

超高效液相色谱-串联质谱法检测动物源性食品中的4种 β -受体激动剂

宋鑫¹, 王芹¹, 杭学宇¹, 王媛²

摘要: [目的] 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)定量测定肉类中的克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇及特布他林4种 β -受体激动剂的方法。[方法] 样品经 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶酶解, 再经SLW固相萃取柱净化后, 采用UPLC-MS/MS方法测定4种 β -受体激动剂。[结果] 4种 β -受体激动剂在0.1~20 $\mu\text{g/L}$ 测定的范围内线性关系良好($r>0.9996$), 方法的检出限为0.03~0.10 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N=3$)。在加标水平为2、5、10 $\mu\text{g/kg}$ 时, 空白样品的加标回收率为70.3%~97.1%, 相对标准偏差为0.25%~4.50%。[结论] 该方法分析时间短、选择性好、灵敏度高, 适用于肉类中的 β -受体激动剂的检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 固相萃取; 肉类; β -受体激动剂; 酶解

Determination of Four β -Agonists in Animal Derived Food by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry SONG Xin¹, WANG Qin¹, HANG Xue-yu¹, WANG Yuan² (1.Clinical Laboratory, Huai'an Center for Disease Control and Prevention, Huai'an, Jiangsu 223001, China; 2.Physical and Chemical Institute, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210001, China). Address correspondence to WANG Yuan, E-mail: 664686545@qq.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To establish a method for the determination of four β -agonists including clenbuterol, ractopamine, salbutamol, and terbutaline in meat products induced by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). [Methods] The test samples were enzymatically hydrolyzed with β -glucuronidase/arylsulfatase and purified by SLW solid phase extraction column. The residues were detected for four β -agonists by UPLC-MS/MS. [Results] The proposed method showed a good linearity over the range of 0.1-20 $\mu\text{g/L}$ for the four β -agonists with $r>0.9996$ and the limit of detection (LOD) of 0.03-0.10 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N=3$). The average recoveries were 70.3%-97.1% and the relative standard deviations were 0.25%-4.5% when the samples were spiked at levels of 2, 5, and 10 $\mu\text{g/kg}$. [Conclusion] This highly effective, selective, and sensitive method is suitable for detecting β -agonists in meat products.

Key Words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase extraction; meat; β -agonist; enzymatic hydrolyzation

β -受体激动剂又称瘦肉精, 是人工合成药物, 可提高畜禽类瘦肉率, 因此被广泛添加于饲料中。人体长期食入了含大量 β -受体激动剂的动物组织, 会直接危害人体健康^[1]。我国已明确禁止在饲料或动物饮用水中添加克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等 β -受体激动剂。为此我国也制定了多项国家标准进行相关监测, 如动物源性食品中多种 β -受体激动剂残留量的测定^[1]、饲料中16种 β -受体激动剂的测定液相色谱-

串联质谱法(LC-MS/MS)^[2]、猪肝和猪尿中 β -受体激动剂残留检测气相色谱-质谱法(GC/MS)^[3]等, 在实际工作中上述标准存在仪器设备昂贵、内标物难以购买等问题。因此, 建立和完善 β -受体激动剂的检测分析技术, 对于食品安全监测具有重要意义。

β -受体激动剂类药物常用的检测方法主要有GC/MS^[4]、高效液相色谱法(HPLC)^[5]、免疫亲和色谱法^[6]及LC-MS/MS^[7-11]等。GC/MS检测 β -受体激动剂时, 需要经过繁琐的衍生化过程; HPLC可以直接进行分析, 但其检测器灵敏度低、杂质干扰比较多, 不能同时进行多种 β -受体激动剂的准确定性和定量检测。而LC-MS/MS具有检出限低、准确度高、杂质干扰少等优点, 已被广泛用于农兽药残留的检测。本项目

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15333

[作者简介] 宋鑫(1984—), 男, 学士, 主管药师; 研究方向: 药学及理化检验; E-mail: 305211704@qq.com

[通信作者] 王媛, E-mail: 664686545@qq.com

[作者单位] 1.淮安市疾病预防控制中心临床实验室, 江苏 淮安 223001;

2.江苏省疾病预防控制中心理化实验室, 江苏 南京 210001

对实验前处理操作和质谱条件进行优化,建立了能够同时快速检测肉类中 β -受体激动剂类药物的超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS),为基层检测工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Agilent Technologies 1290 超高效液相色谱-API4000 串联四级杆质谱仪,配有电喷雾离子源(AB公司,美国);Waters Pro PS高纯水发生器(LABCONCO公司,美国);FSH-II型高速电动匀浆器(环宇仪器公司);TGL-16台式高速冷冻离心机(湖南湘仪);VORTEX-T涡旋振荡器(上海凌初公司);AR2130电子天平(感量0.0001g,奥豪斯公司,美国);Techne氮吹仪(TECHNE公司,美国);WSZ-20A震荡器(上海-恒科技有限公司);SLW固相萃取柱(体积6mL,填料500mg,杭州福裕科技公司);0.22 μ m滤膜(25mm,鲁尔公司,德国)。

1.2 主要试剂

甲醇、乙腈为色谱纯(默克公司,德国);乙酸乙酯、氨水、乙酸钠、乙酸、盐酸为分析纯。将乙酸钠经乙酸调制成pH 5.2的乙酸-乙酸钠缓冲液。甲酸为优级纯,与高纯水配成体积分数为0.1%甲酸水溶液。试验用水由高纯水发生器系统制得。 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶(Sigma公司,美国)。供试品克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇及特布他林(100 μ g/mL,1mL,含量均大于99%)均购自农业部环境保护科研监测所。

空白样品溶液制备:将不含 β -受体激动剂的样品经过提取和净化等操作后,甲醇复溶后过滤膜制得。

4种 β -受体激动剂混合标准溶液的配制:精确吸取0.1mL各 β -受体激动剂单标,用甲醇溶液定容至10mL容量瓶中,配成1.0mg/L混合标准使用液。精确吸取适量的混合标准使用液,用空白样品溶液稀释,配制含4种 β -受体激动剂的质量浓度分别为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μ g/L的系列标准工作液。

1.3 样品的提取与净化

1.3.1 试样制备 取取自江苏淮安地区的供试样品如猪肉、牛肉、猪肝等。取适量捣碎,充分混匀后放入高速电动匀浆器粉碎,制成试样。

1.3.2 提取^[12] 称取5g试样(精确至0.01g)于50mL离心管中,加入15mL乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 5.2),充分混匀后,加入 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶

50 μ L,涡旋混匀后,于37 $^{\circ}$ C水浴避光震荡酶解16h。酶解后放置至室温,涡旋混匀5min,高速离心10min(10000r/min,离心半径6cm),取上清液待净化。

1.3.3 净化 SLW固相萃取柱经5mL甲醇、5mL水、5mL盐酸(50mmol/L)活化,将上述上清液加到柱子上过柱,再用5mL水淋洗除杂,真空抽干。先用3mL甲醇洗脱,然后用10mL 5%氨化乙酸乙酯洗脱收集,洗脱液在50 $^{\circ}$ C氮气吹干。准确加入1mL 0.1%甲酸水-甲醇溶液(95:5,V/V),超声混匀,取上清液经0.22 μ m滤膜过滤后,供UPLC-MS/MS测定。

1.4 分析条件

1.4.1 色谱条件 Agilent Poroshell120ec-C18色谱柱(2.1mm $\times$ 75mm,2.7 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:1 μ L;流动相A为0.1%甲酸,流动相B为乙腈,梯度洗脱条件见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间(min)	配比(%)		流速(μ L/min)
	流动相A	流动相B	
0.00	95	5	200
1.00	95	5	200
5.00	5	95	200
5.01	5	95	200
8.00	95	5	200
10.0	95	5	200

1.4.2 质谱条件 正离子模式ESI(+);检测方式为多反应监测(MRM),利用保留时间和碎片信号比值定性。质谱条件具体如下:离子喷射电压(IS):5500V;离子源温度(TEM):550 $^{\circ}$ C;气帘气压力(CUR):25psi;碰撞气(CAD):6(孔径);雾化气压力(Gasl):40psi;辅助干燥气(Gas2):55psi;入口电压(EP)=10V;驻留时间(Dwell time):100ms;图1可见各 β -受体激动剂得到有效分离,出峰时间短,峰形良好。特征离子见表2。

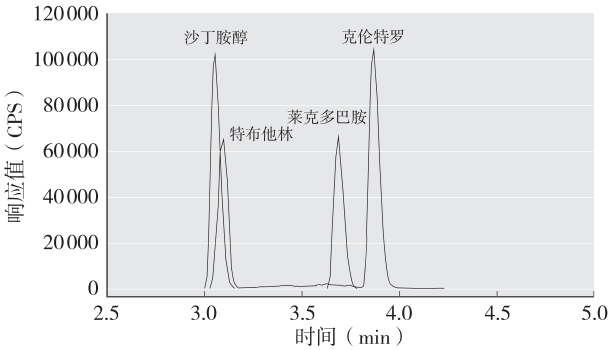


图1 4种 β -受体激动剂类药物(10 μ g/L)

表2 4种β-受体激动剂类药物的保留时间及特征离子

名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	定量离子/ 碰撞能(eV)	定性离子/ 碰撞能(eV)	去簇电压 (eV)
克伦特罗	3.87	277.1	203.0/22.2	259.1/14.3	47.1
莱克多巴胺	3.68	302.0	164.1/22.4	284.1/16.9	54.0
沙丁胺醇	3.05	240.0	148.0/25.3	221.6/14.7	46.5
特布他林	3.08	226.1	152.0/22.0	170.0/16.7	52.6

[注]定量离子-母离子/干扰小、特征性高的二级特征离子。

2 结果

2.1 定量测定

采用UPLC-MS/MS外标校准曲线法定量测定。用空白样品溶液配制的一系列基质标准工作溶液。图2中可见空白试样基线低，干扰少。各种β-受体激动剂的线性方程、线性范围、相关系数见表3。

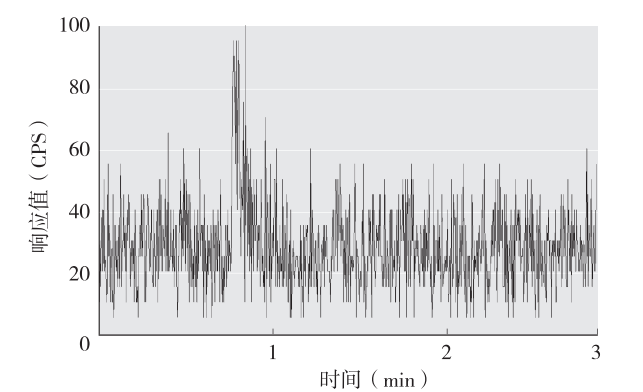


图2 空白试样图

表3 4种β-受体激动剂的线性方程、线性范围、相关系数

名称	线性方程	线性范围(μg/L)	r
克伦特罗	$\hat{y}=37\,214.5x-783.3$	0.1~20	0.9998
莱克多巴胺	$\hat{y}=23\,145.5x-585.5$	0.1~20	0.9997
沙丁胺醇	$\hat{y}=17\,900.6x-115.2$	0.1~20	0.9998
特布他林	$\hat{y}=11\,636.2x-156.7$	0.1~20	0.9996

2.2 方法的检出限和定量限

采用向空白组织中添加目标化合物的方法进行检测，以3倍信噪比(S/N)所对应的被测化合物的含量作为方法的检出限，以10倍信噪比所对应的被测化合物的含量作为方法的定量限。见表4。

表4 4种β-受体激动剂类药物的检出限和定量限(μg/kg)

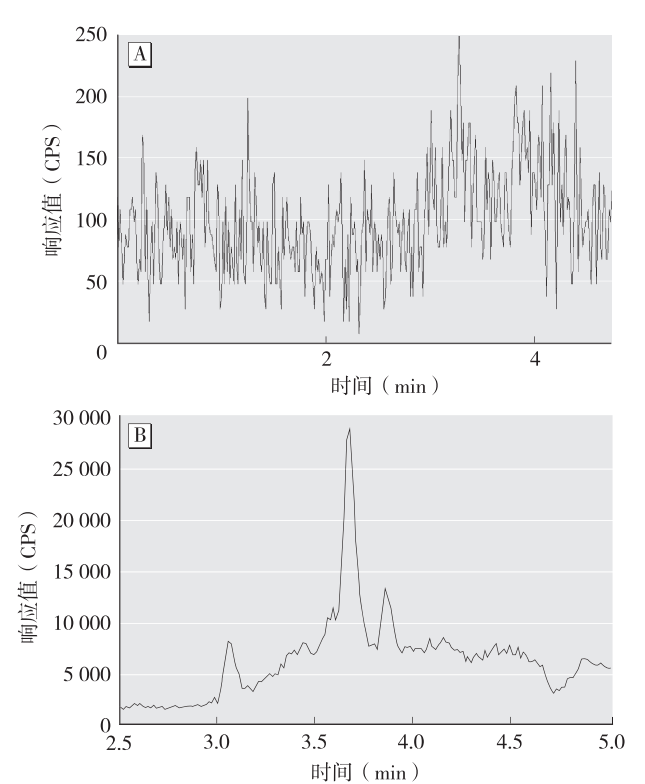
名称	检出限(LOD)	定量限(LOQ)
克伦特罗	0.09	0.30
莱克多巴胺	0.09	0.30
沙丁胺醇	0.03	0.10
特布他林	0.10	0.30

2.3 方法的回收率与精密度

取1份已测过不含有上述4种药物的空白猪肉样品，分别加入低、中、高3种不同浓度标准品充分混匀后按样品制备方法进行提取净化后，进行加标回收试验，重复检测6次，结果见表5。空白猪肉样品和加标后样品检测见图3，从中可以看出本方法对检测这4种β-受体激动剂有较高的灵敏度。

表5 方法的回收率与精密度(n=6)

名称	加标量为2.0μg/kg		加标量为5.0μg/kg		加标量为10.0μg/kg	
	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
克伦特罗	70.3	1.03	84.5	2.33	97.0	0.29
莱克多巴胺	73.0	2.34	82.2	3.50	93.5	2.10
沙丁胺醇	78.3	4.45	86.4	1.98	90.4	1.10
特布他林	80.2	3.43	88.9	2.41	95.3	1.31



[注]A: 空白猪肉样品；B: 加标猪肉样品。

图3 空白猪肉样品与加标量为2μg/L的猪肉样品离子图

2.4 样品检测结果

根据江苏省食品污染物及有害因素风险监测工作要求，应用本方法对26份不同采样点的肉类如猪肉、牛肉、猪肝等进行检测，结果均未检出文中所述的4种β-受体激动剂类药物。

3 讨论

本文提取样本采用β-葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯

酶进行酶解,提高了提取效率。 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶的存在能够破坏苯酚类、间苯二酚类 β -受体激动剂苯环上的羟基结合位点,能够迅速的使 β -受体激动剂由结合态转化为游离形态,因而在 β -受体激动剂的检测中,酶解方法已经成为 β -受体激动剂常用的提取方法。

为减少基质对定量测定的影响,本文用样品空白溶液来配制所使用的一系列基质标准工作溶液,用基质标准工作溶液分别进样来绘制标准曲线,并且保证所测样品中药物的响应值均在仪器的线性范围内。

本文采用了SLW固相萃取柱,该柱是C18和SLS(磺酸型聚苯乙烯阳离子交换树脂)的复合柱,即具有高保留特性,又有高吸附性和强交换性。有利于目标化合物的净化分离。使用的薄壳型填料Poroshell120ec,使得检测中具有更快的分析速度和更高的分离度,在超高效液相色谱系统上获得极佳的性能。

本文中所建立的同时测定动物源性食品中4种 β -受体激动剂的UPLC-MS/MS方法,重现性好,灵敏度高,选择性和特异性好。本方法应用于实际样品测定,可为监管部门制定和执行动物源性食品相关安全法规和动物源性食品中有毒有害残留物质的监控检测提供依据,也为基层检测工作提供筛查依据。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部. 猪肝和猪尿中 β -受体激动剂残留检测 气相色谱-质谱法: 农业部1031号公告-3-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 动物源性食品中多种 β -受体激动剂残留量的测定 液相色谱串联质谱法: GB/T 22286—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [3] 中华人民共和国农业部. 饲料中16种 β -受体激动剂的测定 液相色谱-串联质谱法: 农业部1029号公告-1-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [4] 彭涛, 赖卫华, 张富生, 等. 20种 β 2-受体激动剂的性质及检测方法研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 254-260.
- [5] 刘敬先, 杨希国, 刘凯. GC/MS分析牛尿中瘦肉精残留[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(2): 285-288.
- [6] 董璐, 王全凯, 刘林娜, 等. 盐酸多巴胺、硫酸沙丁胺醇、盐酸莱克多巴胺、盐酸克伦特罗残留量的HPLC检测[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 54(5): 79-81.
- [7] 李靖靖, 郭林. 免疫法检测瘦肉精的现状及其发展[J]. 食品与机械, 2012, 27(3): 266-269.
- [8] 黄艳梅, 黄卓焕, 冯荣华, 等. 液相色谱串联质谱法测定猪尿中9种 β -受体激动剂残留[J]. 食品与机械, 2013, 28(1): 72-75, 139.
- [9] 潘煜辰, 周瑶, 伊雄海, 等. 亚临界水萃取及液相色谱-串联质谱法检测猪肉中 β -受体激动剂与氯霉素残留[J]. 分析测试学报, 2013, 32(7): 789-795.
- [10] 蔡英华, 薛毅, 张玥, 等. UPLC-MS/MS法测定动物源性食品中4个四环素类药物和10个 β -受体激动剂类药物残留[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(7): 1223-1230.
- [11] 刘敬先, 苗翠, 刘笑, 等. 超高效液相串联质谱法分析牛肉中残留的 β -受体激动剂[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10): 1836-1841.
- [12] 李阳, 苏晓鸥, 张维, 等. 酶解及有机溶剂提取对绵羊血浆和尿样中两种 β 2-受体激动剂含量测定的影响[J]. 分析化学, 2014, 42(5): 717-722.

(收稿日期: 2015-05-14)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 郑轻舟)