

超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中巴氯芬的残留

严 凤¹, 潘 娟¹, 贡松松¹, 胡申玥², 张 婧¹, 吴剑平¹, 黄士新^{*}

(1. 上海市兽药饲料检测所, 上海 201103; 2. 上海杉达学院食品质量与安全学院, 上海 201209)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中巴氯芬残留量的方法。**方法** 样品采用 0.1 mol/L 盐酸-甲醇溶液(20:80, V/V)提取, 混合型强阳离子交换柱(MCX)净化, 经 C₁₈ 反相色谱柱分离后, 正离子扫描, 多反应监测模式检测巴氯芬, 基质标准定量。**结果** 该方法在 1~500 ng/mL 浓度范围内线性良好, $r^2=1$, 检出限为 1 µg/kg, 定量限为 5 µg/kg, 回收率为 75.28%~77.86%, 精密度 RSD < 10%。**结论** 该方法灵敏度高、特异性强, 适用于猪肉中巴氯芬残留量的分析。

关键词: 巴氯芬残留; 猪肉; 基质标准曲线; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of baclofen in meat by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YAN Feng¹, PAN Juan¹, GONG Song-Song¹, HU Shen-Yue², ZHANG Jing¹,
WU Jian-Ping¹, HUANG Shi-Xin^{1*}

(1. Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China; 2. Sanda University College of Food Quality and Safety Management, Shanghai 201209, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of baclofen in meat by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The sample was extracted by hydrochloride methanol, purified by solid-phase extraction cartridges (MCX) and separated on a reversed phase. Using ESI⁺ with multiple reactions monitoring (MRM), identification of baclofen residue was performed and quantified by matrix extracted calibration curve. **Results** Calibration curve was linear between 1 and 500 ng/mL with the correlation coefficient of 1. The limit of detection was 1 µg/kg and the limit of quantitation was 5 µg/kg. The recoveries were 75.28%-77.86%, and relative standard deviations (RSDs) were less than 10%. **Conclusion** This method has high sensitivity and high specificity, which is suitable for the determination of the baclofen residual amount in meat.

KEY WORDS: baclofen residue; meat; matrix extracted calibration; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*通讯作者: 黄士新, 硕士, 推广研究员, 主要研究方向为兽药残留分析与安全评价。E-mail: huangshx1968@163.com

*Corresponding author: HUANG Shi-Xin, Master, Extension Researcher, Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, No.855, Hongqiao Road, Changning District, Shanghai 201103, China. E-mail: huangshx1968@163.com

1 引 言

巴氯芬, 是一种人用处方药, 中文别名巴氯酚、氯苯氨基丁酸、巴克诺芬等, 是一种选择性的 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)受体激动剂^[1]。巴氯芬口服后经胃肠道快速而完全地吸收, 与血清蛋白结合率大约为 30%, 大部分以原形由肾排泄^[2]。 γ -氨基丁酸在食品工业与医药中已有广泛应用, 它是一种广泛分布于哺乳动物神经中枢的重要神经递质, 除具有镇静、降血压和抗惊厥等生理作用外, 还在促进动物生长、调节食欲和抗应激方面表现出良好的效果, 受到人们愈来愈多的关注^[3]。在养殖业中违规使用, 会通过食物链对消费者造成潜在危害。虽然我国农业部目前已颁布了高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法测定饲料中巴氯芬的标准, 但是饲料存在易转移、销毁等特点, 在实际检测过程中难以反馈真实情况, 因此建立动物源性食品中巴氯芬含量的方法是极其重要的。国内外对动物源性食品中巴氯芬残留检测的相关文献较少, 主要通过液相色谱-串联质谱法、高效液相色谱法和毛细管电泳法^[4]等检测手段来测定猪尿^[5,6]、饲料中巴氯芬的含量^[7-9]。本研究建立超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中巴氯芬残留量, 对完善动物源性食品中巴氯芬残留检测技术具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Xevo TQ 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司); AL104 电子天平(美国梅特勒-托利多公司); MS3 basic 振荡器(德国 IKA 公司); Allegra X-22R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司); OA-SYS N-EVAP112 恒温水浴氮吹仪(美国 Organomation 公司); 12 管固相萃取装置(12 position Vacuum Manifold set, 德国 CNW 公司)。

巴氯芬标准品($\geq 98\%$, 美国 Sigma 公司); 盐酸、氨水、甲醇(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司); 甲酸(色谱纯, 西班牙 ACS 集团); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 混合型强阳离子交换柱(MCX, 60 mg/3 mL, 英国 Waters 公司)。

2.2 试验方法

2.2.1 溶液配制

巴氯芬标准溶液: 精密称取巴氯芬标准品 10 mg, 加 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液溶解, 甲醇定容至 10 mL, 配成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 4 °C 保存。准确量取巴氯芬标准储备液 1 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配成浓度为 10 μ g/mL 的标准工作液, 4 °C 保存。

0.1 mol/L 盐酸: 取 9 mL 盐酸, 用去离子水定容至 1000 mL。

0.1%甲酸溶液: 取 0.5 mL 甲酸, 用去离子水定容至

500 mL。

甲醇: 0.1 mol/L 盐酸(80:20, *V/V*)提取溶液: 取 0.1 mol/L 盐酸 20 mL 与 80 mL 甲醇混匀。

甲醇: 0.1 mol/L 盐酸(20:80, *V/V*)溶解液: 取 0.1 mol/L 盐酸 80 mL 与 20 mL 甲醇混匀。

5%氨水甲醇溶液: 取 5 mL 氨水与 95 mL 甲醇混匀。

乙腈: 0.1%甲酸(15:85, *V/V*)复溶液: 取 15 mL 乙腈与 85 mL 0.1%甲酸混匀。

2.2.2 样品前处理

称取匀浆后的猪肉样品 2.00 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇:0.1 mol/L 盐酸(80:20, *V/V*)提取液提取, 充分震荡 10 min, 离心 5 min(9000 r/min)。取 10 mL 上清液转移至另一离心管中, 在 60 °C 水浴下氮吹至约 1 mL。加入 4 mL 甲醇:0.1 mol/L 盐酸(20:80, *V/V*)溶解液复溶, 涡旋 1 min, 离心 5 min(9000 r/min)后, 上清液备用。

MCX 混合型强阳离子交换柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化平衡, 将上述备用液全部过柱, 再依次用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗, 挤干后用 3 mL 5%氨水甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液, 在 60 °C 水浴下氮吹至干。准确加入 1.0 mL 乙腈:0.1%甲酸(15:85, *V/V*)复溶液溶解, 过滤膜, 上机测定。

2.2.3 液相色谱串联-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

Agilent SB-C₁₈(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μ m); 柱温: 35 °C; 进样量: 5 μ L; 流动相: 乙腈:0.1%甲酸=15:85(*V/V*), 等度洗脱, 流速: 0.3 mL/min。

(2) 质谱条件

电喷雾正离子源(ESI⁺); 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 离子源温度: 150 °C; 毛细管电压: 2.80 kV; 脱溶剂温度: 500 °C; 脱溶剂气流量: 800 L/h; 反吹气: 50 L/h; 碰撞气流速: 0.25 mL/min; 脱溶剂气、锥孔气均为高纯氮气, 碰撞气为氩气。定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表 1。

表 1 巴氯芬的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量的参考值
Table 1 The cone voltage and collision energy of qualitative and quantitative ion pairs of baclofen

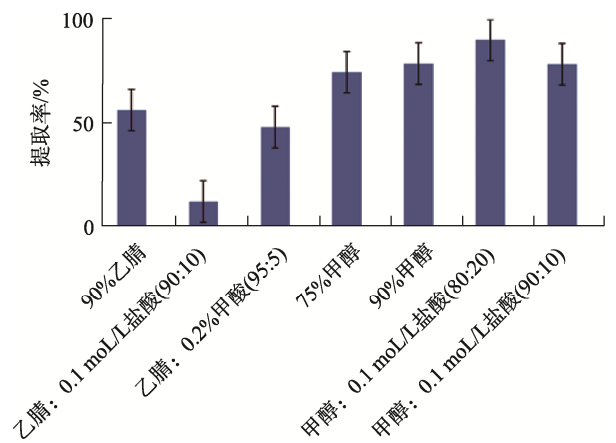
被测物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
巴氯芬 (baclofen)	213.9 > 178.9			15
	213.9 > 151.0	213.9 > 151.0	20	18
	213.9 > 116.0			30

3 结果与分析

3.1 前处理条件优化

猪肉中含有的蛋白会对净化和检测造成影响, 通过沉淀蛋白能够缩短过柱的时间和降低对检测的干扰。常用

的沉淀蛋白的方法有热沉淀、无机盐沉淀、酸沉淀、有机溶剂沉淀等，其中酸沉淀和有机溶剂沉淀蛋白是不可逆的。本实验选择了不同比例的酸溶液和有机相的组合作为提取液，同时具有沉淀蛋白的作用，高比例的有机相能更好地沉淀蛋白，而巴氯芬能溶于酸性水溶液，难溶于弱极性有机溶剂，因此拟设定乙腈:0.2%甲酸(95:5, *V:V*)、乙腈:0.1 mol/L 盐酸(90:10, *V:V*)、90%乙腈、90%甲醇、75%甲醇、甲醇:0.1 mol/L 盐酸(80:20, 90:10, *V:V*)7 种不同的提取溶剂，每种溶剂平行 3 个重复。在提取过程中发现当提取液中的有机相为甲醇时，经充分震荡后猪肉组织会分散得更均匀，比较结果图 1 中也显示出含甲醇的提取溶剂比含乙腈的提取溶剂提取效率明显增高。再通过改变提取溶剂中甲醇的比例后发现，甲醇:0.1 mol/L 盐酸(80:20, *V:V*)的提取效率最好。



注：溶剂的比例为体积比。

图 1 不同提取溶剂比较(*n*=3)

Fig.1 Effect of different extraction solvents (*n*=3)

3.2 固相萃取柱的选择

巴氯芬为酸碱两性化合物，在水中 pK_a 值为 3.87 和 9.62^[10]，因此选择了对碱性药物具有高选择性的 MCX 小柱和通用型的 HLB 小柱进行比较。取适量的巴氯芬工作液加入到 0.1%盐酸溶液中，将溶液全部过柱。在净化过程所花费的时间并无太大差异，但结果显示 MCX 柱的净化效果更佳，回收率也更高，比较结果如表 2 所示。与 HLB 相比 MCX 除了具备反相作用外，更多了离子交换作用，对目标化合物的结合特异性更强，对样品的净化效果更好。

表 2 不同 SPE 柱的比较
Table 2 Comparison of different SPE columns

柱子类型	添加量/ng	实际检测量/ng	回收率/%
MCX	10	9.02	90.2
HLB	10	0.23	2.3

3.3 流动相的选择

巴氯芬的油水分配系数 LogP 为 1.3, LogP 值越小, 说明该物质越亲水。采用反向色谱柱, 亲水性物质的保留时间比疏水性物质短, 有助于缩短分析周期。流动相的组成会影响电喷雾质谱的离子化效率以及目标化合物的分离^[11], 选择了洗脱能力更强的乙腈作为流动相中的有机相, 在流动相中添加适量甲酸有助于碱性物质的电离。所以在流动相选择中, 比较了乙腈:水(30:70、15:85, *V:V*)、乙腈:0.1%甲酸(15:85, *V:V*), 这 3 种不同有机相与水相的组合对目标物的响应情况。从图 2 中可得知, 当流动相为乙腈:水(30:70, *V:V*)时, 虽然获得了较好的柱效, 但是由于有机溶剂乙腈的含量相对较高, 其保留时间太短; 当流动相为乙腈:水(15:85, *V:V*)时, 在乙腈含量降低后, 洗脱能力也随之降低, 峰形扩散严重; 而当流动相为乙腈:0.1%甲酸(15:85, *V:V*)时, 峰形得到了改善并且保留时间也相对向后延长。

3.4 基质效应的考察

化学分析中, 基质指的是样品中被分析物以外的组分, 基质常常对分析物的分析过程有显著的干扰^[12]。基质效应主要是由质谱检测器的离子化过程产生的, 在电喷雾时, 基质内的组分与目标化合物共同流出喷雾针, 影响目标物的雾化、挥发、分裂、化学反应及带电过程, 致使进入质谱的离子减少或增加, 从而影响定量分析的可靠性和准确性^[13,14]。

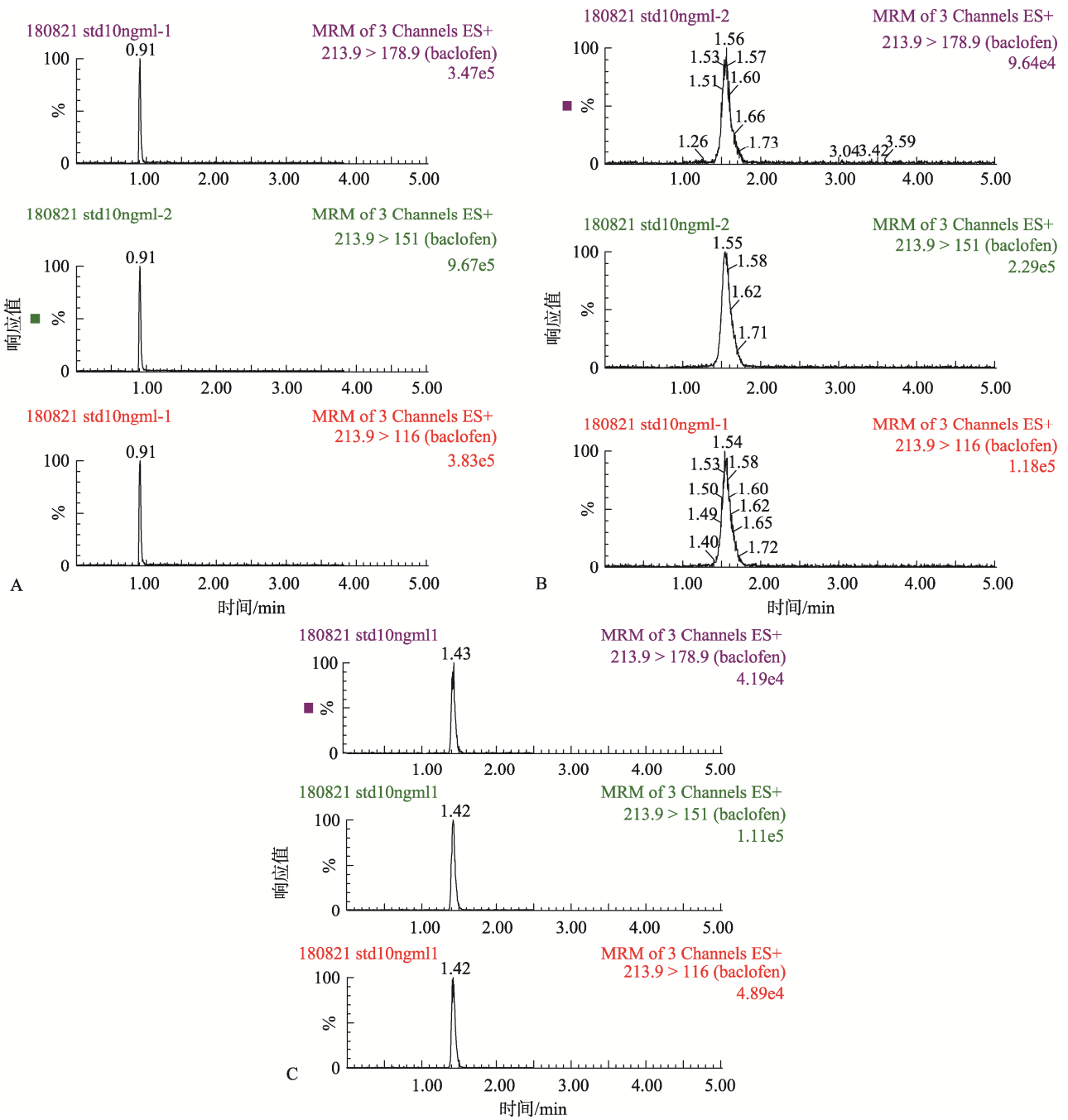
基质效应(matrix effect, ME)可通过公式 $\text{ME}(\%) = \frac{\text{基质溶液中分析物峰面积}}{\text{纯溶剂中分析物峰面积}} \times 100\%$, 来评价。ME 在 85%~115%之间一般认为不存在基质效应; 本方法用乙腈:0.1%甲酸(15:85, *V:V*)溶剂和空白猪肉基质溶液分别配制成含巴氯芬 20、50、100 ng/mL 这 3 个浓度, 上机重复测定 2 次, 发现随着浓度的升高, ME 值逐渐升高, 当浓度达到 100 ng/mL 时的 ME 已超过 115%, 基质对目标化合物的响应存在增强作用, 见表 3。因此在实际检测的过程中, 用标准曲线定量可能会对回收率造成影响。在液相色谱-串联质谱法中, 补偿基质效应的方法有基质匹配标准溶液的校正、同位素标记法、加入分析保护剂、优化进样技术等^[15,16], 本实验采用目前广泛接受的方法基质液标准曲线法进行定量。

3.5 方法检出限与定量限

方法检出限为 5 ng/g, 信噪比 $S/N(\text{peak to peak}) \geq 3$ 。方法定量限为 10 ng/g, 信噪比 $S/N(\text{peak to peak}) \geq 10$, 见图 3。

3.6 方法线性范围

取空白猪肉按 2.2.2 处理后所得空白基质提取液作为基质溶液使用。配制成巴氯芬浓度为 1、5、10、20、50、200 和 500 ng/mL 的基质标准工作液。标准线性方程为 $Y=523.79X+544.36$, $r^2=1$, 见图 4。



注: A: 乙腈:水(30:70, V/V); B: 乙腈:水(15:85, V/V); C: 乙腈:0.1%甲酸(15:85, V/V)。

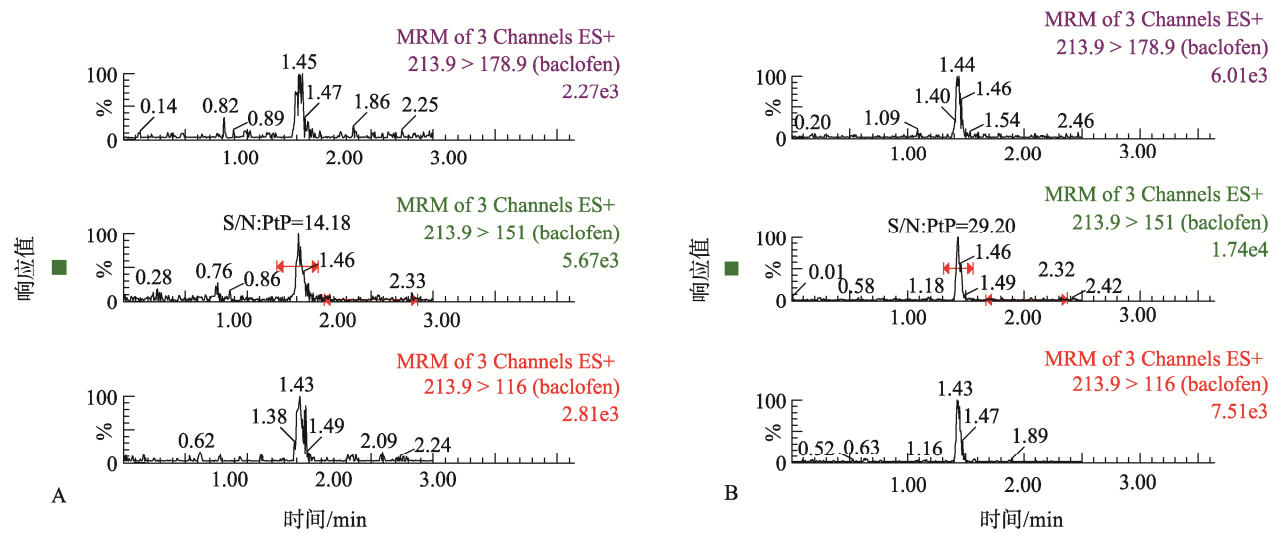
图 2 不同流动相比较

Fig.2 Comparison of different mobile phases

表 3 3 个浓度基质效应

Table 3 Matrix effects of 3 concentrations

浓度/(ng/mL)	峰面积		ME/%
	乙腈:0.1%甲酸(15:85, V/V)	空白猪肉基质提取液	
20	11688	12567	108±1.92
50	27178	31013	114±0.66
100	50085	59132	118±1.59



注: A:检出限; B:定量限。

图 3 检出限与定量限

Fig.3 Limit of detection (LOD) and limit of quantitation(LOQ) of the method

表 4 回收率与精密度
Table 4 Recovery and RSD

添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	实测浓度/($\mu\text{g/kg}$)					平均值/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
	1	2	3	4	5			
5	4.09	3.95	3.75	3.73	3.76	76.79	4.15	3.91
	4.15	4.02	3.68	3.86	3.60		5.94	
	3.91	3.84	3.92	3.92	3.77		2.60	
20	15.81	16.37	15.91	16.35	16.05	77.86	1.58	3.37
	15.42	15.20	15.31	15.09	14.69		1.85	
	16.06	14.91	15.70	15.65	15.04		3.12	
100	72.33	70.64	70.52	73.61	71.72	75.28	1.78	3.87
	78.78	76.79	75.39	78.86	76.71		1.93	
	78.08	74.73	78.36	75.62	77.13		2.04	
500	374.9	397.4	362.4	389.3	394.7	76.62	3.85	2.94
	391.8	388.5	381.7	401.5	374.3		2.65	
	376.5	370.6	381.4	371.5	389.5		2.06	

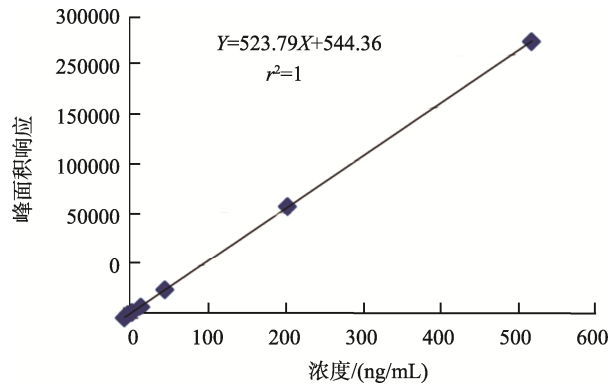


图 4 方法线性回归

Fig.4 The calibration curve of the method

3.7 回收率与精密度

选择空白猪肉进行加标回收率实验,添加浓度为 5、20、100 和 500 $\mu\text{g/kg}$, 每批次内同一浓度做 5 次重复, 平行 3 个批次, 考察方法的准确度和精密度。实验结果见表 4, 该方法准确度(回收率为 75.28%~77.86%), 批内和批间精密度(相对标准偏差, relative standard deviation, RSD < 10%)良好。

4 结 论

本方法建立了猪肉中检测巴氯芬残留量的超高效液相色谱-串联质谱法。方法检出限为 1 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 5 $\mu\text{g/kg}$,

回收率 75.28%~77.86%, 精密度 $RSD < 10\%$ 。方法灵敏度高, 特异性强, 能够对复杂样品内的目标化合物进行定性、定量分析。本方法的建立对于完善动物源性食品中巴氯芬残留检测技术具有重要意义。

参考文献

- [1] Ban E, Park JS, Kim C, *et al.* Semi-microbore HPLC for the determination [J]. *J Liquid Chromatogr Relat Technol*, 2004, 27(19): 3051–3064.
- [2] 谢瑞满. 巴氯芬临床应用研究进展[J]. *世界临床药物*, 2006, 27(3): 149–153.
- Xie RM. The research of baclofen clinical application [J]. *World Clin Drugs*, 2006, 27(3): 149–153.
- [3] 郑秋红, 薛小波, 常娟, 等. 抗热应激饲料添加剂对猪生长性能的影响及作用机理研究[J]. *江西农业学报*, 2010, 22(12): 153–156.
- Zheng QH, Xue XB, Chang J, *et al.* Study on effect of several anti-heat-stress feed additives on pig growth performance and their acting mechanisms [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 2010, 22(12): 153–156.
- [4] 曹丽伟, 李聪, 任东. 毛细管电泳分离-激光诱导荧光检测巴氯芬和加巴喷丁[J]. *暨南大学学报(自然科学版)*, 2011, 32(5): 485–488.
- Cao LW, Li C, Ren D. Determination of baclofen and gabapentin by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence method [J]. *J Jinan Univ(Nat Sci)*, 2011, 32(5): 485–488.
- [5] 夏骏, 李勇, 徐国茂, 等. 固相萃取-液相色谱串联质谱法测定猪尿中的巴氯芬[J]. *中国兽药杂志*, 2013, 47(5): 32–35.
- Xia J, Li Y, Xu GM, *et al.* Determination of baclofen in pig urine by high-performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Vet Drug*, 2013, 47(5): 32–35.
- [6] 许秀琴, 吴银良, 杨挺, 等. 液相色谱串联质谱法测定猪肉和猪尿中巴氯芬[J]. *肉类研究*, 2013, 27(9): 22–25.
- Xu XQ, Wu YL, Yang T, *et al.* Determination of baclofen in pork and swine urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Meat Res*, 2013, 27(9): 22–25.
- [7] 黄士新, 李丹妮, 顾欣, 等. 液相色谱-串联质谱测定饲料中的巴氯芬[J]. *饲料研究*, 2013, (5): 62–65.
- Huang SX, Li DN, Gu X, *et al.* Determination of baclofen by HPLC-MS-MS [J]. *Feed Res*, 2013, (5): 62–65.
- [8] 易建希, 任凤莲. 饲料中巴氯芬的测定-高效液相色谱法[J]. *饲料研究*, 2015, (4): 20–22.
- Yi JX, Ren FL. Determination of baclofen by HPLC [J]. *Feed Res*, 2015, (4): 20–22.
- [9] 李阳, 苏晓鸥, 王培龙, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中 3 种氯丙那林异构体和巴氯芬[J]. *分析化学*, 2014, 42(4): 525–530.
- Li Y, Su XO, Wang PL, *et al.* Simultaneous determination of 3 kinds of isomers of clorprenaline and baclofen residues in feed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2014, 42(4): 525–530.
- [10] Vaccher MP, Lipka E, Bonte JP, *et al.* Chiral capillary electrophoretic resolution of baclofen, gabaergic ligand, using highly sulfated cyclodextrins [J]. *Electrophoresis*, 2004, (25): 1111–1120.
- [11] 李丹妮, 严凤, 张文刚, 等. 液质串联法测定饲料中 16 种 β -受体激动剂[J]. *饲料检测*, 2011, (12): 43–47.
- Li DN, Yan F, Zhang WG, *et al.* Determination of 16 beta-agonists by HPLC-MS-MS [J]. *Feed Res*, 2011, (12): 43–47.
- [12] 陈小华, 汪群杰. 固相萃取应用技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- Chen XH, Wang QJ. Application of solid phase extraction [M]. Beijing: Science Press, 2009.
- [13] 苏萌, 艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(2): 511–513.
- Su M, Ai LF. Matrix effects and elimination methods of liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(2): 511–513.
- [14] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. *质谱学报*, 2011, 32(6): 321–332.
- Wang LQ, He LM, Zeng ZL, *et al.* Progress in matrix effect of veterinary drug residues analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2011, 32(6): 321–332.
- [15] 蒋施, 赵颖, 金雁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物组织 19 种兽药残留量[J]. *理化检验: 化学分册*, 2010, 46(11): 1319–1322.
- Jiang S, Zhao Y, Jin Y, *et al.* UHPLC-MS/MS determination of residual amounts of 19 veterinary drugs in animal tissues [J]. *PTCA (Part B: Chem Anal)*, 2010, 46(11): 1319–1322.
- [16] 刘洪斌, 于洪侠, 刘佳佳, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中多种苯并咪唑兽药残留[J]. *分析试验室*, 2011, 30(3): 13–17.
- Liu HB, Yu HX, Liu JJ, *et al.* Simultaneous determination of benzimidazoles in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2011, 30(3): 13–17.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



严 凤, 硕士, 畜牧师, 主要研究方向为兽药残留分析与安全评价。
E-mail: yan508@163.com



黄士新, 硕士, 推广研究员, 主要研究方向为兽药残留分析与安全评价。
E-mail: huangshx1968@163.com