Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用UPLC-MS/MS检测肉制品中常见的β-受体激动剂的残留量

任一平[1]，杨锦川[2]
[1]中国杭州浙江省疾病预防与控制中心
[2]沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

与当前所采用的GB/T 22286-2008 LC法相比，采用本UPLC®-MS/MS法时，样品制备步骤更为简单、运行时间可减少73%(本法运行一次仅需7分钟，而目前的GB法运行时间为26分钟)、溶剂使用量更少。相当于节省了1,925小时的仪器运行时间。

沃特世提供的解决方案

ACQUITY UPLC® HSS T3色谱柱

ACQUITY UPLC系统

Xevo® TQ-S 质谱仪

关键词

盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、食品安全

引言

β-受体激动剂或β2-肾上腺素受体激动剂是用于治疗哮喘及其他肺部疾病的常用药物。这两种药物可作用于β2-肾上腺素受体，可产生使平滑肌放松，支气管扩张等等的功效。然而，由于这些药物同样可促进动物肌肉生长、抑制脂肪产生，所以一些养殖业者将β-受体激动剂非法地添加到饲料中，以期增加动物体重、增加肌肉，从而增加红肉总产量。已出现过一些因食用受到β-受体激动剂污染的肉类而引发食物中毒的事件。在许多国家与地区，已禁止在动物饲料中添加β-受体激动剂。[1,2]盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇是常用的β-受体激动剂。中国的相关法律规定，严禁将盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇用于产肉类动物，[3,4]并且在肉制品中存在这类药物也属违法。图1显示了这三种化合物的结构。

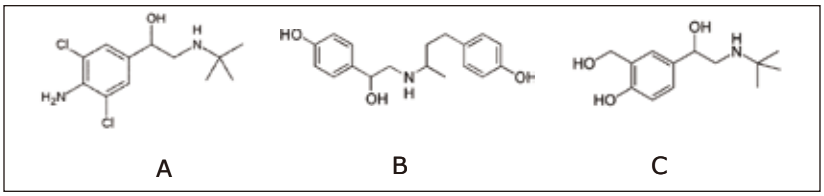

图1 1A)盐酸克伦特罗、1B)莱克多巴胺、1C)沙丁胺醇

在中国，液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)是检测肉制品中是否存在β-受体激动剂残留物的标准方法。[5]采用该种方法(GB/T 22286-2008)，样品需经酶解、蛋白质沉淀、萃取、固相提取、净化处理，然后利用反相液相色谱在C_{18}色谱柱上，将样品分离，用串联质谱法进行检测。在进行定量分析时，采用性质稳定的同位素(盐酸克伦特罗-d_9及莱克多巴胺-d_3)作为内标物。采用该LC-MS/MS法进行分析，通常需要26分钟。

实验

UPLC条件

液相色谱系统: ACQUITY UPLC
运行时间: 7.0 min
色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 µm, 2.1 x 100 mm
柱温: 30 °C
进样器温度: 10 °C
进样量: 5 µL
流速: 0.4 mL/min

流动相

A: 含0.1%(v/v)甲酸的水溶液
B: 含0.1%(v/v)甲酸的乙腈溶液梯度

时间	流速	A%	B%	梯度线型
初值	0.4	95	5	初值
1.2	0.4	95	5	1
2.5	0.4	59	41	6
3.5	0.4	59	41	1
3.7	0.4	0	100	6
4.8	0.4	0	100	1
5.0	0.4	95	5	6

质谱条件

质谱系统: Xevo TQ-S MS
电离模式: ESI+
毛细管电压: 3.5 kV
锥孔电压: 30 V
离子源温度: 150 °C
脱溶剂温度: 550 °C
脱溶剂气体流速: 900 L/H
碰撞气体流速: 0.19 mL/min

MRM方法参数

使用沃特世IntelliStart™软件实现诊断性MRM通道变换(参见表1)。

早在2004年沃特世就首先推出了超高效液相色谱系统(UPLC®)，因此相比于传统的HPLC，UPLC的优越之处也已在许多文献中得到明确的阐述，并且UPLC也在多个分析领域中得到了广泛的应用。本篇应用纪要介绍了使用ACQUITY UPLC超高效液相色谱与Xevo TQ-S串联四级杆质谱仪检测肉类中是否含有三种常见β-受体激动剂(盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇)残留物及其残留量的方法。与GB法相比，[5]采用UPLC法时，样品运行时间从26分钟缩短到7分钟；样品的萃取方法以及色谱条件得到了优化；并且采用了更多的MRM通道以及国际标准稳定同位素内标物以完善分析过程。此外，也对ACQUITY UPLC HSS T3 1.8µm色谱柱在实际肉类产品分析中的使用情况进行了研究。

样品制备

图2说明了样品制备步骤。

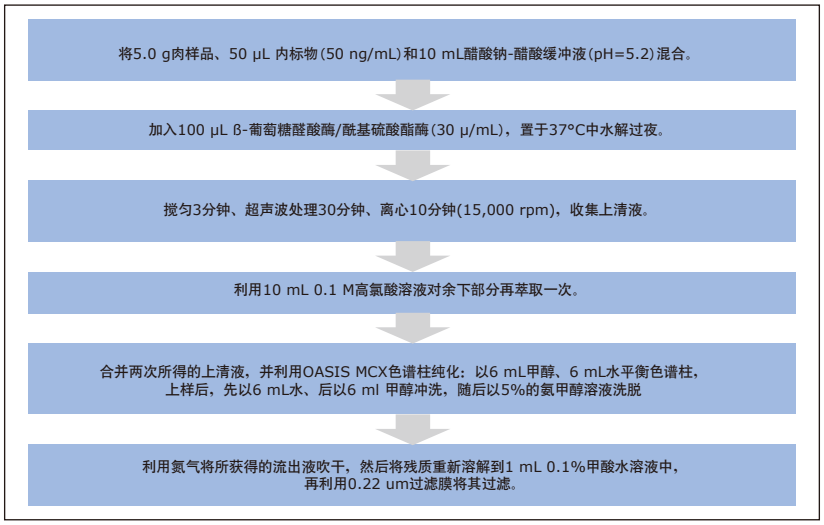

图2 样品制备步骤一览。

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
盐酸克伦特罗	276.9	167.8	25	25
		202.9		15
D9-盐酸克伦特罗	286.1	168.6	25	35
		203.9		15
莱克多巴胺	302.1	106.9	30	32
		164.0		15
D5-莱克多巴胺	307.1	107.1	30	32
		167.0		15
沙丁胺醇	239.9	147.8	25	20
		165.9		12
D3-沙丁胺醇	243.0	150.7	25	18
		168.8		12

表1 分析β-受体激动剂及其稳定同位素内标物的MRM参数。

结果与讨论

分析肉制品中的β-受体激动剂

在ACCUITY UPLC HSS T3色谱柱上，采用梯度洗脱。盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇。三种化合物的保留时间分别为3.29、3.08和2.49 分钟。三种化合物分别对应的MRM通道、标准溶液及加标样品进行UPLC分离时所确定的保留时间，可确认该三种化合物。在本方法中，采用两对母离子/子离子MRM通道，而国标方法(GB/T 22286-2008)中则仅采用一对。这提高了分析结果的可信度。稳定的同位素内标物可校正样品在分离及离子化过程中，引入的误差(文中未显示标准工作曲线)。图3及图4分别显示了经过前处理和未经前处理的样品的色谱图。

在三个浓度下进行加标回收率实验(0.1、1.0及10.0μg /kg肉样品，如表2所示)。三种浓度下的回收率约在80%～100%之间，且相对标准偏差小于10.5%。本方法的检出限(LOD)推算为0.02 μg/kg，定量限(LOQ)为0.05 μg/kg。该法的检出限约是当前采用的GB T 22286-2008法(0.5 μg/ kg)的1/25。

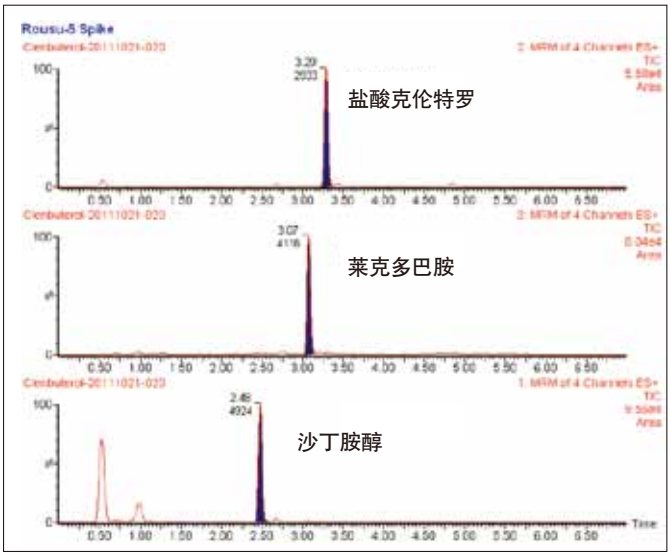

图3 对β-受体激动剂的肉加标样品进行UPLC-MS/MS分析时所得到的色谱图实例(β-受体激动剂的加标浓度为1 ng/mL，相当于每kg肉样中含有0.2 ug/kg)。

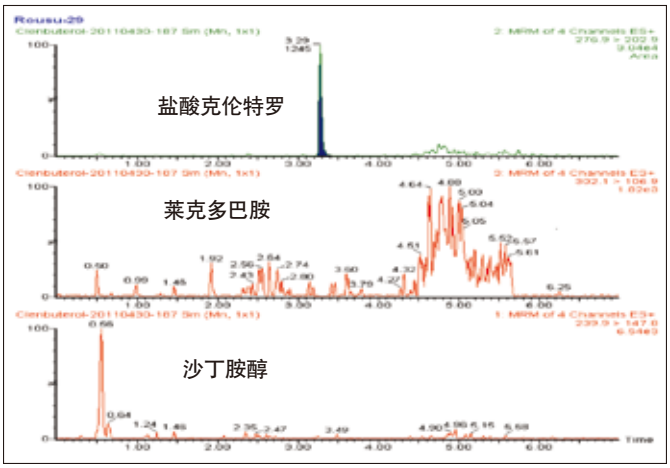

图4 肉样品的UPLC-MS/MS色谱图。在样品中仅检测到盐酸克伦特罗。检测到盐酸克伦特罗样品的含量为1.9 μg/kg。

加标量	盐酸克伦特罗		莱克多巴胺		沙丁胺醇	
	回收率%	相对标准偏差%	回收率%	相对标准偏差%	回收率%	相对标准偏差%
0.1 µg/kg	92.8	5.5	81.0	4.3	90.4	10.5
1.0 µg/kg	98.7	4.3	99.1	5.0	98.1	4.8
10.0 µg/kg	99.2	4.6	96.6	4.0	100.0	6.9

表2 三种浓度下的回收率。

采用本法对当地市场中购得的140种肉样品进行分析。
在所检测的140种肉制品中，有39%的肉制品含有盐酸克伦特罗，
其含量最高为4.8 µg/kg (0.2 ~ 4.8 µg /kg)。在样品中均未检测到莱克多巴胺及沙丁胺醇(数据未显示)。

UPLC色谱柱的可靠性

一些食品分析实验室对是否应采用UPLC技术存在疑虑，认为UPLC色谱柱使用寿命较短，不适于进行食品分析。在我们对肉制品中的β-受体激动剂分析及其它用UPLC色谱柱进行食品相关分析时，发现，只要对操作系统维护、并对流动相以及样品适度处理，[6]我们未发现有任何色谱柱寿命方面的问题。图5显示了我们在对肉制品中残留的β-受体激动剂进行常规分析的过程中，所得的有关ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱性能的比较图。比较在相同色谱柱上第1,600次进样与第5,500次进样时所得的色谱图，发现两个色谱图所显示的峰形及保留时间并无明显不同。这说明ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱具有很好的稳定性和耐用性，完全适用于食品分析。

除ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱以外，在我们采用其它UPLC色谱柱(例如UPLC BEH 300及ACQUITY UPLC BEH C_{18})时，发现这些色谱柱也具有极高的可靠性。在进行食品分析时，只要对色谱柱及系统进行适当的维护，这些色谱柱即使在5,000次进样之后仍表现出一致的柱效。这里未显示相关数据。

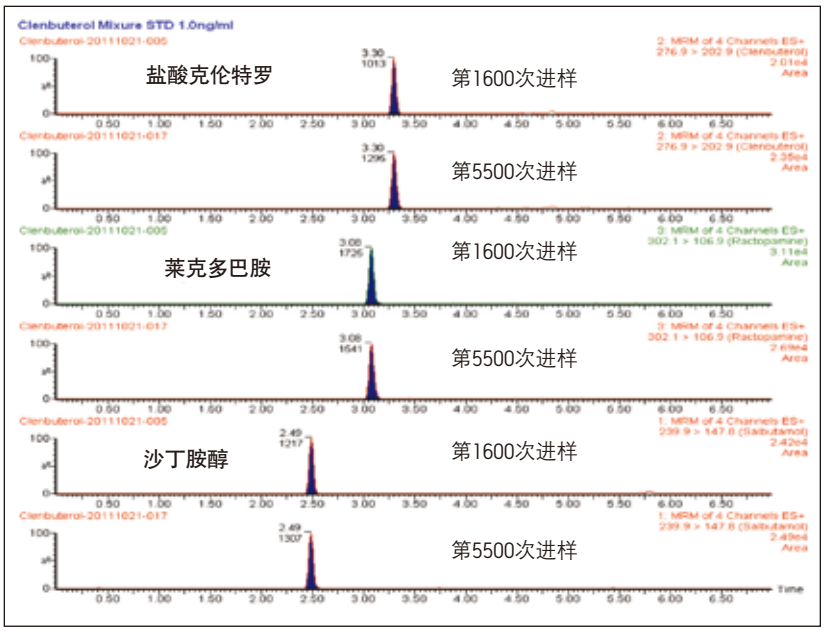

图5 比较了在进行β-受体激动剂混标分析时，不同进样次数的UPLC-MS/MS色谱图。三种β-受体激动剂的浓度均为1.0 ng/mL。每两个色谱图分别是在第1,600次进样及第5,500次进样时，由同一根ACQUITY UPLC色谱柱上采集的数据(如色谱图中所示)。

结论

- ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱成功地应用在肉制品中β-受体激动剂残留的分析。
- 与当前所采用的GB/T 22286-2008法相比，UPLC-MS/MS法，样品制备步骤更简单、运行时间更短、且溶剂使用量更少：
  - 与当前所采用的GB/T 22286-2008法相比，本UPLC-MS/MS分析法大幅提高了分析灵敏度(LOD 0.02 µg/kg)。
  - 提高了分析通量、减少了73%的运行时间(由GB法的26分钟/每个样品减少至7分钟/每个样品)、可耐受5500以上的进样次数，此时，相当于减少了1,925小时仪器运行时间、13.2 L的溶剂使用量。
  - 减少了46%的溶剂消耗(UPLC法分析一个样品，只需要2.8 mL溶剂，而GB法需要5.2 mL)。
- 在当地市场购置的140种肉制品的分析结果显示，39%的测试样品含有盐酸克伦特罗，其残留量为0.2～4.8 µg/kg不等。在本次分析中未检测到莱克多巴胺及沙丁胺醇。
- ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱的超高可靠性，使得在检测β-受体激动剂时，即使在5,000次进样之后，色谱柱性能仍然不变。

参考文献

1. Illegal use of beta-adrenergic agonists: European Community, J. Anim. Sci. 1998, 76:195-207.
2. 70 ill after eating tainted pig organs, China Daily, February 23, 2009 http://www.chinadaily.com.cn/china/2009-02/23/content_7501017.htm
3. Chinese Ministry of Agriculture Bulletin 176, February 9th, 2002.
4. Chinese Ministry of Agriculture Bulletin 235, December 24th, 2002.
5. Determination of beta-agonists residues in foodstuff of animal origin, liquid chromatography with tandem-mass spectrometric method, China National standard GB/T 22286-2008.
6. Controlling Contamination in UltraPerformance LC/MS and HPLC/MS Systems, Waters Literature 715001307EN, Rev. F.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY UPLC, Xevo, 和 UPLC 为沃特世公司的注册商标。
Waters和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。
其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2012年 沃特世公司 中国印刷
2012年6月 720004388ZH AG-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com