

液相色谱串联质谱法测定动物组织中 17 种  $\beta$ -兴奋剂残留招钰娟<sup>1</sup>, 邓晓华<sup>1</sup>, 甘沛明<sup>1</sup>, 梁雪琪<sup>1</sup>, 黎小鹏<sup>2</sup>

(1. 中山市农产品质量监督检验所, 广东中山 528400; 2. 中山市三乡镇农产品检验检测站, 广东中山 528463)

**摘要** [目的]建立动物组织中  $\beta$ -兴奋剂多残留的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析方法。[方法]样品经提取、固相萃取柱净化后采用 LC-MS/MS 进行检测分析,对样品前处理条件和质谱参数进行研究。[结果]17 种  $\beta$ -兴奋剂的线性范围在 0.5 ~ 50.0 ng/mL 相关性良好,线性相关系数在 0.999 88 ~ 0.995 70; 2 种加标水平回收率为 63.20% ~ 109.92% 和 62.99% ~ 112.19%, 相对标准偏差(RSD)为 0.63% ~ 11.50% 和 0.33% ~ 8.93%。[结论]该方法稳定、灵敏度高、选择性好,测定结果令人满意,可在各食品检测机构推广应用。

**关键词**  $\beta$ -兴奋剂; 动物组织; 液相色谱串联质谱; 残留

**中图分类号** S851.34<sup>+7</sup> **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)15-0095-05

### Determination of 17 $\beta$ -agonists Residual in Animal Tissue by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometer

ZHAO Yu-juan, DENG Xiao-hua, GAN Pei-ming et al (Zhongshan Quality Supervision & Inspection of Agricultural Products, Zhongshan, Guangdong 528400)

**Abstract** [Objective] A sensitive and rapid HPLC-MS/MS method was developed for the determination of Beta-adrenergic agonists residues in animal tissue. [Method] Samples were subjected to extraction, followed by solid phase extraction clean-up before HPLC-MS/MS analysis. The pretreatment conditions and mass spectra parameters were studied. [Result] The developed standard curves of 17 Beta-adrenergic agonists all displayed good linearity over the concentration range of 0.5 - 50.0 ng/mL, and coefficient correlation ( $R^2$ ) between 0.999 88 - 0.995 70. Mean recovery rates of 6 replicates for Beta-adrenergic agonist in a negative pork sample spiked at two levels between 63.20% - 109.92%; 62.99% - 112.19%, RSD was 0.63% - 11.50% and 0.33% - 8.93%. [Conclusion] This method proved to be of stability, high sensitivity and good selectivity and provided satisfying determination results. Therefore, its application deserves to be popularized among various food testing laboratories.

**Key words**  $\beta$ -agonists; Animal tissue; Liquid chromatography-tandem mass spectrometer; Residual

$\beta$ -兴奋剂是一类合成化学兴奋剂,是具有苯乙醇胺结构的母核化合物,主要包含克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺等,是主要用来增进家畜增长瘦肉的  $\beta$ -受体激动剂动物用药的俗称,能加强脂肪的分解,促进蛋白质的合成<sup>[1-3]</sup>。此类药物被大量非法添加于饲料中,导致  $\beta$ -受体激动剂在动物体内蓄积,进一步引起食物中毒等情况。我国于 1988 年 6 月发布的《兽药管理条例实施细则》<sup>[4]</sup>中就规定了“不得添加激素类药品”,在 1997 年又下发了《关于严禁非法使用兽药的通知》<sup>[5]</sup>。因此,建立动物源性食品中  $\beta$ -受体激动剂的多组分残留测定方法是兽药残留检测的重要工作。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 主要仪器:Agilent 1200 液相色谱 6410 QQQ,美国安捷伦公司;摇床、T26 匀浆机, IKA 公司;高速冷冻离心机 3K30, SIGMA 公司; MUL-TIV APTM 氮吹仪, Organomation 公司。

主要试剂:乙腈、甲醇、甲酸,色谱纯,默克公司;乙酸铵、乙酸乙酯、叔丁基甲醚,氨水,分析纯,成都科龙化工;甲醇,分析纯,广州化学试剂厂;试验用水为去离子水; CNW 的 MCX 小柱(60 mg 3cc),购于安谱公司; 17 种标准品(奥西那林、特布他林、沙丁胺醇、西马特罗、齐帕特罗、西布特罗、非诺特罗、利托君、氯丙那林、克伦普罗、莱克多巴胺、妥布特罗、克伦特罗、班布特罗、溴布特罗、马布特罗、喷布特罗)以及 5 种内标(沙丁胺醇-D3、特布他林-D9、西马特罗-D7、

克伦特罗-D9、莱克多巴胺-D6),均购于安谱公司。

**1.2 色谱条件** 色谱柱:Agilent Poroshell 120 Phenyl Hexyl (2.1 mm  $\times$  100 mm, 2.7  $\mu$ m); 流动相如表 1 所示; 柱温 45  $^{\circ}$ C; 流速为 0.3 mL/min; 进样量 10  $\mu$ L。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

时间 Time//min	0.2% 甲酸水溶液 0.2% formic acid aqueous solution//%	乙腈 + 0.2% 甲酸 Acetonitrile 0.2% formic acid//%
0	98	2
4.0	98	2
6.0	80	20
8.0	40	60
10.0	10	90
10.5	98	2
17.0	98	2

**1.3 质谱条件** 电离方式为 ESI<sup>+</sup>; 检测模式为多反应检测(MRM); 毛细管电压为 4 000 V; 干燥气流量 10 mL/min; 干燥气温度为 350  $^{\circ}$ C; 雾化器压力 344.74 kPa; 定性离子对、定量离子对、碰撞能量见表 2。

## 1.4 样品前处理

**1.4.1 样品提取。**准确称取 2 g 样品,加入 1 mg/L 内标 20  $\mu$ L,加入 8 mL 的 0.2 mol/L 乙酸铵,旋涡均匀,4 000 r/min 离心 5 min; 加入 0.1 mol/L 高氯酸溶液 5 mL,旋涡均匀,4 000 r/min 离心 5 min; 上清液转移至另一根 50 mL 离心管,用 0.5 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 9.5  $\pm$  0.2; 加入 10 mL 乙酸乙酯,2 g 氯化钠,振荡 30 min,4 000 r/min 离心 5 min; 取出上层有机相至玻璃试管中,加入 8 mL 叔丁基甲醚

重复提取,振荡 30 min,4 000 r/min 离心 5 min,合并上清液, 50 ℃氮气吹干;用 2% 甲酸溶液 5 mL 溶解,旋涡振荡,备用。

表 2 待测物的质谱参数

Table 2 Mass spectrometric parameters of the analyte

分析物 Analyte	出峰时间 Peak time//min	母离子 Parent ion	子离子 Daughter ion	碎裂电压 Breakdown voltage//V	碰撞能 Impact energy//eV
奥西那林 Ossie Nalin	2.03	212.1	194.1	105	9
			152.1	105	17
特布他林 Terbutaline	3.64	226.3	151.8	80	30
			124.7	80	4
沙丁胺醇 Salbutamol	3.67	240.2	222.1	100	5
			148.2	100	15
西马特罗 Cimeterol	4.15	220.3	202.1	80	4
			160.1	80	16
齐帕特罗 Zilpaterol	4.97	262.3	244.3	110	8
			185.1	110	24
西布特罗 Cimbutoerol	8.14	234.3	160.1	80	12
			143.1	80	28
非诺特罗 Fenoterol	9.28	304.2	134.6	100	15
			106.6	100	25
利托君 Ritodrine	9.79	288.2	270.1	110	9
			121.0	110	21
氯丙那林 Clorprenaline	10.43	213.9	195.9	80	8
			153.8	80	16
克伦普罗 Karen proletarian	10.49	262.8	244.9	80	8
			202.8	80	10
莱克多巴胺 Ractopamine	10.49	302.2	284.1	110	6
			164.2	110	12
妥布特罗 Tulobutoerol	10.69	228.7	155.0	80	12
			119.1	80	32
克伦特罗 Clenbuterol	10.75	277.2	259.1	100	5
			203.1	100	12
班布特罗 Bambutoerol	10.93	367.9	293.9	110	15
			72.1	110	36
溴布特罗 Bbu Tero	10.93	367.1	292.9	110	16
			212.0	110	28
马布特罗 Mabutoerol	10.99	310.8	236.9	110	12
			216.9	110	20
喷布特罗 Penbutolol	11.59	292.4	236.2	110	12
			74.1	110	24
沙丁胺醇 - D3 Salbutamol - D3	3.58	243.2	151.2	100	15
特布他林 - D9 Terbutaline - D9	3.58	235.3	125.7	80	30
西马特罗 - D7 Cimeterol - D7	3.91	227.3	161.1	80	16
克伦特罗 - D9 Clenbuterol - D9	10.67	286.1	204.1	100	12
莱克多巴胺 - D6 Ractopamine - D6	10.41	308.4	290.3	110	12

**1.4.2 样品净化。**固相萃取小柱,依次用甲醇、水、2% 甲酸溶液各 3 mL 活化,取备用液全部过柱,再依次用 2% 甲酸溶液、甲醇各 3 mL 淋洗,负压抽干,用 3% 氨水甲醇溶液 6 mL 分 2 次洗脱,负压抽干。

洗脱液于 50 ℃ 下氮气吹干;1 mL 初始流动相定容,上机检测。

## 2 结果与分析

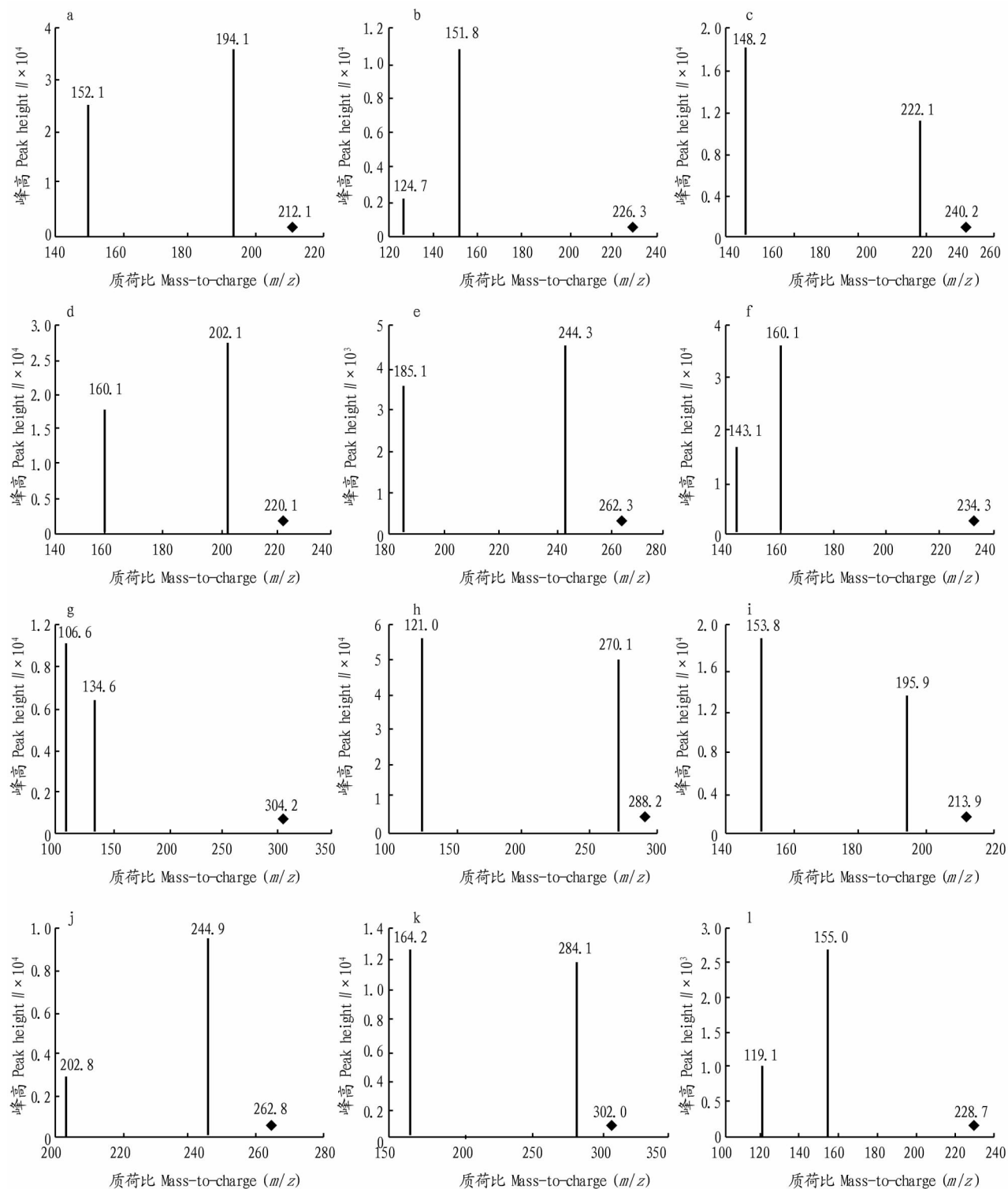
**2.1 质谱条件优化** 采用直接进样方式,0.01 mg/L 单标

溶液进样 10 μL,采用正负离子扫描模式对相应模式的母离子进行扫描,待测物响应最佳的准分子离子峰均在正离子模式下获得,母离子均为  $[M + H]^+$ ,以准分子离子为母离子进行二级质谱扫描,得到各个化合物相应响应值最佳的碎片离子,详见图 1、2。

**2.2 前处理方法的选择** 有关 β - 兴奋剂的提取研究报道虽然较多,但大多只限于常见的克伦特罗、沙丁胺醇和莱克多巴胺等的研究,对其他的 β - 兴奋剂的研究报道则较少。

该研究此次试验借鉴农业部 1025 号公告-18—2008<sup>[6]</sup> 前处理方法高氯酸沉淀蛋白,乙酸乙酯和叔丁基醚提取,浓缩后过固相萃取(SPE)小柱净化,洗脱液浓缩进样分析。

**2.3 线性范围和相关系数** 将 17 种  $\beta$ -兴奋剂配制成一系列同质量浓度的混合标样,在该试验条件下标准溶液的浓度在 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL 各取 10  $\mu$ L 进

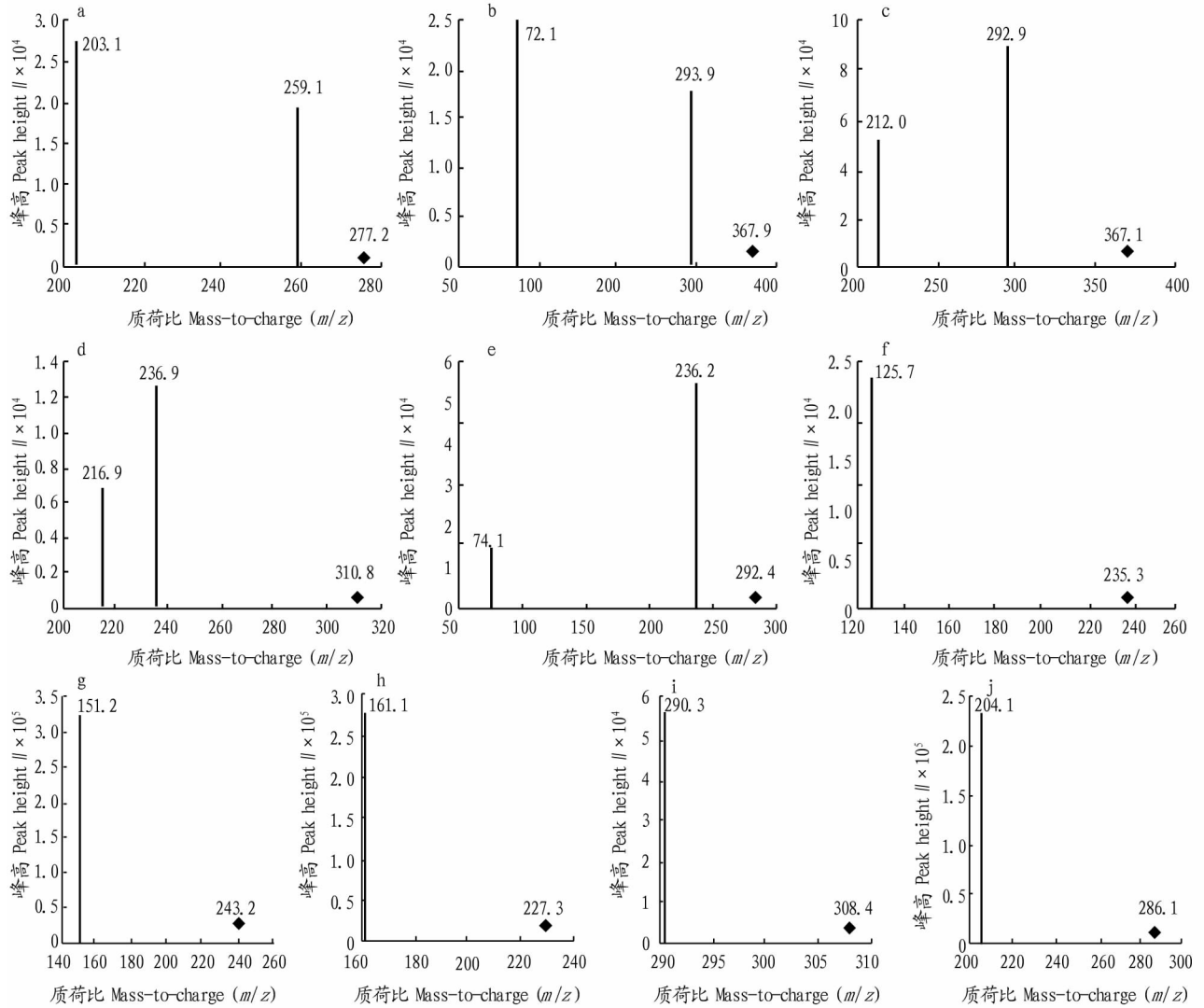


注:a. 奥西那林;b. 特布他林;c. 沙丁胺醇;d. 西马特罗;e. 齐帕特罗;f. 西布特罗;g. 非诺特罗;h. 利托君;i. 氯丙那林;j. 克伦普罗;k. 莱克多巴胺;l. 妥布特罗

Note: a. Ossie Nalin; b. Terbutaline; c. Salbutamol; d. Cimaterol; e. Zilpaterol; f. Cimbuterol; g. Fenoterol; h. Ritodrine; i. Clorprenaline; j. Karen proletarian; k. Ractopamine; l. Tulobuterol

图 1 0.01 mg/L 标准溶液 12 种药物离子质量色谱

Fig. 1 0.01 mg/L standard solution 12 kinds of drugs ion mass chromatography



注:a. 克伦特罗;b. 班布特罗;c. 溴布特罗;d. 马布特罗;e. 喷布特罗;f. 沙丁胺醇 - D3;g. 特布他林 - D9;h. 西马特罗 - D7;i. 克伦特罗 - D9;j. 莱克多巴胺 - D6

Note: a. Clenbuterol; b. Bambuterol; c. Bbu Tero; d. Mabuterol; e. Penbutolol; f. Salbutamol - D3; g. Terbutaline - D9; h. Cimaterol - D7; i. Clenbuterol - D9; j. Ractopamine - D6

图2 0.01 mg/L 标准溶液 10 种药物离子质量色谱

Fig. 2 0.01 mg/L standard solution 10 kinds of drugs ion mass chromatography

样,并用“1.3”所述的仪器条件进样分析,以测得各β-兴奋剂的峰面积(y)和相对应的质量浓度(x)绘制工作曲线,线性方程和相关系数见表3。

表3 17种β-兴奋剂线性范围和相关系数

Table 3 Linear range and correlation coefficient of 17 β-agonists

分析物 Analyte	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	分析物 Analyte	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient
奥西那林 Ossie Nalin	$y = 1.381880x + 0.064251$	0.99748	克伦普罗 Karen proletarian	$y = 0.478115x + 0.024424$	0.99776
特布他林 Terbutaline	$y = 7.817348x + 0.357731$	0.99888	莱克多巴胺 Ractopamine	$y = 4.151160x - 0.009604$	0.99802
沙丁胺醇 Salbutamol	$y = 1.032247x + 0.012414$	0.99893	妥布特罗 Tulobuterol	$y = 0.080650x - 0.046340$	0.99912
西马特罗 Cimaterol	$y = 0.828039x + 0.069915$	0.99792	克伦特罗 Clenbuterol	$y = 1.388870x + 0.040076$	0.99981
齐帕特罗 Zilpaterol	$y = 1.465727x - 0.051314$	0.99443	班布特罗 Bambuterol	$y = 7.808645x - 0.261029$	0.99570
西布特罗 Cimbuterol	$y = 1.0465727x + 0.083876$	0.99940	溴布特罗 Bbu Tero	$y = 0.570418x + 0.017644$	0.99965
非诺特罗 Fenoterol	$y = 7.981847x + 0.127297$	0.99954	马布特罗 Mabuterol	$y = 0.8728836x + 0.013554$	0.99988
利托君 Ritodrine	$y = 19.328922x - 0.561367$	0.99831	喷布特罗 Penbutolol	$y = 15.370742x - 0.406445$	0.99746
氯丙那林 Clorprenaline	$y = 0.933338x + 0.026347$	0.99931			

**2.4 回收率和精密度** 为测定该方法的精密度和回收率,该试验选用阴性试样中添加不同量的  $\beta$ -兴奋剂混合标准

液,进行加标回收试验,每个化合物做 2 个水平的添加,每个添加水平均做 3 个平行样,其结果见表 4。

表 4 供试动物组织中 17 种  $\beta$ -兴奋剂添加回收率和精密度数据( $n=3$ )  
Table 4 Recovery and precision data of 17  $\beta$ -agonists in tested animal tissue

分析物 Analyte	添加浓度 Concentration $\mu\text{g}/\text{kg}$	猪肉平均 回收率 Pork average recovery %	牛肉平均 回收率 Beef average recovery %	猪肉相对 标准偏差 Pork relative standard deviation %	牛肉相对 标准偏差 Beef relative standard deviation %	分析物 Analyte	添加浓度 Concentration $\mu\text{g}/\text{kg}$	猪肉平均 回收率 Pork average recovery %	牛肉平均 回收率 Beef average recovery %	猪肉相对 标准偏差 Pork relative standard deviation %	牛肉相对 标准偏差 Beef relative standard deviation %
奥西那林 Ossie Nalin	1.0	79.47	62.99	0.89	3.97	克伦普罗 Karen proletarian	1.0	100.63	77.70	2.76	3.24
特布他林 Terbutaline	2.5	72.70	70.52	3.58	3.48	莱克多巴胺 Ractopamine	2.5	94.08	102.05	4.95	5.33
沙丁胺醇 Salbutamol	1.0	68.56	66.87	4.03	2.16	妥布特罗 Tulobuterol	1.0	104.50	102.17	8.57	1.66
西马特罗 Cimbutero	2.5	69.98	89.70	5.36	5.69	克伦特罗 Clenbuterol	2.5	92.95	109.96	3.95	5.01
齐帕特罗 Zilpaterol	1.0	101.80	99.19	1.69	7.70	班布特罗 Bambuterol	1.0	63.29	83.91	1.11	4.71
西布特罗 Cimbuterol	2.5	102.26	96.05	8.60	3.08	溴布特罗 Bbu Tero	2.5	76.39	79.93	2.64	2.32
非诺特罗 Fenoterol	11.0	95.40	99.60	1.23	3.14	马布特罗 Mabuterol	1.0	109.92	93.57	11.50	2.00
利托君 Ritodrine	2.5	96.50	95.40	2.54	2.25	喷布特罗 Penbutolol	2.5	102.15	101.27	8.35	2.27
氯丙那林 Clorprenaline	1.0	104.63	112.01	2.23	8.59		1.0	96.01	112.19	3.06	8.44
	2.5	103.45	92.88	4.18	5.43		2.5	103.41	107.48	0.62	1.17
	1.0	66.23	67.24	1.00	3.35		1.0	78.54	69.46	5.65	4.16
	2.5	82.28	80.14	3.90	3.40		2.5	76.84	80.29	7.34	8.83
	1.0	107.67	63.43	1.32	3.35		1.0	102.31	109.19	1.72	8.93
	2.5	75.31	74.59	0.73	1.38		2.5	88.27	103.09	7.50	0.33
	1.0	107.88	76.71	1.30	5.71		1.0	68.53	73.38	9.61	3.97
	2.5	75.60	90.29	1.63	1.27		2.5	63.20	68.71	7.81	3.77
	1.0	109.33	91.74	7.99	7.57						
	2.5	85.51	109.28	3.15	5.17						

### 3 结论

该研究建立了动物性食品中 17 种  $\beta$ -兴奋剂多残留同时检测的液相色谱-质谱联用分析方法,该方法对于各种  $\beta$ -兴奋剂的分离效果好、灵敏度高、准确度和精密度均较满意。该试验方法稳定,前处理方法简单、快速,能满足动物性食品中  $\beta$ -兴奋剂多残留的检测要求。

### 参考文献

[1] DAESELEIRE E, VANDEPUTTE R, PETEGHEM C V. Validation of multi-residue methods for the detection of anabolic steroids by GC-MS in muscle tissues and urine samples from cattle [J]. The analyst, 1998, 123 (12):

2595 - 2598.

[2] 邱阳生, 杨根海, 何方洋.  $\beta$ -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.

[3] 牛晋阳, 庞宇, 姚欣乐. 液质法测定猪肉中十种  $\beta$ -兴奋剂残留 [J]. 食品科学, 2010, 31 (8): 241 - 244.

[4] 中华人民共和国农业部. 兽药管理条例实施细则 [A/OL]. (1988-01-05) [2017-01-21]. <http://www.moa.gov.cn/zwillm/zcfg/qtbmgz/200601/t20060123540349.htm>.

[5] 中华人民共和国农业部. 关于严禁非法使用兽药的通知 [A/OL]. (1997-12-25) [2017-01-21]. <http://www.chinalawedu.com/falvfa-gui/fg22016/50992.shtml>.

[6] 中华人民共和国农业部. Determination of  $\beta$ -agonists residual in animal tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometer [R]. 2008.

### 名词解释

扩展 H 指数:指该期刊在统计当年被引的论文中,至少有 h 篇论文的被引频次不低于 h 次。

来源文献量:指来源期刊在统计当年发表的全部论文数,它们是统计期刊引用数据的来源。

文献选出率:按统计源的选取原则选出的文献数与期刊的发表文献数之比。

参考文献量:指来源期刊论文所引用的全部参考文献数,是衡量该期刊科学交流程度和吸收外部信息能力的一个指标。

平均引文数:指来源期刊每一篇论文平均引用的参考文献数。

平均作者数:指来源期刊每一篇论文平均拥有的作者数,是衡量该期刊科学生产能力的一个指标。

地区分布数:指来源期刊登载论文所涉及的地区数,按全国 31 个省市计(不包括港澳台)。这是衡量期刊论文覆盖面和全国影响力大小的一个指标。

机构分布数:指来源期刊论文的作者所涉及的机构数。这是衡量期刊科学生产能力的另一个指标。

海外论文比:指来源期刊中,海外作者发表论文占全部论文的比例。这是衡量期刊国际交流程度的一个指标。

基金论文比:指来源期刊中,各类基金资助的论文占全部论文的比例。这是衡量期刊论文学术质量的重要指标。

引用半衰期:指该期刊引用的全部参考文献中,较新一半是在多长一段时间内发表的。通过这个指标可以反映出作者利用文献的新颖度。