

# GB31658.22动物性食品中β-受体激动剂残留量的分析方法

付尧

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

## 概述

本实验重现了GB31658.22-2022 食品安全国家标准 动物性食品中β-受体激动剂残留量的测定 液相色谱-串联质谱法, 使用Cleanert PCX固相萃取结合液质联用仪的检测方法对禽肉进行了β-受体激动剂药物的测试。样品经酶解、高氯酸沉淀蛋白, 乙酸乙酯、叔丁基甲醚萃取后, Cleanert PCX固相萃取柱净化, Kinetex C18 (100×2.1 mm, 1.7 μm) 液相色谱柱进行检测, 采用内标法定量。结果表明, 添加水平的相对回收率为80~106%, 能够满足检测要求。

## 关键词

β-受体激动剂; Kinetex C18

## 化合物信息

表1. 化合物信息

中文名称	英文名称	CAS号	分子式	分子量
克仑特罗	Clenbuterol	37148-27-9	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	277.19
莱克多巴胺	Ractopamine	97825-25-7	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	301.38
沙丁胺醇	Salbutamol	18559-94-9	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	239.32
西马特罗	Cimaterol	54239-37-1	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O	219.28
齐帕特罗	Zilpaterol	117827-79-9	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	261.32
氯丙那林	Clorprenaline	3811-25-4	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> ClNO	213.7
特布他林	TerbutalineHemisulfatesalt	23031-32-5	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S	548.65
西布特罗	Cimbuterol	54239-39-3	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O	233.31
溴布特罗	Brombuterol	41937-02-4	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	366.09
班布特罗	Bambuterol	81732-65-2	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	367.45
克仑丙罗	Clenproperolhydrochloride	75136-83-3	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> C <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	299.62
妥布特罗	Tulobuterol	41570-61-0	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> ClNO	227.73
利托君	Rirodriene	26652-09-5	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	287.35

中文名称	英文名称	CAS号	分子式	分子量
克仑赛罗	Clencyclohexerol	157877-79-7	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> C <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	319.23
马贵特罗	MapenterolHydrochloride	54238-51-6	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	361.23
克仑潘特	ClenpenterolHydrochloride	37158-47-7	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	327.67
克仑特罗-D <sub>9</sub>	BendrofluMethiazide-D <sub>5</sub>	1330183-13-5	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> D <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	421.41
莱克多巴胺-D <sub>6</sub>	Triamterene-D <sub>5</sub>	1189922-23-3	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> D <sub>5</sub> N <sub>7</sub>	253.26
沙丁胺醇-D <sub>3</sub>	Canrenone-D <sub>6</sub>	-	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> D <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-
西马特罗-D <sub>7</sub>	Cimaterol-D <sub>7</sub>	1228182-44-2	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O	219.28
齐帕特罗-D <sub>7</sub>	Zipaterol-D <sub>7</sub>	1217818-36-4	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	261.33
氯丙那林-D <sub>7</sub>	Clorprenaline-D <sub>7</sub>	2748354-86-9	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> ClNO	213.71
特布他林-D <sub>9</sub>	Terbutaline-D <sub>9</sub>	1189658-09-0	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> D <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	234.34
西布特罗-D <sub>9</sub>	Cimbuterol-D <sub>9</sub>	1246819-04-4	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O	233.32
班布特罗-D <sub>9</sub>	Bambuterol-D <sub>9</sub>	1794810-59-5	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	403.90
克仑丙罗-D <sub>7</sub>	Clenproperol-D <sub>7</sub>	1173021-09-4	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	263.16
妥布特罗-D <sub>9</sub>	Tulobuterol-D <sub>9</sub>	1325559-14-5	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO	264.19

## 实验部分

### 3.1 仪器、试剂与材料

#### 3.1.1 主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪(AB SCIEX API 5500+), 配有电喷雾离子源(ESI);

#### 3.1.2 试剂材料

Cleanert PCX: 60mg/3mL

CAT: CX0603

微孔滤膜: 0.22 μm PTFE/L滤膜



实验用水为屈臣氏水；乙腈、甲醇、甲酸、乙酸乙酯和叔丁基甲醚均为色谱纯试剂；高氯酸、氨水均为分析纯。

### 3.1.3 标准溶液配制

1.  $\beta$ -受体激动剂等标品：外部购买， $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。
2.  $\beta$ -受体激动剂标准工作液：称取 $\beta$ -受体激动剂各标品1mg，用甲醇配制成1mL母液，吸取母液10 $\mu\text{L}$ ，用甲醇配制成1mL。（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）
3. 内标标品：外部购买， $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。
4. 内标标准工作液：称取内标各标品1mg，用甲醇配制成1mL母液，吸取母液10 $\mu\text{L}$ ，用甲醇配制成1mL。（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）
5.  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶：30U/60U/mL

### 3.1.4 溶液配制

1. 0.2mol/L乙酸铵缓冲液：取乙酸铵15.4g溶解于1000mL水中，用乙酸调pH至5.2。
2. 0.1mol/L高氯酸溶液：取高氯酸8.7mL用水稀释至1000mL。
3. 10mol/L氢氧化钠溶液：称取40g氢氧化钠用适量水溶解冷却后，用水稀释至100mL。
4. 2%甲酸溶液：取甲酸2mL用水稀释至100mL。
5. 5%氨化甲醇溶液：取氨水5mL用甲醇稀释至100mL。
6. 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸1mL用乙腈稀释至1000mL。
7. 0.1%甲酸溶液：取甲酸1mL，用水稀释至1000mL。
8. 甲醇-0.1%甲酸溶液(10+90, V/V)：取甲醇10mL和0.1%甲酸溶液90mL混匀。

### 3.2 样品前处理方法

**称量：**取试料2g（准确至 $\pm 0.05\text{g}$ ），于50mL聚丙烯离心管中，加标及。

**酶解提取：**加0.2mol/L乙酸铵缓冲溶液6mL、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶40 $\mu\text{L}$ ，涡旋混匀， $37^{\circ}\text{C}$ 避光水浴振荡16h，放置至室温，备用。

**萃取：**取备用液加100ng/mL内标工作液100 $\mu\text{L}$ ，涡旋混匀，8000r/min离心8min，取上清液加0.1mol/L高氯酸溶液5mL，涡旋混

匀，用高氯酸调pH至 $1.0\pm 0.2$ ，8000r/min离心8min后，将上清液用10mol/L NaOH溶液调pH至 $10\pm 0.5$ ，加乙酸乙酯15mL中速振荡5min，5000r/min离心5min，取上层有机相，下层水相中再加入叔丁基甲醚10mL，中速振荡5min，5000r/min离心5min，取上层有机相，合并， $50^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干，用2%甲酸溶液5mL溶解，备用。

**活化：**Cleanert PCX固相萃取柱使用前用3mL甲醇，3mL 2%甲酸溶液活化；

**上样：**将备用液全部加入固相萃取柱上；

**淋洗：**依次用3mL 2%甲酸溶液、3mL甲醇淋洗固相萃取柱，抽干Cleanert PCX小柱；

**洗脱：**用3mL 5%氨化甲醇溶液洗脱；

**洗脱液浓缩：**洗脱液在 $50^{\circ}\text{C}$ 用氮气吹至近干，用0.5mL 甲醇-0.1%甲酸溶液液(10+90, V/V)溶解残余物，涡旋混匀，过0.22 $\mu\text{m}$  PTFE/L滤膜，待测定。

### 3.3 仪器检测条件

#### 3.3.1 色谱条件

**色谱柱：**Kinetex C18 100 $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ;

Cat No: 00D-4475-AN

**流动相：**A: 0.1%甲酸水溶液（5 mmol/L乙酸铵溶液）；  
B: 乙腈；

**流速：**0.3 mL/min；

**柱温：** $40^{\circ}\text{C}$ ；

**进样量：**5  $\mu\text{L}$ ；

梯度程序见表2：

表2. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.30	95	5
5.0	0.30	5	95
8.0	0.30	5	95
8.01	0.30	95	5
13.0	0.30	95	5

#### 3.2.2 质谱条件

**离子源类型：**电喷雾离子源 (ESI)

**扫描方式：**多反应监测正离子模式 (MRM+)



喷雾针电压：5500 V

离子源温度：550 °C

加热器 (GS1)：55 psi

辅助加热气 (GS2)：55 psi

气帘气 (CUR)：35 psi

碰撞气 (CAD)：10 psi

为获得较好的稳定和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压 (DP) 和碰撞电压 (CE)，目标化合物定量定性离子对参数均经过系统优化，优化信息参见表3。

表3. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
班布特罗	368.2	294.3*	100	26
	368.2	72.2	100	37
溴布特罗	367	293	90	24
	367	349.2*	90	17
西马特罗	367	212	50	39
	220	202	65	13
	220	160	65	22
西布特罗	234	160.1*	70	21
	234	143	70	34
	234	216	50	12
克仑特罗	277	203*	65	21
	277	168.1	65	38
	277	259	45	15
克仑赛罗	319	301*	50	17
	319	203	50	26
克仑潘特	291.01	203*	50	22
	291.01	132	50	40
	214	154.1*	85	23
氯丙那林	214	118	85	34
	214.1	196.1	26	15
马贲特罗	325	237*	50	24
	325	217	50	34
	302.2	164.1*	80	23
莱克多巴胺	302.2	107.1	80	51
	302.2	284.2	50	17
利托君	288.1	121.1*	45	29
	288.1	150.1	45	25
沙丁胺醇	240.2	148.1*	68	24

	240.2	222.3	68	14
	226.2	152*	70	21
特布他林	226.2	107.1	70	36
	226.2	125.1	36	33
	228	154*	85	21
妥布特罗	228	118.1	85	36
	228.1	172.1	33	16
	262.1	244.2*	80	17
齐帕特罗	262.1	185	80	32
	263.1	203*	40	24
克伦丙罗	263.1	245.1	40	15
	286	204	50	23
克仑特罗-D <sub>9</sub>	286	204	50	23
莱克多巴胺-D <sub>6</sub>	308.1	168.1	40	23
沙丁胺醇-D <sub>3</sub>	243.1	151	30	25
西马特罗-D <sub>7</sub>	227.2	161.1	40	23
齐帕特罗-D <sub>7</sub>	269.1	185	40	32
氯丙那林-D <sub>7</sub>	221	155	40	23
特布他林-D <sub>9</sub>	235.2	153.1	40	20
西布特罗-D <sub>9</sub>	243.2	161.1	40	21
班布特罗-D <sub>9</sub>	377.2	295.1	40	26
克仑丙罗-D <sub>7</sub>	270	204	40	25
妥布特罗-D <sub>9</sub>	237	155	40	21

注：表3中标“\*”为定量离子。

### 3.4 结果与讨论

#### 3.4.1 基质匹配标准曲线的制备

取6份空白样品经提取和净化后，加入适量的标准工作液及100ng/mL内标工作液100μL，50°C用氮气吹至近干，用0.5mL甲醇-0.1%甲酸溶液液(10 + 90, V/V)溶解残余物，涡旋混匀过0.22μm PTFE/L滤膜，配制成浓度为4μg/L、8μg/L、20μg/L、40μg/L、80μg/L和200μg/L的基质匹配标准溶液。以待测药物特征离子色谱峰的峰面积与对应内标物特征离子色谱峰的峰面积比值为纵坐标，相应的标准溶液浓度比为横坐标，绘制标准工作曲线。

#### 3.4.2 方法精密度与准确度

本实验选择禽肉空白基质添加1倍和10倍地定量限两个浓度，平行测定6次，计算回收率与精密度结果，由表4可得，β-受体激动剂的添加浓度的回收率



为80~106%，相对标准偏差RSD小于3%；本实验色谱图见图1、图2。

表4.基质加标回收实验结果

化合物	理论加标浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均检测结果 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率%	RSD%
莱克多巴胺	0.5	0.4228	84.56	1.5
	5	4.3915	87.83	1.6
沙丁胺醇	0.5	0.4081	81.62	2.2
	5	4.4845	89.69	1.9
西马特罗	0.5	0.4843	96.85	2.0
	5	5.1670	103.34	1.5
齐帕特罗	0.5	0.4463	89.26	0.7
	5	4.6770	93.54	1.3
氯丙那林	0.5	0.5270	105.4	1.0
	5	5.0360	100.72	1.1
特布他林	0.5	0.4947	98.93	1.2
	5	4.6925	93.85	1.6
西布特罗	0.5	0.4473	89.45	1.5
	5	4.3235	86.47	1.8
溴布特罗	0.5	0.4329	86.57	2.1
	5	4.2835	85.67	1.5
班布特罗	0.5	0.4036	80.72	1.3
	5	4.1640	83.28	1.7
盐酸克伦普罗	0.5	0.4168	83.35	2.3
	5	4.5015	90.03	1.7
妥布特罗	0.5	0.4753	95.05	2.3
	5	4.6045	92.09	1.3
利托君	0.5	0.4888	97.75	1.4
	5	4.7375	94.75	1.5
克仑赛罗	0.5	0.5272	105.43	2.1
	5	4.5465	90.93	2.4
马贲特罗	0.5	0.4647	92.94	1.7
	5	4.6760	93.52	1.8
克仑潘特	0.5	0.4419	88.37	1.6
	5	4.1735	83.47	0.8

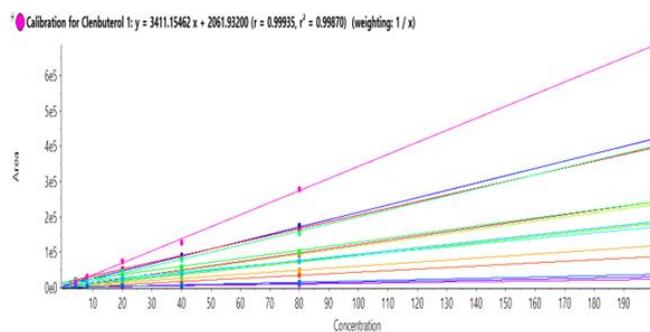


图2.  $\beta$ -受体激动剂药物基质线性回归曲线

## 结论

本实验重现了GB31658.22-2022 食品安全国家标准动物性食品中 $\beta$ -受体激动剂残留量的测定液相色谱-串联质谱法，使用Cleanert PCX固相萃取结合液质联用仪的检测方法对禽肉进行了 $\beta$ -受体激动剂药物的测试。样品经酶解、高氯酸沉淀蛋白，乙酸乙酯、叔丁基甲醚萃取后，Cleanert PCX固相萃取柱净化，Kinetex C18 (100 $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )液相色谱柱进行检测，采用内标法定量。结果表明，添加水平的相对回收率为80~106%，相对标准偏差RSD小于3%，平行性良好，满足检测要求。

## 3.5实验谱图

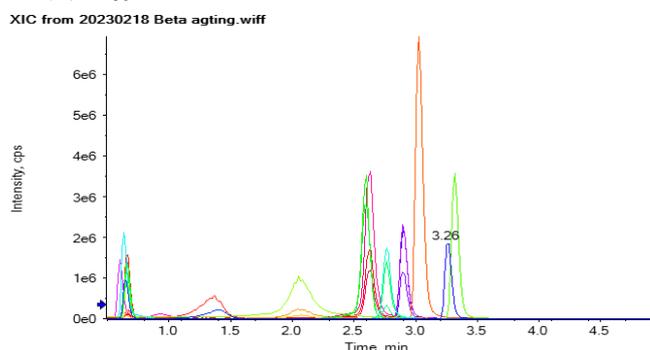


图1. 基质加标 $\beta$ -受体激动剂提取离子流图 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )



## Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

### 三大研发中心

#### 中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

#### 中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

#### 美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

