

超高压液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法 测定猪肉食品中8种 β -受体激动剂

孟娟, 石莹, 张晶, 邵兵*

(北京疾病预防控制中心, 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013)

摘要: **目的** 采用超高压液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱同时测定猪肉食品中8种 β -受体激动剂残留。**方法** 试样中 β -受体激动剂残留经酶解后超声提取, 低温离心后, 上清液用MCX固相萃取柱净化, Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈色谱柱分离, 以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱, 最后用液相色谱-质谱/质谱进行测定。**结果** 该方法的平均回收率为75.6%~118.7%, 相对标准偏差小于25.0%, 方法的定量限为0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 该方法操作简单, 灵敏度高, 重现性良好, 适用于猪肉食品中 β -受体激动剂残留的定性与定量检测。**关键词:** 超高压液相色谱-串联质谱法; 固相萃取; β -受体激动剂; 食品安全; 兽药残留

Simultaneous determination of eight β -agonists residues in animal food by ultra pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry

MENG Juan, SHI Ying, ZHANG Jing, SHAO Bing*

(Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

ABSTRACT: Objective To develop an analytical method for the determination of eight kinds of β -agonists in animal producing food based on ultra pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Samples were enzymatic hydrolysed and extracted by acetic acid buffer (pH 5.2) and then purified and enriched by Oasis MCX solid phase extraction cartridges. The separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ column (100 mm \times 2.1 mm i.d., 1.7 μm) with gradient elution using methanol and water containing 0.1% formic acid at a flow rate of 0.3 mL/min. **Results** Average recoveries of this method for fortified samples ranged from 75.6% to 118.7% with relative standard deviation less than 25.0%. The limits of quantitation (LOQ) for the whole method ranged from 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** Due to its high sensitivity and reproducibility, the method is suitable for the determination of β -agonists in animal producing samples.

KEY WORDS: ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); solid-phase extraction; β -agonists; food safety; veterinary drugs residue

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2010AA023001)、北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目

Fund: Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2010AA023001) and Beijing Municipal Senior Technical Training Plan in Health System

*通讯作者: 邵兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全保障技术。E-mail: shaobingch@sina.com

*Corresponding author: SHAO Bing, Professor, Beijing Center for Disease Control and Prevention, No. 16, Hepingli Middle Street, Dongcheng District, Beijing 100013, China. E-mail: shaobingch@sina.com

兽药残留问题是影响动物性食品安全的主要因素^[1]。在诸多兽药中, β -受体激动剂因较强的毒性及易被滥用等特点一直受到广泛关注。这类药物作用效应较强, 在动物体内残留时间较长, 短期内产生残留量较大, 可通过食物链进入人体, 使一些易感人群产生较明显的中毒症状甚至死亡, 严重危害人类健康。我国政府早在十余年前就将 β -受体激动剂列入“食用动物禁用兽药清单”^[2,3], 但是在利益驱使下, β -受体激动剂的滥用问题依然严重, 其中影响最大的是2011年的双汇瘦肉精事件。

现阶段, 动物性食品中 β -受体激动剂一直是我国兽药残留监测工作的重点。目前的分析方法包括免疫测定法、气相色谱-质谱法、高压液相色谱法和液质联用分析法等^[4-8]。其中液相色谱-质谱法特异性强、灵敏度高, 是 β -受体激动剂残留检测的最主要的技术手段^[9-11], 但样品处理程序较为复杂, 费时费力。本研究在已有方法的基础上, 简化了样品前处理步骤, 采用 MCX 柱固相萃取和超高压液相色谱-串联四级杆质谱技术建立了猪肉、猪肝和猪肾中 8 种 β -受体激动剂同时检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ACQUITYTM 超高压液相色谱仪、Micromass[®]-Quattro Premier XE 质谱仪(美国 Waters 公司); X-22R 型冷冻离心机(德国 Beckman 公司); 漩涡混合器; NVEP-116 型氮吹仪。

Oasis MCX 固相萃取(SPE)小柱(6 mL, 150 mg, 美国 Waters 公司)。

氨水、乙酸、乙酸钠均为分析纯(国药集团北京化学试剂公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸(纯度为 99%, Ameisensaure); β -葡糖醛酸苷肽酶/芳基磺酸酯酶(德国罗氏公司); 实验用水均为超纯水。

8 种 β -受体激动剂: 妥布特罗(tulobuterol, CAS: 41570-61-0)、特布它林(terbutaline, CAS: 23031-25-6)、沙丁胺醇(salbutamol, CAS: 51022-70-9)、非诺特罗(fenoterol, CAS: 1944-12-3)、福莫特罗(formoterol, CAS: 73573-87-2)、克伦特罗(clenbuterol, CAS: 37148-27-9)、莱克多巴胺(ractopamine, CAS: 97825-25-7)、异丙喘宁(metaproterenol, CAS: 586-06-1)购自美国 Sigma 或德国 Dr.E 公司, 纯度均大于等于 99%。

标准储备溶液的配制: 准确称取克伦特罗、沙丁胺醇、妥布特罗、特布它林、非诺特罗、福莫特罗、莱克多巴胺、异丙喘宁各 10 mg (精确至 0.1 mg), 分别用甲醇溶解并定容至 10 mL, 浓度为 1000 mg/L, -18 °C 冰箱中保存, 有效期 12 个月。临用前用 10% 甲醇水溶液将标准储备溶液配制为 0.5~100.0 μ g/L 的标准工作液。

1.2 检测条件

色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 柱温: 40 °C; 进样体积: 10 μ L; 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为甲醇; 流速为 0.3 mL/min; 流动相线性梯度洗脱: 0~3 min, 95%~80%A; 3~10 min, 80%A~50%A; 10~10.1 min, 50%A~1%A; 10.1~12 min, 1%A~1%A; 12~12.1 min, 1%A~95%A。

质谱条件 电喷雾电离正离子模式(ESI⁺); 质谱扫描方式: 多反应监测(MRM); 毛细管电压: 3.3 kV; 源温度: 100 °C; 脱溶剂气温度: 350 °C; 脱溶剂气流量: 600 L/h 电子倍增电压: 650 V; 碰撞室压力: 3.1×10^{-3} mbar。8 种 β -受体激动剂的质谱采集参数见表 1。

1.3 样品前处理

加标用空白猪肉、猪肝和猪肾样品获赠于中国农业大学动物医学院。准确称取 5.0 g (精确到 0.01 g) 匀浆样品, 加入 10 mL pH5.2 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液中, 10000 r/min 匀浆 1 min, 再加入 β -葡糖醛酸苷肽酶/芳基磺酸酯酶溶液 100 μ L, 于 37 °C \pm 1 °C 振荡酶解过夜。取出后超声振荡 15 min。放入冷冻离心机中, 4 °C 10000 r/min 离心 10 min。倾出上清液, 残渣再用 10 mL pH5.2 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液提取一次, 10000 r/min 离心 10 min, 合并上清液。MCX 柱用 6 mL 甲醇、6 mL 水活化, 将上清液过柱, 弃去滤液, 依次用 6 mL 水、6 mL 甲醇、3 mL 0.1% 甲醇氨溶液淋洗, 最后用 6 mL 2% 甲醇氨洗脱, 洗脱液用氮气流吹干后, 用 10% 甲醇水溶液定容至 1.0 mL, 漩涡混合 1 min, 用于 UPLC-MS/MS 测定。

称取与试样基质相匹配的阴性样品 5.0 g, 加入标准系列溶液 1.0 mL, 与试样同时进行提取和净化。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

由于部分目标药物在动物组织中以葡糖醛酸苷结合态存在, 如莱克多巴胺^[12,13], 因此, 我们将试样

置于乙酸-乙酸钠缓冲液中加入 β -葡糖醛酸苷肽酶/芳基磺酸酯酶酶解过夜。 β -受体激动剂呈弱碱性, 文献报道强酸性蛋白沉淀剂如高氯酸等对其提取效果较好, 另一方面, 乙酸-乙酸钠缓冲液为弱酸性, 对目标化合物也有一定的提取作用, 此外, 加入适量的

表 1 β -受体激动剂的质谱采集参数
Table 1 Mass parameters for β -agonists analysis

化合物	保留时间(min)	母离子	锥孔电压(V)	子离子	碰撞能量(eV)
异丙喘宁	1.62	212.0	30	193.9*	12
				151.9	16
特布它林	2.46	226.0	35	151.9*	16
				169.9	12
沙丁胺醇	2.62	240.1	35	147.9*	18
				221.9	12
非诺特罗	3.36	304.1	35	134.9*	18
				107.0	18
莱克多巴胺	4.95	302.1	35	164.0*	16
				107.0	18
克伦特罗	5.39	277.1	35	202.9*	16
				259.0	10
福莫特罗	5.64	345.1	35	149.0*	14
				327.1	18
妥布特罗	6.09	227.9	45	153.8*	16
				171.8	12

注: *标记的离子用作定量分析

有机溶剂可能会改善提取效率。基于以上考虑, 我们比较了三种提取液: 乙酸-乙酸钠缓冲液酶解后直接超声提取、酶解后加入 50% 甲醇超声提取以及酶解后加入高氯酸(pH1.0)超声提取。三种处理条件进行比较, 结果表明高氯酸提取时的回收率为 48%~102%, 其中异丙喘宁和非诺特罗均低于 55%。样品经酶解超声后直接过柱测定, 样品的回收率则为 59%~105%, 异丙喘宁和非诺特罗的提取效率与前者相比有明显改善; 酶解后加入 50% 甲醇提取的效果与直接提取相似。所以, 本实验采用酶解后直接超声提取的方法, 简化了操作步骤, 节省了实验时间。

2.2 富集净化条件的优化

根据 β -受体激动剂的结构特点, 本实验采用混合型强阳离子交换小柱对提取液中的目标化合物进行富集净化。采用标准加入法考察了洗脱液中氨水的浓度: 分别配制不同浓度的甲醇氨水溶液(0.02%、0.05%、0.10%、0.20%、0.5%、1.0%、2.0%和 5.0%), 依次取 6 mL 洗脱已上样的 MCX 柱, 结果表明甲醇氨中氨水的浓度为 0.10% 时, 没有目标化合物流出, 浓度为 2.0% 时所有待测物均被洗脱下来, 因此将前

者确定为林洗液, 后者为洗脱液。

此外, 我们比较了两种不同型号的强阳离子交换小柱 MCX 柱和 PCX 柱的富集净化效果。样品经酶解后, 冷冻离心合并上清液分别过 MCX(6cc, 150 mg)和 PCX(6cc, 200 mg)小柱, 淋洗后用 6 mL 2% 甲醇氨洗脱, 氮气吹干, 定容上机分析, 其结果表明两柱效果相当。本文选取了 MCX 固相萃取柱。

2.3 定容试剂的选择

样品测定时, 定容液中甲醇的比例会直接影响到目标化合物的色谱峰形及灵敏度, 本实验分别用 0%、10%、20%、30%、40%和 50% 的甲醇水配制 10 μ g/L 的标准溶液进行分析, 其谱图结果显示定容液为 10% 甲醇水时峰形及响应值最好, 超过 10% 时异丙喘宁、沙丁胺醇和特布他林的峰明显的前伸和展宽, 且出现了与溶剂共流出现象。所以样品定容液中甲醇的比例不能高于 10%, 否则会造成待测组分的色谱峰展宽, 降低灵敏度。

2.4 线性范围、回收率、精密度及检出限

配制待测物浓度为 0.5、1、2.5、5、10、25、100 μ g/L 的混合标准系列, 称取 5.00 g 试样, 并加入上述

溶液,按 1.3 节进行前处理后上机分析。以目标组分的峰面积 Y 对相应的质量浓度 X ($\mu\text{g/L}$) 绘制标准曲线,

回归分析其相关系数均大于 0.99,表明 8 种目标化合物在上述质量浓度范围内时具有较好的线性关系。各

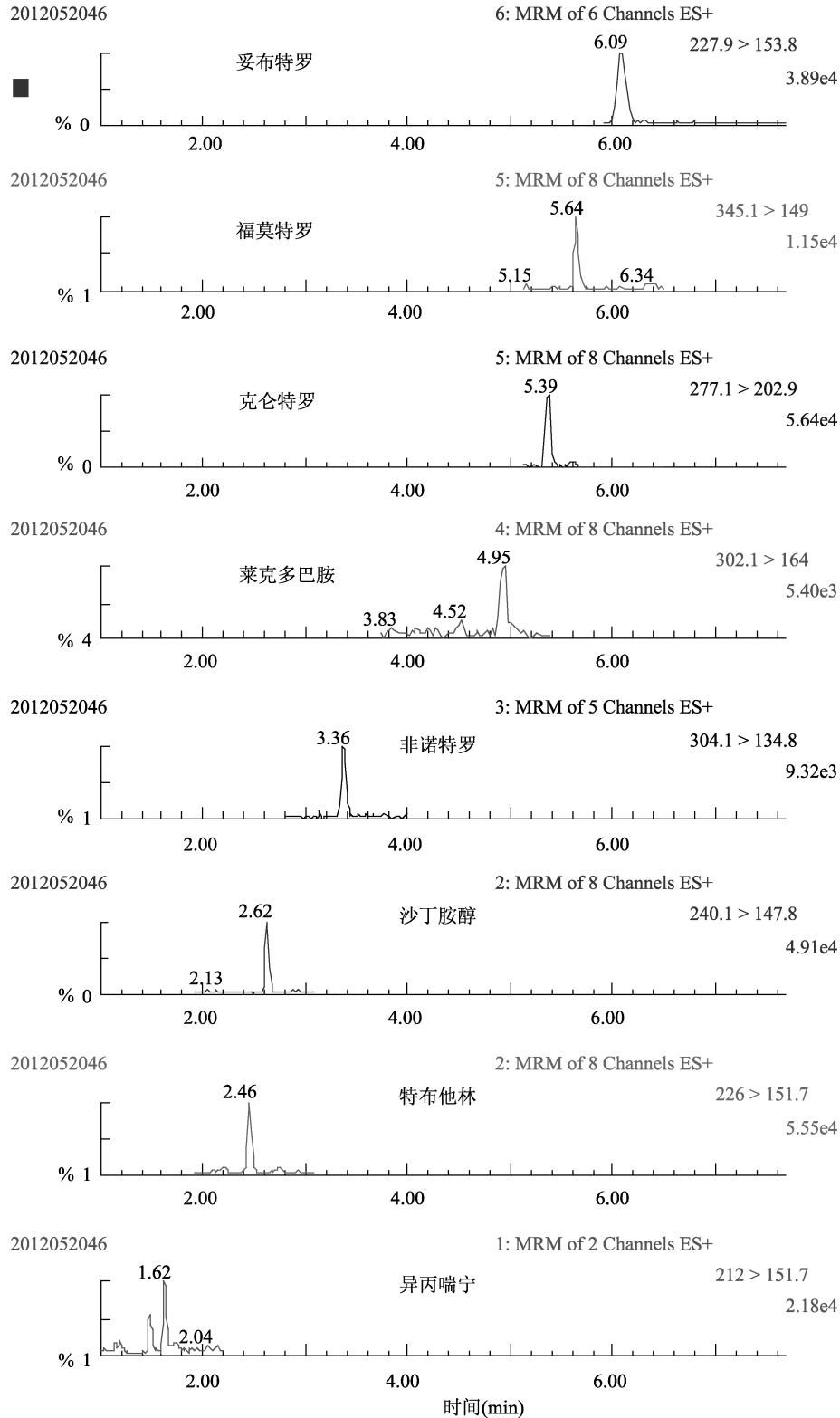


图 1 加标猪肝样品色谱图

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of a spiked liver sample

药物的方法检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别以最低加标浓度试样中被分析物质的定性离子信噪比为 3 和 10 时计算所得。当取样量为 5 g 时, 克伦特罗、沙丁胺醇、妥布特罗、特布它林、莱克多巴胺在动物组织中的定量限为 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 非诺特罗、福莫特罗、异丙喘宁的定量限为 0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。图 1 给出了加标浓

度为 0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时猪肝样品的 LC-MS/MS 谱图。8 种目标药物的回收率和相对标准偏差(RSD)见表 2。三个加标水平下, 猪肉、猪肝和猪肾中 8 种 β -受体激动剂类药物的平均回收率为 75.6%~118.7%, 相对标准偏差为 4.7%~22.5%, 满足国际上动物性食品中兽药残留检测的要求。

表 2 猪肉、猪肝和猪肾中 8 种目标化合物的加标回收率和相对标准偏差

Table 2 The mean recoveries and the relative standard deviation of 8 target drugs in pork, liver and kidney samples

化合物	加标浓度 / $\mu\text{g}/\text{kg}$	猪肝		猪肾		猪肉	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
异丙喘宁	0.2	90.0	21.7	103.2	9.7	95.3	19.0
	0.5	103.5	10.5	109.1	5.8	95.6	15.9
	2.0	94.6	11.7	107.6	13.1	92.2	17.9
特布它林	0.2	78.7	10.4	75.6	14.2	90.5	18.6
	0.5	103.1	18.5	87.5	16.7	93.3	11.0
	2.0	89.0	15.1	90.2	17.5	85.7	15.7
沙丁胺醇	0.2	99.8	20.1	108.7	12.7	91.5	21.0
	0.5	103.4	17.6	108.8	11.4	106.2	12.6
	2.0	105.3	15.0	94.3	18.7	101.0	10.3
非诺特罗	0.2	100.7	16.2	106.5	15.7	107.4	10.1
	0.5	83.6	13.6	78.5	6.9	88.5	10.5
	2.0	89.0	12.2	83.6	16.2	90.3	14.6
莱克多巴胺	0.2	76.8	8.6	85.4	15.1	96.5	12.1
	0.5	105.4	14.5	118.7	14.7	108.2	10.0
	2.0	96.4	18.3	89.3	10.3	92.3	13.5
克伦特罗	0.2	105.4	22.5	91.7	19.5	96.0	16.4
	0.5	99.7	10.0	87.2	17.2	93.4	19.7
	2.0	103.6	4.7	88.2	7.9	90.9	7.6
福莫特罗	0.2	102.4	20.0	93.1	19.4	89.5	13.7
	0.5	98.1	10.3	102.9	12.0	85.0	13.8
	2.0	91.2	12.6	83.3	11.8	106.8	10.6
妥布特罗	0.2	92.7	18.0	93.7	15.9	105.7	17.9
	0.5	78.0	12.1	82.5	10.1	84.0	17.1
	2.0	82.9	15.1	93.7	21.9	100.8	13.0

3 结 论

本研究采用 MCX 固相萃取柱浓缩净化, 超高压液相色谱-质谱/质谱(UPLC-MS/MS)法同时检测猪肉食品中 8 种 β -受体激动剂, 方法回收率和精密度符合残留检测要求。该方法简便快速、灵敏度高、重现性好, 对猪肉制品的监管和保障食品安全具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘德炎. 我国动物性食品中兽药残留的现状、问题及对策[J]. 养殖与饲料, 2009, (1): 78-82.
- [2] 岳振峰, 周乃元, 叶卫翔. 国内外食品安全限量标准实用手册[M]. 北京: 中国劳动保障社会出版社, 2011.
- [3] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 第 193 号 食品动物禁用
- Liu DY. The current situation, problems and countermeasures on the issue of veterinary drugs residues in animal producing food in China [J]. Anim Breed Feed, 2009, (1): 78-82.
- Yue ZF, Zhou NY, Ye ZX. Practical handbook of domestic and foreign food safety evaluation standard [M]. Beijing: China Labor Safeguard Social Press, 2011.

- 的兽药及其它化合物清单[S]. 2002.
The Ministry of Agriculture, PR China, regulation No. 193, List of veterinary drugs and their compounds banned for use for food animals [S]. 2002.
- [4] Van Hoof N, Courtheyn D, Antignac JP, *et al.* Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecular imprinted polymers [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 2801–2808.
- [5] Haasnoot W, Streppel L, Cazemier G, *et al.* Development of a tube enzyme immunoassay for "on-site" screening of urine samples in the presence of beta-agonists [J]. *Analyst*, 1996, 121: 1111–1114.
- [6] Hernandez-Carrasquilla M. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of β_2 -agonists in bovine retina [J]. *Anal Chim Acta*, 2000, 408: 285–290.
- [7] Juan C, Igualada C, Moragues F, *et al.* Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of beta-agonists in animal feed and drinking water [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217 (39): 6061–6068.
- [8] Lee HB., Sarafin K., Peart TE. Determination of β -blockers and β -agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1148 (2): 158–167.
- [9] 王凤美, 张鸿伟, 庞士平, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品和尿液中 4 种 β -受体激动剂残留[J]. *分析化学*, 2008, 36 (12): 1629–1635.
Wang FM, Zhang HW, Pang SP, *et al.* Determination of four beta-agonists residues in products of animal origin and urine by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2008, 36 (12): 1629–1635.
- [10] Shao B, Jia X, Zhang J, *et al.* Multi-residual analysis of 16 β -agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Food Chem*, 2009, 114: 1115–1121.
- [11] 苗虹, 邹建宏, 范赛, 等. 高效液相色谱-离子阱质谱法测定尿液中 β -受体激动剂和 β -受体阻断剂[J]. *色谱*, 2010, 28 (6): 572–578.
Miao H, Zou JH, Fan S, *et al.* Determination of β_2 -agonists and β -blockers in urine using high performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2010, 28 (6): 572–578.
- [12] Smith DJ. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76: 173–194.
- [13] Smith DJ, Shelver WL. Tissue residues of ractopamine and urinary excretion of ractopamine and metabolites in animals treated for 7 days with dietary ractopamine [J]. *J Anim Sci*, 2002, 80: 1240–1249.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



孟娟, 主管技师, 主要研究方向为食品检验。

E-mail: mengj777@sina.com



邵兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全保障技术。

E-mail: shaobingch@sina.com