

实验技术与方法

超高效液相色谱-线性离子阱同时检测动物源性样品中
7种 β_2 -受体激动剂

朱鹏飞, 刘文卫, 凌霞, 周闰

(无锡市疾病预防控制中心, 江苏 无锡 214023)

摘要:目的 建立测定动物源性样品中马布特罗、塞曼特罗、莱克多巴胺、克伦特罗、沙丁胺醇、特布他林、苯氧丙酚胺等7种 β_2 -受体激动剂残留量的超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)的分析方法和阳性样品确证方法。方法 动物源性样品经乙酸铵缓冲液酶解提取,用阳离子交换柱净化,以流动相A:1 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水、流动相B:1 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸乙腈水(90:10, V/V),经 Agilent C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)分离,阳性样品通过 QTrap 四级杆质谱仪的增强型离子扫描模式作进一步确证。本研究同时考察了7种 β_2 -受体激动剂的基质效应。结果 动物源性样品中 β_2 -受体激动剂残留量的检测存在较强的基质效应。7种 β_2 -受体激动剂在0.25~50 ng/g 浓度范围内,呈良好线性,线性相关系数 $r > 0.99$,加标回收率为86.6%~108.7%,方法检出限为0.1~0.5 ng/g。结论 该方法采用了内标法定量以减小基质效应带来的定量误差,检出限较低、定量准确、仪器分析时间短,可用于检测动物源性样品中 β_2 -受体激动剂的残留量,同时对阳性样品作进一步确证。

关键词: β_2 -受体激动剂; 动物源性样品; 超高效液相色谱-串联质谱联用法; QTrap 四级杆质谱; 瘦肉精; 违禁药物; 食品安全

中图分类号: R155; R115 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)01-0022-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.01.006

Simultaneously determination of seven β_2 -receptor agonists by UHPLC-QTrap in animal derived sample

ZHU Peng-fei, LIU Wen-wei, LING Xia, ZHOU Run

(Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Wuxi 214023, China)

Abstract: Objective To establish an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) analytical methods and confirmatory method for positive samples to determine seven β_2 -receptor agonists including mabuterol, cimaterol, ractompamine, clenbuterol, salbutamol, terbutaline and isoxsuprine in animal derived samples.

Methods The animal derived samples were enzymatic hydrolyzed and extracted with ammonium acetate buffer solution. The supernatant was treated by cation exchange column solid phase extraction (SPE), followed by nitrogen concentrating and analyzed by UHPLC-MS/MS. The suspicious positive sample was further confirmed by specific scanning mode of QTrap tandem mass spectrometry. This study also investigated the matrix effects of seven β_2 -receptor agonists. **Results** The results showed that there was a strong matrix effects of the method. The correlation coefficients were good in the concentration range of 0.25-50 ng/g. The limit of detection was 0.1-0.5 ng/g. The average recovery for β_2 -receptor agonists was in the range of 86.6% -108.7%. **Conclusion** The internal standard quantitative method could be used to reduce the quantitative error from the matrix effect. This method could be used for determination of β_2 -receptor agonists in animal derived samples with a low detection limit, good accuracy and fast. The positive samples could be further confirmed.

Key words: β_2 -receptor agonists; animal derived sample; ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; QTrap; clenbuterol; illegal drug; food safety

收稿日期: 2014-08-07

基金项目: 江苏省预防医学研究课题(Y201022)

作者简介: 朱鹏飞 男 主治医师 研究方向为主任医师

E-mail: zpf20031212@163.com

通讯作者: 凌霞 女 高级工程师 研究方向为卫生检验

E-mail: l1216liuminq@163.com

β 受体存在于心血管、肺及肌肉等组织器官内,可分为 β_1 及 β_2 两种。人体呼吸道内主要是 β_2 受体,占总 β 受体的90%, β_2 -受体激动剂是一类人工合成药物,主要用于防治人、兽支气管哮喘及痉挛。研究发现该类药物添加到饲料中后能够抑制动物脂肪生长,促进瘦肉生长,因此被称为“瘦肉

精”。长期使用会造成其在动物组织尤其在肝脏中蓄积,进入人体后引起肌肉震颤、心动过速、心悸和过敏等症状。

胡萍等^[1]研究了 1999—2005 年 64 篇专业文献报道的瘦肉精中毒事件,共计中毒 2 455 人。近年来,瘦肉精违法添加事件仍不断报道,其中比较典型的是 2006 年上海盐酸克伦特罗中毒事件^[2]、2011 年的双汇瘦肉精事件。因此,有必要建立准确可靠的检验方法,对辖区内的动物源性样品进行经常性的监督。此外,由于动物源性样品的复杂性,样品检测过程中容易出现假阳性,需要通过一定的方法进一步确证。

目前动物源性样品中 β_2 -受体激动剂类物质残留的检测主要是二极管阵列高效液相色谱法^[3-4]、气相色谱-质谱联用法^[5]、酶联免疫吸附法^[6]、高效液相色谱-质谱联用法^[7-8]。其中,气质联用法需要长时间、较繁琐的衍生化过程,高效液相色谱法易受杂质干扰,尤其是基质复杂的动物源性样品。酶联免疫吸附法操作简便,但大多试剂盒产品一次只能检测一种目标物,且容易出现假阳性,一般适用于大量样品的快速筛选。

本文采用固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法,同时提取、净化和检测猪肉、猪肝、牛肉、牛肝羊肉、羊肝等动物源性样品中 7 种 β_2 -受体激动剂类物质,包括马布特罗(mabuterol, mabu)、塞曼特罗(cimaterol, cima)、莱克多巴胺(ractompamine, ract)、克伦特罗(clenbuterol, clen)、沙丁胺醇(salbutamol, salb)、特布他林(terbutaline, terb)、苯氧丙酚胺(isoxsuprine, iso)。相对 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》^[9],主要有两点改进:该方法液相部分采用了超高效液相色谱仪,仪器分析快速;质谱为 QTrap,可利用其增强型离子扫描(enhanced product ion scan, EPI)的采集模式,对可疑阳性样品作进一步确证。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国 Agilent)、API 3200QTrap 三重四极杆串联质谱仪(美国 AB Sciex)、Aanalyt 1.5.1 质谱数据系统、MCX 阳离子交换固相萃取小柱(60 mg/3 ml, 美国 Waters)、高速低温离心机。

β -葡萄糖苷酸酶(美国 Sigma),乙腈、甲醇、异丙醇均为色谱纯,试验用水为超纯水,乙酸乙酯(色谱纯),甲酸(色谱纯,纯度 > 98%)、乙酸铵(色谱纯,纯度 > 99%),氢氧化钠、醋酸、乙酸钠、高氯酸等均

为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 标准液的制备

准确称取 mabu、cima、ract、clen、salb、terb、iso 各 10 mg,置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇分别配制成 1.00 mg/ml 的标准储备液,保存于 -20 °C 冰箱内。准确吸取 100 μ l 上述标准储备溶液至 10 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得到 10 mg/L 的混合标准使用液,保存于 -20 °C 冰箱内。

准确加入 1 ml 甲醇于 Ractopamine-d6 Hydrochloride(D6-ract)中,充分混匀溶解后得到 1.00 mg/ml 的标准储备液并通过甲醇稀释得到 100 mg/L 的标准中间液,准确量 100 μ l Clenbuterol D9(D9-clen)、Salbutamol D3(D3-salb)、D6-ract 标准中间液,用甲醇适当稀释,得到 1.00 μ g/ml 同位素内标混合使用液。

1.2.2 标准工作曲线的绘制

分别量取适量混标使用液、内标使用液,用初始流动相稀释并定容至刻度,摇匀,即得系列浓度标准溶液:1.25、2.50、5.00、25.00、50.00、125.00、250.00 ng/ml,内标浓度为 25.00 ng/ml。该曲线对应样品中浓度为 0.25、0.50、1.00、5.00、10.00、25.00、50.00 ng/g,内标浓度为 5.00 ng/g。以峰面积为纵坐标、 β_2 -受体激动剂类浓度为横坐标绘制标准工作曲线,计算回归方程及相关系数。

1.2.3 样品前处理

参考 GB/T 22286—2008 的样品前处理方法对样品进行前处理^[9]。

1.2.4 仪器条件

色谱条件:Agilent C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μ m),流动相 A 为 1 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水、B 为 1mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸乙腈水(90:10, V/V),流量 0.25 ml/min;采用梯度洗脱的方式,梯度为 0 ~ 1 min 5% B、1 ~ 3 min 100% B、3 ~ 5 min 100% B;柱温 30 °C,进样量 20 μ l。

质谱条件:质谱的蠕动泵直接进样,进行 Q1 全扫描,优化去簇电压(V),确定母离子后进行子离子扫描,优化碰撞能量(eV),选择合适的子离子(2 ~ 3 个),以所选的母离子及其子离子进行多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描,采用电喷雾电离方式(ESI+),并进行各参数的 FIA 条件优化,选择优化的色谱条件分离,选出无干扰的特征子离子。

本试验选用离子喷射电压(IS)为 5 500 V,雾化气温度 500 °C,GS1 为 55 psi,GS2 为 35 psi,碰撞气 CAD 为 Medium,气帘气 CUR 为 30 psi。各组分的质谱参数见表 1。

表1 各 β_2 -受体激动剂的质谱参数设置

组分	离子对	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	去簇电压 /(V)	碰撞能量 /(eV)
clen	定量	277.1	203.1	24	21
	定性		259.1, 132.1	24	16
ract	定量	302.2	164.2	25	22
	定性		284.2, 136.1	25	15
salb	定量	240.2	148.1	30	27
	定性		222.3, 166.2	28	14
marb	定量	311.2	237.1	26	23
	定性		293.2, 217.1	30	15
iso	定量	302.2	150.1	28	20
	定性		284.1, 135.0	27	26
cima	定量	220.2	202.2	18	13
	定性		160.1, 143.0	20	22
terb	定量	226.1	152.1	25	26
	定性		125.1, 170.1	35	33

1.2.5 基质效应的考察

按照 Matuszewski 等^[10]的数学模型评定基质效应的影响。本研究中以未检出上述各组分的样品作为空白基质,按照 1.2.3 样品前处理得到的处理液,多份合并后,配制基质加标溶液。计算公式为绝对基质效应($ME/\%$) = $S2/S1 \times 100\%$, $S1$ 为标准品溶液的色谱峰面积, $S2$ 为动物源性样品基质提取后添加标准溶液后的色谱峰面积。当 $ME < 100\%$

表2 各组分标准曲线的回归方程、相关系数、线性范围和检出限

Table 2 Regression equation, correlation coefficient, linear range and detection limit of β_2 -receptor agonists

组分名称	内标	回归方程	相关系数 r	线性范围 /(ng/ml)	检出限 /(ng/g)	定量限 /(ng/g)
clen	D9-clen	$y = 1.01x + 0.0547$	0.999 1	1.25 ~ 250.00	0.20	0.60
ract	D6-ract	$y = 1.35x + 0.13$	0.998 3	2.50 ~ 250.00	0.20	0.60
salb	D3-salb	$y = 0.931x + 0.00559$	0.998 4	2.50 ~ 250.00	0.50	1.50
marb	D9-clen	$y = 0.165x + 0.0351$	0.999 2	1.25 ~ 250.00	0.50	1.50
iso	D6-ract	$y = 0.373x + 0.509$	0.997 5	2.50 ~ 250.00	0.10	0.30
cima	D3-salb	$y = 0.0679x + 0.181$	0.997 6	2.50 ~ 250.00	0.50	1.50
terb	D3-salb	$y = 0.056x + 0.1$	0.999 4	1.25 ~ 250.00	0.50	1.50

2.3 方法的精密度及准确度

以猪肝为例,向未检出上述 β_2 -受体激动剂猪肝样品中添加一定量的标准溶液,得到浓度为 0.50、5.00、25 ng/g,内标浓度为 5.00 ng/g 的加标样品,每个浓度做 6 份平行样品,所测加标样品的峰面积代入标准工作曲线的回归方程求得各组分的检出浓度,样品的平均回收率在 86.6% ~ 108.7%, RSD 在 1.7% ~ 7.8% 之间,该方法的准确度及精密度均符合方法学分析要求,见表 3。

2.4 基质效应的考察

液质联用法在分析复杂样品时存在基质效应。其中基质对 clen 的信号抑制最为明显,研究结果与王国民等^[11]的报道一致。不经内标校正,MCX 柱净化处理后各组分的基质效应为 48% ~ 81%。本研究采用了同

时,提示为基质抑制效应。

1.2.6 动物源性样品中 β_2 -受体激动剂类物质阳性样品的确证

在上述方法的基础上,增加 EPI 采集模式,通过信息相关扫描方式(information dependent acquisition, IDA)触发,建立 MRM-IDA-EPI 方法,获得高质量的二级谱,通过标准溶液 EPI 谱图与样品溶液的 EPI 谱图作比较,对阳性样品做进一步确证。

2 结果

2.1 质谱条件的优化

用液相初始流动相配制混合标准使用溶液,各组分标准物质浓度均为 2.50 ng/ml,内标浓度为 25.00 ng/ml,得到 MRM 扫描图谱,各组分均在 3.5 min 内出峰,且峰形良好,见图 1。

2.2 标准工作曲线、方法检出限

采用向空白动物源性样品中加入一定量标准溶液、经上述方法处理后分析,以 3 倍信噪比计算方法的检出限,以 10 倍信噪比计算定量限,经 UHPLC-MS/MS 进样分析,所得曲线在 1.25 ~ 250.00 ng/ml 范围内线性较好,各组分相关系数 r 、回归方程、线性范围、方法检出限及定量限,见表 2。

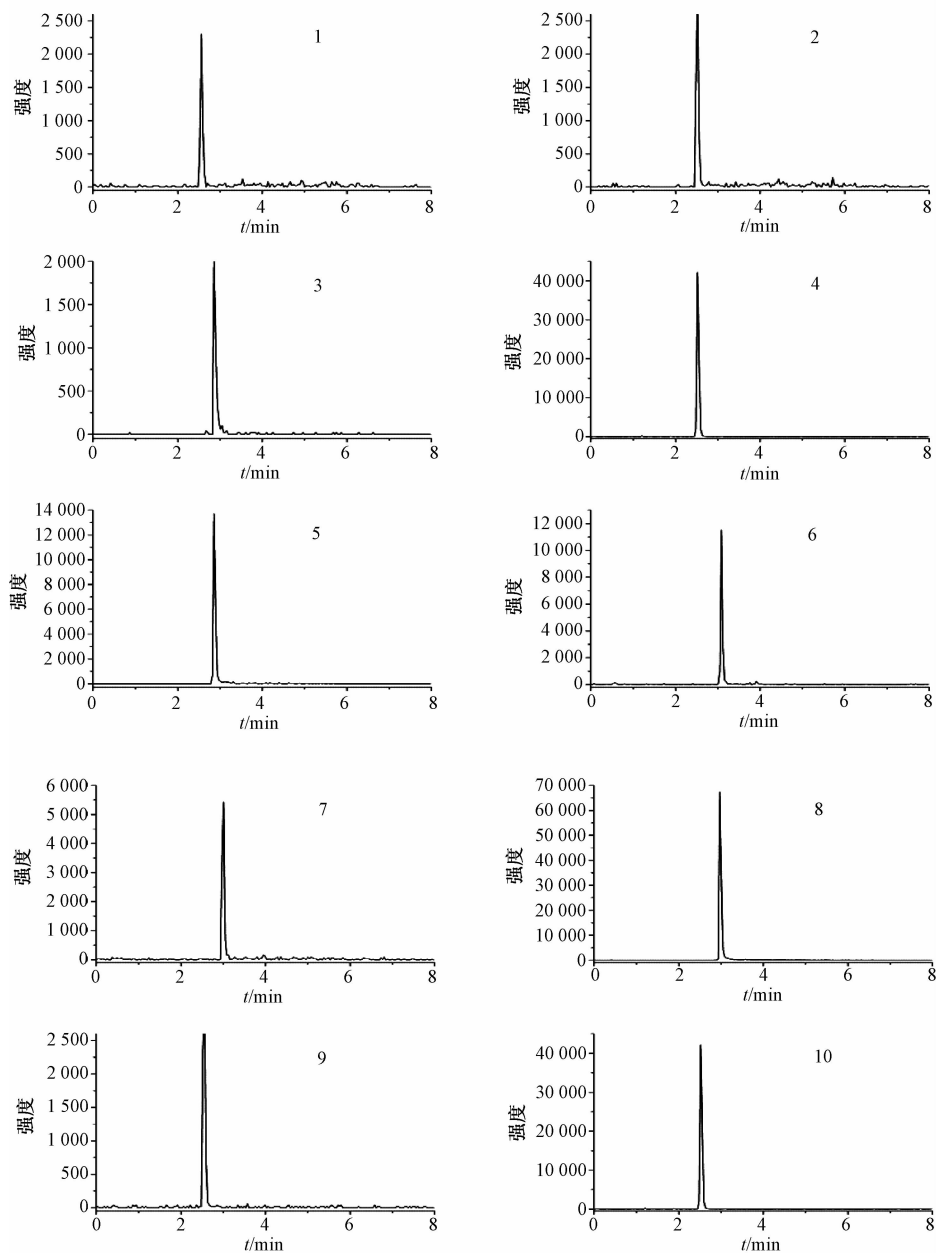
表3 β_2 -受体激动剂的准确度及 $RSD(n=6)$ Table 3 Spiked recoveries and relative standard deviations of β_2 -receptor agonists

组分名称	0.5 ng/g		5 ng/g		25 ng/g	
	平均回收率/%	RSD /%	平均回收率/%	RSD /%	平均回收率/%	RSD /%
clen	108.7	5.4	99.9	7.8	96.8	2.1
ract	86.6	5.4	102.1	5.6	102.2	5.1
salb	104.5	2.4	90.6	4.6	96.8	2.5
marb	102.0	6.1	101.4	6.7	104.4	1.7
iso	108.6	2.8	102.2	4.6	103.6	4.1
cima	103.0	4.5	101.3	2.2	100.8	2.9
terb	91.5	6.0	96.3	5.9	98.3	3.0

位素内标定量,获得了较好的回收率及精密度。

2.5 方法应用

对 2013 年 4 月—2014 年 5 月市售动物源性样



注: 1为cima, 2.6 min; 2为terb, 2.5 min; 3、5为ract, D6-ract, 2.9 min; 4为iso, 3.0 min; 6为mabu, 3.1 min; 7、8为clen, D9-clen, 3.0 min; 9、10为salb, D3-salb, 2.6 min

图1 各组分标准的MRM图谱

Figure 1 MRM chromatography of β_2 -receptor agonists

品91份,含猪肉56份、猪肝16份、牛肉12份、牛肝2份、羊肉5份,检出牛肉、牛肝中clen各1份,检出浓度分别为20.20和174.00 ng/g。

2.6 动物源性样品中 β_2 -受体激动剂类物质阳性样品的确证

通过目标物的保留时间、MRM离子对的峰度比排除确证。本研究还可借助QTrap质谱平台EPI采集模式对阳性样品作进一步的确证。

选取本研究中某疑似检出clen样品作为研究对象,获取标准溶液、阳性样品clen及阴性样品的clen加标的MRM-IDA-EPI图谱。加标图谱中的离子与阳性样品图谱的离子具有可比性,由此可进一

步确定该样品中有clen的检出。同时也可以看到,由于样品中可能存在的杂质干扰,导致阳性样品谱图中存在有其他的杂质峰,见图2、3、4。

3 结论

本研究建立了应用固相萃取、同位素内标法、液相色谱-串联质谱法检测动物源性样品中7种 β_2 -受体激动剂类物质的方法。本研究方法检出限较低、线性范围宽、仪器分析时间短、准确度高,可以作为动物源性样品中 β_2 -受体激动剂类物质残留检测较为理想的方法,可用于应对 β_2 -受体激动剂类物质引起的食物中毒突发事件的定性、定量工作。

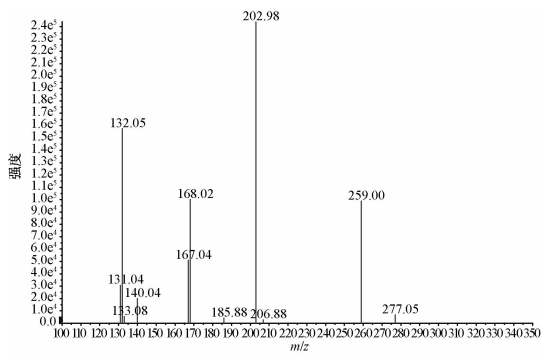


图 2 clen MRM-IDA-EPI 图谱

Figure 2 MRM-IDA-EPI picture of clen

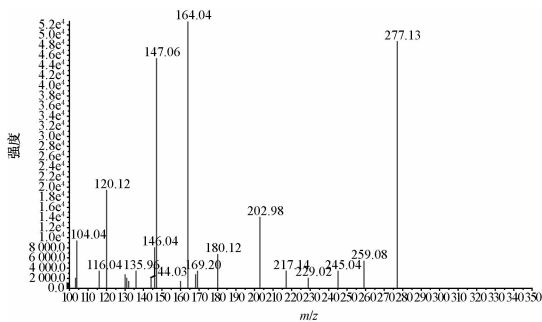


图 3 阳性样品中 clen MRM-IDA-EPI 图谱

Figure 3 MRM-IDA-EPI clen in positive sample

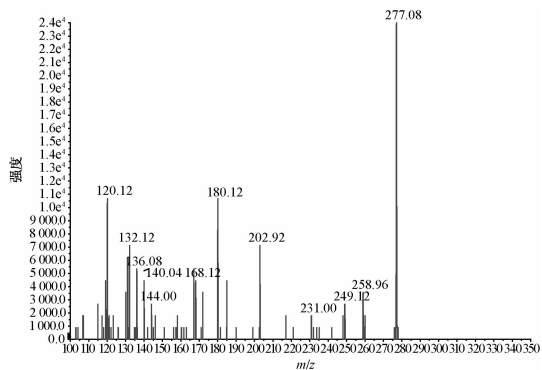


图 4 阴性加标样品 clen MRM-IDA-EPI 图谱

Figure 4 MRM-IDA-EPI clen in negative sample

本研究采用了 QTrap 的 MRM-IDA-EPI 扫描模式,能够对阳性样品作进一步确证。研究中只针对 MRM 检出的 clen 进行了 MRM-IDA-EPI 扫描,可扫描其他目标化合物的 MRM-IDA-EPI 图谱,建立 EPI 谱库,以利于在日常工作中直接通过搜索 EPI 谱库,更方便快捷地得到阳性样品的确证结果。

此外,本研究前处理工作采用了固相萃取法,存在一定的基质效应,前处理过程也较长,在后面

的工作中可采用其他前处理技术,如超声辅助萃取、在线固相萃取、免疫亲和柱固相萃取^[12-14]等技术,以进一步降低基质效应,缩短前处理时间^[11]。

参考文献

- [1] 胡萍,余少文,李红,等.中国 13 省 1999 年—2005 年瘦肉精食物中毒个案分析[J].深圳大学学报:理工版,2008,25(1):1-6.
- [2] 顾振华,郑雷军.上海盐酸克伦特罗食物中毒事件的分析与思考[J].中国食品卫生杂志,2007,19(1):10-12.
- [3] 王春荣,张济,刘岚铮,等.高效液相色谱法测定猪肉及动物源性样品中的盐酸克伦特罗[J].中国卫生检验,2005,15(1):75-76.
- [4] 王琦,张笑,邢文,等.动物性食品中克伦特罗残留量的测定高效液相色谱法方法改进[J].中国卫生检验杂志,2011,21(6):1363-1364.
- [5] 陈剑刚,白艳玲,张彩红,等.固相萃取-气质联用法分析肉食品中盐酸克伦特罗残留量[J].中国卫生检验,2003,13(6):712-713.
- [6] 何红梅,张春荣,李锐,等.酶联免疫法测定猪肉、动物源性样品和猪尿中盐酸克伦特罗[J].理化检验-化学分册,2012,4(1):40-42.
- [7] 康莉,陈春晓,刘红河,等.LC/MS/MS 法测定动物源性样品中四环素类抗生素及盐酸克伦特罗药物残留[J].中国卫生检验,2007,17(12):2144-2146.
- [8] 滕南雁,刘向红,何颂华,等.氘代同位素内标液相色谱-串联质谱法测定猪肉、猪肝中 8 种 β 受体激动剂类药物残留[J].中国卫生检验杂志,2011,21(7):1617-1620.
- [9] 中国国家标准化管理委员会.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[S].中国标准出版社,2008
- [10] Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. Anal Chem, 2003, 75 (13): 3019-3030.
- [11] 王国民,彭涛,陈冬东,等.两种 SPE 净化测定克伦特罗等 β_2 -受体激动剂的基质效应[J].检验检疫学刊,2011,21(3):16-19.
- [12] PAN S,ZHOU L,ZHAO Y et al. Development and validation of a sensitive method for simultaneous determination of eight β_2 -agonists in pork by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J].J Chromatogr Sci,2014.
- [13] MI J,LI S,XU H,et al. Rapid analysis of three β -agonist residues in food of animal origin by automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J].J Sep Sci,2014,37(17):2431-2438.
- [14] WANG G, ZHAO J, PENG T, et al. Matrix effects in the determination of β -receptor agonists in animal-derived foodstuffs by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with immunoaffinity solid-phase extraction[J]. J Sep Sci,2013,36(4):796-802.