液相色谱-串联质谱结合谱库检索测定猪组织中的 9 种 β -兴奋剂残留量

蔡勤仁^{1*}, 吴洁珊¹, 钱振杰¹, 彭玉芬¹, 蔡 杰¹, 杜志峰²

(1. 珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东 珠海 519015; 2. 爱博才思亚太应用支持中心, 上海 200233)

摘要:建立了猪组织中 9 种 β -兴奋剂(克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、利托君、特布他林、班布特罗、妥布特罗、西马特罗和异舒普林)多残留的液相色谱-四极杆/线性离子阱串联质谱(QTrap LC-MS/MS)检测方法。样品经 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶酶解提取,液液萃取净化,以乙腈-甲酸水溶液为流动相,经 C_{18} 柱分离后用 QTrap LC-MS/MS 进行多反应监测(MRM)、信息相关采集(IDA)、增强子离子扫描(EPI)和谱库检索分析。9 种 β -兴奋剂的线性范围为 0.1 ~ 50.0 $\mu\text{g/L}$,线性关系良好($r > 0.99$);样品中 9 种目标物在 0.5、1.0 和 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下的回收率为 72.0% ~ 95.1%,相对标准偏差为 3.1% ~ 12.1%;方法检出限为 0.1 ~ 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 。实际样品检测结果表明,本方法可实现猪组织样本中 β -兴奋剂残留量的灵敏、准确的定性和定量分析。

关键词:液相色谱-串联质谱;谱库; β -兴奋剂;猪组织

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2013)03-0200-06

Determination of nine β -agonist residues in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combining with library search

CAI Qinren^{1*}, WU Jieshan¹, QIAN Zhenjie¹, PENG Yufen¹, CAI Jie¹, DU Zhifeng²

(1. Technical Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China;

2. AB SCIEX Asia Pacific Application Support Center, Shanghai 200233, China)

Abstract: A new method has been developed using a hybrid triple-quadrupole linear ion trap (QTrap) mass spectrometer for the fast detection and identification of nine β -agonists, clenbuterol, salbutamol, ractopamine, ritodrine, terbutaline, isoxsuprine, tulobuterol, cimaterol and bambuterol, in one single liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis. The homogenized tissue samples were purified with liquid-liquid extraction after enzymatic hydrolysis by β -glucuronidase/aryl sulfatase. After gradient elution separation on C_{18} LC column using acetonitrile and formic acid aqueous solution as the mobile phases, a multiple reaction monitoring (MRM) scan as survey scan and an enhanced product ion (EPI) scan as dependent scan were performed in an information dependent acquisition (IDA) experiment. Finally, the identification of the drugs was carried out by library search with a newly developed MS/MS library based on EPI spectra at three different collision energies in positive mode. The analytical method in the present study was well validated and good results were obtained with respect to precision, repeatability and spiked recovery. The limits of detection of residues were 0.1 ~ 0.2 $\mu\text{g/kg}$ for β -agonists, and with a linear range from 0.1 to 50.0 $\mu\text{g/L}$. Three concentration levels of 0.5, 1.0 and 5.0 $\mu\text{g/kg}$ were spiked in pig tissues, and the overall recoveries were between 72.0% and 95.1% with the relative standard deviations (RSDs) between 3.1% and 12.1%. The real sample test showed that this method could be used for sensitive and accurate determination of β -agonist residues in pig tissues.

* 通讯联系人. E-mail:mr. cai@vip.163.com.

基金项目:国家质检总局科技项目(2009IK156).

收稿日期:2012-11-15

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); spectral library; β -agonists; pig tissue

β -兴奋剂(β -agonists)是一类与肾上腺素受体结合,产生肾上腺素样作用的药物的总称。这类药物可以使多种动物(牛、猪、羊、家禽)体内的营养成分由脂肪组织向肌肉组织转移,称为“营养再分配效应”,能显著地提高酮体的瘦肉率^[1]。20世纪80年代以来 β -兴奋剂被大量非法用于畜牧生产,但如果使用剂量过大,则会对动物和人(间接)的健康产生相当大的毒害作用^[2,3]。鉴于 β -兴奋剂类药物在动物源食品中存在的安全隐患,欧盟、日本、韩国等国家都规定禁止进出口含有此类药物的肉制品,欧盟于1996年禁止在畜牧生产中使用该类药(EC Directive 96/22/EC),我国农业部在2002年农牧发[2002]1号文件中明确规定克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺为禁用药物。 β -兴奋剂的检测方法主要有酶联免疫法^[4]、液相色谱法^[5]、气相色谱-质谱法^[6]和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[7-10]等,目前常用的检测方法是LC-MS/MS。

欧盟发布的2002/657/EC法规是药物残留分析的基础,该法规规定LC-MS/MS用于禁用药物的确证必须同时满足4个确证点(identification points)、保留时间(retention time)和离子比例(ion ratio)的要求^[11]。随着研究的不断深入,特别是不少假阴性案例的出现,该法规受到了不少学者的质疑和挑战。Stolker等^[12](2002年)和Kushnir等^[13](2005年)对LC-MS/MS分析确证时的离子比例做了统计学分析,结果表明凡是满足2002/657/EC法规要求的阳性样品其假阳性率为零,但未说明不满足2002/657/EC法规要求的假阴性率等情况。Kaufmann等^[14](2009年)在一次能力验证中发现麻保沙星的离子比例偏离了标准很多,他们在其他氟喹诺酮类药物中重复了该试验,研究结果表明,由于基质干扰等因素导致离子比例出现偏差从而产生假阴性结果。因此,如何更好地完善法规来有效避免假阳性或假阴性结果就显得尤其重要。LC-MS/MS在做多反应监测(MRM)时只能获得化合物的保留时间、峰高、峰面积、离子比率等信息而无法获得更多的二级结构信息,液相色谱-四极杆/线性离子阱串联质谱技术(QTrap LC-MS/MS)则提供了这种可能。QTrap LC-MS/MS技术采用MRM→信息相关采集(IDA)→增强子离子扫描(EPI)→谱库检索模式^[15-20],该模式的原理为:当MRM信号超过IDA设定的阈值时,MRM与EPI交替进行,因而既得到了MRM的信息也得到了EPI二级碎片

全谱信息,结合谱库检索能实现同时定性和定量。本研究选择9种常见的 β -兴奋剂作为研究对象,并利用谱库检索建立了猪组织中9种 β -兴奋剂的LC-MS/MS检测方法,该方法快速、准确,能有效排除基质的干扰,非常适合 β -兴奋剂的确证分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Shimadzu UFLC-XR 高效液相色谱仪, API 5500 Q-Trap 三重四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源;JOUAN MR23i 离心机;Zymark TurboVap[®] LV 浓缩站;恒温水浴振荡器等实验室常用设备。

克伦特罗(clenbuterol, 98.5%)、莱克多巴胺(ractopamine, 99.0%)、沙丁胺醇(salbutamol, 98.5%)、利托君(ritodrine, 99.5%)、特布他林(terbutaline, 98.0%)、班布特罗(bambuterol, 97.5%)、异舒普林(isoxsuprine, 98.5%)、妥布特罗(tulobuterol, 99.0%)、西马特罗(cimaterol, 99.5%)标准品,购于Sigma公司。用少量乙腈溶解,用色谱纯甲醇配制1 g/L标准储备液,再根据需要用含0.1% (v/v)甲酸及40% (v/v)乙腈的水溶液稀释成适当含量的标准工作液,4℃下保存,有效期为2个月。乙酸铵、乙腈均为色谱纯, β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶购自Sigma;所用试剂除注明外均为分析纯,水为超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱:Agela-Venusil MP C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 3 μ m);流动相:溶剂A是含0.1% (v/v,下同)甲酸及5% (v/v,下同)乙腈的水溶液,溶剂B是含0.1%甲酸及95%乙腈的水溶液,梯度洗脱,在0至12 min内溶剂A的体积分数从60%线性减少到10%,然后保持2 min,在14.1 min时溶剂A的体积分数变化至60%并平衡6 min,流速0.25 mL/min;柱温35℃;进样量5 μ L。

1.3 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);雾化气流速50 mL/min,气帘气流速30 mL/min,辅助加热气流速50 L/min,辅助加热气温度550℃,碰撞气流速5 mL/min,4种气体均为氮气;Q1和Q3均为单位分辨率;去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能(collision energy, CE)等质谱参数见表1。当MRM信号大于IDA设定的阈值2000 cps时同时启动线性离子阱的EPI功能。EPI扫描参数:扫描

范围 50 ~ 500 Da,扫描速率 20 000 Da/s;离子阱填充时间:1.00 ms;离子阱扫描步长:0.12 Da;动态排除时间:60 s。

表 1 9 种 β -兴奋剂的部分质谱参数
Table 1 Part of the parameters of MS/MS analysis for nine β -agonists

Analyte	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>) (CE/eV)	DP/eV
Clenbuterol	277.0	203.0* (24), 168.1 (41)	100
Ractopamine	302.2	164.1* (23), 284.1 (19)	100
Salbutamol	240.2	166.1 (19), 148.1* (25)	100
Ritodrine	288.2	121.0* (30), 270.1 (18)	100
Terbutaline	226.2	152.0* (22), 170.1 (16)	100
Bambuterol	368.2	312.1 (20), 294.2* (27)	110
Isoxsuprine	302.2	107.0* (35), 284.2 (21)	100
Tulobuterol	228.1	154.1* (23), 172.1 (18)	50
Cimaterol	220.2	160.1* (23), 202.1 (14)	110

* The ion was used for quantification. CE: collision energy. DP: declustering potential.

1.4 LC-MS/MS 谱库

分别用高、中、低 3 种碰撞能量对 9 种 β -兴奋剂进行 EPI 扫描,并用 Microsoft Office Access 软件编写 9 种 β -兴奋剂的液相色谱-串联质谱数据库,包括分子式、相对分子质量、CAS 编号、化学名、结构图等。

1.5 样品处理

猪肉、猪肝和猪肾等样品均购自市场。称取 2.0 g 经绞碎均匀的组织样品(肌肉、肝脏和肾脏)于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 醋酸缓冲液(pH 5.2),匀质 20 s,加入 50 μ L β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶液,在 37 $^{\circ}$ C 水浴中水解 16 h 后取出冷却,加入 10 mL 0.2 mol/L 高氯酸-甲醇(9:1, v/v)旋涡振荡 5 min,以 6 500 r/min 离心 5 min,将上清液转移至 50 mL 聚丙烯酰胺离心管中,残渣再以 5 mL 0.2 mol/L 高氯酸-甲醇清洗,合并上清液。以饱和 NaOH 调节溶液 pH 至 9.5 $\pm$ 0.5 并以 NaCl 饱和和水相。加入 10 mL 乙酸乙酯-异丙醇(6:4, v/v),振荡提取 15 min。以 5 000 r/min 离心 5 min,将上层有机相转移至玻璃试管中;水相再以 10 mL 乙酸乙酯-异丙醇(6:4, v/v)、10 mL 叔丁基甲醚分别提取一次,合并有机相,吹干。准确加入 2 mL 0.1% 甲酸-甲醇(9:1, v/v),旋涡混匀 15 s,以 3 mL 正己烷脱脂两次,弃去正己烷层,下层清液过 0.22 μ m 滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

1.6 检测模式

采用 MRM $\rightarrow$ IDA $\rightarrow$ EPI $\rightarrow$ 谱库检索模式。待测样液进入质谱系统后,首先进行 MRM 扫描,当 MRM 信号低于 IDA 设定的阈值 2 000 cps 时,只进

行 MRM 扫描;当 MRM 信号超过 IDA 设定的阈值 2 000 cps 时,MRM 与 EPI 交替进行。最后将获得的 EPI 图谱与已经建立好的标准谱库进行比对检索,同时进行定性和定量分析。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法

β -兴奋剂类药物在机体内经过吸收、转化、代谢后终产物主要以原型药和轭合物形式(主要包括硫酸轭合物和葡萄糖醛酸轭合物)存在,通常使用酶对组织成分进行水解,使药物游离或者释放出来,以促进溶剂提取^[8,9]。由于 β -兴奋剂类药物多数为中等极性物质,而且苯胺类呈弱碱性而苯酚类多呈酸碱两性,在酸性条件下它们均以离子态存在,易溶于水,适合用酸性溶液提取;本实验采用 0.2 mol/L 高氯酸作为提取溶剂获得了较高的提取效率并能有效地沉淀蛋白;由于所有的 β -兴奋剂类药物结构中都含有疏水结构,故在高氯酸中添加 10% 甲醇,可以进一步提高回收率。

β -兴奋剂类药物在碱性条件下都易溶于有机溶剂,但是不同的 pH 值对萃取效率的影响很大^[10]。本实验中测定了在 7.0 ~ 14.0 之间 8 种不同的 pH 值缓冲体系下的萃取效应。结果表明:对于苯胺类药物克伦特罗,当 pH 值处于 8 ~ 11 之间时,萃取效率都可以达到 80% 以上;而对于沙丁胺醇、特布他林等苯酚类药物来说,只有在 pH 9 ~ 10 之间才能达到 80% 的最佳萃取效应。因此选择 pH 9.5 左右的缓冲体系进行液液萃取。

2.2 色谱条件的选择

由于 β -兴奋剂类药物属于极性化合物,大多数化合物含有羟基(-OH),这些化合物在很多色谱柱上表现出保留时间无规则地漂移,这些色谱柱包括 XBridge、Atlantis dC₁₈、Phenomenex Luna C₁₈ 以及 Shim-Pack VP-ODS 等。本研究同时考察了 Agilent Rx-Sil 硅胶柱和 Waters Atlantis HILIC 柱等亲水色谱(HILIC)柱的分离效果,结果发现大多数化合物很难获得理想的峰形。Agela-Venusil MP C₁₈ 是一款中等极性 C₁₈ 柱,适用于中等 pH(1.5 ~ 8.5),无需添加离子对试剂就能将 9 种 β -兴奋剂分离,研究表明,当流动相含 0.1% 甲酸时,化合物的峰形能得到进一步改善。综合考虑上述因素,故用 Agela-Venusil MP C₁₈(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3 μ m)色谱柱,选择 0.1% 甲酸与乙腈(含 0.1% 甲酸)作为流动相,梯度洗脱,能完全将 9 种 β -兴奋剂很好的保留和分离(见图 1)。

图 1 空白猪肉样品中添加 1 $\mu\text{g/kg}$ 9 种 β -兴奋剂的重构离子色谱图
Fig. 1 Reconstituted ion chromatograms of the nine β -agonists in blank pig muscle spiked at 1 $\mu\text{g/kg}$

2.3 谱库检索与应用

用蠕动泵以 5 $\mu\text{L/min}$ 的流速连续注射,分别将 9 种 0.5 mg/L 的 β -兴奋剂药物标准溶液注入 ESI 离子源中,在正离子检测方式下进行一级质谱扫描,得到准分子离子 $[M + H]^+$ 峰,优化去簇电压并对准分子离子峰进行子离子扫描,得到碎片离子信息;优化 MRM 离子对碰撞能和其他质谱参数,结果见表 1。为了同时实现定性和定量的要求,本研究采用了 MRM→IDA→EPI→谱库检索的模式,利用 QTrap 的线性离子阱功能,在 MRM 获得化合物的保留时间、峰高、峰面积、离子比率等信息的同时,通过 EPI 扫描获得一张二级质谱图,并可使用已经建立好的谱库进行检索,这对化合物的结构确认有很大帮助。经计算,空白基质添加样品中各 β -兴奋剂的 EPI 谱图对标准工作液和对基质标准工作液中各 β -兴奋剂的 EPI 谱图的 Fit 值(匹配值)无明显差别,因此实验确定以标准工作液为参照,Fit 阈值为 85,样品中各 β -兴奋剂的 EPI 谱图 Fit 值超过 85 即可作为确证分析的有效判据,Fit 值低于 50 可判为阴性^[18]。实际样品检测谱图见图 2~图 5。图 2

为阳性可疑猪肝样品的 MRM 图,图 3 是在保留时间 5.37 min 处用 3 种碰撞能量做 EPI 扫描后获得的该阳性可疑样品的 EPI 谱图与本文建立的 LC-MS/MS 谱库中克伦特罗的 EPI 谱图进行比较的结果,表 2 为谱库检索的结果,其中 Fit 值是用标准物质谱图与该可疑样品谱图进行对比后获得的相似度值,满分为 100,Fit 值越高说明该化合物的可能性越大;RevFit 值(反相匹配值)是用可疑样品谱图与标准物质谱图进行对比后获得的相似度值;Purity 值(纯度值)是综合前两种结果得出的数值。检索结果按 Fit 值从大到小排序,从表 2 可明显得出可疑阳性样品就是克伦特罗阳性的结论(Fit 值为 92.21,实测含量为 2.3 $\mu\text{g/kg}$)。图 4 也是一个阳性可疑猪肝样品,该样品 MRM 图谱的离子比例符合要求,保留时间为 5.51 min 也在 2002/657/EC 法规规定 2.5% 偏差的边缘(偏离标准 5.37 min 约 2.6%),用标准曲线定量为 0.32 $\mu\text{g/kg}$;图 5 是在保留时间 5.51 min 处用 3 种碰撞能量做 EPI 扫描后获得的该阳性可疑样品的 EPI 谱图与本文建立的 LC-MS/MS 谱库中克伦特罗的 EPI 谱图进行比较

的结果,表 3 为谱库检索的结果,Fit 值为 28.06,远低于设定的阈值,因此该样品是个阴性样品。

图 2 阳性可疑样品 1 的重构离子色谱图
Fig. 2 Reconstituted ion chromatogram of doubtful positive sample 1

图 3 阳性可疑样品 1 的 EPI 谱图与谱库中克伦特罗标准谱图的对比
Fig. 3 Comparison of EPI spectrum of doubtful positive sample 1 and library spectrum of clenbuterol

表 2 阳性可疑样品 1 的谱库检索结果

Table 2 Results of library search of doubtful positive sample 1					
Name	Formula	Fit	RevFit	Purity	CE/eV
Clenbuterol	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O	92.21	92.64	87.61	35
Salbutamol	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	10.62	4.56	1.12	35

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系和检出限

将 9 种 β -兴奋剂混合标准储备液用空白组织(猪肝)提取液依次稀释成 0.1 ~ 50.0 $\mu\text{g/L}$ 系列浓度,按 1.6 节方法测定。将测得的各种 β -兴奋剂

图 4 阳性可疑样品 2 的重构离子色谱图
Fig. 4 Reconstituted ion chromatogram of doubtful positive sample 2

图 5 阳性可疑样品 2 的 EPI 谱图与谱库中克伦特罗标准谱图的对比
Fig. 5 Comparison of EPI spectrum of doubtful positive sample 2 and library spectrum of clenbuterol

表 3 阳性可疑样品 2 的谱库检索结果

Table 3 Results of library search of doubtful positive sample 2					
Name	Formula	Fit	RevFit	Purity	CE/eV
Clenbuterol	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O	28.06	38.52	21.52	35
Isoxsuprine	C ₁₈ H ₂₄ ClNO ₃	8.18	4.73	0.79	35

药物峰面积的平均值(y)与所对应的药物浓度(x)做线性回归,外标法定量,求得标准曲线的回归方程和相关系数(r)。本方法 9 种 β -兴奋剂的线性范围为 0.1 ~ 50.0 $\mu\text{g/L}$,线性关系良好($r > 0.99$)。检出限(LOD)以在空白组织中添加 9 种 β -兴奋剂时 MRM 离子对信噪比 ≥ 3 时的添加浓度确定,定量限

(LOQ)以在空白组织中添加 9 种 β -兴奋剂时 MRM 离子对信噪比 ≥ 10 时的添加浓度确定。9 种 β -兴奋剂的线性方程、检出限和定量限见表 4。

表 4 方法的线性方程、检出限和定量限				
Table 4 Regression equations, limits of detection and limits of quantification of the method				
Analyte	Regression equation	<i>r</i>	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)
Clenbuterol	$y = 1415x + 167$	0.9926	0.10	0.32
Ractopamine	$y = 628x - 28$	0.9917	0.15	0.53
Salbutamol	$y = 1217x + 134$	0.9936	0.22	0.64
Ritodrine	$y = 786x + 136$	0.9902	0.12	0.32
Terbutaline	$y = 3457x + 338$	0.9976	0.15	0.54
Bambuterol	$y = 2415x - 345$	0.9948	0.15	0.34
Isoxsuprine	$y = 629x - 75$	0.9957	0.11	0.32
Tulobuterol	$y = 1125x - 125$	0.9945	0.15	0.53
Cimaterol	$y = 725x - 45$	0.9991	0.21	0.62

y: peak area; *x*: mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

2.4.2 回收率和精密度

本研究分别选用空白猪肉、猪肝和猪肾基质,在 0.5、1.0 和 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 3 个含量水平上进行添加,每个水平 6 个试样(每种基质 2 个平行样品),其平均回收率和相对标准偏差(RSD)结果见表 5, 9 种 β -

表 5 猪组织中 9 种 β -兴奋剂的加标回收率及精密度($n = 6$)			
Table 5 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of the nine β -agonists spiked in blank pig tissues ($n = 6$)			
Analyte	Spiked/($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/%	RSD/%
Clenbuterol	0.5	85.3	5.2
	1.0	92.1	4.3
	5.0	95.1	3.1
Ractopamine	0.5	82.1	6.7
	1.0	85.2	5.3
	5.0	92.1	3.6
Salbutamol	0.5	72.0	11.4
	1.0	75.1	12.1
	5.0	82.0	8.6
Ritodrine	0.5	83.6	7.3
	1.0	82.5	6.5
	5.0	91.2	6.2
Terbutaline	0.5	72.5	10.5
	1.0	77.4	8.6
	5.0	79.5	5.3
Bambuterol	0.5	78.5	8.5
	1.0	82.4	6.4
	5.0	88.5	4.3
Isoxsuprine	0.5	85.3	5.3
	1.0	87.5	4.5
	5.0	94.6	4.1
Tulobuterol	0.5	73.0	9.8
	1.0	75.4	8.6
	5.0	81.3	6.3
Cimaterol	0.5	80.5	6.3
	1.0	82.2	5.4
	5.0	85.4	3.6

兴奋剂的平均回收率为 72.0% ~ 95.1%, RSD $\leq$ 12.1%,显示本方法用于猪组织中目标物的检测有很好的准确度和重复性。

3 结论

建立了测定猪组织中 9 种 β -兴奋剂的高效液相色谱-电喷雾质谱多残留检测方法。该方法采用 MRM $\rightarrow$ IDA $\rightarrow$ EPI $\rightarrow$ 谱库检索模式,能同时实现定性和定量分析。方法检出限等指标满足国内外对 β -兴奋剂类药物检测的相关要求^[11]。该方法快速、准确,能有效排除基质的干扰,非常适合 β -兴奋剂的确证分析。

参考文献:

[1] Yang Y T, McElligott M A. Biochem J, 1989, 261(1): 1

[2] Prather I D, Brown D E, North P, et al. Med Sci Sports Exerc, 1995, 27(8): 1118

[3] Pulce C, Lamaison D, Keck G, et al. Vet Hum Toxicol, 1991, 33(5): 480

[4] Shelver W L, Smith D J. J Agric Food Chem, 2004, 52(8): 2159

[5] Liu B, Yan H, Qiao F, et al. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(1): 90

[6] Bocca B, Fiori M, Cartoni C, et al. J AOAC Int, 2003, 86(1): 8

[7] Williams L D, Churchwell M I, Doerge D R. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 813: 35

[8] Fesser A C, Dickson L C, MacNeil J D, et al. J AOAC Int, 2005, 88(1): 61

[9] Juan C, Igualada C, Moragues F, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217(39): 6061

[10] Garcia P, Paris AC, Gil J, et al. Biomed Chromatogr, 2011, 25(1): 147

[11] Commission Decision 2002/657/EC. Off J Eur Commun, 2002, L221: 8

[12] Stolker A A, Zootjes P W, Schwillens P L, et al. Analyst, 2002, 127(6): 748

[13] Kushnir M M, Rockwood A L, Nelson G L, et al. Clin Biochem, 2005, 38(4): 319

[14] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009, 23(7): 985

[15] Chen Y, Zhao L, Lu F, et al. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2009, 26(5): 595

[16] Cai Q R, Zeng Z L, Feng J W, et al. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society (蔡勤仁, 曾振灵, 冯家望, 等. 质谱学报), 2010, 31(5): 277

[17] Dresen S, Ferreirós N, Gnann H, et al. Anal Bioanal Chem, 2010, 396(7): 2425

[18] Viette V, Guillaume D, Mylonas R, et al. Clin Biochem, 2011, 44(1): 45

[19] Cai Q R, Feng J W, Zhang Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (蔡勤仁, 冯家望, 张毅, 等. 色谱), 2011, 29(8): 712

[20] Zhang H W, Cai X, Lin L M, et al. Chinese Journal of Chromatography (张鸿伟, 蔡雪, 林黎明, 等. 色谱), 2012, 30(10): 991