

超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱高分辨率质谱法快速筛查和确证动物源性食品中9种 β -受体激动剂残留量

夏宝林^{1*}, 严秋飠¹, 杨娜¹, 杨佳²

(1. 江阴市食品安全检测中心, 江阴 214400; 2. 无锡微色谱生物科技有限公司, 江阴 214400)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap)筛查和确证动物源性食品中9种 β -受体激动剂残留量的分析方法。**方法** 样品经乙腈提取, 150 mg PSA(乙二胺-N-丙基填料)粉末、50 mg C₁₈粉末和500 mg 无水硫酸镁进行净化, 正己烷去脂, 用 Waters Acquity BEH C₁₈柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μ m)分离, 以0.1%甲酸-乙腈(V/V)和0.1%甲酸-水(V/V)进行梯度洗脱, 在全扫描(Full MS)-数据依赖扫描(data dependent MS²)模式下进行检测。**结果** 9种 β -受体激动剂残留量的精确质量相对偏差小于 1.0×10^{-6} , 在0.5~10 ng/mL范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.997; 检出限范围为0.2~0.5 μ g/kg; 加标水平为0.5~5 μ g/kg时, 方法回收率在74.3%~110.8%范围内, 相对标准偏差低于12%。**结论** 该方法简便、快速、准确, 适用于动物源性食品中9种 β -受体激动剂类药物的快速筛查和定量分析。

关键词: 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱高分辨质谱法; 动物源性食品; β -受体激动剂类药物; 残留量

Rapid screening and confirming of 9 kinds of β -agonists in animal-derived food by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry

XIA Bao-Lin^{1*}, YAN Qiu-Fang¹, YANG Na¹, YANG Jia²

(1. Testing Center of Jiangyin Food Safety, Jiangyin 214400, China;

2. Wuxi Micro Sep Biotechnology Co., Ltd., Jiangyin 214400, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for screening and validation of 9 kinds of β -agonists residues in animal-derived food by ultraperformance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry(UPLC-Q-Orbitrap). **Methods** The sample was extracted by acetonitrile, purified by 150 mg PSA, 50 mg C₁₈, 500 mg MgSO₄ and the fat in the sample was degreased with *N*-hexane. The extract was separated by Waters Acquity BEH C₁₈ column(2.1 mm×50 mm, 1.7 μ m) using a gradient elution program of 0.1% formic acid-acetonitrile(V/V) and 0.1% formic acid-water(V/V) as mobile phases, and detected in full scan-data dependent scan

基金项目: 江阴市社会发展科技示范项目(JY0603A020201180013PB)

Fund: Supported by Jiangyin Social Development Science and Technology Demonstration Project(JY0603A020201180013PB)

***通讯作者:** 夏宝林, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。E-mail: 18068362265@163.com

***Corresponding author:** XIA Bao-Lin, Master, Engineer, Testing Center of Jiangyin Food Safety, No.188, Dongwaihuan Road, Wuxi 214400, China. E-mail: 18068362265@163.com

mode. **Results** The results showed that 9 kinds of β -agonists residues had good linear relationships in the range of 0.5–10 ng/mL with correlation coefficients better than 0.997. The accurate mass relative deviation was less than 1.0×10^{-6} , and the limit of determination (LOD) were 0.2–0.5 $\mu\text{g/kg}$. The recovery of the method ranged from 74.3% to 110.8% at spiked levels of 0.5–5 $\mu\text{g/kg}$, with the relative standard deviations were less than 12%. **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate, which is suitable for the rapid screening and quantitative analysis of 9 kinds of β -agonist drugs in animal-derived food.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry; animal-derived food; β -agonists; residues

1 引言

β -受体激动剂是指含氮激素中苯乙胺类药物,具有苯乙醇胺结构母核。在临床上主要用于扩张支气管和增加肺通气量,用于治疗人和动物的支气管哮喘、阻塞性肺炎、平滑肌痉挛等症以及用于松弛牛子宫和延缓其发育^[1]。在畜牧业上, β -受体激动剂则被用作一种瘦肉增长剂,被大量非法地添加于动物饲料中,以促进家禽生长和提高瘦肉率^[2]。当人体累计摄入量超过一定值或食入高残留(大于 100 ng/g)的内脏组织时,就会出现中毒症状,主要表现为肌肉震颤、心动过速、心律失常、腹痛、肌肉疼痛、恶心和眩晕等^[3]。由于其严重的危害性,在中国和许多其他国家已禁止在饲料中添加这类化合物^[4]。

目前, β -受体激动剂的测定方法主要有:高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[5]、气相色谱串联质谱法(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)^[6,7]、液相色谱串联质谱法(liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)^[8–10]以及薄层色谱法^[11]等。本研究主要采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap)对目标物进行快速准确定性、定量分析。UPLC-Q-Orbitrap 将具有高选择性的四极杆与高分辨率、高灵敏度的轨道阱有机结合,能进行目标物与非目标物的快速筛查与结果确证,不同于三重四极杆低分辨质谱使用多反应监测模式进行定量分析,无需对目标物逐个优化离子及相关参数,弥补传统三重四极杆质谱检测化合物数量有限、假阳性误判的不足,在食品检测行业中已得到广泛应用。已有研究报道了 UPLC-Q-Orbitrap 应用于动物源性食品中食品添加剂^[12]、污染物^[13]、多农药残留^[14]、多兽药残留^[15]的测定。

本研究将该技术用于动物源性食品中 9 种 β -受体激动剂的筛查、鉴定与定量研究。通过一级全扫描模式获得目标化合物的精确质量数,进行定性定量,通过二级全扫描模式获得目标化合物的二级特征图谱,进一步提高定性的准确性,能够准确、高效、快速、高通量的检测多种 β -受体激动剂物质,

对保障我国食品安全和提高行业检测水平具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

猪肉、羊肉、猪肝(江阴市云亭吉麦隆百货超市)。

甲酸、乙酸铵(色谱纯,德国 CNW 公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司); C_{18} 、PSA(乙二胺-*N*-丙基填料)、硫酸镁(MgSO_4)、氯化钠(NaCl)(分析纯,上海安谱公司);9 种 β -受体激动剂标准品:西马特罗、特布他林、沙丁胺醇、班布特罗、莱克多巴胺、克伦特罗、溴布特罗、马布特罗、溴代克伦特罗(纯度 $\geq 99\%$,德国 Witega 公司)。

2.2 仪器与设备

UltiMate 3000/Q Exactive Focus 高分辨液质联用仪(美国赛默飞世尔科技公司);GD-16 高速研磨仪(中国深圳市新锐科技发展有限公司);MV5 浓缩仪(美国莱伯泰科有限公司);2-16K 通用高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);CP512 电子天平[中国奥豪斯仪器(常州)公司];XS205DU 电子天平(美国 Mettler Toledo 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 提取方法

将样品充分绞碎混匀后,装入洁净的容器内,作为试样。准确称取试样 2.00 g,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 5 颗钢珠,加入乙腈 10 mL,研磨仪中快速研磨提取 15 min,9000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至另一离心管中,向残渣中加入 10 mL 乙腈重复提取 1 次,合并上清液,乙腈定容至 50 mL,待净化。

2.3.2 净化方法

正己烷液液萃取:浓缩仪将合并后的上清液进行浓缩至干,加入 1 mL 10% 甲醇-水(*V/V*,含 0.1% 甲酸)和 2 mL 正己烷,涡旋 2 min,以 9000 r/min 离心 5 min,滴管吸除上层正己烷层,下层液过 0.22 μm 滤膜,上机测定。

吸附剂净化:上清液中加入 150 mg 乙二胺-*N*-丙基填料(PSA)粉末、50 mg C_{18} 粉末和 500 mg 无水硫酸镁,涡旋混合 30 s,静置 10 min 后,以 5000 r/min 离心 5 min,重复洗涤 2 次,上清液进行浓缩至干,加入 1 mL 10% 甲醇-水(*V/V*,含 0.1% 甲

酸)涡旋 2 min, 正己烷除脂, 过 0.22 μm 滤膜, 上机测定。

盐析净化: 上清液中加入柠檬酸钠 1.0 g, 氯化钠 0.5 g, 硫酸镁 2.0 g, 涡旋混匀 2 min, 静置 10 min 后, 5000 r/min 离心 5 min, 重复洗涤 2 次, 上清液进行浓缩至干, 加入 1 mL 10%甲醇-水(V/V, 含 0.1%甲酸)涡旋 2 min, 正己烷除脂, 过 0.22 μm 滤膜, 上机测定。

2.3.3 标准曲线的绘制

准确称取上述 9 种 β-受体激动剂对照品 10 mg, 用甲醇配制成 1 mg/mL 的标准储备液。准确称取阴性试样 2.00 g, 按上述提取方法进行提取, 正己烷液液萃取, 氮吹至干。加入一定量的标准溶液, 10%甲醇-水(V/V, 含 0.1%甲酸)定容至 1 mL, 再加入 2 mL 正己烷, 涡旋 2 min, 以 9000 r/min 离心 5 min, 滴管吸除上层正己烷层, 下层液过 0.22 μm 滤膜, 得 0.5、1、2、5、8、10 ng/mL 的标准工作液。

2.3.4 实验条件

1) 液相色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为 0.1%甲酸-水溶液(V/V), B 为 0.1%甲酸-乙腈(V/V); 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 40 °C; 样品室温度: 10 °C; 进样体积: 5 μL; 分析时间: 5 min。

2) 质谱条件

质谱条件: 离子源温度: 350 °C; 传输金属毛细管温度: 350 °C; 喷雾电压: 3.2 kV(正离子模式); 扫描范围: m/z 150~400 Da; 化合物提取精确质量数见表 1; 一级质谱全扫描分辨率: R=70000; C-trap 最大容量(AGC target): 5×10⁵; C-trap 最大注入时间: auto; 数据依赖二级子离子全扫(data dependent MS²)分辨率: R=17500; 归一化碰撞能量: 35%±50%; C-trap 最大容量(AGCtarget): 5×10⁴; C-trap 最大注入时间: auto; 动态排除: 10 s。

表 1 超高效液相色谱梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of ultra performance liquid chromatography

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	95	5
0.2	95	5
2	60	40
2.1	5	95
3.00	5	95
3.10	95	5
5.00	95	5

3 结果与分析

3.1 仪器条件的优化

3.1.1 色谱柱的选择

为了得到较好的峰型和分离效果, 本实验选择浓度为

10 ng/mL 的 9 种 β-受体激动剂标准品溶液, 在相同的流动相和洗脱程序下, 分别采用 Waters Acquity-BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)、ThermoAccucore RP-MS C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)、Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)进行分离实验。β-受体激动剂为碱性化合物, Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱采用亚乙基桥杂化颗粒、三键键合和端基封尾技术, 保证了碱性化合物的峰型。相较于其他色谱柱, 采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱可有效分离 9 种 β-受体激动剂, 且峰型较好。故本实验选择 Waters Acquity BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 粒径 1.7 μm)作为色谱柱。

3.1.2 流动相的选择

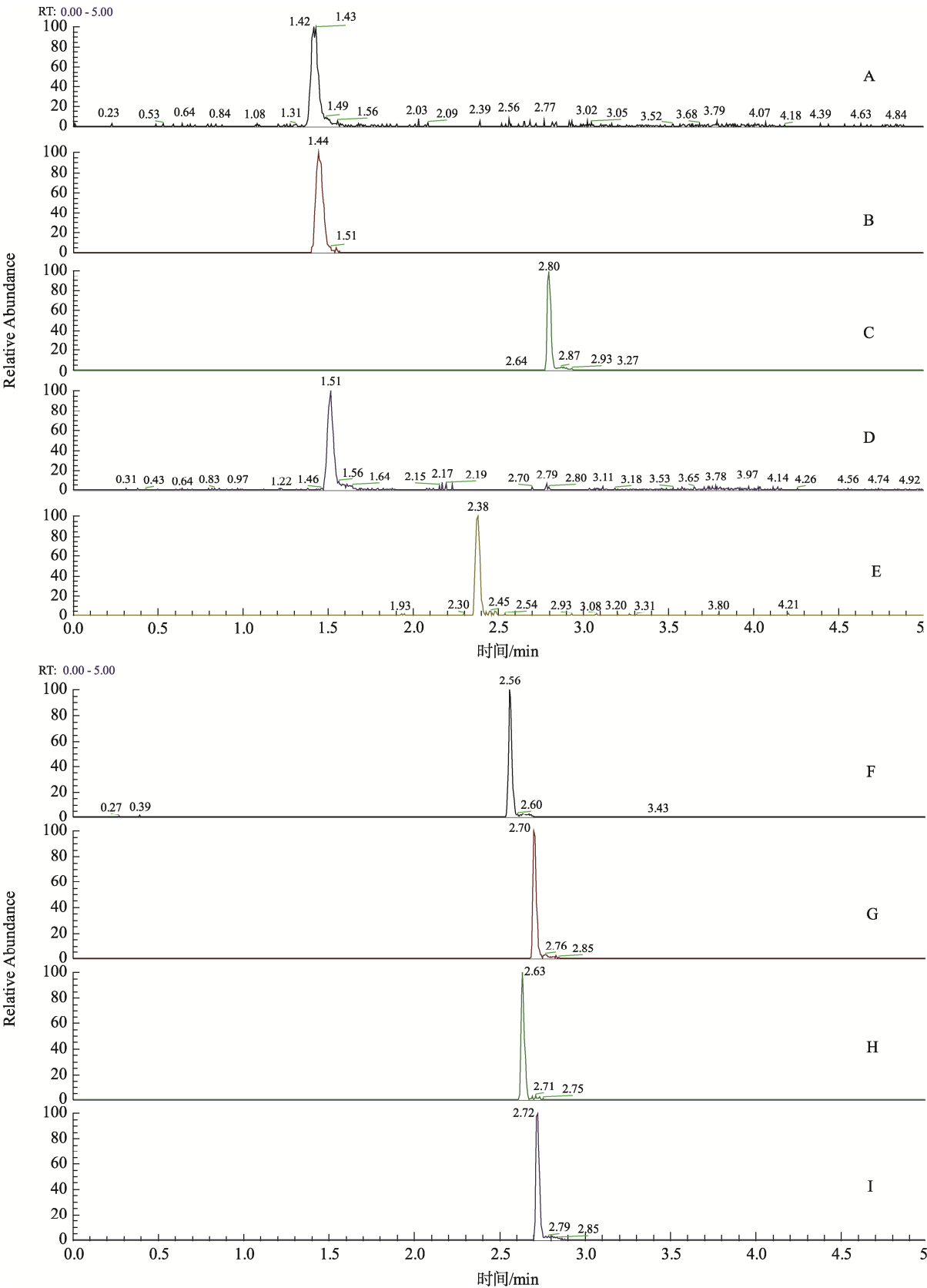
本研究所检测的 9 种受体激动剂均含有氨基基团, 其 pKa 值均大于 9, 容易带正电荷, 选择正离子模式, 流动相中加入低浓度甲酸, 可以增加离子化效率, 极大地改善弱碱性化合物峰型。比较甲醇与乙腈作为流动相效果, 发现甲醇作为流动相目标物的信号强度约为乙腈的 2 倍, 但是峰型拖尾, 半峰宽大, 出现平头峰, 最终选择乙腈作为有机相。考察了低浓度 NH₄Ac 缓冲盐对峰型及离子化效率的影响, 效果并不明显。因此, 最终选择流动相: A 为 0.1%甲酸-水溶液(V/V), B 为 0.1%甲酸-乙腈(V/V)。

3.1.3 质谱条件的选择

比较单离子监测(single ion monitor, SIM)、Full Ms-ddMS² 两种扫描模式, 发现 SIM 模式共流出物多, 提取的特征离子质量色谱图仅有 3~4 扫描点数, 峰型差, 而全扫描加目标物二级离子碎片扫描模式, 扫描点数 12~14, 完全满足定量要求。扫描模式为正离子扫描, 得到一级全扫描质谱图, 以各化合物的精确质荷比提取色谱图, 图 1 为 9 种 β-受体激动剂的提取离子色谱图(含量为 10ng/mL)。9 种 β-受体激动剂的精确质量相对偏差小于 1.0×10⁻⁶(表 2), 符合高分辨质谱检测的要求。二级质谱扫描基于数据依赖的碰撞解离模式运行, 采集目标物的二级质谱图进行定性。

3.2 质谱参数优化

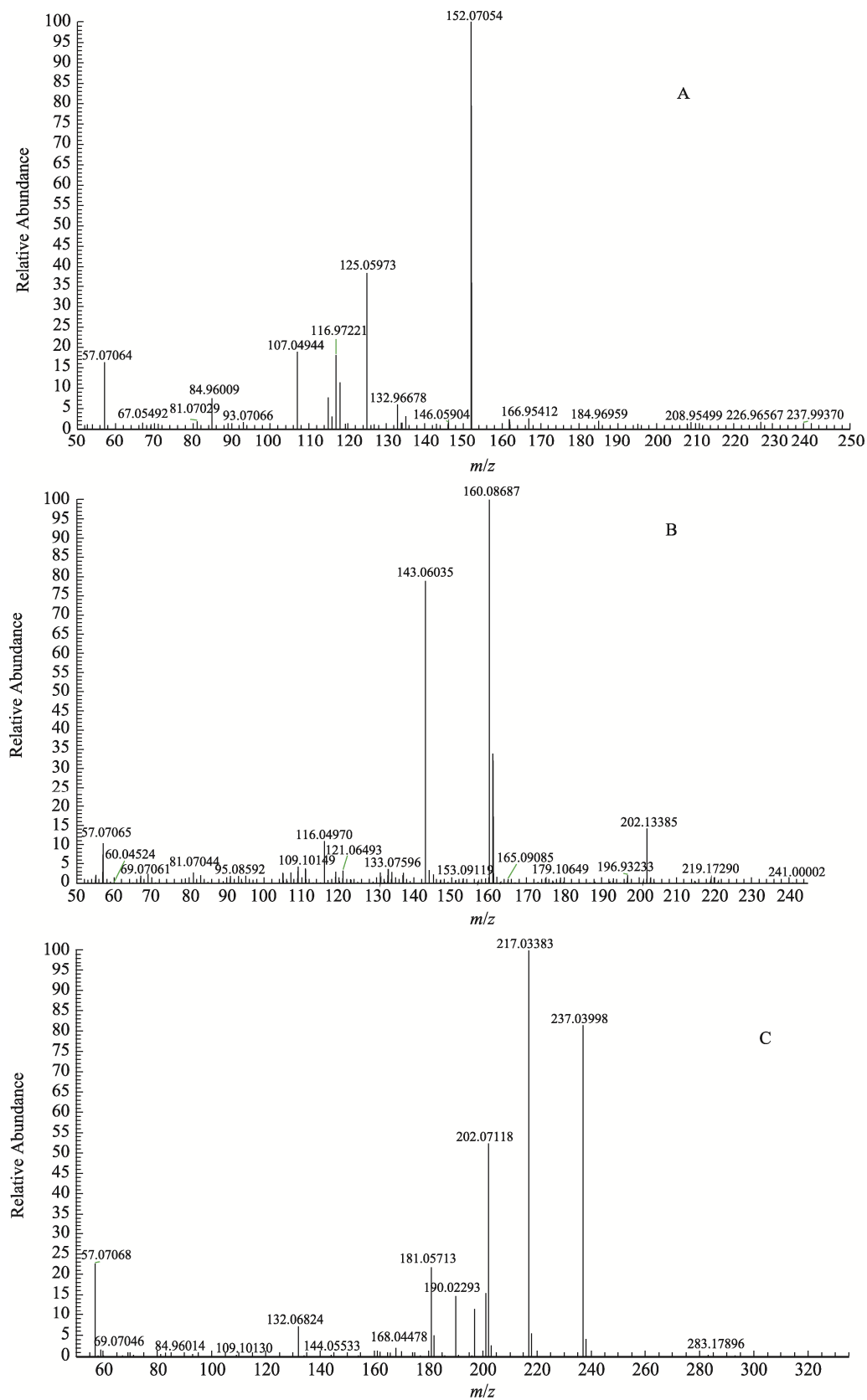
欧盟 EC 2002/657 号文件对多级质谱确证时的碎片类型和所需识别点给出了明确规定, 要求禁用物质的确证必须达到 4 个识别点^[16]。在高分辨质谱中, 每个母离子的识别点规定为 2.0, 子离子的识别点为 2.5。因此, 利用 Orbitrap-MS 只需 1 个母离子和 1 个子离子即可完成对目标物质的确证。9 种化合物一级母离子实测质量误差均小于 5×10⁻⁶, 9 种化合物的二级质谱图见图 2。9 种目标物分子式、保留时间(retention time, RT)、理论质荷比、实际质荷比、精确质量相对偏差、扫描模式、碎片离子、检出限(limit of detection, LOD)等信息见表 2。将表 2 中 9 种化合物的保留时间、精确质荷比及 3 种二级特征碎片离子输入 TraceFinder 软件中, 建立了 9 种化合物的质谱数据库, 实现目标物快速筛查功能。本实验使用母离子峰面积进行定量。



注: A: 特布他林; B: 西马特罗; C: 马布特罗; D: 沙丁胺醇; E: 莱克多巴胺; F: 克伦特罗; G: 溴布特罗; H: 溴代克伦特罗; I: 班布特罗。

图 1 9 种 β -受体激动剂的提取离子色谱图(10 ng/mL)

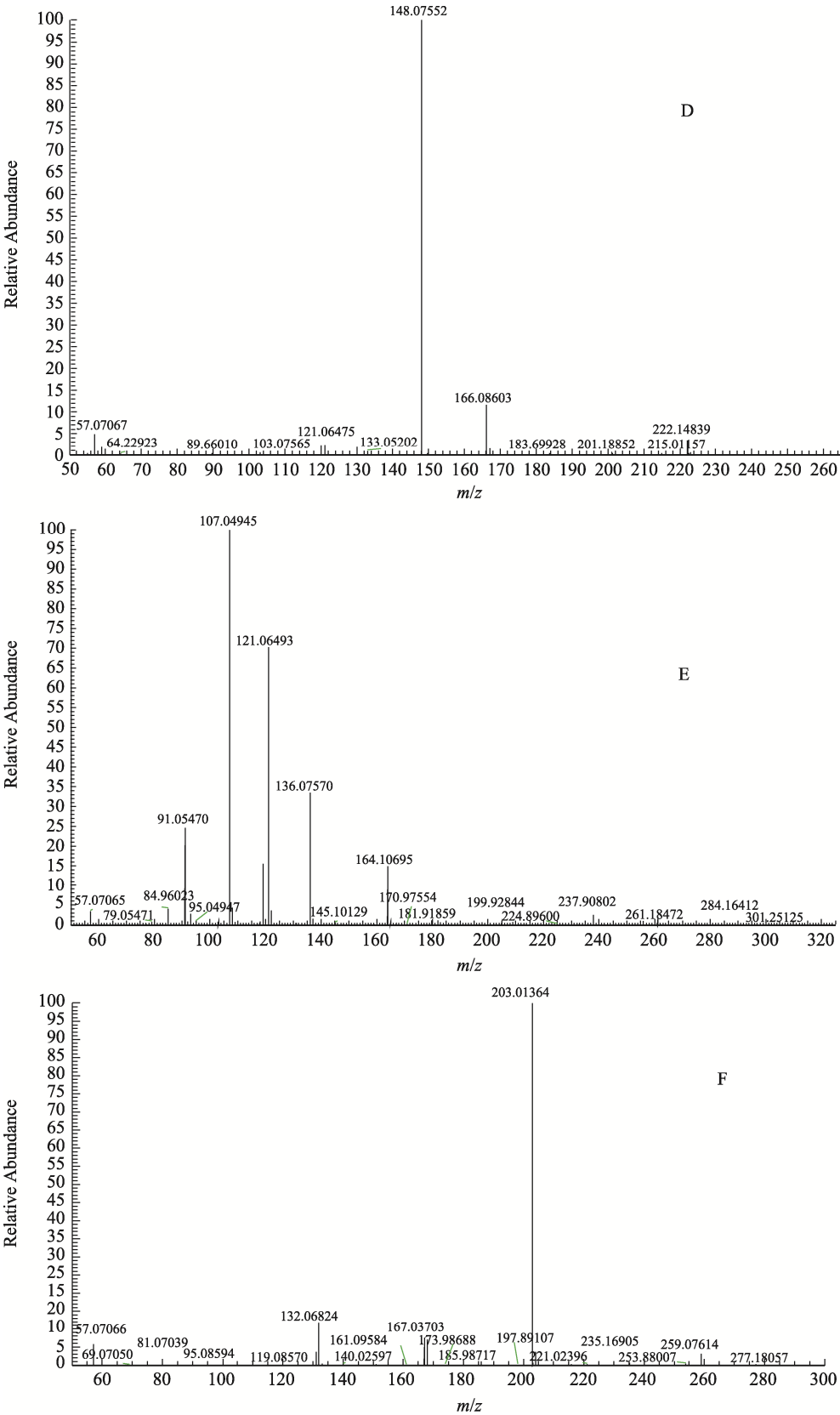
Fig.1 Extracted ion chromatograms of the 9 kinds of β -agonists(10 ng/mL)



注: A: 特布他林; B: 西马特罗; C: 马布特罗。

图 2 9 种 β -受体激动剂的二级质谱图(10 ng/mL)

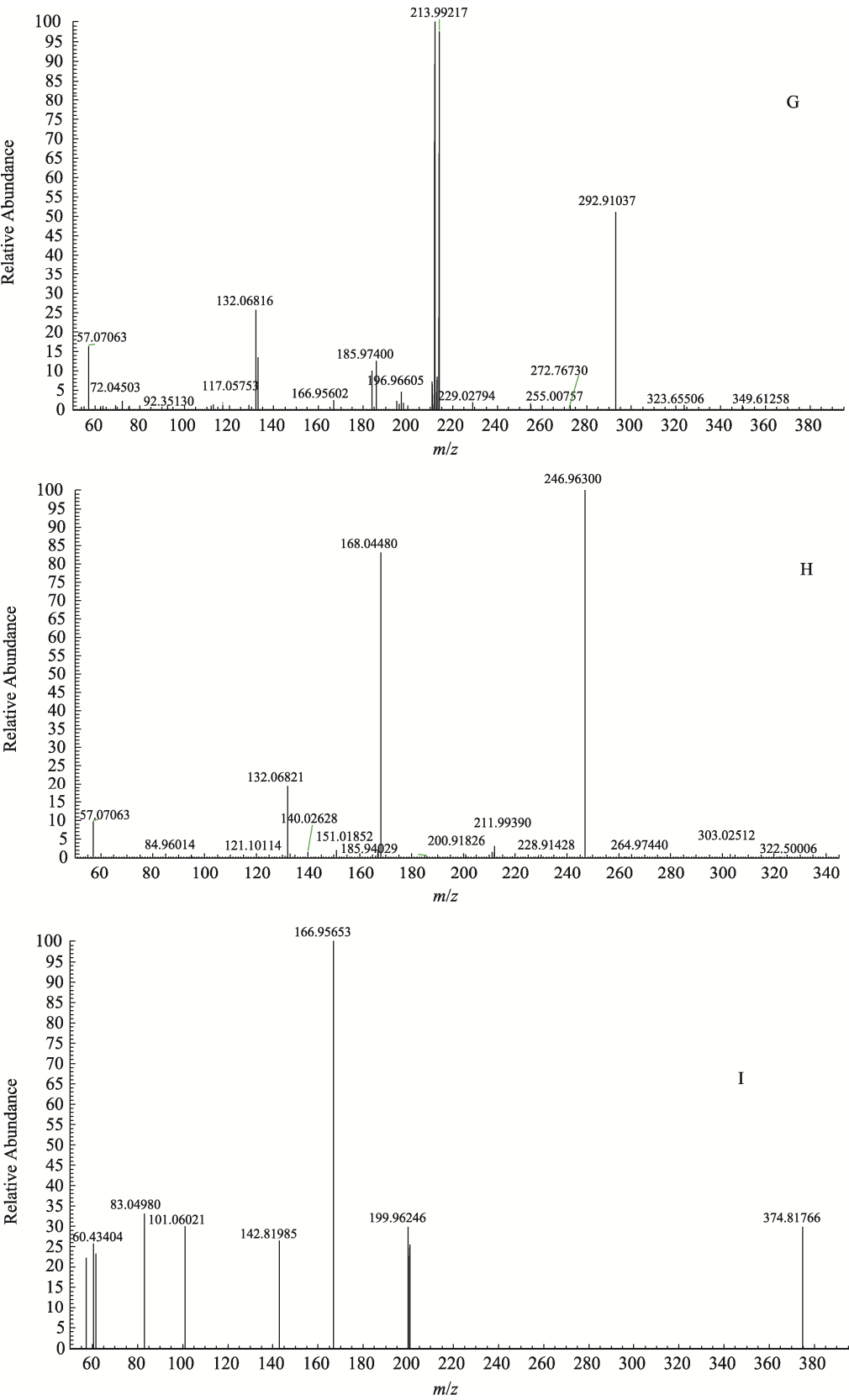
Fig.2 Secondary mass chromatograms of 9 kinds of β -agonists(10 ng/mL)



注: D: 沙丁胺醇; E: 莱克多巴胺; F: 克伦特罗。

续图 2 9 种 β -受体激动剂的二级质谱图(10 ng/mL)

Fig.2 Secondary mass chromatograms of 9 kinds of β -agonists(10 ng/mL)



注: G: 溴布特罗; H: 溴代克伦特罗; I: 班布特罗。

续图 2 9 种 β -受体激动剂的二级质谱图(10 ng/mL)

Fig.2 Secondary mass chromatograms of 9 kinds of β -agonists(10 ng/mL)

表 2 9 种 β -受体激动剂的分子式、保留时间、理论质荷比、实测质荷比、精确质量相对偏差、加合物、碎片离子以及检出限
Table 2 The molecular formula, retention times, theoretical mass-to-charge ratio, actual mass-to-charge ratio, accurate mass relative deviation, adduct, fragment ion, LOD of 9 kinds of β -agonists

化合物	分子式	保留时间 /min	理论 质荷比	实测 质荷比	精确质量 相对偏差/ 10^{-6}	加合物	碎片离子	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)
特布他林	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	1.42	226.14377	226.14380	0.13	+H	152.07054、125.05973、116.97221	0.5
西马特罗	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$	1.44	220.14440	220.14459	0.86	+H	160.08687、143.06035、202.13385	0.2
马布特罗	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}$	2.80	311.11330	311.11313	0.55	+H	217.03383、237.03998、202.07118	0.2
沙丁胺醇	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	1.51	240.15942	240.15952	0.42	+H	148.07552、166.08603、57.07067	0.2
莱克多巴胺	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	2.38	302.17507	302.17517	0.33	+H	107.04945、121.06493、136.07570	0.4
克伦特罗	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{H}_9\text{N}_2\text{O}$	2.56	277.08690	277.08694	0.14	+H	203.01364、132.06824、57.07066	0.4
溴布特罗	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}$	2.70	366.98382	366.98383	0.03	+H	213.99217、292.91037、132.06816	0.4
溴代克伦特罗	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{BRCLN}_2\text{O}$	2.63	321.03638	321.03635	-0.09	+H	246.96300、168.04480、132.06821	0.5
班布特罗	$\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5$	2.72	368.21800	368.21802	0.05	+H	166.95653、199.96246、142.81985	0.2

3.3 基质效应考察与消除

由于基质成分的影响,导致被分析物的信号强度有不同程度的增强或减弱,此为基质效应。基质效应的存在会对测定结果的准确性产生影响。与三重四极杆质谱相比,UPLC-Q-Orbitrap 具有更强的抗干扰能力,但基质效应仍然存在,且样品基质较为复杂,可通过计算基质因子来评价。评价方法如下:绘制溶剂标准曲线(斜率为 K_2)和基质匹配标准曲线(斜率为 K_1),定义基质因子(matrix factor, MF): $\text{MF} = K_1/K_2$ 。当 MF 值为 1 时,表示无基质效应;MF 值小于 1,则基质抑制;MF 值大于 1,则基质增强^[17]。

为考察基质对 9 种受体激动剂响应值的影响,分别配制了溶剂标准工作曲线以及基质标准工作曲线,浓度为 0.5、1、2、5、8、10 ng/mL。溶剂标样和基质标样的曲线回归方程、相关系数及斜率比值见表 3,其中: Y 为信号强度, X 为浓度。溶剂和基质标准曲线线性均良好,相关系数 r 均大于 0.997。除沙丁胺醇外,基质对其余 8 种受体激动剂均有基质抑制效应。基质对沙丁胺醇及西马特罗影响最小,克伦特罗受基质影响最大。

抵消基质干扰的方法很多,如:稀释法、内标法、基质净化法、基质匹配等。4 种方法各有缺点。稀释法往往会提高检出限,不利于低含量物质的检测;内标法对应的内标价格昂贵,合成困难,寻找合适的内标物质是个难点;基质净化法可有效去除基质干扰,提高信噪比,但对于多残留检测存在很多弊端,选择合适净化方式尤为重要;作为一个多残留物质同时筛查和定量的方法,很难兼顾到每一种目标物的同时完全消除基质效应的影响,因此,采用

基质标准溶液定量,这可以在很大程度上减少基质效应影响,将其控制在可接受的范围内。基质匹配法实质并没有消除基质干扰,对于低浓度含量的测定存在难度;本研究采用基质净化和基质匹配法相结合可以抵消大部分的基质效应。

3.4 前处理条件的考察

3.4.1 提取及净化条件的优化

本研究选择 4 种不同的提取溶剂(乙酸乙酯、乙腈、0.1%甲酸乙酸乙酯、0.1%甲酸乙腈),以 9 种 β -受体激动剂的平均回收率(加标浓度 5 $\mu\text{g/kg}$)考察不同溶剂的提取效果。实验表明,采用乙腈作为提取溶剂时,基质干净且 9 种 β -受体激动剂的回收率高。 β -受体激动剂一般为弱碱性化合物,可与酸形成盐,因此采用中性乙腈提取回收率高于酸性乙腈。乙腈具有较好的沉淀蛋白的作用,而乙酸乙酯溶解脂肪,不利于后期的净化。因此,最终选择乙腈为提取溶剂。

3.4.2 净化方式的选择

肉类样品的基质较为复杂,选择合适的净化方式尤为重要。肉类基质中主要含有蛋白质及脂肪类物质。本研究主要考察了正己烷液液萃取、吸附剂净化、盐析净化等 3 种净化方式的净化效果,结果见图 3。发现传统的液液萃取,复溶后浑浊,但过滤膜后,上机液澄清,无可视杂质,回收率普遍高于其他两种方式;盐析净化,复溶后,溶液澄清,净化效果显著,但是西马特罗几乎完全被吸附,其他 8 种化合物回收率较好。吸附剂净化,复溶后,溶液浑浊,还需正己烷进一步净化,9 种化合物回收率均低于正己

烷液液萃取的净化方式, 主要是因为吸附剂在吸附蛋白质、脂肪、磷脂等物质的同时, 也吸附了目标物。考虑仪器污染问题, 最终选择传统的吸附剂净化方式。

3.5 方法学验证

3.5.1 检出限

在高分辨质谱的分析中, 其提取的精确相对分子质量色谱图无基线噪音, 因此采用传统信噪比(S/N)的方法无法计算检出限。本研究通过不同加标水平确定方法检出限,

以各化合物能够触发二级质谱扫描最小峰面积为评价标准。结果见表 2, 检出限范围为 0.2~0.5 μg/kg。

3.5.2 方法回收率及精密度

分别取猪肉、猪肝、羊肉样品空白样品, 添加低、中、高 3 个浓度水平的 9 种受体激动剂混合标准溶液, 进行前处理, 测定目标化合物, 每个浓度水平进行 6 次测定, 结果见表 4。9 种化合物平均回收率为 76.3%~110.8%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.5%~11.3%。

表 3 溶剂标样和基质标样的标准曲线、相关系数及其基质因子
Table 3 Standard curves, correlation coefficients and matrix factors of solvent and matrix standard samples

化合物	溶剂标准曲线	基质标准曲线	MF
特布他林	$Y = 2603.87 + 98463.3X (r = 0.9997)$	$Y = 4349.2 + 81766.4X (r = 0.9979)$	0.8
西马特罗	$Y = -3537.4 + 116942X (r = 0.9998)$	$Y = -32741.1 + 109151X (r = 0.9989)$	0.9
沙丁胺醇	$Y = 20412.8 + 116532X (r = 0.9996)$	$Y = 1584.11 + 131854X (r = 0.9998)$	1.1
莱克多巴胺	$Y = -1594.56 + 68191.2X (r = 0.9997)$	$Y = 2016.29 + 44237.6X (r = 0.9987)$	0.6
克伦特罗	$Y = 10680.2 + 109367X (r = 0.9999)$	$Y = 10027.4 + 55000.6X (r = 0.9975)$	0.5
溴布特罗	$Y = 7646.61 + 73732.8X (r = 0.9998)$	$Y = -694.105 + 43330.8X (r = 0.9979)$	0.6
溴代克伦特罗	$Y = 2061.87 + 65388.5X (r = 0.9995)$	$Y = -6054.59 + 36501.2X (r = 0.9978)$	0.6
马布特罗	$Y = 44415.1 + 178271X (r = 0.9999)$	$Y = 4044.6 + 107430X (r = 0.9996)$	0.6
班布特罗	$Y = -16348.9 + 217421X (r = 0.9997)$	$Y = 12471.6 + 135702X (r = 0.9993)$	0.6

注: Y: 响应值; X: 浓度; MF: 基质因子。

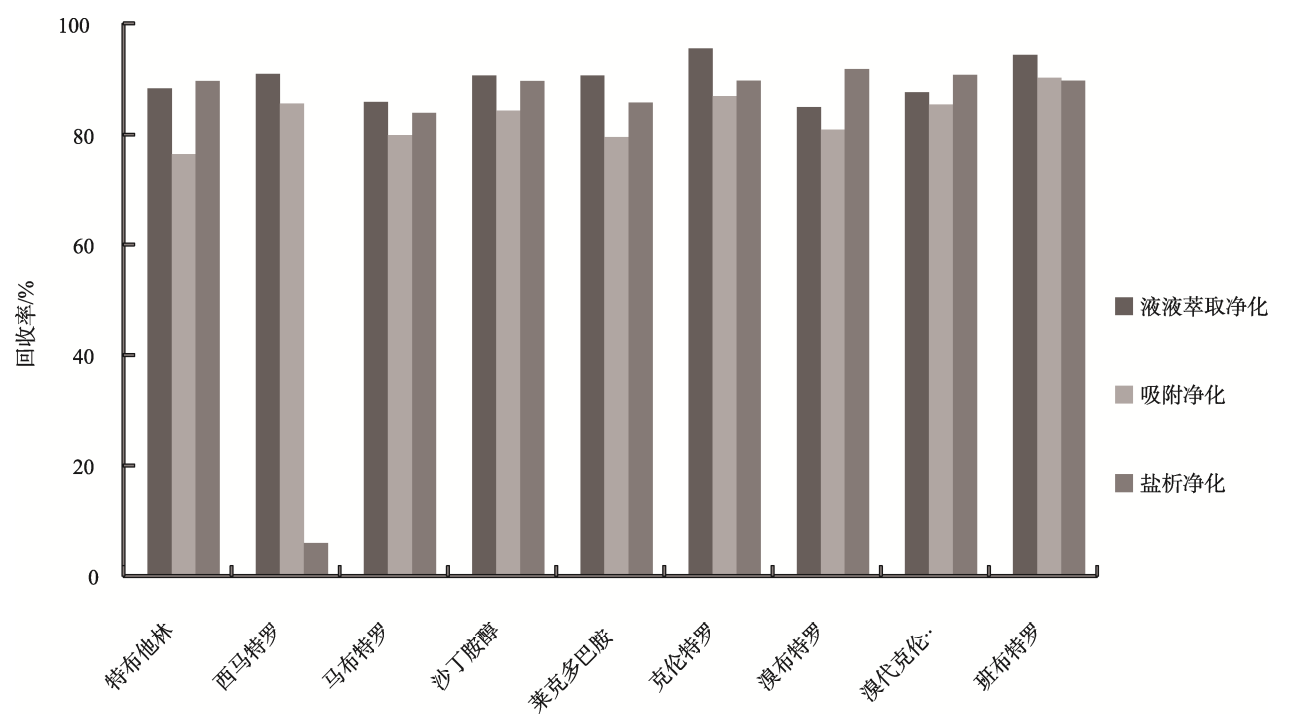


图 3 不同净化方式对 9 种 β-受体激动剂回收率的影响
Fig.3 Effect of different purification methods on the recovery of 9 kinds of β-agonists

表 4 9 种 β -受体激动剂加标回收率及精密度($n=6$)
Table 4 The recovery and precision of 9 kinds of kinds of β -agonists ($n=6$)

化合物	加标水平/($\mu\text{g/kg}$)	回收率	RSD
特布他林	0.5, 1, 5	88.1%~90.8%	5.9%~11.3%
西马特罗	0.5, 1, 5	76.3%~90.5%	3.9%~9.6%
沙丁胺醇	0.5, 1, 5	90.1%~110.8%	4.1%~12.3%
莱克多巴胺	0.5, 1, 5	85.0%~92.5%	5.0%~9.9%
克伦特罗	0.5, 1, 5	91.0%~100.7%	5.1%~10.3%
溴布特罗	0.5, 1, 5	84.9%~97.3%	3.2%~9.3%
溴代克伦特罗	0.5, 1, 5	77.9%~92.7%	3.7%~9.3%
马布特罗	0.5, 1, 5	74.3%~89.5%	2.5%~8.3%
班布特罗	0.5, 1, 5	90.3%~107.5%	4.1%~8.9%

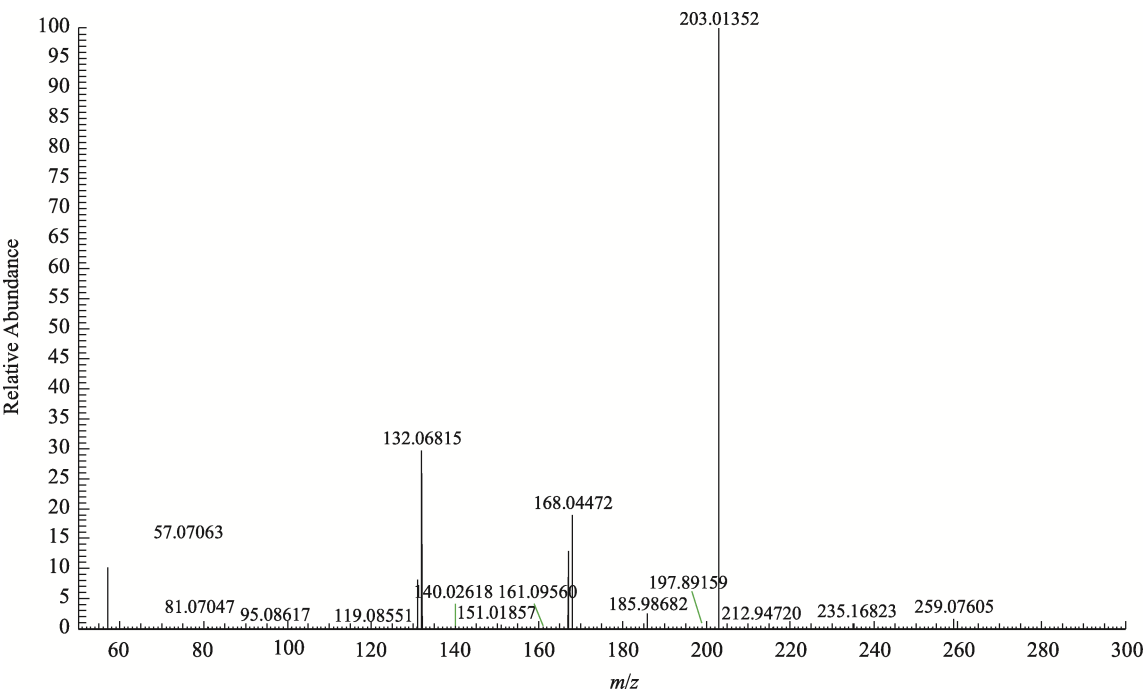


图 4 克伦特罗阳性样品的二级质谱图
Fig.4 Secondary mass spectrum of clenbuterol in positive sample

3.6 实际样品检测

为了验证本方法的可行性及准确性,应用本研究建立的方法对 1 份克伦特罗阳性猪肉样品进行检测。采用精确质量数和保留时间进行初步筛查,并结合二级特征碎片离子确证,母离子进行定量分析。提取二级质谱图见图 4,

样品中克伦特罗保留时间、质荷比、离子碎片等信息均与数据库中信息相匹配,确证了克伦特罗的残留。使用本方法测得克伦特罗含量为 3.9 $\mu\text{g/kg}$ 。依据 GB/T 22286-2008,测试结果为 4.3 $\mu\text{g/kg}$ 。两者相对偏差小于 10%,说明本方法定量的可行性。

4 结 论

本文针对畜产品中 9 种 β -受体激动剂药物, 采用乙腈提取, 正己烷液液萃取净化, 使用高灵敏度、高分辨率的轨道离子阱高分辨质谱仪进行快速筛查和确证。9 种化合物的方法的检出限在 0.2~0.5 $\mu\text{g/kg}$ 之间, 低、中、高 3 个加标水平的回收率在 74.3%~110.8% 范围内, 相对标准偏差均小于 12%, 重现性良好。本方法快速、简便、灵敏度高, 可满足日常工作中对动物源性食品中 9 种 β -受体激动剂药物快速筛查与确认。

参考文献

- [1] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科技出版社, 2002.
- [2] Li JS, Qiu YM, Wang C. Residue of veterinary drug analysis [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002.
- [3] Mastrianni KR, Metavarayuth K, Brewer WE, *et al.* Analysis of 10 β -agonists in pork meat using automated dispersive pipette extraction and LC-MS/MS [J]. J Chromatogr B, 2018, (1084): 64–68.
- [4] 吴永宁, 邵兵, 沈建忠. 兽药残留检测与监控技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [5] Wu YN, Shao B, Shen JZ. Residue of veterinary drug detection and monitoring technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.
- [6] 俞晓兰, 夏宝林, 张维益, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中 5 种 β -受体激动剂残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16): 4320–4325.
- [7] Yu XL, Xia BL, Zhang WY, *et al.* Determination of 5 kinds of β -agonist residues in chicken by ultra performance liquid chromatography chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(16): 4320–4325.
- [8] Lawrence JF, Menard C. Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic cleanup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection [J]. J Chromatogr B, 1997, 696(2): 291–297.
- [9] 卞槐, 林涛, 刘敏, 等. 气相色谱-质谱法测定猪可食性组织中 3 种 β -兴奋剂残留的基质效应[J]. 色谱, 2014, 32(2): 162–168.
- [10] Bian K, Lin T, Liu M, *et al.* Matrix effects in analysis of 3 β -agonist residues in pig edible tissues using gas chromatograph-mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(2): 162–168.
- [11] 宋永青, 郭文萍, 赵蓉, 等. 气相色谱-质谱法测定动物性食品中三种 β -激动剂的残留量[J]. 肉类研究, 2007, 15(11): 45–49.
- [12] Song YQ, Guo WP, Zhao R, *et al.* The detection of 3 β -excitant residue in meats by GC-MS [J]. Meat Res, 2007, 15(11): 45–49.
- [13] 张瑞雨, 梁孟军, 赵丽, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 β -受体激动剂[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(2): 167–171.
- [14] Zhang RY, Liang MJ, Zhao L, *et al.* Determination of β -agonists in food by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 29(2): 167–171.
- [15] 齐鹤鸣, 韩深, 吕美玲, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛肉中 18 种食源性兴奋剂类药物残留[J]. 色谱, 2018, 36(7): 621–628.
- [16] Qi HM, Han S, Lv ML, *et al.* Simultaneous determination of 18 food-borne stimulant drug residues in beef using ultra-high perform liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(7): 621–628.
- [17] 史娜, 郝杰, 姜洁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测动物源性食品中残留的 35 种 β -受体激动剂和 11 种 β -受体阻断剂[J]. 分析仪器, 2018, 36(1): 20–31.
- [18] Shi N, Hao J, Jiang J, *et al.* Simultaneous determination of 35 β -agonist and 11 β -blocker residues in animal-origin foods by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Instrum, 2018, 36(1): 20–31.
- [19] 韩宁娟, 杜玮, 常春, 等. 食品中 β_2 受体激动剂快速检测方法的建立与应用[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 574–578.
- [20] Han NJ, Du W, Chang C, *et al.* Establishment and application of thin layer chromatography method for rapid detection of 4 kinds β_2 agonists in food [J]. J Northwest Pharm, 2016, 31(6): 574–578.
- [21] 冯峰, 李伟明, 孙燕, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱非靶标筛查测定白酒和饮料中甜菊糖苷[J]. 色谱, 2019, 37(1): 87–92.
- [22] Feng F, Li WM, Sun Y, *et al.* Non-targeted screening and determination of steviol glycosides in Chinese liquor and beverages by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/Orbitrap mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(1): 87–92.
- [23] 张宪臣, 张朋杰, 时成玉, 等. 微波辅助萃取-超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速测定食品接触塑料制品中 48 种污染物残留[J]. 色谱, 2018, 36(7): 634–642.
- [24] Zhang XC, Zhang PJ, Shi YC, *et al.* Rapid determination of 48 contaminant residues in food contact plastic products by ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry coupled with microwave-assisted extraction [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(7): 634–642.
- [25] 柳茜, 张亚莲, 丁涛, 等. 高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱用于葡萄酒中 111 种农药残留的定性筛查与定量分析[J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 489–498.
- [26] Liu H, Zhang YL, Ding T, *et al.* Screening and quantification of 111 pesticide residues in wines by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(5): 489–498.
- [27] 程甲, 赵善贞, 霍忆慧, 等. 基质分散固相萃取-高效液相色谱-轨道离子阱高分辨质谱法对水产品中 12 种禁用化合物的快速筛查和确证[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(3): 574–582.
- [28] Cheng J, Zhao SZ, Huo YH, *et al.* Rapid screening and confirming of 12 kinds of prohibited compounds in aquatic products by QuEChERS-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(3): 574–582.

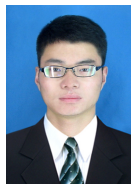
[16] 2002/657/EC Commission Decision [Z].

[17] 何红梅, 赵华, 张春荣, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水稻基质中阿维菌素残留量[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 140–144.

He HM, Zhao H, Zhang CR, *et al.* Determination of abamectin residue in paddy rice by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(1): 140–144.

(责任编辑: 徐梅)

作者简介



夏宝林, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: 18068362265@163.com