

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.06.03

高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定 动物尿液中 48 种兴奋剂

贾寒冰,冯瑞雪,王苑桃,何亚琴,董曼曼,李敏,梁红月,张亚锋*

(西安市食品药品检验所,西安 710100)

[收稿日期] 2023-09-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2024)06-0017-16 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立了高效液相色谱 - 串联质谱(HPLC-MS/MS)法同时检测动物尿液中 β_2 -激动剂类、 β -阻断剂类、利尿剂类、糖皮质激素类、蛋白同化制剂类等 48 种兴奋剂的检测方法。样品经 1% 甲酸乙腈提取,加氯化钠使其分层后,40 °C 下氮气吹干,乙腈水溶液(V/V,5:5,含 0.1% 甲酸)复溶,采用 C₁₈ 色谱柱分离,用电喷雾正(ESI⁺)负(ESI⁻)模式扫描,多反应监测模式(MRM)进行检测分析,单点内标或外标法进行定量。克仑特罗等 48 种兴奋剂能实现很好的分离,重复性良好,加标水平为定量限时,目标化合物的回收率在 60%~120% 之间,相对标准偏差为 1.0%~19.3%。该方法简单、快速、准确,极大地提高了检测效率,已应用于实验室常规兴奋剂检测,为保障体育赛事的顺利进行提供了有力的技术支撑。

[关键词] 高效液相色谱 - 串联质谱(HPLC-MS/MS);动物尿液;兴奋剂

Simultaneous Detection of 48 Doping Agents in Animal Urine by High Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry

JIA Han-bing, FENG Rui-xue, WANG Yuan-tao, HE Ya-qin, DONG Man-man, LI Min,

LIANG Hong-yue, ZHANG Ya-feng*

(Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710100, China)

Corresponding author: ZHANG Ya-feng, E-mail:245463108@qq.com

Abstract: A high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was established for the simultaneous detection of 48 stimulants such as β_2 -agonists, β -blockers, diuretics, glucocorticoids, and anabolic agents in animal urine. The sample was extracted with 1% formic acid acetonitrile, added sodium chloride to make the layers, dried under nitrogen at 40 °C, redissolved in acetonitrile aqueous

基金项目: 陕西省市场监督管理局科技计划项目(2021KY14);陕西省创新能力支撑计划(2021PT-044);陕西省市场监督管理局科技计划项目(2023KY17);陕西省市场监督管理局科技计划项目(2022KY13)

作者简介: 贾寒冰,硕士研究生,助理工程师,主要研究方向为食品安全质量检测。

通讯作者: 张亚锋, E-mail:245463108@qq.com

solution (V/V, 5:5, containing 0.1% formic acid), and separated by C₁₈ chromatographic column. 48 kinds of stimulants such as clenbuterol can achieve good separation and good repeatability. When the spiked level is the limit of quantification, the recovery rate of the target compound is between 60% and 120%, and the relative standard deviation is 1.0% to 19.3%. The method is simple, fast and accurate, which greatly improves the detection efficiency. It has been applied to routine doping detection in laboratories, and provides strong technical support for ensuring the smooth progress of sports events.

Key words: high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS); animal urine; doping

兴奋剂防控是大型赛事极其重要的一项工作, 主要是因为兴奋剂能够在短时间内使运动员身体机能得到最大限度的发挥, 进而提升运动成绩^[1]。食源性兴奋剂指的是来源于食物中的兴奋剂, 既包括食物中天然含有的成分, 也包括在食物生产加工过程中产生的或者人为添加的兴奋剂^[2], 运动员误服了含有违禁兴奋剂的动物源性食品后, 轻者禁赛、剥夺荣誉称号, 重者断送职业生涯; 同时也给运动员的生理和心理造成长期的、甚至是不可逆转的伤害^[3]。蛋白同化制剂又称为同化激素, 俗称合成类固醇, 长期使用易造成肌腱细胞钙化, 使胶原纤维发生机能障碍, 失去弹性、变脆, 造成肌腱撕裂等不可逆的危害^[4]; β_2 – 激动剂能引起骨骼肌震颤造成血钾偏低、心律紊乱等^[5]; 长期食用含有利尿剂类药物的食品, 可引起机体代谢紊乱、损害肾脏功能^[6]; 糖皮质激素类又称肾上腺皮质激素, 影响激素水平特别是生长激素水平; 诱发高血压和动脉硬化等^[7]。兴奋剂应用到畜牧业生产中, 可以明显增加饲料的转化率、动物的体重以及胴体的瘦肉率^[8]。动物尿液相对于其他肌体组织, 具有宰前检测^[9]、日常可监控等优点, 同时研究表明, 兴奋剂主要以尿液形式从动物体内排出^[10-14], 例如, 刘佳在研究 β – 受体激动剂在肉牛体内代谢及残留规律时发现, 尿液中克仑特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺三种药物残留量比血浆中高出几十倍^[15]。Smith 研究表明, 克仑特罗在猪体内吸收迅速、广泛, 主要是以原药形式从尿液(占比 55.0% ~ 77.4%)中排出^[16]。崔晓亮对北京的动物源性样品(猪肉、猪肝、猪肾、牛奶、鸡蛋)和猪尿样品中的十六种糖皮

质激素残留进行检测, 结果表明仅在猪肾和猪尿中含有泼尼松龙和氢化可的松^[17]。因此检验动物尿液中的兴奋剂含量, 可以有效监控动物饲料、动物肌肉中的兴奋剂含量。

兴奋剂的检测方法有液相色谱法^[18-20]、气相色谱 – 质谱联用法^[21-23]、液相色谱 – 质谱联用法^[24-26]等。但大多数检测方法都是只检测某一类或者两类兴奋剂, 比如利尿剂^[27-29]、 β_2 – 激动剂^[30-32]等。世界反兴奋剂机构(WADA)发布的《2022 年禁用清单》^[33]中明确规定 β_2 – 激动剂类、 β – 阻断剂类、利尿剂类、糖皮质激素类、蛋白同化制剂类兴奋剂等为运动员禁、限用物质。很少有同时检测 β_2 – 激动剂类、 β – 阻断剂类、利尿剂类、糖皮质激素类、蛋白同化制剂等 5 大类兴奋剂的方法。因此, 本实验通过查询相关资料和文献, 结合实验室的条件和技术, 利用液相色谱 – 串联质谱测定方法对动物尿液中 5 大类、48 种兴奋剂进行检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Ultimate 3000 – TSQ Quantiva 型高效液相色谱 – 三重四级杆质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司), 配有 ESI 源和 TraceFinder 定量处理软件; Milli2Q 型超纯水器(美国 Millipore 公司); i Swix MV 型平行涡旋振荡器(英国 Neuation 科技); HC – 3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); 氮吹仪(美国 Organomation 公司); MS105 电子分析天平、ME204E 电子分析天平(瑞士 Mettler 公司); 5 ~ 50 mL 数字式瓶口分液器(德国 Brand 公司)。

1.1.2 试剂 标准品:克仑特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、沙美特罗、喷布特罗、美托洛尔、克仑丙罗、甲基泼尼松龙、诺龙、丙酸诺龙、勃地酮、睾酮购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;硫酸特布他林、肾上腺素、盐酸普萘洛尔、阿替洛尔、氯噻酮、吠塞米、螺内酯、卞氟噻嗪、氯噻嗪、氢氯噻嗪、氨苯蝶啶、泼尼松、泼尼松龙、地塞米松、倍他米松、倍氯米松、氢化可的松、甲基睾酮、丙酸睾酮、苯丙酸诺龙购自中国食品药品检定研究院;氢溴酸非诺特罗、阿替洛尔-D₇、睾酮-D₃购自 BePure 公司;妥布特罗、泽仑诺、齐帕特罗、克仑特罗-D₉购自于德国 WITEGA 公司;西马特罗、氟氢可的松、 β -玉米赤霉醇、西马特罗-D₇、勃地酮-D₃、甲睾酮-D₃购于上海 ANPEL 公司;去甲乌药碱购于美国 ChromaDex 公司;盐酸曲托唑啉、氨苯蝶啶-D₅、美托洛尔-D₇、普萘洛尔-D₇、吠塞米-D₅、卞氟噻嗪-D₅、沙美特罗-D₃、地塞米松-D₅、坎利酮-D₆购于加拿大 TRC 公司;乙酰唑胺、坎利酮购于 European Pharmacopoeia;精磺胺(4-氨基-6-氯-1,3 苯二磺酰胺)、美雄酮、群勃龙购于英国 LGC 公司;可的松、司坦唑醇购自于中国药品生物制品检定所;肾上腺素-D₆、沙丁胺醇-D₃、氢氯噻嗪-D₂购于加拿大 CDN 公司;莱克多巴胺-D₆盐酸盐购自于坛墨质检标准物质中心;喷布特罗-D₉盐酸盐、氢化可的松-D₃、司坦唑醇-D₃购自于美国 A Chemtek 公司 First Standard; α -玉米赤霉烯醇-D₅购自于美国 Honeywell Fluka 公司;

甲醇、乙腈(色谱纯,德国,Merck 公司);氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);甲酸(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 溶液制备

1.2.1 1% 甲酸乙腈溶液 取甲酸 10 mL,用乙腈稀释至 1000 mL,混匀,即得。

1.2.2 乙腈-水溶液(50+50,体积比,含 0.1% 甲酸) 取乙腈 50 mL,水 50 mL,加入 0.1 mL 甲酸,混匀,即得。

1.2.3 0.1% 甲酸水溶液 取甲酸 1.0 mL,用水稀释至 1000 mL,混匀,即得。

1.2.4 0.1% 甲酸甲醇溶液 取甲酸 1.0 mL,用甲醇稀释至 1000 mL,混匀,即得。

1.3 标准溶液制备

1.3.1 标准储备液 分别准确称取适量 48 种兴奋剂标准物质(精确至 0.01 mg),分别加入甲醇溶解,配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,置于 -18 °C 以下避光冷冻保存。

1.3.2 混合标准中间液 按照表 1 中兴奋剂的类别,分别吸取同类别兴奋剂标准储备液适量于 10 mL 容量瓶中,用甲醇分别稀释至刻度,配成浓度为 10 μ g/mL 的 β_2 -激动剂类(肾上腺素除外)、 β -阻断剂类、蛋白同化制剂类、糖皮质激素类(氟氢可的松除外)、利尿剂类共 5 类混合标准中间液。

1.3.3 混合标准使用液 分别精确吸取适量 1.3.2 项中 5 类混合标准中间液,以及适量肾上腺素和氟氢可的松标准储备液,用甲醇配成 100 ng/mL ~ 5 μ g/mL 的混合标准使用液。现配现用。

1.3.4 同位素内标标准储备液 分别准确称取或精确吸取适量 22 种同位素内标标准物质,分别加入甲醇溶解,配制成浓度均为 100 μ g/mL 的标准储备液,置于 -18 °C 以下避光冷冻保存。

1.3.5 混合同位素内标中间液 分别精确吸取同位素内标标准储备液适量,用甲醇稀释,配制成浓度均为 1 μ g/mL(肾上腺素-D₆为 100 μ g/mL)的混合同位素内标中间液。

1.3.6 混合标准工作液 精密移取 2 mL 空白基质提取液于 10 mL 离心管中,分别准确吸取适量的混合标准使用液和混合同位素内标中间液,涡旋混匀,于 40 °C 下氮气吹干,准确加入 1 mL 乙腈-水溶液(V/V,5:5,含 0.1% 甲酸)溶解残渣,涡旋振荡 1 min,过 0.22 μ m 尼龙滤膜,作为标准工作溶液。

1.4 液相色谱条件 色谱柱 1:资生堂 CAPCELL PAK C₁₈柱(粒径:5 μ m,2.0 mm \times 150 mm);色谱柱 2:Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(粒径:1.7 μ m,2.1 mm \times 100 mm);柱温:35 °C;进样量:5 μ L;流速:0.3 mL/min(色谱柱 1);0.2 mL/min(色谱柱 2);色谱柱 1 流动相:A 相为 0.1% 甲酸水溶液,B 相为 0.1% 甲酸甲醇溶液,梯度洗脱程序:0 ~ 1 min:95% A;1 ~ 2 min:

80% A; 2~6 min: 40% A; 6~8 min: 20% A; 8~10.5 min: 10% A; 10.5~15 min: 95% A。色谱柱 2 流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为色谱乙腈, 梯度洗脱程序: 0~15 min: 75% A; 15~20 min: 20% A; 20~25 min: 75% A。

1.5 质谱条件 离子源: 电喷雾离子源 (ESI⁺ 和 ESI⁻); 扫描方式: 多反应监测 (MRM); 喷雾电压: 3.5 kV (ESI⁺)、2.5 kV (ESI⁻); 离子传输管温度: 350 ℃; 雾化温度: 350 ℃; 鞘气流速: 40 Arb; 辅助流速: 10 Arb; 吹扫气流速: 0 Arb。

1.6 样品前处理 精密量取试样 5 mL 于 50 mL 具塞离心管中, 加入 100 μL 混合同位素内标中间液 (1.3.5), 涡旋混匀, 加入 10 mL 1% 甲酸乙腈, 涡旋振荡 10 min, 加入 3 g 氯化钠, 涡旋振荡 2 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一干净的 50 mL 具塞离心管中, 剩余部分再用 10 mL 1% 甲酸乙腈重复提取一次, 合并上清液, 精密移取 2 mL 上清

液于 10 mL 离心管中, 于 40 ℃ 下氮气吹干, 准确加入 1 mL 乙腈-水溶液 (V/V, 5:5, 含 0.1% 甲酸) 溶解残渣, 涡旋振荡 1 min, 过 0.22 μm 尼龙滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化 实验采用 100 ng/mL 的各标准品溶液, 通过注射泵注入持续进样的方式, 与适当流速的流动相共同进入质谱仪中。化合物进入电喷雾离子源后形成带电液滴, 当液滴的电荷密度超过表面张力时, 引起液滴自发的分裂, 最终形成稳定的带电离子。离子源参数优化, 在全扫描 (Full-Scan) 模式下调节电压、鞘气、辅助气及尾吹气使母离子响应最大且最稳定; 然后分别对射频电压 (RF Lens) 和裂解电压进行优化, 选择强度 (Intensity) 较强、出峰稳定的碎片作为定性定量离子。48 种兴奋剂及 22 种内标物质的质谱参数优化结果见表 1。

表 1 48 种兴奋剂及 22 种内标物质的质谱参数

Tab 1 Mass spectrometry parameters of 48 stimulants and 22 internal standard substances

类别	序号	化合物	扫描模式	母离子 质量数 (<i>m/z</i>)	定量 离子 (<i>m/z</i>)	定性 离子 (<i>m/z</i>)	裂解 电压/V	射频透镜电压 /V
β ₂ -激动剂类	1	克仑特罗 (Clenbuterol)	ESI ⁺	277.0	202.9	168.0	16/29	49
	2	沙丁胺醇 (Salbutamol)	ESI ⁺	240.2	148.0	166.0	18/10	42
	3	莱克多巴胺 (Ractopamine)	ESI ⁺	302.0	164.0	121.0	15/22	53
	4	特布他林 (Terbutaline)	ESI ⁺	226.3	152.1	107.1	16/30	45
	5	沙美特罗 (Salmeterol)	ESI ⁺	416.3	398.2	380.2	14/18	69
	6	非诺特罗 (Fenoterol)	ESI ⁺	304.2	107.1	135.0	27/17	56
	7	妥布特罗 (Tulobuterol)	ESI ⁺	228.2	154.0	118.0	16/28	45
	8	喷布特罗 (Penbutolol)	ESI ⁺	292.2	236.0	133.0	16/24	51
	9	西马特罗 (Cimaterol)	ESI ⁺	220.2	202.1	143.1	10/23	35
	10	肾上腺素 (Adrenaline)	ESI ⁺	184.1	166.3	135.3	110/15	31
	11	克仑丙罗 (Clenproperol)	ESI ⁺	263.1	132.0	203.0	27/18	38
	12	去甲乌药碱 (Higenamine)	ESI ⁺	272.0	107.2	255.2	25/14	65
	13	曲托喹酚 (Tretoquinol)	ESI ⁺	346.2	164.2	149.2	19/51	63

续表

类别	序号	化合物	扫描模式	母离子 质量数(m/z)	定量 离子(m/z)	定性 离子(m/z)	裂解 电压/V	射频透镜电压 /V
β-阻断剂类	14	普萘洛尔 (Propranolol)	ESI ⁺	260.1	116.1	155.0	18/25	68
	15	阿替洛尔 (Atenolol)	ESI ⁺	267.1	145.3	190.3	25/18	61
	16	美托洛尔 (Metoprolol)	ESI ⁺	268.1	116.4	159.3	17/20	63
蛋白同化制剂类	17	美雄酮 (Metandienone)	ESI ⁺	301.2	121.0	148.9	24/14	41
	18	司坦唑醇 (Stanozolol)	ESI ⁺	329.2	81.4	95.4	41/39	150
	19	甲基睾酮 (Methyl testosterone)	ESI ⁺	303.2	97.0	108.9	24/26	83
	20	丙酸睾酮 (Testosterone propionate)	ESI ⁺	345.2	97.4	109.4	23/28	61
	21	诺龙 (Nandrolone)	ESI ⁺	275.2	109.0	239.1	26/16	71
	22	丙酸诺龙 (Nandrolone propionate)	ESI ⁺	331.2	257.1	275.1	15/17	66
	23	苯丙酸诺龙 (Nandrolone phenylpropionate)	ESI ⁺	407.2	104.9	257.1	29/16	91
	24	勃地酮 (Boldenone)	ESI ⁺	287.2	120.9	134.9	24/15	41
	25	群勃龙 (Trenbolone)	ESI ⁺	271.1	253.4	165.4	19/52	59
	26	睾酮 (Testosterone)	ESI ⁺	289.2	96.9	109.4	23/25	60
	27	泽仑诺 (Zeranol)	ESI ⁻	321.2	277.3	303.2	22/21	100
	28	β-玉米赤霉醇 (β-zeranol)	ESI ⁻	321.1	277.3	303.2	22/21	101
29	齐帕特罗 (Zilpaterol)	ESI ⁺	262.2	244.0	185.0	13/24	52	
糖皮质激素类	30	泼尼松 (Prednisone)	ESI ⁻	403.2	327.2	299.1	13/17	47
	31	泼尼松龙 (Prednisolone)	ESI ⁻	405.2	329.2	295.1	17/31	56
	32	地塞米松 (Dexamethasone)	ESI ⁻	437.1	361.2	307.1	17/31	57
	33	倍他米松 (Betamethasone)	ESI ⁻	437.2	361.2	307.1	17/30	63
	34	氟氢可的松 (Fludrocortisone)	ESI ⁻	379.2	349.2	295.1	10/25	79
	35	甲基泼尼松龙 (Methylprednisolone)	ESI ⁻	419.2	343.2	294.1	17/34	58
	36	倍氯米松 (Beclomethasone)	ESI ⁻	453.2	377.2	297.2	14/26	54
	37	可的松 (Cortisone)	ESI ⁻	405.2	329.2	301.2	14/19	51
	38	氢化可的松 (Hydrocortisone)	ESI ⁻	407.2	331.2	282.1	17/37	58

续表

类别	序号	化合物	扫描模式	母离子 质量数(m/z)	定量 离子(m/z)	定性 离子(m/z)	裂解 电压/V	射频透镜电压 /V
利尿剂类	39	乙酰唑胺 (Acetazolamide)	ESI ⁻	221.1	83.0	58.0	17/15	69
	40	坎利酮 (Canrenone)	ESI ⁺	341.2	107.1	187.1	29/21	86
	41	氯噻酮 (Chlortalidone)	ESI ⁻	337.0	190.0	146.1	16/19	111
	42	呋塞米 (Furosemide)	ESI ⁻	329.1	285.0	205.0	14/20	65
	43	螺内酯 (Spironolactone)	ESI ⁺	341.2	107.1	187.1	29/21	86
	44	卞氟噻嗪 (Bendroflumethiazide)	ESI ⁻	420.2	289.1	328.0	21/24	136
	45	氯噻嗪 (Chlorothiazide)	ESI ⁻	294.0	214.0	179.0	29/44	144
	46	氢氯噻嗪 (Hydrochlorothiazide)	ESI ⁻	296	269.0	205.0	19/22	126
47	氨苯蝶啶 (Triamterene)	ESI ⁺	254.4	237.0	168.0	26/35	87	
48	精磺胺(4-氨基- 6-氯-1, 3-苯二磺酰胺) (4-Amino-6- chlorobenzene-1, 3-disulphonamide)	ESI ⁻	284.0	204.9	169.0	21/22	115	
内标	49	沙丁胺醇-D ₃ (Salbutamol-D ₃)	ESI ⁺	243.2	151.1	225.0	18/10	44
	50	克仑特罗-D ₉ (Clenbuterol-D ₉)	ESI ⁺	286.0	203.9	268.0	16/11	48
	51	莱克多巴胺-D ₆ (Ractopamine-D ₆)	ESI ⁺	308.3	168.2	290.2	17/13	59
	52	沙美特罗-D ₃ (Salmeterol-D ₃)	ESI ⁺	419.2	401.4	383.4	13/17	64
	53	美托洛尔-D ₇ (Metoprolol-D ₇)	ESI ⁺	275.2	123.4	159.3	18/21	63
	54	普萘洛尔-D ₇ (Rac-Propranolol-D ₇)	ESI ⁺	267.2	189.3	116.4	17/18	59
	55	阿替洛尔-D ₇ (Atenolol-D ₇)	ESI ⁺	274.2	145.3	190.3	25/18	67
	56	肾上腺素-D ₆ (Adrenaline-D ₆)	ESI ⁺	190.2	172.3	157.3	10/20	31
	57	西马特罗-D ₇ (Cimaterol-D ₇)	ESI ⁺	227.1	209.4	161.3	10/17	30
	58	喷布特罗-D ₉ (Penbutolol-D ₉)	ESI ⁺	301.2	237.2	133.1	16/24	56
	59	甲睾酮-D ₃ (Methyltestosterone-D ₃)	ESI ⁺	306.3	288.4	270.4	15/18	60
	60	17β-勃地酮-D ₃ (17β-Boldenone-D ₃)	ESI ⁺	290.2	121.3	138.4	23/14	46
	61	睾酮-D ₃ (Testosterone-D ₃)	ESI ⁺	292.2	109.3	256.4	23/15	59
	62	α-玉米赤霉烯醇-D ₅ (alpha-Zearalenol-D ₅)	ESI ⁻	324.2	280.2	160.0	20/30	87

续表

类别	序号	化合物	扫描模式	母离子 质量数(m/z)	定量 离子(m/z)	定性 离子(m/z)	裂解 电压/V	射频透镜电压 /V
内标	63	司坦唑醇 - D ₃ (Stanozolol - D ₃)	ESI ⁺	332.2	81.1	95.1	43/41	125
	64	氢化可的松 - D ₃ (Hydrocortisone - D ₃)	ESI ⁻	410.2	334.2	300.2	16/31	58
	65	地塞米松 - D ₅ (Dexamethasone - D ₅)	ESI ⁻	442.2	364.3	310.2	17/32	57
	66	坎利酮 - D ₆ (Canrenone - D ₆)	ESI ⁺	347.2	189.3	207.3	21/20	83
	67	呋塞米 - D ₅ (Furosemide - D ₅)	ESI ⁻	334.0	290.2	206.1	15/22	67
	68	卞氟噻嗪 - D ₅ (Bendroflumethiazide - D ₅)	ESI ⁻	425.0	294.2	328.0	22/25	135
	69	氢氯噻嗪 - D ₂ (Hydrochlorothiazide - D ₂)	ESI ⁻	298.0	270.1	206.1	19/23	105
	70	氨苯蝶啶 - D ₅ (Triamterene - D ₅)	ESI ⁺	259.1	242.3	241.3	26/26	134

2.2 前处理条件优化

2.2.1 流动相的选择 由于检测的组分较多,选择梯度洗脱。本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%甲酸水、甲醇-含0.1%的甲酸的10 mmol/L乙酸铵溶液、乙腈-含0.1%的甲酸的10 mmol/L乙酸铵溶液、0.1%甲酸甲醇-0.1%甲酸水等几种流动相体系。实验发现流动相中加入酸可以给化合物在正离子模式下更好地提供质子,有效改善峰形,提高分离度,增强响应;用乙腈作为流动相,部分激动剂类物质容易出现分叉现象;当用0.1%甲酸甲醇-0.1%甲酸水溶液作为流动相时所有化合物均能获得较好的峰

型及较高的响应。

2.2.2 色谱柱的选择 实验发现,使用普通 C₁₈柱在短时间内不能把地塞米松和倍他米松这两种同分异构体分离,但是由大型体育赛事的兴奋剂检测需求,在初筛的时候可以先将这两种物质分离,如果样品在地塞米松和倍他米松的保留时间出现色谱峰,则单独对该两种物质进行分离。48种兴奋剂总离子流图详见图1。

由于同分异构体较难分离,为增加两者分离度,选择粒径较小(1.7 μm)的 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱进行分离,并取得了良好的分离效果,详见图2。

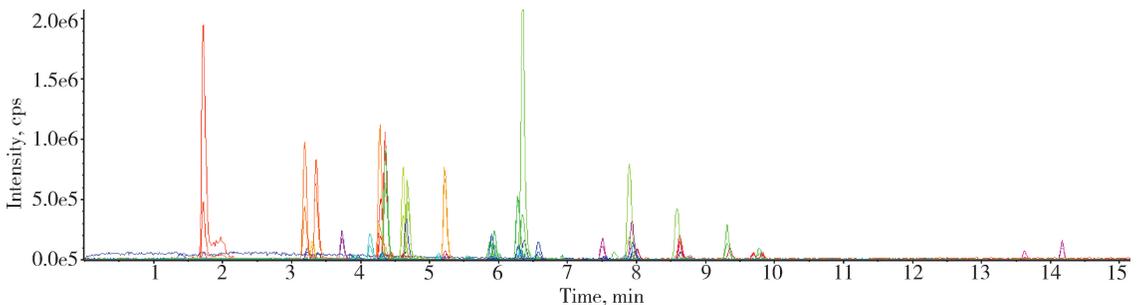


图1 48种兴奋剂总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms of 48 stimulants

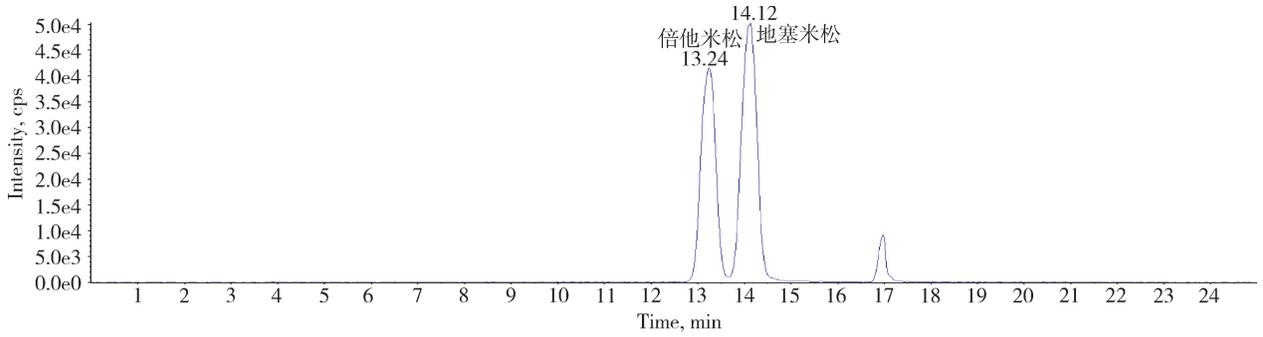


图 2 倍他米松和地塞米松色谱图

Fig. 2 Chromatograms of betamethasone and dexamethasone

2.2.3 提取溶剂的选择 本实验对乙腈-3 g 氯化钠、乙腈-3 g 无水硫酸钠、1% 甲酸乙腈-3 g 氯化钠、1% 甲酸乙腈-3 g 无水硫酸钠四种提取体系

进行了比较。结果表明,在相同添加水平下,用 1% 甲酸乙腈-3 g 氯化钠作为提取溶剂时各组分的平均回收率较高,详见表 2。

表 2 不同提取体系回收率

Tab 2 Recovery rates of different extraction systems

类别	序号	化合物	乙腈-3 g 氯化钠 平均回收率 /%	乙腈-3 g 无水 硫酸钠平均 回收率/%	1% 甲酸乙腈-3 g 氯化钠平均 回收率/%	1% 甲酸乙腈-3 g 无水硫酸钠 平均回收率/%
β ₂ -激动剂类	1	克仑特罗 (Clenbuterol)	79.9	91.6	116	104
	2	沙丁胺醇 (Salbutamol)	94.1	83.6	98.9	100
	3	莱克多巴胺 (Ractopamine)	129	93.0	110	141
	4	特布他林 (Terbutaline)	95.1	75.6	114	101
	5	沙美特罗 (Salmeterol)	125	124	106	94.9
	6	非诺特罗 (Fenoterol)	57.5	44.4	73.7	40.9
	7	妥布特罗 (Tulobuterol)	96.7	153	112	178
	8	喷布特罗 (Penbutolol)	68.0	77.1	109	66.1
	9	西马特罗 (Cimaterol)	137	278	104	551
	10	肾上腺素 (Adrenaline)	170	123	97.3	113
	11	克仑丙罗 (Clenproperol)	83.3	78.2	99.9	87.3
	12	去甲乌药碱 (Higenamine)	33.4	45.4	70.1	46.8
	13	曲托喹酚 (Tretoquinol)	149	194	103	201

续表

类别	序号	化合物	乙腈-3 g 氯化钠 平均回收率 /%	乙腈-3 g 无水 硫酸钠平均 回收率/%	1% 甲酸乙腈-3 g 氯化钠平均 回收率/%	1% 甲酸乙腈-3 g 无水硫酸钠 平均回收率/%	
β-阻断剂	14	普萘洛尔 (Propranolol)	153	152	109	169	
	15	阿替洛尔 (Atenolol)	97.5	127	108	101	
	16	美托洛尔 (Metoprolol)	135	146	104	162	
蛋白同化制剂类	17	美雄酮 (Metandienone)	86.3	106	101	103	
	18	司坦唑醇 (Stanozolol)	94.4	105	118	99.8	
	19	甲基睾酮 (Methyl testosterone)	90.6	81.8	83.8	76.9	
	20	丙酸睾酮 (Testosterone propionate)	110	73.6	114	110	
	21	诺龙 (Nandrolone)	97.8	119	103	91.3	
	22	丙酸诺龙 (Nandrolone propionate)	117	76.51	98.4	91.1	
	23	苯丙酸诺龙 (Nandrolone phenylpropionate)	69.3	39.3	64.5	61.7	
	24	勃地酮 (Boldenone)	104	93.7	91.4	88.6	
	25	群勃龙 (Trenbolone)	240	60.0	110	116	
	26	睾酮 (Testosterone)	85.0	83.1	112	111	
	27	泽仑诺 (Zeranol)	138	129	107	125	
	28	β-玉米赤霉醇 (β-zeranol)	61.0	120	107	96.8	
	29	齐帕特罗 (Zilpaterol)	19.2	57.3	60.1	43.1	
	糖皮质激素类	30	泼尼松 (Prednisone)	64.8	80.2	115	74.5
		31	泼尼松龙 (Prednisolone)	79.4	61.6	100	86.3
32		地塞米松 (Dexamethasone)	92.1	86.9	109	110	
33		倍他米松 (Betamethasone)	86.1	89.5	111	91.6	
34		氟氢可的松 (Fludrocortisone)	23.9	0.00	69.9	64.5	
35		甲基泼尼松龙 (Methylprednisolone)	67.0	83.454	118	71.4	
36		倍氯米松 (Beclomethasone)	86.1	57.6	111	102	
37		可的松 (Cortisone)	485	286	99.2	94.5	
38		氢化可的松 (Hydrocortisone)	70.7	57.8	86.2	75.1	

续表

类别	序号	化合物	乙腈-3 g 氯化钠 平均回收率 /%	乙腈-3 g 无水 硫酸钠平均 回收率/%	1% 甲酸乙腈-3 g 氯化钠平均 回收率/%	1% 甲酸乙腈-3 g 无水硫酸钠 平均回收率/%
利尿剂类	39	乙酰唑胺 (Acetazolamide)	121	192	95.0	131
	40	坎利酮 (Canrenone)	78.6	65.9	109	
	41	氯噻酮 (Chlortalidone)	62.0	18.8	106	25.7
	42	呋塞米 (Furosemide)	371	356	87.4	166
	43	螺内酯 (Spironolactone)	108	86.9	119	121
	44	卞氟噻嗪 (Bendroflumethiazide)	104	105	100	114
	45	氯噻嗪 (Chlorothiazide)	59.0	41.9	72.0	30.6
	46	氢氯噻嗪 (Hydrochlorothiazide)	112	154	101	86.3
	47	氨苯蝶啶 (Triamterene)	124	91.1	106	89.3
	48	精磺胺(4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺) (4-Amino-6-chlorobenzene-1,3-disulphonamide)	124	153	85.7	92.2

2.2.4 内标物质的选择 查看文献以及联系标准品厂家,对目标物质与内标物质进行了选择与匹配,以目标物和内标物质结构相近,保留时间接近、

回收率较高为原则,选择相对最为适合的内标物质。最终确定了 22 种内标物质,详见表 3。

表 3 48 种兴奋剂在定量限水平的加标回收率

Tab 3 Spike recoveries at the limit of quantitation for 48 stimulants

序号	化合物名称	对应内标	检出限 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	定量限 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	克仑特罗 (Clenbuterol)	克仑特罗-D ₉	1	2	2	89.3 82.2 117.4	96.3	19.3
2	沙丁胺醇 (Salbutamol)	沙丁胺醇-D ₃	1	2	2	87.6 99.7 91.8	91.8	7.5
3	莱克多巴胺 (Ractopamine)	莱克多巴胺-D ₆	1	2	2	96.6 93.1 91.8	91.8	6.0
4	特布他林 (Terbutaline)	沙丁胺醇-D ₃	1	2	2	117.2 113.2 114	114	2.6
5	沙美特罗 (Salmeterol)	沙美特罗-D ₃	2	4	4	86.9 99.7 98.3	98.3	11.1
6	非诺特罗 (Fenoterol)	/	1	2	2	81.4 95.8 85.0	85.0	11.3

续表

序号	化合物名称	对应内标	检出限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	定量限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	添加浓度 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 $/\%$	平均回 收率/ $\%$	RSD $/\%$
7	妥布特罗 (Tulobuterol)	莱克多巴胺 - D ₆	1	2	2	93.5 80.6 93.8	93.8	14.3
8	喷布特罗 (Penbutolol)	喷布特罗 - D ₉	1	2	2	96.1 105.8 96.7	96.7	9.2
9	西马特罗 (Cimaterol)	西马特罗 - D ₇	2	4	4	83.4 101.3 92.9	92.9	9.7
10	肾上腺素 (Adrenaline)	肾上腺素 - D ₆	400	800	800	93.8 91.7 93.7	93.7	2.2
11	克仑丙罗 (Clenproperol)	克仑丙罗 - D ₉	1	2	2	110.2 102.5 104.6	104.6	4.7
12	去甲乌药碱 (Higenamine)	/	3	6	6	79.2 71.3 76.1	76.1	5.5
13	曲托喹酚 (Tretoquinol)	莱克多巴胺 - D ₆	1	2	2	96.3 90.3 99.0	99.0	10.4
14	普萘洛尔 (Propranolol)	普萘洛尔 - D ₇	1	2	2	109.4 112.3 104.1	104.1	11.2
15	阿替洛尔 (Atenolol)	阿替洛尔 - D ₇	2	4	4	110.6 106.7 106.2	106.2	4.4
16	美托洛尔 (Metoprolol)	美托洛尔 - D ₇	1	2	2	84.2 87.0 91.5	91.5	11.4
17	美雄酮 (Metandienone)	睾酮 - D ₃	20	40	40	76.0 91.9 85.8	85.8	10.0
18	司坦唑醇 (Stanozolol)	16 β -羟基司坦唑醇 - D ₃	2.5	5	5	92.9 98.4 96.0	96.0	2.9
19	甲基睾酮 (Methyl testosterone)	睾酮 - D ₃	5	10	10	100.3 94.7 99.1	99.1	3.9
20	丙酸睾酮 (Testosterone propionate)	睾酮 - D ₃	5	10	10	98.5 84.3 97.2	97.2	12.7
21	诺龙 (Nandrolone)	睾酮 - D ₃	5	10	10	97.8 87.9 92.7	92.7	5.3
22	丙酸诺龙 (Nandrolone propionate)	睾酮 - D ₃	10	20	20	104.6 94.4 98.8	98.8	5.3
23	苯丙酸诺龙 (Nandrolone phenylpropionate)	/	10	20	20	86.0 87.8 87.0	87.0	1.0
24	勃地酮 (Boldenone)	勃地酮 - D ₃	10	20	20	93.8 117.8 105.2	105.2	5.2
25	群勃龙 (Trenbolone)	勃地酮 - D ₃	5	10	10	84.5 105.2 85.8	91.8	12.6

续表

序号	化合物名称	对应内标	检出限 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	定量限 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
26	睾酮 (Testosterone)	睾酮-D ₃	10	20	20	70.6 66.7 75.9	71.1	6.5
27	泽仑诺(α -玉米赤霉醇) (Zeranol)	α -玉米赤霉烯醇-D ₅	5	10	10	130.5 122.1 106.7	119.8	10.1
28	β -玉米赤霉醇 (β -zeranol)	α -玉米赤霉烯醇-D ₅	5	10	10	103.1 106.3 101.6	103.7	2.3
29	齐帕特罗 (Zilpaterol)	/	8	16	16	70.8 79.8 71.7	74.1	6.7
30	泼尼松 (Prednisone)	氢化可的松-D ₃	8	16	16	77.4 76.2 103.1	85.6	17.8
31	泼尼松龙 (Prednisolone)	氢化可的松-D ₃	4	8	8	101.8 93.4 110.3	101.8	8.3
32	地塞米松 (Dexamethasone)	地塞米松-D ₅	2	4	4	105.5 102.8 99.7	102.6	2.8
33	倍他米松 (Betamethasone)	氢化可的松-D ₃	2	4	4	99.3 97.8 99.7	98.9	1.0
34	氟氢可的松 (Fludrocortisone)	氢化可的松-D ₃	300	600	600	110.2 107.2 95.0	104.2	7.7
35	甲基泼尼松龙 (Methylprednisolone)	氢化可的松-D ₃	4	8	8	90.1 70.9 100.2	87.1	17.1
36	倍氯米松 (Beclomethasone)	氢化可的松-D ₃	4	8	8	91.9 93.3 108.4	97.9	9.4
37	可的松 (Cortisone)	氢化可的松-D ₃	2	4	4	70.8 56.0 56.9	61.2	13.6
38	氢化可的松 (Hydrocortisone)	氢化可的松-D ₃	4	8	8	81.9 91.9 63.0	79.0	18.6
39	乙酰唑胺 (Acetazolamide)	氢氯噻嗪-D ₂	20	40	40	103.6 110.6 102.1	105.4	4.3
40	坎利酮 (Canrenone)	坎利酮-D ₆	5	10	10	104.3 101.7 79.1	95.0	14.6
41	氯噻酮 (Chlortalidone)	坎利酮-D ₆	10	20	20	79.7 91.1 116	95.6	19.5
42	呋塞米 (Furosemide)	呋塞米-D ₅	5	10	10	88.8 99.8 96.2	95.0	5.9
43	螺内酯 (Spironolactone)	坎利酮-D ₆	10	20	20	96.4 94.4 77.3	89.3	11.8
44	卞氟噻嗪 (Bendroflumethiazide)	卞氟噻嗪-D ₅	2.5	5	5	106.3 104.7 104.4	105.1	1.0

续表

序号	化合物名称	对应内标	检出限 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	定量限 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
45	氯噻嗪 (Chlorothiazide)	氢氯噻嗪 - D ₂	2.5	5	5	77.6 94.1 97.0	89.6	11.7
46	氢氯噻嗪 (Hydrochlorothiazide)	氢氯噻嗪 - D ₂	5	10	10	100.2 121.8 113.1	111.7	9.7
47	氨苯蝶啶 (Triamterene)	氨苯蝶啶 - D ₅	2.5	5	5	105.8 99.3 97.4	100.8	4.4
48	精磺胺(4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺) (4-Amino-6-chlorobenzene-1,3-disulphonamide)	氢氯噻嗪 - D ₂	20	40	40	108.5 109.5 98.5	105.5	5.8

2.3 方法回收率与精密度 对本方法在定量限水平进行 3 个平行的加标回收,结果详见表 3。

2.4 实验间比对 为验证方法的有效性,以及精密度和回收率等技术参数,本研究小组委托了 3 家

单位,采用本研究的方法对动物体液中进行了验证实验,数据及分析见表 4。4 家验证单位所得实验结果,平均回收率在 76.6% ~ 106.5% 之间,满足体育赛事兴奋剂检测要求。

表 4 实验室间数据比对

Tab 4 Data comparison between different laboratories

中文名称	本实验室		实验室 A		实验室 B		实验室 C		平均回 收率/%	变异 系数/%
	添加水平 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收 率/%								
克仑特罗	1.986	96.3	2	102.3	2	112.3	2.33	102.3	103.3	6.4
沙丁胺醇	2.152	91.8	2	86.8	2	113.5	2.108	104.2	99.1	12.2
莱克多巴胺	1.86	91.8	2	108.4	2	111.4	2.12	99.9	102.9	8.6
特布他林	1.986	114	2	111.6	2	76.9	2.016	105.4	102.0	16.8
沙美特罗	3.576	98.3	4	103.9	4	110	3.72	98.2	102.6	5.5
非诺特罗	1.578	85	2	85.3	2	81.1	1.7	104.3	88.9	11.7
妥布特罗	2.13	93.8	2	106.8	2	103.9	2.04	113	104.4	7.7
喷布特罗	1.65	96.7	2	92	2	81.4	1.9	102.5	93.2	9.6
西马特罗	3.656	92.9	4	105.2	4	76.5	3.9392	86.7	90.3	13.3
肾上腺素	658.4	93.7	800	93	800	72.9	798.24	99	89.7	12.8
克仑丙罗	1.764	104.6	2	115.9	2	108.7	2.062	96.9	106.5	7.5
去甲乌药碱	6.12	76.1	6	87.3	6	78.3	6.54	92.9	83.7	9.4
曲托唑啉	1.792	99	2	89.7	2	103.4	1.792	102.1	98.6	6.3
普萘洛尔	2.136	90.5	2	95.2	2	87.7	2.174	90.2	91.0	4.2
阿替洛尔	4.448	106.2	4	95.3	4	88.4	4.256	76.9	91.7	13.4
美托洛尔	2.15	91.5	2	89.2	2	110.6	2.02	75	91.6	16.0
美雄酮	36.496	85.8	40	108.2	40	112.5	41.84	109.1	103.9	11.7
司坦唑醇	5.024	96	5	94.2	5	111.9	5.805	111.6	103.4	9.3
丙酸睾酮	11.39	97.2	10	82.3	10	110.6	10.58	94.6	96.2	12.1
诺龙	9.824	92.7	10	81.2	10	82.9	9.9	77.2	83.5	7.9
丙酸诺龙	22.44	98.8	20	84.8	20	87	20	70.1	85.2	13.8

续表

中文名称	本实验室		实验室 A		实验室 B		实验室 C		平均回收率/%	变异系数/%
	添加水平 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/%								
苯丙酸诺龙	20.1	87	20	47.4	20	85.3	20.6	86.8	76.6	25.4
勃地酮	18.792	105.2	20	46.4	20	79.4	21	109.4	85.1	34.1
群勃龙	10.48	91.8	10	98.3	10	83.6	10.84	73.2	86.7	12.5
睾酮	20.32	71.1	20	82.8	20	111.3	19.92	81.2	86.6	19.9
泽仑诺	10.3	119.8	10	96.3	10	80.3	9.452	109.6	101.5	16.8
β -玉米赤霉醇	9.9	103.7	10	106	10	109.4	8.38	105.8	106.2	2.2
齐帕特罗	14.528	74.1	16	103.6	16	84.8	17.36	92.7	88.8	14.0
泼尼松	16.8	85.6	16	129	16	78.3	15.891	85.2	94.5	24.6
泼尼松龙	9.272	101.8	8	101.2	8	86.4	7.868	87.9	94.3	8.8
地塞米松	2.506	102.6	4	93	4	110.5	3.968	82.2	97.1	12.6
倍他米松	2.052	98	4	89.6	4	107.6	4	110.4	101.4	9.4
氟氢可的松	576.3	88.6	600	88.6	600	82.6	585	101.8	91.0	10.8
甲基泼尼松龙	7.99	87.1	8	103.1	8	84.8	8.08	99.3	93.6	9.6
倍氯米松	8.944	97.9	8	84.9	8	87.5	8.072	91	90.3	6.2
可的松	4.128	61.2	4	107.3	4	78.3	4	114.4	90.3	27.6
氢化可的松	8.368	79	8	92.4	8	104.7	7.8056	108.8	96.2	14.0
乙酰唑胺	43.32	105.4	40	99.5	40	109.5	39.12	101.3	103.9	4.3
坎利酮	10.96	95	10	72.3	10	84.7	9.856	113.7	91.4	19.2
氯噻酮	20.92	95.6	20	103.2	20	89.1	19.892	89.1	94.3	7.1
吠塞米	11.44	95	10	91.1	10	84.7	9.95	68	84.7	14.1
螺内酯	18.56	89.3	20	95.6	20	82	21.4	111.7	94.7	13.4
卞氟噻嗪	5.376	105.1	5	101.6	5	83.1	4.532	86.8	94.2	11.5
氯噻嗪	6.49	89.6	5	85.8	5	109.5	4.74	80.2	91.3	14.0
氢氯噻嗪	10.02	111.7	10	86.5	10	81.8	9.34	90.1	92.5	14.3
氨苯蝶啶	4.864	100.8	5	99.2	5	112.5	4.611	78.1	97.7	14.7
精磺胺 (4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺)	40.88	105.5	40	110.5	40	110.5	39.68	90	104.1	9.3

3 讨论与小结

3.1 样品前处理方法的优化 王守英等^[9]针对动物尿液中 23 种常见 β -受体激动剂,样品经酸解释放结合态药物,混合型阳离子固相萃取柱富集净化,5% 氨水甲醇洗脱、浓缩后进行检测;侯轩等^[34]针对动物尿液样本中的蛋白同化制剂,在 37 ± 0.5 °C 下酶解 16 h 后,调节 $\text{pH} = 7.0 (\pm 0.5)$, C_{18} 固相萃取柱净化后,用 HPLC-MS/MS 进行检测。本研究应用高效液相色谱-串联质谱法,将样品经含 1% 甲酸的乙腈溶液提取,加氯化钠使其分层后,40 °C 下氮气吹干,乙腈水溶液 (V/V, 5:5, 含 0.1% 甲酸) 复溶后用于检测,该前处理操作简便,能够快

速、高通量测定动物体液中 β_2 -激动剂类、 β -阻断剂类、蛋白同化制剂类、糖皮质激素类、利尿剂类等五大类共 48 种兴奋剂,涉及的目标物种类更多,大大提高了检测效率,缩短了检验时长。

3.2 标准物质的选择 查看文献以及联系标准品厂家,对目标物质与内标物质进行了选择与匹配,以目标物和内标物质结构相近,保留时间接近、回收率较高为原则,选择相对最为适合的内标物质。

本方法测定了动物体液中五大类共 48 种兴奋剂,建立了动物体液中 48 种兴奋剂残留量的高效液相色谱-串联质谱方法。克仑特罗等 48 种兴奋剂能实现很好的分离,重复性良好,加标水平为定量限

时,目标化合物的回收率在 60% ~ 120% 之间,相对标准偏差为 1.0% ~ 19.3%。该方法简单、快速、准确、灵敏,极大地提高了检测效率,能够满足运动会等大中型赛事对于兴奋剂快速、准确的检测要求,为运动会的成功举办贡献了技术力量,对办“干净”的运动会、拿“干净”的奖牌具有重要意义。

参考文献:

- [1] 侯丹丹. 浅谈体育中的兴奋剂[J]. 田径, 2021(8): 70-71.
Hou D D. Talking about Doping in Sports[J]. Track and Field, 2021(8): 70-71.
- [2] 李笑曼, 臧明伍, 王守伟, 等. 国内外食源性兴奋剂误服事件分析与法规标准现状[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 280-287.
Li X M, Zang M W, Wang S W, et al. Analysis of Events of Ingestion of Food-borne Stimulants by Mistake and Current Status of Relevant Regulations and Standards in China and Abroad [J]. Food Science, 2019, 40(21): 280-287.
- [3] 柴菱. 兴奋剂对运动员健康的危害[J]. 体育时空, 2017(11).
Chai L. Hazards of Doping to Athletes' Health[J]. Sports Time, 2017(11).
- [4] 周冰. 蛋白同化制剂功能及不良反应[J]. 临床药物治疗杂志, 2009, 6(6): 47-48.
Zhou B. Function and Adverse Reactions of Anabolic Agents[J]. Clinical Medication Journal, 2009, 6(6): 47-48.
- [5] 张建丽, 徐友宣, 邸欣. 兴奋剂中 β_2 -激动剂的检测方法研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2003, 22(5): 493-498.
Zhang J L, Xu Y X, Di X. Research Progress on Detection Methods of β_2 -Agonists in Stimulants[J]. Chinese Journal of Sports Medicine. 2003, 22(5): 493-498.
- [6] 张丽华, 刘琪, 李星, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱测定动物源食品中 25 种利尿剂[J]. 分析测试学报, 2023, 42(10): 1335-1342.
Zhang L H, Liu Q, Li X, et al. Determination of 25 Kinds of Diuretics in Animal-derived Foods by UPLC-QE-Orbitrap HRMS[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(10): 1335-1342.
- [7] 李永吉, 陈燕, 王柯, 等. 运动员特供食品中兴奋剂检测研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2604-2610.
Li Y J, Chen Y, Wang K, et al. Advance on Detection Methods of Athletes' food-borne Stimulant[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 7(7): 2604-2610.
- [8] 朱英才, 彭强. 超高效液相色谱-串联质谱法检测猪尿中 4 种 β -兴奋剂药物残留[J]. 畜禽业, 2015(3): 34-36.
Zhu Y C, Peng Q. Detection of 4 β -stimulant Drug Residues in Pig Urine by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-tandem mass Spectrometry [J]. Livestock and Poultry Industry, 2015(3): 34-36.
- [9] 王守英, 司文帅, 杨海锋, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物尿液中 23 种 β -受体激动剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(14): 5620-5628.
Wang S Y, Si W S, Yang H F, et al. Determination of 23 Kinds of β -receptor Agonists in Animal Urine by High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(14): 5620-5628.
- [10] 董伟峰, 高鹭, 于卓然, 等. β -受体激动剂在饲养肉用动物体内的代谢与残留研究进展[J]. 现代农业科技, 2015, (21): 259-261.
Dong W F, Gao L, Yu Z R, et al. Research Progress About Metabolism and Residues of β -agonists in Feeding Meat Animal [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015, (21): 259-261.
- [11] 张凯, 张军民, 赵青余, 等. 沙丁胺醇在动物体内代谢残留规律及监管技术研究进展[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(05): 9-13.
Zhang K, Zhang J M, Zhao Q Y, et al. Research Progress on Metabolic Residues and Regulatory Technology of Salbutamol in Animals [J]. Food and Nutrition in China, 2015, 21(05): 9-13.
- [12] 杨瑞. 同位素质谱在福美司坦、宝丹酮、19-去甲雄酮、 ^{13}C 标记睾酮兴奋剂检测中新方法的研究与应用[D]. 北京体育大学, 2015.
Yang R. Research and Application of New Method on Detection of Doping Control on IRMS for Formestane, Boldenone, 19-Norandrosterone, ^{13}C -Testosterone [D]. Beijing Sport University, 2015.
- [13] 张长久, 张亦农, 刘欣, 等. 兴奋剂甾体类药物质谱检测方法的研究[J]. 质谱学报, 1996(02): 72-77.
Zhang C J, Zhang Y N, Liu X, et al. Study of Mass Spectrometry Detection Methods for Stimulant Steroids [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 1996(02): 72-77.
- [14] 陈子亮, 刘晓宇. 兽药在动物体内残留代谢的研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2010, 214(7): 33-36.
Chen Z L, Liu X Y. Research Progress on Residues and Metabolism of Veterinary Drugs in Animals [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2010, 214(7): 33-36.

- [15] 刘佳. β -受体激动剂在肉牛体内代谢及残留规律研究[D]. 兰州大学, 2018.
Liu J. The Accumulation and Depletion of β -agonists in Beef Cattle[D]. Lanzhou University, 2018.
- [16] D. T. Smith, 万美梅, 谭滇湘. ^{14}C -盐酸克伦特罗混饲在猪体内的残留消除研究[J]. 中国动物保健, 2003, 92(3): 9-12.
D. T. Smith, Wan M M, Tan D X. Study of Residue Elimination in Pigs with Mixed Feeding of ^{14}C -Clenbuterol [J]. China Animal Health, 2003, 92(3): 9-12.
- [17] 崔晓亮. 超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法测定动物源性食品和尿液中糖皮质激素残留[D]. 天津大学, 2006.
Cui X L. Determination of Glucocorticoids Residues in Animal Derived Food and Urine by Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry [D]. Tianjin University, 2006.
- [18] Courtheyn D, Desaeveer C, Verhe R. High-performance liquid chromatographic determination of clenbuterol and cimaterol using post-column derivatization [J]. Journal of chromatography, 1991, 564(2): 537-549.
- [19] Lee S H, Lee M G. Determination of azosemide and its metabolite in plasma, blood, urine and tissue homogenates by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of chromatography. B, Biomedical applications, 1994, 656(2): 367-372.
- [20] Bressan C, Ayala-Cabrera J F, Santos F J, et al. Analysis of hydroxylated phenylalkylamine stimulants in urine by GC-APPI-HRMS[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2020, 412(28).
- [21] Catlin D H, Kammerer R C, Hatton C K, et al. Analytical chemistry at the Games of the XXIIIrd Olympiad in Los Angeles, 1984[J]. Clinical chemistry, 2020(2): 2.
- [22] Wozniak M K, Banaszkiwicz L, Wierowski M, et al. Development and validation of a GC-MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood[J]. Forensic Toxicology, 2020, 38(1): 42-58.
- [23] Speltini A, Merlo F, Maraschi F, et al. Magnetic Micro-Solid-Phase Extraction Using a Novel Carbon-Based Composite Coupled with HPLC-MS/MS for Steroid Multiclass Determination in Human Plasma [J]. Molecules, 2021, 26(7): 2061.
- [24] Duarah S, Sharma M, Wen J. Rapid and simultaneous determination of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate using HPLC-UV: Application in microneedle-assisted skin permeation and deposition studies [J]. Journal of Chromatography B, 2021, 1170: 122609.
- [25] Salih R A. The determination of common anabolic steroid and stimulants in nutritional supplements by HPLC-DAD and LC-MS[J]. Journal of chromatographic science, 2020, 58(4): 4.
- [26] Ksenofontov A A, Lukanov M M, Antina E V. Fluorescent detection of loop diuretics by sensors based on zinc (II) bis(dipyrromethenate)s [J]. Dyes and Pigments, 2020, 179: 108389.
- [27] Hyun J L, Ji Y Y, Young A M, et al. Screening and elucidation of fragmentations of 23 diuretics in dietary supplements using UHPLC-Q-Orbitrap [J]. Science & Justice, 2021, 61(5): 451-458.
- [28] Akhmet Z, Zhaxylykova G, Sukor R, et al. Incidence of hormonal growth stimulant and antibiotics residues in chicken meat [J]. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 2021, 15: 608-615.
- [29] Li L, Li L, Jin Y, et al. Preparation of a teicoplanin-bonded chiral stationary phase for simultaneous determination of clenbuterol and salbutamol enantiomers in meat by LC-MS/MS [J]. Microchemical Journal, 2020, 157: 104925.
- [30] Chen D, Xu Q, Lu Y, et al. The QuEChERS method coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of diuretics in animal-derived foods [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 101: 103965-103970.
- [31] He G, Sheng L, Zhang J, et al. Enantiomeric analysis of clenbuterol in Chinese people by LC-MS/MS to distinguish doping abuse from meat contamination [J]. Bioanalysis, 2020, 12(6).
- [32] Yan Y, Ai L, Zhang H, et al. Development an automated and high-throughput analytical platform for screening 39 glucocorticoids in animal-derived food for doping control [J]. Microchemical Journal, 2021, 165(16): 106142.
- [33] World Anti-Doping Agency (WADA). Prohibited List 2022. <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/prohibited-list>.
- [34] 侯轩, 罗成江, 王彬, 等. 高效液相-串联质谱法测定猪、牛和羊尿液中 18 种同化激素的含量 [J]. 中国兽药杂志, 2022, 56(09): 38-46.
Hou X, Luo C J, Wang B, et al. Determination of 18 Anabolic Hormones in Animal Urine by HPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2022, 56(09): 38-46.