

液质法测定进口猪产品中莱克多巴胺残留量

陈丹萍, 谢应新, 曹晓燕, 杨富春, 张宝元
(佛山出入境检验检疫局, 广东 佛山 528000)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱法测定进口猪产品中莱克多巴胺残留量。样品经乙酸铵溶液提取, 加入 β -盐酸葡萄糖醛苷酶-芳基硫酸酯酶酶解后, 通过MCX固相萃取小柱净化, 采用电喷雾离子源及多反应监测模式进行检测。莱克多巴胺在0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的标准曲线线性关系良好, 相关系数R大于0.99, 本方法的定量检出限为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在3个浓度水平进行添加回收试验, 回收率为80.4%~96.3%, 相对标准偏差为0.95%~6.23%。

关键词:液质法; 猪产品; 莱克多巴胺

Determination of Ractopamine Residues in Imported Porcine Products by LC-MS/MS

CHEN Dan-ping, XIE Ying-xin, CAO Xiao-yan, YANG Fu-chun, ZHANG Bao-yuan

(Foshan Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Foshan 528000, Guangdong, China)

Abstract: A high Performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed for determining the ractopamine residuals in imported porcine products. The sample was extracted with CH_3COONH solution and hydrolyzed with mixed solution of β -glucuronidase and aryl sulfatase, purified by passing through MCX SPE column. ESI was adopted and the sample was detected by the multiple reaction monitoring mode. The concentration of ractopamine presented a good linear relationship in the concentration range of 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, related coefficient $R > 0.99$, and the limit of quantitation was 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recoveries of three concentration levels were within 80.4%~96.3% and RSDs ranging from 0.95%~6.23%.

Key words: LC-MS/MS; porcine products; ractopamine

莱克多巴胺是一种苯乙醇胺类 β -受体激动剂, 它能改变养分的代谢途径, 促进动物肌肉生长, 提高饲料利用率, 促进动物体蛋白质沉积, 提高瘦肉率^[1-4]。美国FDA在2010年批准莱克多巴胺可以用于动物营养重新配剂, 广泛地用于畜牧业和养殖业。由于动物源食品中 β -受体激动剂类药物在人体的累积超过一定量易出现各种毒副作用, 对人体健康造成危害^[5]。因此欧盟、中国等国家禁止将莱克多巴胺作为饲料添加剂用于食用动物, 我国农业部第176号公告《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》明确禁止莱克多巴胺等药物在食品动物中的使用^[6-8]。莱克多巴胺是我国对进口猪产品的重点检验项目, 为了有效监控动物组织中的莱克多巴胺, 本文采用高效液相色谱-串联质谱法对进口猪产品中莱克多巴胺的残留检测进行了研究。

作者简介: 陈丹萍(1983—), 女(汉), 工程师, 大学本科, 研究方向: 食品安全与检测。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

进口市售猪产品: 猪排、猪肾等。

莱克多巴胺标准品(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 农业部环境保护科研监测所; 莱克多巴胺内标 D_3 -莱克多巴胺标准品(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): Dr. Eh-renstorfer; β -盐酸葡萄糖醛苷酶-芳基硫酸酯酶: Merck KGaA公司; 乙酸铵溶液(0.2 mol/L): 广州化学试剂厂; 甲醇、乙腈为色谱纯; Fisher scientific, 其余试剂(分析纯): 广州化学试剂厂。

Agilent 1200 HPLC/6410 QQQ TripleQuad MS型高效液相色谱-串联质谱联用仪; 美国安捷伦科技有限公司; 2-16K型高速冷冻离心机: 德国Sigma公司; SW22型电热恒温振荡水槽: 德国JULABO公司; SPE固相萃取装置: 北京振翔科技有限公司; MTN-2800W型水浴氮吹仪: 天津澳特赛恩斯。

1.2 方法

1.2.1 酶解及提取

准确称取 2.00 g 样品于 30 mL 离心管内,加入 50 μ L D₃-莱克多巴胺标准工作液,然后加入 pH 5.2 的 0.2 mol/L 乙酸铵溶液 8.0 mL,再加入 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶 40 μ L,涡旋混匀 2 min,于电热恒温振荡水槽内设定温度 37 $^{\circ}$ C 避光水浴振荡 16 h。酶解后放置至室温,涡旋混匀,10 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液于另一离心管内,加入 0.1 mol/L 高氯酸溶液 5 mL,涡旋混匀,用高氯酸调 pH 至 1 后 10 000 r/min 高速离心 10 min 沉淀蛋白,上清液调 pH 至 9 后用乙酸乙酯提取,取出有机相氮气吹干后用 2 % 甲酸溶液 5 mL 溶解,待净化。

1.2.2 净化

将 MCX 固相萃取柱与固相萃取装置相连接,依次用甲醇、水、2 % 甲酸溶液各 3 mL 活化,然后取上述提取液过柱,再依次用 2 % 甲酸溶液、甲醇各 3 mL 淋洗,抽干,用 3 % 氨水甲醇溶液 2.5 mL 洗脱,洗脱液在 45 $^{\circ}$ C 下用氮气吹干,用甲醇-0.1 % 甲酸溶液 (10+90, 体积比) 0.2 mL 溶解涡旋混匀,10 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液待测。

1.2.3 仪器工作条件

1.2.3.1 液相色谱条件

色谱柱:XB-C18(2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μ m);柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。流动相:A 为 0.1 % 甲酸乙腈溶液,B 为 0.1 % 甲酸水溶液;梯度洗脱:0~1 min,维持 4 % A;1 min~10 min,4 % A 线性变化至 60 % A;10 min~11 min,60 % A 线性变化至 4 % A;流速:0.3 mL/min。

1.2.3.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源;扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测;MS1/MS2 温度:100 $^{\circ}$ C;电离电压:4 kV;雾化气温度:350 $^{\circ}$ C;雾化气流速:10 L/min;喷雾气流压力:40 psi (1 psi=6.895 $\times$ 10³ Pa)。莱克多巴胺定性、定量离子对及碎裂电压、碰撞能量见表 1。

表 1 莱克多巴胺定性、定量离子对及碎裂电压、碰撞能量

Table 1 Ractopamine qualitative and quantitative ion pair, ion fragmentation voltage, collision energy

化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	碎裂电 压/V	碰撞能量/ eV
莱克多巴胺	302.2>107	302.2>164	105	36
	302.2>164			12

2 结果与分析

2.1 提取条件的选择

莱克多巴胺在机体内经过代谢后终产物主要以

共轭化合物形式存在,通常使用酶对组织进行水解,使之从结合态转为游离态,以利于溶剂的提取。由于莱克多巴胺为苯乙醇胺类化合物,在酸性条件下它们均以离子态存在,易溶于水,适合用酸溶液提取,本试验采用高氯酸溶液作为提取溶剂有较高的提取效率并能有效的沉淀蛋白。由于在碱性条件下易溶于有机溶剂,本试验采用乙酸乙酯作为提取溶剂,酸度对萃取效率的影响很大,故测定了 pH 在 7.0~14.0 之间不同的萃取效应,结果表明,当 pH 在 9~10 时,能达到最佳的萃取效应。

2.2 净化条件的选择

固相萃取是目前常用的样品净化方法,由于莱克多巴胺在中性至酸性条件下呈阳离子状态,故本试验选用 MCX 固相萃取柱,为混合型阳离子交换固相萃取小柱,它对碱性化合物具有高的选择性和灵敏度。

2.3 色谱及质谱条件的优化

试验比较了 XB-C18 柱和 BEH-HILIC 柱的分离效果,XB-C18 柱对莱克多巴胺有较好的分离效果,因此选择了 XB-C18 柱进行分离。本试验选用多反应监测模式进行检测是为了提高灵敏度、特异性和准确度,通过优化质谱条件,选择了 105 V 碎裂电压和 36、12 eV 碰撞能量。

2.4 线性与最低检测限

由于空白基质对莱克多巴胺存在明显离子抑制现象^[9],为了补偿该效应对定量结果的影响,本法采用将空白样品添加标准溶液按样品前处理方法处理,制备校准曲线。该校准方法对待测物可弥补一定的提取率。

空白样品添加标准曲线的制备:分别准确量取莱克多巴胺标准储备液 5、10、20、40、100 μ L,添加到 2 g 空白样品中,制得浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 μ g/kg 的空白添加样品,按上述试验步骤操作,供液相色谱-串联质谱测定。内标溶液浓度为 2.5 μ g/kg。以峰面积响应值为纵坐标(Y),莱克多巴胺组织浓度为横坐标(X),浓度在 0.25 μ g/kg~5 μ g/kg 的范围内具有较好的线性,线性回归方程为 $Y=0.731\ 1X+0.028\ 2$,回归系数 $R>0.99$,按 10 倍信噪比计算方法的定量检出限为 0.5 μ g/kg。莱克多巴胺标准曲线见图 1。

2.5 回收率与精密度

在空白猪肉样品和空白猪肾样品中添加 0.5、1.0、5.0 μ g/kg 3 个浓度水平的莱克多巴胺标准溶液。按上述方法每个浓度平行测定 6 次,结果见表 2。

猪肉样品在 0.5、1.0、5.0 μ g/kg 3 个添加水平的平均回收率在 88 %~96.3 % 之间,6 次平行测定结果的相对标准偏差在 0.95 %~5.35 % 之间。猪肾样品在 0.5、

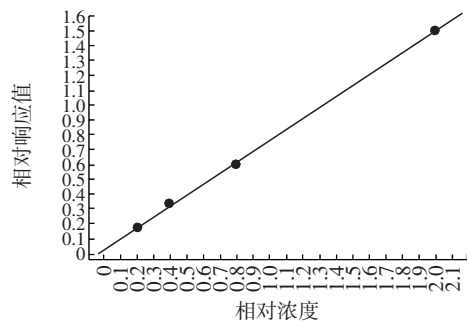


图 1 莱克多巴胺标准曲线

Fig.1 Ractopamine standard curve

表 2 3 个添加水平回收试验结果

Table 2 Three added level recovery test results

样品	加标量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收 率/%	RSD/%
猪肉	0.5	0.440	88	5.35
	1.0	0.878	87.8	2.64
	5.0	4.815	96.3	0.95
猪肾	0.5	0.402	80.4	6.23
	1.0	0.862	86.2	4.86
	5.0	4.58	91.6	3.73

1.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平的平均回收率在 80.4 %~91.6 %之间,6 次平行测定结果的相对标准偏差在 3.73 %~6.23 %之间。

3 结论

本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法测定进

口猪产品中莱克多巴胺残留量,线性关系良好,准确度和精密度高,定量检测限低,方法准确、可靠,可作为进口猪产品中莱克多巴胺残留的检测方法。

参考文献:

[1] 冯冰,张佳宜,王英,等.猪肝中莱克多巴胺残留的分析研究[J].食品研究与开发,2007,28(4):147-149

[2] 陈海玲,郝春莉,黄华斌.高效液相色谱-质谱法同时测定猪尿中克伦特罗和莱克多巴胺[J].理化检验-化学分册,2011,47(8):859-860,862

[3] 张林田,林文,陆奕娜,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测动物源性食品 4 中 β -受体激动剂[J].检验检疫学刊,2013,23(6):44-49

[4] 汪辉,彭新凯,王玉枝,等.高效液相色谱-串联质谱法测定加工肉制品中莱克多巴胺及克伦特罗的含量[J].分析测试学报,2012,31(5):509-516

[5] 甘盛,施晓光,吴超权.探索用液质串联联用法测定牛肉中的瘦肉精[J].食品科技,2012,37(3):291-296

[6] 陈茹,洪振涛,吴晓薇,等.进口猪产品中莱克多巴胺残留的快速检测[J].中国兽药杂志,2011,45(8):20-23

[7] 蔡勤仁,彭玉芬,冯家望,等.超高效液相色谱-电喷雾串联技术测定猪组织中 7 种 β -兴奋剂[J].现代食品科技,2009,25(4):451-454

[8] 许志刚,练海贤,李攻科,等. β_2 -兴奋剂的样品前处理与分析检测方法研究进展[J].分析测试学报,2011,30(4):465-472

[9] 张丽芳,王霄旻,张涛,等.液相色谱-串联质谱法测定肉肠中莱克多巴胺残留量的研究[J].食品科学,2009,30(8):197-200

收稿日期:2015-04-07

社会主义核心价值观

【国家】富强 民主 文明 和谐
【社会】自由 平等 公正 法治
【公民】爱国 敬业 诚信 友善