

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肉中 5 种 α_2 受体激动剂残留量方法的研究

李丹妮¹, 严凤¹, 黄成龙², 顾欣¹

(1. 上海市兽药饲料检测所, 上海 201103; 2. 上海理工大学, 上海 200093)

[收稿日期] 2012-07-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 01-0023-05 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了检测猪肉中 5 种 α_2 受体激动剂的超高效液相色谱 - 串联质谱分析方法。样品加入碱性缓冲液, 再经过乙酸乙酯提取, 浓缩、净化后用乙腈 - 0.2% 甲酸溶解, 经超高效液相色谱 - 串联质谱在多反应检测模式下测定。结果显示, 盐酸可乐定等 5 种 α_2 受体激动剂标准曲线在 0.5~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好, 线性相关系数(r)均大于 0.99; 在 1~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平下, 5 种 α_2 受体激动剂加标回收率在 60%~80% 之间, 相对标准偏差(RSD)均小于 10% ($n=6$); 本方法对猪肉中 5 种 α_2 受体激动剂的定量限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N > 10$), 检出限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N > 3$)。

[关键词] α_2 受体激动剂; 猪肉; 超高效液相色谱 - 串联质谱法

Determination of Five Alpha - agonists in Pork by Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

LI Dan-ni¹, YAN Feng¹, HUANG Cheng-long², GU Xin¹

(1. Shanghai Municipal Institute of Veterinary Drug and Feedstuff Control, Shanghai 201103, China;

2. University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: A simple, sensitive and ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometric (UPLC/MS/MS) method was developed for the quantification of five alpha - agonists in pork. Five alpha - agonists extracted by buffer ($\text{pH} = 11.3$) from pork, was finally dissolved in acetonitrile:0.2% formic acid (20:80, V/V) after the procedure of being concentration. The sample was separated on SB C₁₈ (100 mm × 3.0 mm i. d., 1.8 μm) column using a mobile phase of acetonitrile/0.2% FA. Five alpha - agonists were detected in positive ion mode using multiple reactions monitoring (MRM). The quantitative analysis was finished in 10.0 min. Results showed that in the range of from 0.5 to 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, the standard curves for five alpha - agonists were in good linearity, the correlation coefficients (r) were greater than 0.99. The recoveries for five alpha - agonists at the addition of four levels (1~50 ng/g) were from 60% to 80% and the relative standard deviation (RSD) for the determination of five alpha - agonists were less than 10% ($n=6$). The limits of quantity ($S/N \geq 10$) and limits of detection ($S/N \geq 3$) by the present method for five alpha - agonists were found to be 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

Key words: alpha - agonists; pork; ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry

随着科学技术的发展, β_2 受体激动剂的检测技术得到了飞速发展, 从而有效遏止了 β_2 受体激

动剂在动物养殖中的非法使用, 而 α_2 受体激动剂作为一种新型的具有促生长及提高瘦肉率作用的药

物也在逐步引起关注,且在饲料行业中已有非法添加使用的趋势,但目前尚无相关的残留检测方法。

α_2 受体激动剂对 α_2 受体具有特异亲和性,主要用于治疗人类的高血压症^[1~2]。1975 年 Lal^[3]等发现了 α_2 受体激动剂可乐定对正常人具有显著促进血浆生长激素水平升高的作用。可乐定通过激动 α_2 受体导致 GRF(长激素释放因子)的释放^[4~6],从而引起 GH(生长激素)的分泌增加。王雷杰等^[7]以“杜长大”三元杂交生长猪为试验对象,研究结果表明在饲粮中添加可乐定使猪的体氮储留增加,动物研究表明在猪饲粮中添加 0.5 mg/kg 可乐定,能显著提高猪的瘦肉率,改善猪的胴体组成。农业部 1519 号公告已明确把可乐定列入了农业部《禁止在饲料和动物饮水中使用的物质》清单。 α_2 受体激动剂类药物具有近似的药理作用,因此研究 α_2 受体激动剂药物的检测方法具有重要的意义。5 种 α_2 受体激动剂类药物分子结构图见图 1。

目前已有采用液相色谱 - 串联质谱法(LC/MS/MS)检测血样中可乐定^[8],以及采用高效液相色谱法(HPLC)检测饲料中盐酸可乐定的方法^[9]。本研究采用超高效液相色谱 - 串联质谱(UPLC/MS/MS)技术,建立了猪肉中包括盐酸可乐定在内的常见 5 种 α_2 受体激动剂检测方法,能够进行准确地定性和定量,同时也大大提高了检测的效率。

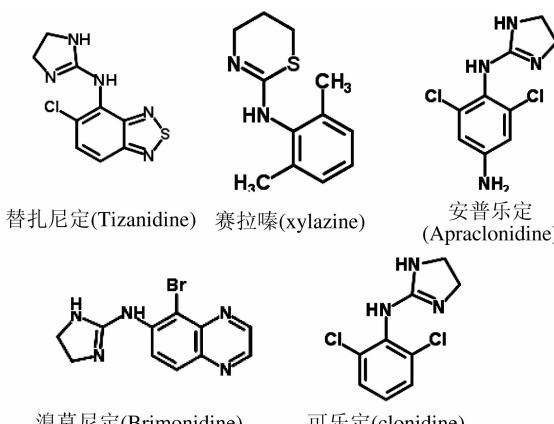


图 1 5 种 α_2 受体激动剂类药物分子结构图

1 材料和方法

1.1 仪器 超高效液相色谱 - 串联质谱仪 UPLC/Quattro Premier XE (Waters 公司); MassLynx v4.1 质谱工作站软件; 漩涡振荡器; CL3R 冷冻离心机(美国 IEC 公司); Laborota 4000 旋转蒸发器(德国 Heidolph 公司)。

1.2 药品与试剂 盐酸可乐定对照品,纯度 ≥ 98% (sigma 公司);盐酸替扎尼定对照品,纯度 ≥ 98% (TRC 公司);盐酸赛拉嗪对照品,纯度 ≥ 99% (Dr. Ehrenstorfer 公司);盐酸安普乐定对照品,纯度 ≥ 98% (TRC 公司);溴莫尼定对照品,纯度 ≥ 98% (TRC 公司);乙腈,色谱纯(Merck 公司);甲醇,色谱纯(Merck 公司);甲酸,纯度 96% (TEDIA);甲醇、乙酸、氨水均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);实验用水为超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 液相色谱参考条件 色谱柱: SB C18 100 mm × 3.0 mm, 粒径 1.8 μm, 柱温 40 °C; 进样量 10 μL; 流速 0.3 mL/min; 流动相 A 相为乙腈; B 相为 0.1% 甲酸水溶液; 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相洗脱程序

时间/min	乙腈 A/%	0.1% 甲酸溶液 B/%
0.00	10	90
3.00	30	70
4.00	30	70
4.50	80	20
5.50	80	20
5.60	10	90

1.3.2 质谱参考条件 电喷雾离子源,正离子电离(ESI⁺);多反应监测(MRM);毛细管电压 3.0 kV;离子源温度 110 °C;脱溶剂气流量 700 L/h;锥孔气 50 L/h;去溶剂温度 350 °C;碰撞气(Ar)流量 0.24 mL/min;碰撞室压力 3.8×10^{-3} Pa。分析中以保留时间和离子对(母离子和两个子离子)的信息比较进行定性分析,经过优化的质谱参数见表 2。

定性依据:样品中待测物质的保留时间与标准品混合工作液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且样品谱图中各组分定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准品工作液中对应的定性离子的相对离子丰度进行比较,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

1.3.3 标准曲线 分别精密称取 5 种 α_2 受体激动剂类药物对照品,用甲醇配成浓度各约 1 mg/mL 的标准储备液,2~8 °C 冷藏保存,有效期 6 个月。分别移取 5 种 α_2 激动剂储备液适量,置于棕色容量瓶中,用乙腈:0.2% 甲酸水溶液(V/V, 20:80)溶液逐级稀释成浓度分别为 0.5、1、5、10、50、100 ng/mL 的混合标准对照工作液,现配现用。

表 2 5 种 α_2 受体激动剂离子对参考值

被测物名称	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	锥孔电压/V	保留时间/min	碰撞能量/eV
替扎尼定	254.1 > 44.1	254.1 > 44.1	38	2.88	22
	254.1 > 210.0				30
赛拉嗪	221.1 > 90.0	221.1 > 90.0	30	4.59	22
	221.1 > 164.0				26
溴莫尼定	292.2 > 170.2	292.2 > 212.3	40	2.42	35
	292.2 > 212.3				30
安普乐定	245.2 > 174.2	245.2 > 174.2	40	2.66	28
	245.2 > 209.2				20
可乐定	230.0 > 160.0	230.0 > 213.0	43	3.13	34
	230.0 > 213.0				24

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差 %

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

1.3.4 样品的前处理 称取 2 g 均质后的猪肉试样于 50 mL 离心管中, 准确加入 5 mL 0.1 mol/L 碳酸钠:0.1 mol/L 碳酸氢钠(9:1, pH 为 11.5), 振荡混匀, 加入 10 mL 乙酸乙酯, 充分震荡, 然后于 8000 r/min 离心 5 min, 上层清液转移至梨形瓶中, 下层溶液中再加入 10 mL 乙酸乙酯进行提取, 合并两次上层清液。将上清液 55 ℃ 下旋转蒸发至干, 并用 4 mL 乙腈:0.2% 甲酸(20:80, V/V) 溶解备用。

固相萃取小柱 PCX (3CC/60mg) 依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化, 再将备用液全部过柱, 用 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗, 空气抽干 2 min, 用 5% 氨水甲醇溶液 6 mL 洗脱, 收集洗脱液, 旋转蒸发(60 ℃)至干, 用 1 mL 0.2% 甲酸乙腈水溶液(0.2% 甲酸:乙腈 = 80:20)溶解, 过 0.22 μm 滤膜后上机测定。

1.3.5 样品回收率与精密度 选取空白猪肉样品, 准确称取匀浆后的样品 2.0 g 于 50 mL 离心管中, 分别添加浓度为 10.0 μg/L 的 5 种 α_2 受体激动剂混合标准工作液 0.2、1、2、4 mL 至样品中, 制得添加浓度分别为 1、5、10、50 μg/kg 样品。按照本方法确定的条件进行加标回收重复性试验, 每个浓度重复测定 6 次, 考察方法回收率及相对标准偏差。

1.3.6 检测限和定量限 取空白样品, 按 1.3.5 项前处理步骤后, 经超高效液相色谱-串联质谱测得噪音信号的平均值, 按信噪比 S/N ≥ 3 为检测限, 信噪比 S/N ≥ 10 为定量限。

2 结果

2.1 超高效液相色谱-串联质谱的测定 图 2 是 5 种 α_2 受体激动剂类药物混合标准溶液的 MRM 色谱图。

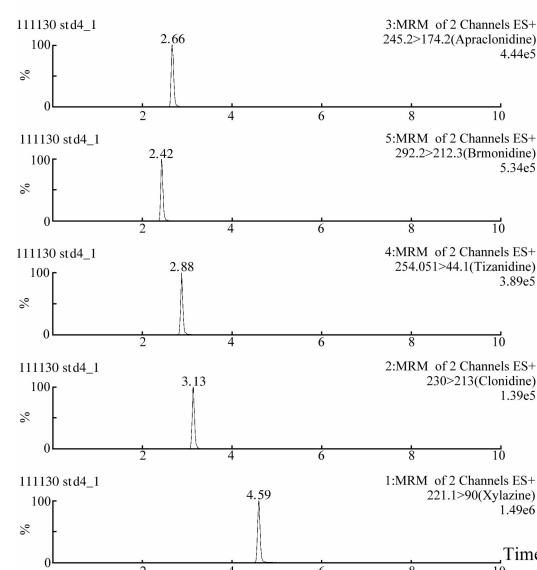


图 2 α_2 受体激动剂类药物混合标准溶液 MRM 色谱图(标准工作液浓度为 10 μg/L)

2.2 标准曲线 用液相色谱-串联质谱测定系列混合标准工作液, 5 种 α_2 受体激动剂类药物在 0.5~100 μg/L 范围内线性关系良好, 线性方程及相关系数如表 4 所示。

表 4 5 种 α_2 受体激动剂类药物标准曲线线性实验结果

药物品种	线性方程	相关系数
可乐定	$y = 776.14x + 84.51$	0.9992
赛拉嗪	$y = 12514.5x + 504.95$	0.9997
安普乐定	$y = 2598.57x + 599.31$	0.9979
溴莫尼定	$y = 2561.83x + 421.3$	0.9972
替扎尼定	$y = 1885.83x + 334.06$	0.9984

2.3 精密度和回收率 选择猪肉空白样品, 按照本方法确定的条件进行加标回收重复性试验, 实验表明相对标准偏差均 ≤ 10%, 表明采用本方法测定猪肉中 5 种 α_2 受体激动剂类药物具有较好的精密度、重复性。统计结果见表 5。

表 5 猪肉中添加不同浓度的 5 种 α_2 受体激动剂的回收率和精密度($n=6$)

药物名称	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
安普乐定	66.1		69.8		72.3		75.6	
	65.3		69.5		73.6		77.2	
	65.4	4.0	71.9	1.6	74.4	2.1	73.1	3.3
	72.0		70.0		72.0		70.8	
	64.8		69.8		76.0		75.9	
	65.9		71.1		75.1		72.2	
赛拉嗪	64.1		60.0		61.5		68.1	
	64.1		61.1		61.7		67.4	
	63.8	1.1	69.9	0.9	61.7	0.2	69.6	2.7
	62.5		60.0		61.7		68.3	
	62.8		69.9		61.8		64.4	
	64.0		60.2		61.4		66.2	
可乐定	90.2		76.9		79.5		81.2	
	93.7		73.2		78.9		80.4	
	94.0	4.0	76.9	2.5	81.7	1.9	79.5	1.6
	98.7		78.2		80.6		82.1	
	90.8		74.9		81.4		83.0	
	88.1		74.2		83.1		82.2	
替扎尼定	78.4		67.5		76.0		74.5	
	91.6		70.1		79.0		73.3	
	86.9	5.8	72.9	3.1	76.7	2.4	72.4	3.0
	86.4		68.8		79.4		70.7	
	79.8		73.1		79.7		77.2	
	87.4		70.5		75.4		73.4	
溴莫尼定	63.0		65.1		64.4		66.7	
	62.1		65.3		62.1		70.5	
	60.3	3.4	65.8	1.6	65.0	2.0	71.4	3.0
	63.7		67.2		65.2		72.6	
	67.9		64.5		64.0		69.7	
	62.3		65.3		65.8		68.7	

由上表看出,按已确定的样品提取条件和色谱条件测定添加回收量,实验表明猪肉中 5 种 α_2 受体激动剂回收率达到 60%~80%,相对标准偏差均 <10%,说明该方法具有较好的准确度。图 3~图 4 为空白猪肉及添加回收率 MRM 色谱图。

2.4 检测限和定量限 猪肉样品中 5 种 α_2 受体激动剂的检测限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,信噪比 S/N(Peak to Peak) > 3。方法最低定量限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,信噪比 S/N(Peak to Peak) > 10。

3 讨论

3.1 工作液稀释溶剂的选择 分别比较了中性溶剂纯甲醇、50% 甲醇水溶液,酸性溶液 0.2% 甲酸、0.2% 甲酸甲醇、0.2% 甲酸:乙腈 = 50:50、0.2% 甲酸:乙腈 = 80:20 等 7 种溶剂作为最终进样前的样品溶剂。发现甲醇作为定容液时的响应较差,其余情况下的响应均达到满意,最终本研究选择了乙

腈:0.2% 甲酸(20:80)作为样品定容液,与流动相兼容性好,可有效避免溶剂效应。

3.2 SPE 柱的选择 5 种 α_2 受体激动剂均属于碱性药物,故选择对碱性药物具有高选择性的混合阳离子小柱进行固相萃取净化,同时比较不同品牌小柱的净化效率后,最终选择了 PCX(3CC, 60 mg) 小柱。

3.3 流动相的选择 在电喷雾质谱中流动相的组成会影响目标化合物的分离和离子化效率,从而影响到目标化合物的灵敏度。为了实现 5 种化合物有效分离,且有效避免基质干扰,可通过在流动相条件下设置梯度洗脱条件,采用梯度洗脱同时会提高定性和定量的准确性。在流动相选择中,比较了纯乙腈、乙腈:水(50:50)、纯甲醇、甲醇:水(50:50)梯度洗脱条件下,以及甲醇:0.1% 甲酸(50:50) 和乙腈:0.1% 甲酸作为流动相条件下进行梯度洗脱。梯度洗脱条件及流动相中没有甲酸存在时, α_2

受体激动剂的电离效果较差,出现峰拖尾、峰型对称性差、灵敏度下降等情况。在设定乙腈:0.1%甲酸进行梯度洗脱后情况得到了改善,因此确定乙腈:0.1%甲酸梯度洗脱作为流动相。

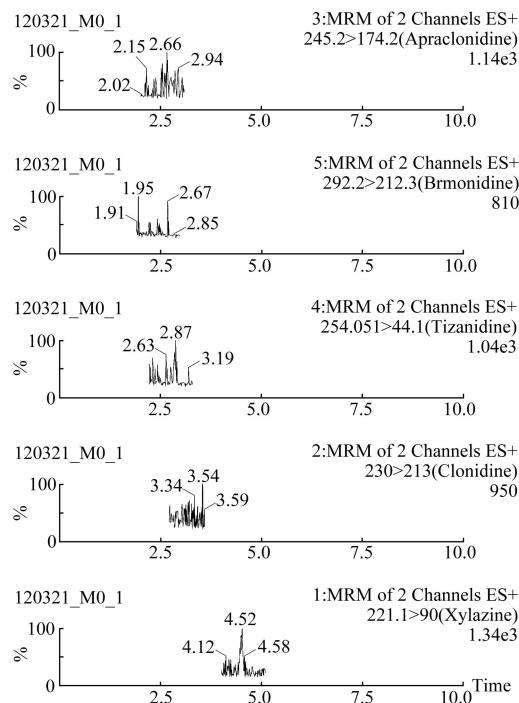


图3 空白猪肉样品 MRM 图

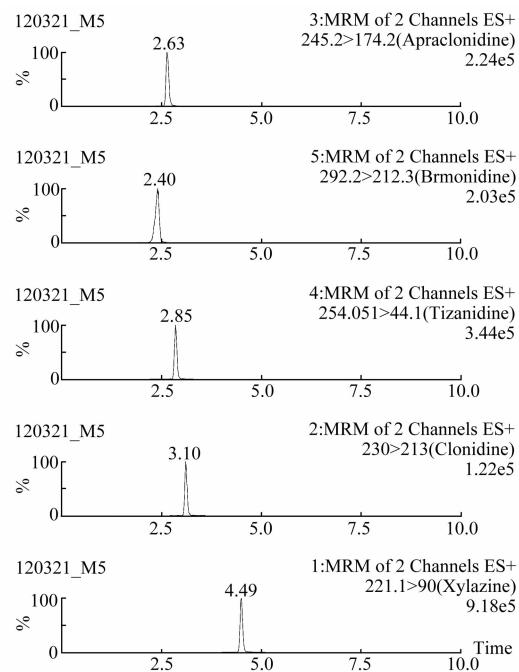


图4 猪肉中5种 α_2 受体激动剂回收率 MRM 图

(添加浓度 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

3.4 提取缓冲液的选择 由于 α_2 受体激动剂属碱性物质,Pka值为8.3,其极性较强,在水环境中存在一定的电离现象,从而导致了有机提取溶剂无法将其完全提取。故考虑在提取步骤中加入了碱性缓冲液来抑制其离子化现象。实验中分别配制了0.1 mol/L碳酸钠:0.1 mol/L碳酸氢钠(1:9,pH约为9.3),0.1 mol/L碳酸钠:0.1 mol/L碳酸氢钠(5:5,pH约为10.0),0.1 mol/L碳酸钠:0.1 mol/L碳酸氢钠(9:1,pH约为11.5)、0.01 mol/L氢氧化钠(pH约为8.5)等几种不同pH的缓冲液来进行比较,结果发现,加入0.1 mol/L碳酸钠:0.1 mol/L碳酸氢钠(9:1)缓冲液后,猪肉中5种 α_2 受体激动剂的回收率较好。

4 结论

本研究建立了一种适用于猪肉中 α_2 受体激动剂类药物的检测方法。该方法采用了缓冲盐-乙酸乙酯的提取方法,提取效率高,具有灵敏度高、定性、定量准确等特点。

参考文献:

- [1] 谷村博美. 中枢性 α_2 受体激动剂[J]. 日本医学介绍, 1993, 11:499~501.
- [2] 赵颖, 郑秀丽, 邵慧, 等. α_2 -肾上腺素能受体激动剂的研究进展[J], 国外医学眼科学分册, 1997, 21(6):326~330.
- [3] Lal S, Tolis G, Martin J B. Effects of clonidine on growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, Follicle-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone in the serum of normal men[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1975, 41(5):827~832.
- [4] Celli S G, Locatelli V, De Gennaro V, et al. In vivo studies with Growth Hormone (GH)-Releasing factor and clonidine in rat pups: Ontogenetic developments of their effect on GH release and synthesis[J]. Endocrinology, 1986, 119:1164~1170.
- [5] 姜礼胜, 陈杰, 陈伟华, 等. 肾上腺素能A2受体对二花脸猪生长激素分泌的作用[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(6):624~625.
- [6] 冯杰, 尤游峰. 可乐定(Clonidine)对动物生长激素分泌的影响[J]. 饲料研究, 2000, 9(10):24~25.
- [7] 王雷杰, 占秀安, 许梓荣, 等. 可乐定对生长猪胴体组成的影响及其作用机理探讨[J]. 浙江大学学报, 2005, 31(5):654~658.
- [8] Weng Naidong, Haizhi Bu, Yu-Luan Chen, et al. Halls, Simultaneous development of six LC-MS-MS methods for the determination of multiple analytes in human plasma[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 28(6):1115~1126.
- [9] 曹莹, 蒋音, 严凤. 高效液相色谱法分析饲料中的“可乐定”[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2010, 6:27~28.

(责任编辑:侯向辉)