

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.07.03

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪尿中 7 种 α_2 - 受体激动剂残留

龚波, 王峻, 董文婷, 陈向丹, 李菁菁, 金秀娥, 周平*

(湖北省兽药监察所, 武汉 430070)

[收稿日期] 2023-01-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 07-0016-09 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立了检测猪尿中 7 种 α_2 - 受体激动剂残留的超高效液相色谱 - 串联质谱分析方法。试样经调节 pH, 乙酸乙酯提取并浓缩、净化后, 经超高效液相色谱 - 串联质谱测定, 外标法定量。结果表明, 7 种 α_2 - 受体激动剂在 1 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内均呈良好线性关系, 相关系数均大于 0.99。7 种目标化合物检测限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$, 定量限为 0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。在 1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内回收率为 60% ~ 110%, 相对标准偏差小于 15%。该方法方便快捷, 定性准确, 可为猪尿中该类兽药残留的日常监控提供方便、快捷的检测方法支持。

[关键词] α_2 - 受体激动剂; 猪尿; 超高效液相色谱 - 串联质谱法; 兽药残留

Determination of Seven Kinds of α_2 - agonists Residues in Pig Urine by Ultra High - performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry

GONG Bo, WANG Jun, DONG Wen - ting, CHEN Xiang - dan, LI Jing - jing, JIN Xiu - e, ZHOU Ping*

(Hubei Institute of Veterinary Drug Control, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: ZHOU Ping, E - mail: 272365998@qq.com

Abstract: An ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometric method was developed for the quantification of seven α_2 - agonists in pig urine. After pH adjustment, the samples were extracted, concentrated and purified by ethyl acetate, then detected by ultra - high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry and quantified by external standard method. The results showed that in the range of 1 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{L}$, the standard curves for seven α_2 - agonists were in good linearity, The correlation coefficients were all greater than 0.99. The limits of detection were 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ and the quantitation limits were 0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ for the seven targets compounds. The recoveries were 60% ~ 110% and the relative standard deviations were less than 15% in the addition concentration range of 1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method is convenient, rapid and accurate, and can provide more convenient and fast detection method support for daily monitoring of the veterinary drug residues in pig urine.

作者简介: 龚波, 兽医师, 从事兽药残留分析方法研究。E - mail: 95298021@qq.com

Key words: α_2 - agonist; pig urine; ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry; veterinary drug residues

以可乐定为代表的 α_2 - 受体激动剂在现代医学中常用于高血压的治疗,在兽医上广泛用于镇静和镇痛,也能加强麻醉药的作用和减少用量^[1]。科学研究发现,该类物质可以通过作用于 α_2 - 受体,促进机体释放生长激素释放因子,调节磷酸腺苷水平,从而引起生长激素分泌增加^[2-4]。从王雷杰^[5]的动物实验中可以看出,饲喂添加可乐定的饲料能显著提高猪的瘦肉率,降低脂肪比率和背膘厚,改善猪的胴体组成。近年来,“瘦肉精”事件仍屡禁不止,时有发生,而且非法添加品种和手段不断升级,从盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等 β - 受体激动剂到可乐定等这类 α_2 - 受体激动剂。2010 年 12 月 27 日农业部 1519 号公告已明确把可乐定列为《禁止在饲料和动物饮水中使用的物质》清单。因此,制定和完善 α_2 - 受体激动剂类药物多残留检测方法迫在眉睫。经查阅文献发现,对 α_2 - 受体激动剂类药物残留检测的研究主要集中于猪组织^[6]、饲料^[7]、血浆^[8-9]、猪肉^[10-11]、猪肝^[12]、动物源食品^[13-14]等基质中的可乐定等数种 α_2 - 受体激动剂含量检测。2004 年, M. - H. Spyridak^[15]报道了气相质谱法检测马尿中的赛拉嗪的方法;国家标准 GB 31660.7 - 2019《猪组织和尿液中赛庚啶及可乐定残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》以及孙晓亮^[16]对猪尿中可乐定的残留检测进行了规定及研究。目前还未见以猪尿为基质,同时测定多种 α_2 - 受体激动剂药物的方法。本研究在不伤害猪本体的前提下取尿液样本,可快速、准确的同时测定 7 种 α_2 - 受体激动剂药物,填补检测方法空白,为实验室检测提供有效技术支持。

1 材料和方法

1.1 仪器与耗材 超高效液相色谱 - 串联质谱仪 Agilent 6470, 配电喷雾离子源 (ESI); MS3 型涡旋混合器 (德国 IKA 公司); pH 计 (上海雷磁公司,

PHS - 3E); 冷冻高速离心机, 转速 ≥ 10000 r/min (日立, CR21 N 型); 氮吹仪 (美国 Organomation 公司, N - EVAP 型); 固相萃取装置 (美国 Agilent 公司); MCX 固相萃取柱 (60 mg/3 mL, 美国 water 公司); 微孔滤头 (0.22 μ m 有机相, 美国 Agilent 公司)。

1.2 药品与试剂 赛拉嗪、盐酸可乐定、盐酸替扎尼定、溴莫尼定、胍法辛、胍那苄、盐酸安普乐定含量均 $\geq 90.0\%$, 除胍法辛、胍那苄购于 First Standard 外, 其余对照品均购于 CATO 公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯, Tedi 公司); 甲酸 (色谱纯, J. T. Baker, 88%); 氢氧化钠、乙酸乙酯、氯化钠、氨水均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 实验室用水为超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 样品的前处理 取试样 5.00 mL, 于 50 mL 塑料离心管中, 用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 10.0 ~ 11.0, 涡旋混匀, 加乙酸乙酯 10 mL, 加 1.5 ~ 2.0 g 氯化钠, 充分振荡, 于 10000 r/min 离心 5 min, 转移上清液于另一 50 mL 塑料离心管中。下层溶液中加入乙酸乙酯 10 mL 重复提取一次, 合并两次上清液, 50 $^{\circ}$ C 氮气吹干, 加 0.1% 甲酸: 甲醇溶液 (90:10) 5.0 mL 溶解残余物, 备用。

取 MCX 固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化, 把全部备用液以每秒一滴的速度过柱, 依次用水 3 mL、甲醇 3 mL 分别淋洗, 真空抽干, 5% 氨水甲醇溶液 5 mL 洗脱, 收集洗脱液, 于 50 $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹干。用 0.1% 甲酸: 甲醇溶液 (90:10) 1.0 mL 溶解残余物, 涡旋 1 min, 过 0.22 μ m 微孔滤头, 供液相色谱 - 串联质谱测定。

1.3.2 液相色谱条件 色谱柱: C_{18} 柱, 粒径 2.7 μ m, 内径 2.1 mm, 柱长 100 mm, 或相当者; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 流速 0.3 mL/min; 进样量 10 μ L; 梯度洗脱程序延迟时间: 1 min。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间/min Time	0.1% 甲酸水溶液/% 0.1% formic acid solution	甲醇/% Methanol
0.00	90	10
0.50	90	10
2.00	65	35
5.00	10	90
6.00	10	90
6.10	90	10
7.00	90	10

1.3.3 质谱参考条件 离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描;毛细管电压(Capillary Voltage):4000 V;雾化温度(Gas temp):325 °C;雾化器流速(Gas flow):10 L/min;雾化器压力(Nebulizer):40 psi;鞘气温度(Sheath gas temp):300 °C;鞘气流速(Sheath gas flow):11 L/min;监测模式:多反应监测(MRM 采集模式)7种 α_2 -受体激动剂的MRM参数见表2。

表 2 7种 α_2 -受体激动剂MRM参数Tab 2 MRM parameters of seven α_2 -agonists

化合物名称 Compound name	定性离子对(m/z) Qualitative ion pair	定量离子对(m/z) Quantification ion pair	锥孔电压/V Cone	碰撞能量/eV Collision
可乐定	230.0 > 160.0	230.0 > 213.0	125	40
	230.0 > 213.0		125	30
溴莫尼定	292.0 > 170.1	292.0 > 212.1	125	40
	292.0 > 212.1		125	33
替扎尼定	254.0 > 210.0	254.0 > 44.1	130	35
	254.0 > 44.1		130	35
胍法新	246.0 > 158.9	246.0 > 60.1	95	37
	246.0 > 60.1		95	17
胍那苳	231.0 > 136.0	231.0 > 172.0	125	30
	231.0 > 172.0		125	25
安普乐定	245.0 > 209.0	245.0 > 174.0	135	25
	245.0 > 174.0		135	33
赛拉嗉	221.0 > 163.9	221.0 > 90.0	135	30
	221.0 > 90.0		135	25

1.3.4 标准溶液的配制 标准储备液:分别精密称取可乐定、溴莫尼定、替扎尼定、胍法辛、胍那苳、安普乐定、赛拉嗉7种对照品,用甲醇分别配制成为1 mg/mL标准储备液,于2~8 °C以下温度保存,有效期6个月。

混合标准中间液:分别准确量取1.00 mL可乐定、溴莫尼定、替扎尼定、胍法辛、胍那苳、安普乐定、赛拉嗉标准储备液(1.3.1项)置于100 mL量瓶中,用甲醇配制成浓度为10 μ g/mL的混合标准中间液,于2~8 °C以下温度保存,有效期1个月。

基质匹配标准曲线的构建:取空白样品按1.3.1项处理后作为基质空白溶液。准确移取适量混合标准中间液,用基质空白溶液配制成

1、5、10、20、50、80 ng/mL基质匹配标准工作液,供超高效液相色谱-串联质谱测定,现用现配。

1.4 基质效应测定 按照1.3.4项方法配制基质匹配标准曲线,同时准确移取适量的混合标准中间液,用0.1%甲酸:甲醇溶液(90:10)配制成同样浓度的溶剂标准曲线,分别上机测试。基质效应计算公式为:基质效应(ME)=(基质匹配标准曲线斜率/溶剂配制标准曲线斜率-1)×100%。

2 结果与分析

2.1 标准曲线 用超高效液相色谱-串联质谱测定基质匹配系列标准工作液,7种 α_2 -受体激动剂在1~80 μ g/L浓度范围内均呈良好线性关系,线性方程及相关系数如表3所示。

表 3 基质匹配标准曲线方程

药物 Drug	线性方程 Standard curve equation	相关系数 Correlation coefficient
安普乐定	$y = 2346.645x + 361.474$	0.9995
溴莫尼定	$y = 2518.364x + 2977.609$	0.9984
替扎尼定	$y = 8242.663x + 2809.925$	0.9996
可乐定	$y = 882.281x - 87.848$	0.9999
赛拉嗪	$y = 15183.508x - 2784.777$	0.9999
胍法辛	$y = 3862.818x - 113.749$	0.9989
胍那苳	$y = 5891.472x + 943.598$	0.9999

2.2 准确度与精密度 为考察方法的准确度和精密度,进行了添加回收试验。按照上述处理和测定

方法,选取了猪尿液空白样品,各添加 3 个不同浓度(即 0.3、0.6、3 $\mu\text{g/L}$),每个水平设 3 个平行,重复试验 3 批。求每个样品的回收率和批内,批间相对标准偏差。其中猪尿空白样品添加回收试验测定结果见表 4。该实验表明,动物尿液中 7 种 α_2 -受体激动剂平均回收率为 60% ~ 110%,精密度小于 15%,说明该方法具有较好的准确度和精密度。图 1、图 2 为空白猪尿及添加回收率质谱图。

2.3 检测限和定量限 猪尿液中 7 种 α_2 -受体激动剂检测限为 0.1 $\mu\text{g/L}$,信噪比 S/N(Peak to Peak) > 3;方法定量限为 0.3 $\mu\text{g/L}$,信噪比 S/N(Peak to Peak) > 10。

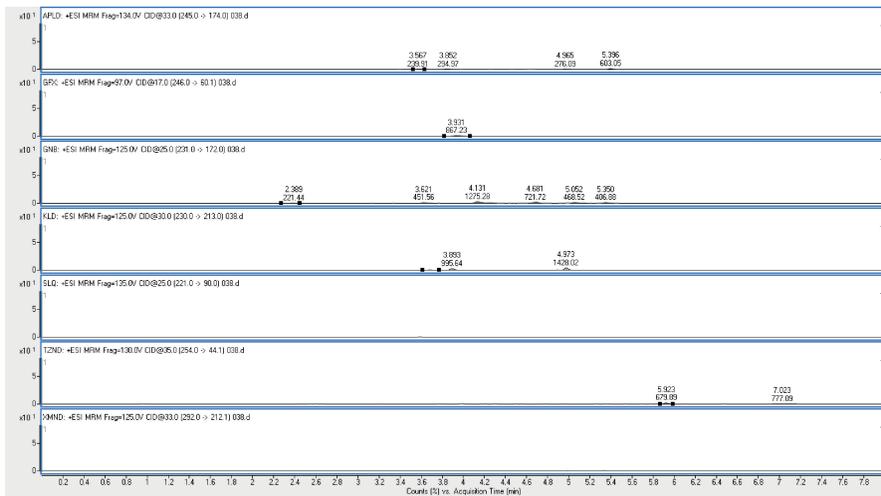


图 1 空白猪尿样品的特征离子质谱图

Fig 1. Characteristic ion mass chromatogram of blank pig urine

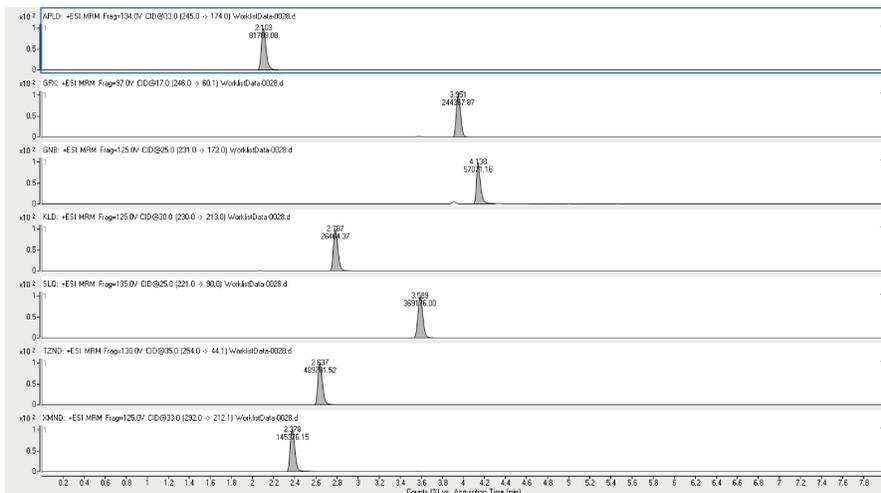


图 2 猪尿中七种 α_2 -受体激动剂添加回收试验的特征离子质谱图 (3 $\mu\text{g/L}$)

(图中依次为安普乐定、胍法辛、胍那苳、可乐定、赛拉嗪、替扎尼定、溴莫尼定)

Fig 2. Characteristic ion mass chromatogram of seven α_2 -agonists added in blank pig urine (3 $\mu\text{g/L}$)

The order in the diagram is Apraclonidine, Guanfacine, Guanabenz, Clonidine, Xylazine, Tizanidine, Brimonidine)

表 4 猪尿中添加药物的回收率和精密度测定结果

Tab 4 Recovery rate and precision of the drugs added in pig urine

药物名称 Drug	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Additive concentration	批次 Batch	回收率/% Recovery rate			平均回收率/% Average recovery rate	批内 RSD/% Intra assay	批间 RSD/% Inter assay
可乐定	0.3	1	93.17	86.22	89.32	89.57	3.89	3.7
		2	86.2	89.78	90.4	88.79	2.55	
		3	95.56	89.09	94.52	93.06	3.73	
	0.6	1	91.07	85.23	88.65	88.32	3.32	4.4
		2	95.97	97.26	94.42	95.88	1.48	
		3	90.29	95.91	89.44	91.88	3.83	
	3	1	89.37	86.11	91.25	88.91	2.93	4.5
		2	92.89	95.61	89.65	92.72	3.22	
		3	99.06	94.87	97.47	97.13	2.18	
溴莫尼定	0.3	1	75.69	84.31	85.29	81.76	6.46	4.4
		2	80.59	83.47	78.22	80.76	3.26	
		3	76.57	80.06	84.27	80.30	4.80	
	0.6	1	84.3	89.67	88.17	87.38	3.17	6.3
		2	78.26	73.59	83.94	78.60	6.59	
		3	88.47	82.05	86.48	85.67	3.84	
	3	1	90.28	92.47	88.33	90.36	2.29	3.2
		2	84.69	85.61	87.18	85.83	1.47	
		3	85.26	83.99	86.27	85.17	1.34	
替扎尼定	0.3	1	87.29	81.09	81.66	83.35	4.11	4.5
		2	80.53	82.07	84.33	82.31	2.32	
		3	89.28	81.34	90.09	86.90	5.56	
	0.6	1	85.41	80.55	82.37	82.78	2.97	5.5
		2	90.53	88.37	92.89	90.60	2.50	
		3	92.11	81.23	84.07	85.80	6.58	
	3	1	79.69	82.33	81.52	81.18	1.67	5.3
		2	90.46	84.04	82.71	85.74	4.83	
		3	87.39	89.31	92.77	89.82	3.04	
胍法辛	0.3	1	85.39	80.52	83.49	83.13	2.95	3.7
		2	87.92	90.13	83.53	87.19	3.85	
		3	85.34	88.69	89.17	87.73	2.38	
	0.6	1	80.22	86.41	84.35	83.66	3.77	4.6
		2	76.19	77.63	82.26	78.69	4.03	
		3	85.34	86.42	81.03	84.26	3.38	
	3	1	89.15	92.39	95.59	92.38	3.49	5.9
		2	83.52	80.46	81.66	81.88	1.88	
		3	86.6	87.49	82.73	85.61	2.96	
胍那苄	0.3	1	72.16	77.39	75.46	75.00	3.53	3.8
		2	80.24	78.6	76.42	78.42	2.44	
		3	78.59	82.45	79.22	80.09	2.59	
	0.6	1	80.22	86.41	84.35	83.66	3.77	8.8
		2	75.19	72.63	70.26	72.69	3.39	
		3	88.34	86.42	89.03	87.93	1.54	
	3	1	86.24	85.27	85.59	85.70	0.58	3.0
		2	79.59	83.45	80.07	81.04	2.60	
		3	83.41	82.62	86.39	84.14	2.36	

续表

药物名称 Drug	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Additive concentration	批次 Batch	回收率/% Recovery rate			平均回收率/% Average recovery rate	批内 RSD/% Intra assay	批间 RSD/% Inter assay
安普乐定	0.3	1	65.24	60.27	66.49	64.00	5.14	5.2
		2	62.17	68.33	59.81	63.44	6.93	
		3	68.75	67.24	64.62	66.87	3.13	
	0.6	1	61.01	65.28	59.64	61.98	4.75	6.6
		2	65.95	67.27	64.43	65.88	2.16	
		3	61.29	65.91	74.14	67.11	9.70	
	3	1	77.17	75.39	80.55	77.70	3.37	11.2
		2	65.35	60.74	61.69	62.59	3.89	
		3	61.64	67.4	62.73	63.92	4.79	
赛拉嗉	0.3	1	74.24	70.53	77.49	74.09	4.70	4.5
		2	73.17	79.33	69.57	74.02	6.67	
		3	78.05	76.64	74.23	76.31	2.53	
	0.6	1	81.07	85.28	82.64	83.00	2.56	7.2
		2	70.91	79.24	74.18	74.78	5.61	
		3	71.27	75.91	70.14	72.44	4.22	
	3	1	79.52	82.39	85.58	82.50	3.67	6.2
		2	75.35	70.44	71.71	72.50	3.52	
		3	76.64	77.26	78.94	77.61	1.53	

2.4 基质效应的研究 对基质效应进行了研究,结果见表5。一般认为 $|\text{ME}| < 20\%$ 为弱基质效应, $20\% \leq |\text{ME}| \leq 50\%$ 为中等程度基质效应, $|\text{ME}| > 50\%$ 强基质效应。结果表明,部分待测物存在中等程度基质抑制效应,为降低基质效应对定量结果所的影响,采用基质匹配标准曲线外标法进行定量分析。

2.5 缓冲液 pH 值的研究 本实验选择在碱性条件下进行样品提取,分别用 5 M 氢氧化钠溶液调节样品 pH 至 8.0,9.0,10.0,11.0,11.5,12 来进行比较,结果见表6。

表5 7种 α_2 -受体激动剂的基质效应

化合物 compound	基质效应/% ME/%
安普乐定	-32.3
溴莫尼定	-41.6
替扎尼定	-39.5
可乐定	-15.6
赛拉嗉	-13.4
胍法辛	-13.4
胍那苳	-16.5

表6 不同 pH 值对添加回收率的影响

药物名称 Drug	pH 8.0	pH 9.0	pH 10.0	pH 11.0	pH 11.5	pH 12.0
安普乐定	/	45.3	69.8	61.8	55	67.6
溴莫尼定	/	67.1	70.9	82.7	68	67.2
替扎尼定	89.8	61.2	83.2	84.8	95.6	72.7
可乐定	97.2	66.2	88.3	95.5	97.8	76.5
赛拉嗉	85.7	58	69.1	68.8	70.4	62.0
胍法辛	79.6	52.2	80.7	79.6	94.8	71.1
胍那苳	64.6	35.5	71.3	70.1	125.2	150

由表 6 可以看出,当样品 pH 为 8.0 时,安普乐定、溴莫尼定峰形杂乱,无法定性、定量;当 pH 为 9.0 时,多种待测物添加回收效果不理想;当 pH 为 11.5、12 时,胍那苄出现不同程度的基质增强作用,导致添加回收率超过 120%;而当 pH 范围为 10.0、11.0 时,样品峰形、回收率等都能达到理想效果。

3 讨论与结论

3.1 色谱条件的确定 色谱柱的选择:考察了常见的色谱柱 ZORBAX SB - C18 和 Poroshell120 SB - C18 对色谱峰进行分离,比较分离度、响应值以及峰形。通过比较发现,利用 ZORBAX SB - C18 可以获得较好的分离度,但是部分目标物会产生拖尾的色谱峰。Poroshell120 SB - C18 均可以使 7 种待测物在 5 分钟内快速出峰,由于该色谱柱的填料孔径为 2.7 μm ,所以峰形也会比较窄,不会产生拖尾峰或者宽峰。考虑到方法的广泛适用性,最终推荐 C18 柱 (2.1 \times 100 mm, 2.7 μm),或相当者。

流动相的选择: α_2 - 受体激动剂具有一定碱性特征,在酸性流动相体系中易产生稳定的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子,因此考虑常用的 0.1% 甲酸水作为流动相水相。为了避免溶剂效应,流动相有机相初始比例和样品复溶液有机相比例保持一致,选用 0.1% 甲酸水 - 甲醇的流动相体系,同时采用流动相梯度变化保证目标物有效分离。

3.2 质谱条件的优化 七种 α_2 - 受体激动剂均含有胺类结构,且极性较强,实验中选择正离子 (ESI⁺) 模式。配制 100 ng/mL 的标准溶液,采用不经过色谱柱直接连接质谱的方式,在全扫描中找出每个化合物的母离子,利用 MRM 采集模式优化子离子、碰撞电压、碰撞能量等参数。

3.3 样品前处理方法的优化

3.3.1 缓冲液 pH 值的优化 由于 α_2 - 受体激动剂具有一定碱的特性,在水环境中存在一定的电离现象,从而导致了有机试剂提取不完全。为了有效抑制其离子化的现象,本实验的缓冲液适合选择碱性环境。随机选取 20 份猪尿液样品,测得其 pH 范围为 5.6 ~ 8.1,若直接加入一定量的碱性溶液^[10-13],并不能保证样品提取溶液 pH 的稳定性,

故本实验采用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 10.0 ~ 11.0 的方式保持提取的碱性环境。

3.3.2 提取试剂的选择 对样品中 α_2 - 受体激动剂的提取液进行了摸索,采用了常用的乙酸乙酯、乙腈提取溶剂。通过比较,乙腈提取效率不如乙酸乙酯提取,并且当用乙腈提取时,胍法辛基质干扰明显,故选用乙酸乙酯作为提取试剂。

3.3.3 样品净化过程优化 α_2 - 受体激动剂属于碱性药物,故考虑对碱性药物具有高选择性的混合型阳离子小柱进行固相萃取净化。因样品经乙酸乙酯提取、氮气吹干复溶、高速离心后即可得到较为清亮的液体,我们选择了 3 种方法进行比较,一为样品经提取操作后不经过小柱净化直接离心取上清液上机,二为参考李艳明^[11]李丹妮^[6]分别采用 PRIME HLB、QuEChERS 净化后上机,三为样品经提取后用混合型阳离子小柱净化后上机。实验显示,方法二样品经净化后采集到的质谱图与方法三相当,但部分上机液体呈现淡黄色,不如方法三净化后透亮澄清,且 PRIME HLB、QuEChERS 成品价格较高,若采用填料自己填充又比较麻烦延长实验操作时间。而方法一采集到质谱图杂质干扰较大,长期操作会对液质联用仪造成污染及损害。从净化效果、经济实用等多方面考虑,此步骤选择用常用的混合型阳离子小柱净化。

3.3.4 样品复溶液的选择 考虑复溶液与流动相的一致性,分别比较了乙腈:0.1% 甲酸水溶液 = 20:80, 甲醇:0.1% 甲酸水溶液 = 20:80, 乙腈:0.1% 甲酸水溶液 = 10:90, 甲醇:0.1% 甲酸水溶液 = 10:90, 甲醇:0.1% 甲酸水溶液 = 5:95 等 5 种溶剂作为最终进样前的样品复溶液。发现当复溶液为乙腈:0.1% 甲酸水溶液 = 20:80 时,安普乐定和溴莫尼定峰型较差,不符合定性定量要求,同时当有机相为乙腈时,液质响应普遍没有甲醇作为有机相时高。而当有机相为甲醇时,过高的甲醇浓度反而会抑制待测物的响应。当甲醇比例为 5%、10% 时,均能得到较为满意的液质图谱,因甲醇比例为 10% 时的待测物响应略高于 5% 甲醇,故最终确定样品复溶液为甲醇:0.1% 甲酸水溶液 =

10:90。

本研究建立了一种适用于猪尿液中 α_2 - 受体激动剂类药物的超高效液相色谱串联质谱的检测技术。该方法在碱性环境中用乙酸乙酯提取,混合型阳离子柱净化,结合基质匹配标准曲线定量,无需采用内标校正^[9],具有提取效率高,灵敏度高,检测成本低的特点,满足了检测要求,弥补了暂无猪尿中多种 α_2 - 受体激动剂类药物检测方法的行业空白。

参考文献:

- [1] Mika Scheinin, Ewen Macdonald, 梁德勇. α_2 - 肾上腺素受体在中枢神经系统的药理学[J]. 动物医学进展, 1990, 10(2): 44 - 48.
- Mika Scheinin, Ewen Macdonald, Liang D Y. Pharmacology of α_2 - adrenergic receptors in the central nervous system[J]. Progress in Veterinary Medicine, 1990, 10(2): 44 - 48
- [2] 赵颖, 郑秀丽, 邵慧, 等. α_2 - 肾上腺素能受体激动剂的研究进展[J]. 国外医学眼科学分册, 1997, 21(6): 326 - 330.
- Zhao Y, Zhen X L, Shao H, et al. Development of α_2 - adrenergic receptor agonists [J]. Foreign Medical Sciences Section of Ophthalmology, 1997, 21(6): 326 - 330.
- [3] 姜礼胜, 陈杰, 陈伟华. 肾上腺素能 α_2 受体对二花脸猪生长激素分泌的作用[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(6): 624 - 625.
- Jiang L S, Chen J, Chen W H. The Role of Adrenergic α_2 - Receptor on GH Secretion of ErHua Pigs [J]. Chin J Vet Sci, 2003, 23(6): 624 - 625.
- [4] 冯杰, 余游峰. 可乐定 (Clonidine) 对动物生长激素分泌的影响[J]. 饲料研究, 2000, 9(10): 24 - 25.
- Feng J, Yu Y F. Effect of Clonidine on Growth Hormone Secretion in Animals [J]. Feed Research, 2000, 9(10): 24 - 25.
- [5] 王雷杰, 占秀安, 许梓荣, 等. 可乐定对生长猪胴体组成的影响及其作用机理探讨[J]. 浙江大学学报, 2005, 31(5): 654 - 658.
- Wang L J, Zhan X - an, Xu Z R, et al. Effect of Clonidine on Carcass Composition of Growing Pigs and Approach to The Mechanism of The Effect [J]. Journal of Zhejiang University, 2005, 31(5): 654 - 658.
- [6] 李丹妮, 严凤, 周悦榕, 等. QuEChERS - 超高效液相色谱法 - 串联质谱法同时检测猪组织中赛庚啶及可乐定残留量[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(2): 29 - 34.
- Li D N, Yan F, Zhou Y R, et al. Simultaneous Determination of

Cyproheptadine and Clonidine in Pig Issues by QuEChERS and Ultra Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(2): 29 - 34.

- [7] 李丹妮, 张文刚, 严凤, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测饲料中盐酸可乐定和盐酸赛庚啶 [J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(10): 20 - 24.
- Li D N, Zhang W G, Yan F, et al. Determination of Clonidine Hydrochloride And Cyproheptadine Hydrochloride in Animal Feeds by Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(10): 20 - 24.
- [8] Weng Naidong, Haizhi Bu, Yu - Luan Chen, et al. Simultaneous development of six LC - MS - MS methods for the determination of multiple analytes in human plasma [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 28(6): 1115 - 1126.
- [9] Veigure R, Aro R, Metsvaht T, et al. A highly sensitive method for the simultaneous UHPLC - MS/MS analysis of clonidine, morphine, midazolam and their metabolites in blood plasma using HFIP as the eluent additive [J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1052: 150 - 157.
- [10] 李丹妮, 严凤, 黄成龙, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肉中 5 种 α_2 受体激动剂残留量方法的研究 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(1): 23 - 27.
- Li D N, Yan F, Huang C L, et al. Determination of Five α_2 - agonists in Pork by Ultra performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(1): 23 - 27.
- [11] 李艳明, 王坤, 朱富强, 等. 通过式固相萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肉中多种受体激动剂药物残留 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 264 - 271.
- Li Y M, Wang K, Zhu F Q, et al. Determination of Multiple Receptor Agonist Drug Residues in Pork by Pass - type SPE and Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 264 - 271.
- [12] 陈大鹏, 王雪蓉, 杨丽, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肝中 5 种 α_2 受体激动剂 [J]. 山东化工, 2021, 50(12): 100 - 102.
- Chen D P, Wang X R, Yang L, et al. Determination of Five Kinds of α_2 - Agonists in Pork Liver by High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry [J]. Shandong Chemical Industry, 2021, 50(12): 100 - 102.

- [13] 朱富强,丁卫平,韩岩君,等. 脂质去除分散固相萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定动物源性食品中 5 种 α_2 - 受体激动剂[J]. 应用化学,2021. 38(6):713 - 721.
Zhu F Q, Ding W P, Han Y J, *et al.* Determination of Five Alpha - agonists in Animal Derived Food by Ultra - performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Using an Enhanced Matrix Removal - lipid Sorbent for Clean - up [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry,2021. 38(6):713 - 721
- [14] 范塞,张楠,李丽萍,等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测动物性食品中 α_2 - 受体激动剂残留[J]. 卫生研究,2020,49(4):591 - 602.
Fan S,Zhang N,Li L P,*et al.* Determination of α_2 - agonists in animal food by ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Journal of Hygiene Research, 2020,49(4):591 - 602.
- [15] Spyridaki M H, Lyris E, Ceorcolakis I, *et al.* Determination of xylazine and its metabolites by GC - MS in equine urine for doping analysis [J]. Pharm Biomed Anal, 2004, 35 (1): 107 - 116.
- [16] 孙晓亮,李雪莲,曹旭敏,等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法快速测定猪尿液中 30 种不同种类“瘦肉精”药物残留[J]. 分析化学,2017(1):124 - 132.
Sun X L,Li X L,Cao X M,*et al.* An Ultra - high Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometric Method for Fast Determination of 30 Different Species of Lean Meat Agents Residues in Pig Urine [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,2017(1):124 - 132.

(编辑:侯向辉)