

超高效液相色谱三重四极杆串联质谱测定猪肉中 β -受体激动剂

LCMSMS-309

摘要：本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆串联质谱仪 LCMS-8050 联用测定猪肉中 β -受体激动剂的方法。该方法在 12 min 内完成 7 种 β -受体激动剂的分析，内标法定量。在 0.05~5 $\mu\text{g/L}$ 的线性范围内，校准曲线的相关系数均在 0.996 以上。对 0.1、0.5、5 mg/L β -受体激动剂类兽药的标准溶液，平行测试 6 次，7 种目标化合物的保留时间和峰面积比的相对标准偏差分别在 0.01~0.60% 和 1.17~6.65% 之间，仪器精密度良好。灵敏度考察结果表明，7 种 β -受体激动剂的定量限在 0.009~0.041 $\mu\text{g/L}$ 的范围内。该方法可用于肉类基质中多种 β -受体激动剂的同时检测。

关键词：三重四极杆质谱 β -受体激动剂 猪肉基质

β -受体激动剂是一类人工合成药物，将其加入动物饲料中可提高饲料转化率，有效促进动物肌肉生长。医学实验已证明， β -受体激动剂残留会严重影响人类健康，长期食用含有 β -受体激动剂残留的猪肉会增加致癌致畸的风险。因而，动物源性食品中存在的 β -受体激动剂检测备受关注。2002 年 12 月，农业部第 235 号公告修订了《动物性食品中兽药最高残留限量》，规定所有动物性食品中不得检出 β -受体激动剂。欧盟同样规定在动物组织中不得检出，美国、墨西哥和日本也对部分

受体兴奋剂规定了最大残留限量。

目前，国内外报道的动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测的确证方法主要有气相色谱 - 质谱联用法和液相色谱 - 串联质谱联用法。其中液相色谱 - 串联质谱法由于无需衍生、检出限低、灵敏度高等优点，成为检测此类物质的首选。

本文使用岛津超高效液相色谱串联质谱建立了猪肉中 7 种 β -受体激动剂的方法，方法灵敏度高、专属性强，为动物性食品中 β -受体激动剂的监测提供了技术支持。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS 2.0 mm I.D. \times 100 mm L.,
1.9 μm

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 - 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
4.00	Pumps	Pump B Conc.	25
7.00	Pumps	Pump B Conc.	90
8.00	Pumps	Pump B Conc.	90
8.01	Pumps	Pump B Conc.	5
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8050

离子化模式：ESI(+)

加热气：空气 10.0 L/min

雾化气：氮气 2.0 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

碰撞气：氩气

离子源接口电压：2.0 kV

源温度：300℃

DL 温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

1.3 标准品溶液的配制

标准工作溶液配制：用甲醇配制浓度为 100 µg/mL 的 7 种受体激动剂的标准储备液，然后用 0.1% 甲酸水溶液将储备液逐步稀释成 0.05 µg/L、0.1 µg/L、0.2 µg/L、0.5 µg/L、1.0 µg/L、2.0 µg/L 和 5.0 µg/L 的混合标准工作液，其中内标 D3-沙丁胺醇和 D3-莱克多巴胺的浓度固定为 0.2 µg/L。

1.4 样品前处理方法

参照 GB/T 22286-2008 《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》中的样品提取和净化方法。

表2 MRM优化参数

序号	化合物	英文名	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	吡布特罗	Pirbuterol	38677-81-5	241.10	149.05*	-29.0	-20.0	-26.0
					122.10	-29.0	-27.0	-21.0
2	卡布特罗	Carbuterol	34866-47-2	268.20	194.10*	-13.0	-15.0	-20.0
					177.10	-13.0	-19.0	-30.0
3	齐帕特罗	Zilpaterol	117827-79-9	262.20	244.15*	-12.0	-12.0	-25.0
					185.10	-12.0	-24.0	-30.0
4	硫酸丁酚胺	Bametansulfate	5716-20-1	210.20	192.15*	-13.0	-11.0	-19.0
					91.10	-13.0	-28.0	-15.0
5	盐酸苯氧丙酚胺	Isoxsuprine hydrochloride	579-56-6	302.10	284.15*	-30.0	-15.0	-29.0
					107.00	-30.0	-30.0	-18.0
6	克伦潘特	Clenpenterol	37158-47-7	291.10	203.00*	-18.0	-16.0	-20.0
					273.10	-18.0	-11.0	-12.0
7	喷布特罗	Penbutolol	36507-48-9	292.30	236.15*	-18.0	-16.0	-24.0
					133.05	-18.0	-24.0	-23.0
8	D3-沙丁胺醇	D3- Salbutamol	/	243.20	151.10*	-30.0	-21.0	-29.0
9	D3-莱克多巴胺	D3-Ractopamine	/	305.20	107.05*	-30.0	-34.0	-18.0

注：*表示定量离子

结果与讨论

2.1 β -受体激动剂标准溶液的 MRM 色谱图 (0.2 $\mu\text{g/L}$)

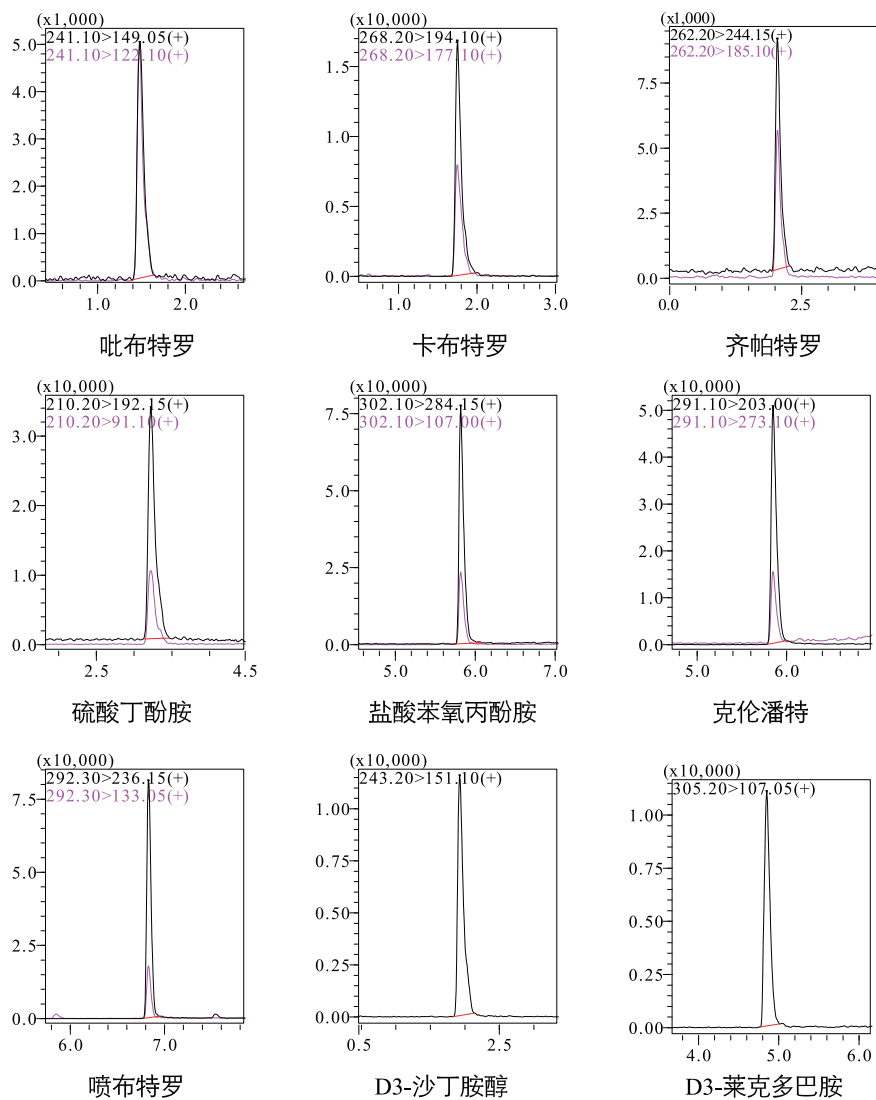


图1 0.2 $\mu\text{g/L}$ β -受体激动剂类兽药的MRM色谱图(内标0.2 $\mu\text{g/L}$)

2.2 线性范围

将浓度为 0.05 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.2 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 和 5.0 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，内标法定量。其中吡布特罗、卡布特罗和齐帕特罗以 D3-沙丁胺醇为内标，硫酸丁酚胺、盐酸苯氧丙酚胺、克伦潘特和喷布特罗以 D3-莱克多巴胺为内标，以待测物与内标物的浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线如下图所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

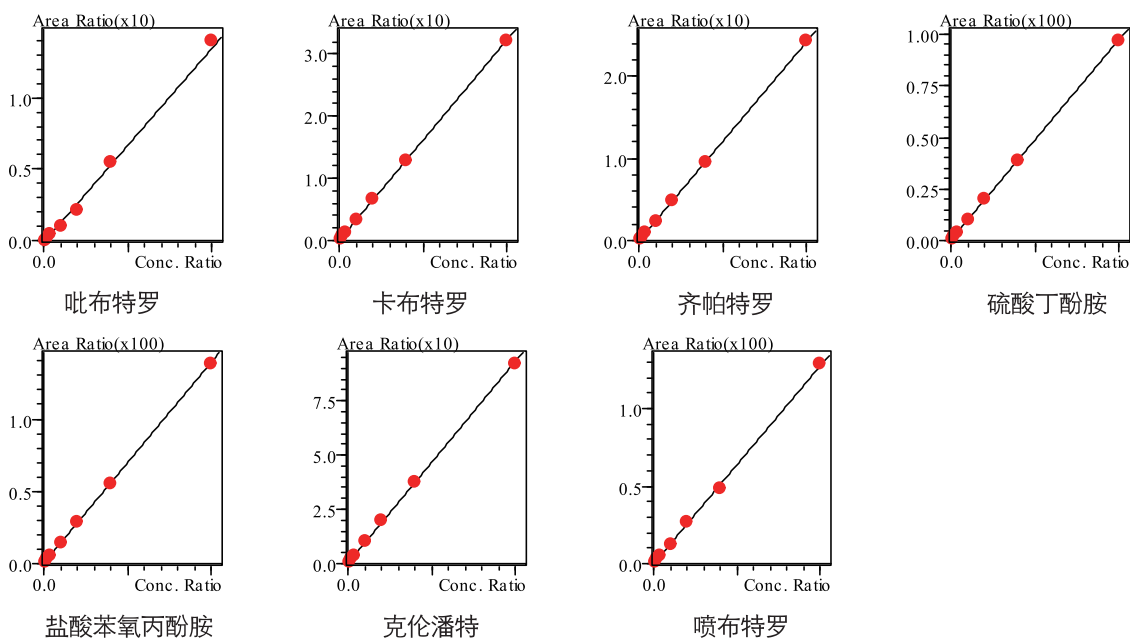


图2 β-受体激动剂标准曲线

表3 校准曲线参数

序号	名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	相关系数 r	准确度(%)
1	吡布特罗	$Y = (2.72295)X + (-0.131835)$	0.05~5	0.9962	81.0~118.4
2	卡布特罗	$Y = (6.46774)X + (0.0263411)$	0.05~5	0.9999	92.3~106.3
3	齐帕特罗	$Y = (4.85847)X + (-0.0371569)$	0.05~5	0.9999	80.4~106.7
4	硫酸丁酚胺	$Y = (19.5032)X + (0.207809)$	0.05~5	0.9998	95.0~106.3
5	盐酸苯氧丙酚胺	$Y = (27.8695)X + (0.291610)$	0.05~5	0.9998	94.9~107.7
6	克伦潘特	$Y = (18.6428)X + (0.191737)$	0.05~5	0.9997	91.5~107.6
7	喷布特罗	$Y = (25.5556)X + (0.0156607)$	0.05~5	0.9995	90.4~107.4

2.3 精密度实验

配制 0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 5.0 mg/L β-受体激动剂类兽药的标准溶液，平行测试 6 次。8 种目标化合物的保留时间和峰面积比的相对标准偏差分别在 0.01~0.60% 和 1.17~6.65% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积比重复性结果(n=6)

序号	化合物名称	RSD% (0.1 μg/L)		RSD% (1.0 μg/L)		RSD% (5.0 μg/L)	
		R.T	Area Ratio	R.T	Area Ratio	R.T	Area Ratio
1	吡布特罗	0.46	6.65	0.43	2.75	0.36	2.68
2	卡布特罗	0.38	5.06	0.40	2.78	0.34	3.88
3	齐帕特罗	0.60	4.34	0.43	2.77	0.35	2.94
4	硫酸丁酚胺	0.26	3.65	0.27	3.52	0.20	2.87
5	盐酸苯氧丙酚胺	0.04	2.61	0.04	2.05	0.11	3.18
6	克伦潘特	0.04	2.01	0.05	3.11	0.11	2.69
7	喷布特罗	0.01	1.60	0.09	2.14	0.05	1.17

2.4 灵敏度实验

配制 0.05 mg/L β -受体激动剂的标准溶液进样，根据 S/N=3 和 10 计算检测限和定量限，结果如下表 5 所示。

表5 0.05 mg/L β -受体激动剂灵敏度实验结果

序号	样品名称	S/N	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量限($\mu\text{g/L}$)
1	吡布特罗	10.68	0.012	0.036
2	卡布特罗	31.56	0.005	0.015
3	齐帕特罗	12.74	0.014	0.041
4	硫酸丁酰胺	23.49	0.007	0.022
5	盐酸苯氧丙酰胺	17.10	0.009	0.028
6	克伦潘特	42.43	0.004	0.012
7	喷布特罗	46.39	0.003	0.009

2.5 β -受体激动剂回收率结果

将市场买的猪肉样品按 1.4 方法进行回收率测定，加标浓度为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ ，0.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 5 $\mu\text{g/kg}$ ，平行测定 3 次，回收率结果见表 6。

表6 加标回收率实验结果

序号	样品名称	加标回收率		
		0.1 $\mu\text{g/kg}$	0.5 $\mu\text{g/kg}$	5 $\mu\text{g/kg}$
1	吡布特罗	79.6	97.0	108.3
2	卡布特罗	74.4	85.2	80.2
3	齐帕特罗	104.1	87.1	90.0
4	硫酸丁酰胺	96.8	108.3	87.9
5	盐酸苯氧丙酰胺	98.7	112.5	103.4
6	克伦潘特	115.4	110.3	112.0
7	喷布特罗	125.4	120.3	118.9

2.6 实际样品检测结果

用本方法对市场中购买的猪肉样品进行检测，检出有卡布特罗残留，含量为 0.035 $\mu\text{g/kg}$ 但低于国标 GB/T 22286-2008 检出限 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 要求，可视为未检出。

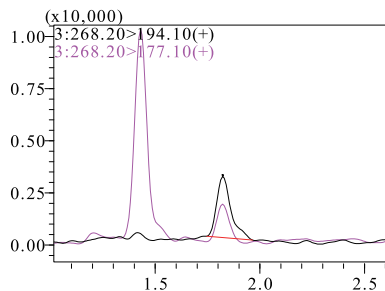


图3 实际样品分析结果

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定猪肉中 8 种 β -受体激动剂的方法。该方法线性关系良好, 在 0.05~5 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 校准曲线的相关系数均在 0.996 以上。对 0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 5.0 mg/L β -受体激动剂的标准溶液, 平行测试 6 次, 7 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.01 ~ 0.60% 和 1.17~ 6.65% 之间, 仪器精密度良好。对加标浓度为 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 5 $\mu\text{g/kg}$ 的样品, 回收率在 74.4~125.4% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势, 可用于肉类基质中多种 β -受体激动剂的检测。