

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中的 7 种 β_2 -兴奋剂

卢艳芬, 徐丽君, 王 辉, 王志明, 颜克旭

(长沙市畜禽水产品质量检测中心, 湖南 长沙 410013)

摘要:为了准确测定饲料中 7 种 β_2 -兴奋剂,建立了超高效液相色谱-串联质谱检测方法。样品经酸性有机混合溶剂提取、固相萃取净化浓缩后,在多反应监测模式下,用带电喷雾离子源(ESI)的串联质谱仪对样品进行定性和定量分析。该方法下各化合物定量检出限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加浓度下,回收率在 71%~103%之间,相对标准偏差在 5.7%~9.8%之间。本方法快速、准确、灵敏度高,适合饲料中福莫特罗、苯乙醇胺 A、克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布它林、西马特罗的同时快速检测。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; β_2 -兴奋剂;饲料;残留

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2012)05-0280-06

Simultaneous Determination of 7 Kinds of β_2 -agonist in Feed by UPLC-MS/MS

LU Yan-fen, XU Li-jun, WANG Hui, WANG Zhi-ming, YAN Ke-xu

(Changsha Quality Testing Center of Livestock Poultry and Aquatic Products, Changsha 410013, China)

Abstract: A method of ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was studied for determination of β_2 -agonist in feed. The sample was extracted by 0.1 mol/L hydrochloric acid-methanol mixed solvent, purified and enriched with cationic solid phase extraction column, and which was separated by liquid chromatography on C_{18} column with mobile phase of 0.1% formic acid in methanol (gradient elution), then analyzed in UPLC-MS/MS with electrospray ion source (ESI) under multi-reaction monitor mode (MRM). The quantification was performed with external standard method. The method has a lower limit of quantitation 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Spike recoveries of three concentration addition levels (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ranged in 71%—103% with relative standard deviations in 5.7%—9.8%. The method is fast, accurate and sensitive. It is suitable for rapid qualitative and quantitative detection of β_2 -agonist in animal feed.

Key words: ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); β_2 -agonist; feed; residue determination

收稿日期:2012-05-11;修回日期:2012-08-24

基金项目:长沙市科技局现代农业与健康科技重大专项(K1003024-21)资助

作者简介:卢艳芬(1968~),女(汉族),副研究员,从事动物源性产品质量安全管理和检测。E-mail:Lubabana@126.com

β_2 -兴奋剂(β_2 -agonist)属于苯乙胺类药物,俗称瘦肉精,既不是兽药,也不是饲料添加剂,药理效应上属于拟肾上腺素药物。这些违禁药物高剂量添加在饲料中,可以选择性地作用于肾上腺素,导致动物体内的脂肪分解代谢增强,增加蛋白质的合成,显著提高胴体瘦肉率^[1-3]。在经济利益驱动下,不法分子违禁在饲料中添加此类药物的情况时有发生。农业部早在 2002 年 2 月发布的 193 号公告《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中就将其列为违禁药物。这几年来,农业部一直将 β_2 -兴奋剂类药物列入重点监测项目之一。由于多年来对克仑特罗的严厉监管,犯罪分子转而添加同类替代药物,比如:莱克多巴胺、沙丁胺醇、苯乙醇胺 A 等,导致中毒事件的屡屡发生。 β_2 -兴奋剂的滥用严重威胁着人们的身体健康^[3-4],农业部于 2010 年 12 月再次发文(农业部公告第 1519 号),禁止在饲料和动物饮水中使用苯乙醇胺 A、福莫特罗等物质。因此,设计多组分的同时测定方法,在实际监督和执法工作中对饲料进行实时监测势在必行,以期从源头进行监控。

有关 β_2 -兴奋剂的分析测定方法涉及(气相、液相)色谱法、(气相、液相)色谱-质谱法、酶联免疫吸附法、放射免疫测定法等^[5-19]。实际工作中,多采用液相色谱-质谱联用法进行确证,因为此法可以同时满足高灵敏度、高选择性的定性定量要求。由于现有国家标准或农业部公告中还没有关于饲料中苯乙醇胺 A、福莫特罗、克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布它林、西马特罗同时测定的方法,而在实际监督执法工作中又迫切需要相关的分析技术予以支撑。为此,本工作进行相关的研究,建立同时测定饲料中的 7 种 β_2 -兴奋剂的超高效液相色谱-串联质谱方法。

1 实验方法

1.1 主要仪器和设备

UPLC-MS/MS:美国 Waters 公司产品;离心机(湘仪 H-1650);固相萃取装置(Alltech);pH 计(雷磁 PHSJ-4A);涡旋混匀器:德国 IKA 公司产品;振荡器(苏州威尔 SHA-C);超声仪

(昆山 KQ-500DE);沙浴氮气吹干仪(美国 N-EVAPTM112)。

1.2 试剂及耗材

苯乙醇胺 A 标准品(纯度大于 98.0%):多伦多化学研究公司产品;莱克多巴胺、克仑特罗、西马特罗、特布他林、沙丁胺醇、福莫特罗标准品(纯度均大于 98.0%):Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司产品;甲醇和甲酸:均为色谱纯;氨水、盐酸和氢氧化钠:均为分析纯;固相萃取小柱(MCX、HLB;60 mg/3 mL):美国 Waters 公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 液相色谱条件 色谱柱:BEH C_{18} (50 m \times 2.1 mm \times 1.7 μ m);流动相 A:0.1%甲酸水溶液;流动相 B:甲醇溶液;梯度洗脱:0~3.4 min,维持 95%A;3.4~3.6 min,95%A 变化至 72%A;3.6~5.5 min,维持 72%A;5.5~5.7 min,72%A 变化至 30%A;5.7~6.7 min,维持 30%A;6.7~8 min,30%A 变化至 95%A。流速:0.3 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:4 μ L。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源;正离子扫描;多反应检测模式;电离电压:3.0 kV;源温:120 $^{\circ}$ C;雾化温度:350 $^{\circ}$ C;锥孔气流速:50 L/h;雾化气流速:580 L/h。7 种化合物的保留时间、定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量等质谱参数列于表 1。

1.4 样品前处理

1.4.1 提取 准确称取 2 g 试样于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 提取液(V(0.1 mol/L 盐酸):V(甲醇)=8:2),充分振荡后超声 10 min,以 5 000 r/min 离心 5 min,上清液全部转移到另一离心管中,残渣用上述方法重复提取 1 次。合并上清液,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节至 pH 4,待用。

1.4.2 净化 依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化固相萃取小柱,准确移取 5 mL 上清液上柱。再依次用 3 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液、3 mL 甲醇淋洗,抽干,3 mL 5%氯化甲醇洗脱,收集洗脱液于 5 mL 离心管中,45 $^{\circ}$ C 下用氮气吹干。用 1.0 mL 流动相溶解,涡旋混匀后过有机微孔滤膜,上机测定。

表 1 7 种 β_2 -受体激动剂最优化的质谱条件Table 1 The optimization parameters of MRM of the seven β_2 -agonist

化合物	保留时间/min	定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
西马特罗(Cima)	2.18	220.1/160.1	220.1/160.1	23	18
		220.1/202.1			10
特布他林(Terb)	2.70	226.1/125.0	226.1/152.0	30	25
		226.1/152.0			18
沙丁胺醇(Salb)	3.23	240.1/148.1	240.1/148.1	25	20
		240.1/222.2			10
莱克多巴胺(Ract)	4.70	302.2/107.1	302.2/164.1	28	30
		302.2/164.1			18
克仑特罗(Clen)	5.10	277.1/203.0	277.1/203.0	28	18
		277.1/259.1			12
福莫特罗(Form)	5.33	345.2/149.1	345.2/149.1	30	20
		345.2/121.2			35
苯乙醇胺 A(Phen A)	6.30	345.5/327.2	345.5/150.2	25	13
		345.5/150.2			23

2 结果与讨论

2.1 净化条件的优化

由于饲料中添加了很多物质,成分复杂,使得提取后的样品本底复杂,容易对各目标化合物的测定造成基质抑制。为了提高灵敏度、降低检出限,样品提取后需进一步进行前处理净化富集。通常的净化方式有液-液萃取法和固相萃取法(SPE)。液-液萃取法虽然对去除基质有较好的效果,但对于不同结构的药物类型,其回收率差别较大,同时液-液萃取会消耗大量的有机溶剂,对环境造成不利影响。因此,本工作采用 SPE 法。

由于本实验中的 7 个化合物既有苯酚型又有苯胺型,因此设计的净化方案需要适合全部目标化合物。研究了各种净化条件对重现性、回收率的影响以及色谱、质谱中各目标峰和杂质的分离情况。

选取了 Oasis MCX 和 HLB 两种小柱进行比对。研究了上样溶液的 pH 值对回收率的影响情况,结果示于图 1、图 2。从图中可以看出,对于 MCX 小柱,当上样溶液的 pH 值在 4 时,7 种化合物的回收率均较好;对于 HLB 小柱,当上样溶液 pH 值为 7 时,7 种化合物的回收率相对较高。实验显示,HLB 小柱的净化能力不如 MCX 小柱,即在样品加标实验时,杂质峰多,不能满足高灵敏度的检测要求。故本实验最终采用 MCX 小柱进行固相萃取净化处理。

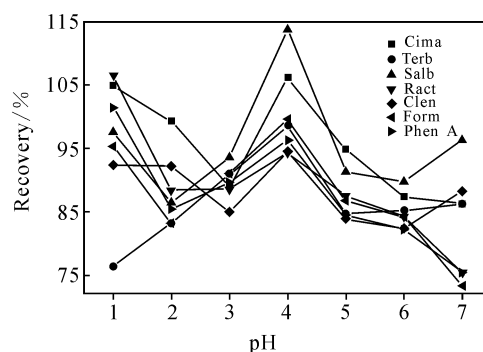


图 1 上样溶液 pH 值和回收率的关系图(MCX 柱)
Fig. 1 Relation schema of solution's pH and recovery(MCX)

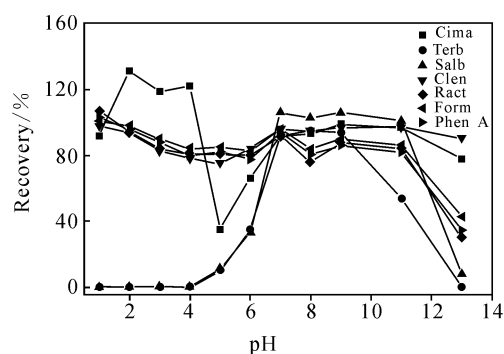


图 2 上样溶液 pH 值和回收率的关系图(HLB 柱)
Fig. 2 Relation schema of solution's pH and recovery(HLB)

2.2 方法的线性关系和测定限

2.2.1 方法的线性关系 用流动相配制成浓度分别为 0.5、1、5、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准工作溶液,在确定的实验条件下进样分析。以浓度为横坐标、峰面积响应值为纵坐标,绘制标准工作曲线。如表 2 所示,各相关系数均大于 0.999,方法的线性范围宽,线性关系良好。

2.2.2 方法的灵敏度 测定了不同饲料样品的最低检测限,确定本方法的定量限。在本方法中,各种受体激动剂的方法最低定量限(LOQ)为 50 $\mu\text{g/kg}$ 。该浓度下饲料中各目标化合物的提取离子质谱图示于图 3。从图中可以看出,在此定量限下,各目标化合物分离良好,信噪比 $S/N > 10$ 。

表 2 7 种 β_2 受体激动剂的标准工作曲线

Table 2 The linear equation and correlation coefficient of standard work curve for 7 β_2 -agonist

化合物	线性方程	相关系数 R^2
苯乙醇胺 A	$y=146.372x$	0.999 9
莱克多巴胺	$y=414.445x$	0.999 9
福莫特罗	$y=1\,396.87x$	0.999 3
克仑特罗	$y=393.994x$	0.999 2
沙丁胺醇	$y=244.236x$	0.999 5
特布他林	$y=295.497x$	0.999 8
西马特罗	$y=151.866x$	0.999 9

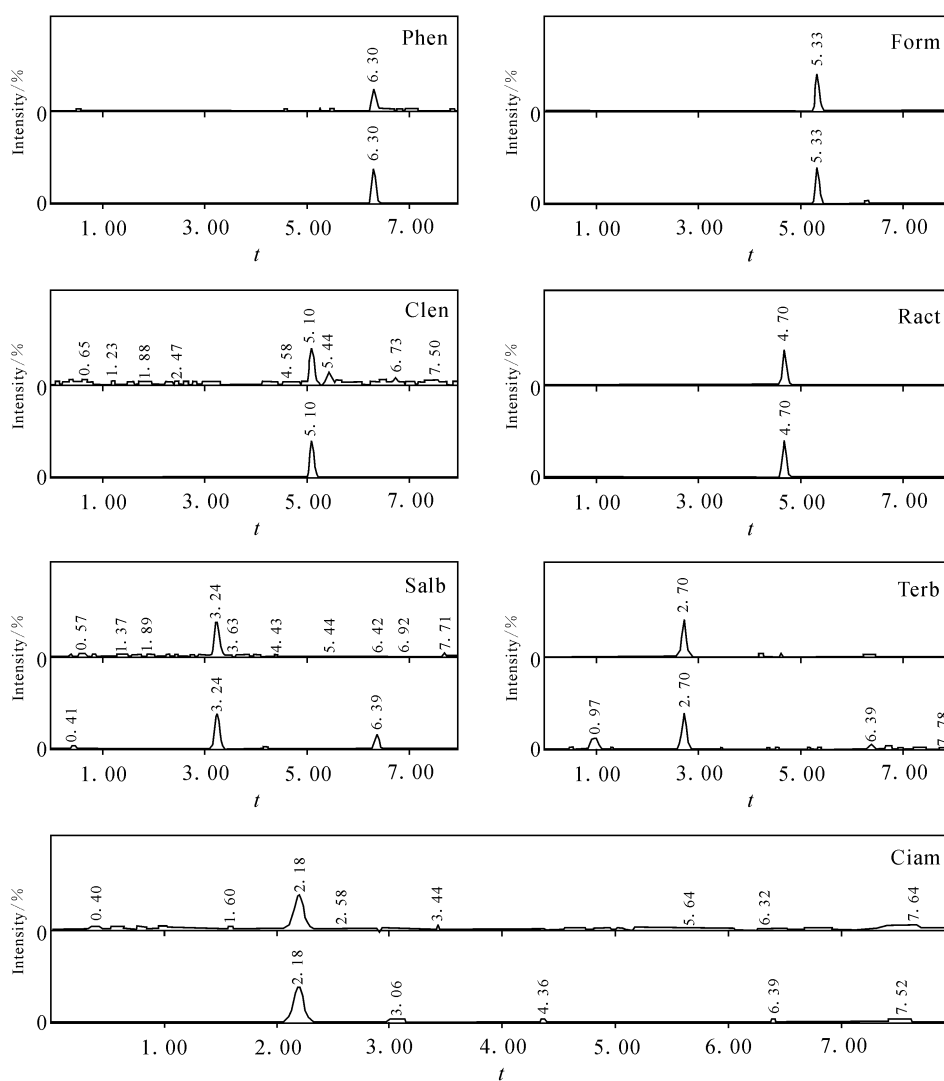


图 3 50 $\mu\text{g/kg}$ 加标饲料中 7 种 β_2 -兴奋剂的提取离子色谱图

Fig. 3 Extracted ion chromatogram of 7 β_2 -agonists for a spiked feed sample(50 $\mu\text{g/kg}$)

2.3 方法的精密度和准确度

对本方法的准确度和精密度进行了考察。以空白饲料样品进行 3 个浓度的添加回收实验, 每个浓度进行 6 次以上的平行测定。福莫特罗、苯乙醇胺 A、西马特罗、特布他林、沙丁胺醇、莱

克多巴胺、克仑特罗的添加浓度为 50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 测得各目标化合物的回收率和变异系数列于表 3。各化合物的回收率在 71%~103% 之间, 相对标准偏差在 5.7%~9.8% 之间。

表 3 精密度和准确度实验结果

Table 3 The experimental result of precision and accuracy

化合物	加标浓度					
	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		200 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	平均回收率/%	变异系数 RSD/%	平均回收率/%	变异系数 RSD/%	平均回收率/%	变异系数 RSD/%
福莫特罗	88.1	7.7	83.8	9.7	87.5	5.8
苯乙醇胺 A	87.2	5.9	89.2	6.4	90.3	6.8
西马特罗	87.5	5.7	87.0	6.9	88.7	8.1
特布他林	84.2	6.1	82.0	9.5	89.0	6.1
沙丁胺醇	85.7	7.5	84.3	7.9	85.3	7.2
莱克多巴胺	83.7	7.0	86.2	9.8	85.5	7.0
克仑特罗	89.0	5.8	90.0	5.8	92.5	9.2

3 结论

本工作建立的饲料中 7 种 β_2 -兴奋剂的多残留 UPLC-MS/MS 检测方法, 简单、快速、有机溶剂消耗少, 方法精密度和准确度高, 实用性强, 为相关的监督执法工作提供了快速准确的技术支持, 可为养殖业健康有序发展提供技术保障。

参考文献:

- [1] PAN S J, HANCOCK J. Effects of clenbuterol on insulin resistance in conscious obese Zucker rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 280: E554-E561.
- [2] YANG Y T, ECELLGOTT M. Multiple action of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue[J]. *Biochemistry J*, 1989, 261: 1-10.
- [3] WAGNER S A, MOSTROM M S, HAMMER C J, et al. Adverse effects of zilpaterol administration in horses; Three cases[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2008, 28(4): 238-243.
- [4] 邱阳生, 杨根海, 何方洋. β -兴奋剂沙丁胺醇及其检测技术研究进展[J]. *动物医学进展*, 2002, 23(4): 50-52.
- [5] 陈继明, 黄土新. 酶联免疫吸附测定法检测克仑特罗[J]. *中国兽药杂志*, 1999, 33(2): 19-22.
- [6] POU K, ONG H, ADAM A, et al. Combined immunoextraction approach coupled to a chemilumi-

nescence enzyme immunoassay for the determination of trace levels of salbutamol and clenbuterol in tissue samples [J]. *Analyst*, 1994, 119 (12): 2 659-2 662.

- [7] 戴 华, 袁智能, 黄志强, 等. 饲料中盐酸克仑特罗、沙丁胺醇高效液相色谱测定[J]. *分析测试学报*, 2003, 22(3): 57-60.
- [8] 尚红霞, 卢业玉, 黄宝华, 等. 固相萃取-高相液相色谱法同时测定克仑特罗和沙丁胺醇[J]. *分析科学学报*, 2003, 19 (2): 145-147.
- [9] LAWRENCE J F, MENARD C. Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic cleanup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, 696 (2): 291-297.
- [10] WILSON R T, GRONECK J M, HOLLAND K P, et al. Determination of clenbuterol in cattle, sheep, and swine tissues by electron ionization gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Journal of AOAC International*, 1994, 77(4): 917-924.
- [11] 孔 莹, 邱月明, 李 鹏, 等. 固相萃取/气相色谱-质谱同时测定猪肉中 4 种 β -激动剂类药物残留量[J]. *分析测试学报*, 2006, 25(2): 63-66.
- [12] LEYSSENS L, DRIESSEN C, JACOBS A, et al.

- Determination of β_2 -receptor agonists in bovine urine and liver by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1991, 564(2): 515-527.
- [13] 余建新, 胡小钟, 余 纯, 等. HPLC/MS 测定动物组织及尿样中的 β 兴奋剂[J]. *分析测试技术与仪器*, 2004, 10(4): 244-247.
- [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_2 -受体激动剂的研究[J]. *质谱学报*, 2007, 28(4): 193-201.
- [15] KOOTSTRA P R, KUIJPERS C, WUBS K L, et al. The analysis of beta-agonists in bovine muscle using molecular imprinted polymers with ion trap LC/MS screening[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529(1/2): 75-81.
- [16] LEE D W, MONA I C, DANIEL R D. Multires-
idue confirmation of beta-agonists in bovine retina and liver using LC-ES/MS/MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2004, 813(1/2): 35-45.
- [17] LEANDRO C C, HANCOCK P, FUSSELL R J, et al. Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1144(2): 161-169.
- [18] KATIA D W, HUBERT D B, DIRK C. LC-MS-MS to detect and identify four beta-agonists and quantify clenbuterol in liver[J]. *Analyst*, 1998, 123(12): 2701-2705.
- [19] 顾 亮, 丁 磊. 液相色谱串联质谱法测定饲料中盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、苯乙醇胺 A[J]. *化学分析计量*, 2012, 21(1): 37-39.