

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.07.015

超高效液相色谱—串联质谱同时测定猪肉中传统型和新型瘦肉精

Simultaneous determination of traditional and new types of "lean meat powder" in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

刘迪^{1,2} 韩莉^{1,2} 黄坤^{1,2} 王彬^{1,2}

LIU Di^{1,2} HAN Li^{1,2} HUANG Kun^{1,2} WANG Bin^{1,2}

王亨^{1,2} 余婷婷^{1,2} 王会霞^{1,2}

WANG Heng^{1,2} YU Ting-ting^{1,2} WANG Hui-xia^{1,2}

(1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 湖北 武汉 430075;

2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北 武汉 430075)

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan, Hubei 430075, China; 2. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan, Hubei 430075, China)

摘要:建立一种超高效液相色谱—串联质谱同时测定猪肉中传统型和新型“瘦肉精”(克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特布他林、异丙喘宁、氯丙那林、西马特罗、非诺特罗和噻乙醇及其代谢物)的分析方法。结果显示,在 0.2~20.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内各化合物有良好的线性关系,相关系数 $>0.996 2$ 。非诺特罗、莱克多巴胺和氯丙那林的检出限和定量限分别为 0.1, 0.3 $\mu\text{g/kg}$; 克伦特罗的检出限和定量限分别为 0.05, 0.2 $\mu\text{g/kg}$, 其他化合物的检出限和定量限分别为 0.2, 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。在 3 个添加水平下,各目标化合物的回收率为 89.1%~121.5%, 相对标准偏差为 2.6%~12.9% ($n=6$)。该检测方法快速、准确、灵敏度高,适用于猪肉等动物源性食品中传统型和新型“瘦肉精”残留的测定和确证。

关键词:超高效液相色谱—串联质谱;猪肉;瘦肉精; β -受体激动剂;噻乙醇

Abstract: An analytical method for the simultaneous determination of new and traditional "lean meat powder" (Clenbuterol, Salbutamol, Ractopamine, Terbutaline, Isoproprane, Chlorpheniramine, Simmatrol, Fenoterol and Olaquinox and its

metabolites) in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was established. Pork samples were extracted with 2% formic acid-acetonitrile solution. The extracts were purified by neutral alumina column. After being dried and concentrated by nitrogen, the hexane was degreased and determined by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantified by internal standard method. Waters HSS C₁₈ column (100 mm \times 2.1 mm, particle size 1.8 μm) was used. The mobile phase was separated by acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution. The electrospray ionization mode was used to determine the multi-reaction monitoring mode. The test can be completed in 7 minutes. The results showed that there was a good linear relationship between the compounds in the range of 0.2~20 $\mu\text{g/L}$, and the correlation coefficient was greater than 0.996 2. The detection limits and quantitation limits of fenoterol, ractopamine and clorprenaline were 0.1 $\mu\text{g/kg}$ and 0.3 $\mu\text{g/kg}$; the detection limits and quantitation limits of clenbuterol were 0.05 $\mu\text{g/kg}$ and 0.2 $\mu\text{g/kg}$, the detection limits and limit of quantitation of other compounds were 0.2 $\mu\text{g/kg}$ and 0.5 $\mu\text{g/kg}$. At the three levels of addition (detection limit, 2 times limit of detection, 10 times limit of detection), the recovery of each target compound was 89.1% to 121.5%, and the relative standard deviation was 2.6% to 12.9% ($n=6$). The method is rapid, accurate and sensitive, and is suitable for the determination and confirmation of traditional and new "lean meat powder" residues in animal-derived foods such as pork.

基金项目:湖北省自然科学基金(编号:2018CFB339)

作者简介:刘迪,男,湖北省食品质量安全监督检验研究院工程师,硕士。

通信作者:余婷婷(1985—),女,湖北省食品质量安全监督检验研究院工程师,博士。E-mail: 271377735@qq.com

收稿日期:2019-02-26

Keywords: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; pork; "lean meat powder"; β -receptor agonist; olaquinox

“瘦肉精”是一种特定的可用来减少被饲养类动物的脂肪、增加其瘦肉比例的药物的俗称。传统型瘦肉精一般是指 β -受体激动剂,是一类人工合成的苯乙醇胺类物质,包括克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特布他林、异丙喘宁、氯丙那林、西马特罗、非诺特罗等。该类药物在动物性食品中的残留会对消费者身体造成不同程度的影响,对于易感人群危害更为严重^[1-2]。而被视为新型“瘦肉精”的唑乙醇并不属于瘦肉精类药物,它不具备传统瘦肉精药物的生物学和化学特点,化学结构也相差甚远,所造成的食品安全危害也不尽相同。唑乙醇为代表的抗生素,是一种化学合成的生长促进剂,可促进机体蛋白质合成代谢,提高饲料能量利用率,增加畜禽养殖效率,减少养殖过程中疾病发生几率^[3],因此可加快畜禽生长发育,提高个体瘦肉率。唑乙醇具有中度至明显的蓄积毒性,对大多数动物有明显的致畸作用,对人体也存在致畸形、致突变、致癌性^[4]。唑乙醇本身不稳定,在动物体内可快速代谢,代谢产物中 3-甲基-喹啉啉-2-羧酸(methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid, MQCA)为唑乙醇的主要代谢产物,在动物体内滞留时间长,且含量与残留关系稳定,能反映唑乙醇的残留情况,被确定为残留标志物^[5]。

2002 年, β -受体激动剂被列入《食用动物禁用兽药及其他化合物清单》^[6],对于唑乙醇中国禁用于禽及水产养殖,仅允许用作育成猪(体重 <35 kg)的饲料添加剂^[7];而欧盟早在 1998 年就已禁止唑乙醇作为饲料添加剂^[8]。现阶段,对 β -受体激动剂和唑乙醇及其代谢物的检测方法较多。刘佳等^[9]建立了一种猪肝中 26 种 β_2 -受体激动剂药物残留的反相液相色谱—串联质谱检测方法,26 种 β_2 -受体激动剂在 5, 10, 20 $\mu\text{g/L}$ 添加水平的回收率为 64.0%~112.7%,相对标准偏差 $<15.2\%$,方法检出限为 0.15~1.35 $\mu\text{g/kg}$;金玉娥等^[10]也采用液相色谱—串联质谱测定了猪肉和猪肝中 11 种 β_2 -受体激动剂,采用内标法定量,可以满足食品安全法规的需要;Zhang 等^[11]、薛良辰等^[12]、欧阳珊等^[13]、Bodi 等^[14]、Merou 等^[15]、Sniegocki 等^[16]分别用液相—质谱/质谱测定了唑乙醇及其代谢物的含量,都取得了比较理想的结果。但上述研究的前处理过程都比较复杂,一般包括酶解、提取、固相萃取的过程,比较费时费力。生物样品基质复杂,内源性物质会干扰检测结果。液相串联质谱联用法特异性强、灵敏度高,是现阶段最主要的检测技术手段,但是同时检测 β -受体激动剂和唑乙醇及其代谢物的高效液相串联质谱检测分析法未见报道。本试验拟建立同时检测猪肉中 β -受体激动剂和唑乙醇及其代谢物的超高效液相串联质

谱联用的分析方法,以期快速检测和监管猪肉中瘦肉精残留提供技术保障,为动物源食品中兽药残留高通量快速分析检测提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

试验所用样品为市售猪肉,且所有的阴性样品均通过国家标准方法测定验证。

标准品(纯度 $\geq 99\%$): 唑乙醇(olaquinox, CAS 号: 23696-28-8)、3-甲基-喹啉啉-2-羧酸(methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic, MQCA, CAS 号: 74003-63-7)、3-甲基-喹啉啉-2-羧酸- D_4 (MQCA- D_4)、喹啉啉-2-羧酸- D_4 (quinoxaline-2-carboxylic- D_4 , QCA- D_4 , CAS 号: 879-65-2)、异丙喘宁(Metaproterenol, CAS 号: 5874-97-5)、氯丙那林(Clorprenaline, CAS 号: 3811-25-4)、西马特罗(Cimaterol, CAS 号: 54239-37-1)、特布他林(Terbutaline, CAS 号: 23031-25-6)、沙丁胺醇(Salbutamol, CAS 号: 18559-94-9)、莱克多巴胺(Ractopamine, CAS 号: 97825-25-7)、克伦特罗(Clenbuterol, CAS 号: 129138-58-5)、非诺特罗(Fenoterol, CAS 号: 13392-18-2)、沙丁胺醇- D_3 (Salbutamol- D_3)、莱克多巴胺- D_3 (Ractopamine- D_3)、克伦特罗- D_3 (Clenbuterol- D_3),德国 Dr.Ehrenstorfer 公司;

乙腈、甲醇、乙酸乙酯、甲酸: 色谱级,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

盐酸、氢氧化钠: 分析纯,国药集团化学试剂有限公司; 试验用水: 电阻率 ≥ 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$, Milli-Q 制备超纯水; C_{18} 、HLB、MCX、MAX、中性氧化铝固相萃取柱: 美国 Waters 公司。

1.2 仪器与设备

超高效液相色谱仪: Acquity UPLC H-class 型,美国 Waters 公司;

串联四级杆质谱仪: Xevo TQ-XS 型,美国 Waters 公司; 电子天平: ME2002E、XS204 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

翻转式混匀器: Trayster 型,德国 IKA 公司;

低温冷冻离心机: Allegra X-15R 型,美国贝克曼库尔特有限公司;

氮吹仪: N-EVAP24 型,美国 Organomation 公司; 涡旋混合器: EOF0-945601 型,美国亨利特里姆公司; 均质器: T25 型,德国 IKA 公司; 超声波清洗仪: S90H 型,德国 Elma 公司。

1.3 标准溶液的配制

用甲醇分别溶解各种标准品,配制成质量浓度为 10 mg/L 的标准储备液和 1 mg/L 的同位素内标标准储备液,储存于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,保存期限为 3 个月。使用时根据需要配成不同质量浓度的中间混合标准溶液,同位

素内标液同样按照需要配制成中间混合标准溶液。标准工作液临用前用 0.1% 甲酸水溶液将标准储备液溶液配制为 0.2~20.0 $\mu\text{g/L}$ 的同位素内标标准曲线。

1.4 样品的前处理

称取 5.00 g 捣碎的猪肉,置于 50 mL 的聚丙烯离心管中;加入 100 μL 混合同位素内标标准溶液,加入 10 mL 含 2% 甲酸的乙腈溶液;匀浆提取 1 min,超声提取 15 min,4 000 r/min 离心 5 min;取上清液转移至 25 mL 比色管中。另取一离心管加入 10 mL 含 2% 甲酸的乙腈溶液,洗涤匀浆刀头 0.5 min;洗涤液移入前一离心管中,用玻璃棒捣碎残渣,涡旋混匀器涡旋 1 min,超声提取 10 min,4 000 r/min 离心 5 min;合并上清液,用含 2% 甲酸的乙腈溶液定容至刻度,摇匀备用。

准确移取 5.0 mL 样品溶液至已活化的中性氧化铝固相萃取柱上,用试管收集流出液;用 5 mL 含 2% 甲酸的乙腈溶液洗涤中性氧化铝柱,收集全部流出液,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,用 1.0 mL 含 0.1% 甲酸水溶液溶解残渣,超声振荡 1 min;加入 3 mL 正己烷溶液,涡旋 2 min,4 000 r/min 离心 5 min;取下层溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后供液相色谱—串联质谱测定。

1.5 UPLC 条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm,1.8 μm);柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;进样量:5 μL ;流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为乙腈。梯度洗脱程序如下:0.0~1.0 min,A 保持 95% 不变;1.0~2.5 min,

95%~50% A;2.5~3.0 min,A 保持 50% 不变;3.0~4.0 min,50%~5% A;4.0~5.0 min,A 保持 5% 不变;5.0~5.1 min,5%~95% A;5.1~7.0 min,A 保持 95% 不变;流速:0.25 mL/min。

1.6 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(ESI 源),扫描方式采用正离子模式,检测方式采用多反应监测(MRM);毛细管电压 2.8 kV,离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度 400 $^{\circ}\text{C}$,锥孔气为高纯氮气,流量 150 L/h;脱溶剂气为高纯氮气,流量 800 L/h,碰撞气为高纯氩气。各物质的质谱多反应监测条件如表 1 所示。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的确定

根据这些化合物的化学结构和性质,在正离子扫描模式下,用蠕动泵按照化合物的绝对响应,以一定的速度对标准物质进行流动注射分析,对质谱参数进行优化处理。通过一级质谱全扫描模式分析确定分析物的分子离子,调试选择最佳的毛细管电压和锥孔电压,找到[M+H]⁺丰度最高的作为母离子,接着对分析物母离子进行二级质谱分析,获取碎片离子信息,优化碰撞能量等相关参数;选择信噪比最强和次强的两个子离子分别作为定量和定性离子,同位素内标物质只需要选择信噪比最强的子离子。最终确定的质谱的多反应监测条件参数见表 1。

表 1 各目标化合物的质谱参数[†]

Table 1 Mass spectrometry parameters of each target compound

分析物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
异丙喘宁	2.11	212.1	152.1,194.1*	35	18,12
特布他林	3.36	226.1	125.0,152.0*	25	26,16
沙丁胺醇-D ₃	3.48	243.2	151.1	25	16
沙丁胺醇	3.52	240.2	148.1*,222.1	25	20,12
西马特罗	3.75	220.0	159.9,202.0*	28	18,10
喹乙醇	3.86	264.1	143.1*,212.1	44	28,20
非诺特罗	4.02	304.2	107.0,135.1*	50	32,18
莱克多巴胺	4.28	302.2	164.1*,284.2	30	15,12
莱克多巴胺-D ₃	4.28	305.0	167.0	30	14
氯丙那林	4.32	214.1	154.0,196.1*	40	18,11
喹噁啉-2-羧酸-D ₄	4.36	179.0	133.0	29	17
3-甲基-喹噁啉-2-羧酸-D ₄	4.44	193.0	149.0	34	15
3-甲基-喹噁啉-2-羧酸	4.45	189.0	143.0,145.0*	30	15,14
克伦特罗	4.51	277.1	132.0,203.0*	25	28,15
克伦特罗-D ₉	4.51	286.1	204.0	25	16

[†] * 为定量离子。

2.2 色谱条件的确定

根据 β -受体激动剂苯环上取代基的差异,可分为苯胺型和苯酚型。 β -受体激动剂极性较大;苯胺型 β -受体激动剂、啞乙醇以及 MQCA 为中等极性极性。 β -受体激动剂一般是弱碱性化合物,而啞乙醇及其化合物为酸性化合物。这些目标化合物在 C_{18} 柱上都有好的保留效果,碱性化合物在中等 pH 值流动相条件下的峰形容易出现拖尾。本研究对比了 Waters ACQUITY UPLC HSS C_{18} 和 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 分析目标物时的效果,这两支色谱柱的粒径 $< 2.0 \mu\text{m}$ 。ACQUITY UPLC HSS C_{18} 色谱柱采用三键键合 C_{18} 配体和专有的端机封尾技术,可以改善碱性化合物的峰形,还能有效抑制酸性条件下键合相的水解。

前期预试验结果表明:采用 Waters ACQUITY UPLC HSS C_{18} 柱分析样品时,各化合物的峰形更优,并且各化合物之间的分离度更优。因此,本研究选用 Waters ACQUITY UPLC HSS C_{18} 色谱柱。同时,在正离子模式下加入一定量的甲酸可以提高离子化效率和分离度,比较了甲醇、乙腈分别作为有机相与 0.1% 甲酸溶液组成流动相的效果。乙腈作为有机相时比甲醇作为有机相时各物质的灵敏度略高,故选用乙腈—0.1% 甲酸溶液作为流动相。在优化的色谱条件下,各化合物的峰形尖锐,并且可以在 7 min 内完成目标物的分离和色谱柱的分离。各目标化合物的选择离子流色谱图见图 1。

2.3 提取方式的选择

β -受体激动剂和啞乙醇及其代谢物的提取方式,大多

为水解后通过后续净化再检测。水解方式包括酶解^[17-18]、酸解^[19-20]、碱解^[21-22]。酶解过程条件温和,但需要 16 h 以上,耗时长且步骤繁琐,而且不适合这两类物质的同时检测;强碱水解效果好,可以有效水解蛋白质,但是反应通常较为剧烈,会造成有些化合物(如 MQCA)的降解;酸水解反应较碱水解温和,但是提取后经固相萃取柱净化后,有些化合物的提取效率和回收率达不到要求。

为达到同时检测这些物质的要求,本研究拟采取有机相均质提取的方式,物理性破坏细胞,可以大大缩短操作时间,简化试验步骤。一般选用的有机相有乙酸乙酯和乙腈,而啞乙醇及其代谢物必须在酸性环境下才能被提取出来,试验对比了 2% 甲酸乙酸乙酯和 2% 甲酸乙腈的提取效果,结果见图 2。由图 2 可以看出:提取溶剂对沙丁胺醇- D_3 提取回收率影响最大,内标的回收率为绝对回收率,绝对回收率太低会影响方法的检出限;对于 QCA- D_1 和 MQCA- D_1 而言,用 2% 甲酸乙腈的提取效率要略低于 2% 甲酸乙酸乙酯,可能是因为乙腈可以沉淀一部分蛋白质,也会带入一部分水溶性杂质,会造成基质减弱效应,需要后续的净化过程;对于其他化合物,两种提取溶液对于相对回收率无太大影响。综合考虑,本研究采用 2% 甲酸乙腈作为提取剂以均质方式提取,以尽量增大提取的绝对回收率。

2.4 净化条件的优化和内标的选择

动物样品中一般含有大量的内源性物质,必须通过净化减小基质对检测的干扰。一般净化的方式有固相萃

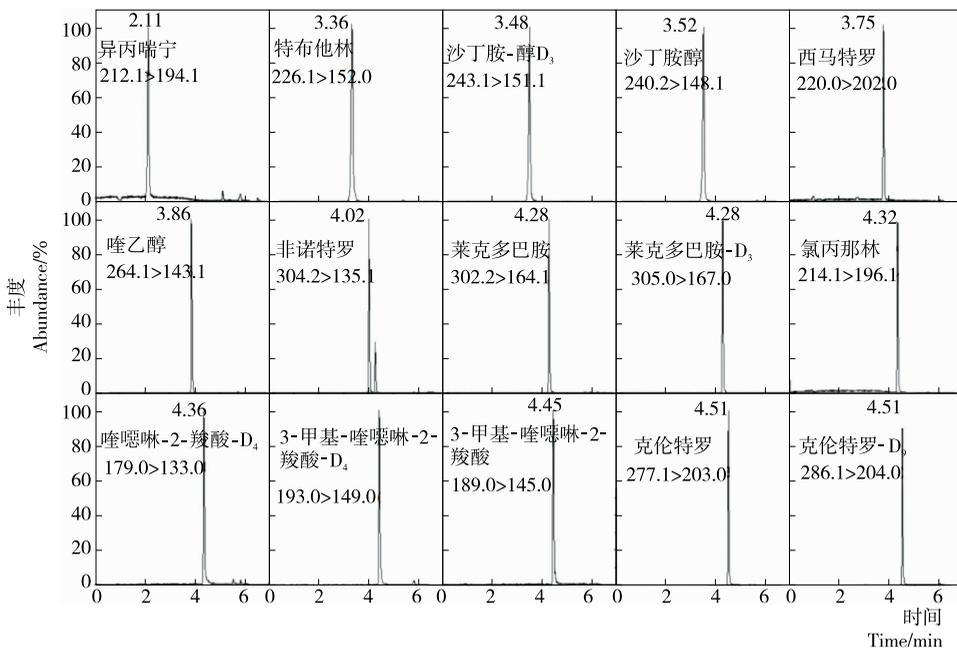


图 1 各目标化合物的选择离子流色谱图

Figure 1 Selected ion chromatogram of each target compound

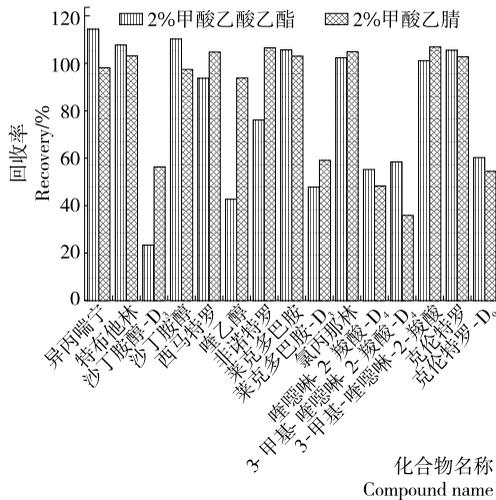


图 2 不同提取溶液对提取效率的影响
Figure 2 Effect of different extraction solutions on extraction efficiency

取法和液液萃取法。液液萃取法净化效果较差,且耗费大量的试剂;而固相萃取法净化效果好,试剂用量少。本研究采用固相萃取法净化。

一般动物源性食品提取液净化常用的固相萃取柱有: C₁₈、MCX、MAX、HLB 和中性氧化铝。首先,对比了 C₁₈、MCX、MAX、HLB 4 款柱子,提取液先用氮吹仪吹干后用水复溶,上样、淋洗、洗脱,经比较发现,喹乙醇在 C₁₈ 固相萃取柱上绝对回收率很低;在 HLB 固相萃取柱上苯

酚型 β-受体激动剂的绝对回收率很低;而 MCX 固相萃取柱仅对弱碱性的 β-受体激动剂有保留;MAX 固相萃取柱仅对酸性的喹噁啉类药物有保留。这几种柱子都可以较好地完成净化过程,消除大部分基质的影响,但是并不适用于所有的目标化合物。

本研究选用了中性氧化铝固相萃取柱,样品提取液直接通过经乙腈活化过的中性氧化铝固相萃取柱,后用乙腈洗脱中性氧化铝柱,收集全部流出液,吹干后 0.1% 甲酸水复溶。结果表明:基质净化的效果理想,各化合物的回收率均可达到要求。试验过程中发现,当加大乙腈洗脱量时,苯酚型 β-受体激动剂的绝对回收率有明显的提升,为确保目标化合物收集完全,最终选用 5 mL 乙腈的洗脱量。

表 2 是经中性氧化铝小柱净化前后各目标化合物的基质效应对比,和各化合物的绝对回收率与相对回收率的对比。所有目标化合物峰面积较净化前都有较大程度变大。这表明动物样品中待测物的检测存在严重的基质抑制效应,基质效应为 -45.2% ~ -86.2%;而净化后基质效应有了不同程度的改善,为 -29.3% ~ -49.2%。

为了补偿检测过程中的基质效应,本试验采用同位素内标标准曲线法进行定量。由表 2 可以看出,各化合物的绝对回收率在 35.1% ~ 66.4%,根据内标的绝对回收率匹配与之绝对回收率相差不大的化合物,通过同位素内标标准曲线校正后相对回收率可达 94.4% ~ 107.1%,均可以达得到满意的补偿效果。

表 2 净化前后各目标化合物的基质效应及各化合物的绝对回收率和相对回收率[†]

Table 2 Matrix effects of each target compound before and after purification and absolute recovery and relative recovery of each compound %

化合物	净化前基质效应	净化后基质效应	绝对回收率	相对回收率
异丙喘宁	-66.1	-49.0	39.1	94.8 ^a
特布他林	-51.1	-38.8	42.6	102.3 ^a
沙丁胺醇-D ₃	-45.3	-36.8	40.6	100.0
沙丁胺醇	-53.8	-38.4	43.2	101.2 ^a
西马特罗	-66.6	-43.4	41.1	104.5 ^a
喹乙醇	-75.8	-48.6	35.1	95.6 ^b
非诺特罗	-86.2	-49.2	49.1	94.4 ^d
莱克多巴胺	-82.4	-46.4	52.4	101.5 ^d
莱克多巴胺-D ₃	-80.2	-41.0	53.0	100.0
氯丙那林	-76.4	-23.6	60.9	107.1 ^e
喹噁啉-2-羧酸-D ₄	-82.9	-42.7	37.4	100.0
3-甲基-喹噁啉-2-羧酸-D ₄	-85.9	-41.5	58.2	100.0
3-甲基-喹噁啉-2-羧酸	-85.2	-45.5	60.4	97.3 ^c
克伦特罗	-78.2	-29.9	66.2	100.3 ^e
克伦特罗-D ₉	-78.3	-29.5	63.5	100.0

[†] a 为采用沙丁胺醇-D₃ 为内标; b 为采用 QCA-D₄ 为内标; c 为采用 MQCA-D₄ 为内标; d 为采用莱克多巴胺-D₃ 为内标; e 为采用克伦特罗-D₉ 为内标。

2.5 标准曲线和检出限

将各种目标化合物标准工作溶液用 0.1% 甲酸水溶液稀释, 分别配制成浓度为 0.2~20.0 ng/mL 的系列标准工作曲线, 按照 1.5 和 1.6 中所确定的液相条件和质谱条件进行检测。以目标化合物质量浓度为横坐标, 目标化合物的峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 拟合线性曲线, 结果见表 3。表 3 结果表明: 在质量浓度 0.2~20.0 μg/L 浓度范围内目标化合物均呈良好的线性关系, 相关系数 $R^2 \geq 0.996 2$ 。

对阴性样品进行加标, 经前处理后的样液进行检测, 根据目标化合物色谱峰信号强度的 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 得出猪肉中非诺特罗、莱克多巴胺和氯丙那林的检出限

和定量限分别为 0.1, 0.3 μg/kg; 克伦特罗的检出限和定量限分别为 0.05, 0.20 μg/kg, 其他化合物的检出限和定量限分别为 0.2, 0.5 μg/kg。

2.6 回收率和精密度

以不含目标分析物的阴性猪肉样品进行加标回收率和精密度试验。准确称取猪肉样品 5.0 g, 设定 3 个添加水平(检出限、2 倍检出限、10 倍检出限), 混匀后根据 1.4 方法进行提取、净化和测定, 每个添加水平重复测定 6 次, 计算添加平均回收率和相对标准偏差, 其回收率和相对标准偏差见表 4。由表 4 可知: 猪肉中各目标化合物的回收率为 89.1%~121.5%, 相对标准偏差为 2.6%~12.9% ($n=6$)。

表 3 猪肉中各目标化合物的回归方程、相关系数、检出限及定量限

Table 3 Regression equation, correlation coefficient, detection limit and limit of quantification of each target compound in pork

化合物	同位素内标标准曲线	R^2	检出限/(μg · kg ⁻¹)	定量限/(μg · kg ⁻¹)
异丙喘宁	$y = 0.281\ 735x + 0.007\ 932\ 1$	0.998 7	0.20	0.5
特布他林	$y = 0.396\ 168x + 0.117\ 385\ 0$	0.999 7	0.20	0.5
沙丁胺醇	$y = 0.531\ 890x + 0.006\ 310\ 7$	0.999 5	0.20	0.5
西马特罗	$y = 0.243\ 203x + 0.046\ 992\ 9$	0.999 2	0.20	0.5
噻乙醇	$y = 0.379\ 740x + 0.053\ 896\ 6$	0.996 2	0.20	0.5
非诺特罗	$y = 0.595\ 413x - 0.013\ 601\ 1$	0.998 3	0.10	0.3
莱克多巴胺	$y = 1.336\ 990x - 0.001\ 909\ 5$	0.999 3	0.10	0.3
氯丙那林	$y = 2.155\ 940x - 0.012\ 558\ 6$	0.999 2	0.10	0.3
3-甲基-噻噁啉-2-羧酸	$y = 0.446\ 328x + 0.022\ 175\ 3$	0.999 7	0.20	0.5
克伦特罗	$y = 0.743\ 371x + 0.007\ 754\ 9$	0.999 8	0.05	0.2

表 4 猪肉中各目标化合物的回收率和精密度

Table 4 Recovery and precision of each target compound in pork ($n=6$)

化合物	添加水平/(μg · kg ⁻¹)	回收率/%	RSD/%	化合物	添加水平/(μg · kg ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
异丙喘宁	0.2	119.5	11.9	非诺特罗	0.1	89.1	8.6
	0.4	114.3	8.7		0.2	95.1	7.4
	2.0	105.7	6.2		1.0	94.9	5.9
特布他林	0.2	91.5	12.4	莱克多巴胺	0.1	96.4	5.2
	0.4	96.2	9.1		0.2	96.7	6.3
	2.0	101.4	7.4		1.0	100.8	4.1
沙丁胺醇	0.2	99.3	4.9	氯丙那林	0.1	116.4	9.9
	0.4	96.4	3.7		0.2	106.4	6.8
	2.0	100.1	5.4		1.0	101.3	4.2
西马特罗	0.2	115.3	10.7	3-甲基-噻噁啉-2-羧酸	0.2	121.5	11.1
	0.4	104.7	8.1		0.4	97.1	5.2
	2.0	99.4	6.2		2.0	96.1	3.4
噻乙醇	0.2	90.4	12.9	克伦特罗	0.05	97.2	2.6
	0.4	94.1	11.2		0.1	95.8	3.5
	2.0	102.4	6.7		0.5	98.1	2.9

2.7 实际样品的测定

应用本方法对 2018 年下半年武汉地区采集的 20 份猪肉样品进行检测,均未检出 β -受体激动剂和喹乙醇及其代谢物。

3 结论

本方试验用 2%甲酸—乙腈溶液提取,中性氧化铝小柱净化,正己烷去脂,液相色谱—串联质谱检测,建立了准确定量检测猪肉中 8 种 β -受体激动剂和喹乙醇及其代谢物残留量的方法。本方法成本低,操作快捷简单,灵敏度较高,重复性好,能够用于应急检测或日常猪肉中传统型和新型“瘦肉精”残留监测,也为动物源食品中不同性质的兽药残留高通量快速分析检测提供一定的技术参考。但是,本研究检测基体较为单一,今后可扩大检测基体量、研究不同基体的前处理方式的优化以及如何更加有效去除内源性物质的干扰,以期达到更全面、严格管理这类药物使用和残留监测的目的。

参考文献

- [1] 刘先军,王一红,李帮锐,等.超高压液相色谱—串联质谱法检测动物组织中 26 种 β -受体激动剂[J].中国食品卫生杂志,2015,27(3):265-270.
- [2] 张林田,黄少玉,陆奕娜,等.固相萃取—超高效液相色谱—串联质谱法测定动物源性食品中 9 种 β_2 -受体激动剂残留量[J].理化检验:化学分册,2014,50(2):155-160.
- [3] 郭霞,孙振中,戚隽渊,等.南美白对虾中喹乙醇及其代谢物 3-甲基-喹恶啉-2-羧酸残留的高效液相色谱—串联质谱检测[J].中国农业大学学报,2014,19(1):156-160.
- [4] 宋春美,侯玉泽,刘宣兵,等.喹乙醇的危害及检测方法研究进展[J].河南农业科学,2009,36(12):13-17.
- [5] 范立鹏,段振娟,方国臻,等.动物源性食品中喹恶啉类药物残留检测方法研究进展[J].中国食品学报,2012,12(9):171-178.
- [6] 农业部发布食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[J].中国兽药杂志,2002,36(4):11-12.
- [7] 中华人民共和国农业部.农业部公告第 168 号 饲料药物添加剂使用规范[S].北京:中国标准出版社,2001.
- [8] SITU C, ELLIOTT C T. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay[J]. Anal Chim Acta, 2005, 529(1/2): 89-96.
- [9] 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 β_2 -受体激动剂类药物残留[J].分析化学,2014,42(10):1486-1492.
- [10] 金玉娥,郭德华,郑焯,等.液质联用仪测定动物源性食品中 11 种 β_2 -受体激动剂的研究[J].质谱学报,2007,28(4):193-201.
- [11] ZHANG Xiao-jun, ZHENG Bin, ZHANG Hong, et al. Determination of marker residue of olaquinox in fish tissue by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2011, 34: 469-474.
- [12] 薛良辰,彭玉芬,刘陆,等.超高效液相色谱—串联质谱法快速检测水产品中喹乙醇及其代谢物 3-甲基-喹恶啉-2-羧酸的残留[J].现代食品科技,2013,29(2):413-415.
- [13] 欧阳姗,庞国芳,谢丽琪,等.动物组织中卡巴氧和喹乙醇以及相关代谢物的液相色谱—串联质谱检测方法[J].分析测试学报,2008,27(6):590-594.
- [14] BODI D, RINGLING C, SCHODEL C, et al. Investigation of matrix effects on the determination of carbadox and olaquinox in feed by LC-MS/MS [J]. Chromatographia, 2013, 76(11/12): 651-662.
- [15] MEROU A, KAKLAMANOS G, THEODORIDIS G. Determination of carbadox and metabolites of carbadox and olaquinox in muscle tissue using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 881/882(1): 90-95.
- [16] SNIEGOCKI T, GBYLIK-SIKORSK M, POSYNIK A, et al. Determination of carbadox and olaquinox metabolites in swine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2014, 944: 25-29.
- [17] 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,2008,26(6):709-713.
- [18] 张静余,杨卫军,严敏鸣.液相色谱—串联质谱法测定水产品中喹乙醇和卡巴氧的代谢物残留量[J].食品安全质量检测学报,2018,9(14):3788-3793.
- [19] 李佩佩,张小军,严忠雍,等.免疫亲和柱净化—超高效液相色谱—串联质谱检测鱼虾中 3-甲基-喹恶啉-2-羧酸[J].食品科学,2016,37(24):257-261.
- [20] 张小军,郑斌,陈雪昌,等.高效液相色谱法测定动物组织中喹乙醇标示残留物[J].食品科学,2010,31(24):289-292.
- [21] 于海霞,张小军,杨会成,等.碱水解—高效液相色谱法测定草鱼组织中喹乙醇代谢物的残留[J].中国渔业质量与标准,2012,2(1):67-70.
- [22] 李二粉,张媚玉,马合勤,等.液相色谱—串联质谱测定鸡肉中喹乙醇标示物 3-甲基-喹恶啉-2-羧酸[J].色谱,2018,36(5):446-451.