

超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 儿茶酚胺类的残留

何志霞*

(天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心, 天津 300400)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass, UPLC-MS/MS)检测猪肉中肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺等儿茶酚胺类药物残留量方法的检测方法。**方法** 样品经乙腈+水(95+5,V/V)提取, 经正己烷脱脂后, 过 PBA 固相萃取小柱纯化, 采用 0.1%甲酸和乙腈作为流动相按比例进行梯度洗脱, 采用电喷雾正离子化质谱(positive electrospray mass spectrometry, ESI⁺)和多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)技术对肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺进行定量和定性检测。**结果** 本方法在 6 min 内完成了 3 种目标化合物的分离分析。3 种目标化合物在 1~50 ng/mL 线性范围内, r^2 均大于 0.995。肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺的检出限分别为 0.2、0.4、0.3 $\mu\text{g/L}$, 定量限分别为 0.7、1.3、1.0 $\mu\text{g/L}$ 。在 20、40 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 3 个加标水平下, 平均回收率为 78.2%~89.6%, 相对标准偏差为 2.2%~4.9%($n=6$)。**结论** 该方法具有快速准确、灵敏度高等优点, 适用于猪肉中儿茶酚胺类残留量的测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 猪肉; 儿茶酚胺类; 残留

Determination of the catecholamines residue in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HE Zhi-Xia*

(Tianjin Agricultural Ecological Environment Monitoring and Agricultural Product Quality Testing Center, Tianjin 300400, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of the residue of catecholamines including epinephrine, norepinephrine and dopamineresidues in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS). **Methods** After extracting the sample with a mixture of acetonitrile and water (95+5,V/V), samples were degreased by n-hexane and purified by PBA solid-phase extraction column. The gradient elution was carried out with 0.1% formic acid and acetonitrile as mobile phases in proportion. Positive electrospray mass spectrometry (ESI⁺) and multiple reaction monitoring (MRM) were used for quantitative and qualitative analysis for epinephrine, norepinephrine and dopamineresidues. **Results** The 3 target compounds were separated and analyzed within 6 min. In the linear range of 1-50 ng/mL, r^2 of the three target compounds were all greater than 0.995. The detection limits of epinephrine, norepinephrine and dopamine were 0.2, 0.4 and 0.3 $\mu\text{g/L}$, respectively, and the limits of quantification were 0.7, 1.3 and 1.0 $\mu\text{g/L}$, respectively. The average recoveries were 78.2%~89.6% and the relative standard deviations were 2.2%~4.9% ($n=6$) at 3 spiked levels of 20, 40 and 100 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** The method is

*通讯作者: 何志霞, 兽医师, 主要研究方向为兽药、饲料和畜产品中药物残留检测。E-mail: 8606425@qq.com

*Corresponding author: HE Zhi-Xia, Veterinarian, Tianjin Agricultural Ecological Environment Monitoring and Agricultural Product Quality Testing Center, Veterinary Station, Yixingfu North Town, Beichen District, Tianjin 300400, China. E-mail: 8606425@qq.com

rapid, accurate, sensitive and suitable for the determination of catecholamine residues in pork.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; pork; catecholamine; residues

1 引言

儿茶酚胺是一种含有儿茶酚和胺基的神经类物质,包括肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺。临床用于心脏骤停、支气管哮喘、过敏性休克。自 20 世纪 60 年代,肾上腺素类药物一直被认为是增加恢复心跳机会的特效药^[1],但人体摄入大剂量的儿茶酚胺类药物能够引起中枢神经兴奋,还会引起惊厥,并抑制呼吸中枢,严重者引发胸痛、血压骤升和心律失常,还可导致脑溢血、急性肺水肿,甚至死亡^[2-4]。

近年来注水肉问题越来越被消费者及监管部门重视^[5-10]。注水肉一般是屠宰前一定时间强行向动物体内机械灌水或者屠宰后直接向肉内注水,但这种方法造成白肌肉等品质较差的肉,影响销售。不法分子为谋取暴利,直接给生猪注射儿茶酚胺类药物,使猪大量喝水,以提高注水量,宰杀后猪肉呈现色泽鲜艳,卖相好的特点^[11]。但是造成药物残留,食用后对人体造成伤害。

目前,国内外报道的针对儿茶酚胺的检测方法^[12,13]有高效液相色谱法^[14-16]、分光光度法^[17]、离子色谱法^[18]等。近年来,利用超高^[19-21]测定儿茶酚胺的相关研究逐渐受到更多关注。液质联用技术在特异性、灵敏度、多组分检测能力等方面具有明显的优势,已成为国际上兽药残留检测技术的主流。本研究对不同条件下采用液质联用法检测猪肉中的儿茶酚胺含量进行了考量,通过对固相萃取柱的选择、液相色谱分离条件及质谱检测条件的优化等一系列手段。建立了一种特测定猪肉中儿茶酚胺的方法,以期准确测定注水猪肉中儿茶酚胺的含量提供参考,对于完善动物源性产品中的药物残留安全提供参考。

2 材料与方 法

2.1 主要仪器与试剂

SCIEX TripleQuad 5500 液相色谱-串联质谱仪: 配电喷雾离子源(electrospray mass spectrometry, ESI)(美国爱博才思公司); Venusil XBP C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm, 150 A, 天津博纳艾杰尔公司); AE240S 电子天平(感量 0.01 mg/0.1 mg, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); BIOFUGE STRATOS 高速冷冻离心机/GenPure 超纯水机(美国 Thermo 公司); SPE-24A 固相萃取装置(上海鑫翁科学仪器有限公司); KQ-100DB 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); MTN-2800D 氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); Bond Elut-Pba 固相萃取柱、Bond Elut Plexa PCX 固相萃取柱(3 cc/60 mg, 美国 Agilent 公司); Waters

Oasis MCX 固相萃取柱(3 cc/60 mg, 美国 Waters 公司);

肾上腺素(纯度 99.7%)、重酒石酸去甲肾上腺素(纯度 94.3%)、盐酸多巴胺(纯度 99.8%, 中国食品药品检定研究院); 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Merck 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 Sigma-aldrich 公司); 氨水(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 高氯酸(优级纯, 天津政成化学制品有限公司); 焦亚硫酸钠(化学纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 乙二胺四乙酸二钠(优级纯, 天津市光复科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

分别精密称取各对照品约 25 mg(精确到 0.1 mg), 用甲醇溶解, 定容至 250 mL 容量瓶中, 配成 1.0 mg/mL 的标准储备液。采用空白基质加标的方法, 配成浓度为 1、2、10、20、50 ng/mL。

2.2.2 样品前处理

准确称取试样 2.0 g(精确至 0.001 g), 置于 50 mL 具塞离心管中, 准确加入 10.0 mL 乙腈+水(95+5,V/V), 涡旋混合震荡 5 min, 离心(10000 r/min)5 min, 倾取上清液, 待用。重复提取一次, 合并 2 次上清液, 混匀, 加入 10 mL 正己烷提取, 离心(10000 r/min), 重复正己烷 10 mL 提取一次, 弃去正己烷层, 下清液备用。

取 3 mL 甲醇、3 mL 水活化固相萃取柱, 准确移取 5 mL 备用液过柱, 再用 3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗, 抽干。用 10%氨水(V/V)甲醇 5 mL 洗脱, 收集洗脱液。于 30 °C 下氮气吹干。准确吸取 1.0 mL 0.1%甲酸 10%乙腈水溶液溶解残留物, 涡旋混匀, 过 0.22 μm 滤膜后, 待上机检测。

2.2.3 检测方法

(1)液相色谱条件

C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm, 150 A); 柱温: 40 °C; 进样体积: 5 μL; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: A: 0.1%甲酸水溶液, B: 乙腈。流动相梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of mobile phase

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	95	5
1.00	95	5
4.00	5	95
5.00	5	95
5.01	95	5
6.00	95	5

(2)质谱条件

离子源：电喷雾离子源 (electrospray mass spectrometry, ESI⁺); 扫描方式：正离子扫描(ESI⁺); 雾化温度：500 °C; 气帘气：20.0 psi; 喷雾气：8 psi; 离子化电压：5500 V; 喷雾气：55.0 psi; 辅助加热气：55.0 psi。质谱参数见表 2。

表 2 肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺的质谱条件
Table 2 Mass spectrum conditions of adrenaline, noradrenaline and dopamine

化合物	离子对(<i>m/z</i>)	喷雾电压 /V	碰撞能量 /V
肾上腺素	定量 184.2/166.0	55	14
	定性 184.2/77.0	55	52
去甲肾上腺素	定量 152.1/107.0	130	23
	定性 152.1/77.0	130	40
多巴胺	定量 154.2/137.1	55	15
	定性 154.2/91.0	55	30
	定性 154.2/119.0	55	24

3 结果与分析

根据肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺的化学性质及其溶解性，实验比较了几种提取液[乙腈、乙腈水(95+5, V/V)、0.4 mol/L 的高氯酸、焦亚硫酸钠溶液+乙二胺四乙酸二钠溶液+乙腈]的提取效果，不同固相萃取小柱 PCX 柱(60 mg/3 mL)、MCX 柱(60 mg/3 mL)、PBA 柱(100 mg/3 mL)的净化效果，结果发现采用乙腈+水(95+5, V/V)为提取液(见图 1)，固相萃取小柱用 PBA 100 mg/3 mL(见图 2)，提取效果和回收率最佳。

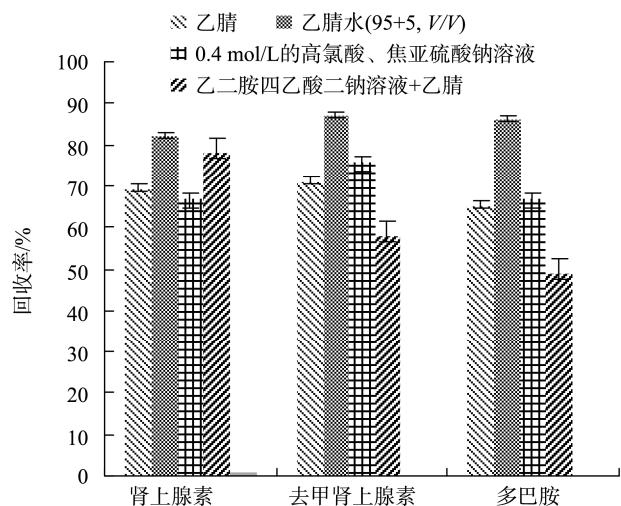


图 1 不同提取溶剂回收率对比($n=3$)

Fig.1 Effect of extraction solvents on the recoveries($n=3$)

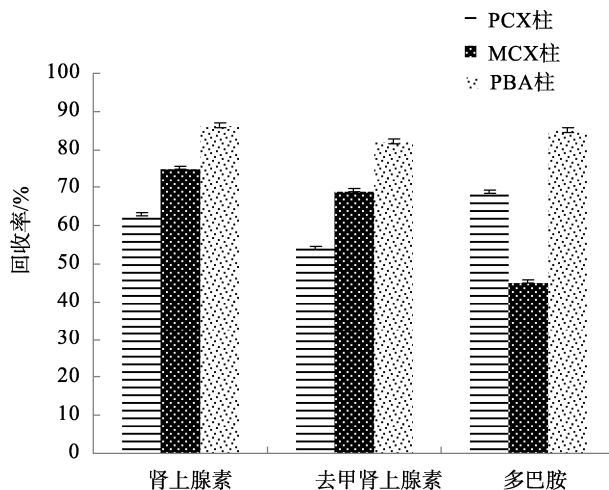


图 2 不同萃取柱回收率对比($n=3$)

Fig.2 Comparison of recovery rates of different extraction columns($n=3$)

3.2 质谱条件的优化

根据肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺 3 种化合物的化学结构，适合在 ESI⁺ 模式下进行离子化。实验采用 100 ng/mL 的混合标准溶液进样，进行全扫描和子离子扫描，最终找到了母离子和子离子，优化了碰撞能量和喷雾电压条件，得到了对 3 种化合物灵敏度较高的质谱条件。优化后的质谱条件见表 2。

3.3 色谱条件的优化

3.3.1 色谱柱的选择

实验比较了 C₁₈、C₈ 色谱柱对色谱分离效果和响应值的影响，C₁₈ 色谱柱测定时，3 种化合物的离子强度明显高于 C₈ 的色谱柱。

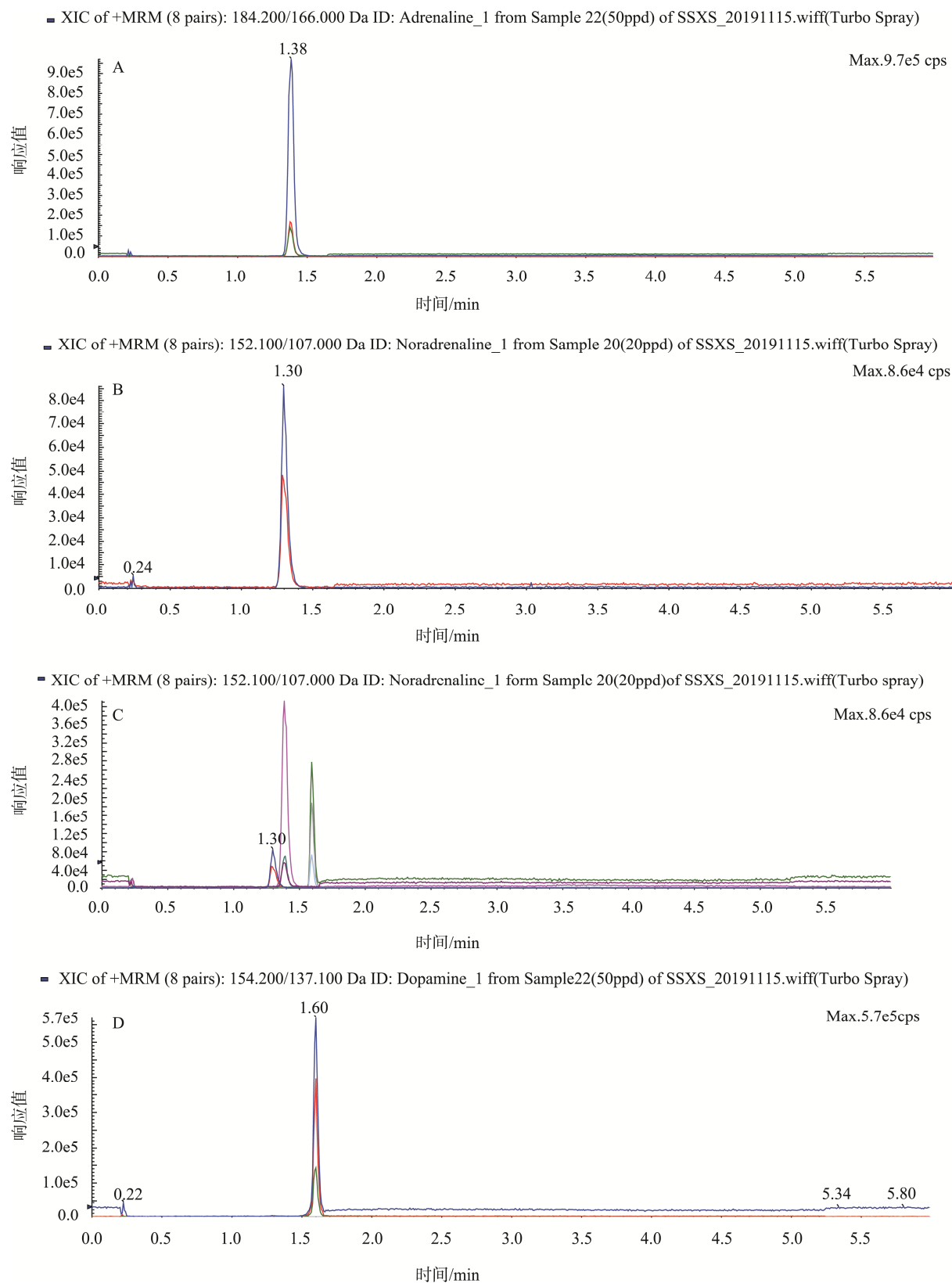
3.3.2 流动相的选择

流动相种类比较了甲醇、乙腈作为有机相，发现 3 种化合物在甲醇中峰形较差，水相比较了添加不同体积分数的甲酸及甲酸铵、乙酸铵的影响，最终选择了 0.1% 甲酸为流动相 A，乙腈为流动相 B；同时做了不同洗脱梯度对化合物的保留时间和质谱图形的影响。结果采用表 1 中梯度洗脱条件，峰形最好，检测灵敏度最高。利用优化后的色谱和质谱条件测定 3 种混合标准溶液，色谱图见图 3。

3.4 方法学验证

3.4.1 线性关系

本研究采用去除基质干扰效应，采用基质添加的方法配制标准系列曲线。配制标准曲线的浓度为 1、2、10、20、50 ng/mL，肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺的相关系数 r^2 均大于 0.995，在 1~50 ng/mL 浓度范围内，具有良好的线性关系(如表 3)



注: A. 肾上腺素标准液相色谱图; B. 去甲肾上腺素标准液相色谱图; C. 多巴胺标准液相色谱图; D. 3 种物质混合标准液相色谱图。

图 3 液相色谱图

Fig.3 Liquid chromatography

表 3 3 种化合物的标准曲线与线性评价

Table 3 standard curve and linear evaluation of 4 compounds

化合物	线性方程	相关系数 r^2
肾上腺素	$Y=5.57912e^4X+6.07177e^4$	0.99779
去甲肾上腺素	$Y=11505.43859X+6008.31946$	0.99902
多巴胺	$Y=2517.36008X+15702.73426$	0.99849

3.4.2 检出限和定量限

按所建立的色谱条件,以 3 倍信噪比作为检出限,以 10 倍信噪比作为定量限,确保实验结果的准确度和精密性。3 种化合物的检出限和定量限如表 4 所示,可知方法灵敏度高

表 4 检出限和定量限($\mu\text{g/L}$)Table 4 Limits of detection and quantitation ($\mu\text{g/L}$)

	肾上腺素	去甲肾上腺素	多巴胺
检出限	0.2	0.4	0.3
定量限	0.7	1.3	1.0

3.4.3 基质效应的消除

由于空白样品基质溶液对 3 种儿茶酚胺类标准物质有不同程度的影响,本研究采用配制基质匹配标准溶液用于定量的方法,能很好的消除了基质影响,完全满足残留检测的要求。

3.4.4 方法回收率和稳定性

用阴性猪肉样品进行加标回收实验。加标回收每个批次内同一浓度做了 6 个平行,同时做了空白对照。分析结果见表 4,结果表明,3 种化合物在猪肉样品中加标回收率为 75%~90%之间。相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.2%~4.9%之间,方法准确度及精密性满足要求。

表 5 3 种化合物的回收率及精密性

Table 5 Recovery and precision of 3 compounds

化合物	添加浓度/ $(\mu\text{g/kg})$	平均回收率/%	RSD/%
肾上腺素	20	84.0	3.1
	40	79.6	2.2
	100	78.2	2.2
去甲肾上腺素	20	81.5	4.9
	40	87.6	2.2
	100	83.1	2.5
多巴胺	20	85.8	2.9
	40	78.6	2.5
	100	89.6	2.6

3.5 实际样品检测

采用本研究中确定的检测方法对天津市辖区内 5 批次猪肉样品进行 3 种化合物含量的测定,结果均未检出。

4 结论与讨论

本研究通过对实验样品前处理的提取方法、液相色谱、质谱条件的优化,建立了一种对畜产品中肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺 3 种儿茶酚胺类残留量的液相色谱-串联质谱的测定方法。该研究方法稳定性强,前处理方法操作简单,快速;在色谱柱上分离效果较好,回收率较高。其分离效率高、灵敏度好和选择性强等特点,适用于猪肉中肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺的定量分析。

参考文献

- [1] Gough CJR, Nolan JP. The role of adrenaline in cardiopulmonary resuscitation [J]. Crit Care, 2018, 22(1): 139.
- [2] 牛晋阳, 郭文萍, 孙焕, 等. 液质法测定动物源性食品中肾上腺素、多巴胺[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 322-324.
Niu JY, Guo WP, Sun H, *et al.* determination of adrenaline and dopamine in animal-derived food by liquid mass spectrometry [J]. Food Sci, 2009, 30(20): 322-324.
- [3] 位佳静, 曹艳云, 王祎娟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中肾上腺素残留量[J]. 肉类工业, 2019, (8): 51-53.
Wei JJ, Cao YY, Wang YJ, *et al.* Determination of adrenaline residues in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Meat Ind, 2019, (8): 51-53.
- [4] 陈少娟, 向力, 江森, 等. 异丙肾上腺素在 C2C12 细胞中分化的作用及机制[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, (9): 49-58.
Chen SJ, Xiang L, Jiang M, *et al.* Role and mechanism of isoproterenol in differentiation of C2C12 cells [J]. Chin Cell Biol, 2017, (9): 49-58.
- [5] 梁丽. 浅谈注水肉的特征、危害及鉴别处理[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(8): 93-94.
Liang L. Talking about the characteristics, harm and identification of water-injected meat [J]. Anim Husband Feed Sci, 2010, 31(8): 93-94.
- [6] 程灵豪, 王余良, 林邵伟. PSE 肉、注水肉、注胶肉的主要危害及检验方法[J]. 浙江畜牧兽医, 2015, (3): 17-18, 23.
Cheng LH, Wang YL, Lin SW. Main hazards and inspection methods of PSE meat, water injection meat and gum injection meat [J]. Zhejiang Anim Husband Veter Med, 2015, (3): 17-18, 23.
- [7] 任南, 赵文涛, 陈超, 等. 固相萃取联合超高效液相色谱-串联质谱法测定畜肉中 3 种儿茶酚胺类物质[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 300-305.
Ren N, Zhao WT, Chen C. Determination of three catecholamines in livestock meat by solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2019, 40(24): 300-305.
- [8] 李志刚, 任南, 马燕红, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测鲜冻肉中违禁注水药物[J]. 食品科学, 2018, 39(12): 308-312.
Li ZG, Ren N, Ma YH, *et al.* Determination of prohibited water injection drugs in fresh frozen meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2018, 39(12):

- 308–312.
- [9] 仇国琴, 郭乃勇, 张艳. 注水肉的危害与控制措施[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2014, (12): 22–22, 76.
Qiu GQ, Guo NY, Zhang Y. Harm and control measures of water injection meat [J]. Chin Abstr Anim Husband Veter, 2014, (12): 22–22, 76.
- [10] 江腾. 如何辨别注水肉[J]. 中国防伪报道, 2016, (10): 111–113.
Jiang T. How to distinguish water injection meat [J]. China Anti-counterfeit Rep, 2016, (10): 111–113.
- [11] 孟伟, 马文涛, 张荣森, 等. 河南省濮阳市注水猪肉专项整治活动分析[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(8): 55–57.
Meng W, Ma WT, Zhang RS, *et al.* Analysis on special rectification activities of water injection pork in Puyang city, Henan province [J]. Anim Quarant in China, 2018, 35(8): 55–57.
- [12] 李博. 测定儿茶酚胺类物质方法的研究进展[J]. 四川生理科学杂志, 2015, 37(4): 214–216.
Li B. Research progress in determination of catecholamines [J]. Sichuan J Physiol Sci, 2015, 37(4): 214–216.
- [13] 沐春磊, 安益国, 蒋磊, 等. 生物样品中儿茶酚胺类物质检测方法的研究进展[J]. 医药前沿, 2017, 7(10): 10.
Mu CL, An YG, Jiang L, *et al.* Research progress on detection methods of catecholamines in biological samples [J]. Med Front, 2017, 7(10): 10.
- [14] 黄露. 高效液相色谱法分离检测四种肾上腺素类化合物[J]. 科技信息, 2011, (29): 14.
Huang L. Separation and determination of four adrenaline compounds by high performance liquid chromatography [J]. Sci Technol Inform, 2011, (29): 14.
- [15] 裴兆辉, 朱妙章, 裴建明, 等. 高效液相色谱测定大鼠血浆儿茶酚胺的含量[J]. 心脏杂志, 2003, 15(1): 9–13.
Pei ZH, Zhu MZ, Pei JM, *et al.* Determination of catecholamines in rat plasma by high performance liquid chromatography [J]. Chin Heart J, 2003, 15(1): 9–13.
- [16] 吴延辉, 许泓, 肖亚兵, 等. 高效液相色谱法检测化妆品中儿茶酚胺类药物的残留量[J]. 日用化学工业, 2009, 39(6): 439–441.
Wu YH, Xu H, Xiao YB, *et al.* Determination of catecholamines residues in cosmetics by high performance liquid chromatography [J]. Daily Chem Ind, 2009, 39(6): 439–441.
- [17] 孟召辉, 王素红. 可见分光光度法测定肾上腺素的含量[J]. 南阳师范学院学报, 2002, 28(6): 39–40.
Meng ZH, Wang SH. Determination of epinephrine by visible spectrophotometry [J]. J Nanyang Norm Univ, 2002, 28(6): 39–40.
- [18] 童裳伦, 朱岩, 郭丹, 等. 离子色谱荧光检测法测定肾上腺素和多巴胺[J]. 分析化学, 2001, 29(10): 1237.
Tong SL, Zhu Y, Guo D, *et al.* Determination of adrenaline and dopamine by ion chromatography with fluorescence detection [J]. Anal Chem, 2001, 29(10): 1237.
- [19] 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 S, Liu ZY, Li LQ, *et al.* Determination of adrenaline and its metabolites residues in pork by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Environ Chem, 2019, 38(3): 701–703.
- [20] Cheuk MY, Lo YC, Poon WT. Determination of urine catecholamines and metanephrines by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2017, 35(10): 1042–1047.
- [21] 王泽民, 王玉文, 伊晶, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定人血清中去甲肾上腺素、多巴胺和5-羟色胺含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(17): 2863–2865, 2688.
Wang ZM, Wang YW, Yin J, *et al.* Determination of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine in human serum by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Inspect, 2015, 25(17): 2863–2865, 2688.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



何志霞, 兽医师, 主要研究方向为兽药、饲料和畜产品中药物残留检测。
E-mail: 8606425@qq.com