

猪肉中10种 β -受体激动剂的全自动分散固相萃取和LC-MS/MS分析

关键词: 减少样品体积, 快速提取



引言

β -受体激动剂是一类合成的苯乙醇胺化合物, 常用作扩张支气管和抑制宫缩。欧盟(1)和中国(2)等许多国家和地区已禁用此类药物, 因为它们会对人类健康产生不良影响, 如引发食物中毒(3)、心血管疾病和中枢神经疾病(4)。目前标准对这类化合物有的没有规定最大残留量, 有的禁止检出。因此, 高灵敏度分析对于标准的执行至关重要。目前的标准主要通过对动物体基质、动物源性产品、饲料和饮用水进行检测并残留物(1)。在以上样本中, 肉类是消费者接触 β -受体激动剂的主要来源。猪肉是最广泛食用的肉类, 占世界肉类摄入量的36%以上(5)。因此, 开发一种猪肉中 β -受体激动剂的高灵敏分析方法是欧洲和国内实验室(工业部门、进口检验检疫和地方质量监督机构)的主要工作重点。

分散固相萃取是在移液吸头内进行的固相萃取技术。将松散的树脂封装在吸头内, 通过液体的吸打步骤进行萃取。本研究旨在通过分散固相萃取技术和较少的样品体积, 对猪肉中10种 β -受体激动剂(西马特罗, 特布他林, 沙丁胺醇, 盐酸苯氧丙酚胺, 莱克多巴胺, 西布特罗, 克伦特罗, 溴布特罗, 马布特罗和马喷特罗)残留进行灵敏快速地LC-MS/MS定量分析。

材料和方法

试剂和标准品

盐酸莱克多巴胺、盐酸苯氧丙酚胺、盐酸克伦特罗和西布特罗购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。特布他林购自Abcam (Cambridge, MA, USA)。西马特罗购自Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)。沙丁胺醇购自VWR (Atlanta, GA, USA)。马喷特罗、马布特罗和盐酸溴布特罗购自TRC-Canada



所有样品制备步骤均通过Hamilton Microlab Nimbus96完成

(Toronto, Ontario, Canada)。内标为盐酸克伦特罗-d9和特布他林-d3购自CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canada)。强阳离子交换树脂 (SCX) XTR tips 购自DPX Technologies, LLC (Columbia, SC, USA)。

仪器分析

分析仪器为Thermo TSQ Vantage™ 三重四极杆质谱仪 (Milwaukee, WI) 串联Agilent 1260 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)。色谱柱: Agilent Poroshell EC-C18 (3.0 × 50 mm, 2.7 μ m)。流动相: A为0.1%甲酸-水, B为0.1%甲酸-乙腈。梯度洗脱程序如下: 0~2 min: 4% B→8% B; 2~6 min: 8% B→40% B; 6~7.5 min: 40% B→95% B; 7.5 min~8.5 min: 95% B→4% B; 总运行时间: 9.6 min。流速: 0.5 mL/min; 柱温: 35 °C, 进样量: 20 μ L。质谱仪参数: 电喷雾电压: 4000 V; 护气压力: 8 psi; 鞘气压力: 30 psi; 干燥器温度: 300 °C; 毛细管温度: 300 °C。

样品准备

因10种 β -受体激动剂均含有pKa>9的氨基基团, 使用阳离子交换树脂提取可获得较高的回收率。通过多次洗涤去除干扰, 减少基质效应。分散型树脂可与样品充分接触而缩短了提取时间。与Hamilton NIMBUS96联用, 可在20 min内提取96个样品。采用猪肉样品基质加标的方法制作标准曲线, 线性范围0.2 ng/g~50 ng/g。

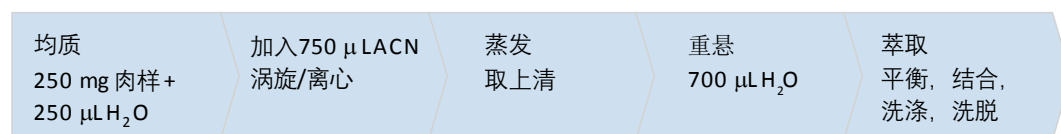
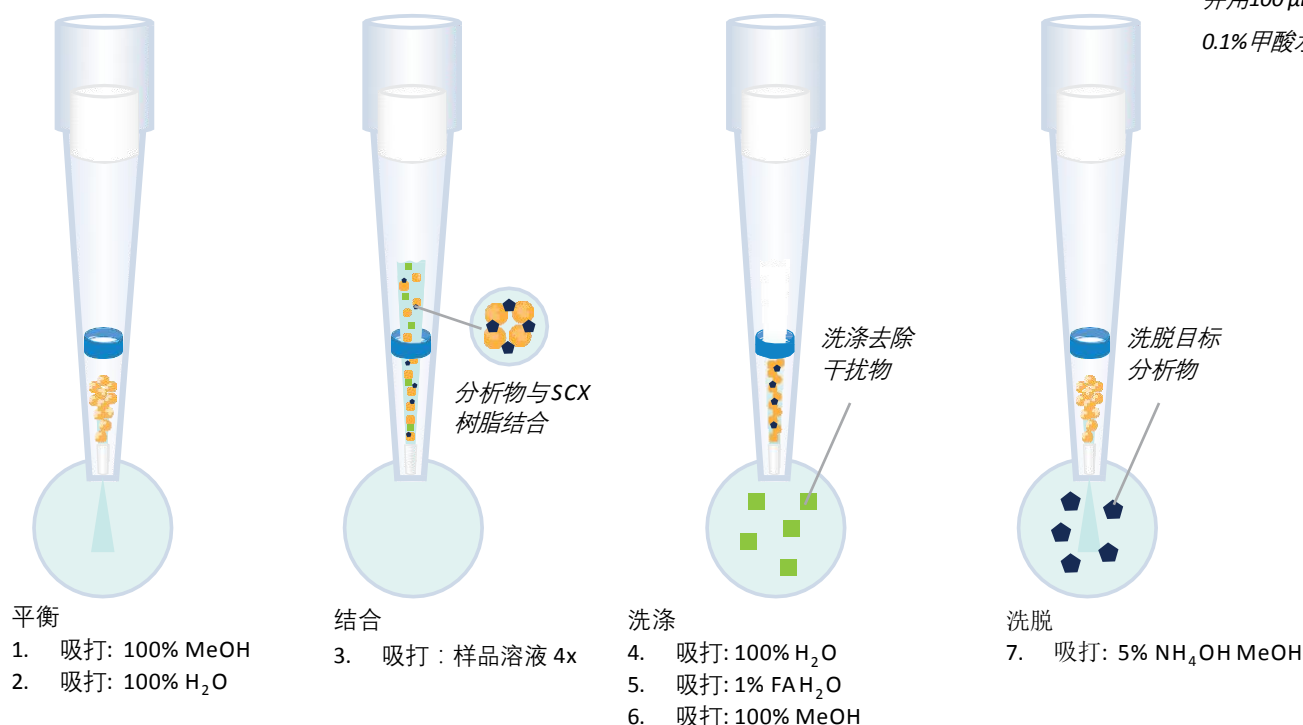


图1. 样品前处理和分散固相萃取方案。溶液洗脱后经氮吹至近干, 并用100 μL 5%甲醇0.1%甲酸水溶液复溶。



结果和讨论

10种 β -受体激动剂色谱分离结果见图2。每种 β -受体激动剂的权重因子为 $1/x$, 线性回归系数 (R^2) 大于0.99。如图3所示, 提取过程快速, 基质效应较小 ($<25\%$), 回收率较大 ($>85\%$)。当盐酸苯氧丙胺浓度为5 ng/mL 时, 批内平均精密度最高为11.8%; 当溴布特罗浓度为0.5 ng/mL 时, 批间平均精密度最高为21.0%。我们推测, 肉类均质提取的时间、蒸发皿的有限容量导致批内和批间变异系数高于预期值, 且对LOD和LOQ结果产生不利影响, 如表1所示, 平均斜率和 y 截距标准差分别表示每种化合物的LODs和LOQs。结果表明, LODs和LOQs分别低于0.7 ng/g 和2.2 ng/g 。实验室LODs和LOQs值应更低。

化合物	批内精密度			批间精密度			LOD	LOQ
	0.5	5	10	0.5	5	10		
特布他林	4.2	4.5	2.4	5.1	6.6	3.1	0.3	0.8
西马特罗	4.5	4.4	2.2	8.7	6.2	2.2	0.5	1.6
沙丁胺醇	4.3	8.5	4.0	14	11	12	0.2	0.6
西布特罗	6.6	6.4	3.5	14	12	5.6	0.4	1.1
莱克多巴胺	6.0	3.0	4.3	14	4.7	4.5	0.2	0.7
克伦特罗	4.5	2.8	4.8	16	7.4	4.7	0.4	1.3
溴布特罗	3.6	11	6.2	21	17	12	0.2	0.7
盐酸苯氧丙胺	5.3	12	3.3	16	21	2.9	0.7	2.2
马布特罗	5.1	1.7	2.4	15	1.7	4.7	0.2	0.7
马喷特罗	5.6	4.6	2.2	12	5.4	9.9	0.3	0.8

表1. 每种 β -受体激动剂在三种不同浓度 (0.5、5和10 ng/g) 的批内、批间精密度 (%)、检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) (ng/mL)。

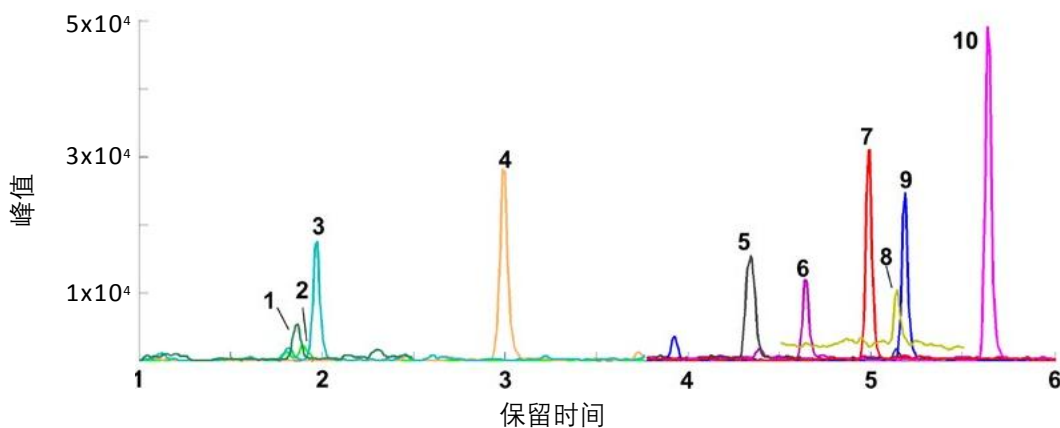


图2. 猪肉中10种 β -受体激动剂

(1 ng/g) 的提取离子色谱图。

1-特布他林, 2-西马特罗,
3-沙丁胺醇, 4-西布特罗,
5-莱克多巴胺, 6-克伦特罗,
7-溴布特罗, 8-盐酸苯氧丙酚胺,
9-马布特罗, 10-马喷特罗。

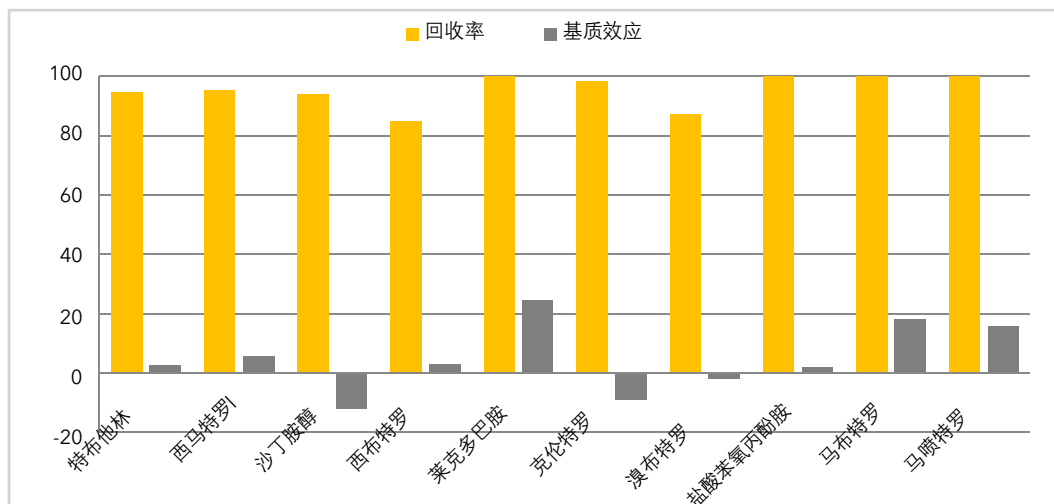


图3. 10种 β -受体激动剂的回收率和基

质效应(离子抑制/离子增强) 结果。

结论

本文建立了一种对猪肉中10种 β -受体激动剂快速、环保、可靠的检测方法，即采用枪头式分散固相微萃取柱提取，LC-MS/MS定量。该方法使用样本量少，样品前处理通过自动化移液工作站完成。该方法适用于猪肉中10种 β -受体激动剂的高通量检测，可作为欧洲国家和中国等地区违禁药品监测的常规方法。

参考文献

1. Directive, C.) EEC. 88, 3-9.
2. In: Agriculture TMO, editor. PR China 2002.
3. Pulce, C., Lamaison, D., Keck, G., Bostvironnois, C., Nicolas, J., Descotes, J. (1991) Veterinary and Human toxicology. 33, 480-481.
4. Martinez-Navarro, J.F. (1990) Lancet. 336, 1311. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978128>.
5. (Fao), F.a.a.O. World meat markets at a glance. 2014.



无锡微色谱生物科技有限公司

地 址：江苏省江阴市月城镇北环路 19 号

电 话：17715681752

邮 箱：custserv@micro-sep.com



MicroSep Biotechnology LLC

ADD: 2411 Monroe ST, Columbia, SC, USA

Phone : 001-803-767-8196

Web: www.micro-sep.com

