

# 同位素稀释超高效液相色谱串联质谱法同时测定牛奶中的克伦特罗、氯霉素与己烯雌酚

朱勇, 陈国, 杨挺, 吴银良, 皇甫伟国

(农业部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波), 浙江 宁波 315040)

**摘要:** 建立了同时测定牛奶中克伦特罗、氯霉素和己烯雌酚残留量的同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法。牛奶样品无需蛋白沉淀, 直接经HLB小柱净化及水和正己烷淋洗, 由乙酸乙酯洗脱后进行分析。采用Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub>色谱柱进行分离, 以乙酸铵溶液-乙腈作为流动相进行梯度洗脱, MRM方式测定, 同位素稀释内标法定量。药物分别在0.2~20(克伦特罗)、1.2~100(氯霉素)、2.0~200 μg·L<sup>-1</sup>(己烯雌酚)质量浓度范围内呈良好线性, 相关系数均不低于0.998 5, 克伦特罗、氯霉素和己烯雌酚在牛奶样品中的检出限分别为0.009、0.007、0.04 ng·g<sup>-1</sup>。牛奶中3种药物在0.05~0.10(克伦特罗)、0.30~0.60(氯霉素)、0.50~1.0 ng·g<sup>-1</sup>(己烯雌酚)加标水平下的回收率为94%~107%, 相对标准偏差均小于10%。

**关键词:** 克伦特罗; 氯霉素; 己烯雌酚; 液相色谱串联质谱法; 同位素稀释; 牛奶; 残留

中图分类号: O657.72; TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)04-0430-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.04.015

## Simultaneous Determination of Clenbuterol, Chloramphenicol and Diethylstilbestrol in Bovine Milk by Isotope Dilution Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

ZHU Yong, CHEN Guo, YANG Ting, WU Yin-liang, HUANGFU Wei-guo  
(The Supervision, Inspection & Testing Center of Agricultural Products Quality & Security,  
Ministry of Agriculture, Ningbo 315040, China)

**Abstract:** A method for the determination of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol in bovine milk was developed by isotope dilution ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. Samples were directly purified through HLB cartridge with 5 mL water and 5 mL hexane as washing solution. The analytes were eluted with 15 mL ethyl acetate. Then the eluate was evaporated to dryness at 40 °C under nitrogen and redissolved with 5 mmol·L<sup>-1</sup> of ammonium acetate solution - acetonitrile(90 : 10, by volume). The analytes were analyzed by LC - MS/MS on an Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column using acetonitrile - 5 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate as mobile phase by gradient elution. The mass spectrometer was operated under multiple reaction monitoring(MRM) mode. The samples were quantified by the internal standards labeled with stable isotopes. The calibration curves of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol were linear in the ranges of 0.2 - 20, 1.2 - 100, 2.0 - 200 μg·L<sup>-1</sup>, respectively, with correlation coefficients more than 0.998 5. The limits of detection of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol were 0.009, 0.007, 0.04 ng·g<sup>-1</sup>, respectively. The recoveries of three drugs in bovine milk sample at the fortified levels of 0.05 - 0.10 (clenbuterol), 0.30 - 0.60 (chloramphenicol), 0.50 - 1.0 ng·g<sup>-1</sup> (diethylstilbestrol) were in the range of 94% - 107% with RSDs less than 10%. The method was suitable for the determination of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol residues in bovine milk.

**Key words:** clenbuterol; chloramphenicol; diethylstilbestrol; liquid chromatography - tandem

收稿日期: 2010-09-27; 修回日期: 2011-01-13

基金项目: 宁波市农业攻关资助项目(2010C10008); 宁波市农科院院长基金资助项目(09-12)

通讯作者: 吴银良, Tel: 0574-87928060, E-mail: wupaddyfield@tom.com

mass spectrometry; isotope dilution; bovine milk; residue

牛奶是人类重要的食品之一,对婴幼儿尤其重要,其安全性指标主要体现在微生物、重金属及药物残留等指标方面,其药物残留一般包括农药和抗生素残留。而随着对食品安全要求的不断提高,除抗生素残留外,牛奶中兴奋剂和激素的残留检测也引起了人们的重视。其中克伦特罗(Clenbuterol)、氯霉素(Chloramphenicol)和己烯雌酚(Diethylstilbestrol)是较为重要的3种药物。目前克伦特罗已被我国禁止用于畜牧业生产<sup>[1]</sup>;氯霉素则被规定在所有可食性组织中不得检出,欧盟也制定了最低允许限量 $0.30 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ <sup>[2]</sup>;我国也已禁止己烯雌酚在动物生产中的使用<sup>[1]</sup>,不得在食品中检出。为满足日益增多的检测需求和提高检测效率,有必要建立这3种药物在食品中的同时检测方法。

目前对于克伦特罗、氯霉素和己烯雌酚单个药物或仅包括其中一种药物的多残留分析方法较多,而涉及其中2种药物的报道较少,尚未见有3种药物同时分析的报道。通常用于这3种药物的主要分析手段有酶联免疫吸附法(ELISA)<sup>[3-5]</sup>、气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[6-10]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[11-12]</sup>及高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)<sup>[13-15]</sup>,其中GC-MS和LC-MS/MS为确证方法。GC-MS法需要复杂的衍生化步骤,而LC-MS/MS的前处理则相对简单。本研究建立了牛奶中克伦特罗、氯霉素和己烯雌酚同时分析的LC-MS/MS方法,方法准确、灵敏,能满足牛奶中这3种药物定量分析的需要。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC Xevo™ TQ MS液相色谱串联质谱仪(美国Waters公司),配置电喷雾离子源;固相萃取仪(美国Supelco公司);Sigma离心机。盐酸克伦特罗、氯霉素、己烯雌酚、克伦特罗-D<sub>9</sub>( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和氯霉素-D<sub>5</sub>( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )均购自Dr. Ehrenstorfer;己烯雌酚-D<sub>8</sub>(Cambridge Isotope Lab. Inc)。乙腈、甲醇和乙酸铵为色谱纯;正己烷为分析纯。

### 1.2 仪器条件

Acquity BHE C<sub>18</sub>色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 内径1.7 μm);流动相A为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液, B相为乙腈,梯度洗脱条件:0~1.5 min, 10% B, 1.5~4.0 min, 10%~80% B, 4.0~4.5 min, 80% B, 4.5~4.6 min, 80%~20% B, 4.6~7.0 min, 20% B;流速: $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样量:10 μL;柱温:30 ℃。

质谱条件:ESI源正/负离子模式电离;多反应监测(MRM);毛细管电压:3.0 kV;萃取锥孔电压:20 V;RF透镜电压:0.5 V;离子源温度:150 ℃;脱溶剂气温度:500 ℃;锥孔气流速:50 L · h<sup>-1</sup>;脱溶剂气流速:1 000 L · h<sup>-1</sup>;倍增器电压:650 V;二级碰撞气:氩气(Ar);其它条件见表1。

表1 药物的定性、定量离子对、锥孔电压及碰撞能量

Table 1 Qualitative ion pair, quantitative ion pair, cone voltage and collision energy of drugs

Drug	Qualitative ion pair $m/z$	Cone voltage $U/V$	Collision energy $E/eV$
Clenbuterol(克伦特罗, CLEN)	277.0 > 202.8*, 277.0 > 131.7	22	16, 28
Chloramphenicol(氯霉素, CAP)	321.0 > 151.8*, 321.0 > 257.0	24	18, 12
Diethylstilbestrol(己烯雌酚, DES)	267.2 > 222.1, 267.2 > 237.0*	43	35, 28
Clenbuterol-D <sub>9</sub> (克伦特罗-D <sub>9</sub> , CLEN-D <sub>9</sub> )	286.0 > 204.0	16	22
Chloramphenicol-D <sub>5</sub> (氯霉素-D <sub>5</sub> , CAP-D <sub>5</sub> )	326.0 > 156.9	35	24
Diethylstilbestrol-D <sub>8</sub> (己烯雌酚-D <sub>8</sub> , DES-D <sub>8</sub> )	275.2 > 245.0	35	43

\* quantitative ion pair

### 1.3 样品处理

称取10 g试样(精确至0.01 g)于50 mL离心管中,加入100 μL内标溶液(CLEN-D<sub>9</sub>:  $25 \text{ μg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; CAP-D<sub>5</sub>和DES-D<sub>8</sub>:  $100 \text{ μg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),涡旋30 s,然后移取试样至经5 mL甲醇和5 mL水活化的OASIS® HLB(60 mg, 3 mL)小柱上,待全部样品流过小柱后,先用5 mL水淋洗,抽干小柱,再用5 mL正己烷淋洗,最后用15 mL乙酸乙酯洗脱。洗脱液置于40 ℃水浴中氮气吹干后用500 μL  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵

和乙腈混合溶液溶解, 溶解液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后, 进行 LC-MS/MS 分析。

## 1.4 方法的线性实验

准确称取 CLEN、CAP、DES 和 DES-D<sub>8</sub> 4 种标准品各 10.0 mg 于相应的 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 即得 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准储备液。准确吸取各标准储备液 1 mL 于相应的 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 即得 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准中间液。分别准确移取各标准中间液适量, 配成 0.2、0.5、1.0、5.0、10、20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (CLEN), 1.2、3.0、6.0、20、50、100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (CAP) 及 2.0、5.0、10、25、100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (DES) 的系列标准工作溶液, 其中各工作液中 CLEN-D<sub>9</sub>、CAP-D<sub>5</sub> 和 DES-D<sub>8</sub> 的质量浓度分别为 5、20、20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 液相色谱质谱分析

由于克伦特罗属弱碱性物质, 通常采用 ESI<sup>+</sup> 进行分析; 而对于氯霉素和己烯雌酚, 由于其属弱酸性物质, 通常采用 ESI<sup>-</sup> 进行分析。为使 3 种药物均能达到良好的电离效果, 以乙腈-乙酸铵溶液 (10:90) 为溶解液, 用蠕动泵 (20  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 对这 3 种药物和相应内标的质谱条件进行优化。结果表明, 乙酸铵浓度超过 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 DES 的响应显著下降, 但乙酸铵浓度为 0 时 CLEN 和 CAP 的响应也有一定程度下降, 而乙酸铵浓度为 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 3 种药物的响应均较好。优化的质谱条件见“1.2”和表 1。在上述色谱质谱条件下, 标准溶液、空白样品和加标样品的 MRM 色谱图见图 1。从图中可见, 3 种药物的峰形均较好, 未见明显的干扰峰。

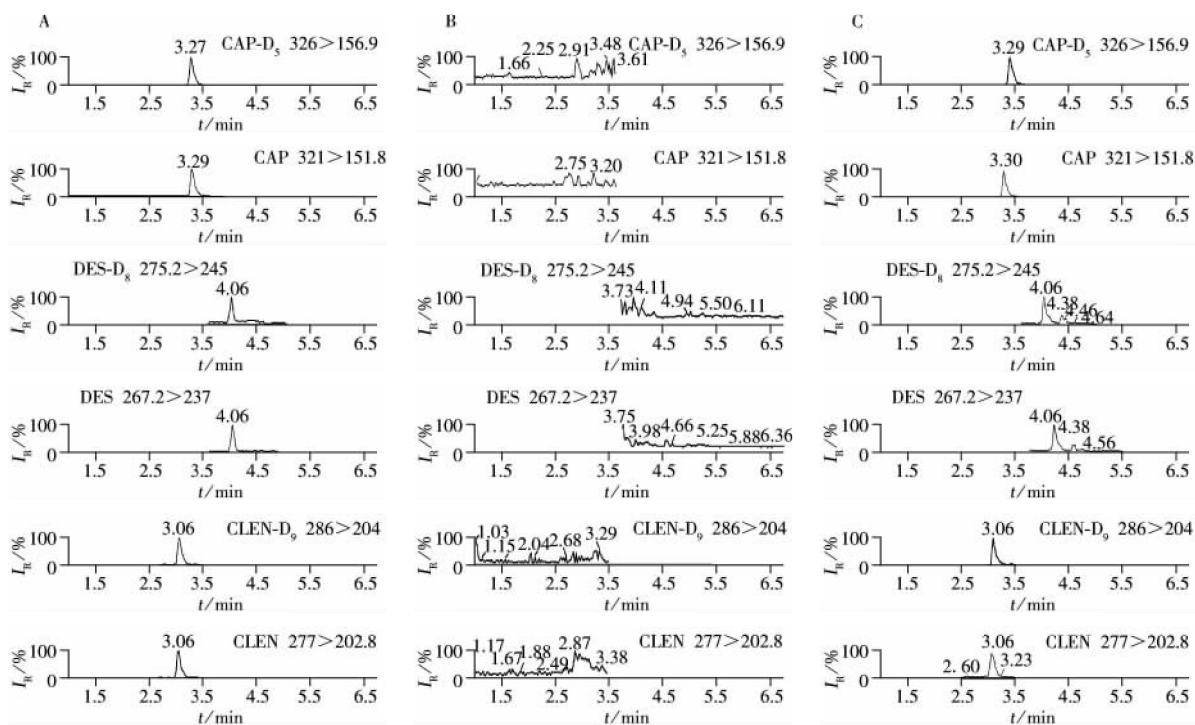


图 1 标准溶液(A)、牛奶空白样品(B)和牛奶添加样品(C)的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of standard solution(A), bovine milk blank sample(B) and fortified bovine milk sample(C)

A: the concentrations of CLEN, CAP, DES, CLEN-D<sub>9</sub>, CAP-D<sub>5</sub> and DES-D<sub>8</sub> were 1.0, 6.0, 10.0, 5.0, 20.0, 20.0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively; C: the fortified levels of CLEN, CAP, DES, CLEN-D<sub>9</sub>, CAP-D<sub>5</sub> and DES-D<sub>8</sub> were 0.05, 0.30, 0.50, 0.25, 1.0, 1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively

### 2.2 提取净化方法的选择与优化

目前, 牛奶中药物残留的分析通常需经复杂的蛋白沉淀步骤后再经固相萃取净化。而牛奶为液体样品, 可直接进行固相萃取净化; 研究发现当用 HLB 和 C<sub>18</sub> 小柱进行净化时, 牛奶样品过柱速度达 1~2  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 而净化克伦特罗常用的 SCX 和 MCX 小柱易发生堵塞现象。

根据 Li 等<sup>[16]</sup>建立的牛奶中地塞米松和倍他米松残留量的前处理方法, 考察了 HLB 和 C<sub>18</sub> 小柱

(500 mg, 3 mL)对牛奶中 CLEN、CAP 和 DES 3 种药物的净化效果。对于 CAP 和 DES, 当用 5 mL 乙酸乙酯洗脱时, 两种小柱均能达到满意的回收率(大于 90%); 而对于 CLEN, 当分别用 5、10、15、20 mL 乙酸乙酯洗脱时, C<sub>18</sub>小柱的回收率依次为 0、2%~3%、15%~17% 和 31%~34%, 而 HLB 小柱的回收率依次为 62%~65%、87%~90%、93%~97% 和 94%~97%, 因此本实验采用 HLB 小柱进行净化, 洗脱液为 15 mL 乙酸乙酯。

### 2.3 方法的线性范围、检出限、回收率及精密度

从图 1A 中可见, DES 标准溶液图谱中只在保留时间 4.06 min 处出现一个峰, 而从图 1C 中可见约 4.38 min 处出现一个相对较小的峰, 原因是因为 DES 有顺反异构体, 药用的通常为 *trans*-DES, 但在前处理过程中部分 *trans*-DES 转化成 *cis*-DES<sup>[11]</sup>。考虑到本实验中 *cis*-DES 比例较少且采用同位素内标, 定量时仅计算 *trans*-DES 的峰面积。根据“1.4”进行线性实验, 以标准溶液的质量浓度( $x$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )为横坐标, 定量离子对与内标物离子对的峰面积比值( $y$ )为纵坐标, 绘制标准线性, 方法的线性范围、线性方程及相关系数见表 2。结果表明本方法适用于这 3 种药物的定量分析。

对 3 种药物在牛奶空白样品中进行了 3 个水平的加标回收实验, 每个水平进行 6 次重复, 实验结果见表 2。从表 2 可见, 牛奶中克伦特罗、氯霉素和己烯雌酚的回收率为 94%~107%。批内相对标准偏差(RSD)为 2.4%~4.5%, 批间 RSD 为 3.9%~5.3%, 结果表明该方法具有较好的准确性和重复性。按 3 倍信噪比计算该方法对克伦特罗、氯霉素和己烯雌酚的检出限分别为 0.009、0.007、0.04  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 2 牛奶中克伦特罗、氯霉素和己烯雌酚的线性、检出限、回收率与相对标准偏差  
Table 2 Linearity, limits of detection, recoveries and RSDs of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol in bovine milk

Drug	Linear range $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Calibration curve	$r^2$	Limit of detection $w/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	Fortified level $w/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	Mean recovery R/%	Intra-assay RSD $s_r$ /%	Inter-assay RSD $s_r$ /%
CLEN	0.2~20	$y=0.2164x+0.0121$	0.9985	0.009	0.05	98, 103, 104	2.4, 3.7, 3.5	4.7
					0.075	101, 104, 98	3.0, 3.9, 4.1	4.9
					0.10	97, 97, 104	2.9, 4.0, 3.5	4.5
CAP	1.2~100	$y=0.0361x+0.0293$	0.9988	0.007	0.30	104, 95, 97	3.2, 4.1, 3.6	4.9
					0.45	97, 107, 105	3.6, 3.0, 2.8	3.9
					0.60	100, 98, 96	3.1, 3.2, 4.2	4.6
DES	2.0~200	$y=0.0559x+0.0671$	0.9992	0.04	0.50	94, 104, 106	3.7, 4.2, 4.0	5.3
					0.75	102, 98, 98	3.1, 2.9, 4.5	3.9
					1.0	98, 98, 105	4.0, 3.5, 3.3	5.0

### 2.4 实际样品的测定

利用该方法对 60 个牛奶样品中的 CLEN、CAP 和 DES 进行测定, 均未检出 CLEN 和 DES, 仅有 2 个样品检出微量的 CAP, 含量分别为 0.03、0.17  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , 未超出欧盟规定的最低允许限量(0.30  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )。

## 3 结论

本文建立了同时测定牛奶中 CLEN、CAP 和 DES 3 种药物的同位素稀释超高效液相色谱串联质谱分析方法。牛奶经 HLB 小柱净化, 洗脱液经氮吹后即可进行仪器分析。牛奶中 CLEN、CAP 和 DES 的加标回收率为 94%~107%, 批内 RSD 为 2.4%~4.5%, 批间 RSD 为 3.9%~5.3%, 检出限分别为 0.009、0.007、0.04  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。方法简单、准确、灵敏, 能满足牛奶中 CLEN、CAP 和 DES 3 种药物残留的同时定量分析。

#### 参考文献:

- [1] 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: 589, 644.
- [2] STIDL R, CICHNA-MARKL M. Sample clean-up by sol-gel immunoaffinity chromatography for determination of chloramphenicol in shrimp[J]. J Sol-Gel Sci Technol, 2007, 41(2): 175-183.
- [3] POSYNIK A, ZMUDZKI J, NIEDZIELSKA J. Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography[J]. Anal Chim Acta, 2003, 483(1/2): 61-67.

- [4] ZHANG S, ZHANG Z, SHI W, EREMIN S A, SHEN J. Development of a chemiluminescent ELISA for determining chloramphenicol in chicken muscle[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(16): 5718 – 5722.
- [5] WANG W J, LING Y, XU T, GAO H B, SHENG W, LI J. Development of an indirect competitive ELISA based on polyclonal antibody for the detection of diethylstilbestrol in water samples[J]. *Chin J Chem*, 2007, 25(8): 1145 – 1150.
- [6] ENGELMANN M D, HINZ D, WENCLAWIAK B W. Solid-phase micro extraction(SPME) and headspace derivatization of clenbuterol followed by GC – FID and GC – SIMMS quantification[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 375(5): 460 – 464.
- [7] 吴银良, 李晓微, 刘素英, 沈建忠, 杨挺. 气相色谱 – 质谱法测定肝脏中盐酸克伦特罗和盐酸莱克多巴胺[J]. *分析化学*, 2006, 34(8): 1083 – 1086.
- [8] SANTOS L, BARBOSA J, CASTILHO M C, RAMOS F, RIBEIRO C A F, SILVEIRA M I N. Determination of chloramphenicol residues in rainbow trouts by gas chromatography – mass spectrometry and liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529(1/2): 249 – 256.
- [9] SAWAYA W N, LONE K P, HUSAIN A, DASHTI B, AL – ZENKI S. Screening for estrogenic steroids in sheep and chicken by the application of enzyme-linked immunosorbent assay and a comparison with analysis by gas chromatography – mass spectrometry[J]. *Food Chem*, 1998, 63(4): 563 – 569.
- [10] 吴银良, 刘素英, 侯东军, 沈建忠, 王海, 单吉浩. 气相色谱 – 质谱法测定动物组织中三种 1, 2-二苯乙烯类药物的残留量[J]. *色谱*, 2006, 24(5): 462 – 465.
- [11] 吴银良, 杨挺, 单吉浩, 皇甫伟国. 高效液相色谱法测定猪尿中克伦特罗对映异构体残留量[J]. *分析化学*, 2010, 38(6): 833 – 837.
- [12] XU Y J, GENG J P, ZHANG X Z, ZHANG S J, TIAN X H, LIU H H. Determination of diethylstilbestrol in aquatic products by high performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Chin J Chem*, 2010, 28(1): 86 – 90.
- [13] XU H, GU L, HE J, LIN A, TANG D. Simultaneous determination of residual stilbenes and stilbene metabolites in animal tissue by liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr: B*, 2007, 852(1/2): 529 – 533.
- [14] THEVIS M, SCHEBALKIN T, THOMAS A, SCHANZER W. Quantification of clenbuterol in human plasma and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Chromatographia*, 2005, 62(7/8): 435 – 439.
- [15] VAN DE RIET J M, POTTER R A, CHRISTIE – FOUGERE M, GARTH BURNS B. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(3): 510 – 514.
- [16] LI C, WU Y, YANG T, ZHANG Y. Rapid simultaneous determination of dexamethasone and betamethasone in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry with isotope dilution [J]. *J Chromatogr: A*, 2010, 1217(3): 411 – 414.