

# HPLC-MS/MS 法同时检测牛奶中 17种 $\beta_2$ -受体激动剂和 $\beta$ -受体阻滞剂残留

王娟<sup>1,2</sup>, 张庆合<sup>2</sup>, 王志华<sup>1</sup>, 李秀琴<sup>2</sup>

(1. 北京化工大学, 化工资源有效利用国家重点实验室 北京 100029; 2. 中国计量科学研究院, 北京 100013)

## Multi-Residual Analysis of 17 $\beta_2$ -Agonists and $\beta$ -Blockers in Milk by HPLC-MS/MS

WANG Juan<sup>1,2</sup>, ZHANG Qing-he<sup>2</sup>, WANG Zhi-hua<sup>1</sup>, LI Xiu-qin<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. National Institute of Metrology, Beijing 100013, China)

**Abstract:** A method for the determination of 17  $\beta_2$ -agonists and  $\beta$ -blockers in milk was developed by solid-phase extraction(SPE) and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS). The samples were extracted with acetonitrile and cleaned with an Oasis MAX SPE cartridge, after protein precipitation with trichloroacetate. The analytcs were quantified by HPLC-ESI-MS/MS operating in positive multiple-reaction mode(MRM). Recoveries of 17 compounds range from 61.6 % to 134.3%, and the RSDs are less than 25%. LOD and LOQ of the analytcs upon the method range from 0.024 to 3.960  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and from 0.068 to 13.200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

**Key words:** milk;  $\beta_2$ -agonists;  $\beta$ -blockers; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0153-02

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪: 美国 Agilent 公司产品。

沙丁胺醇、甲氧酚胺、西马特罗、特布它林、莱克多巴胺、沙米特罗、氯丙那林、菲诺特罗、妥布特罗、喷布特罗、克伦特罗、奥西那林、心得安、阿替洛尔、美托洛尔, 拉贝洛尔、氧烯洛尔, 内标物: 克伦特罗-D9 (纯度均大于 99%): 均购自美国 Sigma 公司; 沙丁胺醇-D3 ( $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司产品。

### 1.2 样品处理

取10 g牛奶样品(准确到0.01 g), 加入一定量沙丁胺醇-D3、克伦特罗-D9内标, 振荡1 h, 加入8倍体积的3%三氯乙酸溶液和2倍体积的乙腈, 振荡和超声各10 min提取后离心, 取上清液过滤, 待净化。依次用5 mL甲醇, 5 mL水活化SPE柱, 上样后, 依次用3%的三氯乙酸、水和甲醇各2 mL淋洗, 抽至近干, 用6 mL 5% (体积比) 氨水/乙醇洗脱、抽干。洗脱液于50 °C下氮气吹至近干, V(甲醇): V(0.1%甲酸) = 5:95的溶液定容至1.5 mL, 0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 进样分析。

### 1.3 仪器测量

**1.3.1 HPLC条件** Waters XBridge TM Shield RP18色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 2.5  $\mu\text{m}$ ); 流动相

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 20775075) 和科技部科技基础性工作专项 (No. 2008FY130200) 资助

通信作者: 张庆合 (1968-), 男 (汉族), 河南人, 研究员, 从事色谱质谱新技术与新方法研究。E-mail: zhangqh@nim.ac.cn

A相为0.1%甲酸溶液, B相为甲醇; 流速:  $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 梯度洗脱程序: 初始为2%B, 5 min线性增至90%B, 8 min 后结束; 柱温:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**1.3.2 MS/MS条件** 电喷雾离子源 (ESI); 正离子多反应监测 (MRM) 方式扫描; Delta EMV: 400; 雾化气压力:  $2.76 \times 10^5 \text{ Pa}$ ; 碰撞气流速:  $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 干燥气温度:  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 干燥气流速:  $9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 毛细管电压4 000 kV, 碰撞能量因化合物不同。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品处理

**2.1.1 沉淀蛋白质、提取及净化条件的优化** 比较了 HAc 和 TCA 沉淀蛋白质效果, 表明 TCA 效果较好。1%、3%、10% 三种浓度 TCA 沉淀蛋白质的回收率结果表明: 3%的 TCA 可以较完全的沉淀蛋白质, 同时可以较充分地提取目标化合物。

采用混合阳离子交换型 (MCX) 固相萃取柱净化牛奶样品, 比较4 mL不同体积比例的水-甲醇进行淋洗的效果, 发现当 $V(\text{水}):V(\text{甲醇})=1:1$ 淋洗时, 大部分干扰物被除掉, 净化效果最好。实验对洗脱液种类进行了优化, 比较了5%的氨水/甲醇和5%氨水/乙醇洗脱对回收率的影响, 发现, 5%的氨水/乙醇洗脱回收率较高, 据此采用5%氨水/乙醇作为洗脱液。

**2.1.2 加标基质匹配时间对回收率的影响** 相同质量的空白牛奶, 添加等量混合标准溶液, 在室温下振荡1、4、10、16 h后, 按1.2的方法前处理、进样分析。结果表明: 基质匹配时间对回收率总体影响不大, 时间为1 h时, 实验的10种目标化合物, 除喷布特罗外, 其余9种的回收率均集中在95%~118%之间。综合考虑实验时间和回收率, 采用加标振荡1 h后进行前处理。

### 2.2 测量条件

比较两种色谱柱Hypersil GOLD ( $150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 5 \text{ }\mu\text{m}$ ) 和Waters XBridge™ Shield RP18 ( $50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 2.5 \text{ }\mu\text{m}$ ) 分离情况, 发现Hypersil GOLD柱上部分化合物出现峰分裂现象, XBridge™ Shield RP18色谱柱上峰形更加对称尖锐, 信噪比高。考察了甲醇-0.1%甲酸溶液和乙腈-0.1%甲酸溶液两种混合溶剂流动相对目标化合物的色谱行为和离子化程度的影响。结果表明, 两种情况下色谱分离效果相差不大, 但甲醇-0.1%甲酸溶液流动相时, 目标化合物的离子化效率较高, 响应较强, 因此, 采用甲醇-0.1%甲酸溶液流动相梯度洗脱。

### 2.3 基质抑制效应

研究了牛奶基质对17种 $\beta_2$ -受体激动剂和 $\beta$ -受体阻滞剂的抑制效应, 结果表明, 前处理后牛奶基质对阿替洛尔、拉贝洛尔和奥西那林的抑制率较大, 分别为65.79%、83.51%和88.42%, 对其余14种目标化合物的抑制效应较小。

### 2.4 方法线性、回收率、检出限和定量限

采用空白基质, 配制一系列标准工作溶液, 在选定的条件下进行测定, 除氧烯洛尔 ( $12.33 \sim 493.20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )外, 其余16种药物在 $0.37 \sim 24.40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 线性关系良好, 相关系数均大于0.997。3个添加水平, 样品的平均加标回收率为61.6%~134.3%。17种目标化合物的方法检出限为 $0.024 \sim 3.96 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , 方法定量限为 $0.068 \sim 13.20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD均小于25%。

## 3 小结

建立了高效液相色谱串联四极杆质谱法检测牛奶中的17种 $\beta_2$ -受体激动剂和 $\beta$ -受体阻滞剂, 对前处理方法进行了优化。该方法简单、准确、快速、灵敏度高、重现性好, 可用于牛奶中 $\beta_2$ -受体激动剂和 $\beta$ -受体阻滞剂残留的检测。

### 参考文献:

- [1] LEE H B, SARAFIN K, PEART T E. Determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta_2$ -agonists in sewage by solid-phase extraction and chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of chromatography A, 2007, 1148 (2):158-167.