

郭蓉, 孙谦, 赵宇鑫, 等. 三重四极杆气质联用法测定熟肉及其制品中多组分 β -受体激动剂残留量[J]. 环境化学, 2019, 38(1): 231-234.
GUO Rong, SUN Qian, ZHAO Yuxin, et al. Determination of multi-component beta-agonist residues in meat and its products by triple quadrupole gas chromatography-mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(1): 231-234.



三重四极杆气质联用法测定熟肉及其制品中多组分 β -受体激动剂残留量

郭蓉^{1*} 孙谦² 赵宇鑫³ 梁晓聪¹

(1. 陕西省疾病预防控制中心, 西安, 710060; 2. 岛津企业(管理)中国有限公司, 西安, 710065;
3. 铜川市疾病预防控制中心, 铜川, 727031)

摘要 通过未检出 β -受体激动剂的熟肉作为空白样品, 采用酶解法将动物组织彻底分解, 以固相萃取小柱进行萃取净化, 净化液经衍生剂后经毛细管色谱柱程序升温分离, 利用 GC-MS/MS 多反应监测模式(MRM 模式)对目标物进行采集, 以氘代同位素化合物为内标进行内标法定量. 采用质控样品和加标回收率评价方法的准确度, 以回收率的相对标准偏差(RSD)评价方法的精密性. 12种 β -受体激动剂在 0.20—50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围线性关系良好, 相关系数在 0.9925—0.9995 范围内, 检出限为 0.2—0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 空白样品在 1.00、10.0、50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 水平的回收率为 65.5%—110.7%; RSD 为 1.16%—8.93%. 此方法假阳性率低、准确、可靠.

关键词 三重四极杆气质联用法, 多组分, β -受体激动剂, 熟肉及其制品.

Determination of multi-component beta-agonist residues in meat and its products by triple quadrupole gas chromatography-mass spectrometry

GUO Rong^{1*} SUN Qian² ZHAO Yuxin³ LIANG Xiaocong¹

(1. Shaanxi Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Xi'an, 710060, China; 2. Shimadzu (China) Co., Ltd., Xi'an, 710065, China; 3. Tongchuan City centre for Disease Control and Prevention, Tongchuan, 727031, China)

Abstract: Using meat without beta-agonist residues as the blank sample, then enzyme was used to let the animal tissues thoroughly decomposed, and the solid phase extraction was used to cleanse the sample. After extraction and purification, the purified liquid was separated by temperature programmed capillary column after derivatives. The multi-reaction monitoring mode (MRM model) of GC-MS/MS was used for data acquisition, and quantified by internal standard method with deuterium isotope compound as internal standard. Accuracy of the method was based on quality control samples and standard addition recovery rate. The relative standard deviation (RSD) of recovery rate was used to evaluate the accuracy of the method. The correlation coefficient of the 12 beta-agonist residues was in the range of 0.9925—0.9995, and the detection limit was 0.2—0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The recovery rate was 65.5%—110.7% and RSD was 1.16%—8.93%. This method was accurate, reliable and has low false positive rate.

Keywords: GC-MS/MS, multi-component, beta-agonist residues, meat and its products.

“瘦肉精”指一类具有相似结构的 β -受体激动剂的化合物, 能够促进蛋白质的合成, 提高瘦肉的比率, 主要包括克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特布他林、西马特罗、氯丙那林、妥布他林等. 人食用含有这类药物的肉品后, 会出现不同程度的中毒反应, 长期食用还会导致染色体畸变, 诱发恶性肿瘤, 甚至可危及生命. 自出现多起瘦肉精中毒事件后, 2002年我国农业部会同卫生部和国家药品监督管理局联合出台了《禁止在饲料和动物饮用水中食用的药品目录》, 将此类化合物列为禁用药品. 因此建立一种同时测定多种瘦肉精的方法具有实际价值.

目前, 检测“瘦肉精”的方法有免疫层析法、气相色谱-质谱联用(GC-MS)、酶联免疫吸附法(ELSA)和高效液相色谱

* 通讯联系人, E-mail: 253228192@qq.com

Corresponding author, E-mail: 253228192@qq.com

法(HPLC)、高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS)、酶联免疫吸附法检测“瘦肉精”快速便捷,但假阳性率较高;HPLC灵敏度相对较低,很容易受基底杂质的干扰,满足不了痕量检测的要求;UPLC-MS/MS法操作复杂,价格昂贵,不适于基层使用.我国已将高效液相色谱法(HPLC)作为检测饲料中盐酸克伦特罗残留的半确证法,将GC-MS法定为确证性方法,主要用于最后确认和仲裁.对于动物组织这种样品的基质极其复杂,而且对于加工的肉制品,其基质更加复杂,需要采用有效的检测方法,三重四极杆-气质联用法可以排除杂质干扰,检测目标化合物.

本文利用三重四极杆气质联用仪对熟肉及制品中的11种 β -受体激动剂含量进行测定,样品经处理后,利用MRM方式采集,即可消除基质干扰现象,同时也可避免假阳性现象的出现,为食品安全保驾护航.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 试验材料

仪器 三重四极杆气质联用仪 GCMS-TQ8040;固相萃取仪,氮吹仪,SLW 固相萃取柱(500 mg/6 mL),离心机,涡旋混匀器;

试剂 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶(sigma),双三基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)+1%(ϕ)三甲基氯硅烷(TMCS); β -受体激动剂标准品:马布特罗、特布他林、卡布特罗、克伦特罗、西马特罗、沙丁胺醇、克伦潘特、苯氧丙酰胺、班布特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、齐帕特洛; β -受体激动剂内标标准品:D9-克伦特罗、D3-沙丁胺醇、D3-莱克多巴胺;

1.2 实验条件

色谱条件 色谱柱:毛细管色谱柱 VF-1701MS,30 m \times 0.25 mm,0.25 μ m;载气:高纯氮气(99.999%);碰撞气:高纯氩气(99.999%);恒压模式,压力:73 kPa;进样口温度:250 $^{\circ}$ C;进样方式:不分流;进样量:1 μ L;程序升温:柱温程序:100 $^{\circ}$ C(3 min) $\xrightarrow{15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ 200 $^{\circ}$ C $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ 230 $^{\circ}$ C $\xrightarrow{20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ 280 $^{\circ}$ C(7 min).

质谱条件 电子轰击(EI)离子源温度:230 $^{\circ}$ C;接口温度:300 $^{\circ}$ C;EI源电子轰击能量70V;检测器器电压:相对调谐电压+0.5 kV 溶剂延迟:8.5 min;多重反应监测(MRM)模式,MRM参数见表1.

表1 β -受体激动剂及内标的保留时间及检测离子

Table 1 The retention time and detection ion of the beta-agonist residues and its internal standard

NO	化合物名称	内标	保留时间/min	定量离子	定性离子
1	氯丙那林	D3-沙丁胺醇	9.718	72.00>30.10(6)	72.00>43.10(12)
2	马布特罗	D3-沙丁胺醇	12.040	86.00>30.10(6)	72.00>57.10(12)
3	特布他林	D3-沙丁胺醇	13.477	86.00>30.20(6)	86.00>57.10(12)
4	D3-沙丁胺醇		14.294	86.00>30.10(6)	372.00>73.10(21)
5	沙丁胺醇	D3-沙丁胺醇	14.308	86.00>30.20(6)	369.00>73.10(21)
6	D9-克伦特罗		15.065	95.00>31.10(6)	95.00>66.20(12)
7	克伦特罗	D9-克伦特罗	15.153	86.00>30.20(6)	86.00>57.10(12)
8	克伦潘特	D9-克伦特罗	16.490	100.00>30.10(6)	100.00>43.10(15)
9	西马特罗	D9-克伦特罗	17.208	72.00>31.10(6)	72.00>43.10(12)
10	齐帕特罗	D9-克伦特罗	19.230	308.00>218.20(12)	308.00>73.10(21)
11	苯氧丙酰胺	D3-莱克多巴胺	19.658	178.00>107.10(15)	178.00>135.10(9)
12	卡布特罗	D3-莱克多巴胺	21.087	325.00>73.10(18)	86.00>30.10(6)
13	D3-莱克多巴胺		22.840	252.00>60.20(9)	268.00>73.10(18)
14	莱克多巴胺	D3-莱克多巴胺	22.854	250.00>60.20(9)	179.00>73.10(12)
15	班布特罗	D3-莱克多巴胺	23.136	86.00>30.10(6)	86.00 >57.10(12)

注:定性定量离子中括号内数字表示碰撞电压.

1.3 样品的前处理

称样、加内标 \rightarrow 加入缓冲盐、均质、酶解 \rightarrow 上清液过SPE柱净化 \rightarrow 氮吹干后、80 $^{\circ}$ C衍生1 h \rightarrow 氮气吹干,加入0.2 mL甲苯上GC-MS/MS分析.

1.4 分析方法

称取5 g经绞碎均匀的动物组织于50 mL聚乙烯离心管中,分别加入50 μ L 1.0 mg \cdot L $^{-1}$ 受体激动剂内标混合液,静置10 min,加入15 mL 0.2 mol \cdot L $^{-1}$ pH 5.2 乙酸钠-醋酸缓冲溶液,用匀质机匀质20 s,加入50 μ L β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶液,在37 $^{\circ}$ C水浴中水解16 h后取出冷却,8000 r \cdot min $^{-1}$ 离心10 min,分出上层溶液(注意如果页面有脂肪析出,可以用棉花过滤),用2.0 mol \cdot L $^{-1}$ 盐酸溶液调节至pH 2.0 \pm 0.1(pH测定仪),再在8000 r \cdot min $^{-1}$ 离心10 min,分出上清液待用.取SLW固相萃取柱,先用甲醇5 mL、水5 mL、50 mmol \cdot L $^{-1}$ 盐酸5 mL活化柱子,然后将10 mL上清液加到柱子上过柱,再

用 5 mL 水淋洗除杂,真空泵抽干 5 min,先用 5 mL 甲醇洗脱,然后用 10 mL 5% 氨化乙酸乙酯洗脱收集,在 50 °C 水浴中氮气吹干.蒸发剩余物加 0.1 mL 双三甲基硅基三氟乙酰胺 (BSTFA)+1% (ϕ) 三甲基氯硅烷 (TMCS),在 80 °C 的烘箱中加热衍生 1.0 h,氮气吹干,加 0.2 mL 甲苯溶解;另外分别取标准溶液,加 50 μ L 内标使用液,氮气吹干后与样品同时进行衍生.取 1.0 μ L 甲苯溶液进行 GC-MS/MS 分析.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 MRM 扫描图谱

图 1 为 12 种“瘦肉精”有机物的扫描质谱图.图 1 为 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准溶液,内标浓度为 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TIC 质谱图.

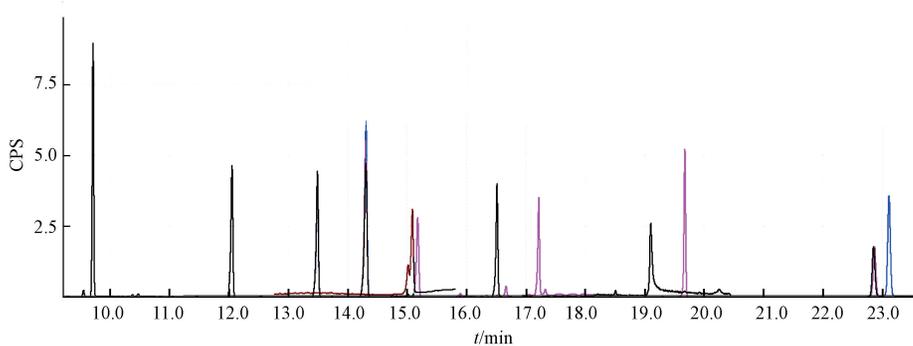


图 1 12 种 β -受体激动剂及其 3 种内标 TIC 图

Fig.1 The TIC chart of the beta-agonist residues and its internal standard

2.2 线性范围、回归方程及检出限

在 0.20—50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的线性范围内,方法呈现较好的线性相关,相关系数 r 在 0.9925—0.9995 范围内,满足动物组织中瘦肉精检测的要求.以空白加标测定信噪比,重复测定 3 次;以 3 倍信噪比计算,方法的检出限为 0.2—0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,结果见表 2.

表 2 12 种瘦肉精标准的线性范围、回归方程及检出限 ($n=3$)

Table 2 The linear range, regression equation and detection limit of 12 beta-agonist residues standards ($n=3$)

化合物	回归方程	相关系数	检出限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
氯丙那林	$y=3.33\times 10^{-2}x-3.31\times 10^{-2}$	0.9952	0.4	2.0
马步特罗	$y=2.31\times 10^{-2}x+7.40\times 10^{-2}$	0.9958	0.4	2.0
特布他林	$y=2.58\times 10^{-2}x+2.40\times 10^{-2}$	0.9993	0.2	1.0
沙丁胺醇	$y=1.54\times 10^{-2}x+1.16\times 10^{-2}$	0.9992	0.2	1.0
克伦特罗	$y=1.72\times 10^{-2}x+1.83\times 10^{-3}$	0.9995	0.4	2.0
克伦潘特	$y=1.62\times 10^{-2}x+1.57\times 10^{-2}$	0.9988	0.4	2.0
西马特罗	$y=1.58\times 10^{-2}x-2.05\times 10^{-2}$	0.9988	0.4	2.0
齐帕特罗	$y=6.60\times 10^{-4}x-4.87\times 10^{-3}$	0.9925	0.4	2.0
苯氧丙酰胺	$y=1.89\times 10^{-2}x-1.12\times 10^{-2}$	0.9926	0.4	2.0
卡布特罗	$y=1.69\times 10^{-2}x-2.16\times 10^{-2}$	0.9958	0.4	2.0
莱克多巴胺	$y=1.58\times 10^{-2}x-7.32\times 10^{-3}$	0.9976	0.4	2.0
班布特罗	$y=5.66\times 10^{-2}x+2.27\times 10^{-2}$	0.9969	0.4	2.0

注: Y 代表浓度, x 代表强度.

2.3 方法准确度

采用标准添加法,在动物组织样品中分别添加 3 个质量浓度水平的 12 种瘦肉精混合标准溶液,加标浓度分别为 1.00、10.0、50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,每个浓度点重复测定 6 次,计算加标回收率及其相对偏差 (RSD).结果表明,11 种瘦肉精的回收率为 65.5%—110.7%;RSD 为 1.16%—8.93% (表 3).

表3 方法的回收率及精密度试验结果($n=6$)Table 3 The recovery and precision test results of the method ($n=6$)

化合物	1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	
	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
氯丙那林	65.5	4.91	68.3	5.63	70.8	3.27
马步特罗	86.1	5.24	88.4	3.03	88.5	2.15
特布他林	110.7	1.99	109.5	1.48	111.4	2.76
沙丁胺醇	105.2	4.03	106.9	3.77	107.1	3.05
克伦特罗	97.7	6.10	98.2	3.59	100.3	3.32
克伦潘特	82.6	3.86	89.1	2.34	88.9	1.16
西马特罗	89.4	7.87	90.5	2.61	91.1	5.28
齐帕特罗	65.5	8.93	68.3	7.24	70.8	3.64
苯氧丙酰胺	92.6	6.62	95.8	3.14	101.4	3.07
卡布特罗	100.4	4.45	100.6	3.36	101.1	2.27
莱克多巴胺	96.4	3.68	97.3	5.31	99.8	2.84
班布特罗	103.6	1.52	105.3	2.78	108.7	1.59

2.4 质控样品的测定

应用本方法对猪肉粉中克伦特罗兽药残留检测质控样品(大连中食国实检测技术有限公司;样品编号:CFAPA-QC022B-2)以及猪肉粉中莱克多巴胺兽药残留检测质控样品(大连中食国实检测技术有限公司;样品编号:CFAPA-QC022B-3)进行了测定.其测定结果见表4所示.由测定结果可以看出,其结果均在标准值之内,说明该方法的准确度很好.

表4 质控样品测定结果

Table 4 The determination results of quality control samples

化合物名称	测定值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	标准值 \pm 标准偏差/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$
克伦特罗	33.34	23.59 \pm 10.83
莱克多巴胺	28.09	26.65 \pm 14.40

2.5 实际样品的测定

应用本方法的条件,对从市场上购买的4份熟牛肉、3份熟羊肉、4份熟羊肝和4份猪肉制的香肠样品进行了测定.结果发现:15份样品中均未检测到目标成分.

3 结论(Conclusion)

本文建立了利用三重四极杆气质联用仪(GC-MS/MS)测定动物源性食品中12种 β -受体激动剂含量的方法,该方法利用GC-MS/MS独有的MRM采集模式,不仅灵敏度高,而且可以去除动物源性样品对目标化合物的干扰,有效消除假阳性现象,准确性更高.12种 β -受体激动剂在0.2—500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围内线性良好,相关系数在0.9925—0.9995之间,检出限0.2—0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,在1、10、50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的加标浓度下平均回收率为65.5%—110.7%,RSD为1.16%—8.93%.该结果完全满足日常食品安全监管的要求,可为食品安全的监管提供可靠结果.