

UPLC-MS/MS检测运动食品中 β -受体激动剂残留

周帅,张飞云

(西安交通大学城市学院,陕西 西安 710018)

摘要: 建立一种超高效液相色谱-串联质谱法检测运动食品中西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗 10 种 β -受体激动剂残留的分析方法。样品前处理用乙腈沉淀蛋白后,采用 MCX 小柱进行净化和富集。采用 Waters Atalantis T3 色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 3 μ m)分离,以 0.1% 甲酸-乙腈为流动相的梯度洗脱模式下, β -受体激动剂在 1.0 ng/mL~20.0 ng/mL 浓度范围内线性良好,相关系数 r^2 为 0.993~0.999,检出限为 0.5 μ g/kg,定量限为 1.5 μ g/kg,加标回收率达到 78.2%~91.8%。该方法具有前处理简单、净化效果好、灵敏度高和检测速度快的优点,适用于运动食品中西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗等 10 种 β -受体激动剂残留的分离和定量检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱;运动食品; β -受体激动剂

Analysis β -Agonist Drugs Residues in Sports Food by UPLC-MS/MS

ZHOU Shuai, ZHANG Fei-yun

(Xi'an Jiaotong University City College, Xi'an 710018, Shaanxi, China)

Abstract: A ultra high performance liquid chromatography mass spectrometry analysis method was established for the residues determination of cimaterol, terbutaline, salbutamol, fenoterol, rackdopamine, clorprenaline, clenbuterol, tulobuterol, phenylethanolamine A and penbutolol in sports food. After treated with acetonitrile, the sample concentrated and purified by MCX solid phase extraction column. The separation of targeted compound was performed on a Waters Atalantis T3 chromatographic column (2.1 mm \times 150 mm, 3 μ m) using 0.1% formic acid-acetonitrile as mobile phase under gradient elution mode. The linear range of β -agonist drugs components was in the range of 1.0 ng/mL~20.0 ng/mL with a correlation coefficient of 0.993~0.999. The detection limit was 0.5 μ g/kg and the quantitative limit was 1.5 μ g/kg. The recovery rate was 78.2%~91.8%. The method has the advantages of simple pretreatment, good purifying effect, high sensitivity and fast detection rate, and is suitable for the separation and quantitative detection of cimaterol, terbutaline, salbutamol, fenoterol, rackdopamine, clorprenaline, clenbuterol, tulobuterol, phenylethanolamine A and penbutolol in sports food.

Key words: ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); sports food; β -agonist drugs

β -受体激动剂是一类化学合成的苯乙醇胺类物质,国内养殖户一般将其添加到动物饲料中去,这样能够提高饲养动物的胴体瘦肉率,从而卖出好价钱。但是若人体食用含有过量 β -受体激动剂药物的动物源性食品后,将会引发恶心、呕吐、激动、失眠、食欲减

退等一系列不良反应^[1-2],所以农业部 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》规定在所有动物源性食品中不得检出此类药物^[3]。但一些不法商贩为获取经济利益,仍然非法使用该类药物,这对购买的消费者是一种潜在的危害。所以以动物源性为材料的运动食品也有可能存在 β -受体激动剂药物残留的可能,且对此类运动食品中多种 β -受体激动剂药物的残留研

究报道不多,故本试验对此类动物源性运动食品进行检测研究。

目前常见的 β -受体激动剂药物有西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗等。检测方法也有很多,主要有酶联免疫测定法、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱-质谱联用法 (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱-串联质谱联用法 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 等^[4-9]。已有的方法常有灵敏度不高,前处理烦琐、检测药物单一或重现性不好等问题,很难满足对药物残留的同时确证检测。本试验所用的方法结合了超高效液相色谱的高分离能力和质谱提供结构信息的功能,具有灵敏度高、选择性强的优势。特别是在前处理阶段采用固相萃取技术,对于复杂样品的分析检测,不仅可以避免基质干扰等问题,而且可以起到一个富集目标物的作用,分析鉴定以往难于辨识的痕量成分。本方法针对 10 种 β -受体激动剂类药物残留建立了一种快速简便、专属性强、灵敏度高的超高效液相色谱-串联质谱方法,在实验室的推广可行性较高,可为动物源性运动食品中 10 种 β -受体激动剂类药物残留的监督检验和残留监控提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪:美国安捷伦公司 Agilent 1290,四极杆串联质谱仪:美国 AB 公司 API4000;

西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗 10 种标准品:德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司;甲醇、乙腈为色谱纯:美国 Fisher Scientific 公司。

1.2 超液相色谱条件

色谱柱:Waters Atalantis T3(2.1 mm \times 150 mm,3 μ m);流速:0.3 mL/min;进样量:10 μ L;柱温:30 $^{\circ}$ C;流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为乙腈;流动相梯度洗脱程序:0~2.0 min 80%A;2.0~5.5 min 80%A \rightarrow 30%A;5.5~8.0 min 30%A \rightarrow 80%A;8.0 min 80%A。

1.3 方法

1.3.1 质谱条件的优化

采用针泵连续进样的方式,在正离子模式(ESI⁺)下,先对各个目标物进行母离子全扫描,然后对其子离子进行全扫描,分别选定定性离子和定量离子,并对喷雾电压、离子源温度、碰撞气、扫描停滞时间、去簇

电压及碰撞电压等参数进行优化。

1.3.2 标准曲线的制作

称取相应质量的西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗标准品,配制成浓度为 1.0、2.0、4.0、10.0、20.0 ng/mL 的标准溶液,进行质谱仪分析,绘制标准曲线。

1.3.3 样品前处理条件的优化

动物源性运动食品中含有丰富的蛋白质和脂肪类物质,食品基质复杂,对前处理要求高,本试验以目标物的加标回收率为比较依据,对几种常用的提取溶剂以及固相萃取小柱,进行比较,选择较优的前处理条件。

1.3.4 加标回收试验及样品测定

以市售未检测出 β -受体激动剂药物的运动食品为空白基质,加入标准混合溶液,选择优化后的前处理条件和仪器条件,上机检测,计算回收率。

2 结果与amp;讨论

2.1 质谱条件的优化

采用针泵连续进样的方式,在正离子模式(ESI⁺)下,分别对浓度为 10 ng/mL 的西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗的标准溶液进行母离子全扫描,确定其分子离子,优化各母离子的锥孔电压。再在上述母离子的基础上,对其子离子进行全扫描,选择两组丰度最高的离子,较高的作为定量离子,次之的为定性离子,并对喷雾电压、离子源温度、碰撞气、扫描停滞时间、去簇电压及碰撞电压等参数进行优化。

优化后的质谱参数为:喷雾电压 5 500 V、离子源温度 500 $^{\circ}$ C、氮气流量 30 L/min、扫描停滞时间 100 ms,其他质谱参数见表 1。

表 1 10 种 β -受体激动剂的多反应监测扫描模式的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters for 10 β -agonist drugs

目标化合物	母离子	子离子	去簇电压/V	碰撞电压/V
西马特罗	220.0	159.9*	55	21
		202.0		23
特步他林	226.0	124.9*	54	24
		15.19		24
沙丁胺醇	240.1	222.0*	60	24
		147.9		19
菲诺特罗	304.0	104.9*	54	18
		134.9		18

续表 1 10 种 β -受体激动剂的多反应监测扫描模式的质谱参数
Continue table 1 Mass spectrometric parameters for 10 β -agonist drugs

目标化合物	母离子	子离子	去簇电压/V	碰撞电压/V
莱克多巴胺	302.1	106.9*	54	23
		164.0		31
氯丙那林	214.0	153.9 *	56	18
		196.0		17
克伦特罗	277.0	202.9 *	48	23
		259.0		26
妥布特罗	228.0	153.9*	54	16
		171.9		12
苯乙醇胺 A	345.2	150.0 *	58	25
		327.2		15
喷布特罗	292.1	201.0*	54	25
		236.1		31

注: * 为定量离子。

依照表 1 所设定质谱和超高效液相色谱的条件,选择多反应监测模式 (multiple reaction monitoring mode, MRM) 进行检测, 10 种 β -受体激动剂能在 10 min 内快速分离, 结果如图 1 所示。

2.2 标准曲线的制作

为了验证西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗在优化好的仪器条件中的线性关系, 配制了浓度为 1.0、2.0、4.0、10.0、20.0 ng/mL 的系列混合标准溶液上机进行检测。试验结果表明, 10 种 β -受体激动剂在 1.0 ng/mL~20.0 ng/mL 内均具有良好的线性关系 ($r^2 > 0.99$), 并得到 10 种目标组分的 LOD 均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ 均为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 结果见表 2。

2.3 提取溶剂的选择

在对西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、

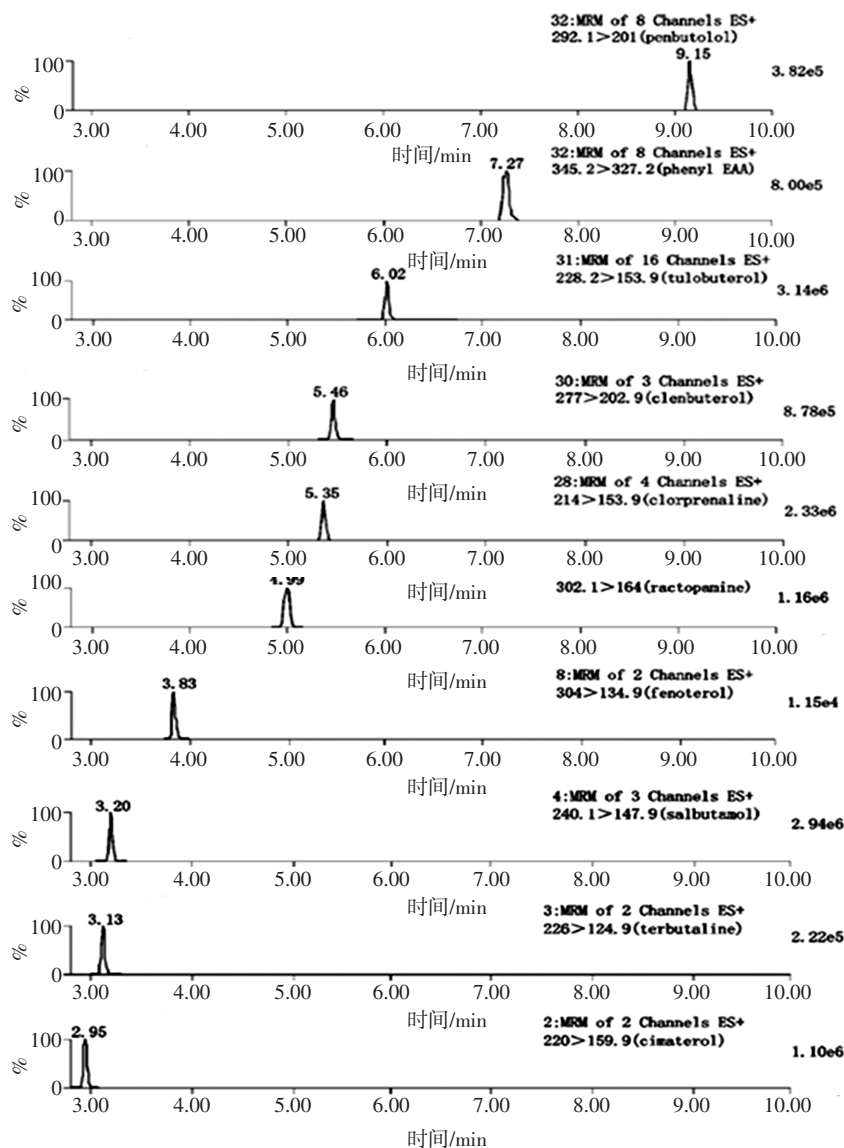


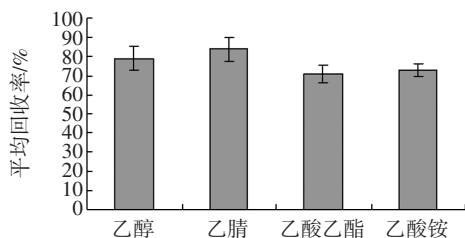
图 1 10 种 β -受体激动剂的 MRM 图

Fig.1 MRM chromatogram of 10 β -agonist drugs

表2 10种 β -受体激动剂的保留时间、标准曲线、相关系数、检出限与定量限Table 2 Retention time, standard curve, correlation coefficient, detection limit and quantitative limit of 10 β -agonist drugs

目标化合物	保留时间/min	线性回归方程	r^2	检出限/(ng/mL)	定量限/(ng/mL)
西马特罗	2.95	$Y=0.486X-0.221$	0.994	0.5	1.5
特步他林	3.13	$Y=0.668X-0.125$	0.996	0.5	1.5
沙丁胺醇	3.20	$Y=1.542X+0.170$	0.999	0.5	1.5
菲诺特罗	3.83	$Y=0.014X+0.007$	0.993	0.5	1.5
莱克多巴胺	4.99	$Y=1.014X+0.0126$	0.999	0.5	1.5
氯丙那林	5.35	$Y=1.658X-0.421$	0.997	0.5	1.5
克伦特罗	5.46	$Y=0.625X-0.064$	0.999	0.5	1.5
妥布特罗	6.02	$Y=2.312X-0.592$	0.998	0.5	1.5
苯乙醇胺 A	7.27	$Y=24.364X+8.137$	0.997	0.5	1.5
喷布特罗	9.15	$Y=1.896X-1.267$	0.998	0.5	1.5

莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗等 10 种目标物提取的过程中,目标物易被运动食品中的蛋白质所吸附,所以在前处理过程中既要考虑蛋白质的去除也要避免目标物被蛋白质沉淀所吸附。本试验参考相关文献^[10-15],比较了 0.2 mol/L 乙酸铵溶液、乙酸乙酯、乙醇、乙腈等 4 种提取溶剂对 10 种目标物的提取效果,具体结果见图 2。

图2 提取液对 10 种 β -受体激动剂平均回收率的影响Fig.2 The effect of extract solution on the average recovery rate for 10 β -agonist drugs

结果如图 2 所示,4 种提取溶剂中,当乙酸铵溶液以及乙酸乙酯作为提取溶剂时,样品中的蛋白质沉淀不充分,提取液出现浑浊现象;当乙醇和乙腈为提取溶剂时,样品中的蛋白质沉淀效果明显,提取液易于分离,其中乙醇提取率不及乙腈,乙腈的提取效果最好,回收率最高,所以本试验选择乙腈作为提取溶剂。

2.4 固相萃取柱的选择

运动食品中的基质成分复杂,特别是以动物源性的运动食品中,即使是经乙腈提取后的提取液中也含有很多杂质干扰目标物在仪器上的响应。所以本试验采用固相萃取小柱对提取液进行进一步的净化和富集,并比较了常用的硅胶小柱、中性氧化铝小柱、MCX 小柱、HLB 小柱以及 C_{18} 小柱等 5 种固相萃取小柱对

10 种 β -受体激动剂的净化效果,结果以 10 种目标物的平均加标回收率作为比较依据。

结果发现,相比较其他几款小柱,MCX 小柱对样品提取液的净化效果最好,加标回收率最高。主要是因为酸性条件下,MCX 小柱能够吸附具有一定弱碱性的 β -受体激动剂,淋洗液淋洗杂质后,再用碱性有机溶剂进行洗脱,洗脱液较为干净,杂质少,能对提取液起到很好的净化效果。

2.5 加标回收与相对偏差

在上述优化后的前处理条件仪器条件下,利用空白基质的样品进行加标回收率试验,在分别添加 0.5、5.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 等 3 个浓度梯度的标准混合溶液,每个浓度平行测定 5 次,测定结果见表 3。

表3 方法的回收率及相对标准偏差(n=5)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations(RSD) of the method(n=5)

抗生素	0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
西马特罗	83.4	2.6	84.6	3.7	87.4	2.7
特步他林	81.7	3.0	88.4	2.1	91.8	3.9
沙丁胺醇	86.3	3.5	87.9	2.8	88.3	1.9
菲诺特罗	90.5	3.1	86.0	2.2	88.3	3.8
莱克多巴胺	89.4	2.8	86.8	3.0	82.1	3.4
氯丙那林	79.5	2.5	81.9	3.1	82.2	3.0
克伦特罗	80.5	2.6	84.6	2.9	86.9	3.1
妥布特罗	78.2	3.0	85.9	2.4	83.7	3.1
苯乙醇胺 A	80.3	2.6	84.7	3.5	78.5	2.7
喷布特罗	82.9	2.1	84.4	2.4	88.2	3.7

由表 3 可见,10 种 β -受体激动剂的加标回收率为 78.2%~91.8%,相对标准偏差(RSD)为 1.9%~3.9%,表明本试验所建立的方法具有可靠的准确度和精密度。

2.6 实际样品的测定

利用本试验优化后处理方法及检测方法,对市场随机购买的 20 个批次动物源性运动食品进行测定,结果良好,未发现上述 10 种 β -受体激动剂的残留。并且利用农业部 1025 号公告-18-2008《动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测液相色谱-串联质谱法》^[16],对适用于该标准的 9 种 β -受体激动剂进行复检,结果 20 个批次动物源性运动食品也未检测出阳性样品,表明该方法实际可行,可用于实际样品的测定。

3 结论

建立一种超高效液相色谱-串联质谱检测动物源

性运动食品中西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗等 10 种 β -受体激动剂残留的分析方法。结果表明,通过优化后的质谱条件,在 MRM 扫描模式下,10 种 β -受体激动剂组能在 10 min 实现快速分离检测。样品经过乙腈提取后,提取液再采用 MCX 小柱可有效去除样品中的复杂基质,可实现对目标物质的净化与富集,能准确快速有效地检测动物源性运动食品中的西马特罗、特步他林、沙丁胺醇、菲诺特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、克伦特罗、妥布特罗、苯乙醇胺 A 和喷布特罗等 10 种 β -受体激动剂的药物残留。

参考文献:

- [1] 李俊锁,邱月明,王超.兽药残留分析[M].上海:上海科学技术出版社,2002:365-390
- [2] 沈建忠,江海洋.畜产品中 β -受体激动剂残留及其危害[J].中国动物疫, 2011,28(6):27-28
- [3] 中华人民共和国农业部.农业部 235 号公告 动物性食品中兽药最高残留限量[S].北京:中国标准出版社,2002
- [4] 陈小锋,李瑞芳,刘曙照.对克伦特罗具有高特异性的酶联免疫吸附分析法研究[J].分析化学, 2013, 41(6): 940-943
- [5] 金雁,姚家彪,姜莉,等.高效液相色谱法同时测定禽肉中的克伦特罗和沙丁胺醇[J].现代仪器, 2005(5): 34-36
- [6] 朱坚,杨景贤,李波,等.气相色谱-质谱法测定肝、肾和肉中 β -受体激动剂残留量[J].分析测试学报, 2004, 23(9): 223-225
- [7] 王培龙,范理,苏晓鸥,等.分子印迹固相萃取-气相色谱-质谱法测定猪尿中 4 种 β 受体激动剂[J].分析化学, 2012, 40(3): 470-473
- [8] 刘佳,谢云峰,任丹丹,等.反相液相色谱-串联质谱法检测猪肝中 26 种 β -受体激动剂类药物残留[J].分析化学研究报告,2014, 42(10):1482-1492
- [9] 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].分析化学研究报告,2013,41 (6):899-904
- [10] 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, 2013, 32(3): 290-295
- [11] 鲁立良,王远,郝家勇,等.基质固相分散/高效液相色谱-串联质谱法分析肉肠中 4 种 β -2-受体激动剂残留[J]. 分析测试学报, 2012, 31(5): 535-540
- [12] 刘谦,颜红.氘代同位素内标液相色谱串联质谱测定肠衣肉类肝脏中 5 种 β -受体激动剂类药物残留[J].中国兽医杂志, 2013, 49 (7): 80-83
- [13] 孟娟,石莹,张晶,等.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[J].食品安全质量检测学报, 2013,4(1): 129-134
- [14] 金玉娥,郭德华,郑焯,等.液质联用仪测定动物源性食品中 11 种 β -受体激动剂的研究[J].质谱学报, 2007, 28(4): 198-201
- [15] 谭微,张毅,洪爱华,等.液相色谱-串联质谱同时测定猪肉中的 7 种 β -受体激动剂[J].光谱实验室, 2013, 30(2): 850-853
- [16] 中华人民共和国农业部. 农业部 1025 号公告-18-2008 动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测液相色谱-串联质谱法[S].北京:中国标准出版社,2007

收稿日期:2017-02-17

欢迎订阅 2017 年《食品研究与开发》

《食品研究与开发》是由天津市食品研究所有限公司和天津市食品工业生产力促进中心主办,国内外公开发行的食品专业科技期刊,1980 年创刊,半月刊,采用国际流行开本大 16 开。其专业突出,内容丰富,印刷精美,是一本既有基础理论研究,又包括实用技术的刊物。本刊已被“万方数据库”、“中文科技期刊数据库”、“乌利希期刊指南”、美国《化学文摘》、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、英国《食品科技文摘》(FSTA)等知名媒体收录,并被列入“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、RCCSE 中国核心学术期刊(A)。主要栏目有:基础研究、分离提取、研发与工艺、标准与检测、生物工程、营养保健、贮藏保鲜、质量安全、专题论述、食品机械等。

本刊国内统一刊号 CN 12-1231/TS;国际刊号 ISSN 1005-6521;邮发代号:6-197。全国各地邮局及本编辑部均可订阅。从本编辑部订阅全年刊物享八折优惠。2017 年定价:30 元/册,全年 720 元。

本编辑部常年办理邮购,订阅办法如下:

(1) 邮局汇款。地址:天津市静海县静海经济开发区南区科技路 9 号;收款人:《食品研究与开发》编辑部;邮政编码:301600。

(2) 银行汇款。开户银行:工商银行静海支行

账号:0302095119300204171;单位:天津市食品研究所有限公司。

《食品研究与开发》编辑部

E-mail:tjfood@vip.163.com

电话(传真):022-59525671