

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定猪肉中 25 种 β -受体激动剂

LCMSMS-187

摘要: 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 25 种 β -受体激动剂的方法。该方法在 9 min 内完成 25 种 β -受体激动剂的分析, 线性范围 0.01~10 $\mu\text{g/L}$, 校准曲线的相关系数均在 0.994 以上。对 0.02、0.05、0.5 mg/L β -受体激动剂类兽药的标准溶液, 平行测试 6 次, 25 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 0.01~0.21% 和 0.66~4.98% 之间, 仪器精密度高。灵敏度考察结果表明, 25 种 β -受体激动剂的定量限在 0.005~0.01 $\mu\text{g/L}$ 的范围内。对实际样品进行分析, 检出 4 种药物。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 -受体激动剂又称为苯乙胺类药物, 能够增强心脏收缩、扩张骨骼肌血管和支气管平滑肌, 兽医和临床上用于治疗休克和支气管痉挛。5~10 倍以上治疗量达到同化剂量, 对牛、羊、猪、家禽等多种动物具有提高饲料转化率和增加瘦肉率的作用。人 1 次摄入 100~200 g 组织所含的残留量即达到治疗剂量, 会对消费者的心血管和神经系统产生影响。表现为肌肉震颤、剧烈腹痛、心跳和呼吸加快, 最终死亡。

中国农业部于 2002 年 4 月制定的第 193 号公告中, 明确规定了禁止 β -受体激动剂的克伦特罗、沙丁胺醇、西马特罗及其盐、酯及制剂在食源性动物的所有用途的

使用。随着国家对盐酸克伦特罗、莱克多巴胺等的严厉查处, 在饲养过程中使用此类 β -受体激动剂的行为得到遏制, 但是一些不法饲养主采用结构类似物作为替代, 出现了多种类型的 β -受体激动剂残留。

动物源性食品中残留 β -受体激动剂的测定方法有气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱、液相色谱-质谱联用法、放射免疫测定、酶联免疫法。其中液相色谱-串联质谱法由于其检出限低、灵敏度高、可以准确定性等优点, 成为检测此类物质的首选。本文利用岛津液质系统 LCMS-8050 开展了猪肉中 25 种常见 β -受体激动剂残留的 UHPLC-MS/MS 检测方法。

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. 5.65 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D.
 \times 75 mm L., 1.6 μm

流动相: A 相 -2mM 醋酸铵水溶液;
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
5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.10	Pumps	Pump B Conc.	5
9.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 0.5 kV

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

源温度: 350°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 15 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

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	特布他林	Terbutaline	23031-25-6	226.10	152.00*	-15.0	-15.0	-16.0
					124.95	-15.0	-23.0	-23.0
2	西马特罗	Cimaterol	54239-37-1	220.05	202.05*	-15.0	-10.0	-21.0
					160.00	-15.0	-16.0	-17.0
3	沙丁胺醇	Salbutamol	18559-94-9	240.10	148.00*	-16.0	-18.0	-29.0
					222.05	-16.0	-10.0	-24.0
4	吡布特罗	Pirbuterol	38677-81-5	241.10	149.00*	-17.0	-19.0	-30.0
					167.00	-17.0	-15.0	-30.0
5	齐帕特洛	Zilpaterol	117827-79-9	262.00	244.00*	-18.0	-13.0	-17.0
					185.05	-18.0	-23.0	-20.0
6	西布特罗	Cimbuterol	54239-39-3	234.10	160.00*	-16.0	-14.0	-17.0
					143.00	-16.0	-24.0	-15.0
7	非诺特罗	Fenoterol	13392-18-2	304.10	135.05*	-21.0	-17.0	-14.0
					106.95	-20.0	-30.0	-11.0
8	克伦塞罗	Clencyclo- -hexerol	157877-79-7	319.05	301.00*	-22.0	-13.0	-21.0
					202.95	-21.0	-19.0	-21.0
9	莱克多巴胺	Ractopamine	97825-25-7	302.10	284.15*	-20.0	-12.0	-20.0
					163.95	-20.0	-16.0	-17.0
10	羟甲基克 伦特罗	Hydroxymethyl- -clenbuterol	38339-18-3	293.10	202.95*	-19.0	-17.0	-21.0
					275.05	-20.0	-12.0	-30.0
11	克伦普罗	Clenproperol	38339-11-6	263.00	245.00*	-18.0	-12.0	-27.0
					132.00	-18.0	-25.0	-13.0
12	氯丙那林	Clorprenaline	3811-25-4	214.00	196.10*	-15.0	-12.0	-21.0
					153.90	-15.0	-18.0	-30.0

13	克伦特罗	Clenbuterol	37148-27-9	277.00	202.95*	-19.0	-16.0	-14.0
					259.00	-19.0	-11.0	-18.0
14	溴代克伦特罗	Bromo-chlorobuterol	78982-84-0	322.95	248.95*	-22.0	-18.0	-12.0
					168.00	-22.0	-29.0	-30.0
15	妥布特罗	Tulobuterol	41570-61-0	228.05	153.95*	-16.0	-16.0	-16.0
					118.00	-16.0	-29.0	-23.0
16	溴布特罗	Brombuterol	41937-02-4	366.95	292.80*	-13.0	-18.0	-20.0
					348.85	-13.0	-12.0	-25.0
17	班布特罗	Bambuterol	81732-65-2	368.15	294.05*	-13.0	-19.0	-20.0
					72.05	-13.0	-34.0	-28.0
18	马布特罗	Mebuterol	56341-08-3	311.05	237.00*	-11.0	-17.0	-25.0
					216.90	-11.0	-25.0	-23.0
19	丙卡特罗	Procaterol	81262-93-3	291.10	273.05*	-19.0	-12.0	-30.0
					202.95	-20.0	-15.0	-14.0
20	克伦异磅特罗	Clenisopenterol	1435935-00-4	291.10	188.00*	-20.0	-22.0	-20.0
					217.10	-20.0	-17.0	-23.0
21	克伦潘特	Clenpenterol	37158-47-7	327.10	238.95*	-22.0	-16.0	-25.0
					218.90	-22.0	-25.0	-23.0
22	马喷特罗	Mapenterol	1325559-18-9	325.05	237.00*	-23.0	-18.0	-26.0
					217.00	-22.0	-26.0	-15.0
23	福马特罗	Formoterol	73573-87-2	345.15	120.95*	-23.0	-31.0	-12.0
					327.05	-12.0	-13.0	-23.0
24	Clenhexerol	/	38339-23-0	305.10	286.95*	-11.0	-13.0	-20.0
					187.85	-20.0	-23.0	-20.0
25	喷布特罗	Penbutolol	36507-48-9	292.15	236.05*	-20.0	-17.0	-16.0
					132.95	-20.0	-25.0	-24.0

注：*表示定量离子

1.3 标准品溶液的配制

标准物质：共 25 种 β -受体激动剂。

标准工作溶液配制：用 0.1% 甲酸水溶液配制 1.0 mg/L 的混合标准中间溶液，依次稀释成 0.01 $\mu\text{g/L}$ 、0.02 $\mu\text{g/L}$ 、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 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 不同浓度的混合标准工作液。

1.4 样品前处理方法

参照《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) 中的样品提取和净化方法。

■ 分析结果

2.1 25种β-受体激动剂标准溶液的MRM色谱图(0.2 μg/L)

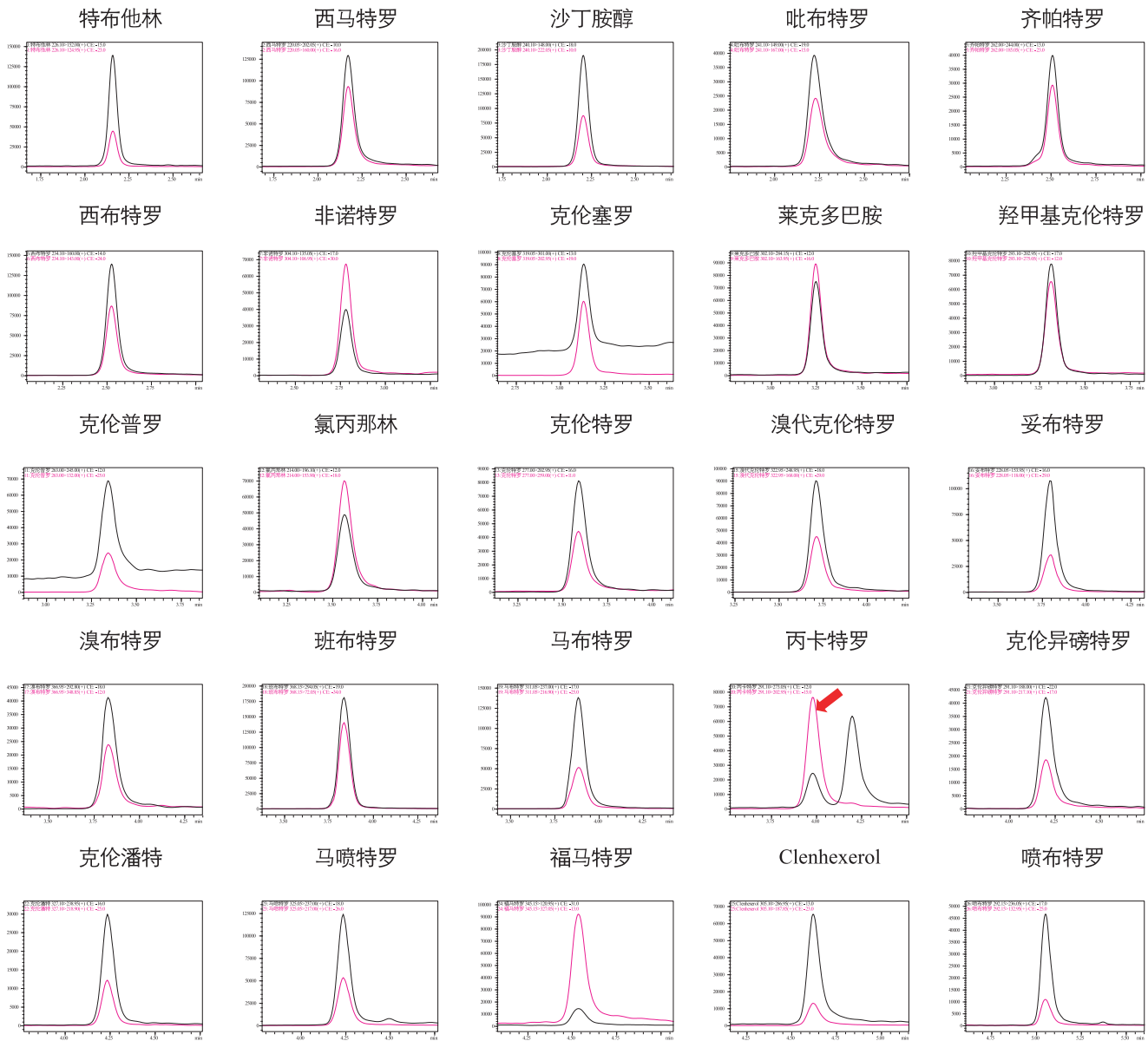


图1 0.2 μg/L 25种β-受体激动剂类兽药MRM色谱图

2.2 线性范围

将 0.01 μg/L、0.02μg/L、0.05μg/L、0.1 μg/L、0.2 μg/L、0.5 μg/L、1.0 μg/L、2.0 μg/L、5.0 μg/L 和 10 μg/L 不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，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。

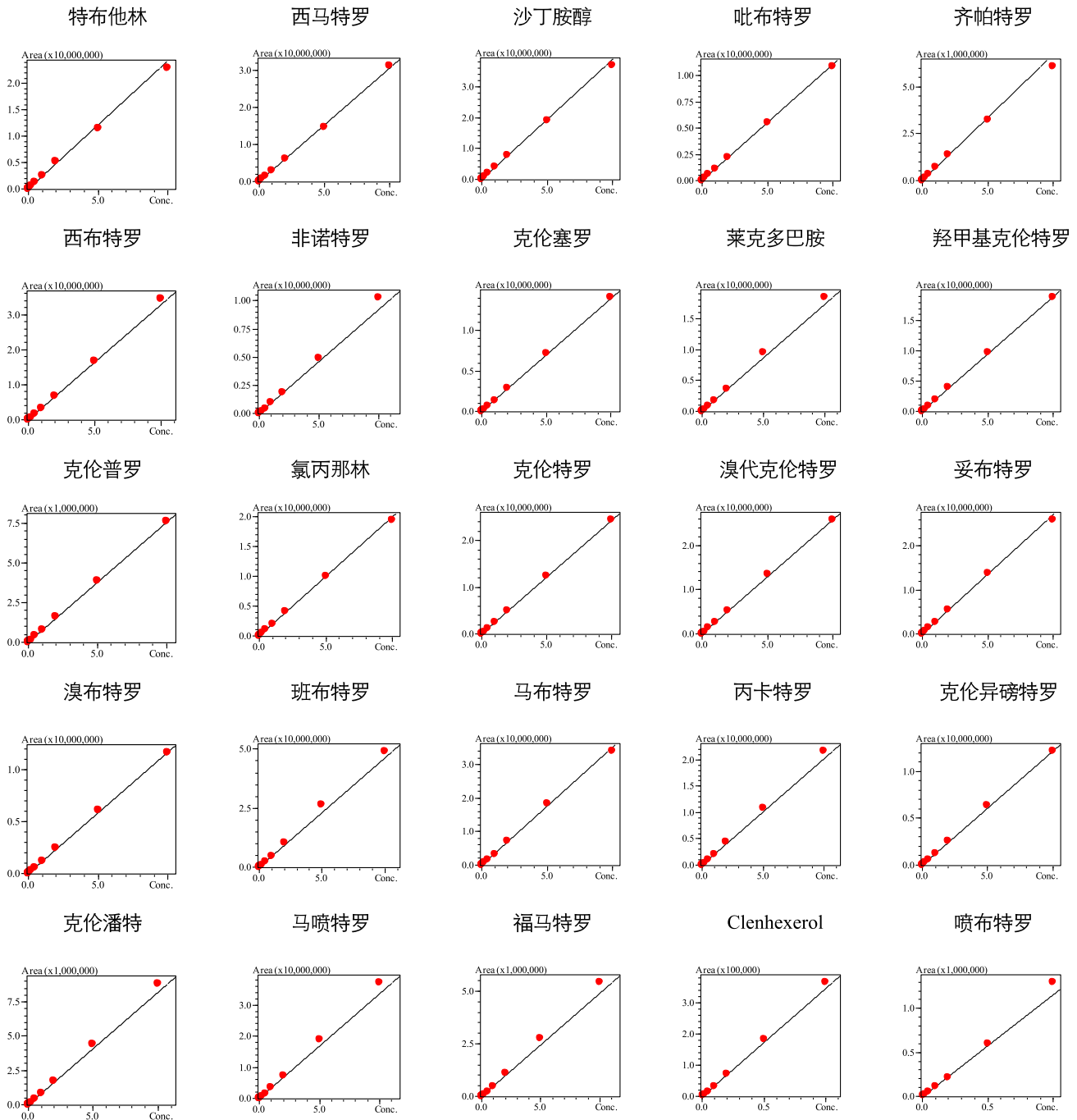


图2 25种 β -受体激动剂类兽药的标准曲线

表3 校准曲线参数

序号	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 r
1	特布他林	$Y = (2.43202e+006)X + (851.456)$	0.01~10	0.9991
2	西马特罗	$Y = (3.06926e+006)X + (1732.05)$	0.01~10	0.9994
3	沙丁胺醇	$Y = (3.88668e+006)X + (2214.62)$	0.01~10	0.9997
4	吡布特罗	$Y = (1.11186e+006)X + (-1736.15)$	0.01~10	0.9998
5	齐帕特罗	$Y = (673853)X + (-531.209)$	0.01~10	0.9988
6	西布特罗	$Y = (3.28497e+006)X + (146.167)$	0.01~10	0.9993
7	非诺特罗	$Y = (920540)X + (-576.202)$	0.01~10	0.9978
8	克伦塞罗	$Y = (1.39300e+006)X + (-2111.19)$	0.01~10	0.9994
9	莱克多巴胺	$Y = (1.73547e+006)X + (152.733)$	0.01~10	0.9977
10	羟甲基克伦特罗	$Y = (1.89744e+006)X + (1085.80)$	0.01~10	0.9995
11	克伦普罗	$Y = (755193)X + (-1752.91)$	0.01~10	0.9986
12	氯丙那林	$Y = (2.00249e+006)X + (-1526.54)$	0.01~10	0.9998
13	克伦特罗	$Y = (2.43111e+006)X + (-2841.96)$	0.01~10	0.9995
14	溴代克伦特罗	$Y = (2.57869e+006)X + (-899.389)$	0.01~10	0.9987
15	妥布特罗	$Y = (2.72037e+006)X + (-2940.75)$	0.01~10	0.9997
16	溴布特罗	$Y = (1.17026e+006)X + (-1591.31)$	0.01~10	0.9992
17	班布特罗	$Y = (4.62708e+006)X + (-14344.7)$	0.01~10	0.9944
18	马布特罗	$Y = (3.52128e+006)X + (-4759.60)$	0.01~10	0.9990
19	丙卡特罗	$Y = (2.02365e+006)X + (1503.90)$	0.01~10	0.9970
20	克伦异磅特罗	$Y = (1.21589e+006)X + (-3008.26)$	0.01~10	0.9992
21	克伦潘罗	$Y = (820809)X + (-3085.73)$	0.01~10	0.9966
22	马喷特罗	$Y = (3.36592e+006)X + (-9920.86)$	0.01~10	0.9953
23	福马特罗	$Y = (480432)X + (-106.262)$	0.01~10	0.9909
24	Clenhexerol	$Y = (348408)X + (-938.686)$	0.01~1.0	0.9973
25	喷布特罗	$Y = (1.16189e+006)X + (-5895.34)$	0.01~1.0	0.9955

2.3 精密度实验

配制 0.02、0.05、0.5 mg/L β -受体激动剂类兽药的标准溶液，平行测试 6 次。25 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 ~ 0.21% 和 0.66 ~ 4.98% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

序号	化合物名称	RSD% (0.02 µg/L)		RSD% (0.05 µg/L)		RSD% (0.5 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	特布他林	0.07	2.73	0.07	1.55	0.05	1.07
2	西马特罗	0.08	4.25	0.08	2.33	0.04	1.00
3	沙丁胺醇	0.07	4.25	0.08	2.32	0.03	1.36
4	吡布特罗	0.08	4.67	0.05	2.47	0.04	1.82
5	齐帕特罗	0.07	4.58	0.04	4.32	0.04	2.18
6	西布特罗	0.07	2.74	0.05	3.31	0.05	2.13
7	非诺特罗	0.05	4.50	0.04	3.58	0.03	1.95
8	克伦塞罗	0.16	4.30	0.02	1.28	0.01	0.90
9	莱克多巴胺	0.18	4.76	0.02	3.55	0.01	2.95
10	羟甲基克伦特罗	0.21	4.86	0.04	2.21	0.02	1.20
11	克伦普罗	0.14	4.66	0.05	4.39	0.02	2.93
12	氯丙那林	0.12	4.89	0.03	4.19	0.03	1.25
13	克伦特罗	0.10	2.47	0.04	2.38	0.03	1.06
14	溴代克伦特罗	0.11	1.98	0.04	1.88	0.01	1.25
15	妥布特罗	0.06	4.73	0.02	3.84	0.02	2.88
16	溴布特罗	0.14	4.64	0.12	3.98	0.04	3.21
17	班布特罗	0.09	2.18	0.04	1.76	0.03	1.70
18	马布特罗	0.08	4.77	0.02	4.14	0.02	1.80
19	丙卡特罗	0.08	4.56	0.04	1.20	0.03	0.66
20	克伦异磅特罗	0.04	4.58	0.05	2.57	0.03	2.19
21	克伦潘罗	0.08	4.95	0.04	3.94	0.02	2.11
22	马喷特罗	0.04	4.67	0.03	3.40	0.02	2.54
23	福马特罗	0.17	4.98	0.08	3.95	0.05	3.74
24	Clenhexerol	0.06	3.80	0.04	3.02	0.01	2.62
25	喷布特罗	0.09	4.46	0.06	4.19	0.02	1.92

2.4 灵敏度实验

配制 0.01 mg/L β -受体激动剂类兽药的标准溶液, 平行测试 7 次, 结果如表 5 所示。由 7 次进样测定的标准偏差(S) 计算出检测限和最低定量浓度, 此时检出限 $MDL=3.14 \times S$, 定量下限 $LOQ=4 \times MDL$ 。

表5 0.01 $\mu\text{g/L}$ β -受体激动剂类兽药灵敏度实验结果(n=7)

序号	样品名称	S/N	标准偏差 (S)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1	特布他林	53.95	0.00039	0.00122	0.00490
2	西马特罗	61.30	0.00071	0.00224	0.00896
3	沙丁胺醇	217.22	0.00049	0.00154	0.00618
4	吡布特罗	35.42	0.00076	0.00237	0.00950
5	齐帕特罗	75.02	0.00080	0.00252	0.01000
6	西布特罗	96.19	0.00050	0.00157	0.00628
7	非诺特罗	57.19	0.00056	0.00174	0.00698
8	克伦塞罗	83.78	0.00070	0.00220	0.00882
9	莱克多巴胺	37.88	0.00074	0.00232	0.00928
10	羟甲基克伦特罗	88.43	0.00058	0.00182	0.00727
11	克伦普罗	33.96	0.00082	0.00258	0.01030
12	氯丙那林	29.86	0.00061	0.00192	0.00766
13	克伦特罗	53.40	0.00080	0.00252	0.01000
14	溴代克伦特罗	69.16	0.00082	0.00257	0.01020
15	妥布特罗	81.18	0.00069	0.00218	0.00870
16	溴布特罗	65.15	0.00069	0.00217	0.00869
17	班布特罗	208.43	0.00067	0.00210	0.00841
18	马布特罗	62.33	0.00061	0.00190	0.00761
19	丙卡特罗	41.24	0.00079	0.00247	0.00988
20	克伦异磅特罗	32.81	0.00082	0.00256	0.01020
21	克伦潘特	11.44	0.00072	0.00227	0.00907
22	马喷特罗	56.45	0.00067	0.00219	0.00874
23	福马特罗	13.41	0.00068	0.00214	0.00856
24	Clenhexerol	25.50	0.00081	0.00255	0.01020
25	喷布特罗	56.94	0.00077	0.00242	0.00968

2.5 β -受体激动剂类兽药样品测试结果

将实际猪肉样品上机分析，实际样品见图 3，测试结果见表 6。

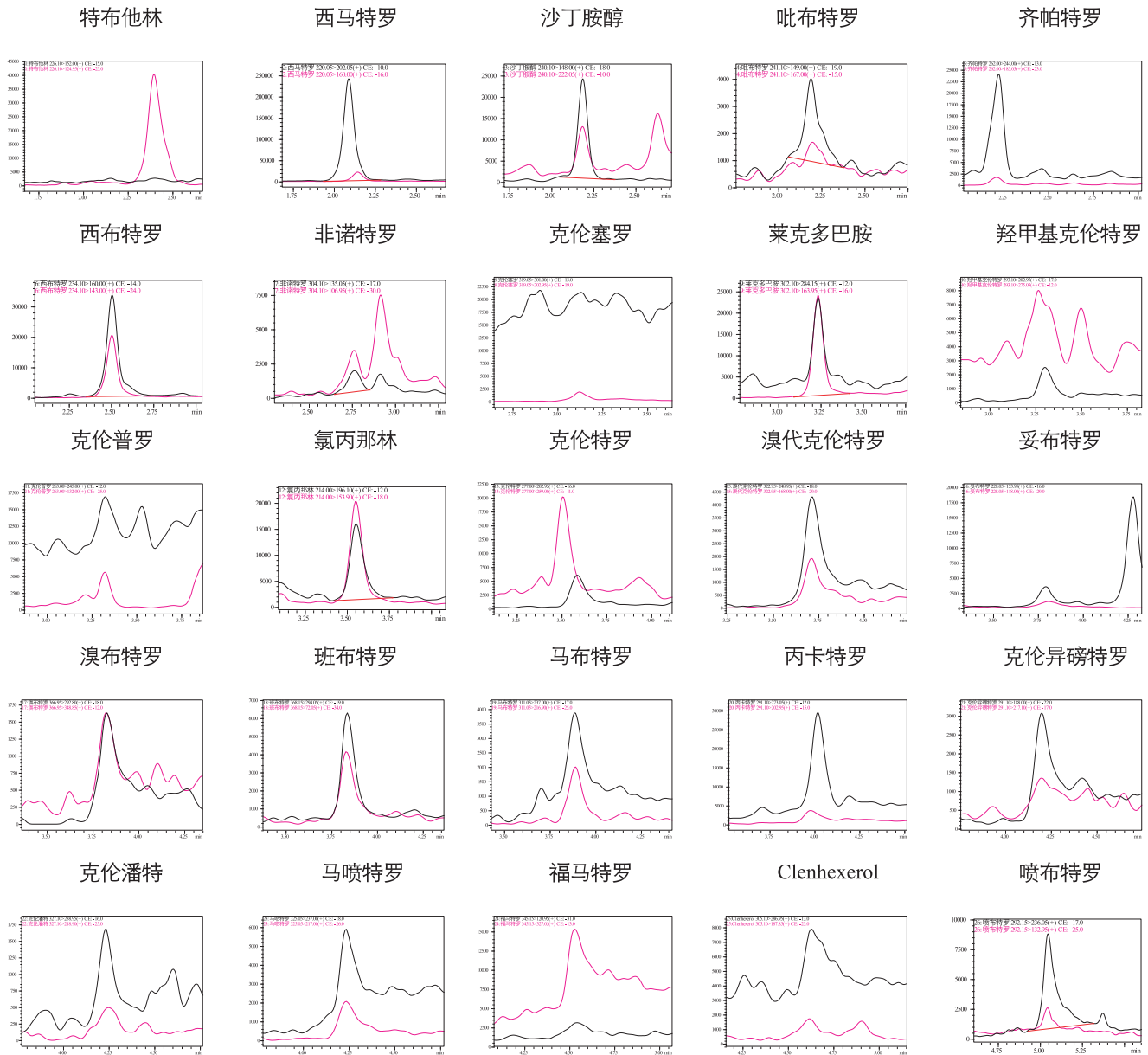


图4 实际样品中25种 β -受体激动剂类兽药的典型色谱图

表6 猪肉样品的分析结果(n=6)

序号	化合物名称	样品名称	浓度 (µg/L)	定量与定性离子对	测定浓度
				丰度比 (设定值)	(µg/L)
1	特布他林		/	/	/
2	西马特罗		0.386	2% (64%)	/
3	沙丁胺醇		0.023	49% (47%)	0.023
4	吡布特罗		0.012	13% (67%)	/
5	齐帕特罗		/	/	/
6	西布特罗		0.049	64% (58%)	0.049
7	非诺特罗		0.020	15% (56%)	/
8	克伦塞罗		/	/	/
9	莱克多巴胺		0.030	102% (115%)	0.030
10	羟甲基克伦特罗	空白 基质	/	/	/
11	克伦普罗		/	/	/
12	氯丙那林		0.051	69% (72%)	0.051
13	克伦特罗		/	/	/
14	溴代克伦特罗		/	/	/
15	妥布特罗		/	/	/
16	溴布特罗		/	/	/
17	班布特罗		/	/	/
18	马布特罗		/	/	/
19	丙卡特罗		/	/	/
20	克伦异磅特罗		/	/	/
21	克伦潘特		/	/	/
22	马喷特罗		/	/	/
23	福马特罗		/	/	/
24	Clenhexerol		/	/	/
25	喷布特罗		0.024	31% (21%)	/

注：黄色表示定性定量离子对丰度比超出允许偏差范围，因此测定浓度为未检出。

■ 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 25 种 β -受体激动剂的方法。该方法在 9 min 内完成 25 种 β -受体激动剂的分析，线性范围 0.01~10 $\mu\text{g/L}$ ，校准曲线的相关系数均在 0.994 以上。对 0.02、0.05、0.5 mg/L β -受体激动剂类兽药的标准溶液，平行测试 6 次，25 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 ~ 0.21% 和 0.66~4.98% 之间，仪器精密度良好。对实际样品进行分析，检出 4 种药物，分别为沙丁胺醇 0.023 mg/L、西布特罗 0.049 mg/L、莱克多巴胺 0.030 mg/L、氯丙那林 0.051 mg/L。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。