

白艳梅,张立佳,汪洋,等. 同位素稀释高效液相色谱-串联质谱法测定乳与乳制品中 3-甲氧酪胺和肾上腺素 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 305-312. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110234

BAI Yanmei, ZHANG Lijia, WANG Yang, et al. Determination of 3-Methoxytyramine and Adrenaline in Dairy Products by Isotopic Dilution-Assisted Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 305-312. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110234

· 分析检测 ·

同位素稀释高效液相色谱-串联质谱法测定乳与乳制品中 3-甲氧酪胺和肾上腺素

白艳梅,张立佳,汪洋,刘丽君,谢瑞龙,范敏,李翠枝*
(内蒙古伊利实业集团股份有限公司,内蒙古呼和浩特 010110)

摘要: 本文建立高效液相色谱-串联质谱法 (High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 同时测定乳与乳制品中 3-甲氧酪胺和肾上腺素的检测方法。样品前处理使用高氯酸溶液作为提取溶剂,通过弱阳离子固相萃取柱净化,样品采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 分离,以 0.1% 甲酸-甲醇流动相体系进行梯度洗脱,采用电喷雾离子源正离子方式扫描,在多反应监测 (Multiple reaction monitoring, MRM) 模式下检测,内标法定量。结果表明,3-甲氧酪胺在 0.5~12.0 ng/mL,肾上腺素在 50~1200 ng/mL 范围内线性关系均良好 ($r>0.99$),3-甲氧酪胺的方法检出限为 0.2 μg/kg,定量限为 0.5 μg/kg;肾上腺素检出限为 20 μg/kg,定量限为 50 μg/kg。在 0.5、1.0、3.0 μg/kg 浓度下,3-甲氧酪胺方法回收率在 76.97%~119.20% 之间,精密密度在 1.53%~9.61% 之间;在 50、100、300 μg/kg 浓度下,肾上腺素方法回收率在 90.65%~108.55% 之间,精密密度在 1.29%~3.95% 之间。本方法建立的 HPLC-MS/MS 结果准确,特异性强,准确度和重复性好,适用于乳与乳制品中 3-甲氧酪胺和肾上腺素的分析测定。

关键词: 高效液相色谱质谱联用法,乳制品,3-甲氧酪胺,肾上腺素,固相萃取柱

中图分类号:TS252.7

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2023)19-0305-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110234



本文网刊:

Determination of 3-Methoxytyramine and Adrenaline in Dairy Products by Isotopic Dilution-Assisted Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

BAI Yanmei, ZHANG Lijia, WANG Yang, LIU Lijun, XIE Ruilong, FAN Min, LI Cuizhi*

(Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd., Hohhot 010110, China)

Abstract: A method was established for the simultaneous determination of 3-methoxytyramine and adrenaline in dairy products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) coupled with isotope dilution. Sample was extracted by perchloric acid solution, cleaned by weak cationic solid phase extraction column. The analyte was separated by ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column and a gradient elution of mobile phase with 0.1% formic acid aqueous solution-methanol. The detection was achieved by HPLC-MS/MS with electrospray ion source and positive ion scanning mode as well as multiple reaction monitoring (MRM) mode. The quantification was accomplished by the internal standard method. It was demonstrated that the linear relationships of 3-methoxytyramine and adrenaline were good in the range of 0.5~12.0 ng/mL and 50~1200 ng/mL ($r>0.99$), respectively. The detection limits and the limit of quantification of 3-methoxytyramine were 0.2 and 0.5 μg/kg, respectively. At the concentrations of 0.5, 1.0 and 3.0 μg/kg, the recoveries of the 3-methoxytyramine ranged from 76.97% to 119.20%, with the corresponding precision ($n=6$) of 1.53%~9.61%. While the recoveries of adrenaline at 50, 100 and 300 μg/kg were 90.65%~108.55% and the relative standard deviations were in the range of 1.29%~3.95%. The method would be accurate in results and good in

收稿日期: 2022-11-24

作者简介: 白艳梅 (1981-), 女, 本科, 高级工程师, 研究方向: 乳制品检测, E-mail: baiyanmei@yili.com。

* 通信作者: 李翠枝 (1969-), 女, 硕士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全管理和检验检测技术研究, E-mail: lczg@yili.com。

repeatability, and it can be an important measure to monitor 3-methoxytyramine and adrenaline in dairy products.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; dairy product; 3-methoxytyramine; adrenaline; isotope dilution

3-甲氧酪胺(简称甲氧酪胺)和肾上腺素均是一种激素和神经递质,在临床上属于 β -受体激动剂的药物,可以使心肌收缩力增强、心输出量增加等作用^[1]。在现代畜禽养殖业中,一些饲养员为了缩短牲畜的生长周期、降低成本,大量使用盐酸肾上腺素药物,提高畜禽肉中的水分含量,如注水猪肉时间。动物源性食品兽药残留,是食源性兴奋剂的主要来源。如果人类长期食用此类食物,会对人体机能产生较大的伤害^[2-3]。尤其是对于竞技运动员,兴奋剂能提高运动员的成绩,但是长期违规使用会引起心神不宁、心律失常、身体虚弱甚至猝死等现象^[4-6]。为了赛事的公平公正及运动员的身心健康,世界反兴奋剂机构(World Anti-Doping Agency, WADA)发布的《世界反兴奋剂条例国际标准禁用清单》和我国体育总局反兴奋剂中心印发的《大型赛事食源性兴奋剂防控工作指南》(体反兴奋剂字[2021]584号)通知中肾上腺素列为刺激剂,是赛内禁用物质^[7]。甲氧酪胺和肾上腺素理化性质及生理作用相近,结构式见图1。乳制品作为动物源食品的一种,同样存在兴奋剂残留的风险,为保障乳制品安全,给消费者提供健康食品,需要建立甲氧酪胺和肾上腺素的检测方法,为兴奋剂风险监控提供可靠检测技术。

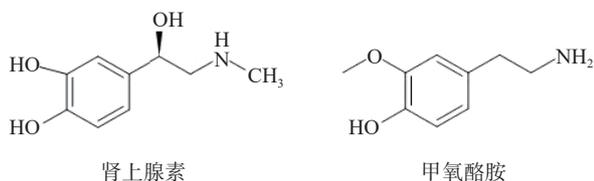


图1 甲氧酪胺和肾上腺素的分子结构式
Fig.1 Molecular formulas for methoxytyramine and epinephrine

目前报道的甲氧酪胺和肾上腺素检测研究多集中于肉类、饲料^[8-13]、血浆和尿液等人体液^[14-22]等基质中,现行的检测标准仅适用于牛奶基质^[23-24],并未涉及乳制品其他基质。而文献报道的甲氧酪胺方法大多是适用于人体液,不适用于乳制品基质,前处理复杂,有的需要两个固相萃取柱净化。肾上腺素前处理过程中容易降解,稳定性差,影响结果的准确度。现有文献和标准中两个化合物大多数研究采用外标法定量,经过研究外标法分析此化合物基质效应较强,回收率低,影响定量结果。因此,亟需建立乳与乳制品中稳定性强、准确度高的,并可同时测定肾上腺素和甲氧酪胺的检测方法。本研究采用同位素内标作为定量方式建立,分析多种乳制品基质中3-甲氧酪胺和肾上腺素的残留量,并对提取试剂和净化材料进行了优化,故采用阳离子固相萃取柱技术结合高效

液相色谱串联质谱分析,同时测定3-甲氧酪胺和肾上腺素残留的方法,为此类药物残留的分析和监控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

液奶、发酵乳、冷冻饮品、奶粉 市售;四种标准品(3-甲氧酪胺、3-甲氧酪胺- d_4 盐酸盐、肾上腺素、肾上腺素- d_6) 均购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司;阳离子固相萃取小柱(填料为 N-乙基吡咯烷酮-二乙烯苯共聚物基质-COOH, 6 mL, 150 mg) 美国 Waters 公司;聚四氟乙烯微孔滤膜(0.22 μm) 上海安谱实验科技股份有限公司;甲醇、乙腈、甲酸、醋酸铵 色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司;焦性没食子酸 分析纯,天津市福晨化学试剂厂;高氯酸 优级纯,济宁华凯树脂有限公司;色谱柱 (ACQUITY UPLC BEH C_{18} 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm) 美国 Waters 公司。

QTRAP 6500 高效液相色谱-质谱联用仪 ESI 配有电喷雾离子源,美国 AB Sciex 公司;ST16R 高速冷冻离心机 美国 Thermo Fisher 公司;S25 旋涡震荡器 德国 IKA 公司;ME2002E 分析天平 梅特勒公司;Millipore Q 纯水机 美国 Millipore 公司;Biotage 氮吹仪 瑞典拜泰齐公司;KQ-300DE 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制 单标储备液:分别准确称取甲氧酪胺、肾上腺素标准品适量,置于 10 mL 棕色容量瓶中,少量 0.1% 甲酸-甲醇溶液(甲酸:甲醇=1:1000, V:V)溶解后稀释至刻度。分别配制成 1 mg/mL 的储备液,-18 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

混合标准工作液的制备:分别吸取适量甲氧酪胺和肾上腺素标准储备液,至棕色容量瓶中,用 0.1% 甲酸-甲醇溶液(甲酸:甲醇=1:1000, V:V)稀释至刻度,配制成 100 ng/mL 甲氧酪胺和 10 $\mu\text{g/mL}$ 肾上腺素混合外标标准溶液,-18 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

内标混合工作液的制备:吸取适量甲氧酪胺- d_4 内标、肾上腺素- d_6 标准储备液,至棕色容量瓶中,用 0.1% 甲酸-甲醇溶液(甲酸:甲醇=1:1000, V:V)稀释至刻度,配制成 100 ng/mL 甲氧酪胺- d_4 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 肾上腺素- d_6 混合内标标准工作液,-18 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

1.2.2 样品提取与净化 提取:称取液奶、发酵乳、冷冻饮品试样约 5 g(精确到 0.1 mg)于 50 mL 具塞离心管中,加入 100 μL 混合内标标准工作液(1.3.1),静置 20 min,加入 20 mL 高氯酸溶液(pH=2),再静

置 20 min, 经涡旋提取 3 min, 以 4 °C 下 15000 r/min 的转速离心 10 min, 取出上清液, 用 100 mmol/L 焦性没食子酸-乙酸铵溶液定容到 50 mL, 待净化。

称取奶粉试样约 2.5 g(精确到 0.1 mg)于 50 mL 具塞离心管中, 加入 5 mL 水(50 °C)充分溶解后并放置室温, 加 100 μL 混合内标标准工作液(1.2.1), 静置 20 min, 加入 20 mL 高氯酸溶液(pH=2), 再加入 40 μL 冰乙酸, 混匀后静置 20 min, 经涡旋提取 3 min, 以 4 °C 下 15000 r/min 的转速离心 10 min, 取出上清液, 用 100 mmol/L 焦性没食子酸-乙酸铵溶液定容到 50 mL, 待净化。

净化: 液奶、发酵乳、冷冻饮品基质: 取待净化溶液 25 mL 过固相萃取柱(Solid Phase Extraction, 简称 SPE 小柱), 自然流干后依次用 5 mL 40 mmol/L 乙酸铵溶液和 6 mL 甲醇淋洗 SPE 小柱, 抽干, 用 6 mL 2% 甲酸乙腈水溶液(乙腈:水=85:15, V:V)洗脱, 收集洗脱液, 用氮气吹至干, 用 0.1% 甲酸水溶液定容至 1 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 供液质分析。

奶粉基质: 奶粉基质上清液全部转移至 SPE 小柱, 其它步骤与液体乳净化操作一致。

1.2.3 液相色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 柱温: 40 °C; 流动相 A: 0.1% 甲酸水; 流动相 B: LC-MS 级甲醇; 梯度洗脱程序: 0~1 min 保持 97% A; 1~2 min, 97% A 线性变化至 85%; 2~3 min, 85% A 线性变化至 50%; 3~5 min, 50% A 线性变化至 0%; 5~7 min 保持 5% A; 7~9 min 保持 97% A。

1.2.4 质谱分析条件 质谱条件: 离子源为电喷雾离子源, 正离子扫描模式; 离子源温度 150 °C; 脱溶剂温度 500 °C; 脱溶剂气流量 1000 L/Hr; 锥孔气流量 100 L/Hr; 毛细管电压 0.6 kV。扫描方式多反应监测模式(MRM)条件见表 1。

表 1 多反应监测条件
Table 1 Parameter of MRM

化合物	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)
3-甲氧酪胺	168.23/151.15*	38	11
	168.23/119.20	38	17
肾上腺素	184.23/166.5*	14	13
	184.23/107.00	14	20
3-甲氧酪胺-d ₄ 内标	172/155*	16	10
肾上腺素-d ₆ 内标	190.12/172*	15	9

注: *为定量离子对。

1.2.5 标准曲线的建立 准备甲氧酪胺和肾上腺素均未检出的阴性基质样品, 按照样品一致的前处理进行检测, 使用过滤后的基质溶液, 将甲氧酪胺和肾上腺素(1.2.1 混合外标标准工作液)逐级稀释系列标准工作液, 浓度由低到高进行检测, 以外标峰面积/内标峰面积比值-浓度作图, 得到标准曲线回归方程。

1.2.6 结果计算 试样中甲氧酪胺和肾上腺素的测

定按下式计算:

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times n}{m}$$

式中: X 为试样中被测物残留量, μg/kg; C 为试样上机溶液中被测化合物物残留量, ng/mL; C₀ 为空白实验中被测化合物残留量, ng/mL; V 为样液最终定容体积, mL; n 为稀释倍数; m 为试样质量, g。

1.3 数据处理

采用 HPLC-MS/MS 进行分析检测, 数据采集使用 Waters Masslynx 4.1 工作站软件对目标物进行定性定量分析, Excel 2016 软件对实验数据进行处理和统计学分析, 用 Minitab 16 软件作图。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择

如图 2 所示, 由于肾上腺素和甲氧酪胺结构中有极性的氨基和非极性苯环结构, 因此本文考察了常规两款极性色谱柱和一款非极性色谱柱, 分别是 HILIC(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), Amide(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)和 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 结果表明: HILIC 色谱柱上两个目标物均保留不佳, 容易受溶剂峰干扰, 改变水相和有机相比例对出峰时间无明显改善, 影响定量结果, 色谱图如图 2A 和图 2B 所示。在 Amide 色谱柱上肾上腺素能得到很好的峰形和响应值, 但是甲氧酪胺随着加大有机相比例时峰形变得较差, 影响定量结果, 色谱图如图 2C 和图 2D 所示。大多数文献报道, 分析肾上腺素时流动相加离子对试剂听可改善出峰时间和峰形, 但离子对试剂对质谱仪器会造成污染, 故本研究不采用添加离子对试剂的方式分析。考察反相色谱柱 C₁₈, 肾上腺素和甲氧酪胺峰可以获得很好的保留且峰形良好, 色谱图如图 2F 所示。因为肾上腺素和甲氧酪胺均含氨基和羟基, 是弱碱性的极性化合物, 在流动相中加入 0.1% 甲酸时可增强离子强度, 灵敏度有明显改善, 本方法综合考虑最终选择使用 C₁₈ 色谱柱分离, 0.1% 甲酸-甲醇流动相梯度洗脱。

2.2 基质效应评价

基质效应在质谱检测方法中普遍存在, 由于基质中的干扰组分与目标物竞争电离, 导致目标化合物质谱检测时离子化效率降低或增强, 产生基质抑制或基质增强效应。基质效应影响分析结果准确度, 通常超出 80%~120% 范围^[25-26], 判定为有基质效应。实验选取甲氧酪胺和肾上腺素未检出的阴性牛奶、发酵乳、冷冻饮品和乳粉, 按照实验前处理进行试验, 得到的基质液配制标准工作液, 上机后记录色谱图峰面积, 与起始流动相配置同浓度工作液进行比较, 内标法计算结果, 结果见表 2。结果显示发酵乳(甲氧酪胺)和乳粉基质(肾上腺素)基质效应超出方法规定范围(方法规定 80%~120% 为合格), 如果采用流动相配制标准曲线进行定量结果偏差会很大, 为了提高结果的准确性, 最终乳制品基质均采用基质加标进行定量。

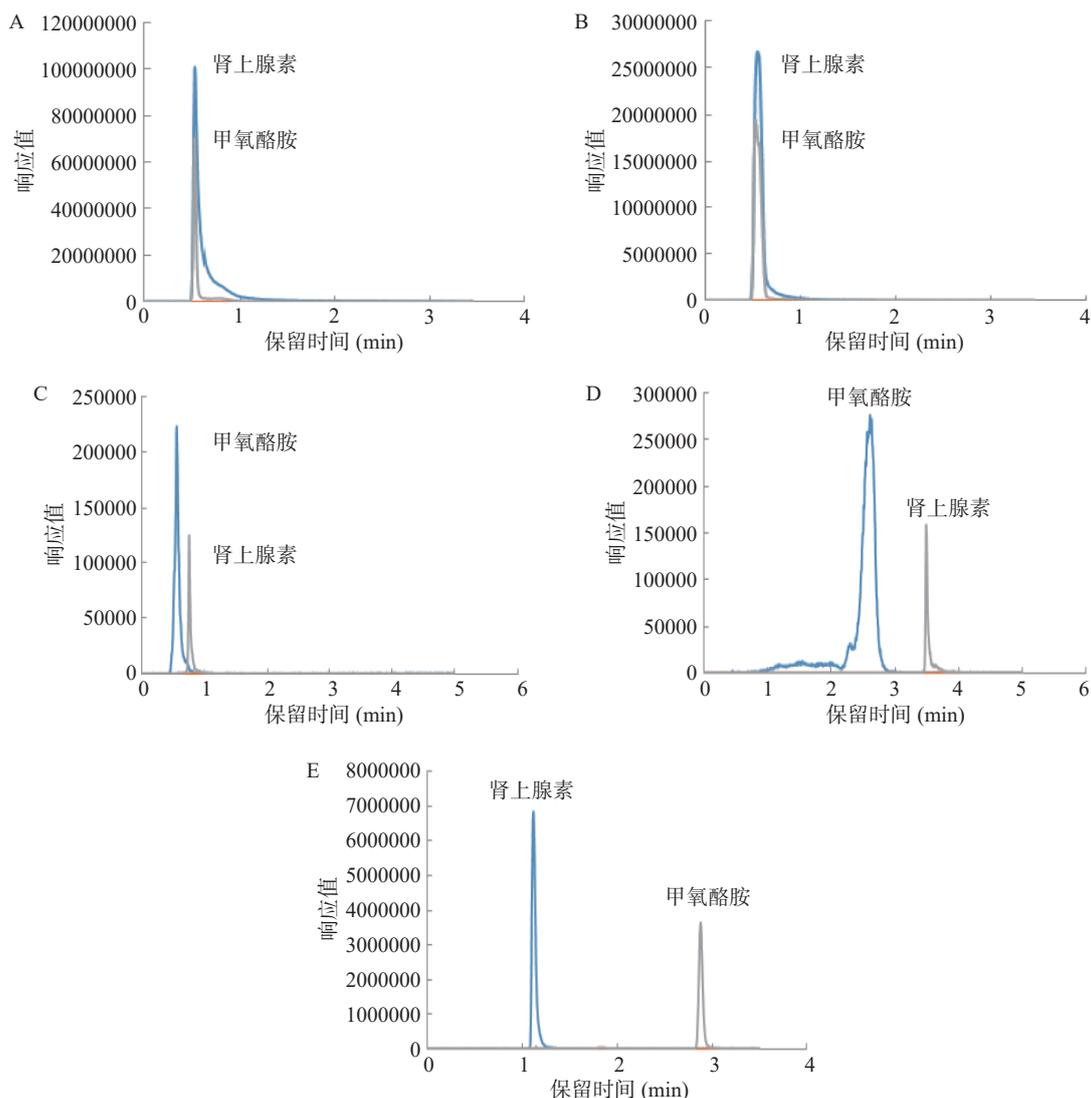


图2 色谱柱的考察

Fig.2 Investigation of chromatographic column

注: A: HILIC 色谱柱-起始流动相 5/95(0.1% 甲酸-甲醇); B: HILIC 色谱柱-起始流动相 2/98(0.1% 甲酸-甲醇); C: Amide 色谱柱-起始流动相 5/95(0.1% 甲酸-甲醇); D: Amide 色谱柱-起始流动相 25/75(0.1% 甲酸-甲醇); E: C₁₈ 色谱柱-起始流动相 5/95(0.1% 甲酸水-甲醇)。

表2 肾上腺素和甲氧酪胺的基质效应评价(n=3)

Table 2 Matrix effects of epinephrine and methoxytyramine (n=3)

基质	基质效应(%)	
	甲氧酪胺	肾上腺素
牛奶	117	115
发酵乳	128*	116
冷冻饮品	101	111
乳粉	101	74*

注: *为超出80%~120%范围。

2.3 提取方式的选择

2.3.1 提取溶剂的选择 不同品相的乳制品基质之间的蛋白和脂肪含量会有所不同,某些干扰组分会对提取过程造成影响,对此分别考察高氯酸、1% 甲酸乙腈、乙腈、三氯乙酸的提取效率。如表3所示,结果表明高氯酸、三氯乙酸溶剂对甲氧酪胺的提取回

收率比较高并满足方法要求,肾上腺素只有高氯酸溶液回收率满足方法要求。肾上腺素和甲氧酪胺属于弱碱性化合物,在弱阳离子交换固相萃取柱能够有效的进行富集与净化。在提取过程中目标物以离子状态分散在溶液里会提高提取效率,高氯酸溶液能同时加强两个目标物的离子化效率,提高了回收率。而使用有机溶剂提取会抑制目标化合物的离子化,影响回收率,最终优选高氯酸溶液作为提取溶剂。

表3 肾上腺素和甲氧酪胺的提取液比较(n=6)

Table 3 Comparison of adrenaline and methoxytyramine extracts (n=6)

化合物	回收率(%)			
	高氯酸溶液(pH=2)	1%甲酸乙腈	纯乙腈	三氯乙酸
甲氧酪胺	85	0	0	80
肾上腺素	80	0	0	0

2.3.2 提取溶剂 pH 的选择 如图 3 所示,经过高氯酸不同的 pH(1、2、3、4、5)的对比实验发现,甲氧酪胺和肾上腺素在 pH=1 时回收率 3%~64%,尤其是对肾上腺素的影响较大,回收率不符合要求。pH=2~5 时回收率整体在 76%~89% 范围内,符合方法要求。乳制品在 pH=1 时容易发生乳化现象,影响目标物离子化提取效率低,pH=2~5 酸性条件助于目标化合物在提取液中离子化。经研究发现 pH=2 时沉淀效果最佳,离心后上清液澄清,pH=3~5 时沉淀效果差,上清液浑浊,通过固相萃取柱时容易堵塞,延长前处理时间。为了改善沉淀效果最终优选 pH=2 检测。选用 pH=2 高氯酸水溶液作样品前处理操作,由于乳粉中含有大量的脂肪和蛋白质,沉淀效果仍并不理想,极易污染固相萃取柱、色谱柱和仪器,影响检测。故做乳粉基质样品时,为了防止产生乳化现象并提高沉淀效果选择加弱酸冰醋酸,pH=2 高氯酸水溶液提取液中加 40 μL 冰醋酸,结果沉淀效果明显好转并无乳化现象。这主要利用了冰乙酸与乳制品蛋白质争夺结合水特性,导致蛋白质分子相互聚集沉淀^[27]。最终本研究提取溶剂选择 pH=2 高氯酸水溶液进行提取,考察奶粉基质时添加冰醋酸改善沉淀效果,实现了本研究的减负增效作用。

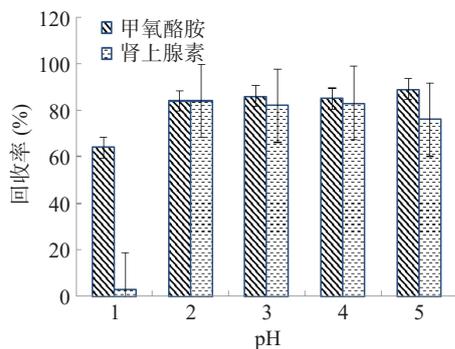


图 3 提取溶剂 pH 的影响(n=2)

Fig.3 Effects of extraction solvent on pH (n=2)

2.4 抗氧化剂对结果的影响

在方法优化过程中肾上腺素回收率不稳定,加内标定量时回收率在 30%~120% 之间,RSD% 为 20% 以上,最终参考 SN/T 5170-2019 液相方法添加焦性没食子酸试剂,选择不含目标物的阴性液体乳样品,加标量为甲氧酪胺 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,肾上腺素 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,做两组实验,每组做 6 个平行样,一组 100 mmol/L 乙酸铵水溶液中含有 0.01 mol/L 抗氧化剂,另一组不添加抗氧化剂,其它条件不变,考察甲氧酪胺和肾上腺素回收率值。如图 4A 控制图所示,甲氧酪胺是否加抗氧化剂,回收率的均值和波动相差较小,说明抗氧化剂对甲氧酪胺回收率无影响,而图 4B 所示,肾上腺素不加抗氧化剂时回收率在 30.43%~105.55% 之间,部分回收率和精密度不能满足要求,添加抗氧化剂时回收率和精密度明显改善,均满足要求。同时采用等方差检验分析回收率的精密度差异是否显著,结果甲氧

酪胺 P 值为 0.44,肾上腺素 P 值为 0,说明是否添加抗氧化剂对肾上腺素回收率精密度的影响显著,对甲氧酪胺回收率精密度影响不显著。原因是肾上腺素属于儿茶酚类药物,对环境的要求比较苛刻,典型的化学性质是容易被氧化,通常温度、pH、光照等都会引起肾上腺素的降解^[28],焦性没食子酸属于抗氧化剂,抑制肾上腺素被氧化降解。因此,最终在 100 mmol/L 乙酸铵水溶液中添加焦性没食子酸抗氧化剂,同时前处理时注意避光操作,使回收率变得稳定,改善精密度,结果更加可靠。

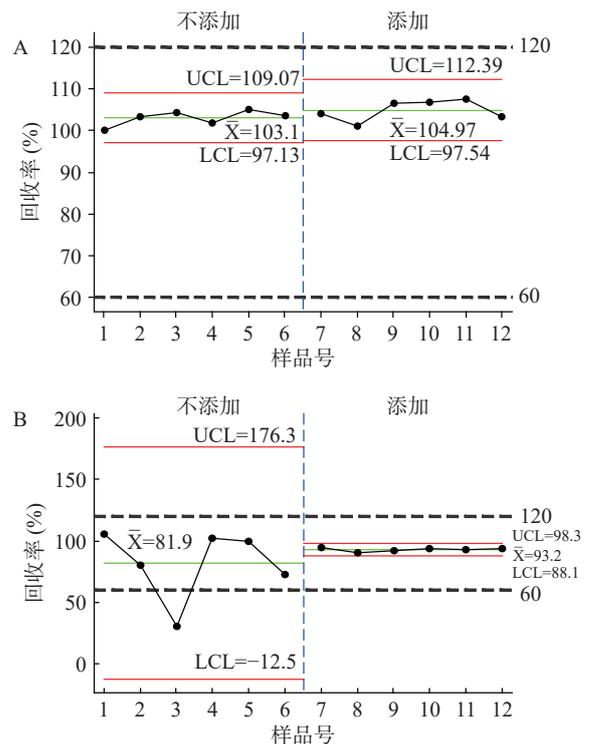


图 4 抗氧化剂对 3-甲氧酪胺(A)和肾上腺素(B)回收率的影响(n=6)

Fig.4 Effects of antioxidants on recovery of 3-methoxytyramine (A) and adrenaline (B) (n=6)

注:UCL 为上控制限;LCL 为下控制限;X 为中心线。

2.5 固相萃取柱的选择

本研究考察强阳离子交换固相萃取小柱(SCX, 60 mg, 3 mL)、弱阳离子交换固相萃取小柱(WCX, 150 mg, 3 mL)、聚苯乙烯-二乙烯基苯固相萃取小柱(HLB, 500 mg, 6 mL)、prime 聚苯乙烯-二乙烯基苯固相萃取小柱(prime HLB, 150 mg, 3 mL)、PAES (500 mg, 6 mL) 5 种固相萃取柱。SCX 采用 5 mL 5% 氨化甲醇洗脱;WCX 采用 5 mL 2% 甲酸乙腈洗脱;HLB、GCB、primeHLB 和 PAES 均采用 10 mL 乙腈洗脱。见表 4 结果表明:SCX 和 WCX 对甲氧酪胺的洗脱效果较好,回收率在 80%~120% 之间,WCX 对肾上腺素洗脱效果较好,回收率在 85%~110% 之间,其它固相萃取柱无法洗脱,回收率为 0%。因肾上腺素和甲氧酪胺是碱性化合物,而 WCX 是弱阳离子交换固相萃取柱,能够有效吸附目标化合物,回

收率满足方法需求。为了同时检测肾上腺素和甲氧酪胺,最终选择 WCX 固相萃取柱进行前处理。

表4 固相萃取柱选择(n=6)

Table 4 Solid phase extraction column selection (n=6)

固相萃取柱	3-甲氧酪胺-回收率(%)	肾上腺素-回收率(%)
SCX	102	101
WCX	80	0
HLB	0	0
prime HLB	0	0
PAES	0	0

2.6 定量方式的选择

通过以上色谱条件及前处理条件优化后部分乳制品中基质效应仍然存在,另一方面乳制品基质的影响下,目标物在前处理过程中易被吸附或者是降解,故采用内标法定量使定量结果更加准确并稳定。本次研究选择纯牛奶基质,适量添加甲氧酪胺和肾上腺素标准品,加内标进行前处理,计算结果时采用外标法和内标法两种方式汇总数据,结果见表5。从表5结果可见,甲氧酪胺采用内标和外标法回收率和精密度均满足 GB/T 27417-2017 中规定要求,肾上腺素外标法定量回收率和精密度均不能满足 GB/T 27417-2017 要求,而内标法定量时均能满足要求。为了结果的稳定可靠,最终甲氧酪胺和肾上腺素均采用内标法进行定量。

2.7 方法学评价

2.7.1 标准曲线、检出限和定量限 在 1.2.1 实验条件下,甲氧酪胺系列标准工作液浓度分别为 0.5、1、

表5 内标和外标法比较(n=6)

Table 5 Comparison between internal standard and external standard (n=6)

实验次数	甲氧酪胺(添加量2 μg/kg) 回收率(%)		肾上腺素(添加量200 μg/kg) 回收率(%)	
	内标法	外标法	内标法	外标法
1	103	86	101	38
2	102	80	103	34
3	105	86	107	50
4	105	83	101	32
5	102	80	101	34
6	105	76	105	34
RSD(%)	1.45	4.79	2.46	18.01

2、4、8、12 ng/mL,肾上腺素系列标准工作液分别为 50、100、200、400、800、1200 ng/mL 的混合标准溶液供液相色谱-串联质谱仪测定。甲氧酪胺标准曲线在 0.5~12 ng/mL、肾上腺素 50~1200 ng/mL 的范围内线性关系良好,相关系数 r 为 0.9942~0.9999,其检出限范围为 0.2~20 μg/kg,定量限范围为 0.5~50 μg/kg,牛奶、发酵乳、冷冻饮品、乳粉中结果能够很好满足定量分析要求,具体结果见表6。

2.7.2 方法的回收率和精密度 在确定的线性范围之内,分别选取不含甲氧酪胺和肾上腺素的基质样品进行回收率试验,甲氧酪胺添加 0.5、1.0、3.0 μg/kg 共 3 个水平的甲氧酪胺标准溶液,肾上腺素添加 50、100、300 μg/kg 共 3 个水平的肾上腺素标准溶液,每个加标水平分别做 6 次平行试验,基质标准曲线进行定量,测定的数据结果如表7所示。

表6 标准曲线及检出限和定量限的试验数据(n=6)

Table 6 Standard curve and test data for detection limit and quantification limit (n=6)

基质	化合物	标准曲线	浓度范围(ng/mL)	决定系数(R ²)	检出限(μg/kg)	定量限(μg/kg)
纯牛奶	3-甲氧酪胺	Y=0.0138738X+0.0914133	0.5~12	0.9967	0.2	0.5
	肾上腺素	Y=0.00739014X-0.0534348	50~1200	0.9997	20	50
发酵乳	3-甲氧酪胺	Y=0.185842X-0.022332	0.5~12	0.9999	0.2	0.5
	肾上腺素	Y=0.00722154X-0.169946	50~1200	0.9952	20	50
冷冻饮品	3-甲氧酪胺	Y=0.244006X-0.0968845	0.5~12	0.9942	0.2	0.5
	肾上腺素	Y=0.000665205X-0.0110832	50~1200	0.9948	20	50
奶粉	3-甲氧酪胺	Y=0.0649785X+0.0272634	0.5~12	0.9981	0.2	0.5
	肾上腺素	Y=0.00345562X+0.0498032	50~1200	0.9992	20	50

表7 回收率与RSD的试验数据(n=6)

Table 7 Experimental data on recovery rate and RSD (n=6)

待测物	基质	添加低浓度水平		添加中浓度水平		添加高浓度水平	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
甲氧酪胺	液奶	107.36~119.20	4.84	101.08~107.64	2.42	103.17~106.96	1.53
	发酵乳	111.04~117.08	1.86	109.62~117.08	2.35	103.59~110.77	2.86
	冷冻饮品	93.68~115.36	7.95	104.48~113.64	2.95	97.33~102.51	1.60
	奶粉	76.97~95.70	9.61	83.02~101	7.48	90.82~100.22	3.50
肾上腺素	液奶	90.65~94.14	1.63	94.28~100.63	2.54	92.39~98.08	2.66
	发酵乳	95.74~105.24	3.95	95.74~106.24	3.51	95.99~106.28	3.73
	冷冻饮品	100.32~106.62	2.46	103.47~106.91	1.29	104.15~108.15	2.45
	奶粉	97.18~106.71	3.21	100.71~108.55	2.73	102.98~106.35	1.34

本研究测定低、中、高 3 个不同浓度的加标回收率。试验结果显示,甲氧酪胺回收率范围在 76.97%~119.20% 之间;相对标准偏差(Relative standard deviations, RSD)的范围在 1.53%~9.61% 之间;肾上腺素回收率范围在 90.65%~108.55% 之间;RSD 的范围在 1.29%~3.95% 之间。表 7 数据说明该方法测定牛奶、发酵乳、冷冻饮品、奶粉中甲氧酪胺和肾上腺素残留时均具有较好的回收率和精密度,均满足日常检测要求。

2.7.3 实际样品中甲氧酪胺和肾上腺素的测定 应用本方法实验中取市售的不同品牌不同品相液奶、发酵乳、冷冻饮品和奶粉进行分析(样本数量 40 种),甲氧酪胺和肾上腺素含量均未检出,说明目前大部分企业对食源性兴奋剂的源头控制非常严格,消费者可放心饮用。

3 结论

本研究建立了同位素稀释液相色谱法-串联质谱法测定乳制品中甲氧酪胺和肾上腺素的分析方法,本研究通过高氯酸溶液提取,添加抗氧化剂稳定剂,采用弱阳离子固相萃取小柱富集净化,在 C_{18} 色谱柱分离,同位素内标法定量等手段,同时分析甲氧酪胺和肾上腺素,采用 4 种代表性的乳制品基质进行定量分析,甲氧酪胺和肾上腺素在 4 种基质中的线性范围良好,相关系数 r 为 0.9967~0.9999,检出限范围为 0.2~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限范围为 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率 76.97%~119.20% 之间,精密度在 1.29%~9.61% 之间,该方法基质使用范围广、具有操作简便、方法稳定、准确度高优点,可满足法规和日常监测分析要求。

参考文献

- [1] GOUGH C, NOLAN J P. The role of adrenaline in cardiopulmonary resuscitation[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 139.
- [2] 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): 49-51. [MENG W, MA W T, ZHANG R L, et al. Analysis on problem-addressing action for water-injected pork in puyang city of Henan province[J]. *China Anim Health Inspection*, 2018, 35(8): 49-51.]
- [3] 齐鹤鸣, 韩深, 吕美玲, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛肉中 18 种食源性兴奋剂类药物残留[J]. *色谱*, 2018, 36(7): 621-628. [QI H M, HAN S, LV M L, et al. Simultaneous determination of 18 food-borne stimulant drug residues in beef using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(7): 621-628.]
- [4] 闫翠花, 李晓健, 田忠非. 08 奥运会禁用的兴奋剂分类及作用[J]. *中国药物滥用防治杂志*, 2010, 16(1): 25-27. [YAN C H, LI X J, TIAN Z F. 2008 Olympic Games banned doping classification and role[J]. *Chin J Drug Abuse Prev Treat*, 2010, 16(1): 25-27.]
- [5] 蒋蔡滨, 胡滢滨. 浅谈兴奋剂的滥用-以运动员为例[J]. *四川解剖学杂志*, 2022, 30(1): 155-156. [JIANG C B, HU Y B. A preliminary review of the abuse of stimulants-take athletes as an example[J]. *Sichuan J Ana*, 2022, 30(1): 155-156.]
- [6] 杨瑾, 蒋慧娟, 李波. 食品中食源性兴奋剂检测的研究进展[J]. *中国食品*, 2021(15): 55. [YANG J, JIANG H X, LI B. Re-

search progress on detection of food-borne stimulants in food[J]. *China Food*, 2021(15): 55.]

- [7] 李笑曼, 臧明伍, 王守伟, 等. 国内外食源性兴奋剂误服事件分析与法规标准现状[J]. *食品科学*, 2019, 40(21): 280-287. [LI X M, ZANG M W, WANG S W, et al. Analysis of events of ingestion of food-borne stimulants by mistake and current status of relevant regulations and standards in china and abroad[J]. *Food Sci*, 2019, 40(21): 280-287.]
- [8] 国家市场监督管理总局. BJS 202109 畜肉及内脏中肾上腺素、3,4-二羟基扁桃酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸的测定[S]. 北京: 中国肉类食品综合研究中心, 2021. [State Administration for Market Regulation. BJS 202109 Determination of Epinephrine, 3,4-dihydroxy-mandelic acid and 4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid in animal meat and viscera[S]. Beijing: China Meat Comprehensive Research Center, 2021.]
- [9] 张杉, 周瑞泽, 张文超, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测动物源性食品中肾上腺素和多巴胺残留[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(13): 151-158. [ZHANG B, ZHOU R Z, ZHANG W C, et al. Determination of epinephrine and dopamine in animal-derived food by HPLC-MS/MS[J]. *Food Res Dev*, 2021, 42(13): 151-158.]
- [10] 何亮娜, 马俊美, 范力欣, 等. 固相萃取结合超高效液相色谱-质谱法测定畜禽肉及肉制品中肾上腺素和多巴胺的残留量[J]. *肉类研究*, 2021, 35(9): 27-32. [HE L N, MA J M, FAN L X, et al. Determination of epinephrine and dopamine residues in meat and meat products by solid phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Meat Res*, 2021, 35(9): 27-32.]
- [11] 何冲, 王彬, 贾亦森, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定 β -受体激动剂残留量的研究[J]. *食品安全导刊*, 2021(31): 59-62. [HE C, WANG B, JIA Y S, et al. Determination of the β -agonist residues by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *China Food Saf Mag*, 2021(31): 59-62.]
- [12] 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所. NY/T 3147-2017 饲料中肾上腺素和异丙肾上腺素的测定液相色谱-串联质谱法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017. [Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products of Caas. NY/T 3147-2017 Determination of epinephrine and isoprenaline in feedstuff high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[S]. Beijing: China Agric Press, 2017.]
- [13] 毕月玲, 许桐, 陈利琴. 纳米纤维在线固相萃取检测尿液中 3 种儿茶酚胺和 5-羟色胺[J]. *色谱*, 2021, 39(12): 1306-1313. [BI Y L, XU T, CEHN L Q. Determination of three urinary catecholamines and serotonin by on-line packed-fiber solid-phase extraction[J]. *Chin J Chromatogr*, 2021, 39(12): 1306-1313.]
- [14] 闫亚娟. 血浆、尿液儿茶酚胺及其代谢产物 UPLC-MS/MS 检测方法的建立及其应用[D]. 青岛: 青岛大学, 2021. [YAN Y J. Establishment and application of UPLC-MS/MS for determination of catecholamines and their metabolites in human plasma and urine[D]. Qingdao: Qingdao University, 2021.]
- [15] 沈莹, 罗霞, 管青, 等. 应用液相色谱-串联质谱法系统检测糖尿病肾病和糖尿病神经病变患者尿儿茶酚胺水平[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(8): 645-651. [SHEN Y, LUO X, GUAN Q, et al. Systematic assessment of urinary catecholamines in type 2 diabetic nephropathy and neuropathy patients by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Chin J Lab Med*, 2019, 42(8): 645-651.]
- [16] 刘岩, 胡志飞, 黄带发, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测 2 型糖尿病伴胰岛素抵抗患者血浆儿茶酚胺及其代谢物含

- 量[J]. 中国临床保健杂志, 2021, 24(4): 459-464. [LIU Y, HU Z F, HUANG D F, et al. The relationship between catecholamine and its metabolites determined by UPLC-MS/MS and type 2 diabetes mellitus with insulin resistance[J]. *Chin J Clin Healthc*, 2021, 24(4): 459-464.]
- [17] 闫亚娟, 黄猛, 张丹, 等. 超高效液相色谱串联质谱法检测晨尿中儿茶酚胺及其代谢产物的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(10): 1228-1232, 1237. [YAN Y J, HUANG M, ZHANG D, et al. Determination value of catecholamines and their metabolites in morning urine by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Int J Lab Med*, 2021, 42(10): 1228-1232, 1237.]
- [18] 刘鹭, 高莹, 张俊清, 等. 甲氧基肾上腺素类物质、3-甲氧酪胺及嗜铬粒蛋白 A 在 PPGL 诊断中的作用[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2021, 41(2): 96-99. [LIU L, GAO Y, ZHANG J Q, et al. Role of metanephrines, 3-methoxytyramine and chromogranin A in the diagnosis of PPGL[J]. *Int J Endocrinol Metab*, 2021, 41(2): 96-99.]
- [19] 秦嘉倩, 彭颖斐, 陈方俊, 等. 液相色谱-串联质谱检测血浆 3-甲氧酪胺方法的建立[J]. 检验医学, 2017, 32(11): 1046-1050. [QIN J Q, PENG Y F, CEHN F J, et al. Establishment of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of plasma 3-methoxytyramine[J]. *Lab Med*, 2017, 32(11): 1046-1050.]
- [20] 李小勇. 定量检测儿茶酚胺代谢产物的液相色谱串联质谱法: 中国, 110568093A[P]. 2019-12-13. [LI X Y. Quantitative determination of catecholamine metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: China, 110568093A[P]. 2019-12-13.]
- [21] EISENHOFER G, PEITZSCH M, KADEN D, et al. Reference intervals for LC-MS/MS measurements of plasma free, urinary free and urinary acid-hydrolyzed deconjugated normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 490: 46-54.
- [22] WANG K J, GAO X J, CONG H Y, et al. Stability and reference intervals of spot urinary fractionated metanephrines and methoxytyramine by tandem mass spectrometry as a screening method for pheochromocytoma and paraganglioma[J]. *Endocrine*, 2020, 69(1): 188-195.
- [23] 中华人民共和国武汉海关研究院. SN/T 5170-2019 出口动物源肾上腺素和去甲肾上腺素的测定[S]. 北京: 中国海关出版社, 2019. [Wuhan Institute of Customs Research. SN/T 5170-2019 Determination of adrenaline and noradrenaline in animal-origin foodstuffs for export[S]. Beijing: China Customs Press, 2019.]
- [24] 中华人民共和国上海出入境检验检疫局. SN/T 2624-2010 动物源性食品中多种碱性药物残留量的检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010. [People's Republic of China Shanghai entry-exit Inspection and Quarantine Bureau. SN/T 2624-2010 Determination of basic veterinary drugs residues in foodstuffs of animal origin for import and export ahplc-MS/MS method[S]. Beijing: China Standard Press, 2010.]
- [25] 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 W T, CHEN C, et al. Determination of three catecholamines in livestock meat by solid phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Sci*, 2019, 40(24): 300-305.]
- [26] 孙利东, 许秀丽, 袁飞, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶和鸡肉中 4 种激素本底值[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 291-297. [SUN L D, XU X L, YUAN F, et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of background values of 4 hormones in milk and chicken[J]. *Food Sci*, 2017, 38(22): 291-297.]
- [27] 陶大利, 白鹤, 李琴. SPE 净化-同位素稀释质谱法测定乳与乳制品中生物素的含量[J]. 现代食品, 2018, 11(21): 103-106. [TAO D L, BAI H, LI Q. Determination of biotin in milk and dairy products by spe purification-isotope dilution mass spectrometry[J]. *Analysis and Testing*, 2018, 11(21): 103-106.]
- [28] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 793. [Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 793.]