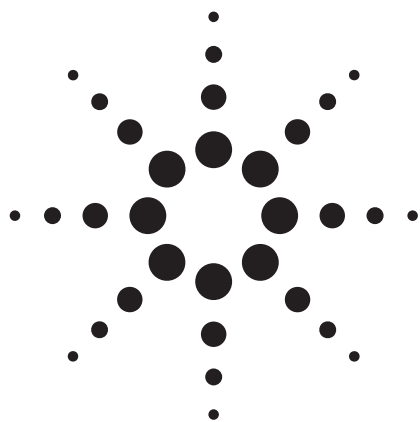




利用安捷伦 SampliQ SCX 固相萃取柱和液相色谱/串联质谱联用检测猪肉中的 β 2-激动剂

应用报告

食品安全

作者

Chenhao Zhai
安捷伦科技有限公司
中国上海外高桥保税区，英伦路 412 号
上海，200131
中国

Jianzhong Li and Yue Song
安捷伦科技有限公司
福州路 318 号, 高腾大厦 11 楼
上海 200001
中国

摘要

本应用报告开发并验证了一种同时检测四种 β 2-激动剂残留物的方法，包括特布他林、沙丁胺醇、克仑特罗和福莫特罗。分析物经过液-液萃取(LLE)和固相萃取(SPE)纯化后，由正离子多反应监测模式下的液相色谱耦合电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)进行定量。该方法为检测猪肉中四种 β 2-激动剂提供了亚 ng/g 水平的检测限 (LOD)，以及 0.25 至 5 ng/g 的动态校准范围。总回收率为 78%至 101%，相对标准偏差(RSD)为 1.8%至 7.2%。



Agilent Technologies

前言

β 2-激动剂是广泛应用于猪肉生产中的一种非法生长促进剂。最近发生的中毒事件都是因为猪肉中含有高水平的 β -激动剂（克仑特罗）。本应用报告采用了安捷伦公司新推出的固相萃取（SPE）产品来提取和浓缩猪肉中的 β -激动剂，并采用 LC-MS/MS 进行分析。表 1 给出了四种 β -激动剂化合物的名称和结构。

表 1. 本研究中采用的 β 2-激动剂化合物

化合物	Log P	结构
特布他林	0.55	
沙丁胺醇	0.44	
克仑特罗	2.94	
福莫特罗	1.91	

实验

试剂及药品

所有试剂都是质谱纯级、高效液相纯级或分析纯级。

乙腈和水由 Scharlau 公司提供。乙酸乙酯、异丙醇由 Fisher 公司提供。标准物均采购自国家药品生物制品检定所（NICBPB）。猪肉则由本地市场采购。

以甲醇配制单个标准溶液（1.0 mg/mL），并在 4 °C 下冷藏。以甲醇-水(10:90) 配制合并工作溶液（10 μ g/mL），并在 4 °C 下冷藏。添加溶液应每周配制，以适当稀释合并工作溶液来制备。

设备与材料

安捷伦 1200 高效液相色谱系统

安捷伦 6460 三重四极杆液相色谱-质谱/质谱联用系统

安捷伦 SampliQ SCX 聚合物柱，50 $\times$ 3 mL 管，60 mg（部件号：5982-3236）

安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱，50 $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m（部件号：959741-906）

安捷伦真空歧管处理盒(部件号: 5982-9120)

样品制备

液-液提取

于 15mL 带盖聚丙烯管中称取 2 g 猪肉（精确至 ± 0.01 g）。加入 8 mL 0.2M 的乙酸钠（pH 值 5.2）溶液，并涡旋以混合均匀。然后加入 100 μ L β -葡萄糖醛酸酶（1000 U/mL）并涡旋混合 2 分钟。样品在 37 °C 下水解 16 小时。

水解产物经震动处理 15 分钟后，在离心机中用 4000rpm 的速度离心分离 10 分钟。取 4 mL 上层清液至另一离心管中，加入 5 mL 0.1M 高氯酸溶液并调节 pH 值至 1 ± 0.3 ，再在离心机中以 4000 rpm 的速度离心分离 10 分钟。将上层清液移至另一试管中，用 10M 氢氧化钠溶液调节其 pH 值至 11。

于样品试管中分别添加 10 mL 饱和氯化钠溶液和异丙醇-乙酸乙酯（60:40）混合液，并震动处理 5 分钟。以 4000 rpm 离心分离 5 分钟后，将有机层仔细转移至另一离心管中。将异丙醇-乙酸乙酯混合液的添加、震动处理、离心分离和转移有机液层的过程重复两次，并将所有上清液合并。

样品于 40 °C 以氮气吹干，并将残留物复溶于 5 mL 0.2M 的乙酸钠（pH 值 5.2）溶液中。该样品将用于固相萃取纯化。

固相萃取

固相萃取过程（SPE）如图 1 中所示。先用 3 mL 甲醇活化安捷伦 SampliQ SCX 柱，然后用 3 mL 水平衡。取 5 毫升样品溶液载入到柱中，并以重力通过色谱柱（约 1 mL/min）。用 2 mL 水和 2 mL

2%甲酸水溶液冲洗 SPE 小柱，丢弃所有洗脱液。真空抽干 SPE 小柱。最后以 5 mL 5%氨甲醇溶液洗脱，流速约为 1 mL/min。洗脱液于 40 °C 氮气吹干，残留物复溶于 1 mL 0.1%甲酸的水/乙腈（90:10）溶液。样品经涡旋混合和超声波处理以完全溶解后转移至 1.5 mL 离心管中，并在 3000 rpm 条件下处理 5 分钟。最后将样品转移至 2 mL 的色谱小瓶中等待分析。



图 1. 猪肉的清理和浓缩-固相萃取过程

仪器条件

高效液相色谱条件

色谱柱:	安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱， 50 × 2.1 mm, 1.8 μm (部件号: 959741-906)		
流速:	0.4 mL/min		
柱温:	40 °C		
进样体积:	5 μL		
流动相:	水（0.1%甲酸溶液+2mM 乙酸铵，A）， 乙腈（0.1%甲酸，B）		
梯度淋洗:	时间（分钟）	%A	%B
	0	90	10
	0.5	90	10
	1.8	20	80
	2	90	10
	3.5	90	10

质谱条件

在正离子模式下对 4 种化合物进行了监测。离子源条件如图 2 所示，多反应监测通道如表 2 中所示。

Source parameters	
Gas Temp:	325 °C
Gas Flow:	5 l/min
Nebulizer:	45 psi
Sheath Gas Temp:	400 °C
Sheath Gas Flow:	12 l/min
Capillary:	4000 V
Nozzle Voltage:	0 V
Chamber Current:	0.19 μA

图 2. 四种化合物的质谱源参数

表 2. 多反应监测模式的质量监测

化合物	定量多反应监测	确认多反应监测
特布他林	226.1 → 152.1	226.1 → 125
沙丁胺醇	240.1 → 148.1	240.1 → 222.1
克仑特罗	277 → 203	277 → 259.1
福莫特罗	345.1 → 149.1	345.1 → 327.1

结果与讨论

线性与检测限

标准工作曲线（0.25, 0.5, 1.0, 2.0 和 5.0 ng/g）是以添加适量混合工作溶液于空白基质来配制的。空白基质是通过将猪肉进行水解、液液萃取和固相萃取来制备的。校准曲线的结果如表 3 中所示。检测限(LOD)定义为每个化合物给出信噪比(S/N)大于 3:1 的时浓度。各化合物的检测限也列于表 3 中。

表 3. β2-激动剂的线性和检测限

化合物	回归方程	R ²	猪肉中的检测限(ng/g)
特布他林	Y = 3470x + 1325.4	0.9972	0.05
沙丁胺醇	Y = 13099x + 2900.3	0.9921	0.05
克仑特罗	Y = 27028x + 1143.7	1	0.02
福莫特罗	Y = 23251x + 487.44	0.9983	0.02

回收率和重现性

在猪肉中分别添加标样浓度为 0.5, 1.0, 2.0 ng/g, 计算回收率和重现性。每个浓度重复分析 6 次。回收率和重现性数据列于表 4 中。添加猪肉萃取物 (1.0 ng/g) 的色谱图如图 3 中所示。

表 4. 采用安捷伦 SampliQ SCX 进行固相萃取猪肉中 β 2-激动剂的回收率和重现性; (部件号: 5982-3236), 平均回收率 90%, 平均相对标准偏差 4.4%

化合物	添加浓度 (ng/g 猪肉)	回收率 (%)	相对标准偏差 (n=6)
特布他林	0.5	88.7	5.4
	1	98.0	7.2
	2	100.8	5.9
沙丁胺醇	0.5	100.6	1.8
	1	92.9	2.1
	2	97.4	3.9
克仑特罗	0.5	82.3	5.0
	1	91.5	6.3
	2	90.6	4.3
福莫特罗	0.5	85.1	1.9
	1	83.0	4.0
	2	77.9	2.5

1.0 ng/g 添加猪肉样品经安捷伦 SampliQ SCX(p/n: 5982-3236)进行固相萃取净化后的色谱图

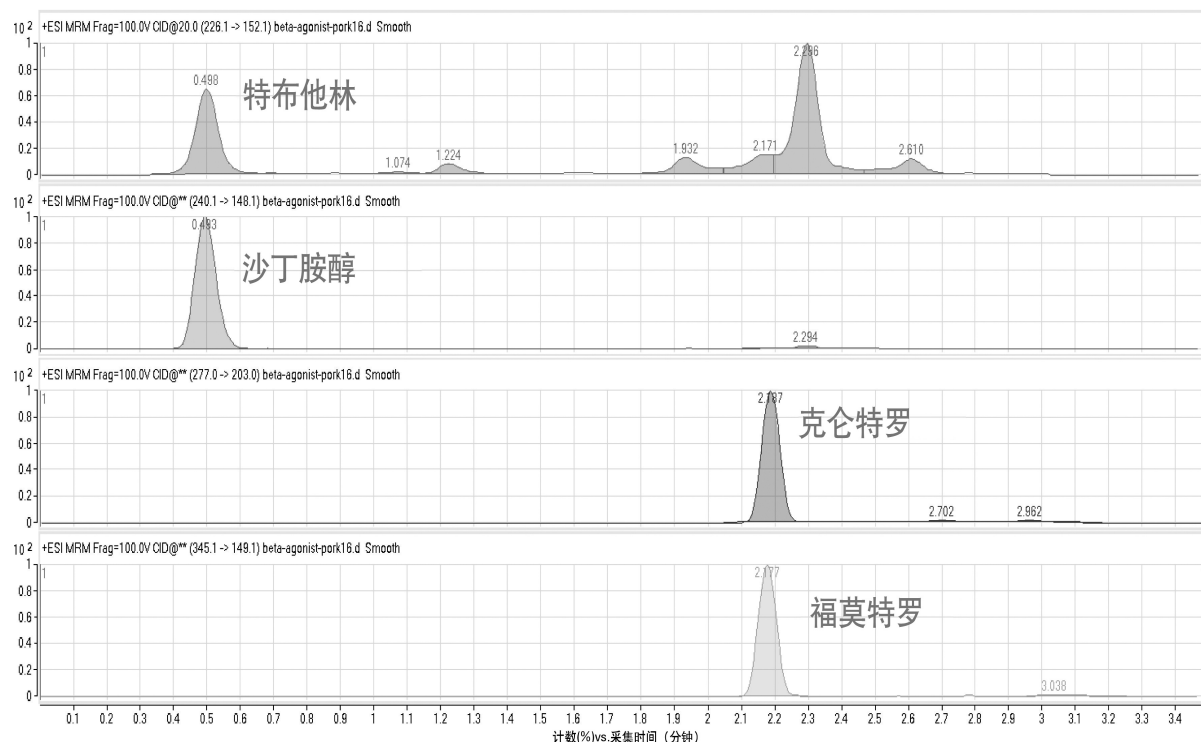


图3. 1.0 ng/g 添加猪肉样品萃取物的色谱图

结论

研究表明, 安捷伦 SampliQ SCX 可以作为在复杂基体中 (如猪肉) 进行多种 β 2-激动剂的纯化和浓缩的有效方法。用标准添加基质所测定的回收率和重现性, 符合猪肉中 β 2-激动剂残留物检测的中国国家标准。杂质以及基质效应是不会干扰任何目标化合物的定量, 最低定量限明显低于最高残留限量[1,2]。

参考文献

1. GB/T 21313-2007“动物源性食品中 β 2-激动剂的高效液相色谱串联质谱法分析”
2. SN/T 1924-2007“进出口动物源性食品中的克仑特罗、雷托巴胺、沙丁胺醇和特布他林残留物的高效液相色谱-质谱/质谱联用法测定”

更多信息

有关我们产品和服务的更多信息, 请访问
www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和规格，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2009

中国

2009 年 7 月 20 日

5990-4180CHCN



Agilent Technologies