

基于液相色谱-多级多反应监测模式(LC-MRM³)的高灵敏定量分析新策略

李婷^{1,2}, 张珂^{1,2}, 李军^{1,2}, 王胜鹏^{3*}, 宋月林^{1**}

(¹北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 102488; ²北京中医药大学中药学院, 北京 102488;

³澳门大学中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078)

摘要 液相色谱多级质谱联用(LC-MS/MS)的多反应监测模式(multiple-reaction monitoring, MRM)已经成为复杂体系中多成分同步定量分析的金标准,广泛应用于药品、中药、食品等各个领域。然而,由于选择性的限制,在对复杂基质中痕量化学成分定量时,MRM无法有效降低噪音或基质干扰,灵敏度不足。多级多反应监测模式(multiple-reaction monitoring cubed, MRM³)是对碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)产生的子离子碎片进行富集并再次裂解,检测其孙离子碎片信号。通过多次离子筛选,显著提升了选择性和灵敏度,因此LC-MRM³得到了广泛关注。本文针对该方法的原理、参数设置及在生物标志物分析、药物分析、法医和毒物分析、食品分析和环境分析等领域中的应用进行介绍和系统综述,为利用LC-MRM³实现复杂基质中痕量化学成分的定量分析提供参考。

关键词 MRM³; 定量分析; 复杂基质; 灵敏度; LC-MS/MS

中图分类号 R917; O657.63 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)06-0718-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023062801

引用本文 李婷, 张珂, 李军, 等. 基于液相色谱-多级多反应监测模式(LC-MRM³)的高灵敏定量分析新策略[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(6): 718 - 728.

Cite this article as: LI Ting, ZHANG Ke, LI Jun, *et al.* An emerging analytical tool for highly sensitive quantitative analysis based on liquid chromatography-multiple-reaction monitoring cubed (MRM³)[J]. *J China Pharm Univ*, 2023, 54(6): 718 - 728.

An emerging analytical tool for highly sensitive quantitative analysis based on liquid chromatography-multiple-reaction monitoring cubed (MRM³)

LI Ting^{1,2}, ZHANG Ke^{1,2}, LI Jun^{1,2}, WANG Shengpeng^{3*}, SONG Yuelin^{1**}

¹Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; ²School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; ³State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, University of Macau, Macao 999078, China

Abstract Liquid chromatography-multiple-reaction monitoring (LC-MRM) has been widely recognized as the golden standard for multiple components-targeted quantitative analysis of complicated matrices, with extensive applications for analysis in such fields as chemical drugs, traditional Chinese medicines and foods. Unfortunately, when facing the task of quantitatively analyzing trace chemical components in complex matrices, MRM suffers dramatically from the background noise or matrix interference, leading to undesirable sensitivity and selectivity in terms of the lower limits of quantification (LOQ) and detection (LOD). In recent years, MRM cubed (MRM³), also known as MS³ scan, has received much attention because of its unique ability to significantly improve detection selectivity and sensitivity attributing to the successive ion filtering function, enabling LC-MRM³ as an emerging analytical tool. In this review, our attention is devoted to: 1) the illustration of the principle for MRM³;

收稿日期 2023-06-28 通信作者 *Tel: 0853-88228559 E-mail: swang@um.edu.mo

**Tel: 8610-64286100 E-mail: syltwe2005@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81973444); 中药质量研究国家重点实验室(澳门大学)开放课题资助项目(No. SKL-QR-CM-OP21011)

2) parameter settings; and 3) the application progress of LC-MRM³ in such fields as the pursuit of biomarkers, pharmaceutical analysis, forensic analysis, toxicological analysis, food chemistry, and environmental analysis, aiming to provide a promising analytical tool of LC-MRM³ advantageous in the quantification analysis of trace chemical components in complex matrices.

Key words MRM³; quantitative analysis; complex matrices; sensitivity; LC-MS/MS

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81973444) and the Open Research Project Programme of the State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine (University of Macau) (No. SKL-QRCM-OP21011)

近年来,由于其高灵敏度、高特异性、高效分离等优势,液相色谱多级质谱联用(LC-MS/MS)被广泛应用于生命科学、药物、食品科学和环境科学等领域的定性、定量分析中。尤其是超高效液相色谱(UHPLC)的快速发展,实现了在数分钟内单次分析数百个化合物,使得LC-MS/MS兼具高通量的优势。多反应监测模式(multiple-reaction monitoring, MRM)主要依靠三重四极杆质谱(QqQ-MS)实现。由于其重复性好、精密度和准确度高等优势,已经成为复杂基质中痕量化学成分分析的强有力工具。LC-MRM被认为是小分子定量分析的“金标准”^[1-3]。然而,在对生物样品、土壤、污水等高度复杂基质进行分析时,无法完全去除背景干扰,导致LC-MRM的灵敏度和选择性难以满足定量分析要求^[2,4-5]。为了弥补该缺陷,有学者提出了采用多个MRM离子对检测同一分析物,通过将多个离子对的信号强度加和提高灵敏度。由于采用了多个碎片离子,该方法也可用于分析物的确认^[6-7]。然而,对于存在强干扰的复杂基质,该方法依旧难以实现灵敏度的有效提升^[8]。

离子阱质谱(ion trap MS, IT-MS)具有离子聚焦、共振激发、共振弹射、多级碎裂等多种功能,可以实施多级质谱(MSⁿ)扫描,主要包含三维离子阱(3D IT-MS)和线性离子阱(linear ion trap MS, LIT-MS;又称二维离子阱)两种类型^[9]。其中,3D IT-MS可以通过多次的“冷却-激发”循环,理论上可以实现无限极质谱扫描,而LIT-MS只能实现单次的“冷却-激发”程序。相较于3D-IT MS, LIT-MS具有更大的捕获空间、更高的注入效率和更强的离子存储能力^[10-11]以及更小的空间电荷效应^[12-13]。四极杆-线性离子阱串联质谱(Qtrap-MS)通过对传统的三重四极杆质谱(QqQ-MS)进行改良,其最后一个质量分析器(Q3)可以在四极杆(Q)和LIT模式间快

速切换,同时具有多级串联质谱(MS³)分析和离子选择性富集能力,有效提高了去除背景噪音或杂质干扰的能力。

多级多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM³)在MS²扫描的基础上,通过前体离子→子离子→孙离子对目标化学成分进行检测。与MRM只进行两次离子筛选相比,MRM³对分析物产生的离子进行三次连续筛选,显著降低了背景噪音或杂质干扰,进而有效提升了灵敏度和选择性。作为一种新兴的定量技术,近年来,MRM³定量技术已被广泛应用于环境样品^[5]、生物样品^[14-15]等复杂基质中化学成分的定量分析。

鉴于LC-MRM³在定量分析中的独特优势,本文将从仪器原理、参数设置及其在生物标志物、药物、法医毒物、食品和环境等领域中的应用进行综述,并对其应用前景进行展望。

1 仪器原理

MSⁿ($n \geq 3$)扫描是IT-MS的特有扫描模式,而由于LIT在高离子储存能力及低空间电荷效应等方面的优势,LIT在定量分析中更为常用。通过二维的射频电压(radio frequency, RF)将离子径向限制,并利用施加在端电极上的停止电位进行轴向限制,前体离子在LIT中经历碰撞冷却,选择隔离,共振激发裂解等过程,产生的碎片离子从离子阱中轴向喷出并静电聚焦至检测器中被检测^[12,16-17]。前体离子在LIT中被共振激发并从RF中吸收能量,获得动能,与引入的碰撞气体发生碰撞并裂解产生子离子,然后可以进一步发生裂解或进行质量分析^[18]。Qtrap-MS结合了四极杆和LIT两种质量分析器的优势,具有MS³分析能力和离子选择性富集能力,可有效甄别目标信号和干扰信号。由于更高的灵敏度和选择性,Qtrap-MS在复杂基质

定量分析中的应用更为广泛。如图 1-A 所示,整个仪器主要由前端的一个纯射频电压(RF)的预四极杆(Q₀)和中间 3 个四极杆质量分析器(Q1, q2, Q3/LIT)组成^[16,19]。其中, Q3 既可以作为传统的直流/射频(RF/DC)分辨的四极杆质量分析器,也可以作为轴向射出的 LIT。当 Q3 作为 LIT 时,通过在 LIT 上施加射频(RF)电压将离子径向限制,并利用施加在短电极上的静止电位进行轴向限制,产生的子离子与残余的前体离子在压力较低(3×10^{-5} Torr)的 LIT 中被阱住(图 1-B)。在 MS³ 扫描模式下,前体离子通过 RF/DC 分辨的 Q1 四极杆,并加速进入 q2 碰撞池(压力约为 5×10^{-3} Torr)。在 q2 中以特定的碰撞能(collison energy, CE)发生碰撞诱导解离(collison induced dissociation, CID),产生的子离子进入 LIT 中被阱集,然后筛选目标子离子,以设定的激发能量(excitation energy, EE, 对应仪器参数 AF2)以共振激发的形式发生进一步 CID,产生的孙离子碎片被阱集,并做进一步筛选。由于在高真空区域中离子阱无法实现离子直接碰撞解离,使用脉冲阀技术向离子阱中短暂注入碰撞气体(如 N₂),从而实现更快、更有效的多级串联质谱分析^[20]。

采用 LC-MS³ 进行定量分析有两种方式:一种是以 MS³ 全扫描的形式扫描子离子在 LIT 中裂解产生的所有孙离子,并将其中一个或多个孙离子丰度的加和用于定量分析^[21-23]。另一种则是 MRM³ 扫描,依据感兴趣的孙离子设置窄质量扫描范围,在 MRM 设定的前体离子→子离子离子对基础上,增加孙离子信息,实现前体离子→子离子→孙离子 3 次连续筛选检测(图 1-C)。与 MRM 只进行两次离子筛选相比,MRM³ 显著降低了背景噪音或杂质干扰,进一步提高选择性、增强灵敏度,更适合复杂基质样品的分析。Campbell 等^[8]对比了 MRM, MS³ 和 MRM³(该研究称为 Scan-free MS³) 3 种扫描方式的定量分析能力,其中 MS³ 扫描的选择性比 MRM 更高,但循环时间通常比 MRM 长,而 MRM³ 扫描由于只采集预选的离子信号,相较于传统的 MS³ 分析可以减少约 35% 的循环时间,不会造成灵敏度损失,其性能与 MRM 和传统的 MS³ 相比更好。

MS³(MRM³)扫描激发效率高,扫描速度可达 20 kD/s。通过多次碎裂和筛选,对分析物的选择性增强、基线降低、信噪比提升,从而显著提升灵

敏度。

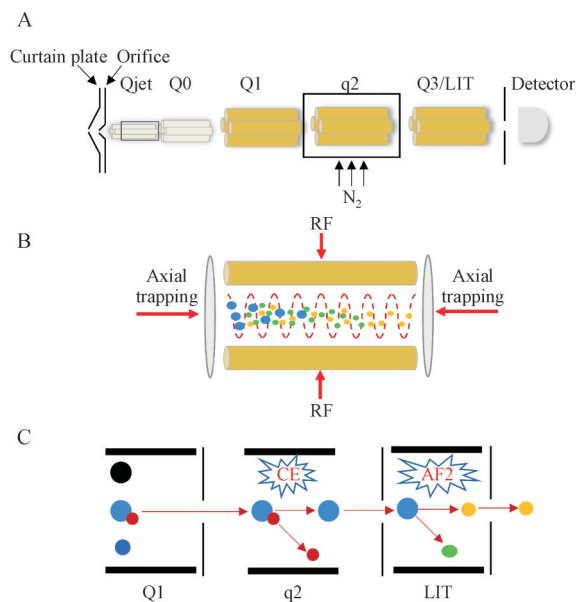


Figure 1 Schematic representation of the ion path of Qtrap-MS instrument (A), linear ion trap (B) and MRM³ scan mode (C)

2 MRM³扫描参数设置

通过相关参数优化,可以提高分析物 MRM³ 离子对的响应,增强方法的选择性和灵敏度。CE 和去簇电压(declustering potential, DP)是与一级 CID 产生子离子相关的参数;与 LIT 扫描相关的参数主要包括激发能量(EE, 对应仪器参数 AF2)、激发时间、LIT 填充时间、扫描速度等,这些参数与分析物的响应密切相关。

2.1 去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)

DP 控制 orifice 上的电压,从而控制 orifice 和 Qjet 之间离子的聚簇能力。DP 电压越高,传递给离子的能量就越高,适当的 DP 可以避免溶剂分子的吸附,但 DP 过高会引发源内裂解,导致目标化合物碎裂^[24]。CE 是导致母离子在 q2 中发生 CID 的参数。低 CE 值难以产生足够强度和种类丰富的子离子,而高 CE 值则常会导致目标子离子过度裂解为非目标碎片。因此,需对 DP 和 CE 进行优化以获得足够强度的目标子离子,从而增强 MRM³ 离子对的整体响应。针对 DP 和 CE,可以采用注射对照品的方式或者在线能量分辨质谱(online energy-resolved-MS, online ER-MS),采集不同 DP 和 CE 下离子对的响应,根据色谱峰面积或平均质谱响应进行参数优化^[25-27]。

2.2 激发能量(EE)

EE值描述了LIT对q₂碰撞产生的子离子施加的张力,对子离子的裂解效率影响最大^[19]。其优化步骤与CE类似,可以采用online ER-MS方法,通过采集不同EE下离子对信息,以色谱峰峰面积或平均质谱响应强度对EE值作高斯曲线拟合,曲线顶点即为最优EE值^[28]。

2.3 激发时间与LIT填充时间

激发时间即施加激发能量的时间。如果激发时间过短,离子在离子阱中无法充分裂解,碎片离子过少甚至无法产生碎片。反之,则碎片过多,影响目标子离子的产生。LIT填充时间为子离子在LIT中的累积时间,包括动态和固定填充时间两种设置方式。动态填充时间根据来自离子源的离子通量自动调节填充时间使碎片离子在离子阱中积累。一般而言,MRM³定量首选固定填充时间。一方面,固定的填充时间使每次分析的占空比完全相同,保证每个色谱峰的点数相同,从而具有更高的准确性和重现性。另一方面,当使用固定填充时间时,可以激活Q0捕获选项,进一步实现灵敏度的提升。在一定范围内,激发时间和LIT填充时间的增加,可以显著提高离子对的响应。然而,这种增长并非线性增长,在超过一定值后,化合物响应增强效果不再明显,反而会导致循环时间的延长。一个LC-MS色谱峰至少需要15~20个数据点方能实现准确定量分析^[29],而激发时间和LIT填充时间的增加则会减少每个色谱峰的数据点数,从而影响色谱峰峰形。因此,需要综合考虑信号改善和色谱峰数据点数进行参数优化,实现更好的定量分析效果。已有报道中,部分研究者将LIT填充时间和激发时间作为一个与化合物非相关的参数,在对所有化合物检测时均保持LIT填充时间和激发时间固定不变^[21,30]。然而,Lopukhov等^[31]在研究过程中注意到LIT填充时间和激发时间与化合物相关的现象,在增加LIT填充时间和激发时间的情况下,由于其他基质物质的共生聚集,分析物发生降解,因此需要对不同的分析物进行不同LIT填充时间和激发时间的优化。Guironnet等^[4]的研究也证实了这一现象,即对于MRM³扫描的每一个分析物,特别是在针对复杂基质中的化合物分析时,应对不同化合物的LIT填充时间和激发时间参数分别进行优化。

2.4 扫描速度

MRM³扫描速度也会影响循环时间和峰响应强度。扫描速度降低,响应增强,循环时间增加;反之,扫描速度增加,可以缩短循环时间,但可能伴随着色谱峰响应强度降低的发生。Sordet等^[30]针对分析物进行了3个扫描速度的优化,结果显示1 kD/s的速度大大延长了循环时间;20 kD/s的速度由于离子在脱离离子阱前没有时间被聚集和稳定,因此降低了分析物的响应强度;在最佳循环时间和响应强度之间的最适宜扫描速度为10 kD/s。

2.5 其他参数

前述可知,MRM³扫描通常循环时间较长,导致其同时监测多个化合物的能力较差。采用常规高效液相色谱(HPLC)与MRM³联用,为获得良好的色谱峰峰形,一个扫描周期内通常只能容纳10~12个MRM³离子对。在使用UHPLC时,色谱峰峰宽更窄,通常为10 s左右^[32-33],可同时监测的分析物则更少。为了增加同时监测多个化合物的能力,可以通过设置分段扫描或者动态扫描的方式。依据保留时间,在不同的时间段内分别设置对应的离子对进行监测^[30,34]。

另外,Q0为高压腔内仅射频的四极杆离子导引,可通过高压碰撞聚焦技术提高离子聚焦能力,更多气体分子与离子碰撞,减少离子路径空间,使离子的传输最大化。设置Q0捕获(Q0 trapping)也被用来增加灵敏度和占空比,通过增加聚焦层,从离子源到分析器的离子飞行时间被放大^[4,17,35]。

3 应用

LC-MRM³定量分析策略已被广泛用于生物标志物、药物、法医毒物、食品和环境分析等领域。尤其是在对复杂基质中的痕量化学成分进行靶向定量分析时,可以显著提升灵敏度和选择性,降低检测限和定量限。

3.1 生物标志物分析

生物标志物是指可被客观测量并能用于评价正常生物过程、病理过程及治疗反应的指标,对临床治疗、疾病诊断与分型、疾病发展进程等具有重要指导意义^[36]。褪黑素在许多生理过程中起着重要的作用,而6-磺酰氧基褪黑素(6-sulfatoxymelatonin, 6-SM)是尿液中褪黑素排泄的主要代谢产物,其浓度与血浆中褪黑素水平存在相关性。因此,

对尿液中的6-SM进行定量分析可以评估褪黑素的水平^[37]。Lopukhov等^[31]通过优化MRM³参数,建立了人体尿液中6-SM的LC-MRM³定量分析方法。该方法的定量准确性和精确性与LC-MRM相当,但具有更优的选择性。Richards等^[2]采用LC-MRM³策略实现了人体血清中甲状腺激素类成分的定量分析,定量下限(lower limits of quantification, LLOQ)可达2.63 ~ 194.22 μg/mL (0.005 ~ 0.25 nmol/L),基质效应低,灵敏度高,方法准确可靠。对于复杂生物基质中类固醇激素^[38]、视黄酸^[39]、5-羟色胺^[40]、去甲肾上腺素^[41]等多种小分子代谢物生物标志物的LC-MRM³定量分析方法均被成功建立。LC-MRM³定量分析策略也被成功应用于蛋白质类生物标志物的检测。载脂蛋白F(APO-F)被认为是一种新颖且有应用前景的肝纤维化标志物,属于低丰度蛋白,而且其浓度会随着肝纤维化的进程而降低,因此需建立一种高灵敏的检测方法。Kumar等^[42]利用LC-MRM³策略建立了人血浆中APO-F的定量分析方法,检测限可达到1.67 ng/mL(对应色谱柱上多肽载样量2.5 fmol),灵敏度、选择性显著增强。Simon等^[43]建立了人体尿液中肾小球损伤潜在生物标志物Podocin蛋白的LC-MRM³定量分析方法,LLOQ为0.39 ng/mL,准确度为105% ~ 112%,精密密度为7% ~ 20%,方法准确可靠,且可节约样品用量。Pailleux等^[44]建立的大鼠脊髓中Tachykinin蛋白的LC-MRM³分析方法可以显著降低共流出物的干扰,增强选择性。

3.2 药物分析

由于高选择性和高灵敏度的优点,LC-MRM³常用于中药中目标化学成分的含量测定、体内外定量分析及药代动力学等研究中。Vaclavik等^[45]基于LC-MRM³建立了毒性成分马兜铃酸I和II定量分析方法并成功应用于30个中成药中马兜铃酸I和II的含量测定。Duan等^[5]建立了McF-7细胞中农药残留物甲草胺的LC-MRM³定量分析方法,并成功应用于20 μg/mL甲草胺给药后的McF-7细胞药代动力学研究中。Ren等^[46]结合微固相萃取的前处理方法,基于LC-MRM³分析策略对大鼠曲普瑞林(十肽药物)给药后的血浆进行了含量测定。利用微固相萃取进行样品快速制备,MRM³则显著降低基质干扰,最终实现多肽药物在pg/mL水平的定量分析,并成功应用于曲普瑞林大鼠血浆

药代动力学研究中。Cesari等^[47]采用LC-MRM³定量分析策略对小分子药物*D*-amphetamine进行了大鼠血浆药代动力学研究。

LC-MRM³在临床药物分析和药代动力学研究中也有较多应用实例。甲氨蝶呤血药浓度监测对减少不良反应和调整给药剂量至关重要,因此Yin等^[48]建立了高选择性和高灵敏度的LC-MRM³分析策略检测甲氨蝶呤的血药浓度。该方法不需要额外浓缩,节约分析样品,方法准确可靠,与LC-MRM定量结果一致。Ma等^[49]和Sun等^[50]采用LC-MRM³建立了人血浆中卡马西平和金刚烷胺定量分析方法,并成功应用于临床治疗药物监测。

小分子类化合物在CID裂解时产生碎片过小而无法被有限的质谱扫描范围识别或无法裂解产生碎片,故在进行LC-MS/MS分析时,仅以前体离子构建离子对进行MRM或MRM³检测,基线较高、灵敏度较低、专属性差。针对这一现象,有学者以分析物的醋酸钠加合离子([M + 2CH₃COONa-H]⁻)作为母离子构建MRM³离子对[M + 2CH₃COONa-H]⁻ → [M + CH₃COONa-H]⁻ → [M-H]⁻,建立了人血浆中伊马替尼^[51]、丙戊酸^[52]和γ-羟基丁酸(GHB)^[53]的LC-MRM³定量分析方法,信噪比显著增强,选择性和灵敏度得到大幅度提升。此外,LC-MRM³定量分析策略在药物临床药代动力学研究中也显示出其优势^[54]。

3.3 法医毒物分析

迄今为止,大麻仍是世界上最常用的毒品之一。主要的神经兴奋活性成分为四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol, THC), THC及其代谢产物Δ⁹-四氢大麻酚-9-羧酸(OH-THC)和11-去甲-Δ⁹-四氢大麻酚-9-羧酸(THC-COOH)为法医和临床分析中重要的诊断标志物,在血液、尿液或毛发等多种生物基质等中均能检测到^[55],检测毛发中的THC-COOH是确认大麻摄入的重要方式。相较于样品前处理过程繁琐、耗时的气质联用(GC-MS)分析,基于LC-MS的毛发中THC-COOH定量分析方法已有报道。Dulaurent等^[56]等采用LC-MRM³建立毛发中THC-COOH的绝对定量分析方法,其LLOQ可达0.2 pg/mL,并结合MRM扫描,对毛发中其他大麻中的化学成分和代谢物包括THC、大麻酚和大麻二酚进行了定量分析。Cho等^[57]建立了柱切换系统对LC-MS³分析方法进行了改进,有效降低了基

质干扰。同时,作者认为针对毛发中 THC-COOH 浓度较低接近定量限的样品,将 LC-MRM 与 LC-MRM³两种模式结合,可以有效地增强分析结果的可靠性。而 Park 等^[58]采用柱切换结合 LC-MRM³的方式,对毛发中的 THC-COOH 进行定量,其定量限降低至 0.1 pg/mL。与 LC-MRM 相比,LC-MRM³可以有效地去除基质中的干扰信号,提高分析方法的选择性。化学衍生化技术是提升 THC-COOH 检测灵敏度的有效方式之一。Thieme 等^[59-60]对 THC-COOH 进行选择性的甲基化和吡啶甲酸酯衍生化,建立其衍生化产物的 LC-MRM³分析方法,LLOQ 为 0.05 pg/mL,相较于常规分析方法,降低为原来的 25%~50%,增强了检测灵敏度。液液萃取(LLE)对提取的毛发样品进行净化,无须额外的衍生化处理,结合 LC-MRM³也可以增强 THC-COOH 分析灵敏度^[61]。除了大麻相关成分的检测,针对其他毒品或兴奋剂成分的 LC-MRM³定量分析研究也有报道。如 Zubaidi 等^[62]基于分段扫描的 MRM-EPI-MRM³扫描策略,实现了多种苯丙胺类中枢兴奋剂高灵敏、高选择性的快速同步分析;Dziodos^[53]建立了人体血清中中枢神经兴奋剂 GHB 的 LC-MRM³定量分析策略。

3.4 食品分析

农药、兽药的使用虽然极大地促进了农业、畜牧业的发展,但其滥用导致农药、兽药残留超标,引发食品安全问题,对人类健康具有潜在威胁。LC-MS/MS 已被中国、欧盟以及其他多个国家地区用于农药、兽药残留分析。灵敏度更高、选择性更强的 LC-MRM³策略也逐步被用于食品中农药、兽药的残留分析中。氟苯尼考是一种用于畜牧业和水产业的广谱抗菌药,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有效。氟苯尼考是会引起耐药性的抗生素,可以传递到人体内造成抗菌素耐药性^[63],因此,有必要对食品中氟苯尼考的残留水平进行测定。Faulkner 等^[64]基于 UHPLC-MRM³定量分析策略,对牛奶中氟苯尼考的残留量进行测定,在 0.25~5 μg/kg 和 1~100 μg/kg 的范围内线性良好,平均总体回收率(准确率)为 103%,与 LC-MRM 相比,该方法显著提升了检测灵敏度和选择性。残留在食品中的克伦特罗、莱克多巴胺及沙丁胺醇等 β-受体激动剂经人使用会引发头痛、胸闷、心悸等不良反应,甚至可能危及生命。传统的 LC-MRM 检测方

法对复杂基质样品中待测物的选择性较差,导致基线较高或无法与干扰物分离,可能存在假阳性或假阴性的风险。Sun 等^[65]基于高选择性的 LC-MRM³策略建立了猪肝等复杂基质中克伦特罗、莱克多巴胺及沙丁胺醇残留检测的方法。与 LC-MRM 相比,MRM³可以显著降低共流出物对分析物的干扰,选择性高,实现了分析物的准确定量。该方法在 0.5~10 μg/kg 范围内线性关系良好,准确度、灵敏度高,精密度好,为进一步提升 β-受体激动剂在食品中的残留监控能力,保障食品安全提供了新方案。

单端孢霉烯族类霉菌毒素(tricothecenes)是由各种真菌产生的有毒次级代谢物^[66],被列为最重要的慢性膳食健康风险,需建立准确可靠的分析技术对其进行检测,以保证食品安全。Lim 等^[67]基于 MRM 和 MS³联合定量分析策略分析玉米粉和米粉中的 9 个 Tricothecenes 类化合物。采用 MRM 和 MS³策略的定量限分别为 2~6 μg/kg 和 4~10 μg/kg,基质效应分别为 -9%~11% 和 -13%~12%,准确度在 90%~108% 之间,方法准确、灵敏、可靠。

吡咯里西啶类生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)是植物中一类毒性成分,广泛分布于菊科、豆科、紫草科植物中。将有毒物种作为代茶饮、传统药物或食用含有 PAs 种子污染的谷物可能会引起人体毒性反应。Chung 等^[68]通过对 15 个 PAs 和 13 个 N-氧化 PAs 分析,对比了 MRM、MS³和差分离子迁移谱(differential ion mobility spectrometry, DMS)对 PAs 的选择性和定量分析能力。结果显示,MS³与 DMS 具有更好的选择性,但受限于循环时间,更适合于监测高毒性的特定 PAs。乌头属植物的根茎常被用于药酒炮制,乌头碱是其中的有效成分和毒性成分,需建立特异性和选择性的分析方式对其进行分析。He 等^[69]建立了药酒中乌头碱的 LC-MRM³分析方法,乌头碱在 0.1~500 ng/mL 范围内线性良好,定量限和检测限分别为 0.03 和 0.01 ng/mL,定量准确度高,方法精密可靠,并应用于药酒样品检测中,与 LC-MRM 的定量结果基本一致。而且,由于其多次筛选的特性,MRM³可有效去除基质中的干扰信号,提升乌头碱检测的选择性和灵敏度。

食物过敏在过去几十年中已成为全球广泛关注的问题。甲壳类、贝类、鸡蛋、坚果和小麦/麸质等是过敏患者的高风险食物,对食物中的过敏原

进行定量并给出指导含量对于保障食品安全至关重要。由于ELISA和PCR检测过敏原具有局限性,LC-MS/MS逐步成为特异性、稳健的蛋白质检测方式。但由于基质的复杂性或蛋白丰度低等原因,仍需建立选择性更强、灵敏度更高的检测方式。Korte等^[70]基于自下而上(bottom-up)蛋白质组分析的策略,采用LC-MS/MS、LC-MRM³和LC-MRM对甲壳类食物进行非靶向与靶向蛋白组学结合分析,寻找不同甲壳类动物的生物标志物。MRM³的检测限比MRM降低为原来2.5%,还显著提升了肽段分析的专属性和特异性。此外,该学者还将LC-MRM³用于坚果类食物的靶向蛋白定量分析,结果同样表明MRM³具有高选择性和高灵敏度的特性^[31]。Bargen等^[71-72]建立了牛肉中马肉、猪肉等掺伪食品的特异性检测方法,采用LC-MRM³对特异性多肽进行检测,可以检测牛肉中0.13%~0.24%的猪肉或马肉添加。以上结果显示了LC-MRM³技术在食品中过敏原污染物或非法成分添加的高灵敏检测方面的巨大潜力。

3.5 环境分析

工业、农业等各方面的发展给人类生活带来便利的同时,也给环境带来了污染。环境分析基质如水、淤泥等组成复杂,干扰多,待测物含量低,因此灵敏度高、选择性好的分析方法对复杂环境基质中的污染物分析至关重要。然而传统的LC-MRM分析策略在某些应用场景下也无法实现高灵敏的检测。LC-MRM³由于其高选择性和高灵敏度的优势,被逐步应用于环境基质定量分析中。研究者借助LC-MRM³技术对废水中的X射线造影剂^[30]或甲壳类动物中不同的新兴污染物^[21]进行测定,实现了复杂环境基质中污染物的痕量分析,相较于LC-MRM,其选择性和灵敏度均显著提升。在此基础上,Guironnet等^[4]建立了淤泥中5个 β -内酰胺类新兴污染物的LC-MRM³分析方法,LLOQ在0.8~14.7 ng/g之间,定量结果准确,且MRM³可以有效去除基质干扰,具有更好的检测特异性。以上结果表明,高灵敏和高选择性的LC-MRM³定量分析策略在复杂的环境基质分析中显示出巨大的应用潜力。

除上述应用领域外,LC-MRM³定量分析策略也可用于组学研究中。Hartung等^[73]结合MRM和MRM³建立了包含环氧合酶和脂氧合酶介导的花

生四烯酸信号通路的靶向蛋白组学方法,并将其与脂氧化物代谢组学方法结合,首次在单个样本中通过LC-MS/MS表征了免疫细胞中的花生四烯酸级联反应。目前MRM³在组学研究领域的应用相对较少,但该研究显示了MRM³策略在靶向蛋白质组学和代谢组学分析中的应用前景。

4 总结与展望

LC-MS/MS具有灵敏度高、选择性好、通量高等优势。然而,在仅采用MS¹或MS²定量分析复杂基质或低丰度化合物时,其灵敏度和选择性仍难以满足要求。离子阱可以实现MS³裂解,目标分析物相关离子经多级质谱筛选,可以降低共流出物或背景噪声干扰,显著增强选择性和灵敏度,实现复杂基质中低丰度分析物的检出。虽然采用传统3D-IT的LC-MS³定量分析也有报道^[74-75],但由于3D-IT的空间电荷效应更明显,所以线性范围通常在2个数量级以内,定量能力有限。LIT串联质谱在LC-MS³定量分析中更为常用。如Arioli等^[76]基于LTQ Orbitrap MS的MSⁿ扫描功能建立了人尿液中游离皮质醇及其15种内源性代谢物的定量分析方法;Park等^[77]采用高分辨率的Orbitrap Eclipse Tribrid MS建立了基于MS³扫描的单细胞蛋白组学分析方法,实现了高通量、高灵敏的分析。基于Qtrap-MS的MRM³定量分析策略具有更高的灵敏度和选择性,去除干扰能力更强,在小分子和多肽蛋白质类成分的定量分析中均有广泛应用。此外,由于选择性和灵敏度的提升,LC-MRM³可以减少样品用量以及简化样品前处理过程。因此,LC-MRM³常被用于如血浆、尿液、细胞、头发等生物基质,环境样品或食品等复杂基质中的化学成分痕量定量分析中,显示出非常好的应用前景。

然而,LC-MRM³方法仍存在一些有待改进之处:(1)为获得更好的质谱响应和灵敏度,MRM³方法中LIT填充时间和激发时间设置导致MRM³扫描的循环时间过长,无法达到与MRM相当的分析通量。通过设置分段扫描的方式,即将不同化合物根据保留时间设置为多个窗口,每个窗口内设置相应的MRM³方法,可以在一定程度上改善该缺陷。(2)低质量端检测能力差。对于相对分子质量小于200 D内的化合物,由于背景噪音累积的影响,可能会造成灵敏度的缺失导致定量限升高,而

且这种现象可能会随着离子阱累积时间的延长进一步加剧。利用分析物与流动相添加剂形成的加合离子或结合金属离子络合物构建离子对可以提高分析物的选择性,改善相对分子质量较小的化合物灵敏度降低的问题,从而降低定量限和检测限。(3)线性范围窄。相较于MRM能够实现大约5个数量级的线性监测,MRM³扫描基本只能实现2~3个数量级线性范围内的定量分析^[70]。在高真空环境中,离子占空比有限,尽管LIT在传统3D-IT的基础上提升了容纳电荷的能力,但由于空间限制,在较高浓度下,离子阱过度填充,导致质谱信号受到抑制,峰形不佳,从而影响线性范围。

References

- [1] Ferreirós N, Dresen S, Alonso RM, *et al.* Validated quantitation of angiotensin II receptor antagonists (ARA-II) in human plasma by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry using minimum sample clean-up and investigation of ion suppression[J]. *Ther Drug Monit*, 2007, **29**(6): 824-834.
- [2] Richards KH, Monk R, Renko K, *et al.* A combined LC-MS/MS and LC-MS³ multi-method for the quantification of iodothyronines in human blood serum[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, **411**(21): 5605-5616.
- [3] Aydin E, Drotleff B, Noack H, *et al.* Fast accurate quantification of salivary cortisol and cortisone in a large-scale clinical stress study by micro-UHPLC-ESI-MS/MS using a surrogate calibrant approach[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, **1182**: 122939.
- [4] Guironnet A, Wiest L, Vulliet E. Advantages of MS/MS/MS (MRM³) vs classic MRM quantification for complex environmental matrices: Analysis of beta-lactams in WWTP sludge[J]. *Anal Chim Acta*, 2022, **1205**: 339773.
- [5] Duan X, Lu D, Zheng X, *et al.* Development and validation of an LC-MS/MS assay with multiple stage fragmentation for the quantification of alachlor in McF-7 cells[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2023, **1214**: 123550.
- [6] Berna M, Schmalz C, Duffin K, *et al.* Online immunoaffinity liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of a type II collagen peptide biomarker in rat urine: Investigation of the impact of collision-induced dissociation fluctuation on peptide quantitation[J]. *Anal Biochem*, 2006, **356**(2): 235-243.
- [7] Manjunath Swamy J, Kamath N, Radha Shekar AK, *et al.* Sensitivity enhancement and matrix effect evaluation during summation of multiple transition pairs-case studies of clopidogrel and ramiprilat[J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, **24**(5): 528-534.
- [8] Campbell JL, Collings BA, Yves Le Blanc JC, *et al.* A novel MS³ experiment for quantifying ions with a linear ion trap[J]. *Can J Chem*, 2018, **96**(7): 653-663.
- [9] Mayya V, Rezaul K, Cong YS, *et al.* Systematic comparison of a two-dimensional ion trap and a three-dimensional ion trap mass spectrometer in proteomics[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(2): 214-223.
- [10] Douglas DJ, Frank AJ, Mao D. Linear ion traps in mass spectrometry[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2005, **24**(1): 1-29.
- [11] Botitsi HV, Garbis SD, Economou A, *et al.* Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2011, **30**(5): 907-939.
- [12] Hager JW. A new linear ion trap mass spectrometer[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, **16**(6): 512-526.
- [13] Cha B, Blades M, Douglas DJ. An interface with a linear quadrupole ion guide for an electrospray-ion trap mass spectrometer system[J]. *Anal Chem*, 2000, **72**(22): 5647-5654.
- [14] Miyachi A, Murase T, Yamada Y, *et al.* Quantitative analytical method for determining the levels of gastric inhibitory polypeptides GIP1-42 and GIP3-42 in human plasma using LC-MS/MS/MS[J]. *J Proteome Res*, 2013, **12**(6): 2690-2699.
- [15] Quinete N, Bertram J, Reska M, *et al.* Highly selective and automated online SPE LC-MS³ method for determination of cortisol and cortisone in human hair as biomarker for stress related diseases[J]. *Talanta*, 2015, **134**: 310-316.
- [16] Hager JW, Yves Le Blanc JC. Product ion scanning using a Q-q-Q linear ion trap (Q TRAP) mass spectrometer[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, **17**(10): 1056-1064.
- [17] Sandra K, Devreese B, Van Beeumen J, *et al.* The Q-Trap mass spectrometer, a novel tool in the study of protein glycosylation [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, **15**(3): 413-423.
- [18] Snyder DT, Peng WP, Cooks RG. Resonance methods in quadrupole ion traps[J]. *Chem Phys Lett*, 2017, **668**: 69-89.
- [19] Collings BA, Stott WR, Londry FA. Resonant excitation in a low-pressure linear ion trap[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, **14**(6): 622-634.
- [20] Li C. *Research on high sensitivity quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry*(高灵敏度四极杆-线形离子阱串联质谱技术研究)[D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [21] Sordet M, Berlioz-Barbier A, Buleté A, *et al.* Quantification of emerging micropollutants in an amphipod crustacean by nano-liquid chromatography coupled to mass spectrometry using multiple reaction monitoring cubed mode[J]. *J Chromatogr A*, 2016, **1456**: 217-225.
- [22] McCaffery P, Evans J, Koul O, *et al.* Retinoid quantification by HPLC/MSⁿ[J]. *J Lipid Res*, 2002, **43**(7): 1143-1149.
- [23] Leuthold LA, Grivet C, Allen M, *et al.* Simultaneous selected reaction monitoring, MS/MS and MS³ quantitation for the analysis of pharmaceutical compounds in human plasma using

- chip-based infusion[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, **18** (17): 1995-2000.
- [24] Ma W, Xu Y, Wang SY, *et al.* Research on accurate quantitation technique using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry and experiment optimization—take a novel diuretic as an example[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2022, **31**(3): 184.
- [25] Song Q, Li J, Huo H, *et al.* Retention time and optimal collision energy advance structural annotation relied on LC-MS/MS: an application in metabolite identification of an antiedementia agent namely echinacoside[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(23): 15040-15048.
- [26] Liu W, Li W, Zhang P, *et al.* Quality structural annotation for the metabolites of chlorogenic acid in rat[J]. *Food Chem*, 2022, **379**: 132134.
- [27] Cao Y, Chai C, Chang A, *et al.* Optimal collision energy is an eligible molecular descriptor to boost structural annotation: an application for chlorogenic acid derivatives-focused chemical profiling[J]. *J Chromatogr A*, 2020, **1609**: 460515.
- [28] Cao Y, Li W, Chen W, *et al.* Squared energy-resolved mass spectrometry advances quantitative bile acid submetabolome characterization[J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(44): 15395-15404.
- [29] Zeng W, Bateman KP. Quantitative LC-MS/MS. I. Impact of points across a peak on the accuracy and precision of peak area measurements[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2023, **34**(6): 1136-1144.
- [30] Sordet M, Buleté A, Vulliet E. A rapid and easy method based on hydrophilic interaction chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) to quantify iodinated X-ray contrast in wastewaters[J]. *Talanta*, 2018, **190**: 480-486.
- [31] Lopukhov LV, Balandina AV, Nigmatullina LS, *et al.* Evaluation of multiple reaction monitoring cubed performed by a quadrupole-linear ion trap mass spectrometer for quantitative determination of 6-sulfatoxymelatonin in urine[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, **1190**: 123094.
- [32] Vonk RJ, Vaast A, Eeltink S, *et al.* Titanium-scaffolded organic-monomolithic stationary phases for ultra-high-pressure liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2014, **1359**: 162-169.
- [33] Muscat Galea C, Didion D, Clicq D, *et al.* Method optimization for drug impurity profiling in supercritical fluid chromatography: Application to a pharmaceutical mixture[J]. *J Chromatogr A*, 2017, **1526**: 128-136.
- [34] Korte R, Brockmeyer J. MRM³-based LC-MS multi-method for the detection and quantification of nut allergens[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, **408**(27): 7845-7855.
- [35] Jaffuel A, Lemoine J, Aubert C, *et al.* Optimization of liquid chromatography-multiple reaction monitoring cubed mass spectrometry assay for protein quantification: application to aquaporin-2 water channel in human urine[J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1301**: 122-130.
- [36] Guo JJ, Zhou W, Su WQ. Application strategy of mass spectrometry in protein biomarker discovery[J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2022, **39**(23): 3183-3188.
- [37] van Faassen M, van der Veen A, van Ockenburg S, *et al.* Mass spectrometric quantification of urinary 6-sulfatoxymelatonin: age-dependent excretion and biological variation[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, **59**(1): 187-195.
- [38] Gaudl A, Kratzsch J, Bae YJ, *et al.* Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair[J]. *J Chromatogr A*, 2016, **1464**: 64-71.
- [39] Jones JW, Pierzechalski K, Yu J, *et al.* Use of fast HPLC multiple reaction monitoring cubed for endogenous retinoic acid quantification in complex matrices[J]. *Anal Chem*, 2015, **87**(6): 3222-3230.
- [40] Szeitz A, Nguyen TA, Riggs KW, *et al.* A validated assay to quantitate serotonin in lamb plasma using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: applications with LC/MS³[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, **406** (20): 5055-5059.
- [41] Wright MJ, Thomas RL, Stanford PE, *et al.* Multiple reaction monitoring with multistage fragmentation (MRM³) detection enhances selectivity for LC-MS/MS analysis of plasma free metanephrines[J]. *Clin Chem*, 2015, **61**(3): 505-513.
- [42] Kumar A, Gangadharan B, Zitzmann N. Multiple reaction monitoring and multiple reaction monitoring cubed based assays for the quantitation of apolipoprotein F[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, **1033/1034**: 278-286.
- [43] Simon R, Lemoine J, Fonbonne C, *et al.* Absolute quantification of podocin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-multiple reaction monitoring cubed mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, **94**: 84-91.
- [44] Pailleux F, Beaudry F. Evaluation of multiple reaction monitoring cubed for the analysis of tachykinin related peptides in rat spinal cord using a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, **947/948**: 164-167.
- [45] Vaclavik L, Krynitsky AJ, Rader JJ. Quantification of aristolochic acids I and II in herbal dietary supplements by ultra-high-performance liquid chromatography-multistage fragmentation mass spectrometry[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2014, **31**(5): 784-791.
- [46] Ren T, Zhang Z, Fawcett JP, *et al.* Micro-solid phase extraction and LC-MS³ for the determination of triptorelin in rat plasma and application to a pharmacokinetic study[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, **166**: 13-19.
- [47] Cesari N, Fontana S, Montanari D, *et al.* Development and validation of a high-throughput method for the quantitative analysis

- of *D*-amphetamine in rat blood using liquid chromatography/MS³ on a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer and its application to a pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, **878**(1): 21-28.
- [48] Yin L, Ji Z, Cao H, *et al.* Comparison of LC-MS³ and LC-MRM strategy for quantification of methotrexate in human plasma and its application in therapeutic drug monitoring[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, **205**: 114345.
- [49] Ma D, Ji Z, Cao H, *et al.* LC-MS³ strategy for quantification of carbamazepine in human plasma and its application in therapeutic drug monitoring[J]. *Molecules*, 2022, **27**(4): 1224.
- [50] Sun Q, Cao H, Liu Y, *et al.* Comparison of LC-MS³ and LC-MRM methods for quantifying amantadine and its application in therapeutic amantadine monitoring in human plasma[J]. *Molecules*, 2022, **27**(21): 7619.
- [51] Dziadosz M, Klintschar M, Teske J. Imatinib quantification in human serum with LC-MS³ as an effective way of protein kinase inhibitor analysis in biological matrices[J]. *Drug Metab Pers Ther*, 2017, **32**(3): 147-150.
- [52] Dziadosz M. The application of multiple analyte adduct formation in the LC-MS³ analysis of valproic acid in human serum[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, **1040**: 159-161.
- [53] Dziadosz M. γ -Hydroxybutyrate analysis in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry on the basis of MS³ mass transition[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, **986/987**: 8-11.
- [54] Shi X, Liu M, Sun M, *et al.* Development of a LC-ESI-MS³ method for determination of nitrendipine in human plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, **56**(5): 1101-1105.
- [55] Stone NL, Murphy AJ, England TJ, *et al.* A systematic review of minor phytocannabinoids with promising neuroprotective potential[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, **177**(19): 4330-4352.
- [56] Dulaurent S, Gaulier JM, Imbert L, *et al.* Simultaneous determination of Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor- Δ 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Forensic Sci Int*, 2014, **236**: 151-156.
- [57] Cho HS, Cho B, Sim J, *et al.* Detection of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in the hair of drug abusers by LC-MS/MS analysis[J]. *Forensic Sci Int*, 2019, **295**: 219-225.
- [58] Park M, Kim J, Park Y, *et al.* Quantitative determination of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in hair by column switching LC-ESI-MS(3)[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, **947/948**: 179-185.
- [59] Thieme D, Sachs U, Sachs H, *et al.* Significant enhancement of 11-hydroxy-THC detection by formation of picolinic acid esters and application of liquid chromatography/multi stage mass spectrometry (LC-MS(3)): application to hair and oral fluid analysis[J]. *Drug Test Anal*, 2015, **7**(7): 577-585.
- [60] Thieme D, Sachs H, Uhl M. Proof of cannabis administration by sensitive detection of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using selective methylation and application of liquid chromatography-tandem and multistage mass spectrometry[J]. *Drug Test Anal*, 2014, **6**(1/2): 112-118.
- [61] Hehet P, Franz T, Kunert N, *et al.* Fast and highly sensitive determination of tetrahydrocannabinol (THC) metabolites in hair using liquid chromatography-multistage mass spectrometry (LC-MS³)[J]. *Drug Test Anal*, 2022, **14**(9): 1614-1622.
- [62] Zubaidi FA, Choo YM, Tan GH, *et al.* A novel liquid chromatography tandem mass spectrometry technique using multi-period-multi-experiment of MRM-EPI-MRM³ with library matching for simultaneous determination of amphetamine type stimulants related drugs in whole blood, urine and dried blood stain (DBS)-application to forensic toxicology cases in Malaysia[J]. *J Anal Toxicol*, 2019, **43**(7): 528-535.
- [63] Jung HN, Park DH, Choi YJ, *et al.* Simultaneous quantification of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in animal and aquaculture products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Front Nutr*, 2022, **8**: 812803.
- [64] Faulkner DV, Cantley ML, Kennedy DG, *et al.* MRM³-based UHPLC-MS/MS method for quantitation of total florfenicol residue content in milk and withdrawal study profile of milk from treated cows[J]. *Food Chem*, 2022, **379**: 132070.
- [65] Sun L, Ye N, Wang YL, *et al.* Determination of β -agonists residues in complex animal derived food by LC-MS/MS/MS in high selectivity MRM³[J]. *Chin J Vet Drug(中国兽药杂志)*, 2021, **55**(7): 22-29.
- [66] Ye L, Liu JC, Wang YL, *et al.* Development of a three-compartment toxicokinetic model for T-2 toxin in shrimp by blindfold particle swarm optimization algorithm[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, **208**: 111698.
- [67] Lim CW, Tai SH, Lee LM, *et al.* Analytical method for the accurate determination of tricothecenes in grains using LC-MS/MS: a comparison between MRM transition and MS³ quantitation[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, **403**(10): 2801-2806.
- [68] Chung SWC, Lam CH. Development of an analytical method for analyzing pyrrolizidine alkaloids in different groups of food by UPLC-MS/MS[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, **66**(11): 3009-3018.
- [69] He JZ, Huang LZ. Determination of aconitine in medicated wine by LC-MS³[J]. *Occup Health(职业与健康)*, 2021, **37**(10): 1323-1326, 1332.
- [70] Korte R, Monneuse JM, Gemrot E, *et al.* New high-performance liquid chromatography coupled mass spectrometry method for the detection of lobster and shrimp allergens in food samples *via* multiple reaction monitoring and multiple reaction monitoring cubed[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, **64**(31): 6219-6227.
- [71] von Bargaen C, Brockmeyer J, Humpf HU. Meat authentication: a

- new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, **62**(39): 9428-9435.
- [72] von Barga C, Dojahn J, Waidele D, *et al.* New sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, **61**(49): 11986-11994.
- [73] Hartung NM, Mainka M, Pfaff R, *et al.* Development of a quantitative proteomics approach for cyclooxygenases and lipoxygenases in parallel to quantitative oxylipin analysis allowing the comprehensive investigation of the arachidonic acid cascade[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2023, **415**(5): 913-933.
- [74] Musile G, Mazzola M, Shestakova K, *et al.* A simple and robust method for broad range screening of hair samples for drugs of abuse using a high-throughput UHPLC-Ion Trap MS instrument [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, **1152**: 122263.
- [75] Hoffner G, van der Rest G, Dansette PM, *et al.* The end product of transglutaminase crosslinking: simultaneous quantitation of [nepsilon-(gamma-glutamyl) lysine]and lysine by HPLC-MS³[J]. *Anal Biochem*, 2009, **384**(2): 296-304.
- [76] Arioli F, Gamberini MC, Pavlovic R, *et al.* Quantification of cortisol and its metabolites in human urine by LC-MSⁿ: applications in clinical diagnosis and anti-doping control[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, **414**(23): 6841-6853.
- [77] Park J, Yu F, Fulcher JM, *et al.* Evaluating linear ion trap for MS3-based multiplexed single-cell proteomics[J]. *Anal Chem*, 2023, **95** (3): 1888-1898.



[专家介绍] 宋月林,北京中医药大学研究员,博士生导师,入选国家级人才计划-青年项目、中国科协青托等。2007和2009年分别获得北京大学理学学士和硕士学位,2013年获得澳门大学博士学位。主要研究方向为中药全面质量分析和中药体内药效物质及作用机制研究。以第一或通讯作者在 *TrAC Trend Anal Chem*, *Med Res Rev*, *Anal Chem*, *Anal Chim Acta*, *Acta Pharm Sin B* 等国际学术期刊发表研究论文 80 余篇,被引 2 500 余次,H 指数 31。主持国家自然科学基金面上项目、青年项目等多项国家级课题。获国家科技进步奖二等奖、教育部科技进步奖一等奖等奖项。担任 *Chin Med*、*J Pharm Anal* 等十余本杂志编委或青年编委。