

液相色谱-串联质谱法检测毛发中的克仑特罗

凌文婷^{1,2}, 刘畅², 徐伟东², 陈桂良^{2*}

(1. 上海医药工业研究院, 上海 200040 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的: 建立液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)检测毛发中的克仑特罗。方法: 毛发经碱水解, 固相萃取分离、纯化、浓缩后, 进行 LC-MS/MS 分析。色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相为乙腈-甲醇-0.4% 甲酸水溶液(22:4:74); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 样品在三重四级杆串联质谱中经电喷雾正离子源离子化后, 以多反应监测模式(MRM)测定, 定量离子对为 227.1/203.0 定性离子对为 277.1/168.1 和 277.1/259.1。结果: 克仑特罗浓度在 1~1000 ng·g⁻¹ 范围内线性关系良好, 方法回收率大于 99.57%, 提取回收率大于 51.08%, 日内和日间 RSD 均小于 8.9%, 最低定量限为 1 ng·g⁻¹。随机采样人发 20 份, 检出克仑特罗 4 份。结论: 本方法准确, 专属性强, 灵敏度高, 适用于毛发中克仑特罗的检测。

关键词: 毛发; 克仑特罗; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0782-05

LC-MS/MS determination of clenbuterol in hair

LING Wen-ting^{1,2}, LIU Chang², XU Wei-dong², CHEN Gui-liang^{2*}

(1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040 China

2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203 China)

Abstract Objective To develop a method of liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) for the determination of clenbuterol in hair. **Method** After alkaline hydrolysis, the hair sample was extracted, purified, concentrated by SPE and detected using LC-MS/MS. The separation was performed with an Agilent Zorbax SB C₁₈ column(150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) and acetonitrile-methanol-0.4% formic acid(22:4:74) as mobile phase at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹; The injection volume was 10 μL; The sample was ionized by positive electrospray ionization(ESI) source in the triple quadrupole tandem mass spectrometer, confirmed and quantified with multiple reaction monitoring(MRM) mode. Ion transition for quantification is 227.1/203.0 and ion transitions for qualification are 277.1/168.1, 277.1/259.1. **Results** The calibration curve was linear in the range of 1-1000 ng·g⁻¹; The method recovery was more than 99.57% and the extraction recovery was more than 51.08%; The RSDs of inter- and intra-day were less than 8.9%; The limit of quantitation was 1 ng·g⁻¹. This method has been applied to analysis 20 human hair samples and the result showed that 4 samples contained clenbuterol. **Conclusion** The method is accurate, specific, sensitive and suitable for the determination of clenbuterol in hair.

Key words hair; clenbuterol; liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC-MS/MS)

克仑特罗(俗称瘦肉精)为 β-受体激动剂类药物,临床上用于扩张支气管和增加肺通气量。当用药量超过治疗剂量的 5~10 倍时,对牛、羊、猪、家禽等多种动物具有提高饲料转化率和增加瘦肉率的作用,同时在动物的可食组织中有显著残留。人 1 次

摄入 100~200 g 含克仑特罗的组织,组织所含的残留物即达到治疗剂量,会对心血管和神经系统产生影响,表现为肌肉震颤、剧烈腹痛、心跳和呼吸加快,最终死亡^[1]。美国 FDA 禁止任何动物使用克仑特罗作为生长促进剂,但是在绿皮书(Green Book)中,

* 通讯作者 Tel: (021) 50798191 E-mail: guiliang@citiz.net

还是将克仑特罗批准为合法的兽药; 中华人民共和国农业部第 193 号公告中, 明确规定禁止克仑特罗及其盐、酯及制剂在食源性动物中使用。

毛发分析可从源头控制食品污染, 尤其是对违禁兽药的监控, 并且可以活体检测, 对动物无损伤, 适应“从农田到餐桌”的食品安全管理模式。毛发可提供长期、全面、可靠的药物滥用信息, 有着血检和尿检不可替代的优势。目前, 毛发分析技术在药物滥用鉴定中的作用已被确证和公认。有文献报道, 可从毛发中检出克仑特罗^[2]。Gaillard 等^[3]报道给牛服用 3.3 mg 克仑特罗 15 d 41 d 后可从毛发中检出克仑特罗 4.372 ng·mg⁻¹。本文建立了液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 检测毛发中的克仑特罗, 所建立的方法准确, 特异性强, 灵敏度高, 适用于毛发中克仑特罗的检测。

1 仪器与试剂

API 3200 三重四级杆串联质谱仪 (美国应用生物系统公司), 配有 ESI 源及 Analyst 4.1.2 工作站; Agilent 1100 高效液相色谱系统, Agilent 1100 自动进样器; Thermo 高速离心机; IKA VIBRAX VXR Basic 型漩涡混合器; OA-SYS 氮吹仪; PCX 柱 (阳离子交换和反相混合机理的萃取柱, Agela)。

盐酸克仑特罗对照品, 中国药品生物制品检定所; 内标 D₉-克仑特罗, Sigma 乙醚、甲醇、乙酸乙酯、乙腈、甲酸均为色谱纯 (Merck), 氢氧化钠、磷酸二氢钠、盐酸、氨水均为分析纯; 水为超纯水。

毛发样品来源: 猪毛 (背毛, 屠宰场), 兔毛 (背毛, 上海市食品药品检验所动物房), 人发 (上海市郊) 分装在样品袋中, 分别洗净, 检测, 药检阴性的毛发作为空白毛发样品。

2 LC-MS/MS 条件

2.1 LC 条件 色谱柱: Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱 (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); Phenomenex C₁₈ 预柱; 柱温: 30 °C; 流动相: 乙腈-甲醇-0.4% 甲酸水溶液 (22: 4: 74); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL。

2.2 MS 条件 离子化方式: ESI 正离子模式; 喷雾电压: 5.5 kV; 离子源温度: 500 °C; 雾化气: 50 L·min⁻¹; 帘气: 15 L·min⁻¹; 碰撞气: 5 L·min⁻¹。检测方式为多反应监测 (MRM), 离子信息见表 1。两对定性离子 (277.1/168.1, 277.1/259.1) 的相对离子丰度分别为 20.64%, 27.48% (允许的相对误差 ±25%)。

表 1 测定克仑特罗的 LC-MS/MS 参数

Tab 1 LC-MS/MS parameters for clenbuterol detection

化合物 (compound)	质荷比 (m/z)	去簇电压 (declustering potential DP) /V	碰撞能量 (collision energy, CE) /eV	t _R /min
克仑特罗 (clenbuterol)	277.1/203.0	40	24	3.05
	277.1/168.1	40	43	
	277.1/259.1	40	39	
D ₉ -克仑特罗 (D ₉ -clenbuterol)	286.3/203.9	40	16	3.05
	286.3/268.4	40	25	

* 定量离子对 (ion transition for quantification)

3 溶液制备

3.1 系列对照品溶液 精密称取盐酸克仑特罗对照品适量, 用甲醇溶解并制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的储备液; 精密量取适量, 用甲醇稀释成 1000, 100, 10, 1 ng·mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 备用。

3.2 内标溶液 精密称取 D₉-克仑特罗 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度。精密量取 1 mL 置 200 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 即得浓度为 500 ng·mL⁻¹ 的内标溶液。

3.3 10 μg·mL⁻¹ 克仑特罗的二甲亚砷溶液 精密称取盐酸克仑特罗对照品 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 加二甲亚砷溶解并稀释至刻度。精密量取 10 mL 置 100 mL 量瓶中, 加二甲亚砷稀释至刻度, 混匀, 即得。

3.4 供试品溶液

3.4.1 清洗 毛发样品用 1% 吐温 80 洗涤 1 次, 超纯水洗涤 3 次, 50 °C 烘干, 剪碎, 在干燥处保存。

3.4.2 提取 取毛发 100 mg 精密称定, 精密加入内标溶液 100 μL, 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 80 °C 水浴 30 min, 取出, 冷却至室温, 用 2 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 至中性, 加入 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠缓冲溶液 (磷酸调 pH 5.0) 2 mL, 振摇 10 min, 4600 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液; 残渣再加磷酸二氢钠缓冲溶液 (磷酸调 pH 5.0) 2 mL, 同上振摇、离心、取上清液。合并 2 份上清液, 滤过, 即得提取液。

3.4.3 纯化 取 PCX 小柱 (60 mg/3 mL), 依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化小柱。转移“3.4.2”项下的提取液至 PCX 柱顶部。用 6 mL 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠缓冲溶液 (磷酸调 pH 5.0) 洗涤柱子, 在负压下 (10 iHg) 干燥 15 min, 再用 9 mL 甲醇洗涤柱子, 负压下 (10 iHg) 干燥 10 min, 用氨水饱和的乙醚 (98: 2) 9 mL 洗脱, 收集洗脱液, 于 35 °C 氮气吹干,

加入流动相 500 μL , 涡旋振荡 1 min 即得供试品溶液。

4 结果

4.1 方法专属性 按照“3.4”项下方法对空白毛

发样品进行处理, 在本文试验条件下进行测定, 并与空白毛发添加内标及阳性毛发色谱图进行比较, 结果表明, 毛发中的内源性物质不干扰克仑特罗和内标的测定, 见图 1。

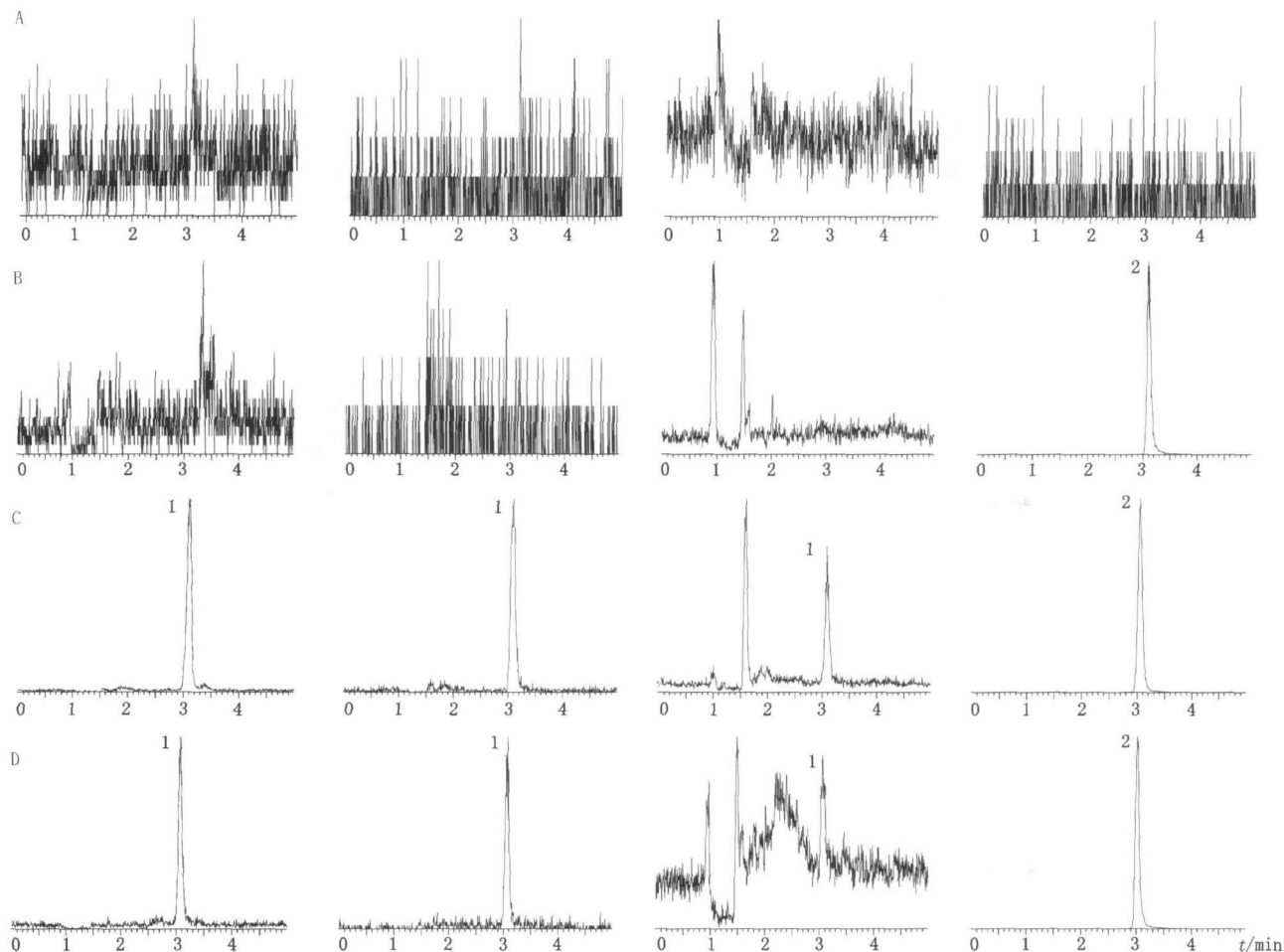


图 1 克仑特罗提取离子 (m/z 227.1/203.9) 和内标 (m/z 286.3/203.9) 色谱图

Fig 1 Typical chromatograms of extract ion (m/z 227.1/203.9) and internal standard (m/z 286.3/203.9)

A. 空白人发 (blank human hair) B. 空白人发中加入内标 (blank human hair spiked D_9 -clenbuterol) C. 空白人发添加克仑特罗 ($10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 和内标 (blank human hair spiked clenbuterol $10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ and D_9 -clenbuterol) D. 阳性人发样品加入内标 (positive human hair spiked D_9 -clenbuterol)
1 克仑特罗 (clenbuterol) 2. D_9 -克仑特罗 (D_9 -clenbuterol)

4.2 克仑特罗与毛发结合规律的考察 取空白人发 12 份, 浸泡在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 克仑特罗二甲亚砜溶液中, 分别在 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 后各取出 2 份, 用大量甲醇和纯水淋洗, 冲去毛发表面残留的克仑特罗, 自然晾干, 按“3.4”项下方法处理后测定。实验结果表明, 随着时间的增加, 进入人发中的克仑特罗逐渐增多, 见图 2。

4.3 毛发提取纯化影响因素考察 按正交试验方案设计 9 种提取纯化工艺, 分别制备供试品溶液并测定, 对结果进行直观分析和方差分析, 结果见表 2 和表 3。不同溶剂对克仑特罗提取效率有显著性差异 ($F > F_{\text{临界值}}$), 从结果分析乙醚效果最好。“提取

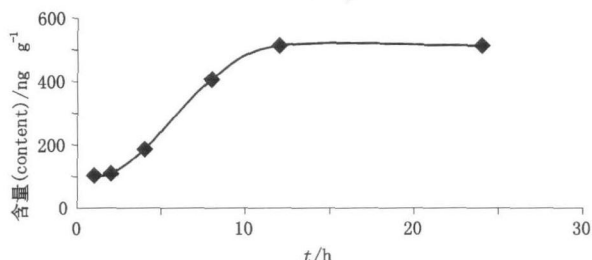


图 2 毛发中克仑特罗含量-时间曲线

Fig 2 Amount of clenbuterol permeate into hair by time

次数”和“固相萃取小柱洗脱溶剂体积”两项, 试验结果之间无显著性差异 ($F < F_{\text{临界值}}$), 故采用提取 2 次和 9 mL 乙醚洗脱的实验条件。

表 2 提取方法试验设计及其结果

Tab 2 The design and results of the test of extraction

试验号 (No)	提取次数 (degree) (A)		溶剂 (solvent) (B)		溶剂体积 (volume) (C)		收率 (recovery) %
	水平 (level)	内容 (content)	水平 (level)	内容 (content)	水平 (level)	内容 (content) /mL	
1	1	1	1	甲醇 (methanol)	1	9	12.21
2	2	2	2	乙酸乙酯 (acetic ether)	2	12	45.59
3	3	3	3	乙醚 (diethyl ether)	3	16	46.09
4	1	1	2	乙酸乙酯 (acetic ether)	3	16	33.53
5	2	2	3	乙醚 (diethyl ether)	1	9	50.96
6	3	3	1	甲醇 (methanol)	2	12	8.15
7	1	1	3	乙醚 (diethyl ether)	2	12	27.60
8	2	2	1	甲醇 (methanol)	1	9	7.48
9	3	3	2	乙酸乙酯 (acetic ether)	3	16	29.69

表 3 试验结果分析

Tab 3 The analysis of the test results

	试验项目 (test items)	提取次数 (degree) (A)	溶剂 (solvent) (B)	溶剂体积 (volume) (C)
直观分析 (directness method)	水平 1 之和 (sum 1)	73.34	0027.85	070.66
	水平 2 之和 (sum 2)	104.03	108.81	81.34
	水平 3 之和 (sum 3)	83.93	126.73	109.30
	极差 (max difference)	10.23	32.96	12.88
	含量平均值 (average content)		29.03	
方差分析 (variance method)	离差平方和 (sum of square)	162.04	1972.22	265.52
	自由度 (degree of freedom)	2	2	2
	方差 (variance)	81.02	986.11	132.76
	F 值 (F value)		12.17	1.64
	P 值 (P value)		< 0.05	> 0.10

注 (note): $F_{1-0.01}(2,6) = 3.46$, $F_{1-0.05}(2,6) = 5.14$

4.4 线性关系考察 精密量取克仑特罗对照品溶液适量, 加到 100 mg 剪碎的毛发中, 分别制成含量为 1, 2.5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 的含克仑特罗毛发, 室温放置 12 h, 按“3.4”项下方法处理, 进样测定。以克仑特罗含量 X ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 为横坐标, 以克仑特罗与内标定量离子对的峰面积比 Y 为纵坐标, 计算线性回归方程。结果显示, 在 1.000 ~ 1000 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 结果见表 4。

表 4 克仑特罗线性回归方程和相关系数

Tab 4 Clenbuterol linear regression equation and correlation coefficient

毛发 (hair)	线性回归方程 (equation of linear regression)	相关系数 (correlation coefficient)
猪毛 (pig hair)	$Y = 3.2184X - 0.0035$	0.9996
兔毛 (rabbit hair)	$Y = 0.3039X + 0.0083$	0.9997
人发 (human hair)	$Y = 0.3347X + 0.0086$	0.9954

4.5 精密度试验 称取空白毛发 100 mg 精密量取克仑特罗对照品溶液, 制成低、中、高 3 种含量水平 (2.5, 25, 250 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 的含克仑特罗毛发, 室温放置 12 h, 按“3.4”项下方法处理, 进样测定。每天平行测定含克仑特罗毛发 6 份, 连续测定 3 d, 计算日内和日间精密度。结果见表 5。

表 5 日内精密度及日间精密度 ($n = 6$)

Tab 5 Intra-day and inter-day RSD

加入量 (add) / $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	日内 (intra-day) RSD %			日间 (inter-day) RSD %		
	猪毛 (pig hair)	兔毛 (rabbit hair)	人发 (human hair)	猪毛 (pig hair)	兔毛 (rabbit hair)	人发 (human hair)
2.5	2.8	2.3	3.7	7.2	4.6	6.5
25	1.0	1.7	1.5	8.9	3.3	2.5
250	1.4	3.7	1.1	6.1	3.6	2.0

4.6 回收率试验 取空白毛发 100 mg 精密量取克仑特罗对照品溶液, 制成低、中、高 3 种含量水平 (2.5, 25, 250 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 的含克仑特罗毛发, 室温放置 12 h, 按“3.4”项下方法处理并测定。将克仑特罗与内标峰面积代入线性回归方程, 求出含量。方法回收率 = 测得量 / 添加量 $\times 100\%$; 提取回收率 = 空白毛发加入对应量的对照品所得的峰面积 / 克仑特罗对照品溶液进样峰面积 $\times 100\%$, 结果见表 6。

表 6 方法回收率及提取回收率 ($n = 6$)

Tab 6 method recovery and extraction recovery

加入量 (add) / $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	方法回收率 (method recovery) %			提取回收率 (extraction recovery) %		
	猪毛 (pig hair)	兔毛 (rabbit hair)	人发 (human hair)	猪毛 (pig hair)	兔毛 (rabbit hair)	人发 (human hair)
2.5	100.7	105.4	99.57	61.28	55.67	55.74
25	100.5	108.6	102.4	53.20	54.44	51.08
250	102.8	107.6	104.7	61.09	52.54	56.32

4.7 最低检测限和定量限 以信噪比 $SN = 3:1$ 计, 克仑特罗最低检测限 (LOD) 为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 以信噪比 $SN = 10:1$ 计, 定量限 (LOQ) 为 $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

4.8 样品测定结果 随机采样人发 20 份, 按“3.4”项下方法处理并测定, 检出克仑特罗 4 份, 含量分别为 1.34 1.96 2.73 $2.40 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

5 讨论

5.1 食品安全是人们普遍关心的热点问题, 即使只含有低剂量的化学物质, 长期服用, 也可能对人体造成危害。现有文献报道检测动物源性食品中的多种 β -受体激动剂^[4,5], 也有报道检测猪毛中的克仑特罗^[6]。本文考察了 3 种毛发基质 (猪毛、兔毛、人发), 建立了适合毛发基质的检测方法, 并且用该方法检测了人发中的克仑特罗, 发现人发中有克仑特罗残留。

5.2 本文采用固相萃取柱净化, 能有效地减小基质效应, 但定性离子对 (m/z 277.1/259.1) 色谱图基线噪音较高并有干扰峰, 通过改变流动相有机相和水相的比例, 调整保留时间, 使内源性物质不干扰目标化合物的测定, 最终采用乙腈-甲醇-0.4% 甲酸水溶液 (22:4:74) 作为流动相, 干扰物在 1.5 min 出峰, 克仑特罗在 3 min 出峰。

5.3 本文用水、甲醇、二甲亚砷作溶剂, 考察克仑特罗进入毛发的规律, 毛发用甲醇和水浸泡后, 表面残留的克仑特罗不易冲净, 不便检测进入毛发中的克仑特罗, 故选用二甲亚砷作溶剂。实验结果表明, 用克仑特罗的二甲亚砷溶液浸泡毛发, 第 7 d 时毛发中的克仑特罗仍在增加。本实验说明药物进入毛发是一个缓慢的过程, 毛发暴露在一定浓度的药物环境中, 药物可以在毛发中不断蓄积。本文选用室温放置 12 h 一是使添加的微量克仑特罗渗透进入毛发, 模拟真实样品; 二是挥干有机溶剂, 减少有机溶剂对提取纯化产生的影响。较添加对照品溶液后直接检测更接近真实样本的情况。

5.4 煮、烧、烤和微波对加样和阳性组织中的克仑特罗都没有影响。因此, 克仑特罗残留会进入组织周围的环境或烹调时肉汁中。克仑特罗在 100°C 的沸水中是稳定的, 在 260°C 的热油中是不稳定的, 半

衰期为 $5 \text{ min}^{[7]}$ 。所以通常的烹调方式, 基本上无法破坏克仑特罗。饲料中非法添加克仑特罗, 家畜食用了添加克仑特罗的饲料, 人食用残留克仑特罗的家畜, 克仑特罗通过食物链进入人体, 经血液循环与毛发蛋白结合, 在头发中蓄积, 因此可以通过检测人发, 来监测克仑特罗在人体内的残留情况。从随机采样检测情况来看, 部分人群头发中检出克仑特罗, 可能是他们无意中食用含有低量克仑特罗的猪肉及肉制品, 克仑特罗进入人体并在毛发蓄积, 克仑特罗滥用问题值得重视。

参考文献

- LI Jun-suo (李俊锁), QUE Yue-ming (邱月明), WANG Chao (王超). *Veterinary Drugs Residue Analysis* (兽药残留分析). Shanghai (上海): Shanghai Science and Technology Publishers (上海科学技术出版社), 2002: 641
- LING Wen-ting (凌文婷), CHEN Gui-liang (陈桂良), XU Weidong (徐伟东), *et al.* Hair analysis for the detection of abused drug in livestock animal (动物滥用药物的毛发分析). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28(9): 1578
- Gaillard Y, Balland A, Doucet F, *et al.* Detection of illegal clenbuterol use in calves using hair analysis: Application in meat quality control. *J Chromatogr*, 1997, 703(1, 2): 85
- CAI Xin-xin (蔡欣欣), ZHANG Xi-yao (张秀尧). Rapid simultaneous determination of six β -agonists in foodstuffs of animal origin by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (超高效液相色谱三重四极杆质谱法同时快速测定动物源食品中 6 种 β -受体兴奋剂残留). *Chin J Health Lab Technol* (中国卫生检验杂志), 2008, 18(7): 1252
- SUN Lei (孙雷), LU Qi-li (刘琪), ZHANG Li (张骊), *et al.* Determination of β -agonists in pig urine by HPLC-MS/MS (高效液相色谱-串联质谱法检测猪尿中四种 β -受体激动剂残留的研究). *Chin J Vet Drug* (中国兽药杂志), 2008, 42(4): 15
- SU Xiao-ou (苏晓鸥), SHEN Jian-zhong (沈建忠). Studies on the determination of clenbuterol in swine hairs using LC-MS/MS and its residue elimination (用 HPLC-MS/MS 研究动物毛发中克仑特罗的残留及代谢规律). *Chin J Anim Sci* (中国畜牧杂志), 2008, 44(11): 41
- Botsoglou NA, Fletouris DJ. *Drug Residues in Foods: Pharmacology, Food Safety, and Analysis*. Chapter 17. Boca Raton, USA: CRC Press, 2000: 533

(本文于 2008 年 12 月 15 日收到)