

QTRAP[®]质谱系统对动物源食品中105种兴奋剂的快速分析检测

Quick Determination of 105 Doping in Animal – derived Food by QTRAP[®] System

杨总¹, 陈丹², 程海燕¹, 李立军¹, 郭立海¹

Yang Zong¹, Chen Dan², Cheng Haiyan¹, Li Lijun¹, Guo Lihai¹

¹ SCIEX亚太应用支持中心, 上海; ² 湖北省武汉食品化妆品检验所

¹ SCIEX Asia Pacific Application Support Center, Shanghai, China; ² Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Hubei Province, China;

Keywords : doping; SCIEX QTRAP[®] 4500 系统; LC-MS/MS; quantitative analysis

引言

在现代畜牧养殖业中, 一些不法分子长期使用各种饲料添加剂和人工合成激素类化合物, 造成动物源食品中的药物残留, 最终成为食源性兴奋剂的来源^[1]。运动员食用含有某些药物残留的食物, 可导致其兴奋剂检测呈阳性。国家反兴奋剂中心和世界反兴奋剂机构(WADA)等组织机构明确规定了兴奋剂的违禁药物的种类, 主要包含了 β -受体激动剂、固醇类激素、糖皮质激素、利尿剂、玉米赤霉醇类等等。总体而言, 兴奋剂的作用主要是对身体或者中枢神经系统起到选择性的作用, 能促进肌肉组织快速增长、增强机体活力和敏捷度, 还可使运动员疲劳减轻, 自信心增强, 注意力集中^[2]。因此在体育赛事过程中, 为了保证赛事结果的公平、公正, 在运动员食品安全保障过程中, 必须对食品中兴奋剂进行严格的监控。本文针对动物源食品中的常见105种兴奋剂, 建立了采用QTRAP[®]系统快速筛查和定量方法, 该方法完全满足在体育赛事过程中对兴奋剂监管的分析要求。

该方案的特点和优势

1. 方法覆盖面广, 包含了常见五大类 β -受体激动剂、固醇类激素、糖皮质激素、利尿剂、玉米赤霉醇类兴奋剂, 共105种;
2. 本实验详细优化了前处理过程, 考察了化合物的稳定性;
3. 实验采用MRM-IDA-EPI扫描实现一针进样同时定量和定性分析, 快速灵敏, 满足国内外标准品的要求;



SCIEX ExionLC™液相和SCIEX QTRAP[®] 4500质谱系统

4. 建立好了105种兴奋剂EPI二级谱库, 软件自动进行匹配二级质谱图, 保证筛查结果准确可靠;
5. 方法现成, 省去开发方法的时间, 提高了工作效率;

1. 实验方法

1.1 液相色谱条件

色谱柱: Phenomenex Kinetex 2.6 μ m F5 100 Å 150 × 3 μ m

流动相: 水相(水中含有5 mM乙酸铵和0.01%甲酸), 有机相为乙腈, 梯度洗脱

1.2 质谱条件

扫描模式: MRM-IDA-EPI, 正负离子同时扫描, MRM离子对见表1。

离子源：ESI源；离子源参数：喷雾电压（IS）：5500V（+）/-4500V（-）；离子源温度：600℃；气帘气（CUR）：35psi；碰撞气（CAD）：Medium；雾化气（GS1）：55psi；辅助雾化气（GS2）：60psi

1.3 样品前处理过程

称取5g样品于50 mL离心管 → 加入10 mL乙酸铵缓冲溶液混匀 → 加入β-葡萄糖醛苷酶进行酶解 → 加入酸化乙腈进行提取，震荡混匀后加入NaCl和Mg₂SO₄ → 萃取之后高速离心取上清液采用PRIME HLB进行净化 → 吹干后复溶上机测试。

2. 结果与讨论

2.1 前处理过程的优化

本实验详细优化了前处理过程，实验结果表明在动物源食品中酸化乙腈的提取效率最高，绝大部分化合物回收率在70%以上（见图1、图2、图3）。由于基质的复杂性，实验比较了5种不同的SPE柱的净化效率，由图4可以看出，PRIME HLB 净化效果最优异，回收率较高。

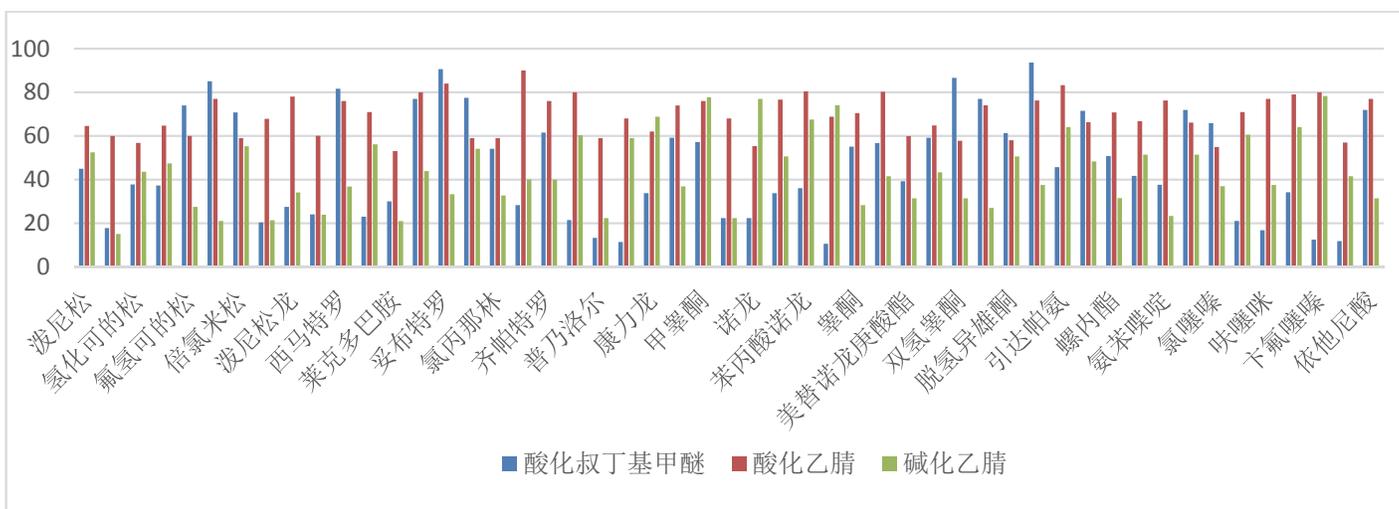


图1. 在鸡蛋基质中不同萃取溶剂对回收率的影响。

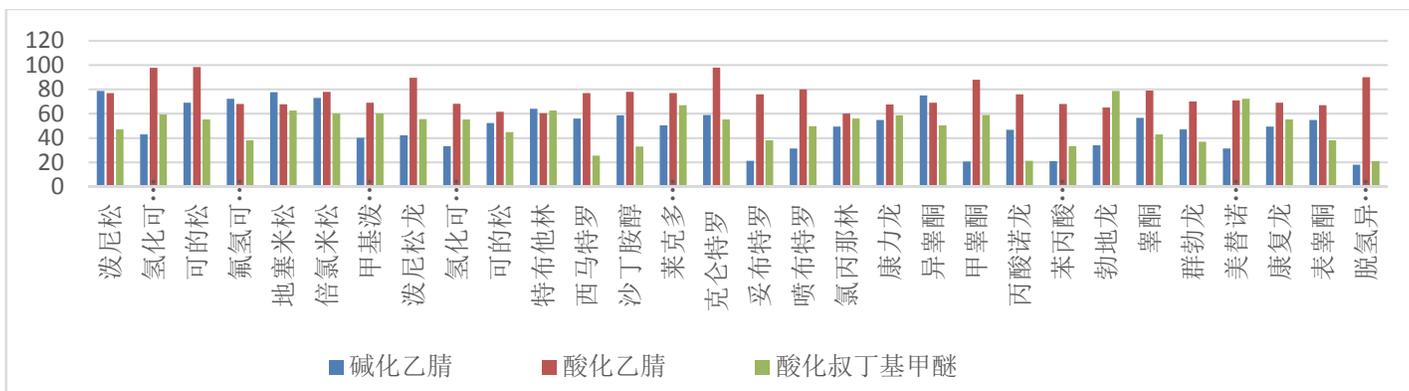


图2. 在牛奶基质中不同萃取溶剂对回收率的影响。

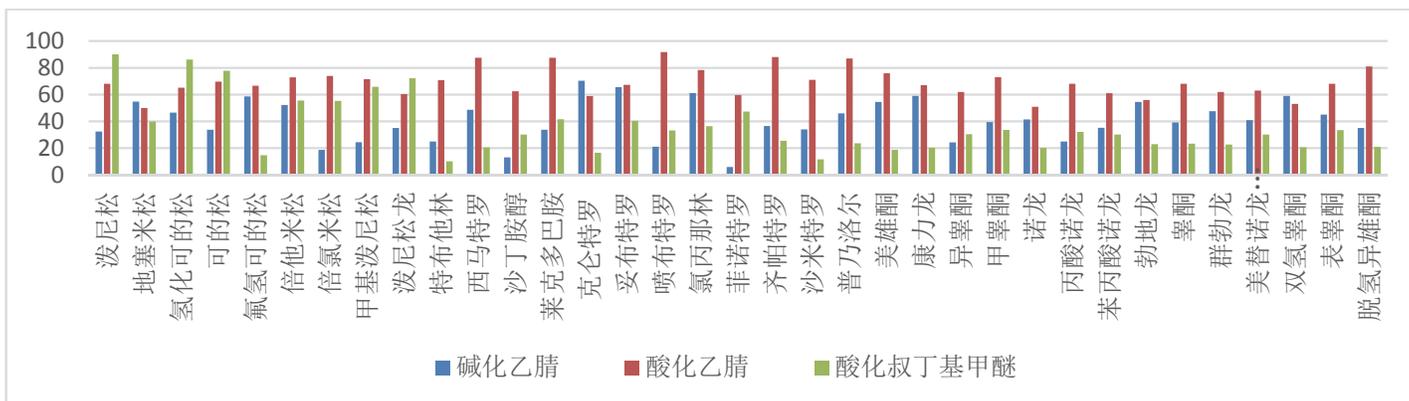


图3. 在瘦肉基质中不同萃取溶剂对回收率的影响。

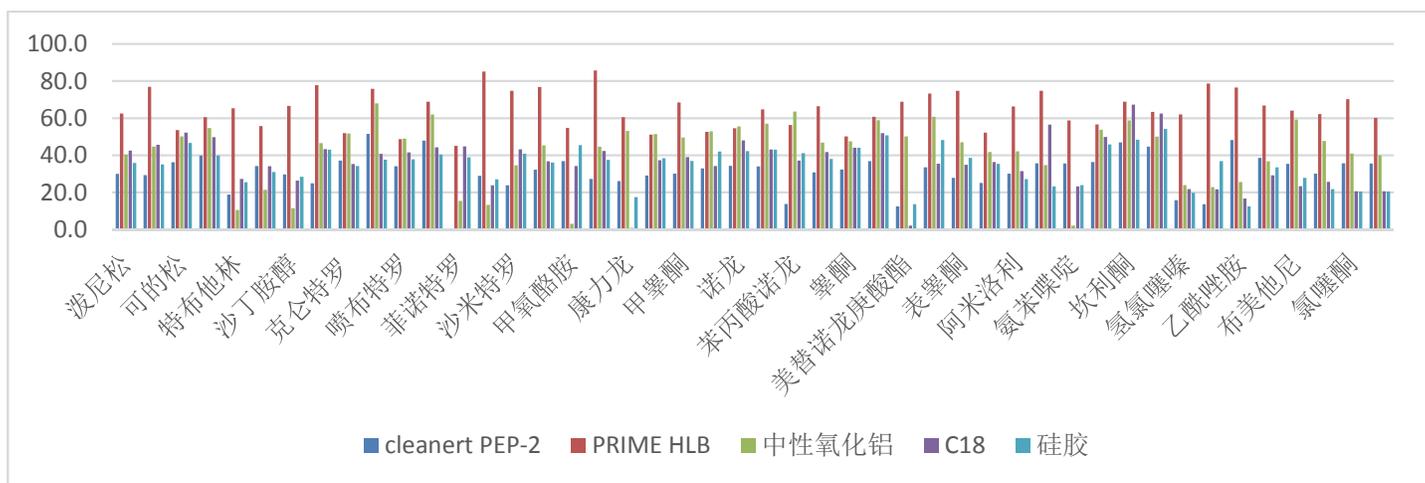


图4. 不同萃取小柱对回收率的影响。

2.2 色谱条件的优化

本实验比较BEH C18、ODS C18、F5色谱柱对105种兴奋剂的分离情况，实验发现F5色谱柱对极性较强的利尿剂、 β -受体激动剂和对极性较弱的固醇类激素均有较好的保留，色谱峰尖锐（图5），因此实验采用F5柱进行分离105种兴奋剂。

2.3 化合物稳定性考察

化合物在电离过程中，由于某些基团吉布斯自由能较低，结构不稳定，容易发生源内裂解。例如利尿剂螺内酯（图6），母

离子为471.2，在源内裂解时易丢失基团 CH_3COS （吉布斯自由能为 -133.57KJ/mol ），于是定量分析是选择母离子为341.2响应值更高，信号更稳定。另外有一部分固醇类激素含有醇羟基，易发生源内裂解产生丢失水峰，诸多情况均可采用源内裂解的碎片作为母离子，响应值更高，信号更稳定。

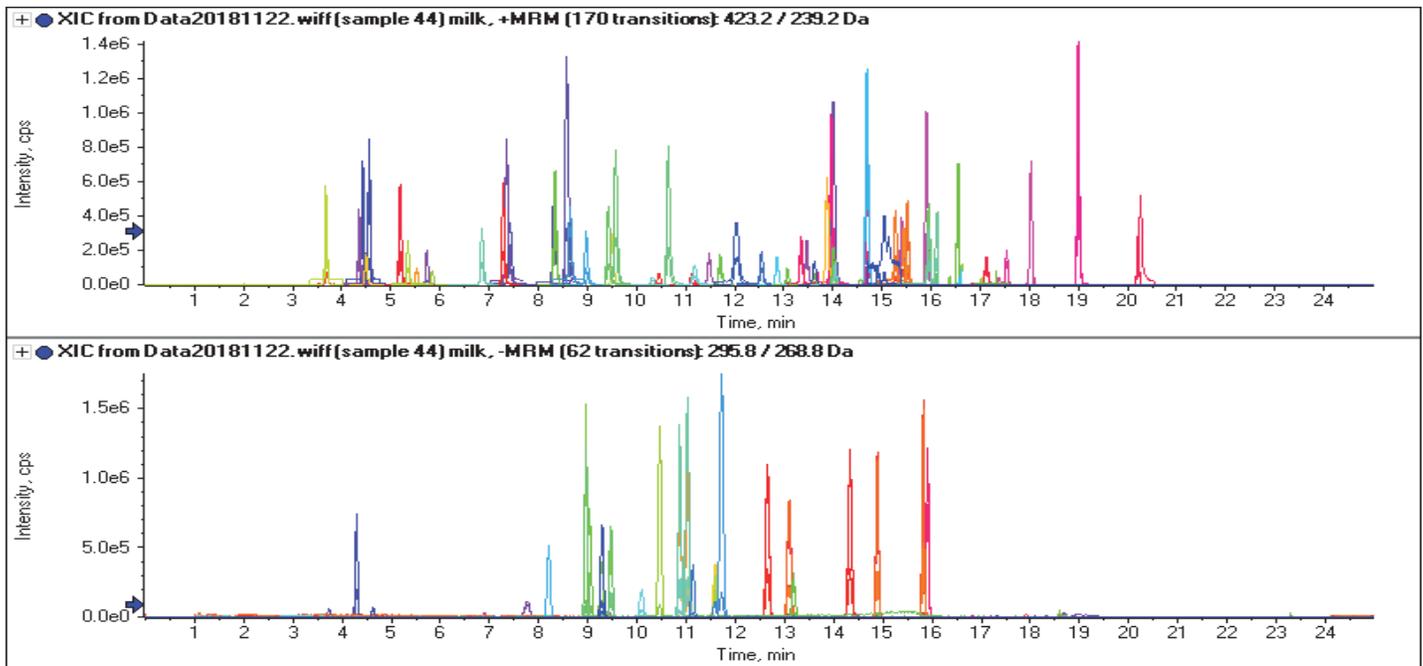


图5. 牛奶基质中10 $\mu\text{g/L}$, 105种兴奋剂色谱图（正负同时扫描，上图为正离子，下图为负离子）。

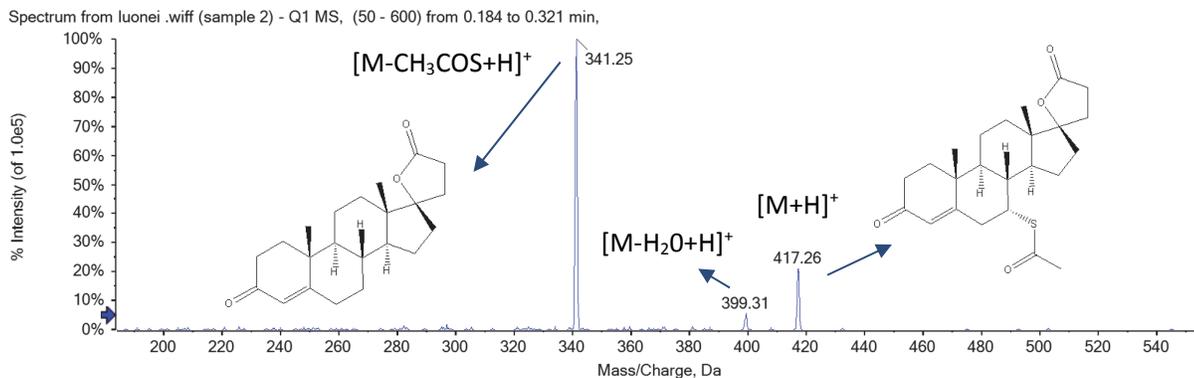


图6. 利尿剂螺内酯的源内裂解过程。

2.4 实际样本的检测

该实验检测方法简单高效，一针进样正负同时扫描，且结合 QTRAP[®]质谱系统独有的MRM-IDA-EPI复合型扫描功能同时获得MRM图和高灵敏度的二级子离子扫描图（EPI图），MRM图可以进行定量分析，增强二级子离子EPI图跟常规的四极杆二级扫描图相比灵敏度提高了两个数量级以上，EPI图可以进行谱库检索，使得定性鉴定结果更加准确可靠。

本文建立了105种兴奋剂的增强二级子离子EPI指纹谱库，包含化合物的分子式、名称、CAS号、结构式、且不同能量碎裂的全质量范围的增强型二级碎裂图。检测结果疑似阳性样品EPI图通过软件自动与标准EPI谱库进行比对，通过得分的高低可以保证定性结果更加准确。

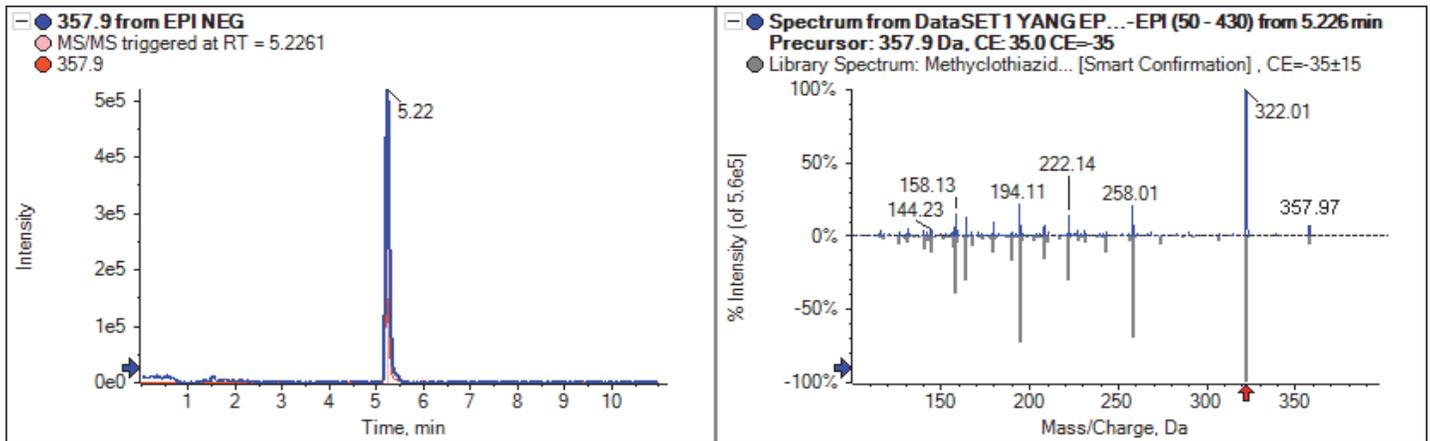


图7. 牛奶基质中检测到甲氯噻嗪（左图为MRM，右图为EPI谱库检测）。

在2018年9月全国赛艇锦标赛期间，冯某某和杜某某食用牛奶，某检测机构检测到牛奶基质含有非法添加的利尿剂甲氯噻嗪，并且对该两名运动员尿液和血液进行分析检测，均含有该化合物，并且结合EPI谱库检索到含有该兴奋剂（图7）。于是某省水上运动协会贴出告示取消该运动员在比赛期间的成绩以及奖项，并且禁赛1年，负担期间兴奋剂检测项目的费用。

3. 小结

本文采用QTRAP® 4500质谱系统独有的MRM-IDA-EPI扫描模式建立了动物源食品中五大类共105种兴奋剂的快速筛查和定量方法，完全满足国内外标准的要求。该实验方法一针进样同时得到高质量的MRM图和二级EPI指纹谱图，使得定性鉴定和准确定量同时完成，省时省力。

该实验详细优化了样品前处理过程，提取溶剂采用酸化乙腈，SPE采用PRIME HLB小柱有效的提高了回收率。考察了化合物的稳定，对于易发生源内裂解的化合物，可以采用源内裂解碎片作为母离子进行分析检测，灵敏度更高，稳定性更好。

实验针对105种兴奋剂专门建立了EPI指纹谱库，QTRAP®系统独有的EPI增强子离子扫描比常规的四极杆二级扫描的灵敏度高出两倍以上，并且EPI图是在多个不同能量下获得全谱图，即使对于如鸡蛋、牛奶、瘦肉复杂的动物源食品基质中的低浓度兴奋剂仍然可以获得高质量的二级碎片图，软件自动将样品的EPI图与标准谱库的EPI相匹配使得鉴定结果更准确，保证了体育赛事的公平、公正。

参考文献

- [1] 齐鹤鸣, 韩深, 吕美玲, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛肉中的18种食源性兴奋剂药物残留 [J]. 色谱, 2018, 36(7): 621-628.
- [2] Timmy. L. S. C, Karen Y. K, Wai H. K, et al. Detection of seventy-two anabolic and androgenic steroids and / or their in horse hair using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in multiplexed targeted ms2 mode [J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1566 (7): 51-63.

表1. 105种兴奋剂MRM离子对。

CAS号	英文名	中文名	Q1	Q3	DP	CE
23031-25-6	Terbutaline	特布他林	226.2	152.1	36	21
			226.2	125.1	36	33
54239-37-1	Cimaterol	西马特罗	220.2	202.2	30	15
			220.2	160.1	30	23
18559-94-9	Salbutamol	沙丁胺醇	240.2	148.1	35	27
			240.2	222.2	35	15
97825-25-7	Ractopamine	莱克多巴胺	302.2	164.1	50	22
			302.2	284.2	50	17
37148-27-9	Clenbuterol	克仑特罗	277.2	203.1	45	22
			277.2	259.2	45	15
41570-61-0	Tulobuterol	妥布特罗	228.1	154.1	33	22
			228.1	172.1	33	16
36507-48-9	Penbutolol	喷布特罗	292.2	236.2	45	22
			292.2	201.2	45	28
3811-25-4	Clorprenaline	氯丙那林	214.1	196.1	26	15
			214.1	154.1	26	22
13392-18-2	Fenoterol	菲诺特罗	304.1	135.1	41	41
			304.1	107.1	41	46
117827-79-9	Zilpaterol	齐帕特罗	262.2	244.1	50	16
			262.2	185.1	50	31
89365-50-4	Salmeterol	沙米特罗	416.3	380.2	80	25
			416.3	232.2	80	31
554-52-9	dopamine	甲氧酪胺	168.1	151.1	40	14
			168.1	91	40	32
525-66-6	Propranolol	普萘洛尔	260.1	183.1	50	22
			260.1	116	50	25
29122-68-7	Atenolol	阿替洛尔	267.1	145.1	45	35
			267.1	190.1	45	25
868049-49-4	Olodaterol	奥达特罗	387.1	163.1	40	26
			387.1	207.1	40	26
586-06-1	Orciprenaline	奥西那林	212.1	152.1	30	23
			212.1	194.1	30	17
72332-33-3	Procaterol	丙卡特罗	291	231.1	30	27
			291	273.1	30	19
73573-87-2	Formoterol	福莫特罗	345.1	121	40	40
			345.1	149.1	40	25
37158-47-7	Clenpenterol	克伦潘特	291	203	30	22
			291	132.1	30	37
56341-08-3	Mabuterol	马布特罗	311	237	40	23
			311	217	40	34
54238-51-6	Mapenterol	马喷特罗	325	237.1	60	23
			325	216.9	60	33
38339-18-3	HydroxyMethylclenbuterol	羟甲基克伦特罗	293	203	30	25
			293	132.1	30	39
41937-02-4	Brombuterol	溴布特罗	367	293	50	24
			367	212	50	39

CAS号	英文名	中文名	Q1	Q3	DP	CE
78982-84-0	Bromochlorobuterol	溴代克伦特罗	323	249.1	30	23
			323	305	30	15
312753-06-3	Indacaterol	印达特罗	393.1	173.1	104	32
			393.1	375.1	104	22
503070-58-4	Vilanterol	维拉特罗	486.1	159	50	49
			486.1	450.1	50	27
5843-65-2	Demethyl-Coclaurine	去甲乌药碱	272.1	107	50	31
			272.1	255.1	50	20
1346746-81-3	phenylethanolamine A	苯乙醇胺A	345.3	150.2	33	30
			345.3	327.3	33	17
54063-54-6	Reproterol	瑞普特罗	390.1	372.2	40	23
			390.1	221.2	40	35
80474-14-2	Fluticasone propionate	氟替卡松丙酸酯	501.1	293.1	40	22
			501.1	313.2	40	18
25122-46-7	clobetasol propionate	氯倍他索丙酸酯	467.1	355.2	40	18
			467.1	373.2	40	15
1177-87-3	Dexamethasone-17-acetate	醋酸地塞米松	435.2	309.2	35	18
			435.2	337.1	35	17
356-12-7	Fluocinonide	醋酸氟轻松	495.1	337.1	80	22
			495.1	319.1	80	24
52-21-1	Prednisolone-21-acetate	醋酸泼尼松龙	403.1	147.1	34	30
			403.1	307.1	34	18
3870-07-3	Triamcinolone acetonide 21-acetate	醋酸曲安奈得	477.1	321.1	40	24
			477.1	339.2	40	20
5534-09-8	Beclomethasone dipropionate	二丙酸倍氯米松	521.1	503.2	65	15
			521.1	319.1	65	21
5593-20-4	Betamethasone Dipropionate	二丙酸倍他米松	505.2	279.2	40	23
			505.2	319.1	40	21
514-36-3	Fludrocortisone acetate	倍他米松戊酸酯	477.2	279.1	60	24
			477.2	355.2	60	16
2152-44-5	Betamethasone 17-valerate	曲安奈得	435.1	339.1	40	19
			435.1	397.2	40	19
76-25-5	Triamcinolone acetonide	曲安西龙	395.1	225.1	40	25
			395.1	357.2	40	17
124-94-7	Triamcinolone	醋酸氟氢可的松	423.2	239.2	140	34
			423.2	181.1	140	41
153-00-4	Metenolone	甲基异睾酮	303.1	201.1	120	25
			303.1	145.1	120	35
434-07-1	Oxymetholone	康复龙	333.2	99	150	38
			333.2	119.1	150	44
846-48-0	Boldenone	勃地龙	287.2	121.1	60	29
			287.2	135.1	60	20
57-85-2	Testosterone propionate	丙酸睾酮	345.3	97.1	110	27
			345.3	109.1	110	31
10161-33-8	Trenbolone	群勃龙	271.1	253.2	95	27
			271.1	199.1	95	31

CAS号	英文名	中文名	Q1	Q3	DP	CE
10418-03-8	Stanozolol	康力龙	329.2	81.1	180	80
			329.2	121.1	180	47
72-63-9	Metandienone	美雄酮	301.2	121.1	70	32
			301.2	149.2	70	21
7207-92-3	Nandrolone 17-propionate	丙酸诺龙	331.2	145.1	95	31
			331.2	239.2	95	15
62-90-8	Nandrolone phenylpropionate	苯丙酸诺龙	407.2	105.1	95	30
			407.2	257.2	95	23
58-18-4	17-Methyltestosterone	甲睾酮	303.1	97.1	130	29
			303.1	109.1	130	32
434-22-0	Nandrolone	诺龙	275.2	109.1	115	33
			275.2	257.2	115	22
303-42-4	Methenolone enanthate	美替诺龙庚酸酯	415.1	83	125	26
			415.1	187.1	125	29
58-22-0	Testosterone	睾酮	289.2	97.1	190	27
			289.2	109.1	190	31
521-18-6	Stanolone	双氢睾酮	291.2	159.1	140	30
			291.2	255.3	140	20
481-29-8	Epiandrosterone	表雄酮	291.2	273.1	120	14
			273.1	255.2	150	20
53-43-0	Dehydroepiandrosterone	脱氢异雄酮	271.1	213.2	145	21
			271.1	197.2	145	25
734-32-7	Norandrostenedione	去甲雄烯二酮	273.1	109.1	84	32
			273.1	197.1	84	24
17230-88-5	Danazol	达那唑	338.1	148.1	140	31
			338.1	310.2	140	27
76-43-7	Fluoxymesterone	氟甲睾酮	337.1	241.2	140	32
			337.1	131.1	140	40
58-20-8	Testosterone cypionate	环戊丙酸睾酮	413.2	79.1	130	72
			413.2	107.1	130	30
72-63-9	Metandienone	甲氢睾酮	305.1	173.1	125	31
			305.1	269.2	125	23
5949-44-0	Testosterone undecanoate	十一酸睾酮	457.3	253.2	110	27
			457.3	97	110	60
15262-86-9	Testosterone isocaproate	异己酸睾酮	387.2	97.1	90	27
			387.2	109.1	90	30
434-05-9	Methenolone acetate	美替诺龙醋酸酯	345.1	83.1	60	25
			345.1	187.2	60	27
521-10-8	Methandriol	美雄醇	287.1	159.1	145	29
			287.1	213.1	145	22
521-11-9	Mestanolone	美雄诺龙	305.101	269.2	150	22
			305.1	229.1	150	26
63-05-8	Androstenedione	雄烯二酮	287.1	97.1	110	29
			287.1	109	110	33
1045-69-8	Testosterone acetate	醋酸睾酮	331.1	97.1	80	26
			331.1	109.1	80	29
153-00-4	Metenolone	美替诺龙	303.1	187.2	140	29
			303.1	83	140	26

CAS号	英文名	中文名	Q1	Q3	DP	CE
2016-88-8	Amiloride	阿米洛利	230	171.1	55	23
			230	116	55	42
26807-65-8	Indapamide	引达帕氨	366.1	132.1	44	22
			366.1	117	44	59
396-01-0	2,4,7-Triamino-6-phenylpteridine	氨苯喋啶	254.1	237.1	140	37
			254.1	104.1	140	49
52-01-7	Spironolactone	螺内酯	341.2	107.1	150	32
			341.2	187.2	150	30
976-71-6	Canrenone	坎利酮	341.1	107.1	150	32
			341.1	187.2	150	30
17560-51-9	Metolazone	美托拉宗	365.9	259	125	28
			365.9	178.9	125	51
58-55-9	Theophylline	茶碱	181	124	50	25
			181	69	50	34
378-44-9	Betamethasone	倍他米松	437.1	361	-50	-21
			437.1	306.9	-50	-40
4419-39-0	Beclomethasone	倍氯米松	453.1	377	-50	-20
			453.1	406.9	-50	-17
83-43-2	Methylprednisolone	甲基泼尼松龙	419.1	343.1	-40	-21
			419.1	372.8	-40	-16
50-24-8	Prednisolone	泼尼松龙	405	329.1	-40	-22
			405	358.9	-40	-14
50-02-2	Dexamethasone	地塞米松	437.1	361	-50	-21
			437.1	306.9	-50	-40
53-03-2	Prednisone	泼尼松	403	327	-40	-18
			403	357.1	-40	-12
50-23-7	Hydrocortisone	氢化可的松	407.1	331.1	-42	-23
			407.1	361.1	-42	-16
53-06-5	Cortisone	可的松	405.2	329.11	-40	-20
			405.2	301.1	-40	-28
2135-17-3	flumethasone	氟米松	455.1	379	-35	-24
			455.1	409	-35	-16
127-31-1	Fludrocortisone	氟氢可的松	425.1	349	-105	-26
			425.1	379.1	-105	-15
1247-42-3	Meprednisone	甲泼尼松	417.1	341	-30	-18
			417.1	313.2	-30	-25
17924-92-4	Zearalenone	玉米赤霉烯酮	317.01	273.1	-135	-27
			317.01	175	-135	-32
5975-78-0	Zearalanone	玉米赤霉酮	319.01	275	-125	-29
			319.01	205	-125	-31
26538-44-3	α -Zearalanol	α -玉米赤霉醇	321.01	277.1	-140	-31
			321.01	303	-140	-30
42422-68-4	β -Zearalanol	β -玉米赤霉醇	321	277.1	-140	-31
			321	303	-140	-30
36455-72-8	α -Zearalenol	α -玉米赤霉烯醇	319	275.001	-120	-28
			319	301.001	-120	-28
71030-11-0	β -Zearalenol	β -玉米赤霉烯醇	319	275	-120	-28
			319	301	-120	-28

CAS号	英文名	中文名	Q1	Q3	DP	CE
73-48-3	bendroflumethiazide	卞氟噻嗪	419.9	288.9	-160	-32
			419.9	328.1	-160	-35
77-36-1	Chlortalidone	氯噻酮	336.9	145.9	-120	-25
			336.9	189.9	-120	-23
58-54-8	Ethacrynic acid	依他尼酸	300.9	242.9	-20	-13
			300.9	206.9	-20	-36
58-93-5	Hydrochlorothiazide	氢氯噻嗪	295.8	268.8	-60	-27
			295.8	204.9	-60	-30
58-94-6	Chlorothiazide	氯噻嗪	293.9	213.9	-100	-38
			293.9	178.7	-100	-57

CAS号	英文名	中文名	Q1	Q3	DP	CE
59-66-5	Acetazolamide	乙酰唑胺	221	82.9	-50	-22
			221	57.8	-50	-18
54-31-9	Furosemide	呋塞米	328.9	284.9	-35	-21
			328.9	204.9	-35	-29
28395-03-1	Bumetanide	布美他尼	363.1	207	-35	-28
			363.1	318.9	-35	-20
56211-40-6	Torasemide	托拉塞米	347	195.5	-40	-44
			347	262	-40	-20
135-07-9	Methyclothiazide	甲氯噻嗪	357.9	321.9	-50	-17
			357.9	257.9	-50	-24

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9756-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司

地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX