

超高效液相色谱-串联质谱法检测动物血浆中 克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇

王凤美*, 何京橙, 张鸿伟, 王妍婷, 张晓梅

(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002)

摘要: **目的** 建立动物血浆中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的超高效液相色谱-串联质谱检测方法。**方法** 采用乙酸铵缓冲液酶解提取血浆中的目标化合物, 提取液经混合阳离子交换柱净化, 采用超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry)多反应监测模式检测, 内标法定量。**结果** 克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇回收良好, 线性相关系数均大于0.99, 测定下限均为0.5 μg/kg。**结论** 该方法适用于动物血浆中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇残留的检测。**关键词:** 血浆; 克伦特罗; 莱克多巴胺; 沙丁胺醇; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of clenbuterol, ractopamine and salbutamol in animal plasma by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Feng-Mei*, HE Jing-Cheng, ZHANG Hong-Wei, WANG Yan-Ting, ZHANG Xiao-Mei

(Technical Center for Inspection and Quarantine of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

ABSTRACT: Objective A method based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS) has been developed for the determination of beta-agonists residues including clenbuterol, ractopamine, and salbutamol in animal plasma. **Method** The analytes were extracted with NH₄AC solution from samples and hydrolysed with beta-glucuronidase overnight at 37 °C. The extract was filtered and the filtrate was cleaned by Oasis MCX solid phase extraction cartridge. Quantification of the 3 analytes was achieved by UPLC-MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) using internal standard method. **Results** The method had a good recovery for the clenbuterol, ractopamine, and salbutamol, and the correlation coefficient was more than 0.99 with the limit of quantitation (LOQ) 0.5 μg/kg. **Conclusion** The method is suitable for the determination of clenbuterol, ractopamine, and salbutamol residues in animal plasma. **KEY WORDS:** plasma; clenbuterol; ractopamine; salbutamol; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 检验检疫行业标准(2013B324)

Fund: Supported by the Inspection and Quarantine Standards (2013B324)

*通讯作者: 王凤美, 硕士研究生, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: fengmeiw@126.com

*Corresponding author: WANG Feng-Mei, Senior Engineer, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: fengmeiw@126.com

1 引言

克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇属于 β -受体激动剂类药物,该类物质能减缓或减少脂肪沉积,增加肌肉蛋白沉积,使营养重新分配,从而显著提高动物酮体的瘦肉率、提高饲料转化率。因此,该类物质被大量非法用于畜牧生产。

长期食用含有 β -受体激动剂残留的食品将对人体健康产生极大的危害。它可诱发和加重心率失常病人的病情,引起心室早搏,四肢、脸、颈部骨骼肌震颤。另外还引起代谢紊乱,对糖尿病人可发生酸中毒或酮中毒。

β -受体激动剂的检测越来越多的采用液相色谱-串联质谱法,满足了禁用药物高灵敏度、高精度的检测要求。目前,文献报道克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的检测多集中在动物源食品基质^[1-3],而食用动物饲养过程中违禁药物监管,针对活体动物检验,需要无创抽样。尿液和血浆常作为主要的测试对象^[4-5]。尿液中3种 β -受体激动剂的检测研究较多^[6-9],动物血浆中3种药物同时测定的研究尚未见报道。由于动物尿液存在取样难、取样时间不好确定等问题,给食用动物饲养过程中违禁药物监管带来极大的不便。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱建立了动物血浆中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的检测方法,为食用动物饲养过程中违禁药物更为方便、可行的监管模式提供技术保障。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Acquity Quattro Premier XE 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司); Himac CR22GII 高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司); MS1Minishaker 漩涡混合器(德国 IKA 公司); FA1104 型电子天平(上海精天电子仪器厂); Milli-Q(18.2 M Ω cm)超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

甲酸(色谱纯,美国 Fluka 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司); 乙酸铵(色谱纯,美国 Mallinckrodt Bake 公司)。乙酸铵缓冲液:称取乙酸铵 77.0 g,用水稀释定容至 500 mL,混匀,并用乙酸调节 pH 为 5.2。克伦特罗(clenbuterol)(美国 Dr.公司,纯度 98.5%); 莱克多巴胺(ractopamine)(美国 Dr.公司,

纯度 98.0%); 沙丁胺醇(salbutamol)(美国 Dr.公司,纯度 98.5%)。克伦特罗内标(clenbuterol-D9)和莱克多巴胺内标(ractopamine-D3)(美国 CDN 公司,纯度 99.0%); 沙丁胺醇内标(salbutamol -D3)(美国 Dr.公司,纯度 99.0%)。 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶(美国 Sigma 公司)。

2.2 对照品溶液的配制

准确称取克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗内标、莱克多巴胺内标、沙丁胺醇内标标准品(折合目标化合物 10.0 mg),分别用适量甲醇溶解,并用甲醇定容至 10 mL,混匀。 -18°C 以下避光保存。临用时,根据需要逐级稀释成不同质量浓度的系列混合标准工作液。

2.3 样品溶液的制备

2.3.1 样品的制备与保存

取食用动物静脉血 10 mL,放入抗凝血试管中,于 -20°C 冷冻保存。

2.3.2 样品提取

称取 1.0 g(精确至 0.01 g)试样,置于 50 mL 螺旋盖聚丙烯离心管中,添加同位素内标工作液,加入乙酸铵缓冲液 15 mL,然后加入 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶 20 μL ,充分振荡混匀, 37°C 温育过夜。 4°C 条件下 10000 r/min 离心 5 min,收集上清液于螺旋盖聚丙烯离心管中,样液经滤纸过滤,并用 2 mL 乙酸铵缓冲液洗涤滤纸,收集全部滤液,待净化。

2.3.3 样品净化

将上述样液过 MCX 柱净化,依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水和 3 mL 盐酸溶液对柱子进行预处理,将上清液以 1.0 mL/min 的流速加载在 MCX 小柱上,再依次用 3 mL 盐酸溶液、3 mL 水、3 mL 50%甲醇和 3 mL 正己烷洗柱,弃去淋洗液;真空抽干 MCX 柱 2 min,用 3 mL 乙酸乙酯-甲醇-氨水(50:45:5, V:V:V)进行洗脱,收集洗脱液。洗脱液在 45°C 下氮气流吹干,加入 1 mL 0.1%甲酸溶液溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,进行超高效液相色谱-串联质谱法测定分析。

2.4 色谱-质谱条件

2.4.1 色谱条件:

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm , 美国 Waters 公司); 流速: 300 $\mu\text{L}/\text{min}$; 进样量: 10 μL ; 柱温: 35°C ; 流动相 A 为水(含 10 mmol/L 乙酸铵和 0.1%甲酸), B 为乙腈; 梯度

洗脱程序见表 1。三种化合物的典型标准溶液提取离子色谱图见图 1。

表 1 β -受体激动剂测定的梯度洗脱程序
Table 1 Elution condition for the determination of beta-agonists

时间 Min	10 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1% 乙酸)/%	乙腈%	曲线变化模式
0.0	95	5	6
0.5	95	5	6
5.0	40	60	6
6.0	10	90	6
6.1	95	5	6
8.0	95	5	6

2.4.2 质谱条件:

离子化模式: 电喷雾电离(electrospray ionization, EI)正离子模式; 质谱扫描方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 正离子扫描; 分辨率: 单位质量分辨率; 毛细管电压 (V): 3300; 毛细管温度 (°C): 350; 离子源温度(°C): 120; 去溶剂气温度(°C): 380; 去溶剂气流量(L/h): 800; 锥孔气流量(L/h): 50; 3 种化合物 UPLC-MS/MS 分析参数见表 2。

3 方法学考察与讨论

3.1 样品的选择

血液作为瘦肉精类药物残留检测样品, 又分为血浆和血清^[10-14]。血浆是指离开动物的全血经抗凝处理后, 通过离心沉淀, 所获得的不含细胞成分的液体; 血清是指离开动物的全血凝固后, 经离心得到的淡黄色上清液体。两者最大的区别在于, 血清不含

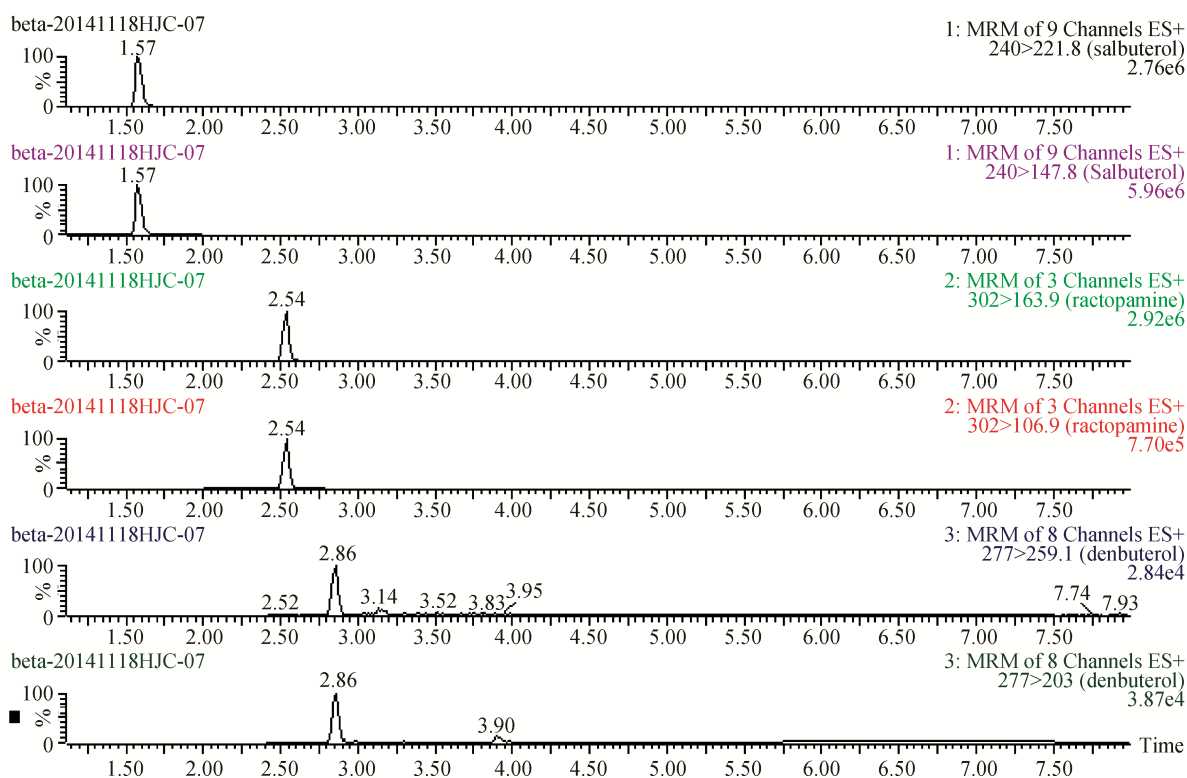


图 1 沙丁胺醇、莱克多巴胺、克伦特罗标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

Fig. 1 MRM chromatography of salbutamol ractopamine and clenbuterol
(沙丁胺醇: 1.57 min, 莱克多巴胺: 2.54 min, 克伦特罗: 2.86 min)

纤维蛋白原。Lether 等^[10]通过给马饲喂含克伦特罗药物的饲料,采用液相色谱-串联质谱法检测药物在血清中的残留情况,论述了血清为比尿液更为适用于药物的监管。Lei 等^[11]通过给猪饲喂含克伦特罗和沙丁胺醇药物的饲料,采用酶联免疫法检测两种药物在血浆、血清中的残留情况。结果表明,血浆中克伦特罗和沙丁胺醇的含量均高于血清中两种药物的残留含量。因此,本研究采用血浆作为检测对象。

3.2 前处理过程优化

根据 β -受体激动剂苯环上取代基的差异,可分为苯胺型和苯酚型。克伦特罗属于苯胺型结构,辄合反应率和蛋白结合率低。但苯酚型的辄合代谢过程较强,如沙丁胺醇在组织和排泄物中主要以硫酸辄合物的形式存在,其次为葡萄糖醛酸辄合物;莱克多巴胺主要以葡萄糖醛酸辄合物形式存在。有文献报道^[15],猪血浆中沙丁胺醇除原药外,还包括沙丁胺醇的葡糖醛酸化和 N-氧化产物。李阳等^[16]考察了酶解与不酶解对绵羊血浆中莱克多巴胺和沙丁胺醇含量测定的影响,结果表明,绵羊血浆中莱克多巴胺辄合率大于 95%,沙丁胺醇辄合率约为 40%。

本方法中采用 2.0 mol/L 的乙酸铵缓冲溶液(pH

5.2)作为提取溶剂, β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶酶解,37 °C 温育过夜。

3.3 方法学评价

3.3.1 线性关系及测定低限

用 0.1%甲酸溶液稀释 2.2 中配制的对照品溶液,配制标准系列,克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺含量均为:0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其中克伦特罗-D9、沙丁胺醇-D3、莱克多巴胺-D5 三种内标含量均为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在本方法所确定的实验条件下进行分析,结果见表 3。从表 3 可以看出 3 种 β -受体激动剂相关系数(r)均大于 0.99,表明 3 种 β -受体激动剂在 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内线性关系良好。测定低限以添加回收中各化合物的定量离子和定性离子信噪比均 10 定义,克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺的测定低限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.3.2 回收率

本研究选取常见食用动物牛、羊、猪 3 种不同血浆作为典型代表基质,在空白样品中进行了 LOQ、2LOQ、10LOQ 共 3 个浓度水平的加标回收实验,每个水平进行 6 次重复实验,计算回收率和相对标准偏差(RSD),结果表明 3 种 β -受体激动剂的平均回收率为 95.57%~101.73%,RSD 值为 3.26%~7.96%(见表 4)。

表 2 3 种化合物的质谱分析参数
Table 2 Analysis parameters of the 3 compound

化合物	母离子 (m/z)	子离子(m/z)	滞留时间 (s)	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)
克伦特罗	277.0	203*	0.05	25	15
		259.1	0.05	25	10
沙丁胺醇	240.0	147.8*	0.05	22	18
		221.8	0.05	22	10
莱克多巴胺	302.0	163.9*	0.05	25	15
		106.9	0.05	25	28
克伦特罗-D9	286.2	204.0	0.08	30	15
沙丁胺醇-D3	243.3	151.1	0.08	30	18
莱克多巴胺-D3	305.2	166.9	0.08	30	15

表 3 3 种 β -受体激动剂线性范围、相关系数和测定低限
Table 3 Linear ranges, correlation coefficients of 3 β -agonists

化合物	浓度范围($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性方程	相关系数(r)
克伦特罗	0.5~50	$Y=0.1438X-0.0006$	0.9974
莱克多巴胺	0.5~50	$Y=0.3666X+0.0491$	0.9989
沙丁胺醇	0.5~50	$Y=0.3528X-0.0031$	0.9978

表 4 空白血浆中 3 种 β -受体激动剂的添加回收($n=18$)
Table 4 Recoveries of the 3 β -agonists spiked in plasma samples ($n=18$)

基质	克伦特罗		莱克多巴胺		沙丁胺醇	
	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
牛血浆	95.57	3.26	100.83	6.28	99.10	6.03
猪血浆	101.73	5.80	99.33	7.96	97.23	7.96
羊血浆	100.40	7.00	97.03	7.84	101.10	5.45

4 结 论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱对动物血浆中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的检测方法。该方法前处理简单,回收率、准确度及精密度均良好,能够满足进出口活体食用动物血浆中 3 种 β -受体激动剂的残留检测。

参考文献

- [1] 刘佳, 谢云峰, 任丹丹等. 反相液相色谱-串联质谱法检测猪肝中 26 种 β_2 -受体激动剂类药物残留[J]. 分析化学, 2014, 42(10): 1486-1492.
Liu J, Xie YF, Ren DD, *et al.* Determination of residues of 26 β_2 -agonists in pork liver by reversed phase high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2014, 42(10): 1486-1492
- [2] 张旖, 赵善贞, 曲栗, 等. HPLC-q/LTQ - MS 法测定肉及肉制品中 10 种 β -受体激动剂[J]. 食品科学, 2014, 34(20): 202-207.
Zhang Q, Zhang SZ, Qu L, *et al.* Determination of 10 kinds of β -agonists in meat and meat products by matrix solid-phase dispersion-high performance liquid chromatography tandem quadrupole linear ion trap mass spectrometry [J]. Food Sci, 2014, 34(20):202-207.
- [3] 熊琳, 李维红, 高雅琴等. 肉品中 β -受体激动剂类药物残留检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 528-533.
Xiong L, Li WH, Gao YQ, *et al.* A review of inspection technology of β -agonist drug residues in meat [J]. J Food Saf & Qual, 2015, 6(2): 528-533.
- [4] Jelka P, Tihomira G, Igor B, *et al.* Clenbuterol residues in plasma and urine samples of food-producing pigs during and after subchronic exposure to a growth-promoting dose [J]. Food Technol Biotechnol. 2009, 47(1): 67-74.
- [5] Guan FY, Uboh CE, Lawrence RS, *et al.* Quantification of clenbuterol in equine plasma, urine and tissue by liquid chromatography coupled on-line with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16:1642-1651.
- [6] 李晓敏, 高燕, 苏晓欧等. 在线固相萃取-高效液相色谱-质谱法快速测定绵羊尿液中 3 种联合态 β -受体激动剂[J]. 分析化学, 2014, 42(12): 1779-1784.
Li XM, Gao Y, Su XO, *et al.* Direct analysis of combined β -agonist in sheep urine using on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem. 2014, 42(12): 1779-1784.
- [7] 聂建荣, 朱铭立, 连瑾等. 高效液相色谱-串联质谱法检测动物尿液中的 15 种 β -受体激动剂[J]. 色谱, 2010, 28(8): 759-764.
Nie JR, Zhu ML, Lian J, *et al.* Determination of fifteen β -agonists in animal urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(8): 759-764.
- [8] 王凤美, 张鸿伟, 庞士平等. 超高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品和尿液中 4 种 β -受体激动剂残留[J]. 分析化学, 2008, 36(12):1629-1635.
Wang FM, Zhang HW, Pang SP, *et al.* Determination of four beta-agonists residues in products of animal origin and urine by ultra chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2008, 36(12): 1629-1635.
- [9] 杨挺, 孙择祥, 鲍伟华. 克伦特罗在猪尿液和血液中残留消除规律研究[J]. 宁波农业科技, 2009, 4: 2-5.
Yang T, Sun ZX, Bao WH. Effects of sulfated glucomannan on the antiviral activity of broiler infected with IBDV [J]. Ningbo Agric Sci Technol, 2009, 4:2-5.
- [10] Lether AF, Harkins JD, Karpiesiuk W, *et al.* Clenbuterol in the horse: confirmation and quantitation of serum clenbuterol by LC-MS/MS after oral and intratracheal administration [J]. J Anal Toxicol, 2001, 25: 280-287.
- [11] Lei YC, Tai YF, Tai YT, *et al.* Development and fast screening of salbutamol residues in swine serum by an enzyme-linked immunosorbent assay in Taiwan [J]. J Agric Food Chem, 2008,

- 56: 5494–5499.
- [12] Jlhansson MA, Hellenas KE. Matrix effects in immunobiosensor determination of clenbuterol in urine and serum [J]. *Analyst*, 2004, 129: 438–442.
- [13] Schmeer K, Sauter T, Schmid J. Rapid pharmacokinetic screening of salbutamol in plasma samples by column-switching high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 777: 67–72.
- [14] Wu JW, Ding CG, Ge QH, *et al.* Simultaneous determination of ipratropium and salbutamol in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 3475–3483.
- [15] 谷旭, 刘义明, 姚婷等. 超高压液相色谱-飞行时间质谱法对比分析沙丁胺醇在猪尿液和血浆中的代谢产物[J]. *分析化学*, 2014, 42(11):1692–1696.
- Gu X, Liu YM, Yao T, *et al.* Identification of major metabolites of salbutamol in swine urine and plasma using-high performance liquid chromatography-electrospray-time of flight-mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2014, 42(11): 1692–1696.
- [16] 李阳, 苏晓欧, 张维等. 酶解及有机溶剂提取对绵羊血浆和尿样中两种 β_2 -受体激动剂含量测定的影响[J]. *分析化学*, 2014, 42(5): 717–722.
- Li Y, Su XO, Zhang W, *et al.* Study on influences of enzymolysis and organic solvent extraction on determination of 2 kinds of β_2 -agonist residues in sheep plasma and urine [J]. *Chin J Anal Chem*, 2014, 42(5): 717–722.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



王凤美, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: Fengmeiw@126.com