

QuEChERS 技术结合高效液相色谱-串联质谱法 快速测定动物源性食品中克伦特罗的残留量

张鑫^{1,2}, 刘文竹^{1,2}, 康优³, 王月娇⁴, 李滢倩¹, 石金娥¹, 刘斌^{1*}

(1. 吉林省食品检验所, 长春 130103; 2. 吉林省安信食品技术服务有限责任公司, 长春 130033;
3. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 4. 吉林省药品检验所, 长春 130033)

摘要: **目的** 建立一种高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)快速检测动物源性食品中克伦特罗残留量。**方法** 样品经 β -葡萄糖醛苷酶酶解, 乙腈提取, 经过 ProElut QuEChERS 净化管净化。采用 0.1%甲酸(A)和乙腈(B)作为流动相进行梯度洗脱, 用多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)对克伦特罗含量进行检测。**结果** 该方法可以在 15 min 内完成目标物的分离分析。克伦特罗在 0.5、1、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平的回收率为 90.0%~94.3%, 相对标准偏差小于 10%($n=6$), 方法检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适用于动物源性食品中克伦特罗的残留量的测定。

关键词: 克伦特罗; 高效液相色谱-串联质谱法; ProElut QuEChERS

Rapid determination of clenbuterol residues in animal-derived foods by QuEChERS technique with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Xin^{1,2}, LIU Wen-Zhu^{1,2}, KANG You³, WANG Yue-Jiao⁴, LI Ying-Qian¹, SHI Jin-E¹, LIU Bin^{1*}

(1. Jilin Institute for Food Control, Changchun 130103, China; 2. Jilin Anxin Food Technology Services Limited Company, Changchun 130033, China; 3. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China;
4. Jilin Institute for Drug Control, Changchun 130033, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of clenbuterol residues in animal-derived foods by QuEChERS technique with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The sample was digested with β -glucuronide, extracted with acetonitrile, and purified by a ProElut QuEChERS purification tube. Gradient elution was carried out using 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) as mobile phases, and clenbuterol content was detected by multiple reaction monitoring (MRM). **Results** The sample could be separated and analyzed within 15 min. The recoveries of clenbuterol at 0.5, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were 90.0%-94.3%, and the relative standard deviations were less than 10% ($n=6$). The detection limit of the method was 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The method is rapid, accurate and sensitive, which is suitable for the determination of clenbuterol residues in animal-derived foods.

KEY WORDS: clenbuterol; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ProElut QuEChERS

*通讯作者: 刘斌, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: liubin130000@163.com

*Corresponding author: LIU Bin, Senior Engineer, Jilin Institute for Food Control, Changchun 130103, China. E-mail: liubin130000@163.com

1 引言

盐酸克伦特罗又称“瘦肉精”，是一种平喘药，为白色结晶状粉末，味略苦^[1]。瘦肉精是一类药物的统称，主要包括肾上腺类、 β 激动剂、 β -兴奋剂(β -agonist)，可以用于治疗支气管哮喘、慢性支气管炎和肺气肿等疾病^[2]。该类物质有助于提高胴体的瘦肉率、饲料转化率、快速提高体重、帮助脂肪分解，且合成蛋白质的效率很高，所以以前经常被用作猪、牛、羊等畜禽的生长剂^[3-5]。但是大量研究证明动物性食品中残留的克伦特罗对人类身体的健康有较大危害，过量食用后可能会出现肌肉震颤、心慌、战栗、头疼、恶心、呕吐等症状，特别是对高血压、心脏病、甲亢和前列腺肥大等疾病患者危害更大，也会增加患癌症的几率^[6-11]，严重的可导致死亡。

中国农业部于 1997 年发文禁止瘦肉精在饲料和畜牧生产中使用，商务部自 2009 年 12 月 9 日起，禁止进出口克伦特罗和盐酸克伦特罗^[12]。现在对瘦肉精的检测方法有液相色谱-串联质谱法^[13-15]和酶联免疫法。酶联免疫法是一种快速筛查的方法，可以批量检测，但是其检出限和定量限较高。液相色谱-串联质谱法快速、灵敏和流转所需的最少样品准备，高灵敏度并结合可分析多个化合物能力，高精密度，高分辨率鉴定和量化目标分析物^[16,17]。

GB/T 22286-2008^[18]和农业部 1025 号公告-18-2008^[19]中，克伦特罗的标准检测方法均为液相色谱-串联质谱法，但是该方法样品前处理过程十分繁琐、耗时长、经济成本高。本研究建立了 QuEChERS 技术结合高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定动物源性食品中克伦特罗残留量的方法，以期节省检测时间，降低检测成本。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

QTRAP 5500 液相色谱-质谱联用仪(美国 AB SCIEX 公司); KQ-300VDE 双频数控超声波(昆山市超声波仪器有限公司); KS501 调速多用振荡器(德国艾卡公司); Allegra 64R 冷冻离心机(德国贝克曼库尔特公司); Microfuge 20 高速台式离心机(美国贝克曼公司); DHPO 30 恒温培养箱(上海实验仪器厂有限公司); ProElutQuEChERS 净化管、0.22 μ m 微孔滤膜、Quintix2102-1CN 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); AUW120D EXP 电子天平(日本岛津公司); FE20 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

克伦特罗(99.00%，德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司); 盐酸克伦特罗-D9(99.80%，美国 CERILLIANT 公司); β -葡萄糖醛苷酶(99.00%，德国默克公司); 氯化钠、乙酸(优级

纯)、乙酸钠、乙酸铅(分析纯，国药集团试剂有限公司); 甲酸(色谱纯，以色列 ACS 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯，TEDIA 公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

克伦特罗-D9 溶液配制：精密称取克伦特罗-D9 标准品 10 mg，加甲醇溶液定容至 100 mL，制成 100 mg/L 溶液，取上述溶液 1.0 mL，用甲醇溶液定容至 100 mL，制成浓度为 1 μ g/mL 的克伦特罗-D9 溶液。

克伦特罗标准溶液配制：精密称取克伦特罗标准品 10 mg 置 100 mL 容量瓶中，加甲醇溶液定容至 100 mL，制成 100 mg/L 标准储备液，分别吸取克伦特罗标准储备液 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 mL，并加入 50 μ L 1 μ g/mL 克伦特罗-D9 内标溶液及 50 μ L 乙腈:水(70:30, V:V)溶液，用甲醇定容至 10 mL，制成浓度分别为 1、3、5、8、10 ng/mL 克伦特罗标准溶液，其中克伦特罗-D9 的浓度为 5 ng/mL。

0.2 mol/L 乙酸钠溶液：称取 13.6 g 乙酸钠，溶解于 500 mL 水中，用适量乙酸调节 pH 至 5.2。

乙酸铅溶液：称取 200 g 乙酸铅，溶解于 1000 mL 水中。

0.1%甲酸水溶液：用移液管移取 1.0 mL 甲酸，溶解于 1000 mL 水中。

2.2.2 样品的前处理

(1) 提取

取 5.0 g 样品与 0.2 mol/L 乙酸钠溶液 3 mL，搅匀后加入适量内标克伦特罗-D9，使样品中含克伦特罗-D9 浓度为 5 μ g/kg，加 50 μ L β -葡萄糖醛苷酶，涡旋混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴酶解 12 h，加 5.0 g 氯化钠，2 mL 乙酸铅溶液(200 g/L)，乙腈 5 mL，涡旋混匀，振荡 5 min，6000 r/min 离心 2 min，取 1 mL 上清液待净化。

(2) 净化

将 1 mL 提取液转移至 2 mL ProElut QuEChERS 净化管中，加入 100 μ L 甲酸，涡旋混合 30 s，10000 r/min 下离心 1 min，取上清液 550 μ L 于浓缩管中，室温下氮吹至剩余约 50 μ L 溶液，加水定容至 500 μ L，混匀后过 0.22 μ m 微孔滤膜，进 HPLC-MS/MS 分析。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μ m)，流动相：0.1%甲酸(A)-乙腈(B)，流速：0.2 mL/min，进样体积：5 μ L，柱温：30 $^{\circ}$ C。液相色谱梯度洗脱程序：0~2.0 min，10%B；2.0~10.0 min，10%B~80%B；10.0~11.0 min，80%B~10%B；11.0~15.0 min，10%B。

(2) 质谱条件

离子源：电喷雾电离 ESI(+)，电喷雾电压 5500 V，雾化气压力 50 psi，辅助气压力 50 psi，气帘气压力 20 psi，

离子源温度 500 °C, 扫描模式: 多反应监测模式。

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化

分别将克伦特罗及内标的标准溶液配制成 200 µg/L 浓度的标准溶液, 不接色谱柱, 使用两通连接液相色谱与质谱, 首先在正离子模式下进行全扫描, 确定化合物的分子离子, 将分子离子作为母离子, 给予一定的碰撞能量和碰撞气体, 全扫描二级离子, 选取丰度较强、干扰较小的 2 个子离子分别作为定性及定量离子, 并优化母离子电压和碰撞电压, 克伦特罗及内标质谱参数优化结果见表 1。

3.2 方法线性范围及检出限

将标准使用液稀释成 1、3、5、8、10 ng/mL 的标准工作液, 经 0.22 µm 滤膜过滤, 用液相色谱-串联质谱分析, 以标准溶液浓度(X)为横坐标, 标准溶液峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程为 $Y=1.504X-0.037$, 相关系数 $r=0.9992$, 线性关系良好。

取空白样品按照分析方法进行测定, 将空白样品色谱图中克伦特罗保留时间的基线噪音与标准工作溶液的响应信号进行比较, 以 3 倍信噪比($S/N=3$)所对应的样品中的克伦特罗浓度为检出限进行计算, 该方法的检出限为 0.5 µg/kg。

3.3 回收率及精密度实验

选取猪肉为样品, 在空白样中分别添加检出限的 1 倍、3 倍、10 倍浓度的标准溶液, 即 0.5、1.5、5 µg/kg 标

准溶液, 按 2.2.2 的前处理条件进行加标回收实验, 每个浓度水平进行 6 次平行测定, 以考察方法回收率和精密度, 用内标法进行计算。结果如表 2 所示, 克伦特罗的平均回收率为 90.0%~94.3%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 10%, 方法回收率和精密度符合相关规定的要求^[20]。

表 2 添加回收率和精密度的实验结果($n=6$)
Table 2 Experimental results of adding recovery and precision ($n=6$)

添加浓度/(µg/kg)	回收率/%	RSD/%
0.5	90.0	8.2
1.5	91.8	6.1
5	94.3	4.3

3.4 实际样品测定

用本方法对市场上销售的 10 份猪肉样品、10 份猪内脏、10 份牛肉、10 份牛内脏进行检测, 没有发现阳性样品。

4 结论

通过对样品前处理的简化和检测方法的优化, 建立了动物源性食品中克伦特罗残留检测的高效液相色谱-串联质谱方法。该方法不同于以往的前处理方法繁琐、复杂、耗时长, 整个方法的前处理时间简短, 操作简单, 同时能达到较低的方法检出限和高效、稳定的回收率要求, 该方法适用于各种禽畜类产品的残留检测。

表 1 克伦特罗药物质谱参数
Table 1 MS parameters of clenbuterol residues

编号	化合物	前体离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/ms	去簇电压/eV	碰撞电压/eV	碰撞室射出电压/eV
1	克伦特罗(clenbuterol)	277	203*	200	52.090	23.660	16.780
		277	259	200	54.870	15.750	23.540
2	克伦特罗-D9	286	204.1*	200	59.670	24.000	17.940

注: *为定量离子。

参考文献

[1] 李树民, 范元成, 王革生. 食物中毒事故应急处理和预防控制[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2006.
Li SM, Fan YC, Wang GS. Emergency treatment and prevention and control of food poisoning accidents [M]. Changsha: Hunan Science & Technology Press, 2006.

[2] 李云川, 许云生. 饲料及饲料添加剂使用问答[M]. 昆明: 云南人民出版社, 2008.
Li YC, Xu YC. Questions and answers on the use of feed and feed

additives [M]. Kunming: Yunnan People's Publishing House, 2008.

[3] 刘佳, 梁桂荣, 谢云峰, 等. 液相色谱-串联质谱法检测猪尿中 26 种 β_2 -受体激动剂类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, (9): 2757-2764.
Liu J, Liang GR, Xie YF, et al. Simultaneous determination of 26 β_2 -agonist residues in swine urine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2014, (9): 2757-2764.

[4] 张秋兰. 动物源性食品中残留的瘦肉精与血清白蛋白相互作用规律[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.

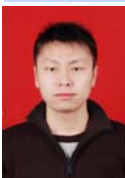
- Zhang QL. Analysis of the interaction of β -agonists steroids residues in food stuff of animal origin with serum albumin [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011.
- [5] 邹本草, 刘焕奇, 邹明. 盐酸克伦特罗对小鼠心肌 ATP 酶和抗氧化能力的影响[J]. 中国农学通报, 2009, 25(7): 33–35.
- Zou BG, Liu HQ, Zou M. Effects of clenbuterol on levels of ATP and antioxidant capacity of myocardium in mice [J]. Chin Agric Sci Bull, 2009, 25(7): 33–35.
- [6] 毕言锋. 基于高分辨质谱技术的 β -受体激动剂在猪体内的代谢研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- Bi YF. Study on the metabolism of β -agonists in swine using high resolution mass spectrometry [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [7] 刘敏, 刘戎, 王立琦, 等. 猪肝中 β -受体激动剂多残留的样品前处理方法比较及同时检测[J]. 分析测试学报, 2012, 31(3): 290–295.
- Liu M, Liu R, Wang LQ, *et al.* Comparison of pretreatment methods of β -agonists residues in pig liver and their simultaneous determination [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(3): 290–295.
- [8] 李阳, 苏晓鸥, 王瑞国, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定绵羊唾液中 14 种 β -受体激动剂[J]. 分析化学, 2013, 41(6): 899–904.
- Li Y, Su XO, Wang RG, *et al.* Simultaneous determination of 14 kinds of β -agonist residues in sheep saliva by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(6): 899–904.
- [9] Smith DJ. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock [J]. J Anim Sci, 1998, 6(1): 173–194.
- [10] 贾涛, 魏秀莲, 王有月. 酶联免疫法检测饲料中莱克多巴胺[J]. 饲料研究, 2008, (4): 39–42.
- Jia T, Wei XL, Wang YY. Determination of ractopamine in the feed by enzyme-linked immunoassay assay [J]. Feed Res, 2008, (4): 39–42.
- [11] 王建平, 沈建忠. 猪肝和饲料中沙丁胺醇和克伦特罗残留的酶联免疫吸附检测法研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 397–401.
- Wang JP, Shen JZ. Detection of salbutamol and clenbuterol in swine liver and swine urine by enzyme linked immunosorbent assays [J]. Acta Vet Zootech Sin, 2005, 36 (4): 397–401
- [12] 农业部、公安部等 8 部门合力督办“瘦肉精”案件 [EB/OL]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwl/m/zwdt/201112/t20111226_2442919.htm
Ministry of Agriculture, Ministry of Public Security and other 8 departments jointly supervise the case of “Clenbuterol” [EB/OL]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwl/m/zwdt/201112/t20111226_2442919.htm
- [13] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- Li JS, Qiu YM, Wang C. Residue analysis for veterinary drug [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2002.
- [14] 李丹, 孙雷, 毕言锋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测饲料中 20 种 β -受体激动剂残留[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(12): 50–56.
- Li D, Sun L, Bi YF, *et al.* Determination of β -agonists in pig urine by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Vet Drug, 2013, 47(12): 50–56
- [15] 总局全面部署打击保健食品“四非”专项行动 [EB/OL]. [2013-5-20]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1523/81960.html>.
- The special action of “four not” against health food was comprehensively deployed by Administration [EB/OL]. [2013-5-20]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1523/81960.html>. 2013-05-20.
- [16] 孙雷, 刘琪, 张骊, 等. 饲料中四种 β -受体激动剂残留检测高效液相色谱-串联质谱法研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, (4): 15–18.
- Sun L, Liu Q, Zhang L, *et al.* Determination of β -agonists in pig urine by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Vet Drug, 2008, (4): 15–18
- [17] 郑玲, 吴玉杰, 赵永锋, 等. QuEChERS 结合高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中的 18 种 β -兴奋剂[J]. 色谱, 2014, (8): 867–873.
- Zheng L, Wu YJ, Zhao YF, *et al.* Simultaneous determination of 18 β -agonist residues in feed using QuEChERS sample preparation and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, (8): 867–873.
- [18] GB/T 22286-2008 动物源性食品中多种 β -受体激动剂残留量的测定液相色谱串联质谱法[S].
GB/T 22286-2008 Determination of β -agonists residues in foodstuff of animal origin-Liquid chromatography with tandem-mass spectrometric method [S].
- [19] 农业部 1025 号公告-18-2008. 动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测液相色谱-串联质谱法[S].
Ministry of Agriculture Proclamation 1025-18-2008 Determination of β -agonists residues in animal derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [20] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories –Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



张鑫, 主管药师, 主要研究方向为食品安全检测与药品安全检测。
E-mail: 18243065466@163.com



刘斌, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: liubin130000@163.com