

全新一代三重四极杆液质联用仪TSQ Fortis 针对18种 β -受体激动剂的检测方法

汪洋, 徐牛生, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部

关键词

β -受体激动剂, TSQ Fortis, 兽药残留

摘要

本文利用赛默飞全新液相色谱串联三重四极杆质谱Vanquish Horizon-TSQ Fortis建立了快速检测18种 β -受体激动剂类化合物的方法。此18种化合物在0.05-500 ng/mL浓度范围内线性关系良好($r^2 > 0.993$), LOD及LOQ均能满足国标规定的检测要求, 运用本方法和设备可实现对动物源性食品中 β -受体激动剂类化合物的检出和定量。

1、引言

β -受体激动剂在医学临床上可用于治疗支气管哮喘、阻塞性肺炎等病症, 同时也可用于治疗马、牛的晚产和流产。20世纪80年代初期, 一系列试验研究发现当 β -受体激动剂使用剂量是治疗剂量5-10倍时, 可以使猪、牛、羊等动物脂肪分解代谢增强, 蛋白质合成速度增加, 若长期使用含有 β -受体激动剂的饲料, 可以提高饲料转化率, 同时能增加动物体重和肌肉组织含量, 以提高瘦肉率, 起到营养再分配作用。但是长期使用会对机体产生毒副作用。目前猪、牛、羊等动物通常使用过量的 β -受体激动剂类药物以促进生长, 致使 β -受体激动剂在动物体内造成蓄积。人类食用含有 β -受体激动剂残留的动物性食品后, 会对人体健康造成极大危害, 严重时可引发急性中毒反应, 常见中毒症状表现为肌肉震颤或疼痛, 心率过快, 头痛眩晕、恶心呕吐等, 严重时可导致休克造成死亡。

由于 β -受体激动剂所产生的危害, 2012年5月1日实施的《饲料和饲料添加剂管理条例》规定禁止将国务院农业行政部门公布的包括 β -受体激动剂在内的任何物质添加到饲料中。国家标准《动物源性食品中多种 β -受体激动剂残留量的测定液相色谱串联质谱法》(GB/T 22286-2008)适用于猪肝和猪肉中沙丁

胺醇、特布他林和塞曼特罗等11种 β -受体激动剂的检测, 该方法利用液相色谱-串联质谱技术, 采用多反应监测(MRM)模式检测, 内标法定量, 目标物的检出限为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。国家标准《河豚鱼、河鳗和烤鳗中12种 β -受体激动剂残留量的测定液相色谱-串联质谱法》(GB/T 22950-2008)适用于河豚鱼、河鳗和烤鳗中溴布特罗、塞曼特罗和克伦特罗等12种 β -受体激动剂的确证和定量, 利用液相色谱-串联质谱法检测, 采用多反应监测(MRM)模式检测, 内标法定量; 莱克多巴胺、沙丁胺醇、塞曼特罗、克仑潘特罗和克伦特罗的方法检出限为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其它化合物的方法检出限为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 Thermo Fisher Vanquish Binary Horizon超高效液相色谱仪

2.1.2 Thermo Fisher TSQ Fortis三重四极杆质谱仪

2.1.3 甲醇(色谱纯, 美国Thermo Fisher公司); 实验用水为Milli-Q去离子水; 甲酸(色谱纯, SIGMA)

2.1.4 18种 β -受体激动剂类化合物标准品均购自德国Dr.Ehrenstrofer公司

2.2 化合物信息及溶液配制

2.2.1 本实验涉及的18种 β -受体激动剂类化合物的基本信息见表1。

表1 18种β-受体激动剂类化合物信息

| 化合物名称 | 分子式 | 分子量 | CAS号 |
|------------------------------------|---|--------|--------------|
| 克伦特罗(Clenbuterol) | C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O | 277.19 | 37148-27-9 |
| 马布特罗(Mabuterol) | C ₁₃ H ₁₈ ClF ₃ N ₂ O | 310.74 | 56341-08-3 |
| 齐帕特罗(Zilpaterol) | C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₂ | 261.32 | 117827-79-9 |
| 西马特罗(Cimaterol) | C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O | 219.28 | 54239-37-1 |
| 溴布特罗(Brombuterol) | C ₁₂ H ₁₈ BrN ₂ O | 366.09 | 41937-02-4 |
| 克伦潘特(Clenpenterol) | C ₁₃ H ₂₁ Cl ₃ N ₂ O | 327.68 | 37158-47-7 |
| 莱克多巴胺(Ractopamine) | C ₁₈ H ₂₃ NO ₃ | 301.38 | 97825-25-7 |
| 沙丁胺醇(Salbutamol) | C ₁₃ H ₂₁ NO ₃ | 239.31 | 18559-94-9 |
| 特布他林(Terbutaline) | C ₁₂ H ₁₉ NO ₃ | 225.29 | 23031-25-6 |
| 福莫特罗(Formoterol) | C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄ | 344.41 | 73573-87-2 |
| 异克舒令(Isoxsuprine) | C ₁₈ H ₂₄ ClNO ₃ | 337.84 | 579-56-6 |
| 利托君(Ritodrine) | C ₁₇ H ₂₁ NO ₃ | 287.35 | 26652-09-5 |
| 苯乙醇胺A(Phenylethanolamine A) | C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄ | 344.17 | 1346746-81-3 |
| 氯丙那林(Clorprenaline) | C ₁₁ H ₁₆ ClNO | 213.71 | 3811-25-4 |
| 妥布特罗(Tulobuterol) | C ₁₂ H ₁₈ ClNO | 227.73 | 41570-61-0 |
| 班布特罗(Bambuterol) | C ₁₈ H ₂₉ N ₃ O ₅ | 367.45 | 81732-65-2 |
| 西布特罗(Cimbuterol) | C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O | 233.31 | 54239-39-3 |
| 羟甲基克伦特罗(Hydroxy-methylclenbuterol) | C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₂ | 293.19 | 38339-18-3 |

2.2.2 储备液：分别精确称取5 mg标准品粉末，溶解于50 mL甲醇中

2.2.3 系列标准曲线：以50:50 甲醇水作为溶剂，稀释成系列标准曲线 0.02 ng/mL-500 ng/mL

2.3 色谱条件：

色谱柱：Thermo Hypersil GOLD aQ (1.9 μm, 100 x 2.1 mm)
；柱温：30℃；进样量：5 μL；

流动相：A为0.1%甲酸水，B为0.1%甲酸甲醇，梯度洗脱程序见表2。

表2 梯度洗脱程序

| 时间 | A% | B% | 流速mL/min |
|------|-----|----|----------|
| 0.0 | 100 | 0 | 0.3 |
| 6.0 | 70 | 30 | 0.3 |
| 9.0 | 60 | 40 | 0.3 |
| 11.0 | 10 | 90 | 0.3 |
| 12.0 | 100 | 0 | 0.3 |
| 16.0 | 100 | 0 | 0.3 |

2.4 质谱条件：

可加热电喷雾电离源 (HESI) ，正离子扫描模式；扫描方式：SRM；喷雾电压 (+)：3500V；离子传输管温度：300℃；鞘气压力38 arb；辅助气压力 4 arb；离子源温度：450℃；碰撞气压力：1.5 mTorr；选择反应监测离子对信息见表3。

表3 18种β-受体激动剂类化合物质谱采集参数

| Compound | Precursor (m/z) | Product (m/z) | Collision Energy (V) | Tube Lens (V) | Source Fragmentation |
|----------|-----------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|
| 氯丙那林 | 214.125 | 195.97* | 11.95 | 88 | 9.8 |
| | | 154.054 | 17.13 | | |
| 西马特罗 | 220.162 | 202.042* | 9.68 | 90 | 8.2 |
| | | 160.196 | 16.67 | | |
| 特布他林 | 226.062 | 152.095* | 16.04 | 101 | 13.1 |
| | | 125.071 | 24 | | |
| 妥布特罗 | 228.112 | 154.125* | 16.25 | 88 | 9.8 |
| | | 118.429 | 28.8 | | |
| 西布特罗 | 234.162 | 160.125* | 14.6 | 92 | 9.8 |
| | | 143.071 | 25.09 | | |
| 沙丁胺醇 | 240.175 | 148.125* | 18.14 | 93 | 9.8 |
| | | 222.125 | 10.48 | | |
| 齐帕特罗 | 262.175 | 244.196* | 12.58 | 111 | 11.4 |
| | | 185.042 | 23.87 | | |
| 克伦特罗 | 277.088 | 202.946* | 16.04 | 96 | 9.8 |
| | | 258.75 | 10.6 | | |
| 利托君 | 288.175 | 270.149* | 12.75 | 104 | 9.8 |
| | | 121.071 | 22.35 | | |
| 克伦潘特罗 | 291.088 | 202.958* | 15.74 | 97 | 9.8 |
| | | 273.095 | 10.64 | | |
| 羟甲基克伦特罗 | 293.088 | 275.083* | 11.49 | 101 | 9.8 |
| | | 202.958 | 17.81 | | |
| 异克舒令 | 302.175 | 284.196* | 13.93 | 100 | 9.8 |
| | | 107 | 28.42 | | |
| 莱克多巴胺 | 302.175 | 164.167* | 15.57 | 103 | 9.8 |
| | | 284.202 | 11.61 | | |
| 马布特罗 | 311.138 | 237.048* | 17.01 | 101 | 9.8 |
| | | 293.042 | 11.28 | | |
| 福莫特罗 | 345.175 | 149.125* | 19.03 | 103 | 11.4 |
| | | 327.125 | 13.38 | | |
| 苯乙醇胺A | 345.225 | 327.036* | 12.29 | 102 | 8.2 |
| | | 150.125 | 22.23 | | |
| 溴布特罗 | 367 | 292.875* | 18.23 | 105 | 8.2 |
| | | 348.958 | 11.87 | | |
| 班布特罗 | 368.212 | 294.042* | 18.82 | 110 | 11.4 |
| | | 72.125 | 31.66 | | |

注：带*的为定量离子

3.实验结果与讨论

3.1 灵敏度测试

采用上述仪器分析方法，18种β-受体激动剂类化合物在16分钟内均可获得良好的色谱峰，图1为18种β-激动剂类化合物在LOQ (0.05-0.1 ng/mL) 浓度的提取离子流图。

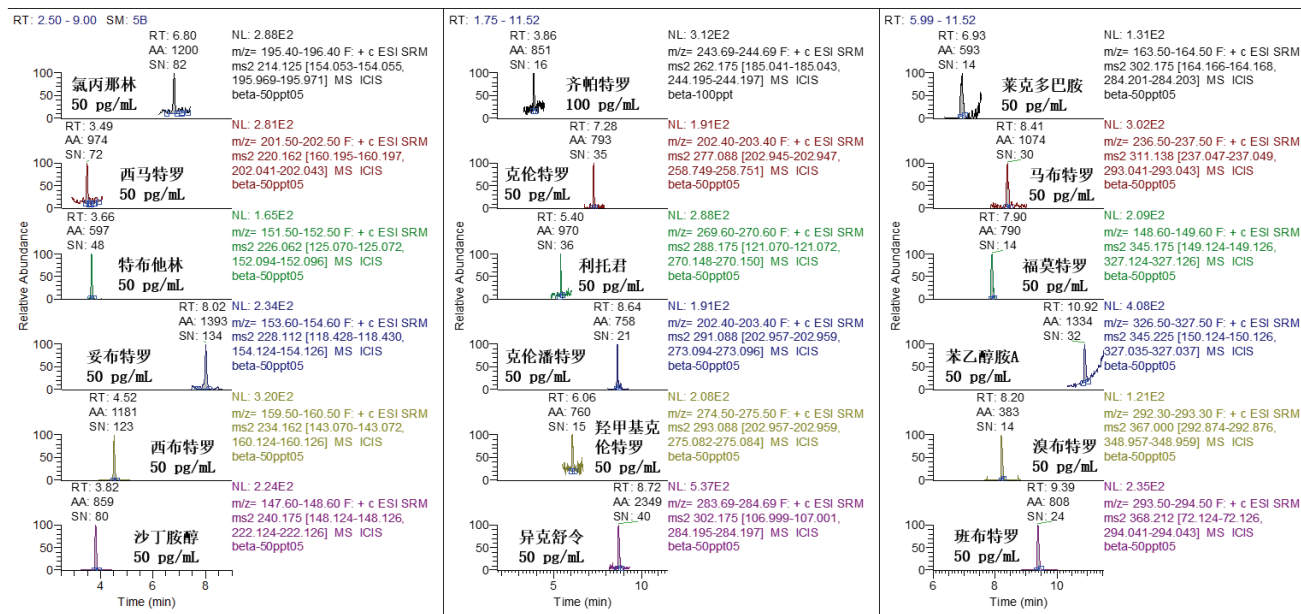


图1 18种β-受体激动剂类化合物在LOQ (0.05-0.1 ng/mL)浓度的提取离子流图

3.2 线性范围测试

采用上述仪器分析方法，对18种β-受体激动剂类化合物进行线性范围测试，线性相关系数 r^2 均大于0.993，线性关系良好。18种β-受体激动剂类化合物LOD ($S/N \geq 3$)、LOQ ($S/N \geq 10$)、线性范围及线性相关系数见表4，化合物标准曲线图见图2。

表4 18种β-受体激动剂类化合物的LOD、LOQ、线性范围及线性相关系数

| Compound | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) | Linearity range (ng/mL) | Linearity(r^2) |
|----------|-------------|-------------|-------------------------|--------------------|
| 氯丙那林 | 0.02 | 0.05 | 0.05-100 | 0.9961 |
| 西马特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-100 | 0.9970 |
| 特布他林 | 0.02 | 0.05 | 0.05-100 | 0.9958 |
| 妥布特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-200 | 0.9977 |
| 西布特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-500 | 0.9973 |
| 沙丁胺醇 | 0.02 | 0.05 | 0.05-100 | 0.9946 |
| 齐帕特罗 | 0.05 | 0.1 | 0.1-200 | 0.9965 |
| 克伦特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-200 | 0.9980 |
| 利托君 | 0.02 | 0.05 | 0.05-100 | 0.9978 |
| 克伦潘特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-200 | 0.9972 |
| 羟甲基克伦特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-200 | 0.9972 |
| 异克舒令 | 0.02 | 0.05 | 0.05-100 | 0.9993 |
| 莱克多巴胺 | 0.02 | 0.05 | 0.05-100 | 0.9961 |
| 马布特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-200 | 0.9964 |
| 福莫特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-200 | 0.9977 |
| 苯乙醇胺A | 0.02 | 0.05 | 0.05-500 | 0.9972 |
| 溴布特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-200 | 0.9962 |
| 班布特罗 | 0.02 | 0.05 | 0.05-200 | 0.9934 |

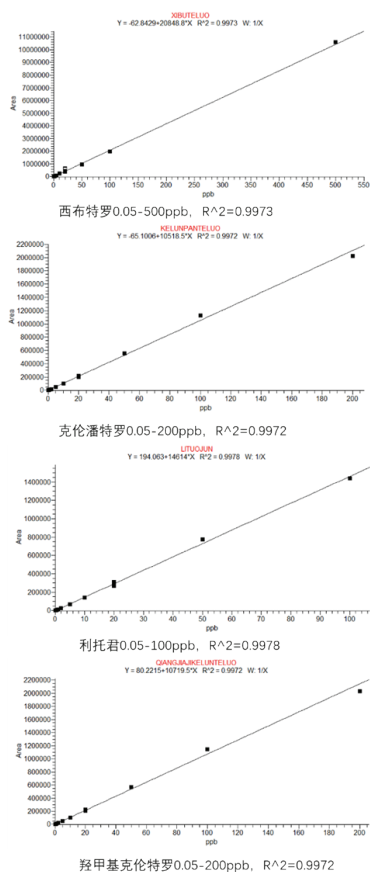


图2 β-受体激动剂类典型化合物标准曲线图

3.3 稳定性测试

采用上述仪器分析方法，对18种β-受体激动剂类化合物进行稳定性测试，考察浓度0.5 ng/mL，进样量5 μL 连续进样6针，实验结果见表5。18种β-受体激动剂类化合物相对标准偏差 (RSD) 均小于6%，实验结果证明仪器具有良好的稳定性。

表5 18种 β -受体激动剂类化合物连续6针的峰面积及RSD值(C=0.5 ppb, N=6)

| | 0.5 ppb-1 | 0.5 ppb-2 | 0.5 ppb-3 | 0.5 ppb-4 | 0.5 ppb-5 | 0.5 ppb-6 | RSD% |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| 氯丙那林 | 6045 | 6119 | 6409 | 6280 | 6078 | 6056 | 2.39 |
| 西马特罗 | 14466 | 14751 | 14935 | 15162 | 15157 | 15323 | 2.11 |
| 特布他林 | 9000 | 8904 | 9283 | 9886 | 9489 | 9601 | 3.98 |
| 妥布特罗 | 8483 | 8608 | 8955 | 8601 | 8600 | 8438 | 2.11 |
| 西布特罗 | 7226 | 7662 | 7600 | 7102 | 7304 | 7484 | 2.99 |
| 沙丁胺醇 | 8956 | 9135 | 9155 | 8753 | 8644 | 9941 | 5.06 |
| 齐帕特罗 | 4724 | 4596 | 4785 | 4758 | 4813 | 5022 | 2.91 |
| 克伦特罗 | 5500 | 5416 | 5555 | 5563 | 5399 | 5638 | 1.67 |
| 利托君 | 6597 | 6669 | 6615 | 6651 | 6761 | 6901 | 1.71 |
| 克伦潘特罗 | 6801 | 7180 | 6489 | 6715 | 6315 | 6791 | 4.42 |
| 羟甲基克伦特罗 | 4622 | 4697 | 4853 | 4637 | 4597 | 4866 | 2.52 |
| 异克舒令 | 20387 | 20011 | 19977 | 20749 | 20429 | 20234 | 1.42 |
| 莱克多巴胺 | 4099 | 4254 | 4187 | 4407 | 3931 | 4402 | 4.35 |
| 马布特罗 | 8094 | 8402 | 8200 | 8370 | 7993 | 8563 | 2.57 |
| 福莫特罗 | 5158 | 5776 | 5481 | 5321 | 5798 | 5379 | 4.67 |
| 苯乙醇胺A | 13505 | 12944 | 13100 | 13036 | 12776 | 12996 | 1.87 |
| 溴布特罗 | 3118 | 2922 | 3135 | 3065 | 3107 | 3277 | 3.69 |
| 班布特罗 | 8479 | 8428 | 8344 | 8157 | 7974 | 7837 | 3.16 |

4. 总结

本文利用ThermoFisher新一代三重四极杆液质联用仪TSQ Fortis 建立了同时分析18种 β -受体激动剂类化合物的检测方法。实验结果可以看出，基于ThermoFisher TSQ Fortis建立的检测方法不仅具有优异的灵敏度和线性范围，同时具备优异的重现性。本方法可用于18种 β -受体激动剂类化合物的日常分析检测。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC