Jingjing, Application of turbulent flow chromatography in the analysis of biological samples[J]. *Chinese J Chromatography*, 2010, 28(2): 168—174. (in Chinese with English abstract)
- [31] 赵凯, 杨大进, 王竹天. 柱切换高效液相色谱法及其在食品检验中的应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2009, 21(2): 156—161.
Zhao Kai, Yang Dajin, Wang Zhutian. Column-switching high performance liquid chromatography and its application to food inspection[J]. *Chinese J Health Laboratory Technology*, 2009, 21(2): 156—161. (in Chinese with English abstract)
- [32] Chen L, Wang H, Zeng Q, et al. On line coupling of solid phase extraction to liquid chromatography—a review[J]. *J Chromatogr Sci*, 2009, 47(8): 614—623.
- [33] Tang HP, Ho C, Lai SS. High-throughput screening for multi-class veterinary drug residues in animal muscle using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(17): 2565—2572.
- [34] Li J, Chen L, Wang X, , et al. Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography[J]. *Talanta*, 2008, 75(5): 1245—1252.
- [35] Jing T, Niu J, Xia H, et al. Online coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction to HPLC for determination of trace tetracycline antibiotic residues in egg samples[J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(12): 1469—1476.
- [36] Kantiani L, Farré M, Sibum M, et al. Fully automated analysis of beta-lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(11): 4285—4295.
- [37] 许泓, 李淑静, 何佳, 等. 二维色谱-质谱联用检测食品中残留物的应用[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(6): 114—120.
Xu Hong, Li Shujing, He Jia, et al. Application of 2D-GC/MS in determining multi-residue in food[J]. *Food Research And Development*, 2013, 34(6): 114—120. (in Chinese with English abstract)
- [38] Chassaing C, Robinson S. Turbulent flow chromatography: An evolving solution for bioanalysis [J/OL]. http://www.chromatographytoday.com/articles/bioanalytical/40/christophe_chassaing_sarah_robinson/turbulent_flow_chromatography_an_evolution_for_bioanalysis/498/. *Chromatography today*, 2009: 20—24.
- [39] 艾连峰, 马育松, 陈瑞春, 等. 在线净化液相色谱串联质谱法测定动物源食品中金刚烷胺的残留[J]. *分析化学*, 2013, 41(8): 1194—1198.
Ai Lianfeng, Ma Yusong, Chen Ruichun, et al. Determination of amantadine residues in foods of animal origin by on-line cleanup liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2013, 41(8): 1194—1198. (in Chinese with English abstract)
- [40] Aguilera-Luiz M M, Romero-González R, Plaza-Bolaños P, et al. Rapid and semiautomated method for the analysis of veterinary drug residues in honey based on turbulent-flow liquid chromatography coupled to ultrahigh-performance liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry (TFC-UHPLC-Orbitrap-MS)[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(4): 829—839.
- [41] Stolker A A, Peters R J, Zuiderent R, et al. Fully automated screening of veterinary drugs in milk by turbulent flow chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(7): 2841—2849.
- [42] Bousova K, Senyuva H, Mittendorf K. Multiresidue automated turbulent flow online LC-MS/MS method for the determination of antibiotics in milk[J]. *Food Addit. Contam. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2012, 29(12): 1901—1912.
- [43] Van der Heeft E, Bolck Y J, Beumer B, et al. Full-scan accurate mass selectivity of ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight and Orbitrap mass spectrometry in hormone and veterinary drug residue analysis[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(3): 451—463.
- [44] 夏曦, 李晓薇, 丁双阳, 等. 液相色谱-高分辨质谱在兽药残留分析中的应用进展[J]. *质谱学报*, 2011, 32(6): 333—340.
Xia xi, Li Xiaowei, Ding Shuangyang, et al. Advances on application of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in veterinary drug residues analysis[J]. *J Chinese Mass Spectrometry Society*, 2011, 32(6): 333—340. (in Chinese with English abstract)
- [45] 孙雷, 毕言锋, 张骊, 等. 飞行时间质谱分析技术及其应用研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2009, 43 (7): 37—40.
Sun Lei, Bi Yanfeng, Zhang Li, et al. Research progress on time-of-flight mass spectrometry and its application[J]. *Chinese J Veterinary Drug*, 2009, 43(7): 37—40. (in Chinese with English abstract)
- [46] Hermo M P, Barrón D, Barbosa J. Determination of multiresidue quinolones regulated by the European Union in pig liver samples high-resolution time-of-flight mass spectrometry versus tandem mass spectrometry detection[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1201(1): 1—14.
- [47] Peters R J, Bolck Y J, Rutgers P, et al. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using

- high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(46): 8206—8216.
- [48] Villar-Pulido M, Gilbert-López B, García-Reyes JF, et al. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1419—1427.
- [49] 李明, 马家辰, 李红梅, 等. 静电场轨道阱质谱的进展[J]. *质谱学报*, 2013, 34(3): 185—192.
- Li Ming, Ma Jiachen, Li Hongmei, et al. Progress on electrostatic orbitrap mass spectrometer[J]. *J Chinese Mass Spectrometry Society*, 2013, 34(3): 185—192. (in Chinese with English abstract)
- [50] Makarov A, Denisov E, Lange O, et al. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17(7): 977—982.
- [51] Wiegand A, Makarov A, Froehlich U, et al. 台式液相色谱静电场轨道阱质谱联用系统[J]. *分析测试学报(J Instrumental Analysis)*, 2011, 30(5): 1—2.
- [52] 叶芳挺, 王勇, Chang J S. 利用 ThermoFisher 全新高分辨台式四极杆静电场轨道阱 Q-Exactive 分析 19 种 β -受体激动剂[J]. *中国食品 (China Food)*, 2011(18): 62—65.
- [53] 刘鑫, 李建辉, 杜伟, 等. Q-Exactive 液相色谱-高分辨质谱联用同时检测动物源食品中 81 种兽药残留 [EB/OL]. <http://www.thermo.com.cn/Resources/201212/28162824281.pdf>.
- [54] Hurtaud-Pessel D, Jagadeeshwar-Reddy T, Verdon E. Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap instrument[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2011, 28(10): 1340—1351.
- [55] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al. Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 700(1/2): 86—94.
- [56] Vanhaecke L, Van Meulebroek L, De Clercq N, et al. High resolution orbitrap mass spectrometry in comparison with tandem mass spectrometry for confirmation of anabolic steroids in meat[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 767: 118—127.
- [57] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al. Quantitative and confirmative performance of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry compared to tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(7): 979—992.
- [58] Huang M Z, Cheng S C, Cho Y T, et al. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 72(1): 1—15.
- [59] Cody R B, Laramée J A, Durst H D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(8): 2297—2302.
- [60] Yu S, Crawford E, Tice J, et al. Bioanalysis without Sample cleanup or chromatography: the evaluation and initial implementation of direct analysis in real time ionization mass spectrometry for the quantification of drugs in biological matrixes[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(1): 193—202.
- [61] Hajslova J, Cajka T, Václavík L. Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(2): 204—218.
- [62] Cooks R G, Ouyang Z, Takats Z, et al. Detection technologies. ambient mass spectrometry[J]. *Science*, 2006, 311(5767): 1566—1570.
- [63] Václavík L, Hrbek V, Cajka T, et al. Authentication of animal fats using direct analysis in real time (DART) ionization-mass spectrometry and chemometric tools[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(11): 5919—5926.
- [64] Zhou Z, Zhang J, Zhang W, et al. Rapid screening for synthetic antidiabetic drug adulteration in herbal dietary supplements using direct analysis in real time mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2011, 136(12): 2613—2618.
- [65] Grange A H, Sovocool G W. Detection of illicit drugs on surfaces using direct analysis in real time (DART) time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(9): 1271—1281.
- [66] Martínez-Villalba A, Václavík L, Moyano E, et al. Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for high-throughput analysis of antiparasitic veterinary drugs in feed and food[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(3): 467—475.
- [67] 张佳玲, 霍飞凤, 周志贵, 等. 实时直接分析质谱的原理及应用[J]. *化学进展*, 2012, 24(1): 101—109.
- Zhang Jialing, Huo Feifeng, Zhou Zhigui, et al. The principles and applications of an ambient ionization method-direct analysis in real time(DART) [J]. *Progress in Chemistry*, 2012, 24(1): 101—109. (in Chinese with English abstract)
- [68] 谢文章, 王东, 杜宏武, 等. 蛋白质微阵列检测抗原抗体相互作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(2): 311—315.
- Xie Wenzhang, Wang Dong, Du Hongwu, et al. The analysis of antigen-antibody interactions on protein microarrays[J]. *Progress In Biochemistry and Biophysics*, 2002, 29(2): 311—315. (in Chinese with English abstract)
- [69] 郭志红, 张荣, 张连彦, 等. 蛋白芯片在兽药残留检测中的应用[J]. *中国兽药杂志*, 2005, 39(10): 9—12.
- Guo Zhihong, Zhang Rong, Zhang Lianyan, et al. The application of protein chip in veterinary drug residue detection[J]. *Chinese J Veterinary Drug*, 2005, 39(10): 9—12. (in Chinese with English abstract)
- [70] 陈爱亮, 王国青, 王艳, 等. 兽药残留蛋白芯片检测系统的研制和应用[J]. *中国医疗器械信息*, 2008, 14(8): 33—36.
- [71] 王硕, 孙晶伟. 生物芯片用于食品快速检测[J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(4): 197.
- [72] 刘天龙, 王燕飞, 邹明强, 等. 利用悬液芯片系统建立一种高通量检测牛奶中头孢氨苄和莱克多巴胺残留的方法[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(2): 79—84.
- Liu Tianlong, Wang Yanfei, Zou Mingqiang, et al. On the

- development of a microsphere-based multiplexed immunoassay for cephalexin and ractopamine in raw milk[J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(2): 79—84. (in Chinese with English abstract)
- [73] 郭浩, 王燕飞, 邹明强, 等. 悬液芯片与常规酶联免疫吸附法检测庆大霉素残留的比较[J]. *食品科学*, 2012, 33(20): 144—148.
- Guo Hao, Wang Yanfei, Zou Mingqiang, et al. Comparison of suspension array and ELISA in the detection of gentamicin residue[J]. *Food Science*, 2012, 33(20): 144—148. (in Chinese with English abstract)
- [74] 刘楠, 苏璞, 高志贤, 等. 用于氯霉素、克伦特罗和雌二醇三种兽药残留检测的高通量悬浮芯片技术研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2009, 43(6): 482—488.
- Liu Nan, Su Pu, Gao Zhixian, et al. Development of a high-throughput suspension microarray technology for detection of three kinds of veterinary drug residues: chloramphenicol, clenbuterol and 17-beta-estradiol[J]. *Chinese J Preventive Medicine*, 2009, 43(6): 482—488. (in Chinese with English abstract)
- [75] Haughey SA, Baxter GA. Biosensor screening for veterinary drug residues in foodstuffs[J]. *J AOAC*, 2006, 89(3): 862—867.
- [76] 魏星华, 闵成军, 凡强胜, 等. 利用 SPR 生物传感器检测盐酸克伦特罗[J]. *肉类工业*, 2013, 382(2): 38—41.
- Wei Xinghua, Min Chengjun, Fan Qiangsheng, et al. Application of SPR biosensor in clenbuterol hydrochloride determination[J]. *Meat Industry*, 2013, 382(2): 38—41. (in Chinese with English abstract)
- [77] 李辉, 蔡浩原, 陈兴, 等. 表面等离子体共振生物传感器连续检测莱克多巴胺[J]. *分析化学*, 2010, 38(3): 381—384.
- Li Hui, Cai Haoyuan, Chen Xing, et al. Continuous detection method for ractopamine with surface plasmon resonance biosensor[J]. *Chinese J Analytical Chemistry*, 2010, 38(3): 381—384. (in Chinese with English abstract)
- [78] 鲍蕾, 许艳丽, 梁成珠, 等. 表面等离子共振生物传感器在食品检测中的应用[J]. *检验检疫学刊*, 2012, 22(4): 73—76, 45.
- Bao Lei, Xu Yanli, Liang Chengzhu, et al. The application of surface plasmon resonance biosensor in food detection[J]. *J Inspection and Quarantine*, 2012, 22(4): 73—76, 45. (in Chinese with English abstract)
- [79] 孟邵华, 高丽娟, 罗马慧, 等. 生物传感器在食品安全中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(9): 197—200.
- Meng Shaohua, Gao Lijuan, Luo Mahui, et al. The application of biosensors in food safety[J]. *Food Research And Development*, 2012, 33(9): 197—200. (in Chinese with English abstract)
- [80] 罗进, 耿萌辉, 钱力, 等. 表面等离子体共振技术测定肉类食品中泰乐菌素和磺胺类药物残留量[J]. *理化检验: 化学分册*, 2011, 47(4): 383—386.
- Luo Jin, Geng Menghui, Qian Li, et al. Determination of residual amounts of tylosin and sulfonamides in meat by surface plasma resonance technology[J]. *PTCA (Part B: Chem Anal*, 2011, 47(4): 383—386. (in Chinese with English abstract)
- [81] Keegan J, O'Kennedy R, Crooks S, et al. Detection of benzimidazole carbamates and amino metabolites in liver by surface plasmon resonance-biosensor[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 700(1/2): 41—48.
- [82] Keegan J, Whelan M, Danaher M, et al. Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 654(2): 111—119.
- [83] 石婷, 刘瑾, 张婉洁, 等. 基于 SPR 生物传感器的抗生素残留检测及影响因素分析[J]. *天津大学学报*, 2010, 43(3): 255—261.
- Shi Ting, Liu Jin, Zhang Wanjie, et al. Analysis of influencing factors on detection of antibiotics residues based on surface plasmon resonance biosensor[J]. *J Tianjin University*, 2010, 43(3): 255—261. (in Chinese with English abstract)
- [84] 黄怡淳, 丁炜炜, 张卓旻, 等. 食品安全分析样品前处理-快速检测联用方法研究进展[J]. *色谱*, 2013, 31(7): 613—619.
- Huang Yichun, Ding Weiwei, Zhang Zhuomin, et al. Development of sample pretreatment techniques-rapid detection coupling methods for food security analysis[J]. *Chinese J Chromatography*, 2013 31(7): 613—619. (in Chinese with English abstract)
- [85] Zhang H, Zhang Y, Wang S. Development of flow-through and dip-stick immunoassays for screening of sulfonamide residues[J]. *J Immunol Methods*, 2008, 337(1): 1—6.
- [86] 韩静, 刘恩梅, 王帅, 等. 胶体金免疫层析法检测食品中的磺胺类药物残留[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(5): 603—606, 539.
- Han Jing, Liu Enmei, Wang Shuai, et al. Detection of sulfonamides residues in food by colloidal gold immunochromatographic method[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(5): 603—606, 539. (in Chinese with English abstract)
- [87] Yuan M, Sheng W, Zhang Y, et al. A gel-based visual immunoassay for non-instrumental detection of chloramphenicol in food samples[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 751: 128—134.
- [88] 张燕, 王玮, 刘俊伟, 等. 免疫胶体金法快速检测动物源性食品中氯霉素残留的研究[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(1): 196—199.
- Zhang Yan, Wang Wei, Liu Junwei, et al. Study on the colloidal gold-based immunoassays for the rapid detection of chloramphenicol residues in animal derived food[J]. *J Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2009, 9(1): 196—199. (in Chinese with English abstract)

High-throughput and fast analysis detection technology of veterinary drug residues in food products of animal origin

Sun Xingquan, Dong Zhenlin, Li Yichen, Dai Di, Su Mingming, Cao Jijuan^{*}

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

Abstract: With the rapid development of animal culture, the increasing problem of veterinary drug residues in food products of animal origin has become an important content in the field of food safety. Some problems existed in the traditional sample pretreatment and test methods in animal origin food, which contains complex matrix and trace veterinary drug residues, such as single sample matrix type, limited veterinary drugs, time consumption, poor reproducibility, etc. and mostly, lack of generality and accuracy. Therefore, those methods could no longer meet the needs of the current social development. In recent years, with the applications of the QuChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe) method and high resolution mass spectrometry (HRMS) in the field of the detection and analysis of veterinary drug residues in animal origin food, a batch of high-throughput, automation and visualization advanced sample preparation and detection technology has appeared and become a fast and efficient analysis method. In this paper, the high-throughput and fast sample preparation and detection methods are introduced and the detection and monitoring work of veterinary drug residues in food products of animal origin are suggested and prospected. The QuEChERS method, the Japanese simultaneous determination method of residual veterinary drugs, and column switching techniques coupled to liquid chromatography and/or mass spectrometry were mainly presented at the sample pretreatment part. Besides biochip, biosensor, and visual fast testing techniques, high-resolution mass spectrometry relative detection techniques were presented at the instrumental analysis part. These techniques include time-of-flight mass spectrometry (TOF MS), orbitrap mass spectrometry (orbitrap MS), which is a kind of Fourier transform mass spectrometry (FTMS), and direct analysis in real time mass spectrometry (DART MS), which belongs to ambient mass spectrometry (AMS) and allows the in situ, real-time, online, high throughput, and low sample-consumption analysis to be performed with no or minimal sample pretreatment. At the same time, some shortcomings of the methods and technology mentioned above were pointed out, such as there are some promoting space relating to purification in the QuChERS method which exists matrix effective, some veterinary drugs library of high resolution mass spectrometry should be established according to the dissociation of relative reference materials (RM) by users themselves, and the analysis range of biochip, biosensor and visual fast testing techniques is relatively narrow, etc. Although the high-throughput and fast test mode is cool, to implement some preventing and control measures, which relates to chemical management, environmental surveillance, and procedure control, is the key to solving the veterinary drug residues problems.

Key words: food products; animals; purification; high-throughput; fast analysis; detection; veterinary drug residue

(责任编辑: 刘丽英)