

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250116002

引用格式: 关静渊, 杨彦宁, 周大可, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨质谱法快速筛查中兽药中 302 种药物非法添加[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 107-114.

GUAN JY, YANG YN, ZHOU DK, *et al.* Rapid screening of 302 kinds of illegal additives in traditional Chinese veterinary medicine by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight high resolution-mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 107-114. (in Chinese with English abstract).

基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨质谱法快速筛查中兽药中 302 种药物非法添加

关静渊¹, 杨彦宁^{1*}, 周大可^{1,2}, 隆雪明¹, 周 灿¹, 张 港¹,
张瑞祺^{1,3}, 胡菊芳¹, 李诗琪¹

(1. 湖南省兽药饲料监察所, 长沙 410006; 2. 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128;
3. 湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙 410128)

摘 要: **目的** 建立一种基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight high resolution-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)用于中兽药中的 302 种药物非法添加的快速筛查方法。**方法** 建立了包含 302 种药物名称、分子式、精确质量数等信息的高分辨质谱数据库。样品经甲醇提取后, 经过 UPLC-Q-TOF-MS 进行数据采集并分析, 当保留时间与数据库绝对偏差 <0.2 min, 质量误差 <5 ppm, 同位素比值偏差 $<5\%$, 且主要特征碎片离子的库比对分数 >80 时, 认为检出疑似阳性样品。**结果** 该方法选择性较好, 目标物最低检出质量浓度低至 50 ng/mL(四环素类、青霉素类、雌激素类、及非甾体抗炎药检出质量浓度 100 ng/mL; 氨基糖苷类检出质量浓度 200 ng/mL), 实现了 302 种非法添加药物的高效筛查。实际样品筛查时, 检出了 7 批疑似阳性样品。**结论** 本研究建立的筛查手段具有快速、广谱的特点, 适用于多种中兽药中的非法添加药物的初步筛查, 为中兽药质量控制提供了有效技术支持。**关键词:** 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨质谱法; 非法添加; 化学药物; 中兽药

Rapid screening of 302 kinds of illegal additives in traditional Chinese veterinary medicine by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight high resolution-mass spectrometry

GUAN Jing-Yuan¹, YANG Yan-Ning^{1*}, ZHOU Da-Ke^{1,2}, LONG Xue-Ming¹, ZHOU Can¹,
ZHANG Gang¹, ZHANG Rui-Qi^{1,3}, HU Ju-Fang¹, LI Shi-Qi¹

收稿日期: 2025-01-16

基金项目: 湖南省自然科学基金-科市联合项目(S2022JKSLH0129)

第一作者: 关静渊(1996—), 女, 硕士, 兽医师, 主要研究方向为兽医药理学与兽药饲料畜禽产品药物残留检测及相关技术研究。E-mail: 894060595@qq.com

*通信作者: 杨彦宁(1986—), 女, 硕士, 农艺师, 主要研究方向为兽药饲料畜禽产品药物残留检测及相关技术研究。E-mail: 87200877@qq.com

(1. Hunan Province Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Changsha 410006, China; 2. Hunan Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Changsha 410128, China; 3. Hunan Agricultural University, School of Food Science and Technology, Changsha 410128, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight high resolution-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) use as a rapid screening method for the illegal addition of 302 kinds of drugs in Chinese veterinary medicine. **Methods** A high-resolution mass spectrometry database containing information such as the names, molecular formulas, and exact mass numbers of 302 kinds of drugs was established. Samples were extracted with methanol and then analyzed by UPLC-Q-TOF-MS. A sample was considered as a suspected positive if the retention time deviation was less than 0.2 min, the mass error was less than 5 ppm, the isotopic ratio deviation was less than 5%, and the library matching score of the main characteristic fragment ions was greater than 80. **Results** The method exhibited good selectivity, with a minimum detection concentration as low as 50 ng/mL for the target substances (100 ng/mL for tetracyclines, penicillins, estrogens, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs; 200 ng/mL for aminoglycosides). This enabled the efficient screening of 302 kinds of illegally added drugs. In the screening of actual samples, 7 batches of suspected positive samples were detected. **Conclusion** This approach is applicable for the screening of illegal additives in various veterinary Chinese medicines, providing effective technical support for the quality control of veterinary Chinese medicines.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight high resolution-mass spectrometry; illegal additives; chemical drugs; Chinese veterinary medicine

0 引言

中兽药,作为传统兽医学的重要组成部分,其在动物疾病预防和治疗中发挥着不可替代的作用。随着“禁抗”政策的实施,中兽药产业迎来了广阔的发展前景,据中国兽药协会数据,2021年我国中兽药行业规模为61.26亿元,预计到2028年市场规模将达到91亿元。然而,市场上的中兽药产品良莠不齐,一些不法商家为了追求短期效益,生产或售卖掺假中兽药,这种行为不仅破坏了中兽药的天然属性,还可能对动物健康和食品安全造成严重威胁。

我国中药掺假现象主要可分为3大类:一是通过添加未申报的药物以增强供临床效果;二是添加工业染料,冒充优质药材;三是用非药物成分替代以增加重量或数量^[1]。本研究聚焦于中兽药中非法添加药物的现象,其中涉及的非法添加的化学药物种类繁多,包括但不限于抗菌药^[2]、抗病毒药物^[3]、抗胆碱药物^[4]、激素类^[5]、解热镇痛药物^[6]、中枢神经系统药物^[7]、 β -受体激动剂^[8-9]等。这些药物的添加虽然可能短期内能提高中兽药的疗效,但长期使用会导致动物耐药性增强^[10]、内分泌失调^[11-12]等一系列健康问题,更重要的是,这些非法添加物可能残留在动物性食品(如肉、蛋、奶等)中,最终进入人类食品链,对消费者健康构成严重威胁。比如,抗生素类药物的滥用可能导致药物在动物体内残留,进而进入食品链,影响消费者健康。抗生素类药物的过度使用还可能导致水体、土壤中抗性菌株的滋生,进而影响生态系统的稳定。此外,由于中草药在收获、加工或储存过程中管理不善,可能导致霉菌毒素污染;同时,一些不法商家为降低成本,采购低

价劣质原料,或因生产工艺落后、存储条件不当等原因,进一步加剧了中兽药安全风险^[13]。

食品安全是公众健康的重要组成部分,而动物源食品的质量安全直接关系到消费者健康。因此,建立高效、精准的检测手段,不仅对保障中兽药的质量至关重要,也对确保食品安全、防止非法药物进入食品链具有重要意义。超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight high resolution-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)因其高灵敏度、高选择性和高通量的特点,成为快速筛查中兽药中非法添加化学药物的理想技术。与轨道阱质谱相比,飞行时间质谱提供了更快速的扫描速度;与离子阱质谱相比,又提供了更高的质量分辨率,有助于提高复杂样品中非法添加物的检测能力。此外,飞行时间质谱具有优异的定性分析能力,能够提供更精确的碎片离子图,支持非法添加物的快速识别。该技术能够通过提供精确的质量测量和碎片离子图谱,结合质谱数据库并通过串联质谱法图谱解析,推断分子式和分子结构,从而实现非法添加物的快速识别。

本研究通过甲醇提取样品,同时结合UPLC-Q-TOF-MS技术进行数据分析,来构建包含302种非法添加药物的高分辨质谱数据库,以期为中兽药的质量控制提供一种新的检测手段,为中兽药行业的健康发展提供坚实的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

SCIEX X500R QTOF 液相色谱-四极杆/飞行时间质谱

仪(上海 SCIEX 爱博才思分析仪器贸易有限公司); ME203/02 万分之一电子分析天平[梅特勒托利多科技(中国)有限公司]; EFAA-HM-01 多管涡旋震荡仪(上海安谱实验科技股份有限公司); SB-800DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 75005289 高速离心机(美国赛默飞世尔科技公司); PGLSCXM2 纯水仪[威立雅水处理技术(上海)有限公司]; 0.2 μm 亲水性聚四氟乙烯(water-wettable polytetrafluoroethylene, wwPTFE)滤膜[颇尔(中国)有限公司]; Kinetex® F5 100 Å 色谱柱(100 mm \times 4.6 mm, 2.6 μm)(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

甲醇、乙腈、乙酸铵(色谱纯, 德国默克有限公司); 甲酸(色谱纯, 美国 ACS 恩科化学公司); 302 种兽药标准品溶液(质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 天津阿尔塔科技有限公司); 采用空白样品基质液稀释样品。

实验所用实际检测样品均来自市售。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为 2 mmol/L 乙酸铵+0.2%甲酸水溶液(A)与乙腈(B), 线性梯度洗脱, 共 22 min, 流速 0.3 mL/min; 进样量 10 μL (表 1)。

表 1 流动相的梯度洗脱

Table 1 Gradient elution of mobile phase

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
3	70	30
8	50	50
17	5	95
19	5	95
19.5	95	5

表 2 部分化合物数据库信息(正离子模式)

Table 2 Database information of selected compounds (positive ion mode)

类别	中文名称	提取离子质荷比	保留时间/min	中文名称	提取离子质荷比	保留时间/min
喹噁啉类	喹烯酮	307.1083	12.18	喹乙醇	264.0984	5.9
林可酰胺类	盐酸林可霉素	407.2220	6.34	盐酸吡利霉素	411.1728	8.39
	白霉素	—	—	泰乐菌素	—	—
大环内酯类	白霉素 A1	786.4669	13.59	泰乐菌素 A	916.5291	11.29
	白霉素 A5*	772.4516	12.74	泰乐菌素 B*	772.4515	10.22
	白霉素 A7	758.4364	11.88	泰乐菌素 C	902.5124	10.77
	白霉素 A8	786.4319	11.76	泰乐菌素 D	918.5473	10.7
	白霉素 A9	744.4201	11.11	螺旋霉素	—	—
	白霉素 A13	800.4823	14.46	螺旋霉素 I	843.5253	8.94
	麦迪霉素 A1	814.4622	13.39	螺旋霉素 III	899.5509	10.01
	维吉尼霉素	—	—	红霉素	734.4720	10.99
	维吉尼霉素 M1	526.2576	12.07	罗红霉素	837.5347	12.83
	维吉尼霉素 S1	824.3652	14.23	泰妙菌素	494.3311	12.73
	乙酰氨基阿维菌素 B1a	914.5300	16.65	伊维菌素 B1a [#]	892.5459	18.09

1.2.2 质谱条件

AB SCIEX X500R QTOF 高分辨四极杆串联飞行时间质谱仪的质谱数据采用信息依赖扫描 (information-dependent acquisition, IDA) 的模式在正负离子模式下采集。

正离子模式下, 离子源参数为: 雾化气 gas1 为 50 psi; 干燥气 gas2 为 50 psi; 气帘气 curtain gas 为 30 psi; 离子源温度为 550 $^{\circ}\text{C}$ 。TOF 一级全扫描模式参数: 扫描范围 50~1000 Da; 离子源电压为 5500 V; 去簇电压 50 V; 累计时间 0.15 s; IDA 参数: 最大候选离子数 12; 触发二级碎裂扫描的离子强度阈值 100 cps; 动态背景扣除; 质荷比误差范围 ± 5 ppm。TOF 二级碎片扫描模式参数: 扫描范围: 35~1000 Da; 碰撞电压为 35 V; 累计时间 0.06 s。

负离子模式下: 离子源电压-4500 V; 去簇电压-80 V, 碰撞电压为-35 V, 其他参数与正离子模式相同。

1.3 样品前处理

液体制剂: 移液枪精确移取 20 μL , 甲醇 10 mL 定容;

固体制剂: 片剂、颗粒剂药物研磨粉碎后称取 50 mg, 粉剂直接称取 50 mg, 甲醇溶解并超声后, 10 mL 定容。

样品定容后经 0.2 μm wwPTFE 滤膜过滤, 待上机。

1.4 质谱数据库的建立

1.4.1 分辨率

X500R QTOF-MS 可采集得到化合物的一级高分辨质谱(≥ 3500)和二级数据, 质量精确度 ≤ 5 ppm, 得到的谱图既有母离子的精确质量数、又有二级质谱全扫描信息。

1.4.2 一级质谱的精确质量数据库

本研究通过 IDA 模式扫描, 建立了 302 种兽药质谱数据库, 对其进行一级质谱全扫描, 得到高分辨质谱信息, 包括化合物的名称、CAS 号、分子式、加荷方式、提取离子质荷比、保留时间, 见表 2 和表 3。所有兽药标准品均采用甲醇稀释至 200 ng/mL 后进样扫描, 以获取相关数据。

表 2(续)

类别	中文名称	提取离子质荷比	保留时间/min	中文名称	提取离子质荷比	保留时间/min
β 2-受体激动剂	盐酸利托君	288.1606	6.87	盐酸莱克多巴胺*	302.1766	7.68
	富马酸福莫特罗二水合物	345.1824	8.47	盐酸苯氧丙酚胺*	302.1759	9.49
	盐酸克仑特罗	277.0877	8.93	苯乙醇胺 A	345.1814	11.9
硝基咪唑类	咪唑他酮	325.1158	7.02	咪唑啉酮*	226.0463	8.81
M 胆碱受体阻断药	东莨菪碱	304.1551	6.91	阿托品	290.1754	7.63
氟喹诺酮类	环丙沙星	332.1420	7.86	诺氟沙星	320.1421	7.67
磺胺类	磺胺氯吡嗪*	285.0221	8.84	磺胺氯吡嗪*	285.0223	10.1
	磺胺邻二甲氧嘧啶*	311.0816	9.13	磺胺间二甲氧嘧啶*	311.0815	10.37
	磺胺对甲氧嘧啶*	281.0716	8.16	磺胺间甲氧嘧啶*	281.0715	8.53
	磺胺二甲嘧啶*	279.0919	7.83	磺胺二甲异嘧啶*	279.0918	6.59
	磺胺甲氧吡嗪*	281.0708	7.97	磺胺异噁唑*	268.0765	9.56
	磺胺二甲唑*	268.0753	7.55	磺胺嘧啶	251.0609	6.95
非甾体抗炎药	双氯芬酸*	296.0256	14.34	依托度酸	288.1608	14
	吡罗昔康*	332.0707	11.65	甲氯芬那酸*	296.0258	15.24
	氟尼辛葡甲胺	297.0849	13.25	异丙氨基比林	246.1603	6.83
硝基咪唑类	甲硝唑	172.0722	6.25	洛硝唑	201.0632	6.76
氨基糖苷类	硫酸新霉素	—	—	硫酸庆大霉素	—	—
	新霉素 B	615.3246	7.62	硫酸庆大霉素 C1	478.3256	2.65
	新霉素	323.1928	13.69	硫酸庆大霉素 C2	464.3100	2.65
	盐酸大观霉素五水合物	351.1719	3.18	硫酸庆大霉素 C3	450.2942	2.64
糖皮质激素类	布地奈德	—	—	可的松*	361.2027	10.2
	布地奈德 22R*	431.2450	13.01	倍他米松*	393.2090	10.88
	布地奈德 22S*	431.2449	13.2	地塞米松*	393.2090	10.94
	醋酸双氟拉松*	495.2202	14.73	泼尼松龙*	361.2029	9.85
	甲基泼尼松龙	375.2184	10.67	氟轻松*	495.2198	14.58
性激素类	雌酮*	271.1703	13.38	双烯雌酚	267.1396	13.61
	α -群勃龙*	271.1695	11.8	甲睾酮	303.2324	13.35
玉米赤霉酮类	玉米烯酮	319.1556	14.19			
伏马菌素类	伏马菌素 B ₁	722.3982	10.13	伏马菌素 B ₂	706.4037	11.5
抗病毒类	盐酸金刚乙胺*	180.1753	9.16	盐酸美金刚*	180.1753	9.51
离子载体类抗球虫药	莫能菌素钠盐	693.4215	18.46	盐霉素钠	773.4838	17.01
苯并咪唑类	阿苯达唑	266.0963	11.05	阿苯达唑亚砷	282.0918	7.73
	阿苯达唑砷	298.0869	9.2	芬苯达唑砷*	332.0715	10.85
头孢菌素类	头孢拉定	350.1191	6.9	头孢克洛	368.0487	6.14
	头孢他啶	547.1094	6.06	头孢匹罗	515.1196	6.29
青霉素类	阿莫西林三水物	366.1135	5.78	氨苄青霉素三水合物	350.1182	6.71
四环素类	盐酸金霉素*	479.1248	8.72	盐酸四环素	445.1635	7.61
	多西环素盐酸盐半乙醇半水合物	445.1634	7.99	差向金霉素盐酸盐*	479.1244	8.38
抗菌增效剂	甲氧苄啶	291.1452	7.29			

注: *为 19 对异构体的 41 种物质, —为混合化合物, 相关信息见后续行。#为加荷方式[M+NH₄]⁺, 其他均为[M+H]⁺。

表 3 化合物数据库信息(负离子模式)
Table 3 Database information of compounds (negative ion mode)

类别	中文名称	提取离子质荷比	保留时间/min	中文名称	提取离子质荷比	保留时间/min
基因重组药物	多拉菌素	897.5017	17.44			
磺胺类	磺胺硝苯	334.0505	11.92			
氨基糖苷类	阿米卡星	584.2789	2.63			
雌激素类	己烷雌酚*	269.1553	13.82	己烯雌酚	267.1398	14.48
祥利尿剂	呋塞米	329.0006	11.01			
非甾体抗炎药	卡洛芬	272.0489	14.29	菲诺洛芬	241.0872	13.78
抗寄生虫类	碘醚柳胺	623.8128	19.62	地克珠利	404.9727	14.77
	尼卡巴嗪	301.0583	14.6	硝米特	210.0157	8.95
	二硝托胺*	224.0314	9.22			
咪喃类	咪喃苯烯酸钠	258.0407	13.03			
玉米赤霉酮类	α -玉米赤霉醇*	321.1707	12.77	β -玉米赤霉醇*	321.1707	12.77
	α -玉米赤霉烯醇*	319.1550	12.11	β -玉米赤霉烯醇*	319.1550	13.12
	玉米赤霉酮*	319.1550	14.06			
β -内酰胺酶抑制剂	舒巴坦	232.0286	6.39			

注: *为 19 对异构体的 41 种物质。加荷方式均为[M-H]⁻。

1.4.3 MS/MS 二级谱库

根据欧盟《食品饲料中农残分析的质量控制和方法确认的指导文件》(SANTE/11312/2021 (V2)及农业农村部公告第 312 号《饲料中风险物质的筛查与确认导则 液相色谱-高分辨质谱法(LC-HRMS)》, 物质定性需满足母离子质量偏差 <5 ppm, 特征碎片离子质量数偏差小于 10 ppm, 在不同碰撞能量下进行测定, 采集叠加所有子离子信息, 得到二级谱库。

1.4.4 筛查确认

提取目标物质质荷比 ± 10 ppm 窗口的离子图, 进行一级谱库检索, 当目标母离子精确质荷比 ≥ 200 , 相对偏差 ≤ 10 ppm; 当目标母离子精确质荷比 < 200 , 相对偏差 ≤ 1 mDa, 提取特征碎片离子 ± 20 ppm 窗口的离子图, 各主要特征碎片离子均有检出。当保留时间与对照品绝对偏差 < 0.2 min, 质量误差 < 5 ppm, 同位素比值偏差 $< 5\%$, 且主要特征碎片离子的谱库比对分数 > 80 时, 认为筛查到可疑化合物或者疑似阳性样品。

1.5 数据处理

本研究采用 SCIEX OS 软件(SCIEX OS Software, 版本号 1.7.0.36606)进行数据处理, 包括质谱数据采集、峰检测、谱库建立、成分匹配、定性筛查及分析。

2 结果与分析

2.1 母离子的确认

大多数物质在质谱分析中会经历离子化过程, 在此过程中不稳定的盐、酸、水等分子会脱落, 比如盐酸克仑特

罗($C_{12}H_{18}Cl_2N_2O \cdot HCl$)在离子化过程中会失去 HCl 分子, 转化为 $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$, 同样, 阿莫西林三水物($C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$)会脱去 3 个水分子, 转化为 $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 等。然而, 盐酸大观霉素五水合物($C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$)进入质谱仪后, HCl 和部分 H_2O 分子被去除, 形成 $C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot H_2O$ 。检测结果显示, $C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot H_2O$ 的离子响应更高且更稳定, 如图 1。

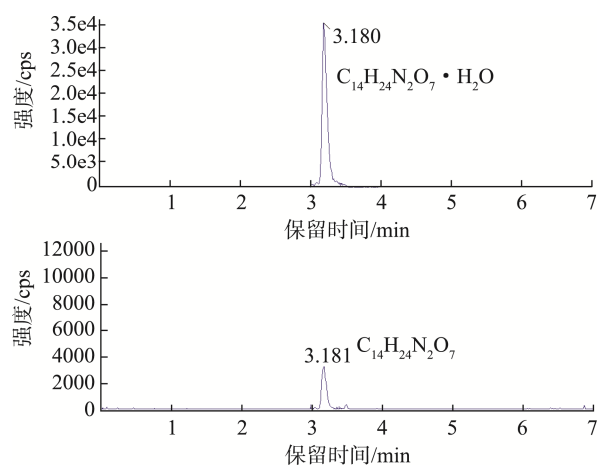


图 1 盐酸大观霉素五水合物色谱图
Fig.1 Chromatogram of spectinomycin hydrochloride pentahydrate

其次, 一些共晶体药物在进入质谱仪后, 会经历解共晶化的过程。如尼卡巴嗪是 4,4'-二硝基苯胺(4,4'-dinitroaniline, DNC)和 2-羟基-4,6-二甲基嘧啶(2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine, HDP)分子以 1:1 的比例组合形成的共晶体^[14], 质谱仪中, 这种共晶体分解为单独

的 DNC 和 HDP 分子, 本研究条件下, DNC 响应更高, 因此尼卡巴嗪以 DNC ($C_{13}H_{10}N_4O_5$) 计。同理, 氟尼辛葡甲胺是由 2-(2-甲基-3-三氟甲基)苯胺基-吡啶-3-羧酸与 1-脱氧-1-甲胺基-D-山梨醇以 1:1 的比例组合形成的共晶体^[15], 因此, 氟尼辛葡甲胺以氟尼辛($C_{14}H_{11}F_3N_2O_2$)计算。

2.2 同分异构体

本研究共分离了 19 对同分异构体, 共 41 种物质, 见表 1。这些同分异构体或色谱分离度良好, 或二级特征离子碎片不相同, 均可进行有效区分。比如, 布地奈德通常以 22R 和 22S 这两种差向异构体的 1:1 混合物形式存在^[16], 是一种具有手性中心的化合物, 如图 2。

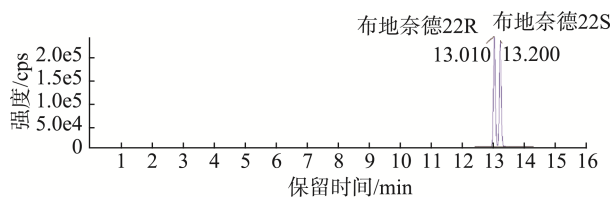


图 2 布地奈德色谱图
Fig.2 Chromatographic profile of budesonide

但是, 某些化合物虽并非同分异构体, 但在质谱分析过程中, 由于它们在离子源中的特定碎裂行为, 导致产生了与同分异构体相似的质谱特征, 比如, 富马酸福莫特罗

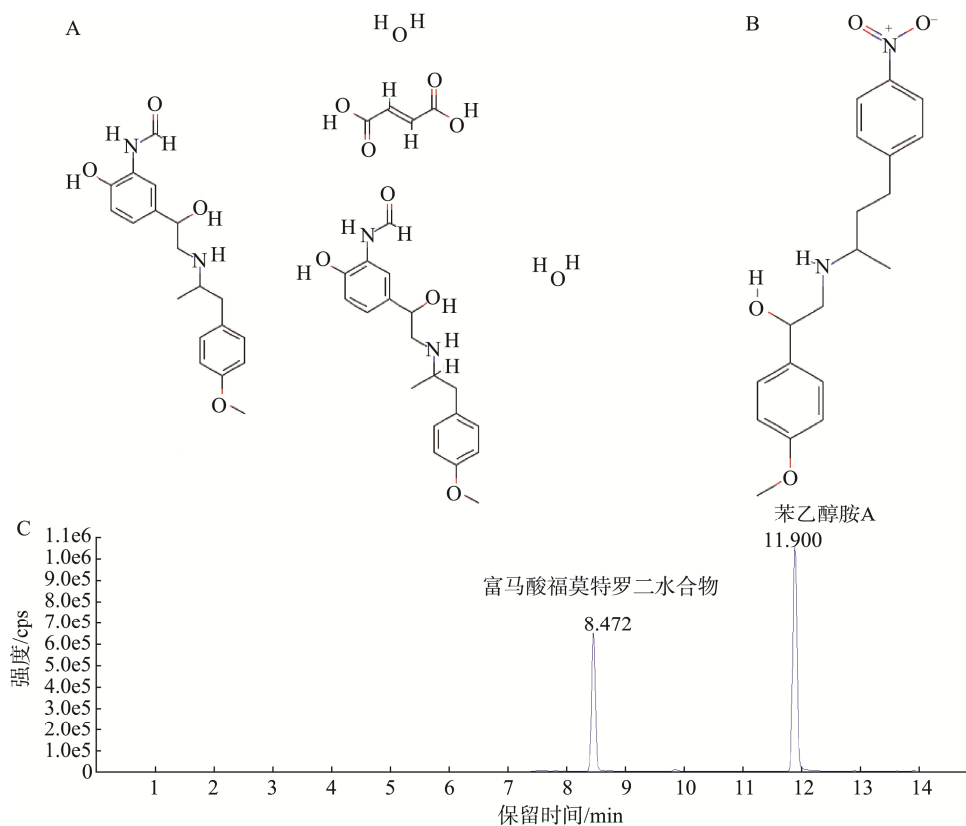
二水合物与苯乙醇胺 A 不是同分异构体, 富马酸福莫特罗二水合物是一种多晶体结构^[17](图 3A), 在质谱中, 会解离成福莫特罗, 福莫特罗和苯乙醇胺 A(图 3B)是同分异构体, 其色谱图见图 3C, 因此需要按照分析同分异构体的流程去进行甄别。与此相似的还有盐酸利托君和依托度酸、氨苄青霉素三水合物和头孢拉定、多西环素盐酸盐半乙醇半水合物和盐酸四环素。

2.3 选择性实验

为验证该筛查手段的特异性, 分别选取具有代表性的空白样品基质进行实验, 包括注射液、口服液、灌服液、预混剂、散剂、颗粒剂和片剂。各空白样品按照 1.3 下前处理方法处理后进行样分析。结果表明, 在 302 种目标化合物的保留时间窗口内, 各空白样品基质均未出现干扰峰, 表明该方法具有良好的选择性, 不受常见制剂成分的干扰, 能够满足不同类型中兽药样品中非法添加药物的筛查要求。

2.4 目标物筛查分析

在正离子模式下, 50 ng/mL 质量浓度下的目标化合物检出率为 73.1%, 其中四环素类、青霉素类、雌激素类、氨基糖苷类及非甾体抗炎药未检出; 100 ng/mL 质量浓度下, 检出率提升至 90.6%, 主要为氨基糖苷类化合物未被检出; 当质量浓度达到 200 ng/mL 时, 所有目标化合物均被检出, 检出率达到



注: A. 富马酸福莫特罗二水合物; B. 苯乙醇胺 A; C. 色谱图。

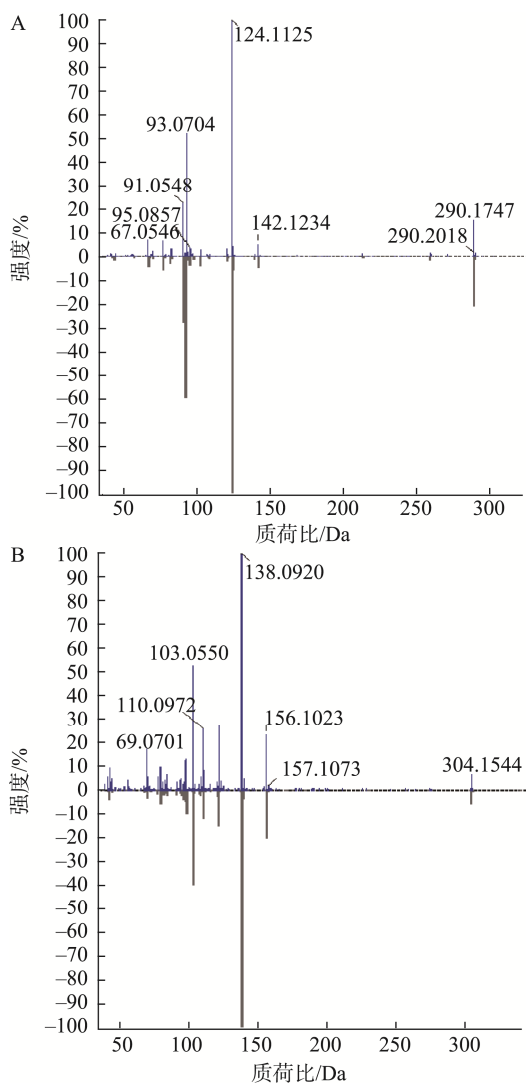
图 3 富马酸福莫特罗二水合物与苯乙醇胺 A 的结构图与色谱图

Fig.3 Structures and chromatograms of formoterol fumarate dihydrate and phenylethanolamine A

100%。在负离子模式 50 ng/mL 质量浓度下的检出率为 90.5%, 100 ng/mL 质量浓度下为 95.2%, 且在 200 ng/mL 质量浓度下同样实现了 100% 的检出率。基于非法添加药物的作用主要是增强药效, 本研究建立的筛查手段能够有效覆盖常见非法添加药物的化学结构特征, 其灵敏度、选择性和筛查范围均能满足中兽药中非法添加药物的初步检出要求。该手段可为中兽药质量控制的初步筛查提供可靠的技术支持。

2.5 实际样品筛查

样品经试验方法处理净化, 上机检测, 读取总离子流图扫描数据, 对 36 批次中兽药中非法添加物进行了筛查, 对比 302 种化合物数据库信息, 发现了 7 批疑似阳性样品, 其中, 促孕灌注液中疑似添加了阿托品和东莨菪碱, 如图 4, 阿托品和东莨菪碱属于抗胆碱药物, 通过抗 M



注: A. 阿托品; B. 东莨菪碱。

图 4 促孕灌注液中阿托品和东莨菪碱与对照品特征碎片离子比对图
Fig.4 Comparison of characteristic fragment ions of atropine and scopolamine in the fertility-promoting intrauterine infusion liquid with reference standards

型胆碱受体的机制作用于子宫平滑肌, 能够显著降低子宫蠕动波、抑制子宫肌层收缩^[18], 并维持血流灌注的充盈状态^[19-20], 功效与促孕灌注液相似, 可提高母畜配种率, 促进恶露排出、缩短产后发情间期^[21]。四黄止痢颗粒中疑似添加了泰妙菌素。四黄止痢颗粒在临床上广泛应用于细菌性、病毒性和湿热性下痢腹泻的防治^[22], 而泰妙菌素作为截短侧耳素类动物专用抗生素, 对多种革兰氏阳性菌^[23-24]以及支原体^[25]和某些螺旋体^[26]都有良好的抗菌活性, 同样多用于治疗猪的痢疾、肺炎^[27]等病症, 还可以促进动物生长, 提高饲料利用率^[28], 二者功效类似。其他筛查结果还有杨树花口服液中疑似添加碘醚柳胺, 藿香正气口服液中疑似添加氟尼辛葡甲胺、地克珠利, 盐酸甜菜碱预混剂中疑似添加林可霉素、甲氧苄啶、恩诺沙星和环丙沙星, 穿心莲注射液中疑似添加了林可霉素, 麻杏石甘散中疑似添加了甲氧苄啶、磺胺嘧啶、恩诺沙星。分析中兽药与非法添加药物的功效发现, 其添加行为主要是为了增强中兽药的“疗效”, 而非法添加者会利用监管盲区或检测技术的局限性, 规避检测, 因此大范围的非法添加筛查技术是遏制非法添加行为的重要措施。由于使用者无法知晓添加物的准确剂量, 且在养殖户缺乏药物使用安全意识的情况下, 盲目依赖中兽药的天然属性, 可能导致药物过量使用, 进而引发动物病情的恶化或程度不等的副反应^[29-30], 严重威胁动物的生命安全。最终, 这会导致动物产品的兽药残留等问题, 并通过食物链传递至人类, 还会导致耐药菌风险的增加^[31]。非法添加行为破坏了中兽药行业的信誉, 可能导致消费者对中兽药安全性的质疑, 进而影响整个行业的健康发展。

3 结论

本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS, 成功构建了涵盖 302 种非法添加药物的高分辨质谱数据库, 为中兽药中的非法添加药物的快速筛查提供了一种高效、精准的技术手段, 并有助于降低食品中的药物残留风险。结果表明, 该手段能够快速、准确地识别多种非法添加物, 为中兽药质量控制提供了技术支持。

中兽药中非法添加药物现象可能由多个因素引起。一方面, 生产条件简陋和技术水平低的企业可能因疏忽引入额外药物; 另一方面, 一些商家可能为了提高疗效、追求经济利益而故意添加功效药物。此外, 市场上对快速见效药物的需求也可能促使非法添加行为。虽然这些药物能短期提升疗效, 但长期或不当使用可能引发剂量非依赖性、不良反应及健康风险。为了从源头上确保食品安全, 应加强对中兽药及动物性食品的质量监管, 推广高效的检测方法, 防止非法药物进入食品链, 保障公众健康。

参考文献

[1] XU M, HUANG B, GAO F, *et al.* Assessment of adulterated traditional chinese medicines in China: 2003—2017 [J]. *Frontiers in Pharmacology*,

- 2019, 10: 1446.
- [2] MA J, LI K, SHI S, *et al.* The application of UPLC-HRMS for quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 922488.
- [3] HE J, WEN J, LIU Y, *et al.* rapid screening and identification of 167 illegally added medicines in herbal tea by ultra performance liquid chromatography-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2022, 40(3): 253–265.
- [4] HOBAN CL, MUSGRAVE IF, BYARD RW, *et al.* Combined liquid chromatography-mass spectrometry and next-generation DNA sequencing detection of adulterants and contaminants in analgesic and anti-inflammatory herbal medicines [J]. *Pharmaceutical Medicine*, 2020, 34(1): 49–61.
- [5] LIANG X, LI L, DONG Y, *et al.* Rapid detection of five estrogens added illegally to dietary supplements by combining tlc with raman imaging microscope [J/O]. *Molecules*, 2022, 27(9). DOI: 10.3390/molecules 27092650
- [6] PRATIWI R, DIPADHARMA RHF, PRAYUGO IJ, *et al.* Recent analytical method for detection of chemical adulterants in herbal medicine [J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6606.
- [7] FOROUGH MH, AKHGARI M, JOKAR F, *et al.* Identification of undeclared active pharmaceutical ingredients in counterfeit herbal medicines used as opioid substitution therapy [J]. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 2017, 49(6): 720–729.
- [8] JAIRON AA, AL-HEMYARI SS, SHAHWAN M, *et al.* Adulteration of weight loss supplements by the illegal addition of synthetic pharmaceuticals [J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 6903.
- [9] LIANG Q, ZHUANG Y, MA J, *et al.* A rapid screening method for sibutramine hydrochloride in natural herbal medicines and dietary supplements [J]. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2021, 2021(1): 8889423.
- [10] MORRISON L, ZEMBOWER TR. Antimicrobial resistance [J]. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 2020, 30(4): 619–635.
- [11] BOLDEN AL, ROCHESTER JR, KWIATKOWSKI CF. Melamine, beyond the kidney: A ubiquitous endocrine disruptor and neurotoxicant? [J]. *Toxicology Letters*, 2017, 280: 181–189.
- [12] QIN Y, BUBIAJIAER H, YAO J, *et al.* Based on unmodified aptamer-gold nanoparticles colorimetric detection of dexamethasone in food [J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12(4). DOI: 10.3390/bios12040242
- [13] QIN L, JIANG JY, ZHANG L, *et al.* Occurrence and analysis of mycotoxins in domestic chinese herbal medicines [J]. *Mycology*, 2020, 11(2): 126–146.
- [14] JAMES A, DOSEN A, THOMAS NB. Crystal structure of nicarbazin, (C₁₃H₁₀N₄O₅) (C₆H₈N₂O) [J]. *Powder Diffraction*, 2024, 39(2): 105–110.
- [15] CAO XJ, SUN CR, PAN YJ. The complex of flunixin and meglumine [J]. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 2003, 59(10): 1471–1473.
- [16] 刘艳双, 郭炜. 高效液相色谱法研究大鼠肝微粒体中布地奈德异构体的酶促反应动力学[J]. *河北医科大学学报*, 2016, 37(5): 558–561, 566.
- LIU YS, GUO W. Study on the enzymatic reaction kinetics of epimeric isomers of budesonide in rat liver microsomes by HPLC [J]. *Journal of Hebei Medical University*, 2016, 37(5): 558–561, 566.
- [17] JARRING K, LARSSON T, STENSLAND B, *et al.* Thermodynamic stability and crystal structures for polymorphs and solvates of formoterol fumarate [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 95(5): 1144–1161.
- [18] NAKAI A, TOGASHI K, KOSAKA K, *et al.* Do anticholinergic agents suppress uterine peristalsis and sporadic myometrial contractions at cine mr imaging? [J]. *Radiology*, 2008, 246(2): 489–496.
- [19] 任文超, 任春娥, 丁成成, 等. 阿托品对不明原因反复胚胎种植失败患者妊娠结局的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2024, 39(22): 4464–4467.
- REN WC, REN CE, DING CC, *et al.* The effect of atropine on pregnancy outcomes in patients with unexplained recurrent embryo implantation failure [J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2024, 39(22): 4464–4467.
- [20] 屈利华. 宫颈注射东莨菪碱在产程中的效果观察[J]. *内蒙古中医药*, 2009, 28(6): 76–77.
- QU LH. Observation on the effect of cervical injection of scopolamine during labor [J]. *Inner Mongolia Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 28(6): 76–77.
- [21] 王双. 促孕灌注液治疗奶牛子宫内膜炎、产后胎衣不下和不孕症的效果[J]. *中国奶牛*, 2017(9): 18–20.
- WANG S. Efficacy of fertility-promoting infusion in treating endometritis, retained placenta, and infertility in dairy cows [J]. *China Dairy Cattle*, 2017(9): 18–20.
- [22] 周炜炜, 王雪峰, 张梦洁, 等. 基于生物网络功能模块整合组方规律分析四黄止痢颗粒治疗仔猪腹泻的作用机制[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(7): 3031–3043.
- ZHOU WW, WANG XF, ZHANG MJ, *et al.* Analysing the mechanism of shiuang zhi li granule in the treatment of piglet diarrhea based on biological network function modules and compatibility rules [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(7): 3031–3043.
- [23] SARTINI I, VERCELLI C, LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA B, *et al.* Pharmacokinetics and antibacterial activity of tiamulin after single and multiple oral administrations in geese [J]. *Veterinary and Animal Science*, 2023, 22: 100317.
- [24] 周宇航. 截短侧耳素类衍生物的化学合成、抑菌活性与毒理学评价[D]. 北京: 中国农业科学院, 2023.
- ZHOU YH. Synthesis, anti-bacterial activities and toxicological evaluation of pleuromutilin derivatives [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023.
- [25] 米同国, 黄占欣, 孟志敏, 等. 延胡索酸泰妙菌素可溶性粉对人工感染鸡慢性呼吸道病的疗效试验[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2011(5): 129–132.
- MI TG, HUANG ZX, MENG ZM, *et al.* Efficacy of tilmosin fumarate soluble powder in the treatment of experimentally induced chronic respiratory disease in chickens [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2011(5): 129–132.
- [26] 肖和良. 几例猪密螺旋体痢疾的诊治报告[J]. *猪业科学*, 2020, 37(3): 90–91.
- XIAO HL. Diagnosis and treatment of several cases of porcine treponema dysentery in Dongkou County [J]. *Swine Industry Science*, 2020, 37(3): 90–91.
- [27] 米同国, 黄占欣, 孟志敏, 等. 复方延胡索酸泰妙菌素可溶性粉对猪支原体肺炎的疗效试验[J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(11): 96–98.
- MI TG, HUANG ZX, MENG ZM, *et al.* Efficacy of compound tilmosin fumarate soluble powder in the treatment of mycoplasma pneumonia in swine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 51(11): 96–98.
- [28] SONG L, WANG Y, LI Q, *et al.* Production of monoclonal antibody against tylosin and tilmosin with homogeneous cross-reactivity and its application in lateral flow immunoassay [J]. *Microchimica Acta*, 2024, 191(1): 42.
- [29] 赵义良, 赵兴鑫, 田梅, 等. 中兽药散剂中非法添加物检测技术的研究现状及进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(2): 452–458.
- ZHAO YL, ZHAO XX, TIAN M, *et al.* Research status and progress of detection technology of illegal additives in Chinese veterinary medicine powder [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(2): 452–458.
- [30] 吴钰瑶, 盘焯晖, 林浩标, 等. 间接竞争酶联免疫吸附法检测保健食品中糖皮质激素类药物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(16): 45–54.
- WU YY, PAN CH, LIN HB, *et al.* Determination of glucocorticoid drugs in health foods by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(16): 45–54.
- [31] SHAO Y, WANG Y, YUAN Y, *et al.* A systematic review on antibiotics misuse in livestock and aquaculture and regulation implications in China [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 798: 149205.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)