

李双, 刘忠义, 李露青, 等. 液相色谱-串联质谱法检测猪肉中肾上腺素及其代谢物残留[J]. 环境化学, 2019, 38(3): 701-703.

LI Shuang, FANG Keyi, CAO Suxan, et al. Analysis of adrenaline drugs in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(3): 701-703.

ThermoFisher 赛默飞世尔科技

S C I E N T I F I C

液相色谱-串联质谱法检测猪肉中肾上腺素及其代谢物残留*

李 双^{1,2} 刘忠义¹ 李露青¹ 周红玲¹ 徐旭文¹ 陈树兵^{1**}

(1. 宁波出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 宁波, 315211;

2. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波, 315211)

摘 要 针对猪肉中新兴的肾上腺素及其代谢物 3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸, 基于“肾上腺素作用翻转”机理同步添加的异丙嗪, 建立了超高效液相色谱-串联质谱检测方法. 4 种物质线性良好, 相关系数均大于 0.999; 猪肉基质的定量限 (LOQ, S/N = 10) 依次为 25、100、5、0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 精密度 (RSD) 均小于 10%, 平均回收率在 78.3%—92.5%.

关键词 高效液相色谱-串联质谱法, 肾上腺素, 残留检测, 猪肉.

Analysis of adrenaline drugs in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Shuang^{1,2} LIU Zhongyi¹ LI Luqing¹ ZHOU Hongling¹
 XU Xuwen¹ CHEN Shubing^{1**}

(1. Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Technology Center of P.R.China, Ningbo, 315211, China;

2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Chinese Ministry of Education, Ningbo, 315211, China)

Abstract: A simultaneous multi-class analysis method for new adrenaline drugs and its metabolites (3, 4-dihydroxymandelic acid and vanillylmandelic acid), and promethazine based on the mechanism of “epinephrine reversal” in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was established. In the corresponding concentration range, 4 targets had good linear relationships with correlation coefficients more than 0.999. The limits of quantification (LOQs) were 25, 100, 5, 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ in pork, respectively. The average recoveries were 78.3%—92.5% and relative standard deviations were below 10%.

Keywords: LC-MS/MS, adrenaline drugs, matrix dispersion solid phase extraction technique, pork.

肾上腺素是强效的心脏兴奋药, 能使心肌收缩力加强、兴奋性增高. 残留的肾上腺素和有原药活性的代谢物 4-羟基-3-甲氧基扁桃酸和 3,4-二羟基扁桃酸能引起可引起心律失常, 从而引起人体器官病变. 2010 年国家颁布的禁止在食品中添加的药物品种名录中也明确规定在动物源性食品中该类药物及其代谢产物均不得检出. 异丙嗪同时与肾上腺素共同使用则会产生“肾上腺素作用翻转”现象. 此类违禁药物的非法使用, 使其原形和代谢产物残留于动物源食品中, 人们食用后会对人体中枢神经系统等造成不良影响. 目前关于猪肉等动物源性食品中肾上腺素及其代谢物的检测方法很少见, 现行行标 NY/T 3147—2017 也只是针饲料中的肾上腺素和去甲肾上腺素进行了检测.

本研究采用基质分散固相萃取技术, 联合了正己烷和中性氧化铝粉除油, 大大降低了前处理时间和油脂的离子化抑制效应, 建立同时测定猪肉中肾上腺素及其代谢物 3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸, 以及基于“肾上腺素作用翻转”机理同步添加的异丙嗪的高效液相色谱-串联质谱技术分析方法.

* 浙江省基础公益研究计划 (LGN18B050002) 资助.

Supported by Basic Public interest Research Project of Zhejiang Province (LGN18B050002)

** 通讯联系人, Tel: (0574) 87022692, E-mail: shubingchen@126.com

1 实验部分 (Experimental section)

1.1 仪器与试剂

TSQ Quantum Ultra 液相色谱-三重四极杆质谱联用系统 (ThermoFisher Scientific 公司), 配置有 H-ESI II 源. 色谱柱为 Eclipse XDB C8 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm). 冷冻离心机 (德国 SIGMA 公司), 漩涡振荡器 (德国 Heldolph 公司), Milli-Q 高纯水发生器 (美国 Millipore 公司). 滤膜 (DIKMA, Nylon 0.22 μm)

肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸及异丙嗪购自 Sigma 和 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度 ≥95%. 中性氧化铝粉 (分析纯, 100—200 目) 购自南京化学试剂一厂. 甲酸 (色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司), Milli-Q 超纯水 (18.2 ΩM.cm).

1.2 提取净化流程

猪肉基质样品来自国家动物源性残留监控抽样. 由于猪肉基质中脂肪和蛋白质含量较高, 根据待测物极性大小, 对样品提取净化. 称取 5.00 g 样品, 加入 10 mL 乙腈, 振荡 5 min, 4500 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取出 5 mL 上清液, 加入 10 mL 正己烷, 加入 1 g 中性氧化铝粉末, 振荡 5 min, 4500 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取乙腈层 (下层) 过 0.22 μm NY 滤膜, 高浓度加标稀释到线性范围内, 待分析.

1.3 色谱条件与质谱条件

待测物通过 TSQ Quantum Ultra 高效液相色谱系统分离. 色谱柱: Eclipse XDB C8 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 柱温 40 ℃. 流动相 A: 含有 0.1% 甲酸水溶液; 流动相 B: 乙腈溶液, 梯度见下表 1. 进样量为 5 μL, 洗脱总时间为 10 min, 流动相流速为 0.8 mL·min⁻¹.

正、负离子模式 HPLC 洗脱程序: 0 min: 95% A+5% B; 3 min: 95% A+5% B; 6 min: 10% A+90% B; 8 min: 10% A+90% B; 8.1 min: 95% A+5% B; 10 min: 95% A+5% B.

质谱条件: 采用正/负离子扫描, 在多反应监控 (MRM) 模式下对 4 种化合物进行定量分析. 电喷雾电离源 (ESI) 正/负离子电离模式, 喷雾电压分别为 3.2 kV 和 2.5 kV, 鞘气流量 25 L·min⁻¹, 辅助气流量 5 L·min⁻¹, 离子传输毛细管温度 320 ℃, 喷雾器温度 300 ℃. 扫描采用 SRM 模式. 特征碎片离子及碰撞能量见表 1.

表 1 分析物 SRM 模式定量和确证参数

	RT/min	SRM	CE/V
肾上腺素 Adrenaline	2.00	184.5/166.0 [*] , 184.5/106.9	11, 28
3,4-二羟基扁桃酸 3,4-Dihydroxymandelic Acid	2.53	183.5/136.8 [*] , 183.5/137.8	-19, -20
4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸 Vanillylmandelic Acid	3.40	197.2/136.8 [*] , 197.2/138.0	-28, -17
异丙嗪 Promethazine	5.38	285.4/85.9 [*] , 285.4/198.0	21, 27

^{*} 定量离子 the quantitative ion.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 提取条件优化

提取液用量要与肾上腺素类物质的提取率相关联, 向空白猪肉样中分别添加 4 种肾上腺素类物质肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸及异丙嗪 (25、100、5、0.1 μg·kg⁻¹) 进行添加回收实验, 比较了提取液体积为 10 mL, 10 mL×2, 10 mL×3 时的信号相应值 (以峰高计). 结果表明, 当提取液体积为 10 mL×2 和 10 mL×3 时, 4 种待测物峰形较好, 信号稳定, 本研究最终将提取液体积确定为 10 mL×2.

2.2 净化条件优化

针对猪肉基质中含有的高含量油脂, 同时兼顾到实验室大量、快速分析的需求, 采用分散固相萃取技术. 联合了正己烷和中性氧化铝粉除油, 通过测量氮吹充分后的残余油脂的精确质量值计算除油率. 除油率 (%) = (M₀-M_x)/M₀×100, 其中 M_x 是指添加中性氧化铝粉末后的残余油脂质量值, M₀ 是指未添加中性氧化铝粉末的残余油脂质量值. 分别比较了添加 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 g 中性氧化铝粉末, 正己烷添加体积为 10 mL 和 20 mL 的除油率情况. 实验结果可知, 当添加中性氧化铝粉末 0.2 g 和 0.5 g 时, 正己烷添加量 20 mL 的除油率明显高于 10 mL. 当中性氧化铝粉末不足时, 正己烷除油占主导, 正己烷体积高时除油率越好; 当添加中性氧化铝粉末大于 1.0 g 时, 油脂吸附充分, 除油率保持稳定, 正己烷添加量对除油率差别影响很小. 本研究最终确定正己烷添加体积 10 mL 且添加中性氧化铝粉末 1.0 g.

2.3 仪器条件优化

分别采用色谱柱 Eclipse XDB C8 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 和色谱柱 Eclipse SB C8 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 在相同流动相条件下, 除了保留时间的微小差异外, 两种色谱柱均能很好地分离几种待测化合物. 考虑到柱子本身的耐酸性质, 为了延长柱子的使用寿命, 本实验最终采用 Eclipse XDB C8 柱.

有机相选择乙腈, 分别比较了水相中不添加助离子化试剂、加入 0.1% 甲酸、加入 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵、同时加入

0.1% 甲酸和 5 mmol·L⁻¹甲酸铵的分析效果.结果表明,无论是在正离子模式还是负离子模式,含有 0.1%甲酸的溶液均可获得较好的色谱峰形、分离效果和质谱信号响应.本文最终采用含有 0.1% 甲酸水作为最终流动相 A.

2.4 加标回收结果分析

以测得峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线.结果表明,肾上腺素在 5.0—100 ng·mL⁻¹, 3,4-二羟基扁桃酸在 20—400 ng·mL⁻¹,4-羟基-3- 甲氧基扁桃酸在 1.0—20 ng·mL⁻¹及异丙嗪在 0.02—0.4 ng·mL⁻¹浓度范围内,呈现良好的线性关系,相关系数 r^2 均大于 0.999 可以满足定量分析的要求.用基质提取液添加低水平的标准溶液 (25、100、5、0.1 μg·kg⁻¹),获得每种待测物的提取离子色谱图均满足 S/N≥10 时的定量限 (LOQ).三水平浓度的加标回收率在 78.3%—92.5%范围,标准偏差在 10% 以内(表 2).

表 2 4 种肾上腺素类药物的添加浓度及其回收率范围的实验数据 (n=6)
Table 2 Recoveries, Linear equation and RSDs of 4 adrenalines in samples (n=6)

化合物 Compounds	加标浓度 Spiked level/(μg·kg ⁻¹)	回收率 Recovery/%	RSD/%	r^2
肾上腺素 Adrenaline	25	78.3	9.8	1.000
	50	88.9	5.0	
	125	92.5	7.2	
3,4-二羟基扁桃酸 3,4-Dihydroxymandelic acid	100	79.1	4.9	0.9990
	200	80.4	10.0	
	500	88.8	8.5	
4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸 Vanillylmandelic acid	5.0	79.6	9.9	0.9996
	10	89.9	7.6	
	25	85.7	6.3	
异丙嗪 Promethazine	0.1	80.1	9.7	0.9996
	0.2	89.7	7.7	
	0.5	92.5	8.2	

3 结论 (Conclusion)

本研究建立了猪肉中肾上腺素及其代谢物 3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸,以及基于“肾上腺素作用翻转”机理同步添加的异丙嗪残留的 LC-MS/MS 快速分析方法.目标物经乙腈提取后,通过正己烷和中性氧化铝粉达到净化的目的.在色谱分析时使用 Eclipse XDB C8 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱对 4 种待测物进行分离,得到了很好的色谱峰形.该法操作简单,重现性好,分辨率高,能同时对猪肉中肾上腺素类残留进行筛查及定性定量分析.