

解决方案

动物源性食品中的4种瘦肉精类残留量的测定 解决方案

关键词

全自动固相萃取；液相色谱-质谱/质谱；瘦肉精

介绍

“瘦肉精”属于B-激动剂类化合物，包括盐酸克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇等十几种物质，是一类动物用药的统称，属于肾上腺类神经兴奋剂。任何能够促进瘦肉生长、抑制动物脂肪生长的物质都可以叫做“瘦肉精”，对于减少脂肪增加瘦肉作用非常好。“瘦肉精”让猪的单位经济价值提升不少，但它有很危险的副作用，会引起心律不齐甚至是心脏病。近年来（2011年），因食用被“瘦肉精”污染的食物导致中毒事件屡有发生，且后果极其严重，引起了世界各国的高度重视。

为了保证畜产品质量安全，保护人类健康，许多国家都禁止在食源性动物的生产中使用盐酸克仑特罗，美国食品与药品监督管理局（FDA）将肉品中的盐酸克仑特罗残留作为必检项目，欧盟也严禁在饲料中添加“瘦肉精”类药物。我国虽然于2000年提出禁止使用“瘦肉精”类药物，但在畜牧业生产中“瘦肉精”的使用仍屡禁不止，如，在2011年河南省和江苏省发生济源双汇的“瘦肉精”事件以及2021年“3.15晚会”中曝光的沧州青县瘦肉精羊肉问题，都对社会造成了很大的反响。

依据《GB/T 22286-2008 动物源性食品中多种B-受体激动剂残留量的测定 液相色谱串联质谱法》，试样中的B-激动剂经过酶解，用高氯酸调节PH值，沉淀蛋白后离心，上清液用氢氧化钠调节PH后用异丙醇-乙酸乙酯提取，用阳离子交换柱净化，采用液相色谱-串联质谱法进行测定，内标法定量。

1. 介绍

“瘦肉精”属于 β -激动剂类化合物，包括盐酸克仑特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇等十几种物质，是一类动物用药的统称，属于肾上腺类神经兴奋剂。任何能够促进瘦肉生长、抑制动物脂肪生长的物质都可以叫做“瘦肉精”，对于减少脂肪增加瘦肉作用非常好。“瘦肉精”让猪的单位经济价值提升不少，但它有很危险的副作用，会引起心律不齐甚至是心脏病。近年来（2011年），因食用被“瘦肉精”污染的食物导致中毒事件屡有发生，且后果极其严重，引起了世界各国的高度重视。

为了保证畜产品质量安全，保护人类健康，许多国家都禁止在食源性动物的生产中使用盐酸克仑特罗，美国食品与药品监督管理局（FDA）将肉品中的盐酸克仑特罗残留作为必检项目，欧盟也严禁在饲料中添加“瘦肉精”类药物。我国虽然于2000年提出禁止使用“瘦肉精”类药物，但在畜牧业生产中“瘦肉精”的使用仍屡禁不止，如，在2011年河南省和江苏省发生济源双汇的“瘦肉精”事件以及2021年“3.15晚会”中曝光的沧州青县瘦肉精羊肉问题，都对社会造成了很大的反响。

依据《GB/T 22286-2008 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》，试样中的 β -激动剂经过酶解，用高氯酸调节pH值，沉淀蛋白后离心，上清液用氢氧化钠调节pH后用异丙醇-乙酸乙酯提取，用阳离子交换柱净化，采用液相色谱-串联质谱法进行测定，内标法定量。

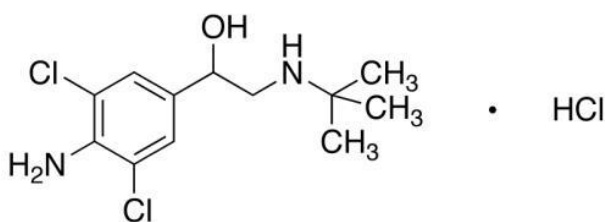


图-1. 盐酸克仑特罗的结构式

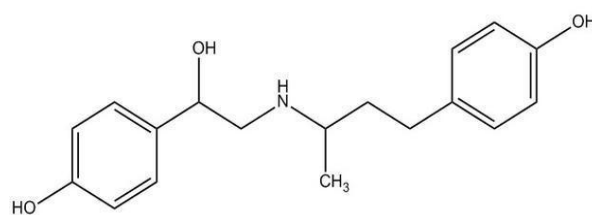


图-2. 莱克多巴胺的结构式

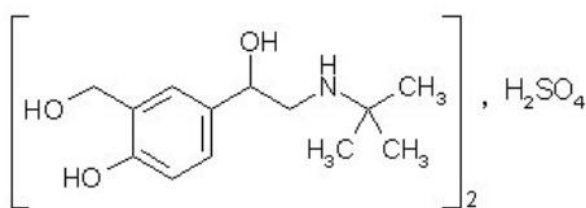


图-3. 硫酸沙丁胺醇的结构式

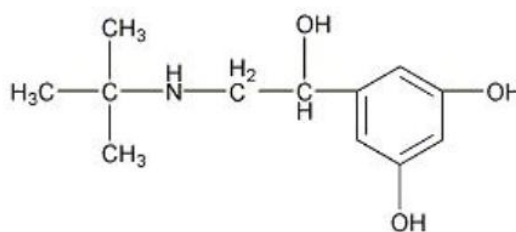


图-4. 特布他林的结构式

关键字：全自动固相萃取；液相色谱-质谱/质谱；瘦肉精

1. 仪器和耗材

仪器

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪 Agilent 1290II/6470 高效液相色谱-串联质谱

Raykol EVA-60 全自动平行浓缩仪

耗材

MCX 固相萃取柱 (RayCure, 60mg/3mL)

试剂

乙酸乙酯、异丙醇、甲醇均为色谱纯；甲酸、高氯酸、氨水、氢氧化钠； β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶。

0.2mol/L 乙酸钠缓冲液：称取 13.6g 乙酸钠，溶解于 500ml 水中，用适量乙酸调节 pH 至 5.2。

标准品：莱克多巴胺盐酸盐，克伦特罗盐酸盐，沙丁胺醇，特布他林硫酸盐，100ng/ml。

内标物：沙丁胺醇-D3，克伦特罗-D9，10ng/ml。

2. 样品制备

2.1 酶解

准确称取 5g (精确到 0.01g) 经捣碎的样品于 50mL 离心管内，加入 0.2mol/L 乙酸钠溶液 (pH=5.2) 20mL，再加入 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶 100 μ L，漩涡混匀，于 37℃ 下避光水浴水解 12h。

2.2 提取

添加 1ml 的内标工作液于待测样品中，加盖置于水平振荡器震荡 15min，5000r/min 高速离心 10min，准确取 10mL 上清液于另一 50mL 离心管中，用高氯酸调节 PH 至 1.0 ± 0.3 ，4000r/min 离心 5min，将上清液转移至另一 50mL 离心管中，用 10mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 11，加入 4~5g 氯化钠，加入异丙醇：乙酸乙酯=6:4 15mL，充分提取，4000r/min 离心 5min，吸取全部有机相到睿科全自动氮吹浓缩仪 EVA-60plus 50℃ 下氮气吹干，加入 0.2M 乙酸铵溶液 5mL 溶解，超声混匀，使残渣充分溶解后备用。

2.3 净化

将 MCX 固相萃取柱安装在 Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪上，依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化。备用液全部过柱，用水 2 mL、2% 甲酸水 2ml、甲醇 2 mL 依次淋洗，抽干，用 5% 氨水 全自动氮吹浓缩仪于 40℃ 水浴氮气吹干，用 10% 乙腈水溶液 (含 0.1% 甲酸) 1.0 mL 溶解，滤过，液相色谱-串联质谱测定。具体的固相萃取方法见图。

甲醇溶液 2 mL 洗脱，收集洗脱液，使用 EVA-60plus

2.2 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	Raykol Fotector Plus
固相萃取柱	MCX 固相萃取柱 (RayCure, 60mg/3mL)
活化	甲醇、水
淋洗	水、2% 甲酸水溶液、甲醇

洗脱

5%氨水甲醇



序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	CH3OH				2.8
2	活化	CH3OH	有机废液	2	3	1.9
3	活化	H2O	有机废液	2	3	1.9
4	上样		有机废液	1	6	6.6
5	清洗样品瓶	2%甲酸水	有机废液	80	5	5.9
6	淋洗	H2O	有机废液	2	2	1.4
7	淋洗	2%甲酸水	有机废液	2	2	1.4
8	淋洗	CH3OH	有机废液	2	2	1.4
9	吹干					5
10	洗脱	5%氨水甲醇	收集	0.5	2	4.5
11	气推		收集	1	2	2.4
12	气推		收集	80	20	1.6
13	结束					

Fotector Plus 高通量全自动固相萃取

取仪

Fotector Plus 固相萃取方法

3. 液质检测条件

3.1 液相条件

Column 色谱柱	Eclipse SB C18, 50mm × 2.1mm, 1.8 μm
Column oven 柱温	30° C
Flow rate 流速	0.2 mL/min
Injection volume 进样量	10μL

3.2 液相梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A (0.1%甲酸溶液)	流动相 B (乙腈)
0.0	95%	5%
2.0	95%	5%
4.0	50%	50%
8.0	70%	70%
10.0	50%	50%
15.0	90%	10%

3.3 质谱仪器参数

离子源	电喷雾源
电离模式	多离子反应监测 (正) 模式
喷雾针压力	45 psi
喷雾加热区电压	1500V
干燥气 (氮气) 温度	325 °C
干燥气流速	5L/min
鞘气温度	350°C
鞘气流速	10L/min

毛细管电压	4000V
增益电压	600V

3.4 MRM 参数

No. 序号	Compound Name 化合物名称	Precursor Ion 母离子	Product Ion 子离子	Dwell 离子监测时间	Fragmentor 裂解电压	Collision Energy 碰撞能量
1	克伦特罗	277	203*	30	90	15
			259	30	90	5
2	莱克多巴胺	302	164*	30	90	10
			284	30	90	5
3	沙丁胺醇	240	148*	30	100	15
			222	30	100	5
4	特布他林	226	152*	30	90	5
			125	30	90	10
5	沙丁胺醇-D ₃	241	151*	30	100	15
6	克伦特罗-D ₉	286	204*	30	90	10

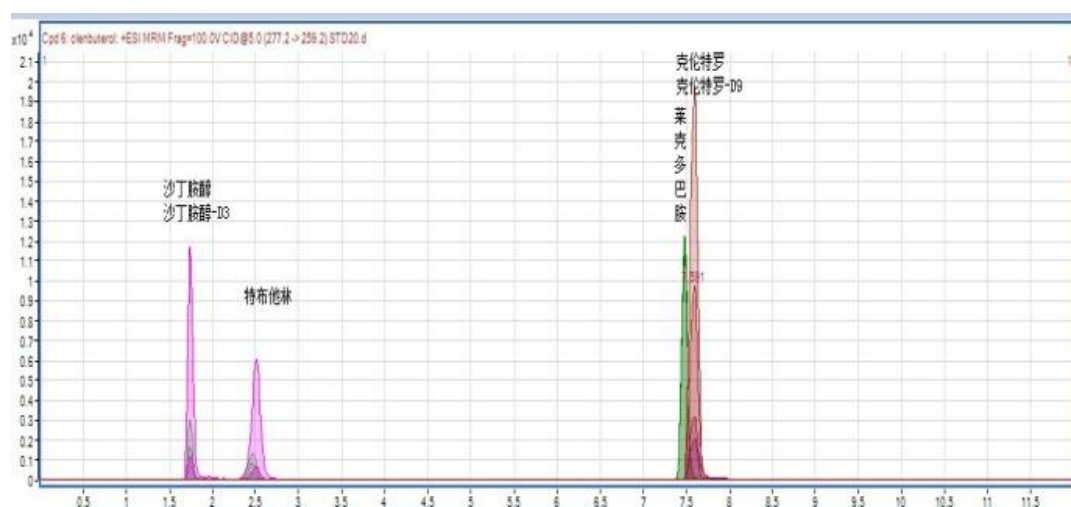


图 5 4 种瘦肉精类 MRM 色谱图

4. 结果与讨论

为了验证该方法的回收率，本实验分别在猪肉样品中加入盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特布他林 4 种混合标准品进行加标回收验证 (n=3)，加标水平为 0.5ug/kg，数据如表-2 所示。加标回

收率在 87.8-112.4%之间，RSD 值控制在 10%以内。说明该方法能够很好地运用于猪肉中瘦肉精残留量的检测。

表-2. 猪肉样品加标回收率及 RSD 值

序号	化合物	添加浓度 ug/kg	回收率 (%) 样品-1	回收率 (%) 样品-2	回收率 (%) 样品-3	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	克伦特罗	2.5	92.6	87.8	95.2	91.9	3.3

2	莱克多巴胺	2.5	102	98.0	101.5	100.5	1.8
3	沙丁胺醇	2.5	99.2	95.7	101.6	98.8	2.5
4	特布他林	2.5	111.1	111.0	112.4	110.7	1.6

注：其中克伦特罗的内标为克伦特罗-D9；沙丁胺醇、特布他林与莱克多巴胺的内标为沙丁胺醇-D3。

本解决方案操作方便、提取和浓缩效率高、回收率好。符合 GB/T 22286-2008 《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》要求。

EVA 系列全自动平行浓缩仪可以自动完成样品的浓缩，采用氮吹针追随的方式使得浓缩进程更

快，并节省氮气；Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理，最多一天能够处理 180 个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。



高通量真空平行浓缩仪
浓缩



高通量全自动固取仪
净化



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

智能化、自动化实验室整体解决方案

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020 年 10 月版