doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2021.7.04

高选择性 MRM^3 液质联用技术检测复杂动物性食品中 β - 受体激动剂残留

孙 雷[1],叶 妮[1],王亦琳[1],尹 晖[1],翟南南[2],王鹤佳[1*],徐士新[1]

(1. 中国兽医药品监察所,北京 100081;2. Sciex 公司,北京 100016)

[收稿日期] 2021 - 04 - 13 [文献标识码]A [文章编号]1002 - 1280 (2021)07 - 0022 - 08 [中图分类号]S859.79

[摘 要] 建立了高选择性 MRM^3 液质联用技术检测猪肝脏等复杂动物性食品中克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇三种 β - 受体激动剂残留的新方法。猪肝脏样品经酶解后用乙酸乙酯和叔丁基甲醚萃取,MCX 固相萃取柱净化,0.1% 甲酸乙腈溶液和 0.1% 甲酸溶液为流动相,Phenomenex F5 (50 mm × 3.0 mm,2.6 μm)色谱柱进行梯度洗脱,在电喷雾正离子源下,采用三级质谱多反应监测模式(MRM^3)检测。结果表明:克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇在系列浓度范围内均呈现良好线性关系,相关系数 R^2 均大于 0.99,猪肝脏组织中的定量限均为 0.5 μg/kg。从 0.5、2 和 10 μg/kg 三个添加浓度检测结果可以看出,三种药物的回收率范围为 89.7% ~ 102.1%,批内、批间相对标准偏差均小于 20%。该方法稳定性好,选择性强,灵敏度高,定性定量更加准确。

[关键词] MRM^3;液质联用技术;复杂动物性食品;β - 受体激动剂;残留

Determination of β - agonists Residues in Complex Animal Derived Food by LC - MS/MS/MS in High Selectivity MRM^3

SUN Lei[1], YE Ni[1], WANG Yi - lin[1], YIN Hui[1], ZHAI Nan - nan[2], WANG He - jia[1*], XU Shi - xin[1]

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, *China*; 2. Sciex, Beijing 100016, *China*)

Corresponding author: *WANG He - jia*, *E - mail*: *pharhejia@163.com*

Abstract: A novel method based on LC - MS/MS/MS in high selectivity MRM^3 was established for the determination of clenbuterol、ractopamine and salbutamol residues in complex animal derived food. The pig liver sample was extracted by ethyl acetate and tert - butyl methyl ether after enzymolysis, and purified on a mixed - mode cation exchange solid phase extraction column (MCX). A F5 chromatography column was used with acetonitrile (0.1% formic acid) and water (0.1% formic acid) as mobile phases in a gradient elution. Ionization was performed using an electrospray positive ion source (ESI^+), and detection was achieved by MS/MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM^3) mode. The linearity for clenbuterol、ractopamine and salbutamol was good between serial concentrations, and the correlation coefficient was $R^2 > 0.99$. The limits of quantification of

作者简介:孙 雷,硕士,副研究员,主要从事兽药残留及食品安全等方面工作。

通讯作者:王鹤佳。E - mail:pharhejia@163.com

clenbuterol、ractopamine and salbutamol in pig liver tissue was 0.5 μg/kg, The average recoveries from spiked pig liver tissues at three concentrations of 0.5, 2 and 10 μg/kg ranged 89.7% ~102.1%. The intra - and inter - batch variation coefficients were both less than 20%. This method shows good stability, high selectivity, high sensitivity, qualitative and qualitative more accurately.

Key words: MRM^3; LC - MS/MS/MS; complex animal derived food; β - agonists; residue

克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇等 β - 受体激动剂是一类化学合成的苯乙醇胺类物质，人们食用了这些药物残留的动物性食品后会出现面色潮红、头痛、头晕、胸闷、心悸、四肢麻木等不良反应症状，严重的可能危及生命。因此，包括我国在内的很多国家先后立法禁止该类药物的使用。

目前，β - 受体激动剂残留检测方法主要有气相色谱 - 质谱法[1-4]、液相色谱 - 串联质谱法[5-12]以及免疫分析法[13-14]等。与其他方法相比，液相色谱 - 串联质谱法不用衍生化反应，可以有效的降低干扰，大幅度的提高选择性，从而为检测方法提供了极低的基线、极优的定量限和良好的线性。但像猪肝脏等基质复杂动物性食品，当药物含量较低时，使用串联质谱技术传统的 MRM 采集模式有时并不能消除来自本底噪音或者其它物质的干扰，就会导致较高的基线、较差的定量限和重现性，检测结果存在假阳性或假阴性的风险。在这种情况下，增加一级质谱即第三级质谱（MS/MS/MS，或 MS^3），采用 MRM^3 采集模式，可以更有效的消除基质干扰，降低本底基线，进一步提高方法的选择性，为检测工作提供更准确可靠的技术支持。

基于高选择性的 MRM^3 液质联用技术建立猪肝脏等复杂动物性食品中克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇残留检测的新方法，使方法稳定性好，选择性强，灵敏度高，为提高 β - 受体激动剂类药物的残留监控能力，保障动物性食品质量安全提供技术支持。

1　材料与方法

1.1　仪器　液相色谱 - 三重四极杆/线性离子阱复合质谱仪（Qtrap 6500，美国 SCIEX 公司）；漩涡混合器（SIR4，广州 IKA 公司）；电热恒温振荡水槽（DKZ - 2 型，上海精宏实验设备公司）；pH 计（Delta 320，Mettler Toledo 仪器（上海）有限公司）；高速冷冻离心机（Biofuge Strators，德国贺利氏公司）；氮吹仪（Organomation Associates，美国 Jnc 公司）；超纯水机（Milli - Q，美国 Millipore 公司）。

1.2　材料、药品与试剂　克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇（纯度均大于 98.0%，德国 Dr. Ehrenstorfer 公司）；乙酸乙酯、叔丁基甲醚和甲酸（色谱纯，美国 Fisher 公司）；MCX 固相萃取柱（60 mg/3 mL，美国 Waters 公司）；微孔滤膜（0.22 μm，美国 Pall 公司）；所用水为超纯水。

1.3　标准溶液的配制　精密称定适量的克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇标准品，用甲醇溶解并配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液，于 -20 ℃下保存。准确吸取 0.1 mL 克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇标准储备液至 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得 10 μg/mL 的标准工作液，于 -20 ℃下保存。

1.4 色谱条件　色谱柱：Phenomenex F5（50 mm × 3.0 mm，2.6 μm）；柱温：30 ℃；流动相 A：0.1% 甲酸溶液；流动相 B：0.1% 甲酸乙腈溶液；进样量：5 μL；流速：0.5 mL/min。梯度洗脱程序：0 ~ 0.5 min 保持 5% B；0.5 ~ 5 min，5% B 线性变化到 60% B，5 ~ 6 min，保持 95% B，6 ~ 7.5 min保持 5% B。

1.5　质谱条件　离子源：电喷雾离子源正离子模式；扫描方式：三级质谱多反应监测（MRM^3）模式；离子化电压（IS）：5500V；源温（TEM）：550 ℃；气帘气（CUR）：30 psi；碰撞气（CAD）：Medium；雾化气（GS1）：50 psi；辅助气（GS2）：60 psi。MRM^3 监测离子对及质谱参数见表 1。

表 1　克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇 MRM³ 监测离子对、去簇电压、碰撞能量和激发能量

Tab 1　Monitoring ion pairs, declustering potentials (DP), collison energies (CE) and excitation energy (AF2) of clenbuterol, ractopamine and salbutamol

药物 Drugs	监测离子对 Monitoring ion pairs (*m/z*)	去簇电压 DP/V	碰撞能量 CE/eV	激发能量 AF2/eV
克仑特罗 clenbuterol	277.0 > 203.0 > 132.1 * 277.0 > 203.0 > 168.0	40	21	0.1
莱克多巴胺 ractopamine	302.1 > 284.1 > 121.1 * 302.1 > 284.1 > 164.2	40	23	0.1
沙丁胺醇 salbutamol	240.3 > 222.2 > 148.1 * 240.3 > 222.2 > 166.1	40	15	0.1

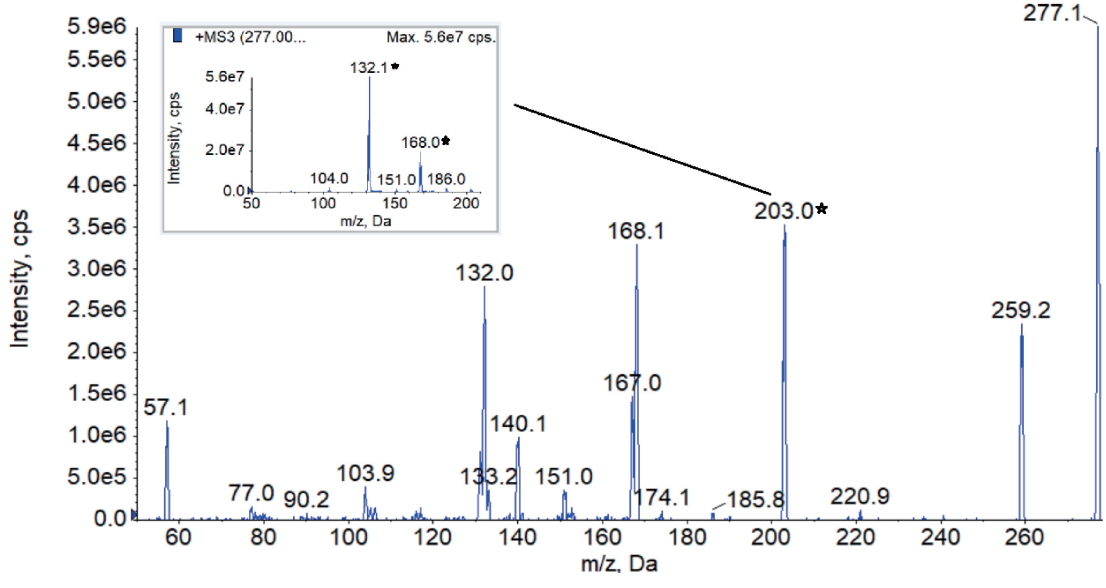
注：标 * 为定量离子对。

1.6　样品处理方法　准确称取 2(±0.02) g 待测样品于 50 mL 离心管内，加入 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲溶液(pH = 5.2) 8 mL，再加入 β - 葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶 40 μL，涡旋混匀，37 ℃下避光水浴振荡 16 h。酶解后放置至室温，涡旋混匀，10 000 r/min离心 10 min，倾出上清液于另一 50 mL 离心管内，用 10 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 10 ± 0.5。加入乙酸乙酯 15 mL，中速振荡 10 min，5 000 r/min离心 5 min，取上层有机相至另一 50 mL 离心管内。下层水相中再加入叔丁基甲醚 10 mL，中速振荡 10 min，5 000 r/min离心 5 min，取上层有机相，合并于乙酸乙酯萃取液中，50 ℃下氮气吹干，用 2% 甲酸溶液 5 mL 溶解，备用。MCX 固相萃取柱依次用甲醇、2% 甲酸水溶液各 3 mL 活化，取备用液全部过柱，依次用 2% 甲酸水溶液、甲醇各3 mL淋洗，抽干，用 5% 氨化甲醇溶液 3 mL 洗脱。洗脱液 50 ℃下氮气吹干，残余物中加入 10% 甲醇溶液(含 0.1% 甲酸)0.5 mL，充分溶解，过 0.22 μm 滤膜后供上机测定，采用基质添加标准溶液外标法定量。

2　结果与分析

2.1　三级质谱 MRM³ 采集离子对结果　使用 50% 甲醇溶液作为溶剂，配制 100 ng/mL 的克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇标准溶液，采用针泵恒流进样的方式，进行质谱参数优化。在正离子全扫描模式下先进行一级质谱扫描(MS¹)获得母离子信息。然后，设定一定的碰撞能量，进行二级质谱子离子扫描(MS²)，获得一个二级子离子信息。最后，设定一定的激发能量，进行三级离子阱质谱孙离子扫描(MS³)，获得两个三级孙离子信息。最终选定的离子对分别为克仑特罗 277.0 > 203.0 > 132.1 和 277.0 > 203.0 > 168.0、莱克多巴胺 302.1 > 284.1 > 121.1 和 302.1 > 284.1 > 164.2、沙丁胺醇 240.3 > 222.2 > 148.1 和 240.3 > 222.2 > 166.1。根据欧盟 2002/657/EC 规定的一个母离子 1 个IP，一个子离子及一个孙离子各 1.5 个 IP，可以得出每种药物各 5.5 个 IP，远超过规定的禁用药物 4 个 IP 要求，很好的满足了法规对于禁用药物的规定。三种药物的 MRM³ 典型质谱图见图 1。

A：克仑特罗（Clenbuterol）



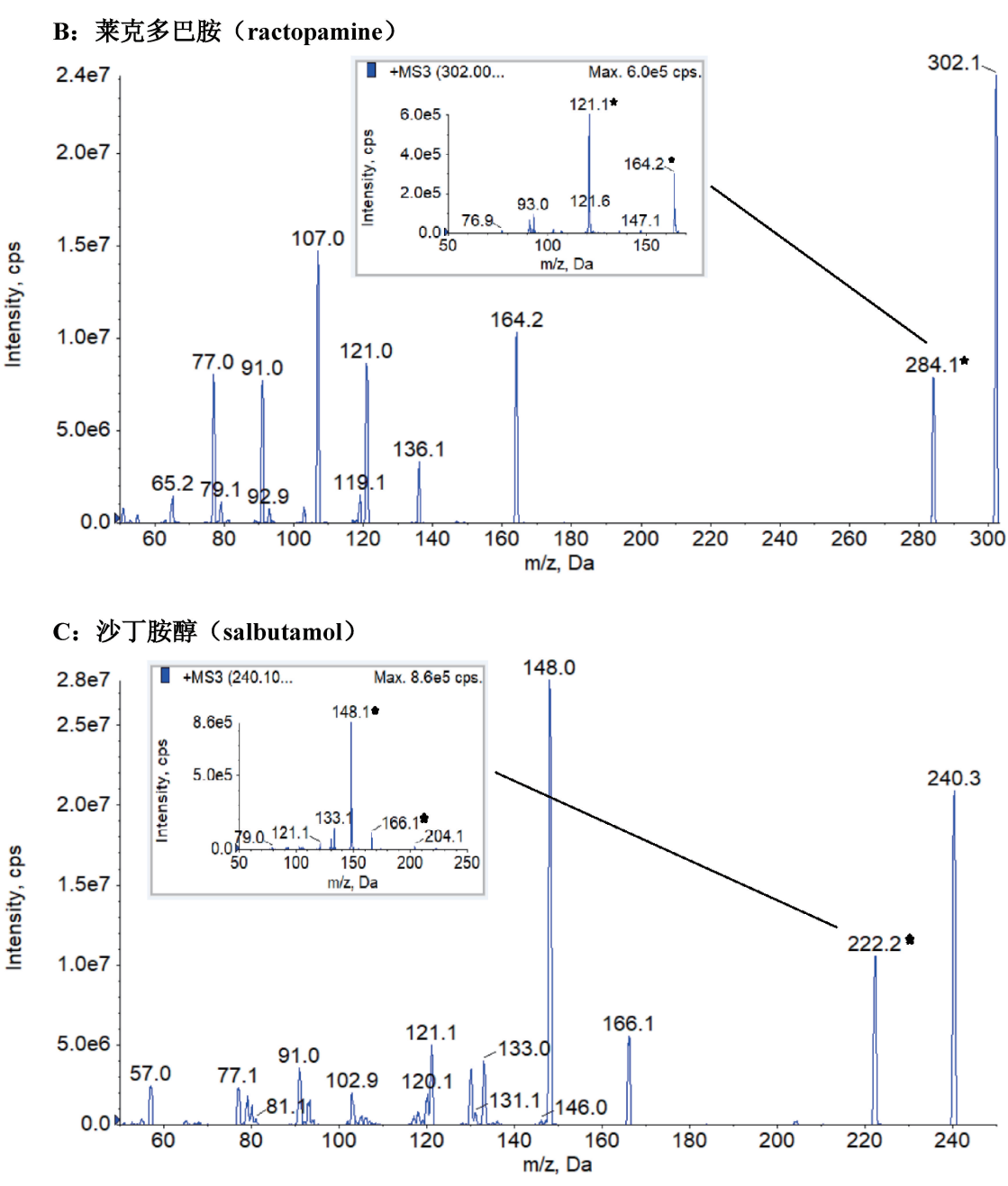


图 1　克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇的 MRM^3 质谱图

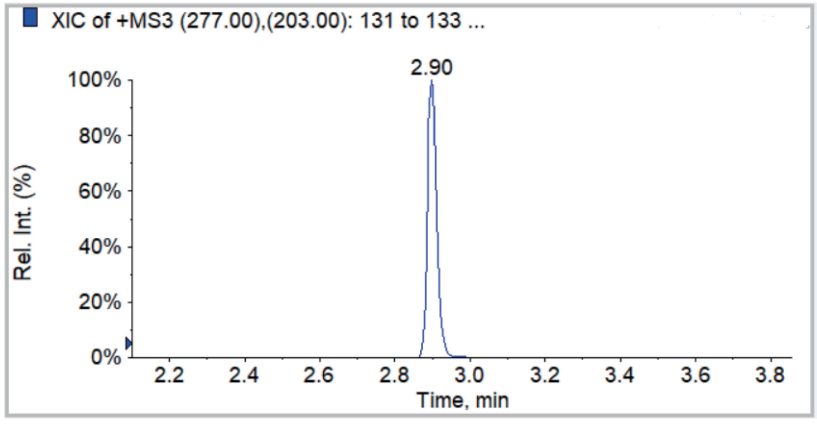
Fig 1　MRM^3 mass spectrum of clenbuterol、ractopamine and salbutamol

2.2　*方法学考察*

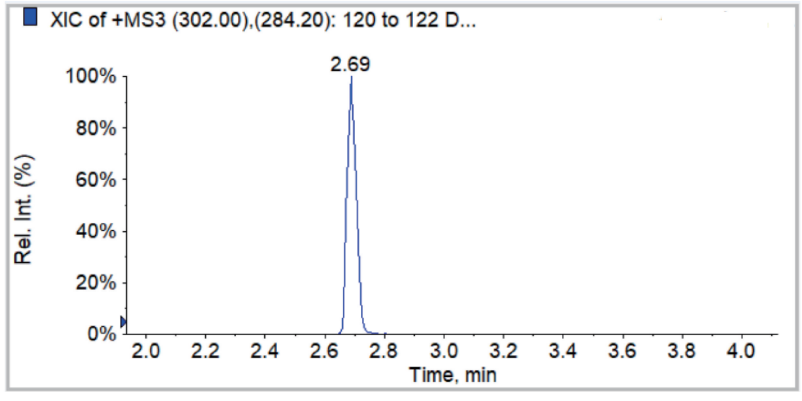
2.2.1　*方法线性*　添加适量克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇混合标准工作液于空白猪肝脏组织中，制得浓度为 0.5、1、2、5、10 μg/kg 的系列基质添加样品，经前处理后依次上机测定。以基质添加标准溶液浓度为横坐标，各药物定量离子质量色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线（表 2）。可以看出三种药物在 0.5 ~ 10 μg/kg 的系列浓度范围内呈现良好的线性关系，相关系数（R^2）均大于 0.99。

2.2.2　*方法灵敏度和精确度*　采用空白添加目标化合物的方法，依据特征离子质量色谱峰信噪比 S/N > 10 为方法定量限，得出三种药物在猪肝脏组织中的定量限均为 0.5 μg/kg。0.5 μg/kg 空白猪肝脏添加样品，经前处理后获得的克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇三级质谱特征离子质量色谱图见图 2。

A：克仑特罗（clenbuterol）



B：莱克多巴胺（ractopamine）



C：沙丁胺醇（salbutamol）

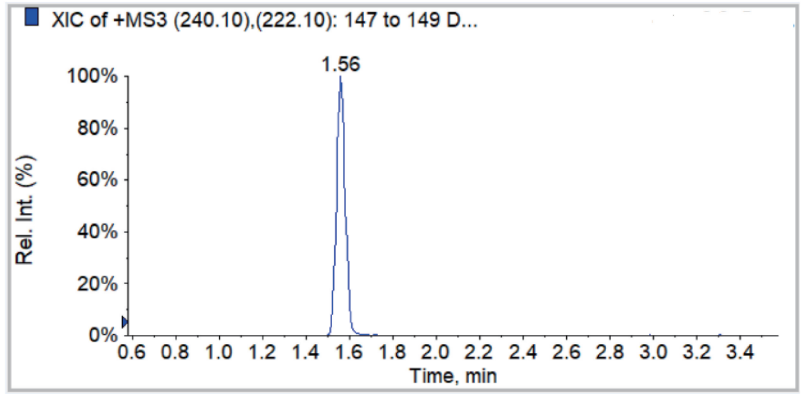


图 2　克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇三级质谱特征离子质量色谱图

Fig 2　MRM^3 chromatograms of clenbuterol、ractopamine and salbutamol

添加 0.5、2 和 10 μg/kg 三个浓度水平的药物，进行方法回收率和精密度考察，结果发现克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇的回收率范围在 89.7% – 102.1%，批内批间 *RSD* 均小于 20%（表 3）。

表 2　三种药物标准曲线及相关系数

Tab 2　Calibration curves and correlation coefficients of three drugs in pig liver

药物 Drugs	线性方程 Linear equation	R^2
克仑特罗 clenbuterol	y = 4040.5x + 970.7	0.9980
莱克多巴胺 ractopamine	y = 2413.0x + 406.8	0.9983
沙丁胺醇 salbutamol	y = 1204.4x + 203.2	0.9948

3　讨论与结论

3.1　样品前处理方法　β－受体激动剂在动物体内代谢过程中，在葡萄糖醛酸转移酶、硫酸酯等作用下发生各种轭合反应，生成各种轭合物长期存在，因此在样品提取前要进行酶解，使其结合态的待测物解离释放出来。有关酶解的方法、酶的品种、酶用量、酶解时间均有人做过研究，本方法直接参考了这些研究报道[5,10－11]。为了提取酸性水溶液中成盐的 β－受体激动剂，先用氢氧化钠溶液调 pH 至碱性，使药物呈游离状态，然后为兼顾不同性质的 β－受体激动剂，本方法参考已有文献，选择了疏水性的乙酸乙酯和叔丁基甲醚从水相中萃取药物的方法[5]。猪肝样品中含有大量的复杂基质，严重干扰残留测定，本方法参考已有报道，选用混合型阳离子交换固相萃取柱（MCX）作为净化柱，起到了较好的净化效果[8－12]。

表 3　空白猪肝脏中三种药物添加回收率实验结果（n = 5）

Tab 3　Average recoveries and precisions（*RSD*）of three drugs in spiked blank pig liver（n = 5）

药物 Drugs	添加浓度 Spiked/（μg · kg^{-1}）	回收率 Recovery /%	批内 *RSD* Intra－*RSD*/%	批间 *RSD* Inter－*RSD*/%
克仑特罗 clenbuterol	0.5,2,10	92.5,101.4,93.3	9.6,5.9,7.8	12.6,10.8,9.0
莱克多巴胺 ractopamine	0.5,2,10	89.7,99.0,102.1	10.5,8.6,4.3	11.5,13.3,8.7
沙丁胺醇 salbutamol	0.5,2,10	93.2,98.7,100.9	8.7,4.6,75.0	9.3,10.1,12.6

3.2　三级质谱 MRM^3 模式检测的优点　在日常检测过程中，对于猪肝脏等基质复杂动物性食品，当检测 β－受体激动剂等禁用药物在含量较低的情况下，有时会出现色谱峰的干扰，给方法的准确定性定量带来困扰，采用三级质谱的 MRM^3 模式可以有效的去除本底或基质带来的干扰，使目标化合物的测定具有更高的选择性。例如，对猪肝脏空白样品采用传统的 MRM 模式检测时，有时会发现有共流出物质干扰目标物克仑特罗的测定（图 3 左），从而造成假阳性结果，在使用 MRM^3 模式后，因为三级质谱 MRM^3 的高选择性，完全消除了空白样品中共流出物的干扰，得到毫无干扰的空白样品色谱图（图 3 中）及空白添加样品色谱图（图 3 右）。

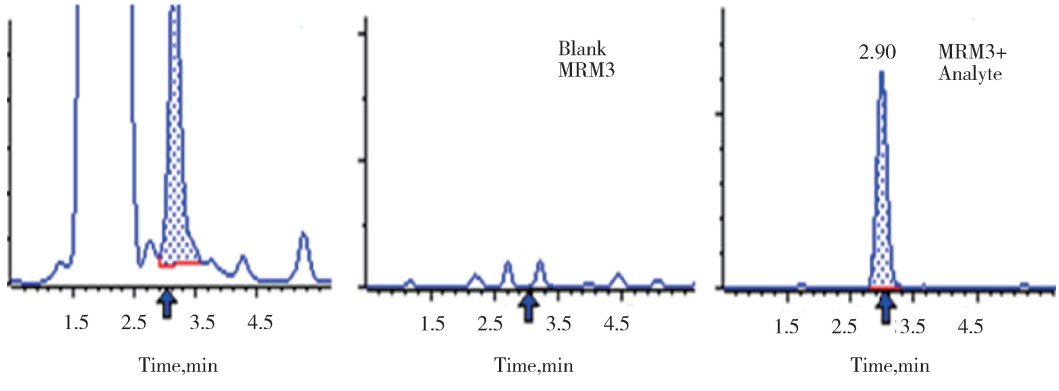


图 3　空白猪肝脏 MRM 和 MRM^3 色谱图及空白添加样品 MRM^3 色谱图

Fig 3　MRM and MRM^3 chromatograms of blank pig liver and MRM^3 chromatograms of blank pig liver spiked

研究建立了高选择性 MRM^3 液质联用技术检测猪肝脏等复杂动物性食品中克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇残留检测的新方法。该方法采用三级质谱 MRM^3 模式通过对母离子、子离子和孙离子三级离子的监测,使方法的选择性更强,灵敏度更高,回收率和精密度等技术参数都能满足兽药残留分析方法的要求,为进一步提高 β - 受体激动剂类药物的残留监控能力,保障动物性食品质量安全提供了技术支持。

参考文献:

[1] 岳韩笑,雷 雯,杜晓宁,等. 同位素稀释 - 气相色谱 - 串联质谱法测定猪肉中残留的 4 种 β - 受体激动剂[J]. 质谱学报,2018,039(001):61 - 68.
Yue H X, Lei W, Du X N, *et al*. Multi - residue analysis of 4 β - agonists in pork using isotope dilution gas chromatography - tandem Mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society,2018,039(001):61 - 68.

[2] 姚德祥,杜作东,黎小鹏,等. 气相色谱 - 质谱法测定动物肝脏中 β - 受体激动剂残留[J]. 现代农业科技,2016,000(023):244 - 245.
Yao D X, Du Z D, Li X P, *et al*. Determination of β - agonists residues in animal liver by gas chromatography - mass spectrometry[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology,2016,000(023):244 - 245.

[3] 蒋万枫,董诗竹,李 钰. 气相色谱 - 串联质谱法测定动物组织中 6 种 β - 受体激动剂残留量研究[J]. 现代农业科技,2012,000(003):33 - 34.
Jiang W F, Dong S Z, Li Y. Determination of 6 β - agonists residues in animal tissues by gas chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology,2012,000(003):33 - 34.

[4] 李 波,朱 坚,杨景贤,等. 气相色谱 - 质谱法测定肝、肾和肉中 β2 - 受体激动剂残留量[J]. 分析测试学报,2004,023(0z1):223 - 225.
Li B, Zhu J, Yang J X, *et al*. Determination of β - agonists residues in liver、kidney and meat by GC - MS[J],Journal of Instrumental Analysis,2004,023(0z1):223 - 225.

[5] 沈东强,刘 标. 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肝中 3 种 β - 受体激动剂残留[J]. 浙江农业科学,2019,060(002):271 - 273.
Shen D Q, Liu B. Determination of 3 β - agonists residues in pig liver by UPLC - MS/MS[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences,2019,060(002):271 - 273.

[6] 李经运,莫秋岸,李陈平,等. UPLC - MS/MS 对猪肉中 3 种 β - 受体激动剂残留的检测[J]. 肉类工业,2016,000(006):43 - 46.
Li J Y, Mo Q A, Li C P, *et al*. Detection of three kinds of β - agonist residues in pork by UPLC - MS/MS[J]. Meat Industry,2016,000(006):43 - 46.

[7] 王同珍,陈孝建,安 爱,等. 超高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱法同时测定猪肉中 4 种 β - 受体激动剂类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报,2016,007(006):2483 - 2489.
Wang T Z, Chen X J, An A, *et al*. Simultaneous determination of 4 kinds of β - agonist residues in pork by ultra performance liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 007 (006): 2483 - 2489.

[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 β2 - 受体激动剂类药物残留[J]. 分析化学,2014,000(010):1486 - 1492.
Liu J, Xie Y F, Ren D D, *et al*. Determination of residues of 26 β2 - agonists in pork liver by reversed phase high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,2014,000(010):1486 - 1492.

[9] 滕南雁,刘向红,何颂华,等. 氚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,2011,021(007):1617 - 1620.
Teng N Y, Liu X H, He S H, *et al*. Determination of 8 β - agonists in pork and swine liver with deuterated isotope internal standard by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology,2011,021(007):1617 - 1620.

[10] 孙 雷,张 骊,朱永林,等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测动物源性食品中残留的 9 种 β - 受体激动剂[J]. 色谱,2008,026(006):709 - 713.
Sun L, Zhang L, Zhu Y L, *et al*. Simultaneous determination of nine β - agonist residues in animal derived foods by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography,2008,026(006):709 - 713.

[11] 庞士平,王凤美,张鸿伟,等. 超高效液相色谱 - 串联质谱测定动物源性食品和尿液中 4 种 β - 受体激动剂残留[J]. 分析化学,2008,036(012):1629 - 1635.
Pang S P, Wang F M, Zhang H W,*et al*. Determination of four beta - agonists residues in products of animal origin and urine by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem

mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2008,036(012):1629 – 1635.

[12] 徐伟东,刘 畅,柴逸峰,等. LC – MS/MS 测定动物源性食品中 15 种 β – 受体激动剂残留的研究[J]. 药物分析杂志, 2008,028(012):2085 – 2089.
Xu W D, Liu C, Chai Y F, *et al*. LC – MS/MS determination of 15 β – agonists in animal borne food[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis,2008,028(012):2085 – 2089.

[13] 王 瑞,秦立德,王晓茵,等. β2 – 受体激动剂类药物多残留间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,048(007):37 – 43.
Wang R, Qin L D, Wang X Y, *et al*. Development of an indirect competitive ELISA for detection of multiple residues of β2 – agonist drugs[J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition),2020,048(007):37 – 43.

[14] 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, 041(006): 940 – 943.
Chen X F, Li R F, Liu S Z, *et al*. Development of enzyme linked immunoassay with high specificity to clenbuterol[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,2013,041(006):940 – 943.

(编 辑:陈 希)