

# 高效液相色谱串联质谱法检测水产品 及其制品中沙丁胺醇残留

王凤美\*, 韩静静, 张晓梅, 张鸿伟, 何京澄

(青岛海关技术中心, 青岛 266109)

**摘要:** **目的** 建立水产品及其制品中沙丁胺醇残留检测的高效液相色谱-串联质谱法 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)。**方法** 样品加入乙酸铵缓冲液(pH=5.2), 37°C条件下酶解过夜, 乙酸乙酯-异丙醇(1:1, v/v)提取, QuEChERS净化, HPLC-MS/MS多反应监测模式检测, 内标法定量。**结果** 沙丁胺醇的测定低限为 0.5 µg/kg, 在 0.5、1.0、5.0 µg/kg 3个浓度添加水平, 总体平均回收率在 87.8%~110.7%范围内, 相对标准偏差为 2.7%~9.6%。**结论** 该方法操作简单, 灵敏度、精密度、回收率均满足残留检测法规要求, 精准解决了目前水产品制品中沙丁胺醇药物残留监控没有相关技术支撑的难题。**关键词:** 水产品及其制品; 沙丁胺醇; 高效液相色谱-串联质谱

## Determination of salbutamol in aquatic products and their products by performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Feng-Mei\*, HAN Jing-Jing, ZHANG Xiao-Mei, ZHANG Hong-Wei, HE Jing-Cheng

(Technology Center of Qingdao Customs, Qingdao 266109, China)

**ABSTRACT: Objective** A method based on performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been developed for the determination of salbutamol in aquatic products and their products. **Methods** The analyte was enzymatic hydrolyzed in NH<sub>4</sub>AC solution overnight at 37°C, and extracted by ethyl acetate-isopropanol (1:1, v/v). The extract was cleaned up by QuEChERS method. Quantification was achieved by HPLC-MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) using internal standard method. **Results** The limit of quantification of salbutamol was 0.5 µg/kg. The average recoveries at three spiked levels of 0.5, 1.0 and 5.0 µg/kg ranged from 87.8% to 110.7% with the relative standard deviations of 2.7%~9.6% (n=6). **Conclusion** The method has the advantages of simple pretreatment steps and its sensitivity, precision, and recoveries all meet the requirements of residue detection regulations, accurately solving the problem of lack of relevant technical support for monitoring salbutamol residues in aquatic products and their products.

**KEY WORDS:** aquatic products and their products; salbutamol; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 青岛海关科技攻关项目(QK202203)

Fund: Supported by Technology research projects of Qingdao Customs (QK202203)

\*通信作者: 王凤美, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: fengmeiw@126.com

\*Corresponding author: WANG Feng-Mei, Senior Engineer, Technology Center of Qingdao Customs, Qingdao 266109, China. E-mail: fengmeiw@126.com

## 0 引言

沙丁胺醇是一种短效 $\beta_2$ 受体兴奋剂(俗称“瘦肉精”),用作平喘药,能有效地抑制组胺等致过敏性物质的释放、防止支气管痉挛。尽管我国自2002年就明确将沙丁胺醇列入食用动物禁用清单,但由于其具有提高动物酮体的瘦肉率作用,目前依然被非法用于畜牧养殖,以促进家畜生长和改善肉质。目前文献报道基本为牲畜类组织<sup>[1-3]</sup>、乳制品<sup>[4-5]</sup>、动物毛发<sup>[6-7]</sup>、动物尿液<sup>[8-9]</sup>及饲料<sup>[10-11]</sup>等样品基质中的相关残留分析及检测。

水产品一般含有组氨酸,一旦水产品不新鲜或保存不当,或者水产品制备干制品过程中发生变质,组氨酸就会在细菌的作用下转化成组胺,导致一些人出现过敏。如果产生的组胺过高,还会引起组胺中毒。而沙丁胺醇能有效地抑制组胺等致过敏性物质的释放<sup>[12-13]</sup>。2022年和2023年我国进出口食品、食用农产品、化妆品安全监督抽检和风险监测计划,均要求动物性水产品制品中监控沙丁胺醇项目。水产养殖用药明白纸2022年1号,将 $\beta_2$ 受体兴奋剂一类化合物都列为水产养殖食用动物中禁止使用的药品及其他化合物清单。

但对水产品中瘦肉精类药物研究甚少,特别是水产品制品,没有查到相关检测方法的文献报道。因此我们急需建立水产品及其制品中沙丁胺醇残留检测的方法,为水产品及其制品中兽药残留监管提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

甲醇、乙腈、乙酸乙酯、异丙醇(色谱纯,德国Merck公司);乙酸胺(质谱纯,美国Sigma-Aldrich公司);甲酸(质谱纯,美国Sigma-Aldrich公司);氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);沙丁胺醇(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,天津阿尔塔科技有限公司);沙丁胺醇-d3(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,天津阿尔塔科技有限公司);实验室用水为Milli-Q高纯水。

### 1.2 仪器设备

AB 5500 液相色谱-质谱/质谱仪(美国SCIEX公司); PL203 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); SHZ-B 水浴恒温振荡器(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); CR22GII 高速冷冻离心机(日本HITACHI公司); MS1 Minishaker 旋涡混合器(德国IKA公司); ST3100 pH 计(奥豪斯仪器(常州)有限公司); Turbo Vap LV 型氮吹浓缩仪(美国Capliper公司); Phenomenex Kinetex 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ , 美国Phenomenex公司); Agilent

5982-4950QuEChERS 净化包(50 mg PSA、150 mg  $\text{C}_{18}$ EC、900 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 美国Agilent公司)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 溶液的配制

沙丁胺醇标准中间夜的配制(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确移取沙丁胺醇贮备溶液 0.1 mL, 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。

沙丁胺醇内标中间夜的配制(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确移取沙丁胺醇-d3 贮备溶液 0.1 mL, 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。

沙丁胺醇工作液配制: 准确移取沙丁胺醇标准中间夜, 用 0.1% 甲酸稀释为 100 ng/mL 的标准工作液。采用逐级稀释法, 配制沙丁胺醇含量为: 1.0、2.0、5.0、10、20 ng/mL 的标准曲线系列, 内标含量为 5.0 ng/mL。

乙酸铵缓冲液(2 mol/L): 称取乙酸铵 77.00 g 于 500 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀, 并用乙酸调节 pH 为 5.2。

氢氧化钠溶液(1 mol/L): 称取氢氧化钠 40.00 g 于 500 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀。

乙酸乙酯-异丙醇(1:1, v/v): 移取 250 mL 乙酸乙酯, 250 mL 异丙醇, 混匀。

0.1% 甲酸溶液: 移取 1.0 mL 甲酸于 1000 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀。

#### 1.3.2 样品前处理

##### (1) 样品制备

鱼、虾、盐渍海蜇、冻煮螺肉、鳕鱼排、鱿鱼耳、干海参等。盐渍的水产品制品需去掉表面附盐, 表层有面包糠的水产品制品需去掉面包糠。取可食部分, 食品料理机打碎, 备用。

##### (2) 样品提取

称取 4 g 试样(精确至 0.01 g), 置于 50 mL 具塞离心管中(干制样品, 粉碎后的粉末, 称取 1 g 样品, 加 3 mL 水震荡混合复溶), 加 15 mL 2 mol/L 乙酸铵(pH=5.2)溶液, 振荡提取 20 min, 10000 r/min 离心 5 min。上清液采用 1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 9.5~10.0, 加入 15 mL 乙酸乙酯-异丙醇(1:1, v/v), 混合震荡 10 min, 离心, 取上层有机层, 加入 QuEChERS 分散固相萃取剂, 涡旋震荡 2 min。10000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下氮气吹干, 用 0.1% 甲酸 2 mL 溶解残渣(干制样品, 用 0.1% 甲酸 0.5 mL 溶解残渣), 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机测定。

#### 1.3.3 色谱条件质谱条件

##### (1) 色谱条件

色谱柱 Phenomenex Kinetex, 2.6  $\mu\text{m}$ , 100 mm $\times$ 2.1 mm; 流动相: 甲醇-0.1% 甲酸水, 梯度洗脱条件如表 1 所示; 柱

温 20°C; 流速 0.3 mL/min; 进样量 10  $\mu$ L。

表 1 沙丁胺醇测定的梯度洗脱条件  
Table 1 Elution condition for the determination of salbutamol

t/min	甲醇/%	0.1%甲酸水/%
0	8	92
0.5	8	92
2.0	70	30
2.5	100	0
5.0	100	0
5.1	8	92
8.5	8	92

## (2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多重反应监测; 电喷雾电压: 5500 V; 离子源温

度: 525°C; 气帘气: 35 psi; 雾化气: 45 psi; 辅助气压力: 55 psi。定性离子对、定量离子对及其他质谱参数见表 2。

表 2 保留时间和质谱条件  
Table 2 Retention times and optimized spectrometric parameters

化合物名称 Compound	保留时间 Retention time	定性离子对 Qual Trace	定量离子对 Quan Trace	去簇电压 DP/V	入口电压 EP/V	碰撞能量 CE/V	碰撞室出口 电压 CXP/V
沙丁胺醇	3.42	240.2/148.2	240.2/148.2	40	8	15	11
		240.2/222.3		40	8	19	11
沙丁胺醇-D3	3.41	243.1/151.1	243.1/151.1	80	10	25	10

## 2 结果与分析

### 2.1 提取条件的选择

沙丁胺醇为苯酚性结构的瘦肉精类药物, 在动物体内经代谢过程较强<sup>[14]</sup>。在组织和排泄物中沙丁胺醇主要以硫酸盐合物的形式存在, 其次为葡萄糖酸盐合物。因此, 沙丁胺醇的分析通常需要葡萄糖苷酸酶和芳基硫酸酯酶混合酶的水解步骤, 水解 pH 一般用乙酸铵缓冲溶液控制在 5.2, 37°C 条件下温育 16~18 h。

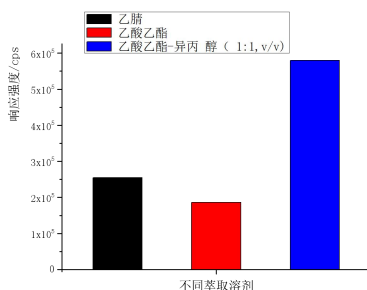


图 2 不同萃取溶剂条件下沙丁胺醇响应强度

Fig.2 Response intensity of salbutamol under different extraction solvent conditions

### 2.2 萃取溶剂的选择

提取后的溶液, 利用沙丁胺醇的极性和酸碱性, 通过调节样品 pH 值和溶剂极性来改变药物在不同体系中的溶解度和分配系数。本实验将乙酸铵提取液采用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 9.5~10.0, 可确保沙丁胺醇处于中性分子状态, 利于有机溶剂萃取。本试验分别采用乙腈、乙酸乙酯、乙酸乙酯-异丙醇(1:1, v/v)三种有机溶剂进行提取后, QuEChERS 净化, 液相色谱-串联质谱检测, 沙丁胺醇的响应强度比较见图。乙酸乙酯-异丙醇(1:1, v/v)对沙丁胺醇的萃取效率明显高于乙腈和乙酸乙酯。

### 2.3 净化条件的选择

QuEChERS 作为农产品检测的快速样品前处理技术, 由于其相对固相萃取小柱操作更为简单, 节省了试剂和时间成本, 已越来越多的被应用于兽药残留检测技术<sup>[15-17]</sup>。水产品及其制品中基质干扰成分蛋白含量较高, 其次为脂肪, 也有少量色素存在。实验室采用 QuEChERS 净化包 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 900 mg、PSA 50 mg、C<sub>18</sub> 150 mg) 和混合型固相萃取柱(MCX)进行盐渍海蜇和鳕鱼鱼饼两种样品的前处理净化对比。从实验结果来看, 沙丁胺醇在两种处理方法中回收率、精密度均满足兽药残留监控的要求, 结果见表 3。由于 QuEChERS 净化, 操作简单、便捷, 可大大节省试剂

和时间成本, 本方法最终选择采用 QuEChERS 净化。

表3 不同净化方式平均回收率和精密度  
Table 3 Average recoveries and RSDs of different purification Methods

净化方式	盐渍海蜇		鳕鱼鱼饼	
	平均回收率/% (n=6)	RSD/% (n=6)	平均回收率/% (n=6)	RSD/% (n=6)
固相萃取柱净化	93.7	6.3	99.4	5.8
QuEChERS 净化	95.6	5.9	98.2	6.9

## 2.4 方法学考察

### 2.4.1 测定低限与线性关系

在高效液相色谱-质谱/质谱确定的仪器条件下, 标准曲线系列浓度进样, 沙丁胺醇药浓度分别为 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20 ng/mL, 线性良好,  $r=0.9933$ 。沙丁胺醇在盐渍海蜇、鳕鱼鱼饼、干海参及虾肉中添加 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 回收样液中沙丁胺醇定量离子均可满足  $S/N \geq 10$ , 因此本方法中沙丁

胺醇测定低限设为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 满足相关残留限量的法规要求。

### 2.4.2 方法回收率与精密度

本方法采用不含待测组分的盐渍海蜇、鳕鱼鱼饼、虾肉、干海参做样品基质空白, 每个添加水平取 6 个平行样, 分别进行 0.5, 1.0, 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三浓度水平添加回收实验。沙丁胺醇的平均回收率为 87.8%~110.7%, 相对标准偏差为 2.7%~9.6%。

表4 不同基质中沙丁胺醇添加回收及精密度(n=6)  
Table 4 Recoveries and RSD of salbutamol in different matrix

样品基质	添加浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	测得值/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率/ (%)	RSD (%)
盐渍海蜇	0.5	0.478	95.6	5.9
	1.0	0.952	95.2	6.4
	5.0	4.86	97.2	6.6
鳕鱼鱼饼	0.5	0.441	98.2	6.9
	1.0	0.963	96.3	5.2
	5.0	4.39	87.8	9.6
虾肉	0.5	0.471	94.2	5.8
	1.0	0.882	88.2	8.1
	5.0	4.63	92.6	6.7
干海参	0.5	0.504	100.8	2.7
	1.0	1.107	110.7	6.8
	5.0	4.50	90.0	5.6

## 2.5 样品溶解液的选择

样品溶解液对沙丁胺醇的峰形影响显著<sup>[8]</sup>, 一般有机溶剂比例不易过高。否则, 很容易出现峰展宽或峰分叉、甚至双峰现象。本研究分别采用 0.1%甲酸、甲醇-0.1%甲酸(1:9, v/v)、甲醇-0.1%甲酸(2:8, v/v)、甲醇-0.1%甲酸(3:7, v/v)、甲醇-0.1%甲酸(5:5, v/v)、乙腈-0.1%甲酸(1:9, v/v)、乙腈-0.1%甲酸(2:8, v/v)、乙腈-0.1%甲酸(3:7, v/v) 8 种不同溶解液稀释沙丁胺醇标准溶液, 进样测试, 峰形比较情况见图 3。当溶解液为甲醇-0.1%甲酸(5:5)时, 沙丁胺醇的峰形明显展宽, 且有明显分叉趋势。溶解液为乙腈-0.1%甲酸(2:8)时, 沙丁胺醇出现双峰现象, 溶解液为乙腈-0.1%甲酸(3:7)时, 保留时间靠前的沙丁胺醇色谱峰明显增高。本研究中出现峰展宽及双峰的有机相比例与文献<sup>[8]</sup>报道有差

异, 跟流动相的组成、梯度洗脱程序及色谱峰的出峰时间有关。同时也说明, 色谱峰出现前展或展宽, 甚至双峰, 主要是有机溶剂的含量影响了流动相系统的洗脱能力, 有机溶剂比例增加, 造成流动相系统的洗脱能力增强; 另外, 随着有机溶剂的增加, 溶解液能给出的质子数减少, 导致沙丁胺醇质子化不完全所致。当溶解液中含相同比例的甲醇和乙腈时, 含乙腈的溶解液中导致的峰展宽现象更为严重, 跟乙腈的洗脱能力比甲醇强, 而提供质子的能力比甲醇弱有关。

由图 3 可知, 样品溶解液为 0.1%甲酸时, 灵敏度相对较高, 且峰形良好。本研究最终选择 0.1%甲醇作为样品的溶解液。

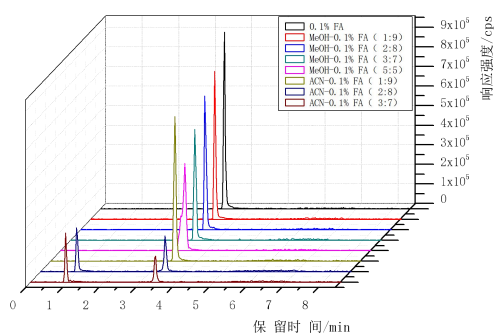


图 3 不同溶解液条件下沙丁胺醇提取离子流图  
Fig.3 MRM of salbutamol in different solvent

## 2.6 实际样品测定

将该方法应用于青岛关区水产品及其制品中沙丁胺醇的进口监督抽检计划, 涉及样品主要包括盐渍鳕鱼鱼排、鱼饼、鱼干、螺肉、盐渍海蜇、盐渍干海参、冻煮鱿鱼膜片等水产品制品, 共检测水产品制品 50 余批。目前, 检测样品中尚未有沙丁胺醇药物检出。

## 3 结论

本研究针对水产品及其制品的基质特点, 建立了沙丁胺醇测定的前处理技术及液相色谱串联质谱检测方法。该方法操作简单, 灵敏度、精密性、回收率均满足残留检测法规要求, 且可重复性良好, 在有力推动实验室检测能力提升的同时, 精准解决了目前水产品制品中沙丁胺醇药物残留监控没有相关技术支撑的难题, 为保障水产品及其制品食品安全、服务地方经济发展提供有力支撑。

## 参考文献

- [1] 董洁琼, 肖璐, 周鑫, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定畜肉中 14 种 $\beta$ -受体激动剂[J]. 色谱, 2023, 41(12): 1106-1114.
- [2] 孙丽, 邢海艳, 吴义春, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛羊肉中瘦肉精[J]. 化学分析计量, 2023, 32(8): 60-64.
- [3] 鲁立良, 刘长勇, 陈永发, 等. 同位素稀释-液相色谱-串联质谱快速测定猪肝中 4 种 $\beta_2$ -受体激动剂残留[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(6): 168-171, 177.
- [4] 关学农, 张敏, 苏运聪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛乳中 19 种 $\beta$ -受体激动剂残留[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(4): 23-28.
- [5] 吴云钊, 张晨, 孙潇, 等. 高效液相色谱-串联质谱/质谱同时测定乳制品中 4 种 $\beta$ -受体激动剂残留量[J]. 食品科技, 2022, 47(08): 294-301.

- [6] 闵佳玲, 费丹, 周瑶敏, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定畜禽毛发中 8 种 $\beta$ -受体激动剂[J]. 分析试验室, 2021, 40(8): 942-947.
- [7] 张凯, 张军民, 赵青余. 动物毛发中 $\beta$ -受体激动剂残留消除规律及检测技术研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(2): 41-46.
- [8] 王凤美, 张鸿伟, 庞士平, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品和尿液中 4 中 $\beta$ -受体激动剂残留[J]. 分析化学, 2008, 36(12): 62:1-1635.
- [9] 王守英, 司文帅, 杨海峰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物尿液中 23 种 $\beta$ -受体激动剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(14): 5620-5628.
- [10] 刘新辉, 纪祥龙, 孙艳丽, 等. QuEChERS 净化结合 UHPLC-MS/MS 同时测定饲料中 $\beta$ -受体激动剂类和喹噁啉类药物[J]. 饲料工业, 2020, 41(10): 55-59.
- [11] 刘佳, 梁桂荣, 李少晖, 等. 液相色谱-串联质谱法检测饲料中 26 种 $\beta_2$ -受体激动剂类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4): 1167-1173.
- [12] 唐法娣, 谢强敏, 王砚, 等. 沙丁胺醇的抗过敏作用及酮替芬对其平喘效应的增强作用[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(5): 415-418.
- [13] MATSUMOTO K, AIZAWA H, FUKUYAMA S, *et al.* Low-dose salbutamol suppresses airway responsiveness to histamine but not methacholine in subjects with asthma [J]. Respiratory Investigation, 2013, 51(3): 158-165.
- [14] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海科学技术出版社, 2002, 641-658.
- [15] 李婧妍, 郭春锋, 崔立辉. QuEChERS-HPLC-MS/MS 法检测液态乳中 9 种 $\beta_2$ -受体激动剂残留量[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(11): 49-52.
- [16] 程江阔, 胡启立, 吴海平. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定牛羊肉中 36 种瘦肉精残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(23): 8798-8808.
- [17] STUBBINGS G, BIGWOOD T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach [J]. Anal. Chim. Acta, 2009, 637(1-2): 68-78.

(责任编辑: 吴华)

## 作者简介



王凤美, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: fengmeiw@126.com