LC-MS/MS 法分析肉类中美度铵残留

LCMSMS-744

摘要：本文利用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了肉类中美度铵残留量的测定方法。样品经碳酸氢铵 - 乙腈缓冲液提取，固相萃取柱净化，液相色谱 - 串联质谱法测定。结果显示该方法在 0.5~100 ng/mL 浓度范围内建立校准曲线，线性相关系数均大于 0.997，线性良好；0.5 ng/mL 美度铵保留时间 RSD 为 0.14%，峰面积 RSD 为 5.03%；猪肉、虾中美度铵的检出限分别为 0.2 和 0.3 μg/kg，定量限分别为 0.7 和 1.0 μg/kg，5、10、50 μg/kg 加标回收率在 81.8%~109.5% 之间。该方法分析速度快，灵敏度高，准确度好，适用于肉类产品中美度铵的残留量测定，也可为相关从业人员分析检测提供参考。

关键词：三重四极杆液质联用仪　美度铵　肉类　代谢调节剂　兴奋剂

技术特点：

❖ 提取液采用碳酸氢铵缓冲液，提取效率高，同时避免了溶剂效应的发生。

❖ 使用 Shim-pack Velox HILIC 色谱柱，提高美度铵与干扰的分离度，定量更准确。

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，在欧洲作为批准药物用治疗糖尿病、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 S4. 激素及代谢调节剂。国家体育总局也于 2021 年发布了《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，其中美度铵参考检出限 20 μg/kg。

目前，美度铵的检测方法包括液相色谱 - 串联质谱法、液相色谱 - 高分辨质谱法，仅尿液、血液、干血斑等基质有少量文献研究。但是食品基质的研究尚未见报道。

本文采用液相色谱 - 串联质谱，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。

■ 实验部分

1.1 仪器配置

岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统 LCMS-8045。具体配置为

输液泵：	LC-40D XR×2	系统控制器：	CBM-40
自动进样器：	SIL-40C XR	三重四极杆质谱仪：	LCMS-8045
柱温箱：	CTO-40C	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.113

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox HILIC（50 mm x 2.1 mm I.D., 2.7 μm），岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-32025-02

流动相：A 相 -10 mM 乙酸铵水溶液；B 相 -A: 乙腈 = 5:95

流速：	0.3 mL/min	进样量：	1 μL
柱温：	35°C	洗针液：	水：乙腈（1：1）

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 80%，时间程序见表 1。

表 1　梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.00	Pumps	Pump B Conc.	72
6.50	Pumps	Pump B Conc.	50
7.50	Pumps	Pump B Conc.	50
8.00	Pumps	Pump B Conc.	80
11.00	Controller	Stop	

质谱条件

质 谱 仪 ： LCMS-8045
离 子 源 ： ESI+
雾 化 气 ： 氮气 3 L/min
干 燥 气 ： 氮气 10 L/min
加 热 气 ： 空气 10 L/min
脱溶剂管温度 ： 250°C
加热模块温度 ： 400°C
接 口 温 度 ： 300°C
扫 描 模 式 ： MRM
MRM 参 数 ： 见表 2

表 2　MRM 参数

序号	中文名	英文名	前体离子（m/z)	产物离（m/z)	CE（V)
1	美度铵	Meldonium	147.20	58.25*	-27.0
				59.25	-19.0
				42.10	-55.0

* 定量离子对

1.3 样品前处理

准确称取样品 1.0 g，置于 50 mL 离心管中，准确加入 50 mM 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 均质 30 s，加入 10 mL 正己烷，轻轻混匀， 4000 r/min 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：取空白样品，按照前处理净化，分别准确加入混合标准中间工作液适量，配制成浓度为 0.5、1、2、5、20、100 ng/mL 的标准工作曲线，待上机分析。

■ 结果与讨论

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，季铵根离子在正离子模式下有很好的质谱响应，-20 eV 和 -55 eV 叠加二级质谱图如下图 1 所示。

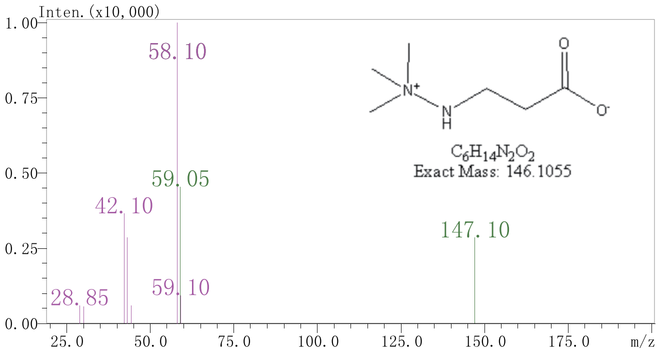

图 1　美度铵二级质谱图 (CE 为 -20 eV 和 -55 eV 叠加)

2.2 色谱条件优化

美度铵极性很强，logP 为 -1.4，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 x 2.1 mm I.D., 2.7 µm）、PC HILIC（150 mm x 2.0 mm I.D., 3 µm）、Shim-pack Diol HILIC（50 mm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm）、Inersil HILIC（150 mm x 2.1 mm I.D., 3 µm）、Inersil Amide（100 mm x 2.1 mm I.D., 5 µm）、Glycan BEH Amide（150 mm x 2.1 mm I.D., 1.7 µm）。其中，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；对于猪肉、虾基质干扰均能实现较好分离的是 Shim-pack Velox HILIC、PC HILIC 两款色谱柱，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。

流动相添加剂对色谱峰形，分离度有一定的影响，对比了水相加 10 mM 乙酸铵、水相加 0.1% 甲酸、水相加 0.1% 甲酸 +10 mM 乙酸铵三种添加剂体系，添加甲酸导致色谱峰分叉，且分离度下降，无法将美度铵与基质干扰峰分离，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 mM 乙酸铵作为流动相添加剂，结果见图 2。

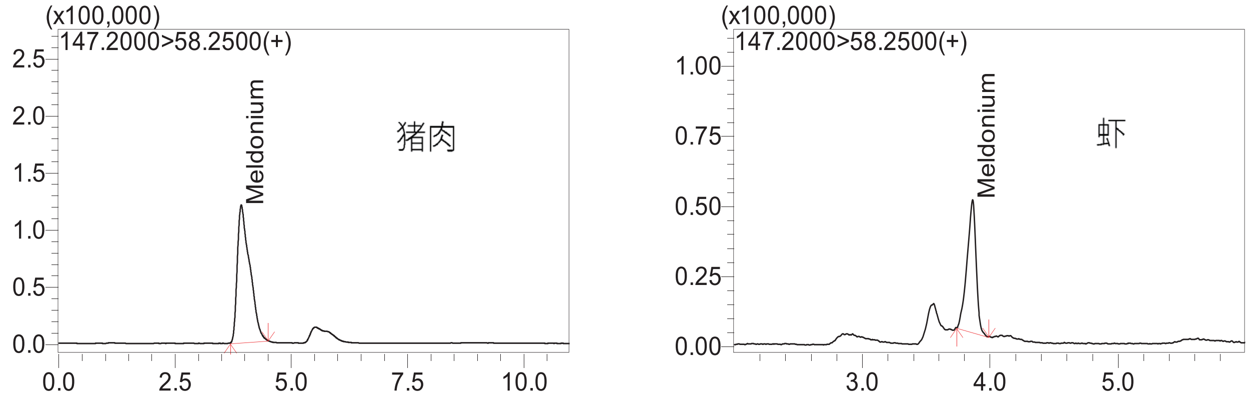

图 2　Velox HILIC 色谱图（猪肉、虾基质）

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）、1% 的甲酸水 / 乙腈（1：9）、0.1M 磷酸缓冲液 / 乙腈（1：9）、0.1M EDTA-Mcllavine 水溶液（pH=4.0、7.0、10.0）、50 mM 碳酸氢铵 / 乙腈（3：7）提取效率。20 ng/g 单点基质标测定提取效率，结果如下图所示，水 / 乙腈（1：9）提取效率 54%，其他提取试剂均可以 80-105% 的提取率。1% 的甲酸水 / 乙腈（1：9）的提取效率 90%，但是样品溶液 pH 较低，导致色谱分离度下降；0.1M 磷酸缓冲液 / 乙腈（1：9）、0.1M EDTA-Mcllavine 水溶液在 -pH=4.0、7.0、10.0 均可以实现较好的提取效率，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 mM 碳酸氢铵 / 乙腈（3：7）可以实现 101% 的提取效率，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，水相比例不高于 50% 可以避免溶剂效应，有利于 HILIC 模式分析。因此最终选择了挥发性的碳酸氢铵缓冲溶液提取。

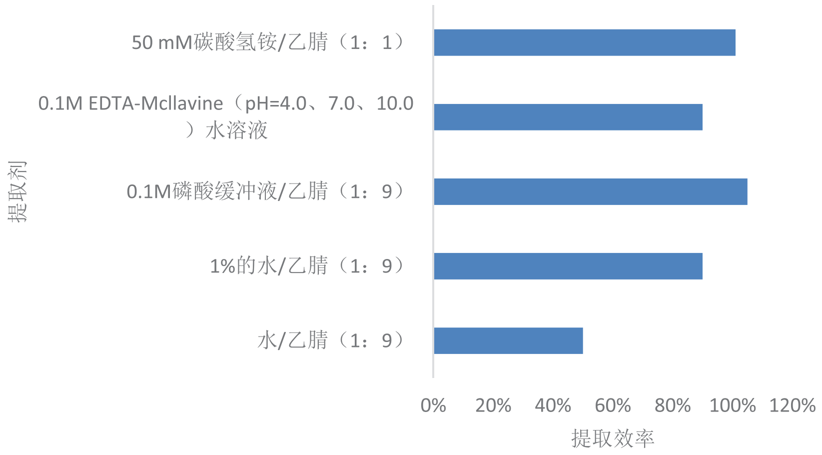

图 3　不同提取剂的提取效率

根据提取的试剂不同，采用两种类型的固相萃取净化方式：1-0.1M EDTA-Mcllavine 提取，净化时使用 styra MCX、SCX、WCX 固相萃取柱；2-50 mM 碳酸氢铵 / 乙腈（3：7）提取，HLB 固相萃取柱净化。pH=4.0 的麦氏溶剂提取后，仅 SCX 有一定的保留，当上样体积增大时，美度铵被洗脱。HLB 净化时，无需活化，直接收集上样液，HLB 对美度铵没有保留，可以实现对样品中弱极性至非极性组分净化。

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；且当 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，当超出此范围时表明存在较强基质效应，须进行基质效应补偿。配制系列浓度的溶剂校准曲线和基质校准曲线，溶液校准曲线、猪肉基质曲线、虾基质曲线如图 4 所示，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。

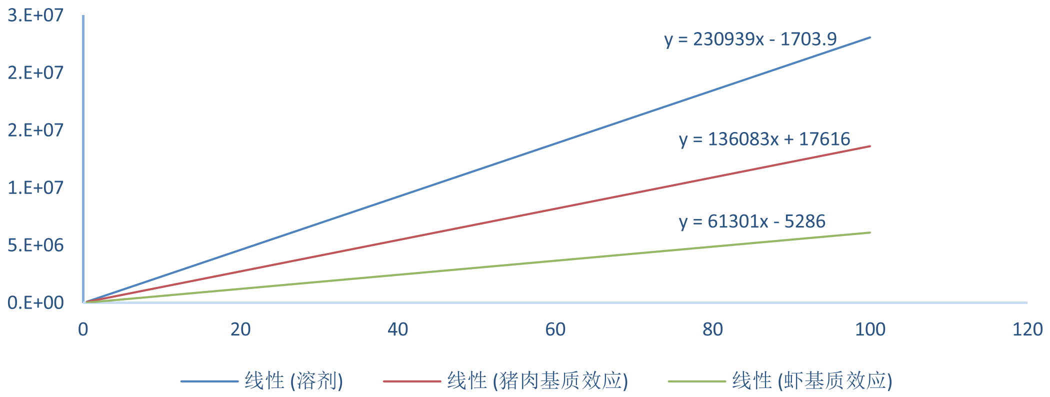

图 4　猪肉、虾基质效应

2.5 线性

按照 1.4 方法配制标准系列溶液，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 0.5~100 ng/mL 范围内，线性良好，相关系数 R 均 >0.997，准确度 94.7%~107.7% 之间。美度铵基质校准曲线见图 5。

表 3　美度铵基质校准曲线的线性关系

化合物	基质	线性方程	相关系数 R	准确度 (%)
美度铵	猪肉	Y =136318.3X +8170.1	0.9994	97.4~104.2
	虾	Y =34568.9X +9147.8	0.9977	94.7~107.7

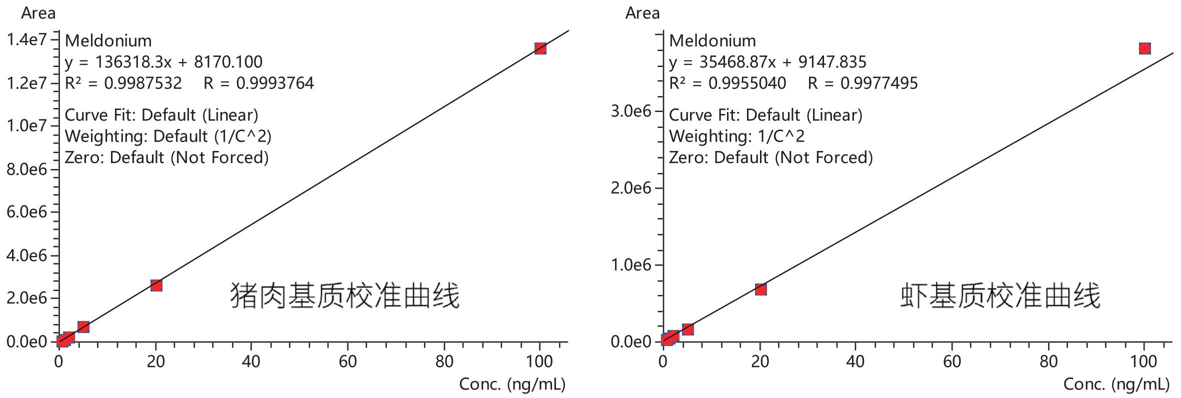

图 5　美度铵基质校准曲线

2.6 精密度考察

取 0.5 ng/mL 的溶液标准溶液，注入液相色谱串联质谱仪，平行测定 6 次，计算保留时间（R.T.）和峰面积（Area）的 RSD%。结果显示美度铵的保留时间（R.T.）的 RSD 为 0.14%，峰面积（Area）的 RSD 为 5.03%，实验结果表明仪器条件稳定性良好。

2.7 检出限和定量限

取 0.5 ng/mL 的基质标准溶液，注入液相色谱串联质谱仪，根据信噪比，计算其检出限（S/N=3）和定量限（S/N=10）。结果如表 5 显示，美度铵在猪肉、虾基质的检出限分别为 0.2、0.3 μg/kg，定量限分别为 0.7、1.0 μg/kg。检出限、定量限满足《大型赛事食源性兴奋剂防控工作指南》要求的 20 μg/kg 。

2.8 加标回收率

选择空白猪肉、虾，进行 5、10、50 μg/kg 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。美度铵加标回收率在 81.8%~109.5% 之间，符合指南要求。

表 4　美度铵加标回收率结果

基质	浓度	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

■ 结论

本实验使用岛津 LCMS-8045 液质联用系统，开发了肉中美度铵残留量的检测方法。实验结果表明，猪肉、虾基质效应分别为 59%，27%，存在一定的基质抑制效应，因此采用基质匹配外标曲线定量。美度铵在猪肉、虾基质中 0.5-100 ng/mL 的范围内线性良好；精密度实验中，0.5 ng/mL 美度铵保留时间 RSD 为 0.14%，峰面积 RSD 为 5.03%，仪器性能稳定；是猪肉、虾中美度铵的检出限在 0.2、0.3 μg/kg，定量限在 0.7、1.0 μg/kg，5、10、50 μg/kg 加标回收率 81.8%~109.5% 之间，回收率良好。

本文研究内容已正式发表，完整内容请参考文献

[1] 郑锌 , 王雨晴 , 李莹 , 李长坤 , 李月琪 , 黄涛宏 . 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.

岛津应用云

岛津企业管理(中国)有限公司 – 分析中心
Shimadzu (China) Co., LTD. – Analytical Applications Center
Email: sshzyan@shimadzu.com.cn Tel: 86(21)34193996 http://www.shimadzu.com.cn