

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查 畜禽类产品中 50 种违禁药物残留

李帆¹, 罗金文², 王峰², 徐潇颖², 刘柱^{2*}

(1. 浙江工业大学绿色制药协同创新中心, 浙江杭州 310014)

(2. 浙江省食品药品检验研究院国家市场监管重点实验室(功能食品质量与安全), 浙江杭州 310052)

摘要:建立了超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)快速筛查畜禽类产品中 50 种违禁药物残留的检测方法。畜禽类产品经 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶酶解,依次用乙酸乙酯-叔丁基甲醚提取后,利用 HLB 净化,采用 UPLC-Q-TOF/MS 电喷雾正离子模式检测。通过建立在线谱库检索的方法实现 50 种违禁药物的快速筛选和准确性,再结合同位素内标法实现准确定量。目标物质量浓度在 2~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.99,检出限为 0.1~0.5 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 0.3~1.5 $\mu\text{g/kg}$,三个不同浓度的加标回收率在 81.74%~114.22%之间,相对标准偏差为 1.41%~8.91%。研究建立的筛查数据库在无需标准品的情况下实现了 50 种违禁药物的快速筛查、定性确证和定量分析。该方法适用于畜禽类产品中低浓度的违禁药物残留量的快速筛查和准确定量。

关键词: 违禁药物;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱;快速筛查;畜禽类

文章编号: 1673-9078(2022)06-304-311

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0967

Quick Screening and Simultaneous Determination of 50 Doping Residues in Livestock by Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-time of Flight Mass Spectrometry

LI Fan¹, LUO Jinwen², WANG Feng², XU Xiaoying², LIU Zhu^{2*}

(1. Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China) (2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory of Quality and Safety of Functional Food for State Market Regulation, Hangzhou 310052, China)

Abstract: A method for quick screening of 50 illegal drugs in livestock by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) had been established. Livestock products were first hydrolyzed by β -glucuronidase/arylsulfatase, then extracted with ethyl acetate-methyl tert-butyl ether, purified by HLB, and determined by UPLC-Q-TOF/MS in positive ion mode. A high-resolution database was established for quick screening and accurate characterization. Precise quantification by isotope internal standard method can be achieved. The correlation coefficient of the calibration curves of each illegal drugs standards exceeded 0.99 in the range of 2~200 $\mu\text{g/L}$. The detection limit of various drugs could reach 0.1~0.5 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantification was 0.3~1.5

引文格式:

李帆,罗金文,王峰,等.超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查畜禽类产品中 50 种违禁药物残留[J].现代食品科技, 2022,38(6):304-311, +326

LI Fan, LUO Jinwen, WANG Feng, et al. Quick screening and simultaneous determination of 50 doping residues in livestock by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 304-311, +326

收稿日期: 2021-08-27

基金项目: 浙江省市场监管局科技计划项目(20210126);浙江省基础公益研究计划分析测试项目(LGC19C200001);国家市场监督管理总局技术保障专项项目(2019YJ020)

作者简介: 李帆(1997-),女,硕士研究生,研究方向:药学, E-mail: m15957167266@163.com

通讯作者: 刘柱(1982-),男,高级工程师,硕士,研究方向:食品科学, E-mail: zliu82@126.com

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 。The average recovery at three different concentration levels varied from 81.74% to 114.22%, and the relative standard deviation was 1.41%~8.91%。The established database realizes the quick screening and analysis of 50 illegal drugs without the need for standard products。This method is suitable for quick screening and simultaneous determination of low-concentration residues in livestock products。

Key words: illegal drugs; ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry; quick screening; livestock

食品中违禁药物包括激动剂类、激素类、兽药等,因其能提高饲料利用率、提高动物酮体的瘦肉转化率^[1]、促进畜禽的生长而被非法用于畜牧业中^[2]。然而动物体内残留的违禁药物被人体摄入并在人体内蓄积达到一定量后,会造成心律失常^[1]、体内激素分泌紊乱^[2]、骨质疏松^[3,4]、高血压、糖尿病^[5]等危害,影响着人们的身体健康。另外运动员误食含违禁药物的畜禽类产品也会扰乱体育赛事,影响个人及国家的成绩^[6,7]。我国食品安全国家标准 GB 31650-2019 和农业部第 250 号公告均对食品中违禁药物最大残留限量有明确规定,欧盟中也禁止对畜禽使用激素作为生长促进剂^[8]。由于畜禽类产品基质复杂,含有脂肪、蛋白质、糖类等多种化合物的干扰,且违禁药物添加种类复杂,因此建立一种快速、准确的方法同时检测多种违禁药物残留具有重要意义。

目前,免疫分析法、高效液相色谱法(HPLC)^[5,9]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[1,10]、液相色谱-质谱法(LC-MS)^[11,12]被广泛应用于违禁药物的检测。高效液相色谱法灵敏度低,难以进行痕量检测。三重四极杆具有检出限低,定量准确的优点,但通常只能用于一种或一类违禁化合物的检测^[13],分析效率低,特别是当样品基质复杂且存在有相似质荷比化合物时,难以进行有效的准确区分,可能出现假阳性结果^[14]。四极杆-飞行时间质谱法(Q-TOF/MS)作为高分辨质谱技术的代表^[15],能够根据高质量精度、同位素丰度、保留时间、二级高分辨离子质谱图四大定性条件进行快速筛查确证^[16],具有分辨率高、分析速度快、检测范围广的特点^[17,18]。通过全扫描可以获得化合物的精确质量数,对复杂化合物的检测具有明显优势^[19]。此外,其扫描速率高,一次可实现几百种化合物的高通量检测^[14],在建立标准品数据库后,无需标准品就能进行非靶向筛查^[13,20-23]。

本实验以畜禽类为研究对象,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)测定畜禽类中 β -激动剂类、糖皮质激素类、雄激素类、孕激素类药物 4 大类 50 种药物残留,建立了高分辨质量数据库,可用于后续快速筛查检测。该方法快速、准确,能够为畜禽类违禁药物的添加提供可靠的分析平台。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

Agilent 6550 UPLC-Q-TOF/MS 质谱仪,美国 Agilent 公司;Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱(2.1 \times 150 mm, 2.7 μm),美国 Agilent 公司;Waters HLB 固相萃取柱(200 mg, 6 mL),美国 Waters 公司;Waters Prime HLB 固相萃取柱(200 mg, 6 mL),美国 Waters 公司;Milli-Q 型超纯水器,美国 Millipore 公司;全自动氮气吹干仪,美国 Biotage 公司;Multifuge XIR 高速冷冻离心机,美国 Thermo 公司;KH-500DV 超声波清洗器,昆山永创超声仪器有限公司;QT-1 涡旋混合器,上海琪特分析仪器有限公司。

甲醇、乙腈(色谱纯),德国 Merck 公司,甲酸(质谱纯),美国 Roe Scientificing 公司,实验用水为经 Milli-Q 型超纯水净化系统制备的超纯水,其余试剂均为分析纯。

50 种违禁药物标准品:16 种 β -激动剂(喷布特罗、妥布特罗、克仑特罗、马布特罗、沙丁胺醇、特布他林、溴布特罗、异丙喘宁、溴代克仑特罗、马喷特罗、西布特罗、氯丙那林、福莫特罗、莱克多巴胺、西马特罗、班布特罗),14 种糖皮质激素(氢化可的松、泼尼松、泼尼松龙、氟米龙、可的松、甲基泼尼松龙、醋酸氟氢可的松、倍氯米松、醋酸氟轻松、丙酸氯倍他索、曲安奈德、氟米松、地塞米松、布地奈德),9 种雄激素(勃地龙、甲基睾酮、丙酸睾酮、诺龙、苯丙酸诺龙、丙酸诺龙、群勃龙、雄烯二酮、司坦唑醇),11 种孕激素(左炔诺孕酮、醋酸羟孕酮、炔诺酮、醋酸美伦孕酮、炔诺酮醋酸酯、醋酸氯地孕酮、孕酮、醋酸甲地孕酮、乙酸甲羟孕酮、17 α -羟基孕酮、21 α -羟基孕酮),纯度均 \geq 98%,均来自中国食品药品检验研究院。

同位素内标:克仑特罗-D₉, 莱克多巴胺-D₃, 氢化可的松-D₃, 甲基睾酮-D₃, 孕酮-D₉。

畜禽类样品均购自农贸市场及超市,包括猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉。

1.2 对照品配制

准确称取各标准品 10 mg (精确至 0.01 mg), 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至 10.0 mL, 配制成 1000 mg/L 的标准储备液, 于 -18 °C 下避光保存。精密称取各内标对照品 1 mg, 用甲醇溶解并定容至 10.0 mL, 配制成 100 mg/L 的标准储备液, 于 -18 °C 下保存。使用时根据需要用甲醇逐级稀释对照品标准储备液和同位素内标储备液。

1.3 样品前处理

称取 5 g (精确至 0.01 g) 样品于 50 mL 离心管中, 加入 8 mL 0.2 mol/L 乙酸铵溶液, 40 μ L β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶, 于 37 °C 避光水浴振荡 16 h。取出冷却至室温, 涡旋混匀, 10000 r/min 离心 10 min。取全部上清液加入 5 mL 0.1 mol/L 高氯酸溶液, 混匀, 用高氯酸调 pH 至 1.0, 10000 r/min 离心 10 min, 上清液转移至新的离心管中, 用 10 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 9.5 \pm 0.2, 加入乙酸乙酯 15 mL, 涡旋混匀, 振荡 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 取上层有机相; 在下层水相中加入叔丁基甲醚 10 mL, 涡旋混匀, 振荡 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 合并有机相。50 °C 氮吹至干, 用 1 mL 甲醇溶解, 再加入 9 mL 水, 待净化。

Oasis HLB 固相萃取小柱预先依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化, 将待净化液全部上柱, 控制流速 1~2 滴/s, 待提取液全部流出, 依次用 15 mL 水和 5 mL 5% 甲醇水淋洗 HLB 固相萃取柱, 弃去全部流出液, 并彻底抽干后用 10 mL 甲醇洗脱, 收集全部洗脱液后于 45 °C 下氮气吹干, 加入 1.0 mL 初始流动相复溶, 用

0.22 μ m 有机滤膜过滤后供 UPLC-Q-TOF/MS 分析。

1.4 仪器工作条件

1.4.1 液相色谱条件

色谱柱: Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 (2.1 \times 150 mm, 2.7 μ m); 流动相: A 相为水 (含质量分数 0.1% 甲酸), B 相为乙腈; 梯度洗脱程序如下: 0~2 min: 5% B; 2~10 min: 5% B \rightarrow 40% B; 10~17 min: 40% B \rightarrow 90% B; 17~20 min: 90% B; 20~20.1 min: 90% B \rightarrow 5% B; 20.1~25 min: 5% B; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 3 μ L。

1.4.2 UPLC-Q-TOF/MS 质谱条件

离子源: 双喷射离子源 (Dual AJS ESI), 正离子模式; 干燥气温度: 200 °C; 干燥气流速: 14 L/min; 雾化器压力: 35 psig; 鞘气温度: 350 °C; 鞘气流速: 11 L/min; 离子源电压: 4000 V; 喷嘴电压: 0 V; 毛细管出口电压: 380 V; 四级杆电压: 750 V。采集模式为 MS Scan 及 Targeted MS/MS; 一级质谱扫描范围: m/z 100~1000, 采集频率: 2 spectra/s; 二级质谱扫描范围 m/z 50~1000, 采集频率: 3 spectra/s; 碰撞池电压: 10、20、40 eV。参比溶液中含嘌呤 ($C_5H_4N_4$, 离子精确相对分子质量 121.0508730) 和 HP-0921 ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$, 离子精确相对分子质量 922.009798), 能够进行实时校正, 提高所测化合物分子量的准确性。

1.5 高分辨质谱筛查谱库构建的条件

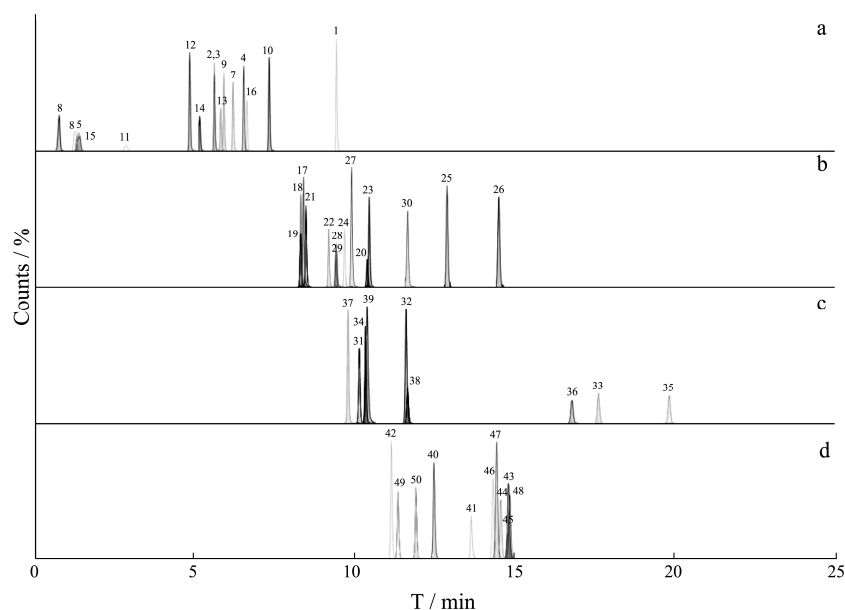


图 1 50 种药物的提取离子流叠加图

Fig.1 Extracted ion chromatograms (EICs) of 50 compounds

注: a: 16 种 β -激动剂类药物; b: 14 种糖皮质激素类药物; c: 9 种雄激素类药物; d: 11 种孕激素类药物。

首先分别配制浓度为 1.0 mg/L 的 50 种违禁药物的标准品溶液,按 1.4 条件在正离子模式下进行 TOF-MS 全扫描一级高分辨质谱分析,获得各个化合物的高分辨一级质谱信息和对应的保留时间。建立化合物 PCDL (Personal Compound Database Library) 高分辨数据库,含对应化合物的名称、分子式、精确分子量、结构式、CAS 号、保留时间等基本信息,完成一级精确质量数据库的建立。

对已获得高分辨一级质谱精确质荷比的化合物在 10 eV、20 eV、40 eV 三种碰撞能量下分别做 Targeted MS/MS 二级扫描,得到不同碰撞能量下的高分辨碎片离子质谱图(附图 1),并对获得的二级质谱高分辨全扫描信息进行子离子校对后导入数据库中相应化合物目录下,完成二级谱图库的建立。

2 结果与讨论

2.1 UPLC-Q-TOF/MS 条件的优化

将所研究的 50 种违禁药物分别在正、负两种离子模式下进行扫描,结果发现 50 种违禁药物在正离子模式下都有较好的响应;在选择流动相时,考察了甲醇和乙腈的洗脱效果,发现使用乙腈洗脱时峰型更尖锐、对称,同时,在水相中加入 0.1%甲酸能够有效改善峰型、提高化合物的响应,因此选择正离子模式对 50 种违禁药物进行扫描,流动相选择乙腈和 0.1%的甲酸水溶液。

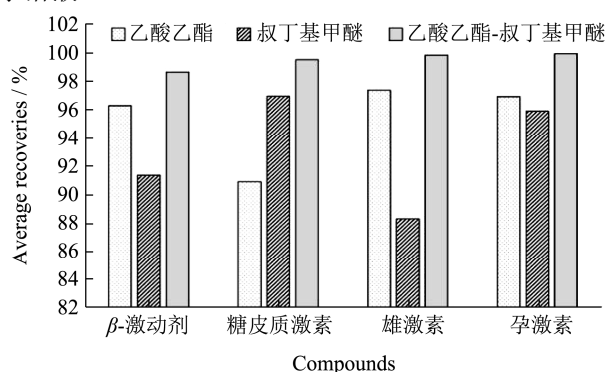


图 2 不同提取溶剂提取的各类化合物的平均回收率

Fig.2 Average recoveries of compounds extracted by different solvents

通过研究发现本文所分析的 50 种违禁药物中有 7 种化合物属于同分异构体,分别为泼尼松龙和可的松,勃地龙和雄烯二酮,丙酸诺龙和 17 α -羟基孕酮、21 α -羟基孕酮,由于本研究采用的定量方式为高分辨一级质谱定量,因此需要通过调整流动相中有机相和水相的比例和洗脱梯度,将 3 对同分异构体进行有效分离。通过研究确定 50 种违禁药物的最佳分离的洗脱梯度,

在最终优化后的 UPLC-Q-TOF/MS 条件下 50 种目标化合物分离效果见图 1,其中,图 1 中标识的数字与表 1 中的化合物编号一一对应。

本研究所涉及到的 3 对同分异构体(为泼尼松龙和可的松,勃地龙和雄烯二酮,丙酸诺龙和 17 α -羟基孕酮、21 α -羟基孕酮)可以获得较好的基线分离(附图 2)。

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂的选择

β -受体激动剂、激素类化合物在动物体内生物转化时会发生葡萄糖醛酸结合反应、硫酸盐化反应和氧化反应^[24],在动物体主要以葡萄糖醛酸结合物和硫酸酯结合物的形式存在。因此需要加入 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶将结合型化合物转化为游离态。由于畜禽类样品蛋白质含量高,在非极性溶剂中不易分散,导致目标化合物的提取效率低。因此在提取前加入乙酸-乙酸铵缓冲液(pH=5.2)使样品进行分散后再用提取剂提取。除此之外,蛋白质的存在不仅会加强基质效应,且容易在色谱柱上产生不可逆的吸附,导致色谱柱失去柱效。因此本文采用高氯酸进行蛋白沉淀,然后用氢氧化钠调节 pH 至碱性使化合物呈游离状态。

目前,畜禽类违禁药物非法添加的检测常采用甲醇、乙酸乙酯、叔丁基甲醚、异丙醇^[3,17]作为提取试剂。由于甲醇会提取缓冲液中的水分而影响后续蒸干步骤,本实验考察了乙酸乙酯、叔丁基甲醚以及两者分别提一次后混合有机相的提取效果。取空白样品 5 g,加入混合标准溶液,分成 3 组,每组 6 份,分别用乙酸乙酯、叔丁基甲醚、以及两者结合提取,按 1.3 进行后续处理后,供 UPLC-Q-TOF/MS 分析,不同提取溶剂提取后各类化合物的平均回收率如图 2 所示。结果表明乙酸乙酯的提取效果优于叔丁基甲醚,但乙酸乙酯对地塞米松的提取效果较差,叔丁基甲醚对沙丁胺醇、勃地龙、苯丙酸诺龙的提取效果不理想。结合两种提取溶剂,先用乙酸乙酯提取后再用叔丁基甲醚提取的方法对 50 种化合物均呈现出较好的回收率。

2.2.2 净化方法的选择

基质效应(Matrix effect)是指样品中除目标待测物之外的其余组分对分析测定的干扰,表现为基质增强或基质抑制两种形式。通过基质效应的计算公式(ME=基质标准曲线的斜率/溶剂标准曲线的斜率)可以判断基质效应的强弱。当 ME 在 0.85~1.15 之间时,基质效应较弱;当 ME 大于 1.15 时,基质效应较强。由于畜禽类产品中含有大量的脂肪、蛋白质、磷脂等

物质的干扰, 需要采取合适净化手段后才能供 UPLC-Q-TOF/MS 检测。本实验采用甲醇配制溶剂标准溶液, 同时选择 PRiME HLB (Waters; 200 mg, 6 mL) 和 HLB (Waters; 200 mg, 6 mL) 两种固相萃取小柱作为净化方式, 得到基质标准溶液。溶剂标准溶液和基质标准溶液均上机测试后, 计算质谱检测的基质效应。结果发现, 使用 PRiME HLB 柱净化的样品 ME 值较高, 谱图存在杂质峰的干扰, 且待检测化合物的回收率较低。而经 HLB 柱净化的样品 ME 值低, 谱图清晰, 目标化合物的响应更高。故实验采用 HLB 固相萃取小柱净化。

2.3 方法评价

2.3.1 线性关系、检出限和定量限

标准品混合储备液用甲醇进行逐级稀释, 配制成浓度为 2~200 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液。在最佳仪器条件下进行检测, 以克伦特罗- D_9 作为克伦特罗、喷布特罗、妥布特罗、马布特罗、溴布特罗、溴代克伦特罗、马喷特罗、西布特罗、福莫特罗、西马特罗、异丙喘宁、氯丙那林的同位素内标, 莱克多巴胺- D_3 作为莱克多巴胺的同位素内标, 氢化可的松- D_3 作为氢化可的松、泼尼松、泼尼松龙、氟米松、可的松、甲基泼尼松龙、醋酸氟氢可的松、倍氯米松、醋酸氟轻松、丙酸氯倍他索、曲安奈德、氟米松、地塞米松、布地奈德的同位素内标, 甲基睾酮- D_3 作为甲基睾酮, 雄烯二酮的同位素内标, 孕酮- D_9 作为孕酮的同位素内标。以待测物质的峰面积和相应内标的峰面积的比值

为纵坐标 (Y), 以质量浓度 (X) 为横坐标绘制标准曲线。其余化合物采用外标法, 以化合物高分辨一级质谱的质荷比进行定量, 以待测物的峰面积为纵坐标 (Y), 以质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线。以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比为依据, 确定方法的检出限与定量限 (附表 1)。

国家标准 GB/T 22286-2008 动物源性食品中多种 β -受体激动剂检测的检出限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$; GB/T 21981-2008 中动物源食品中激素多残留检测的检出限为 0.4~2.0 $\mu\text{g/kg}$; GB/T 20741-2006 中畜禽肉中地塞米松残留量检测的检出限为 0.2 $\mu\text{g/kg}$; GB/T 20758-2006 中牛肝和牛肉中孕酮残留量测定的检出限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。本实验的 50 种药物在线性范围内线性关系良好, 其线性相关系数都大于 0.99。各种药物的检出限为 0.1~0.5 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 0.3~1.5 $\mu\text{g/kg}$, 与国标检出限基本一致或较优于国标方法的检出限。

2.3.2 回收率和精密度

对检测为阴性的猪肉样品进行加标回收实验, 添加浓度水平为: 0.5、10、20 $\mu\text{g/kg}$, 每个浓度水平进行 6 次平行测试, 按 1.3 的前处理方法进行处理, 并按 1.4 的仪器工作条件进行检测, 其平均回收率和相对标准偏差结果见表 1。实验结果表明, 50 种药物的回收率在 81.74%~114.22% 之间, RSD 在 1.41%~8.91% 之间, 优于国标 GB/T 21981-2008 对动物源食品中激素多残留检测方法在 0.4~10 $\mu\text{g/kg}$ 范围内加标回收率 75.2%~121.8%, RSD 2.4%~20.8%, 本方法具有良好的准确度、精密度和重复性。

表 1 不同加标水平下 50 种药物的平均回收率和相对标准偏差 (n=6)

Table 1 Average recoveries and RSDs of 50 drugs spiked in blank samples of different levels (n=6)

No.	Compound	Recovery/%			Precision/(% RSD)		
		0.5 $\mu\text{g/kg}$	10 $\mu\text{g/kg}$	20 $\mu\text{g/kg}$	0.5 $\mu\text{g/kg}$	10 $\mu\text{g/kg}$	20 $\mu\text{g/kg}$
1	Penbutolol	98.36	97.04	100.84	5.19	3.42	2.75
2	Tulobuterol	103.44	99.39	100.06	1.58	1.41	1.32
3	Clenbuterol	102.16	109.05	97.87	4.22	6.57	4.58
4	Mabuterol	103.86	99.48	100.02	3.87	2.56	2.63
5	Salbutamol (Albuterol)	103.45	113.87	96.67	6.69	8.35	4.52
6	Terbutaline	103.72	106.50	96.05	8.99	7.41	6.62
7	Brombuterol	98.53	108.44	98.23	2.49	6.87	4.67
8	Metaproterenol (Orciprenaline)	90.26	96.39	101.51	7.43	5.46	4.86
9	Bromoclenbuterol	99.24	107.97	98.29	3.34	7.12	4.52
10	Mapenterol (Methylmabuterol)	100.75	99.40	100.22	1.56	2.07	1.84
11	Cimbuterol	95.55	99.47	100.48	3.37	1.96	1.13
12	Clorprenaline	102.43	97.30	100.61	2.26	2.42	1.41
13	Formoterol	114.22	104.96	96.37	5.73	2.59	2.66
14	Ractopamine	86.40	81.74	105.17	7.92	8.91	6.34

续表 1

No.	Compound	Recovery/%			Precision/(% RSD)		
		0.5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	0.5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg
15	Cimaterol	105.89	115.25	96.20	3.05	8.48	3.14
16	Bambuterol	88.59	92.54	94.95	8.04	8.12	7.55
17	Hydrocortisone (Cortisol)	94.72	101.07	100.15	6.46	2.59	2.31
18	Prednisone	94.17	103.33	99.62	5.93	4.45	3.12
19	Prednisolone	96.65	102.86	99.55	2.34	2.10	1.96
20	Fluoromethalone	99.32	98.58	100.47	2.57	2.63	2.85
21	Cortisone	95.73	98.01	100.83	4.67	3.55	3.62
22	Methylprednisolone	93.77	101.58	100.04	8.45	5.63	5.35
23	Fludrocortisone acetate	95.74	96.22	101.20	6.11	5.37	4.63
24	Beclomethasone	96.16	105.14	99.11	4.89	3.56	4.01
25	Fluocinonide	96.03	99.26	100.48	7.48	4.35	2.97
26	Clobetasol propionate	104.04	99.17	99.13	5.47	3.64	4.19
27	Triamcinolone acetonide	96.48	98.15	99.45	4.60	4.88	3.63
28	Flumethasone	103.42	105.97	98.80	3.76	2.65	3.27
29	Dexamethasone	98.28	102.95	99.46	3.67	3.45	2.98
30	Budesonide	96.40	102.25	99.75	3.18	1.63	1.72
31	Boldenone (Dehydrotestosterone)	96.32	102.14	99.79	4.28	3.99	3.23
32	Methyltestosterone	96.87	101.06	100.02	3.65	4.41	1.92
33	Testosterone-17-propionate	93.38	98.66	100.78	8.47	5.34	3.79
34	Nandrolone	94.96	100.95	100.15	5.52	4.96	4.66
35	Nandrolone phenpropionate	96.71	94.19	101.61	4.98	6.71	3.75
36	Nandrolone propionate	93.09	96.90	101.20	8.39	6.64	3.92
37	Trenbolone	100.87	101.50	97.36	4.32	2.34	4.83
38	Androstenedione	94.93	100.41	100.29	5.44	4.61	2.41
39	Stanozolol	101.13	97.28	100.68	3.05	3.31	2.58
40	Levonorgestrel ((-)-Norgestrel)	94.14	99.28	100.57	7.98	4.55	3.53
41	Hydroxyprogesterone acetate	95.56	98.33	100.71	4.37	2.09	1.45
42	Norethisterone	97.28	100.54	100.13	4.87	5.27	3.22
43	Melengestrol acetate	97.33	102.24	99.71	2.69	1.67	2.31
44	Norethindrone acetate	96.34	98.61	100.64	5.32	2.72	2.49
45	Chlormadinone acetate	100.44	100.56	99.88	1.59	2.17	1.92
46	Progesterone	95.27	99.76	100.43	5.31	2.34	1.98
47	Megestrol acetate	97.13	101.36	99.94	3.03	2.25	1.39
48	Medroxyprogesterone acetate	96.88	99.95	100.28	2.97	1.51	1.53
49	17 α -Hydroxyprogesterone	95.99	100.23	100.26	4.85	3.37	3.46
50	21 α -Hydroxyprogesterone	94.28	98.70	100.72	6.29	4.43	2.72

2.4 数据库的建立及快速定性筛查的应用

2.4.1 数据库的建立和对加标样的筛查验证

利用 1.5 的条件建立了 50 种违禁药物高分辨质谱筛查数据库 (附图 3), 包括化合物的名称、分子式、精确质量数、保留时间、CAS 号、不同碰撞能量下的

二级质谱图等。

该数据库可以进行化合物的快速筛查和确证, 其筛查流程如附图 4 所示。处理好的样品在相同的条件下进行一级质谱全扫描, 在数据处理软件中根据精确分子质量和保留时间按数据库查找化合物, 以精确分子质量偏差小于 5×10^{-6} 、保留时间偏差小于 0.05 min

作为定性筛查依据。将所得结果与数据库中的信息进行比对,根据精确分子质量得分、同位素丰度得分、同位素分布得分、保留时间得分四者占比 10:5:6:10 进行综合打分,最终得分小于 75 分的鉴定为阴性样品,并且对得分大于等于 75 分的疑似性样品进行进一步确证。阳性样品经过二级特征碎片离子扫描后,按 Targeted MS/MS 查找化合物,利用检索谱库识别化合物的功能,以仪器类型、碰撞能量为标准进行检索,与数据库中二级谱图作镜像比对,软件自动生成得分,对于匹配得分值大于 80 的化合物,确认该样品为阳性样品。

对建立的 50 种违禁药物的高分质谱数据库进行定性筛查能力的考察。选取畜禽类阴性样品加标,按 1.3 前处理方法处理后供 UPLC-Q-TOF/MS 检测,将样品中 50 种违禁剂类药物检测结果与数据库进行比对,50 种激素类化合物与一级精确质量数据库检索匹配的质量偏差均小于 5×10^{-6} ,检索得分均高于 80 分(附表 2)。

2.4.2 实际畜禽肉样品中违禁药物的快速筛查

以猪肉阴性样品中添加马布特罗为例,附图 5 为马布特罗一级提取离子流色谱图。将该结果与数据库中的理论值进行比对,其相对分子质量、保留时间、同位素比例及其分布等均匹配良好,一级检索得分为 98.81,初步确定马布特罗为疑似药物。

通过二级质谱的碎片离子进行进一步的确认,待测化合物与数据库中二级质谱图的镜像对比,以化合物的特征碎片离子为主要评价依据,进行进一步的确认分析。图 3 为马布特罗的二级质谱镜像对比结果,可以看到其主要的碎片离子峰与谱图库匹配较好,得分为 99.23 分。

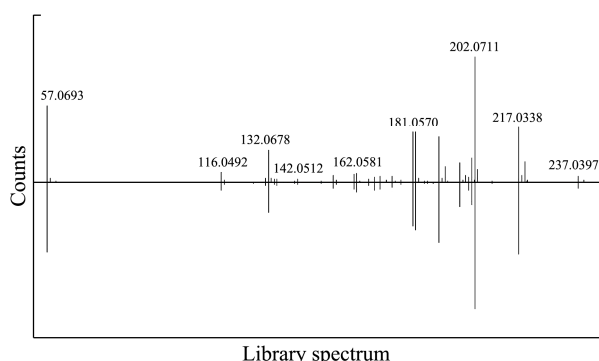


图 3 马布特罗二级质谱镜像对比图

Fig.3 MS/MS spectral difference results of mabuterol

3 结论

本实验建立了超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法筛查畜禽类中 50 种违禁药物的分析方法,考察

了提取溶剂、固相萃取柱的选择,调试仪器参数,最终确定乙酸乙酯-叔丁基甲醚提取、HLB 固相萃取小柱净化为最优的前处理方法,以 0.1%甲酸水溶液、乙腈为流动相,在正离子模式下扫描检测。在样品前处理中加入同位素内标,不仅能去除复杂基质带来的基质效应的影响,还能降低在样品前处理过程中的损失从而提高回收率。该方法检出限为 0.1~0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,线性相关系数均大于 0.99,在 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个不同浓度加标的回收率于 81.74%~114.22% 之间,相对标准偏差为 1.41%~8.91%。将本文建立的方法与国标方法进行比较,该方法优于国家标准,可以应用于实际样品中的违禁药物检测。研究建立了 50 种药物的质谱数据库,该数据库包括化合物的名称、分子式、精确质量数、保留时间、CAS 号、不同碰撞能量下的二级质谱图等。并验证了该高分质谱数据库进行定性筛查能力,无需对照品就可实现较为准确的定性分析。

参考文献

- [1] 曹忠波,曹歌,张媛媛,等.同位素稀释-气相色谱-串联质谱法测定熟肉中多组分 β -受体激动剂[J].食品安全质量检测学报,2020,11(24):9140-9146
CAO Zhongbo, CAO Ge, ZHANG Yuanyuan, et al. Determination of multi-residue β -agonists in cooked meat by isotope dilution-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(24): 9140-9146
- [2] 于慧娟,张珊珊,张晓玲,等.同位素稀释-液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中雌激素、孕激素和雄激素[J].质谱学报,2014,35(2):170-178
YU Huijuan, ZHANG Shanshan, ZHANG Xiaoling, et al. Simultaneous determination of the estrogen, progesterone and androgen in aquatic products by isotope dilution-LC-MS/MS [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2014, 35(2): 170-178
- [3] 郭添荣,吴文林,张崑,等.基于 UHPLC-Q/Orbitrap 高分辨质谱多目标快速筛查鱼肉中 30 种蛋白同化激素及糖皮质激素[J].食品科学,2022,4:321-330
GUO Tianrong, WU Wenlin, ZHANG Yin, et al. Multi-objective rapid screening of 30 protein assimilation hormones and glucocorticoids in fish based on UHPLC-Q/Orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Food Science, 2022, 4: 321-330
- [4] P Chotiyarnwong, E V McCloske. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for

- treatment [J]. Nat. Rev. Endocrinol, 2020, 16: 437-447
- [5] Pengfei Jin, Xiaoli Liang, Xuejun Wu, et al. Screening and quantification of 18 glucocorticoid adulterants from herbal pharmaceuticals and health foods by HPLC and confirmed by LC-Q-TOF-MS/MS [J]. Food Addit. Contam, 2018, 35: 10-19
- [6] Genye He, Linghui Sheng, Jianli Zhang, et al. Enantiomeric analysis of clenbuterol in Chinese people by LC-MS/MS to distinguish doping abuse from meat contamination [J]. Bioanalysis, 2020, 12: 783-790
- [7] K Walpurgis, A Thomas, H Geyer, et al. Dietary supplement and food contaminations and their implications for doping controls [J]. Foods, 2020, 9: 1-21
- [8] P Marchand, B Le Bizec, C Gade, et al. Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2000, 867: 219-233
- [9] Anna Demurtas, Silvia Pescina, Sara Nicoli, et al. Validation of a HPLC-UV method for the quantification of budesonide in skin layers [J]. J. Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2021, 1164: 122512
- [10] 郭蓉,孙谦,赵宇鑫,等.三重四极杆气质联用法测定熟肉及其制品中多组分 β -受体激动剂残留量[J].环境化学,2019,38(1):231-234
GUO Rong, SUN Qian, ZHAO Yuxin, et al. Determination of multi-component beta-agonist residues in meat and its products by triple quadrupole gas chromatography-mass spectrometry [J]. Environment Chemistry, 2019, 38(1): 231-234
- [11] 杨丽君,徐成钢,安代志,等.膜透析/高效液相色谱-串联质谱法测定畜产品中9种 β -受体激动剂残留[J].现代食品科技,2015,31(11):298-306
YANG Lijun, XU Chenggang, AN Daizhi, et al. Analysis of nine β -Agonist residues in livestock products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with membrane dialysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(11): 298-306
- [12] 肖雪花,梁斯,雷宇绯,等.超高效液相色谱-串联四极杆质谱法测定畜禽肉组织中的四环素类抗生素及 β -受体激动剂残留[J].华南预防医学,2014,40(2):188-191
XIAO Xuehua, LIANG Si, LEI Yufei, et al. Determination of tetracycline antibiotics and β -receptor agonist residues in livestock and poultry meat tissues by ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. South China J Prev Med, 2014, 40(2): 188-191
- [13] 曾广丰,谢建军,王志元,等.QuEChERS 前处理结合 HPLC-Q-TOF/MS 非靶向快速筛查凉茶中的非法添加物[J].分析测试学报,2019,38(4):429-434
ZENG Guangfeng, XIE Jianjun, WANG Zhiyuan et al. Non-target screening of illegal additive residues in herbal teas by high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with QuEChERS purification [J]. Journal of Instrument Analysis, 2019, 38(4): 429-434
- [14] 余璐,宋伟,吕亚宁,等.超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查茶叶中的 204 种农药残留[J].色谱,2015,33(6):597-612
YU Lu, SONG Wei, LV Yanning, et al. Rapid determination of 204 pesticide residues in tea by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time flight mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2015, 33(6): 597-612
- [15] M Calderón-Santiago, F Priego-Capote, B Jurado-Gámez, et al. Optimization study for metabolomics analysis of human sweat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode [J]. J Chromatogr A, 2014, 1333: 70-78
- [16] 李杨杰,赵祥龙,岑立怡,等.高分辨质谱对化妆品中非法添加标准外糖皮质激素的快速筛查及应用[J].百科香精化妆品,2018,2(1):58-62
LI Yangjie, ZHAO Xianglong, CEN Liyi, et al. Rapid screening and detection of glucocorticoids illegally added in cosmetics by Q-TOF method [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2018, 2(1): 58-62
- [17] Khwanta Kaewnarin, Suphitcha Limjiasahapong, Narumol Jariyasopit, et al. High-resolution QTOF-MRM for highly accurate identification and quantification of trace levels of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* mycelium [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2021, 32(9): 2451-2462
- [18] R Padilla, V Gaillard, T N Le, et al. Development and validation of a UHPLC-ESI-QTOF mass spectrometry method to analyze opines, plant biomarkers of crown gall or hairy root diseases [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2021, 1162: 122458
- [19] N S Chindarkar, H D Park, J A Stone, et al. Comparison of different time of flight-mass spectrometry modes for small molecule quantitative analysis [J]. J Anal Toxicol, 2015, 39: 675-685