

超高效液相色谱-串联质谱法检测动物血液中 6种 β -受体激动剂类药物残留

刘瑜, 李晓东, 张彤, 毕效瑞, 姜玲玲, 金雁, 耿庆华*

(沈阳海关技术中心, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法检测动物血液样品中6种 β -受体激动剂类药物残留的分析方法。**方法** 样品经乙腈提取, 经 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱分离, 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾正离子(electrospray ionization, ESI+)模式电离, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描模式检测。**结果** 6种化合物在0.2~50 ng/mL 范围内均呈现良好的线性关系, 相关系数(r)均大于0.990。检出限为0.04~0.11 μ g/kg, 猪血液样品中3个浓度添加水平平均回收率为86.2%~99.2%, 相对标准偏差为3.2%~8.4%。**结论** 本方法操作简便, 回收率高, 适用于动物血液样品中6种 β -受体激动剂类药物同时定性、定量分析。

关键词: β -受体激动剂; 动物血液; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 6 kinds of β -agonists residues in animal blood by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

LIU Yu, LI Xiao-Dong, ZHANG Tong, BI Xiao-Rui, JIANG Ling-Ling,
JIN Yan, GENG Qing-Hua*

(Shenyang Customs Technology Center, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 6 kinds of β -agonists residues in animal blood by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted with acetonitrile solution, and separated by Waters Acquity UPLC system with a BEH C₁₈ column. The mobile phases were acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution in gradient elution. The electrospray was operated in the positive ionization mode, and the compounds were identified by multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** A total of 6 kinds of compounds had good linear relationships in the range of 0.2–50 ng/mL, and the correlation coefficients were larger than 0.990. The limits of detection were 0.04–0.11 μ g/kg. The recoveries at 3 spiked levels were 86.2%–99.2%, with the relative standard deviations of 3.2%–8.4%. **Conclusion** This method is simple to operate and has high recovery rate, which is suitable for simultaneous qualitative and quantitative analysis of 6 kinds of β -agonists in animal blood samples.

基金项目: 辽宁省自然科学基金计划重点项目(20170520089)

Fund: Supported by Key Projects of Liaoning Natural Science Foundation Program (20170520089)

*通讯作者: 耿庆华, 博士, 研究员, 主要研究方向为动物检验检疫。E-mail: syhg_gengqinghua@customs.gov.cn

*Corresponding author: GENG Qing-Hua, Ph.D, Professor, Shenyang Customs Technology Center, No.106, Dongbinhe Road, Shenhe District, Shenyang 110016, China. E-mail: syhg_gengqinghua@customs.gov.cn

KEY WORDS: β -agonists; animal blood; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

1 引言

肉及肉制品是人们日常生活中最重要的消费品之一。人们逐渐认识到食品安全与身体健康的重要性,因而对肉类产品质量安全提出更高的要求。

由于 β -受体激动剂药物具有促进动物肌肉组织增长、减少脂肪沉积、改善肉质、提高饲料转化率等作用,常被应用于畜禽生产中^[1,2]。由于其易在动物可食组织(肌肉、肝、肾)中蓄积,并以残留的方式进入人体,危害人类健康。我国农业部禁止将 β -受体激动剂用于所有食用动物中,但是由于商业利益的驱使,2006 年以来瘦肉精中毒事件一度引发社会广泛关注,在有关部门加强监管后,近几年瘦肉精行为受到一定抑制,但近年来瘦肉精出现了替代品,现在使用更多的是莱克多巴胺,通常出现在饲料添加剂中,在猪蹄等肉制品中莱克多巴胺仍时有检出。

如何进行药物残留的有效监控已经成为国际社会关注的焦点问题,通过检测动物血液药物残留预测可食性组织中药物残留情况,将为药物的残留监控提供更简便快捷的活体预测残留的方法^[3-5],对于药物的残留监控具有重大的理论和实际意义,避免造成动物胴体的浪费。

目前,文献报道的 β -受体激动剂类药物的检测方法,大多针对动物可食组织作为研究基质^[6-11],而将血液作为研究基质的文献报道较少^[12-14]。由于动物可食组织基质复杂,通常需要过固相萃取柱净化,导致样品前处理方法操作繁琐,耗时较长^[15,16]。因此本研究选择基质相对简单的血液作为研究基质,建立血液样品中喹诺酮类化合物检测方法,由于其基质简单,一方面具有前处理方法简便,灵敏度高,重现性好等优点;另一方面可通过检测动物血液药物残留预测可食性组织中药物残留情况,避免造成动物胴体的浪费,以期对动物可食性组织中的兽药残留提供参考。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

ACQUITYTM 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Qtrap 5500 质谱仪(美国 AB Sciex 公司); BSA822 电子分析天平(感量 0.01 g, 德国 Sartorius 公司); XW-80A 旋涡混合仪(上海楚定分析仪器); SR-2DS 强力振荡器(日本 Taitec 公司); MG-2200 氮吹仪(日本 EYELA 公司); Z323K 高速离心机(德国 Hermle 公司)。

甲酸(优级纯, 德国 Dikma 公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Dikma 公司); 所用水为超纯水(Millipore 纯水机制备)。

标准品: 克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林、西马特罗、喷布特罗均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 mL, 购自农业部环境保护科研监测所。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备

鸡血液样品于抗凝管中,在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存,取出放置室温后备用。

2.2.2 样品前处理

准确称取 1 g 血液样品(精确至 0.01 g),置于 10 mL 离心管中,加入 2 mL 乙腈溶液,充分漩涡、振荡提取,10000 r/min 离心 8 min,上清液移入另一离心管中,再加入 2 mL 乙腈溶液重复提取 1 次,离心后合并上清液,将上清液于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮吹至近干,加入 1.0 mL 0.1%甲酸水溶液溶解,过 0.22 μm 滤膜,待测。

2.2.3 仪器条件

(1) 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 10 μL ; 流动相: A 相为 0.1%甲酸水溶液, B 相为乙腈,梯度洗脱程序: 0 min, 95%A; 2 min, 95%A; 10 min, 10%A; 11 min, 10%A; 11.1 min, 95%A; 15 min, 95%A。

(2) 质谱条件

电离方式: 电喷雾正离子电离(electrospray ionization, ESI+); 喷雾电压: 5000 V; 离子源温度(ion source temperature, TEM): $500\text{ }^{\circ}\text{C}$; 雾化气(gas1, GS1)流量: 50 mL/min; 辅助加热气(gas2, GS2)流量: 50 mL/min; 帘气(curtain gas, CUR)流量: 25 mL/min; 碰撞气流量: 6 mL/min; 去簇电压(declustering potential, DP): 80 V; 入口电压(entrance voltage, EP): 10 V; 检测模式: 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)。所测定的各化合物的保留时间(retention time, RT)、母离子(Q1)、子离子(Q3)、去簇电压(declustering potential, DP)、碰撞能量(collision energy, CE)及碰撞室出口电压(cell exit potential, CXP)见表 1。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂的选择

考察了甲醇、乙腈、乙酸乙酯 3 种提取溶剂的提取效果,结果显示乙腈作为提取溶剂的回收率较高,高速离心后对血液的沉淀效果较好,以盐酸克伦特罗为例,乙腈作为提取溶剂的回收率为 97.2%,甲醇作为提取溶剂回收率为 91.3%,而乙酸乙酯作为提取溶剂回收率为 88.5%, β -受体激动剂类药物结构相似,6 种化合物均在乙腈中提取效率最高,因此选择乙腈作为提取溶剂。

3.2 流动相的选择

考察了甲醇-0.1%甲酸、乙腈-0.1%甲酸作为流动相各化合物的分离情况,结果表明各化合物在乙腈-0.1%甲酸为

流动相的条件下色谱峰响应值较高,峰型也较好,因此最终选择乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相。表 2 为添加水平为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时不同流动相条件下的各化合物回收率。

表 1 各化合物的质谱参数
Table 1 Chromatogram parameters of compounds

名称	英文名称	保留时间/min	Q1/amu	Q3/amu	DP/V	CE/V	CXP/V
莱克多巴胺	ractopamine	5.56	302.2	164.1*	80	23	13
			302.2	107.1	80	51	13
沙丁胺醇	salbutamol	4.30	240.2	148.1*	70	24	13
			240.2	222.1	70	15	13
特布他林	terbutaline	4.33	226.2	152.0*	70	21	13
			226.2	107.1	70	36	13
克伦特罗	clenbuterol	5.94	277.0	203.0*	65	21	13
			277.0	168.1	65	38	13
西马特罗	cimaterol	4.38	220.0	202.0*	65	13	13
			220.0	160.0	65	22	13
喷布特罗	penbutolol	7.68	292.2	236.2*	73	23	13
			292.2	201.0	73	28	13
D9-克伦特罗	D9-clenbuterol	6.03	285.8	204.1*	65	21	13
			285.8	268.2	65	13	13

注: *: 定量离子。

表 2 不同流动相条件下的各化合物回收率
Table 2 Recovery rates of compounds under different mobile phase conditions

化合物	回收率/%	
	乙腈-0.1%甲酸	甲醇-0.1%甲酸
莱克多巴胺	98.2	92.1
沙丁胺醇	93.2	90.5
特布他林	86.2	83.3
克伦特罗	97.1	93.7
西马特罗	95.3	91.6
喷布特罗	96.6	94.6

3.3 质谱条件的优化

配制浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各化合物通过针泵进样,找到相应的母离子、子离子,优化 DP、CE、CXP 等质谱参数(表 1),建立 MRM 方法。图 1 为各化合物总离子流图。

3.4 方法的线性范围及检出限

为了消除基质效应的影响,方法采用基质匹配标准曲线的方法定量,并用 D9-克伦特罗作为内标物定量。将克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林、西马特罗、喷布特罗 6 种化合物用空白基质溶液配成浓度分别为 0.2、0.5、2.0、10、20、50 ng/mL 的混合标准溶液,以浓度为横坐标,峰面积比为纵坐标绘制标准曲线,各化合物线性回归方程和相关系数见表 3。依据信噪比 $S/N=3$ 计算方法的检出限,检出限见表 4。

结果表明,6 种化合物在 0.2~50 ng/mL 范围内均呈现良好的线性关系,相关系数(r)均大于 0.990。

3.5 回收率及精密度实验

向猪空白血液样品中分别添加不同量的混合标准溶液制成 0.5、1.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度水平的模拟加标样,每个加标水平平行测定 6 次,按照优化的实验方法测定各药物的回收率($n=6$)和相对标准偏差(RSD),见表 4。

结果表明,猪血液样品中 3 个浓度添加水平平均回收

率为 86.2%~99.2%, 相对标准偏差为 3.2%~8.4%。

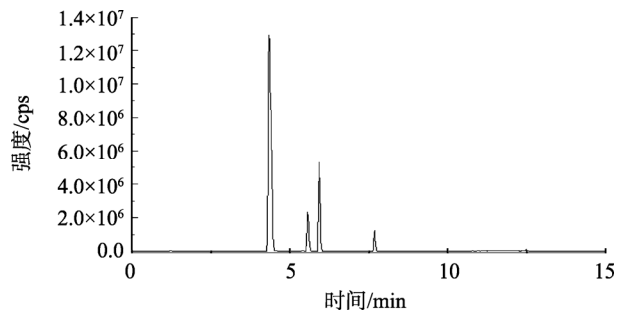


图 1 各化合物的总离子流图

Fig.1 Total ion current(TIC)chromatogram of compounds

3.6 实际样品检测

应用建立的方法, 对 5 个养殖场的 30 头猪血液样

品中 β -受体激动剂残留进行检测, 绝大多数样品未检出此类物质, 2 批样品中检出莱克多巴胺超标, 含量分别为 8.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 10.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 均超出标准中检出限 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 3 6 种 β -受体激动剂类药物的线性回归方程和相关系数
Table 3 Linear regression equation and correlation of 6 kinds of β -agonists

化合物	线性回归方程	相关系数 r
莱克多巴胺	$Y=3.11 \times 10^5 X - 5.42 \times 10^4$	0.997
沙丁胺醇	$Y=2.14 \times 10^6 X + 2.31 \times 10^5$	0.997
特布他林	$Y=4.23 \times 10^5 X + 3.4 \times 10^3$	0.992
克伦特罗	$Y=1.89 \times 10^6 X + 5.43 \times 10^5$	0.998
西马特罗	$Y=4.2 \times 10^5 X - 2.66 \times 10^4$	0.995
喷布特罗	$Y=3.78 \times 10^5 X - 5.81 \times 10^4$	0.993

表 4 6 种 β -受体激动剂类药物的回收率、RSD、检出限($n=6$)
Table 4 Recovery rates, RSDs, LODs of 6 kinds of β -agonists($n=6$)

化合物	回收率/%			检出限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	RSD/%
	0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
莱克多巴胺	97.8	98.5	99.2	0.05	5.4
沙丁胺醇	92.4	93.2	94.8	0.06	8.2
特布他林	86.2	87.8	88.2	0.11	8.4
克伦特罗	97.1	97.6	98.3	0.04	3.2
西马特罗	93.3	95.3	96.7	0.04	5.9
喷布特罗	96.6	96.2	98.6	0.05	6.8

4 结 论

本文采用液相色谱-串联质谱的检测方法, 建立了同时测定食用动物血液样品中的 6 种 β -受体激动剂类药物的定性、定量分析方法, 方法操作简便, 重现性好, 回收率高。文献研究表明, 克伦特罗在血液中的药物浓度与在可食性组织中药物浓度呈线性相关关系^[12-14], 通过检测动物血液药物残留预测可食性组织中药物残留情况, 避免造成动物胴体的浪费, 从而降低经济损失, 提高检测效率, 用以指导肉类生产企业合理饲养、屠宰、加工肉类产品, 为有效控制肉类产品质量提供技术支撑, 保障食品安全。

参考文献

- [1] 高照, 张援, 张亦农, 等. 动物组织内残留 β_2 -受体激动剂的检测方法研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2014, 33(4): 370-378.
Gao Z, Zhang Y, Zhang YN, et al. Progress in the detection of residual β_2 -receptor agonists in animal tissues [J]. Chin J Sports Med, 2014, 33(4): 370-378.
- [2] 王培龙. β -受体激动剂类药物分子印迹和质谱分析技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
Wang PL. Molecular imprinting and mass spectrometry analysis of β -receptor agonists [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural

- Sciences, 2012.
- [3] 李阳, 苏晓鸥, 王瑞国, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定绵羊唾液中14种 β -受体激动剂[J]. 分析化学, 2013, 41(6): 899-904.
- Li Y, Su XO, Wang RG, *et al.* Simultaneous determination of 14 kinds of β -agonist residues in sheep saliva by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(6): 899-904.
- [4] 邱增枝, 郑增忍, 赵思俊, 等. UPLC-MS/MS 法测定猪尿中 β_2 -受体激动剂的基质效应研究[J]. 动物医学进展, 2013, 34(9): 66-70.
- Qiu ZZ, Zheng ZR, Zhao SJ, *et al.* Matrix effects of the UPLC-MS/MS method for the determination of β_2 -agonists in pig urine [J]. Progress Veter Med, 2013, 34(9): 66-70.
- [5] 毕言锋. 基于高分辨质谱技术的 β -受体激动剂在猪体内的代谢研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- Bi YF. Study on the metabolism of β -agonists in swine using high resolution mass spectrometry [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [6] 刘先军, 王一红, 李帮锐, 等. 超高压液相色谱-串联质谱法检测动物组织中26种 β -受体激动剂[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(3): 265-270.
- Liu XJ, Wang YH, Li BR, *et al.* Determination of 26 β -agonists in liver of pigs and ducks using ultra pressure liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2015, 27(3): 265-270.
- [7] 刘桂华, 毛丽莎, 朱舟, 等. 液相色谱串联质谱法测定食用肉类及肝脏中9种 β -受体激动剂[J]. 华南预防医学, 2014, 40(5): 425-430.
- Liu GH, Mao LS, Zhu Z, *et al.* Determination of nine β -agonists in edible meat and liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. South China Prev Med, 2014, 40(5): 425-430.
- [8] 李丹妮, 严凤, 黄成龙, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中5种 β_2 受体激动剂残留量方法的研究[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(1): 23-27.
- Li DN, Yan F, Huang CL, *et al.* Determination of 5 β_2 -agonists in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Veter Med, 2013, 47(1): 23-27.
- [9] 潘艳坤, 张兰, 杨益林, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中9种 β_2 -受体激动剂残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2015, 51(3): 360-364.
- Pan YK, Zhang L, Yang YL, *et al.* Determination of 9 β_2 -agonists residues in pork by HPLC-MS/MS [J]. Phys Test Chem Anal B, 2015, 51(3): 360-364.
- [10] 陈海玲, 谢维平, 王翠玲. 酸解法提取-液相色谱-串联质谱法测定猪肝中多种 β_2 -受体激动剂[J]. 理化检验(化学分册), 2018, 54(12): 31-35.
- Chen HL, Xie WP, Wang CL. Determination of various β_2 -agonists in porcine liver by acidolysis extraction- liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Phys Test Chem Anal B, 2018, 54(12): 31-35.
- [11] 王伟, 尤翠萍. 高效液相色谱-串联质谱法测定羊肉中的4种 β -受体激动剂[J]. 河北科技师范学院学报, 2018, 32(4): 35-38.
- Wang W, You CP. Determination of four β -agonists in mutton by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Hebei Norm Univ Sci Technol, 2018, 32(4): 35-38.
- [12] 朱文渊, 霍翠梅, 郝晴晴, 等. 克伦特罗在猪尿液和血液中的残留消除规律研究[J]. 畜牧兽医科技信息, 2016, (7): 133-134.
- Zhu WY, Huo CM, Hao QQ, *et al.* Studies on the elimination of clenbuterol in pig urine and blood [J]. Chin J Anim Husband Veter Med, 2016, (7): 133-134.
- [13] 孙泽祥, 鲍伟华, 杨挺, 等. 克伦特罗在猪尿液和血液中残留消除相关性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8): 160-163.
- Sun ZX, Bao WH, Yang T, *et al.* Relation study of depletion of clenbuterol in swine urine and blood [J]. China Anim Husband Veter Med, 2010, 37(8): 160-163.
- [14] 张锦红, 葛长荣. 盐酸克伦特罗在动物血浆与组织间残留量的相关性分析及其在体内的残留分布规律研究[J]. 广东农业科学, 2011, (12): 105-112.
- Zhang JH, Ge CR. Study on the correlation between animal plasma and tissue residues and the distribution of residues in the body of clenbuterol [J]. Guangdong Agric Sci, 2011, (12): 105-112.
- [15] 刘敏, 刘戎, 王立琦, 等. 猪肝中 β -受体激动剂多残留的样品前处理方法比较及同时检测[J]. 分析测试学报, 2012, 31(3): 290-295.
- Liu M, Liu R, Wang LQ, *et al.* Comparison of pretreatment methods of β -agonists residues in pig liver and their simultaneous determination [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(3): 290-295.
- [16] 赵敏儿, 彭志超. 3种提取方法在猪肝 β -受体激动剂残留检测中的比较与应用[J]. 现代食品, 2019, (3): 182-184.
- Zhao ME, Peng ZC. Comparison and application of three extraction methods in detection of β -receptor agonist residues in pig liver [J]. Mod Food, 2019, (3): 182-184.

(责任编辑: 武英华)

作者简介

刘 瑜, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为农、兽药残留检测。
E-mail: syhg_liuyu@customs.gov.cn



耿庆华, 博士, 研究员, 主要研究方向为动物检验检疫。
E-mail: syhg_gengqinghua@customs.gov.cn