

QuEChERS-UPLC-Q/Orbitrap MS 法快速测定 草鱼中 14 种糖皮质激素类药物残留

Rapid determination of 14 glucocorticoids in grass carp using
QuEChERS coupled with UPLC-Q/Orbitrap MS

李 涛¹ 杨 潇² 孙桂芳¹ 宋 阳¹ 周兴旺¹

LI Tao¹ YANG Xiao² SUN Gui-fang¹ SONG Yang¹ ZHOU Xin-wang¹

(1. 湖南省食品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410111; 2. 长沙商贸旅游职业技术学院, 湖南 长沙 410004)

(1. Hunan Provincial Food Quality Supervision and Inspection Institute, Changsha, Hunan 410111, China;

2. Changsha Commerce & Tourism College, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:运用 QuEChERS 前处理技术, 结合超高效液相色谱—四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q/Orbitrap MS) 建立草鱼中 14 种糖皮质激素类药物残留的快速检测方法。结果表明: 14 种糖皮质激素在 2.0 ~ 100.0 ng/mL 时具有良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.999$), 方法检出限为 1.3 ~ 6.0 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 4.5 ~ 20.0 $\mu\text{g/kg}$, 加标回收率为 76.9% ~ 103.3%, RSD ($n=6$) 为 1.6% ~ 6.3%。该方法简单高效、准确度高, 适用于大批量草鱼中糖皮质激素的快速检测。

关键词: QuEChERS; 四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 糖皮质激素; 草鱼

Abstract: A simple and rapid method for the simultaneous determination of 14 kinds of glucocorticoids in grass carp was developed by the QuEChERS method coupled with ultra performance liquid chromatography quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q/Orbitrap MS). The results indicated that the linearity of all the 14 glucocorticoids ranged from 2.0 ng/mL to 100.0 ng/mL with the correlation coefficients greater than 0.999. The LOD is in the range of 1.3 ~ 6.0 $\mu\text{g/kg}$ and the LOQ is in the range of 4.5 ~ 20.0 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries were in the range of 76.9% to 103.3%, with the precursor ions ($n=6$) in the range of 1.6% ~ 6.3%. The method was simple, rapid, accurate, and suitable for the rapid detection of glucocorticoids in grass carp.

Keywords: QuEChERS; quadrupole/electrostatic field orbitrap

基金项目: 湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目 (编号: 湘食药科 R201814)

作者简介: 李涛, 男, 湖南省食品质量监督检验研究院高级工程师, 硕士。

通信作者: 杨潇 (1986—), 女, 长沙商贸职业技术学院讲师, 硕士。
E-mail: 31884210@qq.com

收稿日期: 2019-07-04

high resolution mass spectrometry (Q/Orbitrap MS); glucocorticoids; grass carp

水产品中药物残留一直是社会的关注热点。糖皮质激素是由肾上腺皮质中束状带分泌的一类甾体激素, 属于固醇类激素, 能调节脂肪、蛋白质等生物合成与代谢, 具有抑制免疫应答、抗炎、抗过敏、抗毒素等作用^[1-2], 广泛应用于人类医疗。糖皮质激素还可以提高蛋白转换率, 促进动物生长, 一些饲养者在畜禽养殖过程中非法过量使用该药物, 导致水产品中药物残留^[3]。为保障食品安全, 农业部第 235 号公告规定, 水产品中不得检出糖皮质激素类药物残留。

目前, 糖皮质激素类测定法主要有高效液相色谱法^[4-5]、液质联用法^[6-9]、微生物法^[8]、毛细管色谱法^[9]等。高效液相色谱法灵敏度低, 选择性差; 微生物法方便快捷, 但易出现假阳性, 且通量小, 群选性差; 毛细管色谱法虽提高了液相色谱法灵敏度, 但仍存在灵敏度低, 通量小等问题; 液质联用法具有高灵敏度、高选择性、高通量等特点, 是药物残留分析最常用手段之一。四级杆/轨道阱高分辨质谱是依据静电场轨道阱技术发展起来的新式质谱^[10], 具有高分辨率、高质量精度、高稳定性等特点, 已应用于农药残留分析^[11]、兽药残留分析^[12-13]和食品非法添加^[14]等领域。

试验拟利用四级杆/轨道阱高分辨质谱联用系统, 结合 QuEChERS 快速提取净化技术, 建立草鱼中 14 种糖皮质激素类药物残留的快速检测方法, 以期提供一种利用高分辨质谱测定药物残留的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生鲜草鱼: 市售;

Hypersil Gold 色谱柱: 150 mm×2.1 mm, 3 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

乙腈、甲醇: 色谱纯, 美国 Merck 公司;

甲酸: 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司;

PSA 萃取剂: 40~63 μm, 60A, 德国 CNW 公司;

C₁₈ 萃取剂: 40~63 μm, 德国 CNW 公司;

无水硫酸镁: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;

氟米松 (CAS 426-13-1, 99.8%)、倍氯米松 (CAS 4419-39-0, 98.5%)、安西奈德 (CAS 51022-69-6, 99.5%)、氟米龙 (CAS 426-13-1, 97.9%)、醋酸氢化可的松 (CAS 50-03-3, 99.5%) 标准品: 北京曼哈格生物科技有限公司;

醋酸地塞米松 (CAS 1177-87-3, 100%)、布地奈德 (CAS 51333-22-3, 100%)、醋酸氟氢可的松 (CAS 50-03-3, 99.7%)、醋酸泼尼松 (CAS 125-10-0, 100%)、倍他米松 (CAS 378-44-9, 100%)、氢化可的松 (CAS 50-23-7, 100%)、泼尼松 (CAS 53-03-2, 100%)、曲安奈德 (CAS 76-25-5, 100%)、地塞米松 (CAS 50-02-2, 100%) 标准品: 德国 Dr 公司。

1.2 仪器与设备

四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱: Q Exactive Focus 型, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

超高效液相色谱: Ultimate 3000 型, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

电子分析天平: BS224S 型, 德国赛多利斯公司;

冷冻离心机: X1R 型, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

高速振荡器: CM-1000 型, 东京理化器械株式会社。

1.3 液相色谱条件优化

在相同洗脱程序和色谱柱条件下, 选择超纯水、体积分数 0.1% 甲酸溶液、体积分数 0.1% 甲酸—乙酸铵溶液 (5 mmol/L) 为无机流动相, 考察分离效果。色谱柱 Hypersil Gold C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 3 μm), 流动相 A 为无机流动相, 流动相 B 为乙腈; 采用梯度洗脱模式 (表 1) 进样; 流速 0.2 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样体积 5 μL。

1.4 质谱条件优化

在 HESI 离子源下, 采用 PRM/Targeted-MS² 扫描, 扫描范围 (*m/z*) 50~550, 分辨率 35 000, 毛细管电压

3 000 V; 电喷雾离子源温度 320 ℃, 气化温度 350 ℃; 鞘气压 0.24 kPa; 辅助气压 0.091 kPa; 离子传输管温度 320 ℃; 喷雾电压 4.0 kV。取单一标准溶液直接进样, 依据化合物分子量, 在四极杆质量分析器进行 Full MS 扫描, 依据化合物响应值高低选择化合物分析模式。

1.5 样品前处理

1.5.1 提取剂优化 取可食用部分混匀, 精密称取混匀后样品 2.0 g 于 50 mL 离心管中, 分别加入甲醇、乙腈、体积分数 1% 甲酸—乙腈、体积分数 2% 甲酸—乙腈 25.0 mL, 振荡摇匀 30 min, 冷冻离心, 取 1.5 mL 上清液加入 50 mg PSA+100 mg 无水硫酸镁+100 mg C₁₈ 萃取剂, 振荡混匀后高速离心, 过 0.22 μm 滤膜, 上机测定目标物回收率。

1.5.2 净化条件优化 在相同提取条件下, 1.5 mL 上清液中加入 PSA、C₁₈ 和无水硫酸镁净化组合进行净化, 净化组合分别为 A (100 mg C₁₈+50 mg PSA+100 mg 无水硫酸镁)、B (100 mg C₁₈+50 mg PSA)、C (50 mg C₁₈+100 mg PSA+100 mg 无水硫酸镁)、D (75 mg C₁₈+75 mg PSA+100 mg 无水硫酸镁), 振荡混匀后高速离心, 过 0.22 μm 滤膜, 上机测定目标物回收率。

1.6 线性范围、检出限和定量限测定

按 1.5 制备空白基质溶液, 以基质溶液为稀释液, 配制 2.0~100.0 ng/mL 基质标准溶液, 以峰面积的响应值 *Y* 为纵坐标, 标准溶液浓度 *X* (ng/mL) 为横坐标, 外标法制作标准曲线。在空白草鱼样品添加低浓度混合标准溶液, 按样品制备方式处理, 进液质联用仪检测, 以信噪比 ≥3 的浓度为检出限, 信噪比 ≥10 的浓度为定量限。

1.7 准确度和精密度测定

在空白草鱼样品中加入糖皮质激素混合标准溶液, 加标后样品浓度分别为 20.0, 40.0, 200.0 μg/kg, 每个浓度样品制备 6 份, 测定 14 种糖皮质激素的含量, 计算回收率和 *RSD* 值。

1.8 草鱼样品检测

依据上述得出的最优样品制备方式处理草鱼样品, 质谱采集数据采用保留时间进行定性, 结合离子丰度比和二级特征离子进行确证, 在最优仪器条件下检测草鱼中 14 种糖皮质激素含量。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

经扫描得知, 14 种糖皮质激素化合物在正离子模式下响应值最高, 得到目标母离子信息。通过 SIM 扫描, 设置低、中、高碰撞电压, 轨道阱检测子离子信息, 14 种糖皮质激素质谱参数见表 2。

2.2 提取剂优化

由图 1 可知, 体积分数 1% 甲酸—乙腈提取效果最

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	95	5
1.0	95	5
12.0	10	90
16.0	10	90
16.1	95	5
20.0	95	5

优,14 种糖皮质激素综合回收率较高,甲醇提取效果最差。乙腈具有沉淀蛋白作用,且溶液中微量甲酸可促进糖皮质激素化合物的电离,提高提取效率,而过量甲酸易与净化剂发生反应,降低回收率,影响提取效果。

2.3 净化条件的优化

由图 2 可知,100 mg C₁₈、50 mg PSA 和 100 mg 无水硫酸镁组合时,基质干扰小,14 种糖皮质激素类化合物回收率高。PSA 吸附剂可有效去除提取液中脂肪酸、糖类、酚类及极性色素等成分,C₁₈ 吸附剂去除脂肪和酯类等非极性干扰物,无水硫酸镁能产生盐析效应,降低提取液中亲水成分的溶解度,经高速离心后可去除。在固定体积的提取液中,吸附剂的量会影响目标化合物的回收率,通常 1.5 mL 提取液单一吸附剂量为 100 mg,无水硫酸镁对糖皮质激素无吸附作用,能提高目标化合物的回收率,C₁₈ 吸附剂对糖皮质激素类化合物吸附较小而回收率较高。

2.4 流动相的选择

试验发现,无机流动相使用超纯水分离峰形较差,响应值较其他两种流动相差,无机流动相选择体积分数 0.1% 甲酸溶液和体积分数 0.1% 甲酸—乙酸铵能有效分离 14 种糖皮质激素,体积分数 0.1% 甲酸溶液响应值更高。正离子模式中,加入体积分数 0.1% 甲酸可显著提高目标化合物电离效果,增强质谱响应,乙酸铵可增强部分化合物响应值,但同时抑制某些化合物响应值,为减少乙酸铵溶液对管路及质谱的污染,采用体积分数 0.1% 甲酸—乙腈流动相体系。由图 3 可知,14 种化合物得到了有效分离。

2.5 线性范围、检出限和定量限分析

由表 3 可知,14 种糖皮质激素在浓度为 2.0~100.0 ng/mL 时,线性关系良好($R^2 \geq 0.999$),检出限为 1.3~6.0 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 4.5~20.0 $\mu\text{g/kg}$,利用基质溶

表 2 14 种糖皮质激素的离子选择参数表[†]

Table 2 The ion selection parameters table of 14 glucocorticoids

化合物	母离子(m/z)	碰撞气能量/eV	电离模式	碎片离子(m/z)
安西奈德	503.243 9	15,35,60	$[M+H]^+$	339.159 0*,147.080 5
醋酸地塞米松	435.217 4	15,35,60	$[M+H]^+$	147.080 4*,397.201 0
布地奈德	431.242 6	15,35,60	$[M+H]^+$	147.080 8*,413.233 3
醋酸氟氢可的松	423.217 4	15,35,60	$[M+H]^+$	239.143 0*,325.179 8
氟米松	411.198 2	15,35,60	$[M+H]^+$	121.064 8*,253.122 3
倍氯米松	409.178 5	15,35,60	$[M+H]^+$	391.167 2*,147.080 5
醋酸氢化可的松	405.226 9	15,35,60	$[M+H]^+$	121.065 0*,327.196 1
醋酸泼尼松	401.195 5	15,35,60	$[M+H]^+$	147.080 4*,313.179 8
倍他米松	393.206 7	15,35,60	$[M+H]^+$	147.080 4*,355.190 4
氟米龙	377.212 0	15,35,60	$[M+H]^+$	279.174 3*,339.195 5
氢化可的松	363.216 6	15,35,60	$[M+H]^+$	121.064 8*,327.195 5
泼尼松	359.184 7	15,35,60	$[M+H]^+$	147.080 6*,341.174 7
曲安奈德	435.217 3	15,35,60	$[M+H]^+$	147.080 8*,397.201 6
地塞米松	393.206 5	15,35,60	$[M+H]^+$	147.080 4*,355.190 4

[†] * 定量离子。

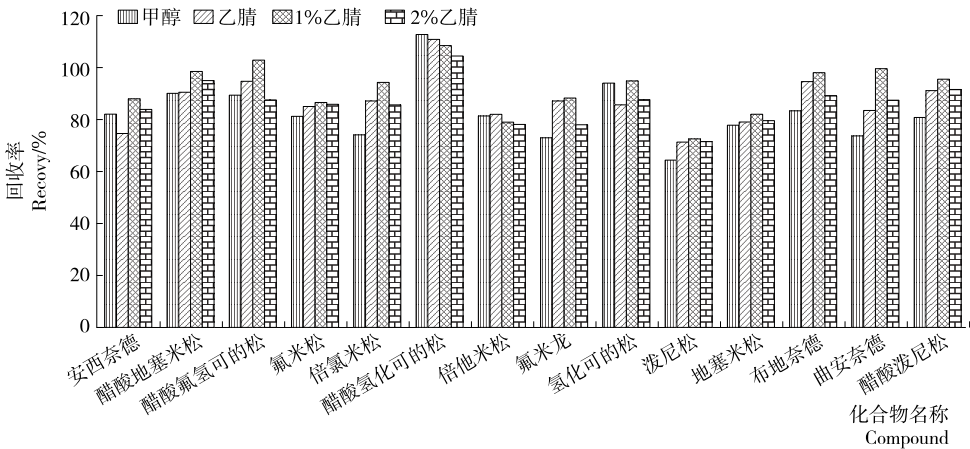


图 1 不同提取剂对目标物回收率的影响

Figure 1 Effect of concentration of extractant on recovery of the target analytes

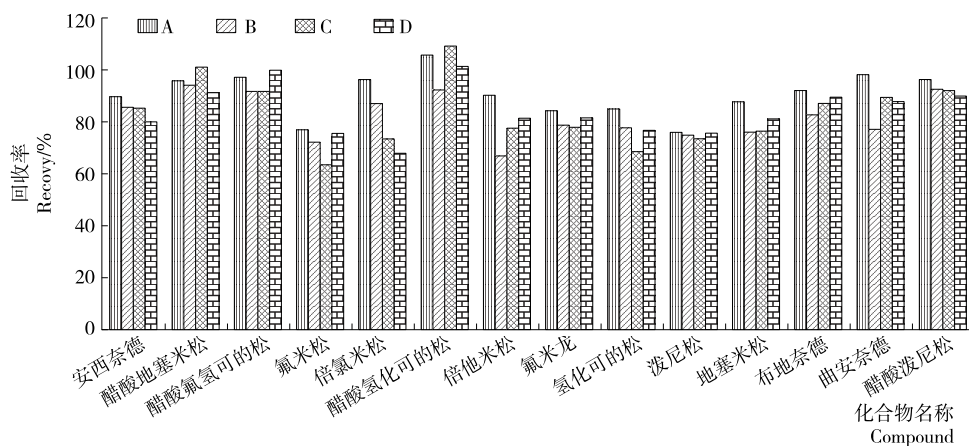


图 2 不同吸附剂组合对目标物回收率的影响

Figure 2 Effect of adsorbents on recovery of the target analytes

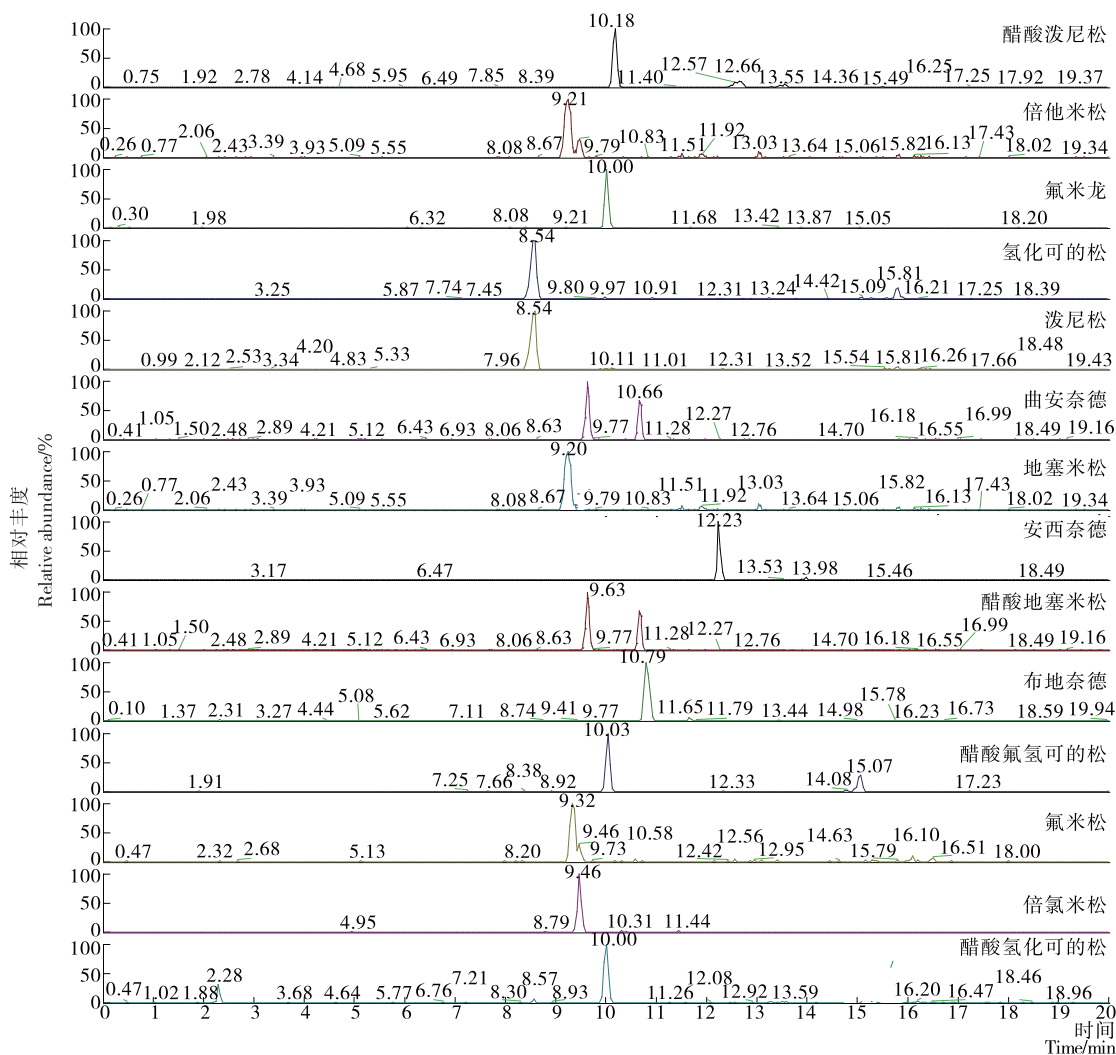


图 3 糖皮质激素混合标准溶液定量离子色谱图

Figure 3 The quantitative ion chromatogram of glucocorticoids in standard solution (20 ng/mL)

液配制标准溶液能有效降低基质增强与抑制效应,线性关系良好,能准确检测目标化合物的含量。

2.6 准确度和精密度分析

由表 4 可知,加标浓度为 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率为 76.9%~102.5%, RSD 为 2.3%~6.1%;加标浓度为 40.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率为 80.5%~103.3%, RSD 为

2.1%~6.2%;加标浓度为 200.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率为 87.1%~97.3%, RSD 为 1.6%~6.3%。依据方法验证要求,回收率浓度通常设置在方法定量限、2 倍定量限、10 倍定量限附近,试验在低、中浓度回收率为 60%~120%,高浓度回收率为 80%~110%, $RSD<10\%$,3 个梯度加标回收率和精密度良好。

表 3 14 种糖皮质激素的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 3 Calibration curves, correlation coefficients, limits of detection and limit of quantitation of the 14 glucocorticoids

药物名称	线性方程	相关系数 R^2	检出限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
安西奈德	$Y=7\ 397.92X$	0.999 7	2.5	8.4
醋酸地塞米松	$Y=5\ 060.58X$	0.999 0	5.0	17.0
布地奈德	$Y=16\ 505.60X$	0.999 3	2.5	8.4
醋酸氟氢可的松	$Y=8\ 321.16X$	0.999 0	6.0	20.0
氟米松	$Y=6\ 084.11X$	0.999 2	5.0	17.0
倍氯米松	$Y=5\ 557.58X$	0.999 3	2.5	8.4
醋酸氢化可的松	$Y=9\ 257.28X$	0.999 0	6.0	20.0
醋酸泼尼松	$Y=18\ 614.40X$	0.999 3	2.5	8.4
倍他米松	$Y=11\ 189.90X$	0.999 1	5.0	17.0
氟米龙	$Y=6\ 026.53X$	0.999 0	5.0	17.0
氢化可的松	$Y=28\ 122.20X$	0.999 0	2.5	8.4
泼尼松	$Y=17\ 327.40X$	0.999 0	1.3	4.5
曲安奈德	$Y=7\ 669.47X$	0.999 5	5.0	17.0
地塞米松	$Y=10\ 945.90X$	0.999 1	5.0	17.0

表 4 14 种糖皮质激素的回收率和精密度

Table 4 Spiked recoveries and precursorsions of the 14 glucocorticoids %

药物名称	20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		40.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		200.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
安西奈德	78.7	4.7	83.6	5.1	88.8	5.3
醋酸地塞米松	82.0	5.7	93.3	4.3	95.1	3.4
布地奈德	93.0	4.0	89.7	2.2	94.7	2.4
醋酸氟氢可的松	81.8	2.7	88.0	4.4	91.1	2.6
氟米松	81.5	6.1	87.6	6.2	88.9	6.3
倍氯米松	80.9	3.6	84.4	5.1	87.1	5.5
醋酸氢化可的松	82.5	2.8	84.0	5.5	89.2	3.8
醋酸泼尼松	82.5	2.8	93.7	3.2	96.8	2.4
倍他米松	83.2	2.3	89.3	3.1	91.7	4.1
氟米龙	76.9	5.2	88.0	3.1	88.5	2.7
氢化可的松	102.5	3.4	103.3	6.2	91.9	1.6
泼尼松	99.1	4.7	99.5	4.0	97.3	2.2
曲安奈德	82.8	3.9	87.3	2.1	88.8	3.2
地塞米松	80.1	4.9	80.5	4.4	88.2	5.2

2.7 实际样品检测

应用试验建立的检验方法对市场采购的 30 批次鲜活草鱼进行检测,均未检出阳性样品,表明草鱼检出糖皮质激素风险较低,安全性较高。

3 结论

试验建立了超高效液相色谱—四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱检测水产品中 14 种糖皮质激素的方法,优

化了 QuEChERS 提取溶剂与吸附剂种类用量,并对线性方程、检出限、定量限、回收率等方法学指标进行了验证。该方法简单高效、灵敏度高,为批量快速检测水产品中糖皮质激素提供参考,也为建立水产品中糖皮质激素类药物残留检测方法提供数据支持。但试验方法所涉及的糖皮质激素种类有限,今后应不断补充完善。

(下转第 162 页)