

猪肝脏和肌肉组织中 β -兴奋剂克伦特罗的高效液相色谱电喷雾质谱分析研究

刘红霞*¹ 张书胜¹ 张西林¹ 屈凌波¹ 赵玉芬^{1,2}

¹(郑州大学化学系化学生物重点实验室, 郑州 450052)

²(清华大学生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084)

摘 要 建立了猪肉和肝组织中克伦特罗的高效液相色谱电喷雾质谱(HPLC-ESI/MS)分析方法。在最佳色谱条件下克伦特罗的保留时间为 16 min, 样品空白无干扰。定量分析的线性范围为 2~ 100 mg/L; 最低检出限为 0.75 mg/L; 方法回收率为 95%~ 98%; RSD 小于 2.0%。利用 ESI/MS/MS 对 β -兴奋剂克伦特罗进行了质谱解析, 选择特征离子峰 m/z 277、259 和 203 作为准确性的依据。对实际生物样品猪瘦肉和肝进行检测结果表明, 当样品中克伦特罗残留含量较高时, 可以利用紫外检测数据对其进行准确定量。当残留含量低于最低检出限时, 可以根据 HPLC/ESI/MS 结果中有无特征峰出现, 给出较准确的定性结果。

关键词 高效液相色谱, 电喷雾质谱, 克伦特罗, 猪, 肝脏, 肌肉

1 引 言

克伦特罗(clenbuterol), 化学名称为(α -叔丁氨基)甲基-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇, 是一种强效 β -肾上腺素兴奋剂, 具有舒张支气管, 松弛牛子宫, 治疗动物和人的阻塞性支气管哮喘的功效; 还可以提高动物胴体瘦肉率, 减少脂肪沉积, 促进动物的肌肉增长。研究表明, 克伦特罗在动物肌肉中可以很快代谢, 但在肝脏中可以残留一星期左右。长期食用含有克伦特罗的食品将会对人类健康造成极大的损害。我国已严禁在动物饲料中添加克伦特罗, 并经常进行市场抽查, 对违者进行严厉打击。对动物体内、饲料中的克伦特罗的检测分析方法主要有酶免疫分析技术^[1~3]、GC^[4]、HPLC 法^[5,6]及 GC-MS^[7,8]联用分析技术等。钱小红等^[9]利用 GC 高分辨质谱联用技术成功对人尿中低浓度的甾体兴奋剂如康力龙、克伦特罗和 5 β -4 羟基甲睾酮类药物进行了检测分析。对于复杂的生物体系, 酶免疫存在有假阳性的情况; 液相色谱方法定量准确度高, 但检测灵敏度低, 对复杂体系中低含量靶物的准确性存在一定困难; HPLC/MS 在复杂生物体系的分离分析中, 已成为一种重要的分离分析手段。然而, HPLC/MS 在研究动物组织中克伦特罗残留的应用报道尚不多见^[10]。本实验利用 ESI/MS 对克伦特罗进行了质谱解析, 并对克伦特罗的 HPLC 的分离条件进行改进, 利用建立的 HPLC/MS 方法, 对市售猪肉和肝组织中的克伦特罗残留进行抽样检测, 结果表明: 该法快速、准确, 可以满足大量的样品测试, 并为食品安全监督提供了方法依据。

2 实验部分

2.1 试剂与样品制备

克伦特罗标准品(中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯; 醋酸铵为分析纯; 克伦特罗标准储备液浓度为 200 mg/L(甲醇配制)。

新鲜猪瘦肉和肝分别取自不同的食品市场, 分别标示为肉 1#、肉 2#、肉 3#、肝 4#、肝 5# 和肝 6#。样品制备的详细方法按国标方法^[5], 样品重 20 g, 总的萃取溶剂体积为 10 mL, 萃取液离心 10 min (4000 r/min), 并在 K-D 浓缩器上浓缩至适当体积, 氮吹至近干, 用甲醇定容至 0.2 mL。0.45 mm 滤膜过滤, 取滤液 20 μ L 进行 HPLC-ESI/MS 分析。

2.2 仪器与分析条件

2003-06-04 收稿; 2003-12-19 接受

本文系河南省杰出青年基金和杰出人才创新基金资助课题(No. 04120001200; 421002300)

Agilent 1100 HPLC/Bruke Esquire 3000 MS 液相色谱/质谱系统(德国布鲁克公司)。

色谱分离柱为 ODS(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm, 德国默克公司), 流动相优化为 MeOH-10 mmol/L NH₄Ac(4555, V/V), 流速为 0.9 mL/min; 检测波长为 243 nm, 进样体积为 20 μL。ESI/MS 采用阳离子模式, MS 分析器质量扫描范围为 m/z 50~300; 喷雾电压为 4 kV; 雾化器压力为 25 psi; 逆向干燥气体温度为 300 °C, 流速为 9 L/h, 分流比为 25:1。分析软件分别为 Bruker Daltonics EsquireControl 5.00、DataAnalysis 2.00 和 Agilent ChemStation A.07。

3 结果与讨论

3.1 克伦特罗的 ESI/MS/MS 和特征离子峰

ESI 是一种软电离技术, 在 MS 谱图上通常有靶物的准分子离子峰出现, 易于对靶物进行确证。对克伦特罗标准溶液进行 ESI/MS 分析, 结果见图 1a。克伦特罗的分子离子 $[MH]^+$ 峰及相关的碎片峰主要为 m/z 277、259 和 203。对 m/z 277 和 259 离子分别进行二级 MS 扫描, 结果见图 1b 和图 1c。推测其裂解机理为: m/z 259 是 m/z 277 失去一分子水所得, 即为 $[MH-H_2O]^+$; m/z 203 是 $[MH-H_2O]^+$ (m/z 259) 经过 McLafferty 重排, 失去一分子 $(CH_3)_2C=CH_2$ 所得, 即为 $[MH-H_2O-C_4H_8]^+$ 。藉此可将 m/z 277、259 和 203 确定为克伦特罗的特征峰。

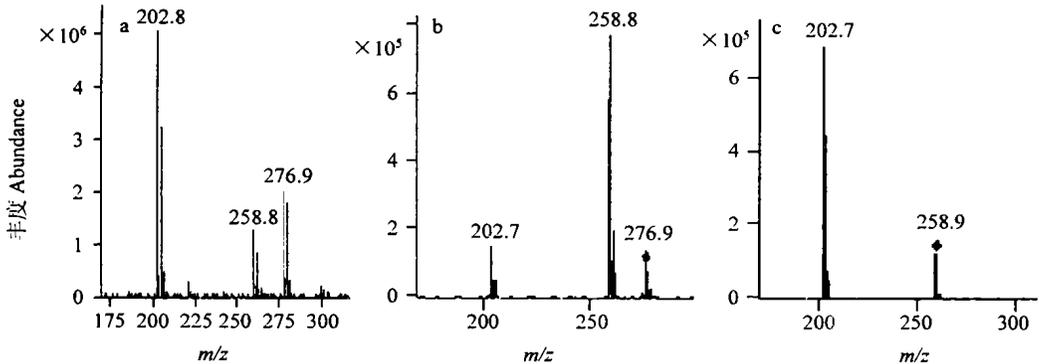


图 1 克伦特罗的电喷雾质谱

Fig.1 Mass spectra (MS) of clenbuterol

a. 克伦特罗的电喷雾质谱(full scan MS of clenbuterol); b. m/z 277 的二级质谱(electrospray ionization (ESI)/MS/MS of m/z 277); c. m/z 259 的二级质谱(ESI/MS/MS of m/z 259)。

3.2 克伦特罗标准溶液的 HPLC-ESI/MS

LC-MS 已发展为对复杂混合组分进行定性定量的有效方法, 对于 LC-MS 技术而言, 流动相中添加的缓冲液和 pH 调节剂应具有挥发性。我们对流动相和色谱分离柱进行优化选择, 确定最佳色谱条件为: 分离柱为 ODS(250 mm × 4.6 mm i. d.); 流动相组成为 MeOH-10 mmol/L NH₄Ac(4555, V/V), 流速为 0.9 mL/min, 检测波长为 243 nm。在最佳的 HPLC-MS 条件下, 克伦特罗标准物质的保留时间大约在 16 min, 而且 UVC (图 2a) 和 TIC (图 2b) 色谱图比较对称。图 2a 保留时间处的质谱示于图 2c, 在 ESI/MS 上克伦特罗的特征离子峰 m/z 277、259 和 203 清晰可见。据此可以对克伦特罗进行更为准确的定性。

在优化的色谱条件下, 对克伦特罗的系列标准溶液(2~100 mg/L) 进行 HPLC-ESI/MS 分析, 用 UV 检测的峰面积 y 对浓度 x 进行线性回归, 得线性方程为 $y = 44.7x + 43.2$ ($n = 6, r = 0.9987$)。其中克伦特罗最低检测浓度为 0.75 mg/L ($S/N = 2$)。

对方法的重复性(RSD)和空白加标回收率进行了考察, 在 5 和 50 mg/L 浓度点, 在肌肉空白里, 3 次测定的平均回收率分别为 96.2% 和 97.3%, RSD 分别为 1.1% 和 1.0%; 在肝脏空白里, 平均回收率分别为 95.1% 和 96.2%, RSD 分别为 2.0% 和 1.7%。

3.3 猪瘦肉和肝脏中的克伦特罗残留检测

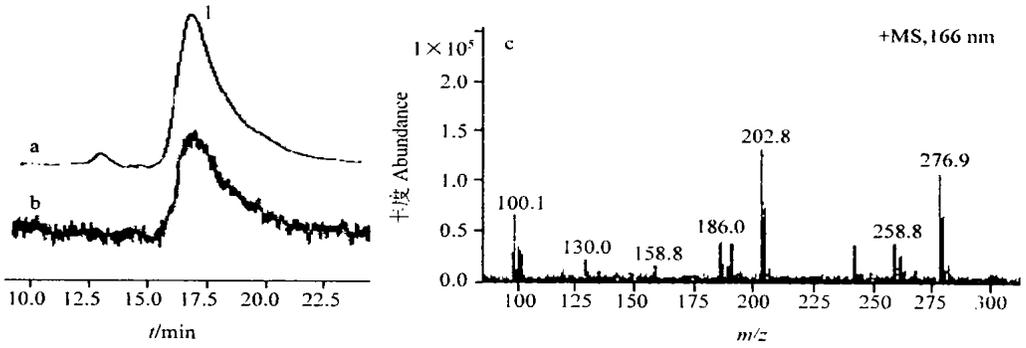


图 2 克伦特罗标准溶液的 HPLC-ESI/MS

Fig. 2 High performance liquid chromatography (HPLC)-ESI/MS of standard solution of clenbuterol
 a. 克伦特罗的紫外检测色谱图(ultraviolet (UV) chromatogram of clenbuterol); b. 克伦特罗的总离子流图(total ion chromatogram (TIC) of clenbuterol); c. a 中保留时间处的 ESI/MS (ESI/MS at retention time of clenbuterol of a). 峰(peak): 1. 克伦特罗(clenbuterol).

用 75% 乙醇水溶液提取猪瘦肉和肝脏中游离的克伦特罗, 提取液中含有较高水平的极性物质。空白实验结果表明, 在选定的 HPLC-MS 条件下, 空白的主要成分在 10 min 内被洗脱, 在 16 min 附近无干扰峰出现。对猪肉(肉 1#、肉 2#、肉 3#)和肝(肝 4#、肝 5#、肝 6#)样品进行 HPLC-ESI/MS 分析, 结果表明: 肉 1#、肉 2#、肉 3# 和肝 5# 的样品中未发现克伦特罗的峰信号, 在相应的质谱上也未发现克伦特罗的特征离子峰。肝 4# 样品, UVC(图 3a)和 TIC(图 3b)有明显的克伦特罗色谱峰出现, 其 MS 的特征离子峰也十分清晰(未列出), 表明克伦特罗残留明显, 测其含量为 $100.2 \pm 5.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($n = 3$)。

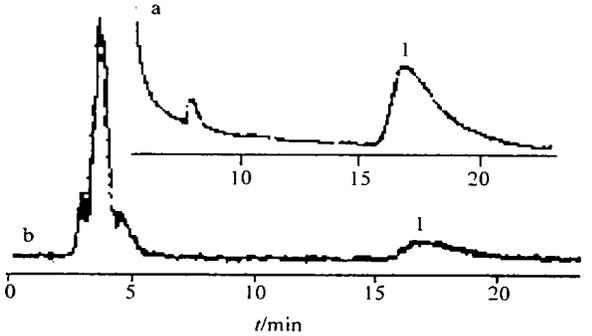


图 3 肝 4# 样品的 HPLC-ESI/MS

Fig. 3 HPLC-ESI/MS of liver 4#
 a. 肝 4# 样品的紫外检测色谱图(UV chromatogram of liver 4#); b. 肝 4# 样品的总离子流图(TIC of liver 4#). 峰(peak): 1. 克伦特罗(clenbuterol).

对于肝 6# 样品, 在 UVC(图 4a)和 TIC(图 4b)上虽未发现明显的色谱峰, 但是在色谱图 16 min 附近的质谱图(图 4c)上发现了克伦特罗的特征离子峰 m/z 277、259 和 203, 这表明克伦特罗的残留量较低, 超出了方法的最低检出限, 但可以确定该检品在屠宰前曾经被饲喂过克伦特罗兴奋剂。

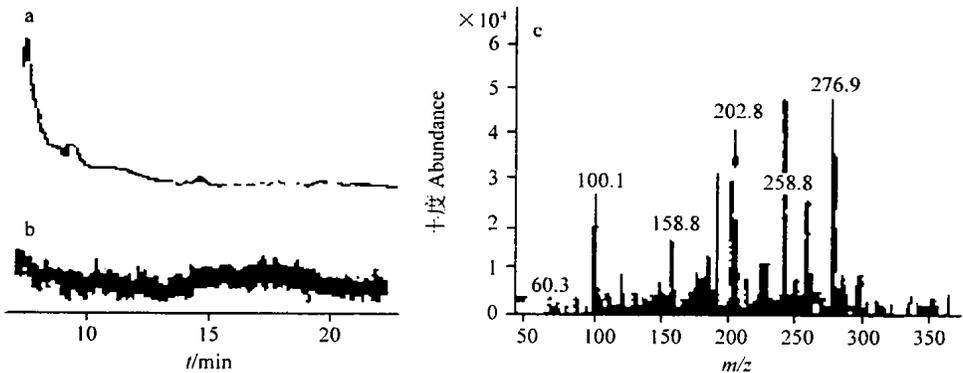


图 4 肝 6# 样品的 HPLC-ESI/MS

Fig. 4 HPLC-ESI/MS of liver 6#
 a. 肝 6# 样品的紫外检测色谱图(UV chromatogram of liver 6#); b. 肝 6# 样品的总离子流图(TIC of liver 6#); c. b 中克伦特罗保留时间处的 ESI/MS (ESI/MS at retention time of clenbuterol of b).

3.4 讨论

对兴奋剂克伦特罗的 ESI/MS 特征离子峰 m/z 277、259 和 203 进行了解析,建立了克伦特罗的 HPLC-ESI/MS 分析方法;利用其 MS 的特征离子峰作为克伦特罗准确性的依据,对实际生物样品猪瘦肉和肝进行检测发现,所检样品中,克伦特罗在肌肉内未发现残留,在肝中的残留浓度较高(或呈阳性),这与克伦特罗在肌肉中代谢较快,在肝中残留周期长的文献报道相一致。所建 LC-ESI/MS 方法在进行克伦特罗低残留检测时,虽然不能给出定量结果,但是可以根据有无特征峰给出较准确的定性(阴性或阳性)结果,为治理克伦特罗的滥用提供直接的证据。

References

- 1 Angeletti R, Paleologo O M, Piro R. *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 275(1-2): 215~ 219
- 2 Wu Shiqing(吴时清), Chen Ru(陈茹), Lin Zhixiong(林志雄), Liu Zhongyong(刘中勇). *Science of Test and Quarantine*(检验检疫科学), **1999**, 9(4): 17~ 18
- 3 Yang Shuming(杨曙明), Gao Sheng(高生), Fan Li(范李), Song Rong(宋荣). *Chin. J. Feed*(中国饲料), **2002**, (10): 15~ 16
- 4 Visser T, Verdenbregt M J. *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 275(1-2): 205~ 214
- 5 *National Standard of PRC*(中华人民共和国国家标准). GB 16869-**2000**
- 6 Huang Hongnan(黄宏南), Fu Wusheng(付武胜), Lin Qing(林清). *Strait J. Prev. Med.* (海峡预防医学杂志), **2002**, 8(1): 51~ 52
- 7 Montrade M P, Le Bizec B, Monteau F. *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 275(1-2): 253~ 268
- 8 Wu Guping(吴谷平). *J. Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2002**, 21(1): 19~ 21
- 9 Wang Jie(王杰), Cai Yun(蔡耘), Sang Zhihong(桑志红), Qian Xiaohong(钱小红), Yang Songcheng(杨松成), Wu Moutian(吴牟天). *J. Chinese Mass Spectrometry Society*(质谱学报), **1999**, 20(2): 17~ 20
- 10 Debrauwer L, Borjes G. *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 275(1-2): 231~ 239

Analysis of Clenbuterol in Pig Liver and Muscle by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Liu Hongxia^{*1}, Zhang Shusheng¹, Zhang Xilin¹, Qu Lingbo¹, Zhao Yufen^{1,2}

¹(Key Laboratory of Chemical Biology, Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

²(The Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry of Ministry of Education, Department of Chemistry, School of Life Sciences and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract For β -agonist clenbuterol, its typical ion peaks at m/z 277, 259 and 203 in electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS) were found and elucidated. The high performance liquid chromatography (HPLC)-ESI/MS method for analyzing the residue of clenbuterol in pig liver and muscle was developed. With the optimal mobile phase of MeOH-10 mmol/L NH₄Ac (4555, V/V) at 0.9 mL/min and the separation column of 250 mm × 4.6 mm i. d. ODS, clenbuterol and the sample blanks can be completely separated with the retention time of 16 min. With 243 nm detection, the linear range was between 2 and 100 mg/L with the detection limit of 0.75 mg/L, the recovery of 95%~ 98% and the RSD less than 2.0%. Using the proposed HPLC-ESI/MS, clenbuterol can be accurately identified with both retention time and the typical ion peaks. The experimental results of the real biologic samples of pig liver and muscle show the residue content of clenbuterol can be accurately determined by ultraviolet detection when the residue of clenbuterol was higher. For the residue of clenbuterol lower than its detection limit, the quantitative result was not able to obtain, however the accurately qualitative result can be made according to its typical ion peaks at corresponding elution time.

Keywords High performance liquid chromatography, electrospray ionization mass spectrometry, clenbuterol, pig liver, pig muscle

(Received 4 June 2003; accepted 19 December 2003)