



# 全自动固相萃取-高效液相色谱-质谱/质谱法 检测动物源性食品中的 3 种 $\beta$ -受体激动剂

编号：ANIET1401

**摘要：** 本方法参考《GB/T 22286-2008 动物源性食品中多种  $\beta$ -受体激动剂残留量的测定》和《SN/T1924-2011 进出口动物源性食品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和特布他林残留量的测定》等标准，建立了利用全自动固相萃取仪（EXTRA）结合液相色谱串联质谱（HPLC/MS/MS）同时检测 3 种  $\beta$ -受体激动剂物质（包括沙丁胺醇、莱克多巴胺、克伦特罗）在动物源性食品中的残留量的方法。样品绞碎后，用 0.2mol/L（pH=5.2）的乙酸铵缓冲溶液提取，经  $\beta$ -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶酶解后，用 SCX 柱净化，吹干后用相色谱串联质谱（HPLC/MS/MS）法测定，同时使用同位素内标进行定量分析，目标化合物的回收率和 RSD 均较好。本方法简便、灵敏、重现性好、干扰少、特异性好、能满足食品安全法规的需要。

**关键词：** 克伦特罗，莱克多巴胺，沙丁胺醇， $\beta$ -受体激动剂，EXTRA，HPLC

## 1 引言

$\beta$ -受体激动剂属于苯乙胺类药物，能减缓或减少脂肪沉积，增加肌肉蛋白沉积，使营养重新分配，从而显著提高动物体的瘦肉率、增重和提高饲料转化率。因此， $\beta$ -受体激动剂被大量非法用于畜牧生产，导致食用其饲料的动物组织和肌肉中存在不同程度的残留。一些肉制品加工企业由于缺乏质量控制意识、原料把关不严，使用存在兽药残留的动物源食品加工，导致市场上一些加工肉制品也含有兽药。然而长期食用含有  $\beta$ -受体激动剂残留的食品将对人体健康产生极大的危害，它不仅可诱发和加重心率失常病人的病情，引起心室早搏，四肢、脸、颈部骨骼肌震颤；另外还能引起代谢紊乱，对糖尿病人可发生酸中毒或酮中毒。目前，除了美国批准莱克多巴胺为猪饲料添加剂外，莱克多巴胺及克伦特罗在欧盟和我国均已禁止使用。

$\beta$ -受体激动剂具有苯乙醇胺结构母核，为苯乙醇胺类物质。按照苯环上取代基的不同，可分为苯胺型和苯酚型，而苯酚型  $\beta$ -受体激动剂又分为邻苯二酚型、间苯二酚型及水杨醇型，结构如图 1 所示。 $\beta$ -受体激动剂的母核结构及主要化合物列于表 1。

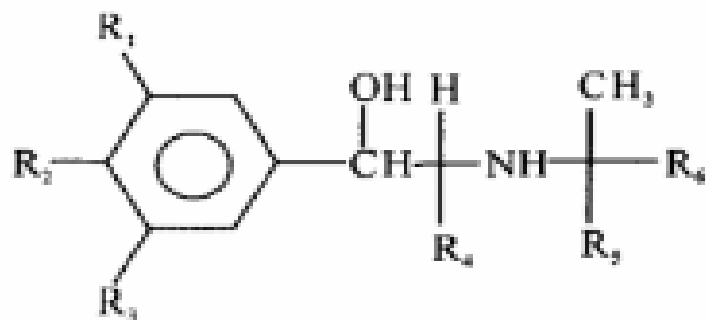


图 1 苯酚型  $\beta$ -受体激动剂分子结构图

| 名称  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>     | R <sub>3</sub>  | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | R <sub>6</sub>                         |
|-----|----------------|--------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------------------------------|
| 苯酚型 | 沙丁胺醇           | CH <sub>2</sub> OH | OH              | H              | H              | CH <sub>3</sub>                        |
|     | 莱克多巴胺          | H                  | OH              | H              | H              | CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -p-OH |
| 苯胺型 | 克伦特罗           | Cl                 | NH <sub>2</sub> | Cl             | H              | CH <sub>3</sub>                        |

表 1  $\beta$ -受体激动剂的母核结构及其主要化合物

## 2 试剂、仪器及器材

### 2.1 试剂

除另外有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水为一级水。

甲醇：色谱纯；

0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液：称取 154 g 乙酸铵，溶解于 1000 mL 水中，用适量乙酸调节 pH 至 5.2；

0.2 mol/L 盐酸溶液：取 18mL 浓盐酸，加水稀释至 1000 mL，混匀；

0.1%甲酸溶液：取 1mL 甲酸，加水稀释至 1000 mL，混匀；

5%氨水甲醇溶液：取 5 mL 氨水，加甲醇稀释至 100 mL，混匀；

$\beta$ -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶（ $\beta$ -Glucuronidase）：10000 units/mg；

沙丁胺醇、莱克多巴胺、克伦特罗标准品：纯度大于 98%；

标准储备液：准确称取适量的沙丁胺醇、莱克多巴胺、克伦特罗标准品，用水分别配成 100  $\mu$ g/mL 的混标储备液，保存于 -18  $^{\circ}$ C 冰箱内。

混合标准中间液（2  $\mu$ g/mL）：分别准确吸取 2.00 mL 沙丁胺醇、莱克多巴胺、克伦特罗标准储备液至 100

mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，-18 °C 避光保存。

同位素内标物：克伦特罗-D9、沙丁胺醇-D3、莱克多巴胺-D3，纯度大于 98%。

同位素内标储备液：准确称取适量的克伦特罗-D9、沙丁胺醇-D3、莱克多巴胺-D3，用水配置成 200 ng/mL 的标准储备液，保存于-18 °C 冰箱内。

## 2.2 仪器及器材

全自动固相萃取仪 EXTRA（上海屹尧）、Waters Alliance 2695 高效液相色谱-串联质谱仪、超声波清洗仪、电子天平、超纯水机、高速离心机、氮吹仪、移液枪、C18 色谱柱、SCX 小柱（500mg/3mL）。

## 3 实验方法

### 3.1 前处理方法

#### 3.1.1 提取

称取 2 g（精确到 0.01 g）经绞碎的样品于 50 mL 具螺旋盖的聚丙烯离心管中，添加 200  $\mu$ L 同位素内标储备液，加入 20 mL 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲溶液，加入 50  $\mu$ L  $\beta$ -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶，充分振荡混匀，37 °C 酶解 12 h。将酶解后的试液涡旋混匀，5000 r/min 离心 10 min，倾出上清液并过滤，取 5 mL 滤液进行净化分析。

#### 3.1.2 净化

3 mL 甲醇活化  $\longrightarrow$  3 mL 水活化  $\longrightarrow$  3 mL (0.2 mol/L) 盐酸溶液活化  $\longrightarrow$  上样  
 $\longrightarrow$  3 mL 水淋洗  $\longrightarrow$  3 mL 甲醇淋洗  $\longrightarrow$  5 mL 5% 氨水甲醇洗脱。

#### 3.1.3 定容

洗脱液在 50 °C 下氮吹至干，用 0.1% 甲酸溶液定容至 1 mL，经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后用 HPLC-MS/MS 分析。

### 3.2 检测方法

#### 3.2.1 EXTRA 净化程序

EXTRA 净化程序如表 2 所示。

表 2 全自动固相萃取仪检测动物性食品中  $\beta$ -受体激动剂的净化程序

| 动作 | 位置 | 溶剂           | 体积<br>(mL) | 抽溶剂速度<br>(mL/min) | 打溶剂速度<br>(mL/min) |
|----|----|--------------|------------|-------------------|-------------------|
| 清洗 | 外针 | 水            | 6          | 120               | 120               |
| 活化 |    | 甲醇           | 3          | 20                | 2                 |
|    |    | 水            | 3          | 20                | 2                 |
|    |    | 2 mol/L 盐酸溶液 | 3          | 20                | 2                 |
| 上样 |    | 样品溶液         | 5          | 20                | 2                 |
| 清洗 | 外针 | 水            | 6          | 120               | 120               |
| 稀释 |    | 水            | 5          | 20                | 15                |
| 上样 |    | 样品溶液         | 5          | 20                | 2                 |
|    |    | 空气           | 1          | 60                | 60                |
| 淋洗 |    | 水            | 3          | 20                | 2                 |
|    |    | 甲醇           | 6          | 20                | 2                 |
|    |    | 空气           | 8          | 60                | 60                |
| 洗脱 |    | 5%氨水甲醇       | 5          | 20                | 2                 |

3.2.2 色谱条件

色谱柱为 C18 柱（Waters），长度 150 mm，内径 2.1 mm，涂层粒径 5  $\mu\text{m}$ ；柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ，流速：0.2 mL/min，进样量：20.0  $\mu\text{L}$ 。色谱梯度洗脱程序如表 3 所示：

表 3 色谱梯度洗脱程序

| 时间(min) | 乙腈(%) | 0.1%甲酸溶液(%) | 流速(mL/min) |
|---------|-------|-------------|------------|
| 0       | 5     | 95          | 0.2        |
| 1       | 5     | 95          | 0.2        |
| 3       | 50    | 50          | 0.2        |
| 5       | 50    | 50          | 0.2        |
| 6       | 5     | 95          | 0.2        |
| 12      | 5     | 95          | 0.2        |

### 3.2.3 质谱条件

电喷雾离子源（ESI），正离子扫描，多反应选择监测（Multiple Reaction Monitoring，MRM）模式；毛细管电压：3.2 kV；锥孔电压：23 V；RF 透镜：0.1 V；离子源温度：120 °C；脱溶剂气温度：350 °C；锥孔吹气流量：50 L/h；脱溶剂气流量：500 L/h； $\beta$ -受体激动剂 MRM 扫描参数如表 4 所示：

表 4 目标物及替代物的 LC-MS/MS MRM 参数、工作曲线线性范围、相关系数和仪器检出限

| 名称        | 母离子   | 子离子    | 定量子离子  | 碰撞能量(V) |
|-----------|-------|--------|--------|---------|
| 沙丁胺醇      | 239.9 | 147.9  | 147.9  | 18      |
|           |       | 222.1  |        | 10      |
| 莱克多巴胺     | 301.7 | 163.9  | 163.9  | 15      |
|           |       | 284    |        | 14      |
| 克伦特罗      | 276.8 | 202.93 | 202.93 | 17      |
|           |       | 258.74 |        | 11      |
| D3-沙丁胺醇   | 242.9 | 150.9  | 150.9  | 15      |
| D3-克伦特罗   | 304.9 | 167    | 167    | 15      |
| D-9 莱克多巴胺 | 285.8 | 203.9  | 203.9  | 15      |

### 3.3 标准曲线的制备

准确移取一定量的同位素内标储备液和混合标准中间液，配置如表 5 所示浓度混合系列溶液，进行 HPLC-MS/MS 分析，以峰面积与标准系列溶液浓度进行线性回归。

表 5 标准曲线浓度表

|       | 同位素内标（ng/mL） | 混标（ng/mL） |
|-------|--------------|-----------|
| 储备液浓度 | 200          | 2000      |
| 1     | 20           | 20        |
| 2     | 20           | 30        |
| 3     | 20           | 50        |
| 4     | 20           | 60        |

### 3.4 结果计算

#### 3.4.1 定性结果

在采用本方法进行样品处理和检测过程中,除与标准品有相同的保留时间外,测定得到的定性离子与定量离子的强度比值关系应在标准品相同离子间丰度比值的 25%内。

#### 3.4.2 定量结果

在仪器最佳条件下,对样液及标准工作溶液进样,内标法定量,计算结果需扣除空白值。D3-沙丁胺醇作为沙丁胺醇的内标物质, D9-克伦特罗作为克伦特罗的内标物质, D3-莱克多巴胺作为莱克多巴胺的内标物质。

## 4 结果与讨论

### 4.1 质谱与色谱行为

为了提高分析的灵敏度和专一性,选用多反应监测模式进行检测,根据目前食品检测法规的要求,进行定性和定量分析。在选定的仪器条件下,混合标准溶液色谱图如图 2 所示,空白样品色谱图如图 3 所示,加标样品色谱图如图 3 所示:

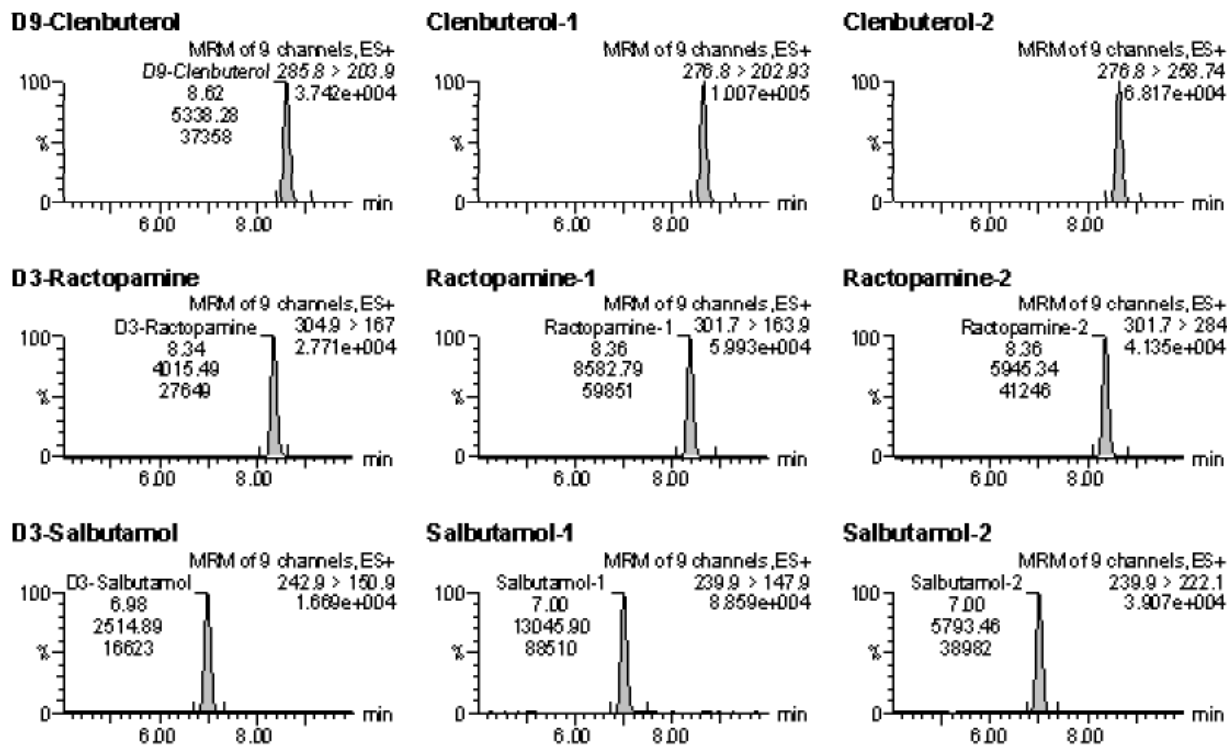


图 2 混合标准溶液色谱图

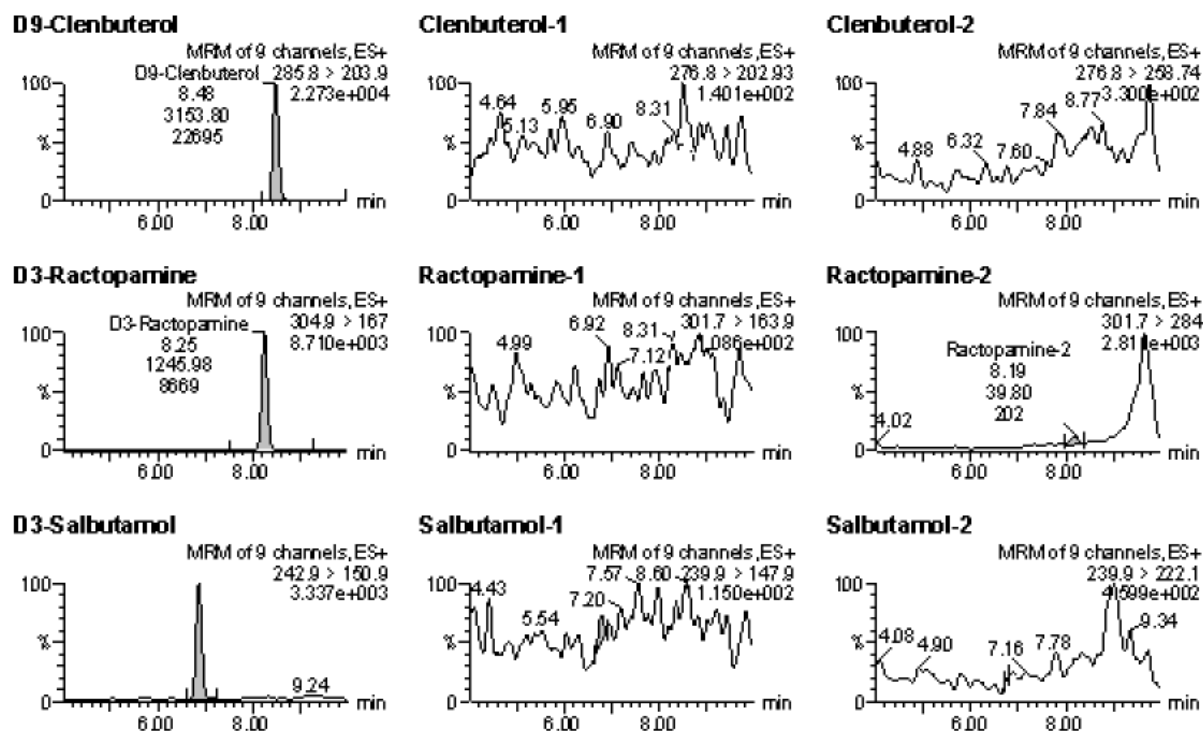


图 3 空白样品色谱图

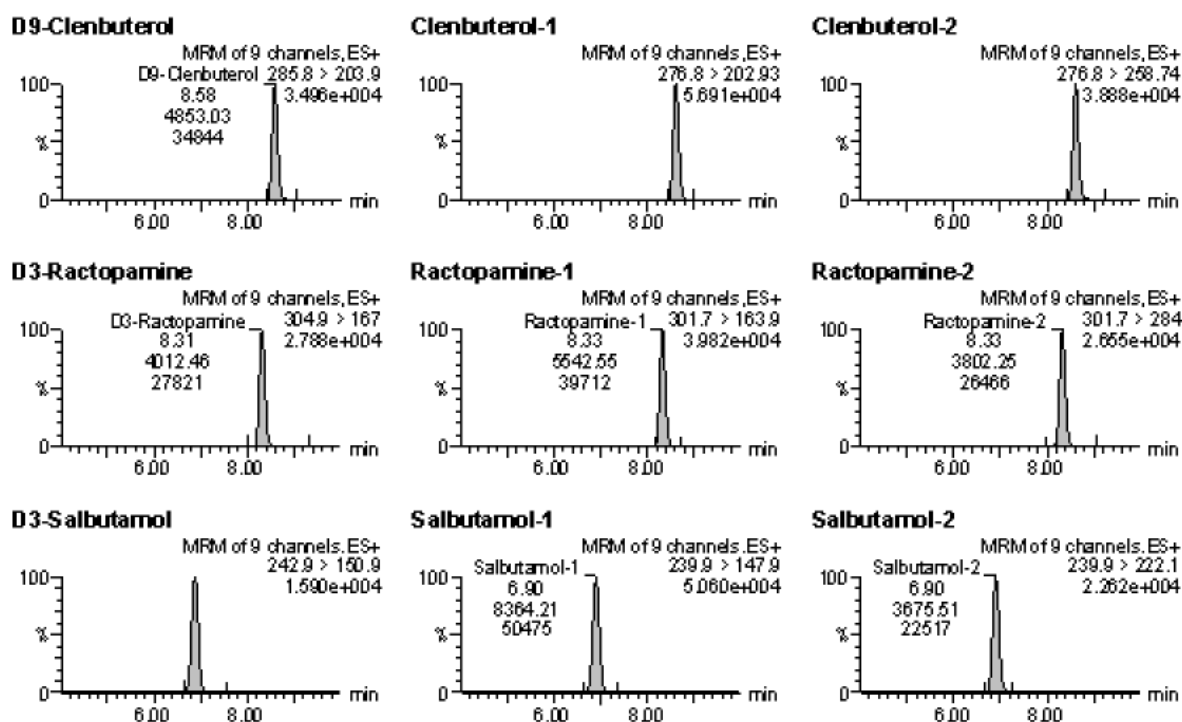


图 4 加标样品色谱图

由图中可以看出，各目标化合物的色谱保留时间重现性良好，样品经净化后，色谱分离行为良好。

4.2 标准曲线回归方程

将混合标准系列溶液在 2.4.2 仪器条件下进样分析，以各组分浓度与其色谱峰面积进行线性回归。回归方程及相关系数如下表所示：

表 6 标准曲线回归方程及相关系数

| 组分    | 回归方程                   | R <sup>2</sup> |
|-------|------------------------|----------------|
| 克伦特罗  | y=0.424796*x           | 0.997258       |
| 莱克多巴胺 | y=0.351796*x           | 0.999436       |
| 沙丁胺醇  | y=0.8414449*x-0.442609 | 0.992929       |

4.3 加标回收率及精密度

在 2.0g 空白样品中添加 20uL 混标中间液，平行三份，进行加标回收实验。加标回收率、相对标准偏差如下表所示：

表 7 回收率及精密度实验结果

| 组分    | 本底值<br>(ng/mL) | 加标值<br>(ng/mL) | 平均测定值<br>(ng/mL) | RSD<br>(n=3) | 平均回收率 |
|-------|----------------|----------------|------------------|--------------|-------|
| 沙丁胺醇  | 0              | 20             | 19.54            | 1.99%        | 97.7% |
| 莱克多巴胺 | 0              | 20             | 19.63            | 6.62%        | 98.2% |
| 克伦特罗  | 0              | 20             | 19.50            | 2.05%        | 97.5% |

4.4 讨论

4.4.1 β-受体激动剂的质谱裂解方式

β-受体激动剂的质谱裂解规律基本相同，苯酚型或苯胺型 β-受体激动剂在碰撞电压作用下都是先脱去一分子水，然后再裂解成胺类物质，如图 5 所示：



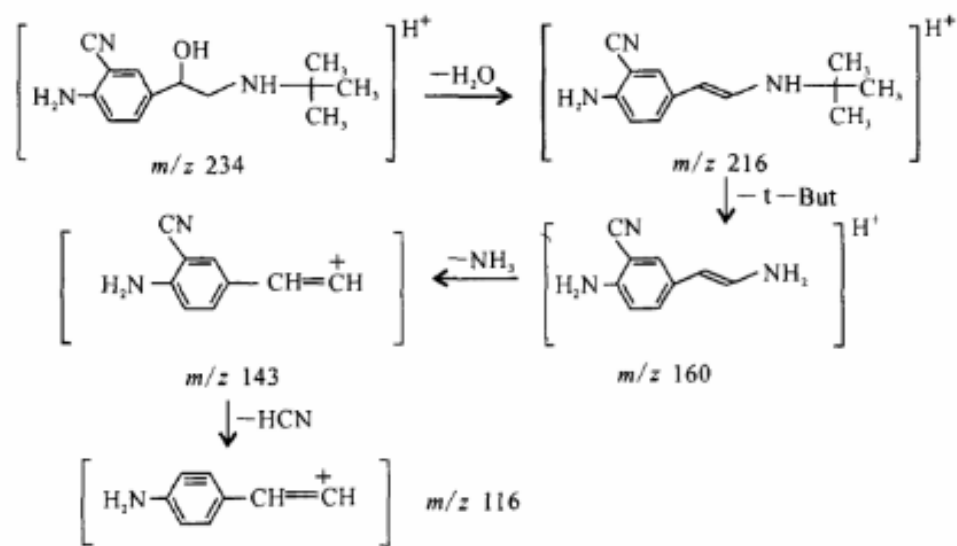


图 5  $\beta$ -受体激动剂的质谱裂解图示

表 8 蜂蜜中氯霉素加标回收率

| Spiking Level | Response | Detected (ng) | Recovery | RSD   | Surrogate Recovery | RSD   |
|---------------|----------|---------------|----------|-------|--------------------|-------|
| 2 ng          | 27139    | 1.97          | 98.5%    | 0.92% | 76.5%              | 1.31% |
|               | 29352    | 2.12          | 100.6%   |       | 76.4%              |       |
|               | 27799    | 2.01          | 100.8%   |       | 78.1%              |       |
| 4 ng          | 57812    | 4.16          | 100.4%   |       | 75.2%              |       |

#### 4.4.2 水解的选择

在动物源性食品中，各类药物在生物体内一部分以代谢物的形式排出体外，还有一部分通过与蛋白质结合，以轭合物或组织成分形式长期存在。有研究表明，苯酚型的  $\beta$ -受体激动剂，如沙丁胺醇，有 40%-45% 以结合物的形式存在于动物源性食品中。为了消除共轭物对检测的影响，有必要进行水解处理，常用的水解方法有酶解法和酸解法。 $\beta$ -受体激动剂用酶解法进行处理，本实验使用  $\beta$ -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶作为水解酶系，pH=5.2 条件下在 37 °C 水浴中过夜，从而实现样品的水解过程。

#### 4.4.3 固相萃取的选择

$\beta$ -受体激动剂因含有仲胺的生物碱，而具有一定的弱碱性，利用其在弱酸环境中离子化性能和碱性条件下的分子化性能，可采用阳离子交换树脂或疏水吸附树脂，在不同的溶液环境中进行进一步的净化处理。本实验采用 SCX 小柱，充分利用  $\beta$ -受体激动剂的特殊化学性能，达到理想的净化效果。这样可以减少测定干

扰、保护色谱柱。

同时本方法适用于大批量样品的同时检测，样品量大，所以本实验采用了 EXTRA 全自动固相萃取仪进行净化处理，免人工干预，自动完成 SPE 柱活化、样品上样、目标物洗脱和收集等步骤。全自动固相萃取仪采用正压技术控制液体流速，保证液体传送的准确性和重现性，从而避免了重复的人工操作及人为误差，并且能够确保良好的重现性和精确性，便于方法的实验室间转移，也便于建立行业乃至国家的实验室标准。

#### 4.4.4 儿茶酚型 $\beta$ -受体激动剂的特殊性质

儿茶酚型  $\beta$ -受体激动剂包括有异丙肾上腺素、甲磺酸异他林等，均具有很强的还原性，遇到空气或日光易自动氧化成醌类物质。在酸性介质中，酚羟基与质子形成氢键，还原性会有所减弱；但在碱性介质中，酚羟基电离增强，苯环上电子云密度的增加会加快氧化，成为红色的醌式结构物质。

本方法在固相萃取的洗脱过程中使用到碱性溶液，会发生相应化合物的结构变化，因此本方法不适宜于儿茶酚型  $\beta$ -受体激动剂的测定。

## 5 结论

本方法通过酶解、提取和固相萃取等方法进行处理，采用 HPLC/MS/MS 法对 3 种  $\beta$ -受体激动剂进行检测，回收率和精密度均较好，完全符合目前许多先进国家或地区的监控要求，为管理部门制定和执行动物源性食品相关安全法规提供帮助。

## 参考文献

- [1] 《GB/T 22286-2008 动物源性食品中多种  $\beta$ -受体激动剂残留量的测定》
- [2] 《SN/T1924-2011 进出口动物源性食品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和特布他林残留量的测定》