Eco-Environmental Knowledge Web

环 境 化 学
ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

第 41 卷第 4 期 2022 年 4 月
Vol. 41, No. 4 April 2022

郑锌, 王雨晴, 李莹, 等. 亲水作用色谱-三重四极杆质谱法分析肉中代谢调节剂美度铵残留[J]. 环境化学, 2022, 41(4): 1457-1460.
ZHENG Xin, WANG Yuqing, LI Ying, et al. Analysis of metabolic regulator Meldonium residues in meat by hydrophilic interaction chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41 (4): 1457-1460.

亲水作用色谱-三重四极杆质谱法分析肉中代谢调节剂美度铵残留

郑 锌[1] 王雨晴[2]* 李 莹[3] 李长坤[1] 李月琪[1] 黄涛宏[1]

（1. 岛津企业管理（中国）有限公司，北京，100020；2. 中国食品发酵工业研究院有限公司 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心，北京，100015；3. 四川省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所，成都，610066）

摘 要 本文采用亲水作用 (HILIC) 色谱-串联质谱，建立了肉类中代谢调节剂美度铵残留量的测定方法. 肉类样品经碳酸氢铵-乙腈缓冲液提取，HLB 固相萃取柱净化，经 HILIC 色谱分离，三重四极杆质谱多反应监测模式（MRM）测定，基质匹配外标曲线定量. 结果显示，5—1000 μg·kg^{-1} 浓度范围内线性良好，判定系数 r^2 均大于 0.995，线性良好；猪肉、虾中美度铵的检出限分别为 0.2、0.3 μg·kg^{-1}，定量限分别为 0.7、1.0 μg·kg^{-1}，空白样品中加标 5、10、50 μg·kg^{-1}，加标回收率 81.8%—109.5% 之间. 该方法简便，灵敏度高，准确度好.

关键词 三重四极杆液质联用法，美度铵，肉类，代谢调节剂，兴奋剂.

Analysis of metabolic regulator Meldonium residues in meat by hydrophilic interaction chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

ZHENG Xin[1] *WANG Yuqing*[2]* *LI Ying*[3] *LI Changkun*[1]
LI Yueqi[1] *HUANG Taohong*[1]

(1. Shimadzu (China) Co., Ltd Beijing Branch, Beijing, 100020, China; 2. China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co., Ltd., Beijing Engineering Research Center of Protein & Functional Peptides, Beijing, 100015, China; 3. Institute of Quality Standard and Testing Technology Research of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, 610066, China)

Abstract A method for determination of the residue of metabolizing regulator meldonium in meat was established by hydrophilic interaction (HILIC) chromatography tandem mass spectrometry. Meat samples were extracted by ammonium bicarbonate and acetonitrile buffer, purified by HLB solid phase extraction column, separated by HILIC chromatography, determined by triple quadrupole mass spectrometry multi reaction monitoring mode (MRM), and quantified by matrix matching external standard curve. The results show that the linearity is good in the concentration range of 5—1000 μg·kg^{-1}, and the determination coefficient r^2 is greater than 0.995; The limits of detection of mildonium in pork and shrimp were 0.2 μg·kg^{-1} and 0.3 μg·kg^{-1} respectively, and the limits of quantitative were 0.7 μg·kg^{-1} and 1.0 μg·kg^{-1} respectively; Blank meat and shrimp spiked 5, 10 and 50 μg·kg^{-1} concentration of meldonium, the recovery rate is between 81.8% and 109.5%. The method is simple, sensitive and accurate.

Keywords liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, mildonium, meat, metabolism regulator, doping.

* 通信联系人 **Corresponding author**，Tel：010-53218288，E-mail：yuqingwang_ivy@163.com

美度铵(meldonium, mildronate),又称米屈肼,最初作为一种生长促进剂用于动物养殖,此外,作为左旋肉碱抑制剂,在欧洲作为临床药物治疗糖尿病、神经退行性疾病和支气管肺疾病. 就运动表现而言,对运动员运动能力、耐力以及运动后恢复均有促进作用. 因此,2016 年,世界反兴奋剂中心 (WADA) 将美度铵列入《禁用清单》S4. 激素及代谢调节剂. 为了避免食品来源的兴奋剂污染,国家体育总局也于 2021 年发布《大型赛事食源性兴奋剂防控工作指南》,要求大型赛事举办方对肉食品中食源性兴奋剂进行检测,其中美度铵的参考检出限 20 μg·kg^{-1}.

美度铵的检测方法包括液相色谱-蒸发光散射检测法 (LC-ELSD)、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)、超临界色谱-串联质谱法 (SFC-MS/MS)、液相色谱-高分辨质谱法 (LC-HRMS) 等[1−5]. LC-ELSD 检测法分析时间长,且易受基质干扰,满足不了痕量分析的需要; SFC-MS/MS 分析速度快,但正相色谱柱易受样品中水的影响,不适合长期、大批量样品的分析; LC-MS/MS 用于美度铵的分析,灵敏度高,抗干扰能力强,是适合大批量样品、稳定分析的最佳技术之一. 美度铵极性强,前处理一般采用液液萃取的方式,目前报道的基质主要是尿液、血浆、干血斑等基质,而动物源性食品中美度铵的前处理研究尚未见报道. 对于动物组织样品,基质更为复杂,需要更为有效的前处理方式,因此,亟需建立动物源性食品中美度铵的残留检测方法,以实现更加可靠有效的食源性兴奋剂污染控制.

本文利用碳酸氢铵缓冲溶液提取,HLB 固相萃取净化,亲水作用色谱-串联质谱定性定量测定,建立了猪肉、虾中美度铵残留的检测方法,对提取效率、基质效应等进行了研究,并进行了详细的方法学考察. 该方法快速、准确、灵敏度高,供相关行业参考.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验材料

仪器 亲水作用色谱与三重四极杆质谱仪联用系统 LCMS-8045, SHIMSEN Styra HLB 固相萃取柱(60 mg, 3 mL),固相萃取仪,离心机,涡旋混匀器.

试剂 碳酸氢铵(国药),乙酸铵(Sigma),乙腈(Honeywell),正己烷(Merck),美度铵 (二水合物) ,≥98%(阿拉丁).

1.2 实验条件

色谱条件 色谱柱: Shim-pack Velox HILIC(50 mm ×2.1 mm I.D., 2.7 μm),流动相: A 为 10 mmol·L^{-1} 乙酸铵水溶液,B 为 A:乙腈=95:5(*V*/*V*);流速 0.3 mL·min^{-1}, 梯度洗脱, 0—6 min, 80%—72%B, 6.5—7.5 min, 50%B, 8—11 min, 80%B; 柱温 35℃, 进样体积: 1 μL;

质谱条件: 离子化模式: ESI, 正离子模式; 离子喷雾电压: +4.5 kV; 雾化气流速: 氮气 3.0 L·min^{-1}; 加热气流速: 氮气 10 L·min^{-1}; 干燥气流速: 氮气 10 L·min^{-1}; DL 温度: 250°C; 加热模块温度: 400°C; 离子源温度: 300°C; 扫描模式: 多反应监测 (MRM); 驻留时间: 150 ms; 延迟时间: 3 ms; 美度铵离子对: 147.2>58.25, 碰撞能−27 eV; 147.2>59.25,碰撞能−19 eV; 147.2>42.10,碰撞能−55 eV; 其中 147.2>58.25 离子对为定量离子对, 其余为定性离子对.

1.3 样品前处理

猪肉剔除油脂、虾去壳,均质,准确称取样品 1.0 g,置于 50 mL 离心管中,准确加入 50 mmol·L^{-1} 碳酸氢铵水: 乙腈(3:7)缓冲液 10.0 mL,涡旋 30 s,超声提取 5 min, 17500 r·min^{-1} 均质 30 s,加入 10 mL 正己烷,轻轻混匀, 4000 r·min^{-1} 转速离心 10 min,弃去正己烷层,吸取 2 mL 清液过 HLB 固相萃取柱,收集上样液,过 0.22 μm 尼龙滤膜,上机.

1.4 标准溶液制备

基质标准系列工作液的配制: 以不含美度铵的样品为空白样品,按照前处理制备空白基质,以空白基质为溶剂,加入适量标准工作溶液,配制成浓度为 0.5、1、2、5、20、100 ng·mL^{-1} 的基质匹配标准工作曲线,待上机分析.

1.5 定性定量测定

以保留时间、定性定量离子比例定性,基质标准工作曲线法定量.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 质谱条件优化

美度铵是 β-氨基酸衍生物,属于两性化合物,在正离子模式下易形成 $[M+H]^+$, 一级扫描得到前体离子为 m/z 147.1. 对前体离子进行二级扫描,碰撞能为−20eV 时,容易形成大碎片 m/z 59.1,继续增大碰撞能至−55eV,形成更小的碎片 m/z 58.1、m/z 42.1. 利用仪器的自动优化功能,对碰撞能进行优化,最佳 MRM 参数参见 1.2 实验条件.

2.2 色谱条件优化

美度铵极性很强, lg*P* 为-1.4,因此在反相 C8、C18 色谱柱上无保留. 从结构上看,采用烷基磺酸根离子对试剂,可实现反相模式保留,但离子对试剂的引入,会给质谱分析带来离子对残留、竞争离子化等新的挑战. 而采用亲水作用色谱 (HILIC) 模式进行分析,可实现质谱兼容的高灵敏度分析. 本文对比了 Silica、Diol、Amide 等几种常见的 HILIC 固定性的保留分离能力. Shim-pack Velox HILIC(50 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm)、PC HILIC(150 mm × 2.0 mm I.D., 3 μm)、Shim-pack Diol HILIC(50 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm)、Inersil HILIC(150 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm)、Inersil Amide(100 mm × 2.1 mm I.D., 5 μm)、Glycan BEH Amide(150 mm × 2.1 mm I.D., 1.7 μm), Diol 对于美度铵的保留较弱,难以分离基质中的干扰峰; 两款 Amide 色谱柱对美度铵保留较好,可以分离猪肉基质中的干扰峰,但是虾基质中干扰峰更多,即使是填料颗粒更小、柱效更高的 Glycan BEH Amide 也无法实现分离; Silica 固定相的色谱柱对美度铵干扰峰的保留分离效果更好, Shim-pack Velox HILIC、PC HILIC 两款色谱柱对于猪肉、虾基质干扰均能实现较好分

离, 此外, Shim-pack Velox HILIC 采用的是实心球颗粒的高纯硅胶, 柱效高, 平衡快, 更适合质谱匹配的快速分析, 本文最终选择 Shim-pack Velox HILIC 色谱柱(图 1).

流动相添加剂对色谱峰形, 分离度有一定的影响, 对比了 10 mmol·L^{-1} 乙酸铵水、0.1% 甲酸水、0.1% 甲酸+10 mmol·L^{-1} 乙酸铵水的 3 种添加剂体系, 添加甲酸导致色谱峰分叉, 且美度铵与基质干扰峰之间的分离度下降, 同时加甲酸对于质谱响应没有明显促进作用, 因此, 最终选择 10 mmol·L^{-1} 乙酸铵作为流动相添加剂.

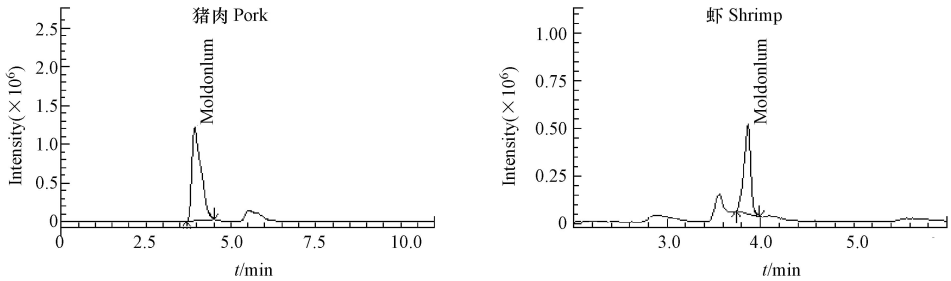

图 1　猪肉、虾基质中美度铵的 MRM 色谱图 (Velox HILIC 色谱柱)

Fig.1　MRM chromatogram of meldonium in pork and shrimp matrix(Velox HILIC Column)

2.3　前处理考察

美度铵分子量小, 极性强, 水溶性好, 优先考虑使用含水比例高的提取试剂进行萃取, 此外, 肉类中蛋白质脂肪含量丰富, 特别是水溶性氨基酸对分离测定干扰较大, 需要一定的净化处理. 本文对比了水/乙腈(1:9,*V*/*V*)、水/乙腈(1:9, *V*/*V*, 含 1% 甲酸)、0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液/乙腈(1:9,*V*/*V*)、0.1 mol·L^{-1} EDTA-Mcllavine 水溶液(pH=4.0、7.0、10.0)、50 mmol·L^{-1} 碳酸氢铵/乙腈(3:7,*V*/*V*)提取效率. 20 ng·g^{-1} 单点基质标计算提取效率, 水/乙腈(1:9,*V*/*V*)提取效率 54%, 其他提取试剂均可以 80%—105% 的提取率. 水/乙腈(1:9,*V*/*V*, 含 1% 甲酸)的提取效率 90%, 但是样品溶液 pH 较低, 导致色谱分离度下降; 0.1 mol·L^{-1} 磷酸缓冲液/乙腈(1:9,*V*/*V*)、0.1 mol·L^{-1} EDTA-Mcllavine 水溶液在 pH=4.0、7.0、10.0 均可以实现 90% 以上的提取效率, 但含磷酸盐的缓冲液容易在质谱离子源处形成结晶堵塞喷针, 需要在净化过程中去除; 50 mmol·L^{-1} 碳酸氢铵/乙腈(3:7,*V*/*V*)提取剂, 乙腈沉淀蛋白的, 同时缓冲盐溶液可以让肉分散, 让肉中的药物充分分散释放, 实现了 101% 的提取效率, 此外, 提取剂中水相比例不高于 50% 可以避免溶剂效应, 有利于 HILIC 模式分析.

根据提取的试剂不同, 采用两种固相萃取净化方式: 一种是 0.1 mol·L^{-1} EDTA-Mcllavine 提取, 净化时使用 styra MCX、SCX、WCX 固相萃取柱; 第二种是 50 mmol·L^{-1} 碳酸氢铵/乙腈(3:7,*V*/*V*)提取, styra HLB 固相萃取柱净化. 仅 pH=4.0 的 0.1 mol·L^{-1} EDTA-Mcllavine 提取后, 在 SCX 有一定的保留, 当上样体积增大时, 美度铵被上样溶剂洗脱. 50 mmol ·L^{-1} 碳酸氢铵/乙腈(3:7,*V*/*V*)提取后, 经 HLB 净化, 杂质保留在 SPE 柱上, 美度铵完全洗脱, 直接收集上样液, 上机测试, 回收率可达 95%. HLB 净化, 可以实现对样品中弱极性至非极性组分净化. 因此最终选择了挥发性的碳酸氢铵缓冲溶液作为提取剂, HLB 净化的前处理方式.

2.4　基质效应

基质中共流出组分影响离子化效率, 对目标物测定产生一定影响, 称为基质效应. 基质效应(ME)=样品提取后添加/纯的标准溶液, 当 ME＞1 时, 表现为基质增强效应; 当 ME＜1 时, 表现为基质抑制效应; 当 ME 介于 0.8—1.2 之间时, 通常认为不存在明显的基质增强或基质抑制效应, 超出此范围表明存在较强基质效应, 须进行基质效应补偿[6].

采用基质匹配标准溶液的标准曲线斜率与溶剂标准溶液的标准曲线斜率的比值进行评价. 配制系列浓度的溶剂标准曲线和基质标准曲线, 溶液标准曲线、猪肉基质曲线、虾基质曲线结果显示, 猪肉基质效应在 59%, 虾基质效应在 27%, 均存在明显的基质抑制效应. 为了平衡基质效应对定量准确性的影响, 本文采用基质匹配外标曲线法定量.

2.5　线性范围与灵敏度

按照 1.4 节配制基质匹配系列标准溶液, 上机分析得出美度铵在猪肉、虾基质中线性范围和线性关系. 结果表明, 美度铵在 5—1000 μg·kg^{-1} 范围内, 线性良好, r^2>0.995, 权重 1/C^2. 以空白样品加标测定信噪比, 重复测定 3 次, 以 3 倍信噪比计算检出限, 10 倍信噪比计算定量限, 检美度铵在猪肉、虾基质的检出限分别为 0.2、0.3 μg·kg^{-1}, 美度铵的定量限在 0.7、1.0 μg·kg^{-1}. 检出限满足《大型赛事食源性兴奋剂防控工作指南》的要求. 美度铵基质标准曲线、检出限和定量限见表 1.

表 1　美度铵基质标准曲线的线性关系、检出限

Table 1　Calibration and detection limits of meldonium in pork and shrimp matrix

化合物	基质	线性方程	判定系数r^2	检出限/(μg·kg^{-1})	定量限/(μg·kg^{-1})
美度铵	猪肉	Y=136318.3X+8170.1	0.9988	0.2	0.7
	虾	Y=34568.9X+9147.8	0.9955	0.3	1.0

2.6　回收率与精密度

选择空白猪肉、虾, 进行 5、10、50 μg·kg^{-1} 浓度的加标回收试验, 每个加标浓度 6 个平行, 按照前述前处理方式处

理，上机测定，以基质外标曲线法定量，计算回收率. 由表 2 可见，美度铵加标回收率 81.8%—109.5% 之间，RSD<15%.

表 2 美度铵在猪肉、虾基质加标回收率

Table 2 Recovery and precision of meldonium in pork and shrimp

基质	浓度/(μg·kg^{-1})	回收率/%	RSD/%
猪肉	5	81.8	6
	10	88.6	5
	50	100.6	3
虾	5	88.9	15
	10	90.9	15
	50	109.5	12

2.7 实际样品检测

市场上购买了 4 份猪肉、3 份虾样品进行了测定，结果显示，7 份样品均未检出美度铵.

3 结论(Conclusion)

本文建立了亲水作用色谱-三重四极杆质谱(HILIC-MS/MS)分析肉中美度铵残留量的检测方法. 该方法采用 HILIC 模式分离，有效解决了质谱通道干扰，避免假阳性的发生，采用基质匹配标准曲线法定量，平衡了基质效应对定量准确度的影响，美度铵在猪肉、虾基质中 5—1000 μg·kg^{-1} 的范围内线性良好，判定系数 r^2>0.995；采用碳酸氢铵缓冲溶液提取，Styra HLB 固相萃取净化方式，5、10、50 μg·kg^{-1} 加标回收率 81.8%—109.5% 之间，RSD<15%，回收率良好.

参考文献 (References)

[1] 曹国颖，吕允凤，胡欣，等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定米屈肼中有关物质及含量 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(11): 864-866.
CAO G Y, LV Y F, HU X, et al. Determination of mildronate and related substances by HPLC-ELSD [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(11): 864-866(in Chinese).

[2] PENG Y, YANG J, WANG Z R, et al. Determination of mildronate by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers [J]. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2010, 878(5/6): 551-556.

[3] KNYCH H K, STANLEY S D, MCKEMIE D S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of meldonium in exercised thoroughbred horses [J]. Drug Testing and Analysis, 2017, 9(9): 1392-1399.

[4] XHAFERAJ M, NAEGELE E, PARR M K. Ion exchange in supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry (SFC-MS/MS): Application for polar and ionic drugs and metabolites in forensic and anti-doping analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1614: 460726.

[5] TEMERDASHEV A, AZARYAN A, DMITRIEVA E. Meldonium determination in milk and meat through UHPLC-HRMS [J]. Heliyon, 2020, 6(8): e04771.

[6] WANG H, PING H, LIU Q J, et al. Determination of pesticide residues in strawberries by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Analytical Methods, 2022, 15(1): 85-95.