

## 气相色谱-质谱法测定动物组织及饲料中克伦特罗

贺利民<sup>1</sup>, 苏贻娟<sup>2</sup>, 张嘉慧<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学兽医学院残留中心, 广东 广州 510642;

2. 华南农业大学农学院生态系, 广东 广州 510642)

**摘要:** 在研究各种分析克伦特罗的方法基础上, 建立了合理、可靠、可操作性的气相色谱-质谱联用测定克伦特罗的方法。试样用 0.1 mol/L 高氯酸溶液提取, 提取液用异丙醇-乙酸乙酯(1 : 9, 体积比)萃取, 萃取液浓缩后用 SCX 离子交换固相小柱净化, = 3% 浓氨水甲醇溶液洗脱、浓缩干, 经 N, O 双三甲基硅基三氟乙酰胺衍生后, 进行分析检测。采用选择离子模式检测 ( $m/z$  86, 243, 262, 277), 衍生物的峰面积与样品质量浓度在 5.00 ~ 1 000  $\mu\text{g}/\text{L}$  呈良好的线性关系, 相关系数大于 0.999, 方法最低检出限达 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (或 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ )。猪肝试样和尿样在 1, 10 和 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (或  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 三水平加标平均回收率分别在 73.4% ~ 96.8% 和 84.4% ~ 92.2%, 变异系数在 7.0% ~ 16% 和 6.0% ~ 11%; 猪肉和饲料加标平均回收率分别为 81.5% 和 70.6%, 变异系数为 5.8% 和 4.5%。

**关键词:** 克伦特罗残留; 气相色谱-质谱法 (GC/MS); 固相萃取; 测定

**中图分类号:** O657. 63; R974. 3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-2997(2005)03-168-04

## Detection of Clenbuterol by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry

HE Li-min<sup>1</sup>, SU Yi-juan<sup>2</sup>, ZHANG Jia-hui<sup>1</sup>

(1. Veterinary Drug Residues Center, College of Veterinary Medicine,  
South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

2. Department of Ecology, College of Agriculture, South China Agriculture University,  
Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** A reasonable, reproducible and operational gas chromatographic-mass spectrometry (GC/MS) for detecting clenbuterol was developed through reviewing and evaluating many various determination methods of clenbuterol. The composite sample was extracted with 0.1 mol/L perchlorate solution, centrifuged, neutralized, followed by extracting with isopropanol-ethyl acetate (1 : 9, v/v). After evaporation of organic solvent, the residues was dissolved with potassium dihydrogen phosphate buffer solution, and applied to a SCX cartridge successively. The drug was eluted from the cartridge with 3% ammonia water methanol solution, and the eluate was evaporated to absolute dryness. After toluene and B-

收稿日期: 2005-01-18; 修回日期: 2005-04-23

作者简介: 贺利民(1967~), 男(汉), 湖南益阳人, 副研究员, 硕士, 食品质量与安全专业。E-mail: liminokhe@scau.edu.cn

STFA were added to the residues, the drug was derivatized at 80 °C for 1 h, then cooling, more toluene was added and applied to GC/MS. SIM mode was performed at  $m/z$  86, 243, 262 and 277. The range of linearity was 5.00~1 000  $\mu\text{g}/\text{L}$ , and relevant coefficient was more than 0.999, and the method detection limits were about 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  or 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Recoveries from pig's liver and urine fortified at 1, 10 and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  or 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  were 73.4%~96.8% and 84.4%~92.2% respectively, RSDs were 7.0%~16% and 6.0%~11% respectively, and from swine muscle and feed at 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  were 81.5% and 70.6%, respectively. RSDs were 5.8% and 4.5%, respectively.

**Key words:** clenbuterol; gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS); solid-phase extract; detection

克伦特罗 (clenbuterol) 一般以盐酸盐形式存在和应用,药名为克喘素、双氯醇胺等,是一种强效选择性  $\beta$ -受体激动剂。在养殖业中,用于治疗呼吸道疾病,因具有强烈的促生长作用,能加快脂肪分解,促进蛋白质的合成,故俗称“瘦肉精”。人体过量摄入这种药物会引起中毒,导致人体肌肉震颤、心悸、神经过敏、头痛、目眩、恶心、呕吐、发烧、战栗等症状,因此很多国家已严禁在养殖业中使用此类药物,并制定了其在肉食品中的最高残留限量<sup>[1]</sup>,我国于1997年禁止在动物食品生产中使用。对动物肉食品、肝脏、体液及毛发中克伦特罗的检测,一般是先用免疫检测<sup>[2~5]</sup>,再用气相(液相)色谱-质谱进行确认及定量测定<sup>[6~8]</sup>。气相色谱-质谱(GC/MS)分析动物组织、尿样以及饲料中克伦特罗含量方法较多<sup>[8~13]</sup>,但在样品提取、纯化及测定等方面,各有不尽理想的地方。有的方法步骤多、繁琐,重复性较差;有的在样品制备原理上不太合理,测定回收率低;有的方法除杂质能力低,测定干扰大、检出限较高。本工作拟采用沉淀蛋白强的高氯酸溶液提取克伦特罗,碱化后用优化比率混合有机溶剂进一步萃取纯化,再经SCX强离子交换固相小柱净化,建立GC/MS分析动物组织、尿样、饲料及饲料添加剂等中克伦特罗的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

AUTOSYSTEM GC XL/TURBOMASS型气相色谱-质联用仪:美国 Perkin Elmer 公司产品;KS501 digital 振荡器:德国 IKA 公司产品;UNIVERSAL 32R 台式离心机:德国 Hettich 公司产品;WERKE RV05-ST 旋转蒸发器:德国 IKA 公司产品;固相萃取柱:LC-SCX 型强

离子交换树脂固相小柱(500 mg, 3 mL),美国 Supelco 公司产品。

### 1.2 主要试剂

0.1 mol/L 高氯酸溶液;1 mol/L 的氢氧化钾溶液;0.02 mol/L 乙酸铵溶液( $\text{pH } 5.2$ );异丙醇-乙酸乙酯(10:90,体积比);盐酸克伦特罗标准品:中国药品生物制品检定所提供; $N, O$ -双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA):美国 Supelco 公司产品。所用甲醇、乙酸乙酯等有机试剂和药品均为分析纯;去离子水;

### 1.3 标准溶液配制

准确称取 10.0 mg 盐酸克伦特罗标准品,用甲醇溶解并定容至 10.0 mL,作为标准贮备液,系列标准液使用  $=3\%$  氨化甲醇溶液稀释。

### 1.4 GC/MS 实验条件

**1.4.1 色谱条件** 色谱柱:HP-5MS 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu\text{m}$ );进样口温度:250

;无分流进样,进样量 2.0  $\mu\text{L}$ ;载气(高纯 He)流量 1.3 mL/min。升温程序:初始温度 110 °C,保持 1 min,以 30 °C/min 升温至 210 °C,再以 5 °C/min 升温至 250 °C,然后以 30 °C/min 升温至 280 °C,保持 1 min。

**1.4.2 质谱条件** 电子轰击( $\text{EI}^+$ )离子源;电子能量 70 eV;离子源温度 230 °C;接口温度 280 °C。

### 1.5 分析鉴定

根据克伦特罗三甲基硅醚质谱特征,选择碎片离子  $m/z$  86、243、262、277 进行测定。选择监测离子的相对丰度比作为定性依据,峰面积作为定量依据。

### 1.6 样品处理

**1.6.1 提取** 称取动物组织、饲料各 10 g(准确至 0.01 g)试样于 50 mL 具塞离心管中,加入

0.1 mol/L 高氯酸溶液 15 mL 匀浆, 振荡 30 min, 取出置于 80 ℃ 水浴中加热 30 min, 冷却, 在 10 000 r/min 下离心 15 min, 倾出上清液, 沉淀再用 0.1 mol/L 高氯酸溶液 5 mL 洗涤, 离心, 合并上清液。上清液用 1 mol/L 的氢氧化钾溶液调 pH 至 9~10, 加入 20 mL 异丙醇-乙酸乙酯, 置于振荡器上振荡提取 20 min, 离心, 用吸管小心将上层有机相移至梨型烧瓶中。水层再用 20 mL 异丙醇-乙酸乙酯提取一次, 合并有机相, 于 60 ℃ 在旋转蒸发器上浓缩至干。用 0.02 mol/L 乙酸铵溶液少量多次洗脱溶解残留物, 转移到 5 mL 具塞刻度离心管中, 用乙酸铵溶液定容至刻度, 在 3 000 r/min 下离心 5 min, 供净化。

**尿液制备:** 分取尿液 5 mL, 加入 0.1 mol/L 高氯酸溶液 20 mL, 振荡提取 30 min, 取出置 80 ℃ 水浴中加热 30 min, 冷却, 在 10 000 r/min 下离心 15 min, 倾出上清液。其余步骤同上。

**1.6.2 净化** 安装好 SCX 固相萃取小柱, 依次用 5 mL 甲醇、3 mL 水和 0.03 mol/L 盐酸溶液 3 mL 活化, 取适量样品溶液至 SCX 柱中, 依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗柱子。在溶剂流过固相萃取柱后, 保持抽气(或 1 000 r/min)5 min 使柱中液体逐渐枯竭。用 3% 氨化甲醇溶液 6 mL 淋洗 SCX 柱, 收集流出液。

**1.6.3 衍生** 用氮气小心吹干流出液, 于 80 ℃ 脱水 10 min 后, 加入 100 μL 甲苯溶解残渣, 加入 100 μL 衍生剂 BSTFA, 涡旋混匀, 于 80 ℃ 衍生 1 h。克伦特罗标准使用液做同步衍生。冷却后用甲苯定容到适当体积, 供气相色谱-质谱分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 克伦特罗三甲基硅烷化衍生物的定性

克伦特罗的化学结构式如图 1(b) 所示, 含有一个羟基, 用 BSTFA 衍生生成的克伦特罗三甲基硅烷化衍生物经气相色谱-质谱分析, 在用保留时间定性的同时, 根据选择监测离子  $m/z$  86、243、262、277 的相对强度进一步确认, 其 SIM 图及质谱图示于图 1。

图 1(a) 中从上至下依次为克伦特罗标样和空白猪肉、猪尿、猪肝及空白饲料样品的 SIM 总离子流色谱图, 7.19 min 处为克伦特罗三甲基

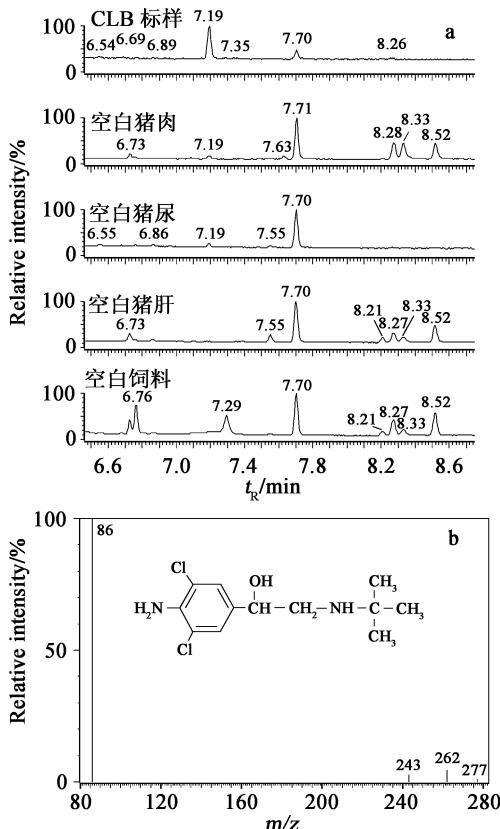


图 1 克伦特罗衍生物的(a) SIM 色谱图与(b) 质谱图

Fig. 1 (a) SIM chromatogram and  
(b) mass spectrum of clenbuterol derivative

硅醚峰, 进一步确证其他主要峰为脂肪酸和氨基酸的三甲基硅烷化衍生物。图 1(b) 质谱图中  $m/z$  86 的碎片峰为基峰, 是克伦特罗衍生物 - 裂解产物; 在高质荷比处选择的 3 个强度较弱的特征碎片离子分别是衍生物断裂重排后的碎片离子:  $m/z$  262、277 和 243。

### 2.2 萃取剂异丙醇-乙酸乙酯比率的优化

在相关文献中<sup>[9,12]</sup>, 异丙醇-乙酸乙酯的比率都选择 40:60(体积比)。考虑到异丙醇在水中溶解较大, 实际中萃取剂较多分配到水相, 并在第二次萃取时, 不出现分层现象, 加过量氯化钠进行盐析, 浓缩时产生大量盐, 影响残渣溶解和固相小柱净化。为此, 进行了 V(异丙醇):V(乙酸乙酯)按 10:90、20:80、30:70、40:60 等 4 种比率的萃取实验(示于图 2)。实验结果表明, V(异丙醇):V(乙酸乙酯)按 10:90 配制作为萃取剂, 可大大提高回收率, 且在旋转蒸发时不会产生泡沫, 残渣中盐也很少。

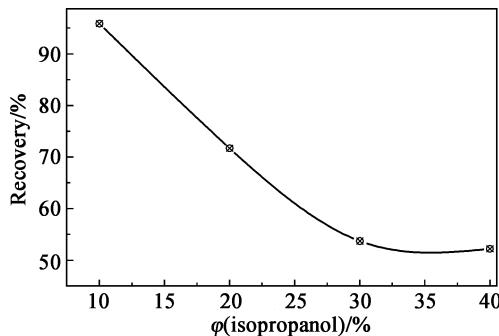


图2 异丙醇-乙酸乙酯比率  
对克伦特罗回收率的影响

Fig. 2 Effect of ratio of isopropanol  
to ethyl acetate on recovery of clenbuterol

### 2.3 固相萃取条件的选择

用0.1 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液溶解浓缩残渣,采用SPE净化,回收率在60%左右。而采用文献[9]方法提取,提取液浓缩后用文献[10, 12]方法中的0.02 mol/L 乙酸铵溶液溶解浓缩残渣,选择SCX型强离子交换树脂为固相净化柱,按1.6.2处理,既实现了净化目的,又获得了高的回收率。试验表明,采用单一SCX小柱净化较C<sub>18</sub>与SCX串联双柱净化不仅具有更好的可操作性,而且平行稳定性也大大提高。

### 2.4 衍生化的改进

吹干的淋洗液残渣,衍生前在80℃干燥10 min,衍生剂减少至50 μL,衍生反应后直接用甲苯定容到适当体积,衍生物在4℃保存,一周内稳定(表1)。

表1 10.0 μg/L 克伦特罗三甲基硅醚衍生物的稳定性

Table 1 Stability of clenbuterol-TMS derivative

t/d	0	1	2	4	6	8
(found)/ (μg · L <sup>-1</sup> )	9.97	9.99	10.2	9.96	9.92	9.86

### 2.5 线性范围

配制0.5.00、25.0、125、250和1 000 μg/L 的盐酸克伦特罗系列标准溶液,各准确量取1 mL,按上述衍生化步骤衍生、测定。以标准溶液浓度为横坐标,选择监测离子色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。实验表明,衍生物的峰面积与其质量浓度在5.00~1 000 μg/L 呈良好的线性关系,相关系数大于0.999。

### 2.6 回收率实验

对猪肝脏及尿液进行了1、10、100 μg/kg (或μg/L)三个水平的添加实验(列于表2);对猪肉、饲料进行了10 μg/kg 水平添加实验(列于表2)。

表2 样品添加回收率试验(n=5)

Table 2 Recoveries of clenbuterol  
from spiked samples(n=5)

Samples	Added Level/ (μg · kg <sup>-1</sup> )	Recovery/ %	RSD/ %
Liver	1.00	82.0	16
	10.0	96.8	8.6
	100	73.4	7.0
Urine	1.00	86.4	8.6
	10.0	92.2	6.0
Pork muscle	10.0	84.4	11
	100	81.5	5.8
Feedstuffs	10.0	70.6	4.5

### 2.7 检出限

选择盐酸克伦特罗的添加水平,使测定响应值峰高是噪音的3倍左右,折算为3倍信噪比时,动物组织、饲料中克伦特罗的最低检出限为1 μg/kg,尿液中为1 μg/L。

## 3 结论

本研究在分析、总结多种克伦特罗测定方法的基础上,通过方法学研究实验,建立了灵敏、准确、可靠、可操作性的GC/MS测定可食性动物组织、尿样、饲料及饲料添加剂等中克伦特罗的方法。

## 参考文献:

- [1] 刘国艳,柴春彦. 动物性产品盐酸克伦特罗(瘦肉精)检测方法研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2002, 19(4): 31~34.
- [2] 康笑枫,徐淑元,秦晓霜. 动物组织中盐酸克伦特罗的快速检测[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(3): 70~73.
- [3] Elliott CT,Crooks SR,Mccaughey WJ. Development of a Rapid Screening Test to Detect -Agonists Residues in Bovine and Hair[J]. Vet Rec, 1995, 137:643~644.

(下转第174页)

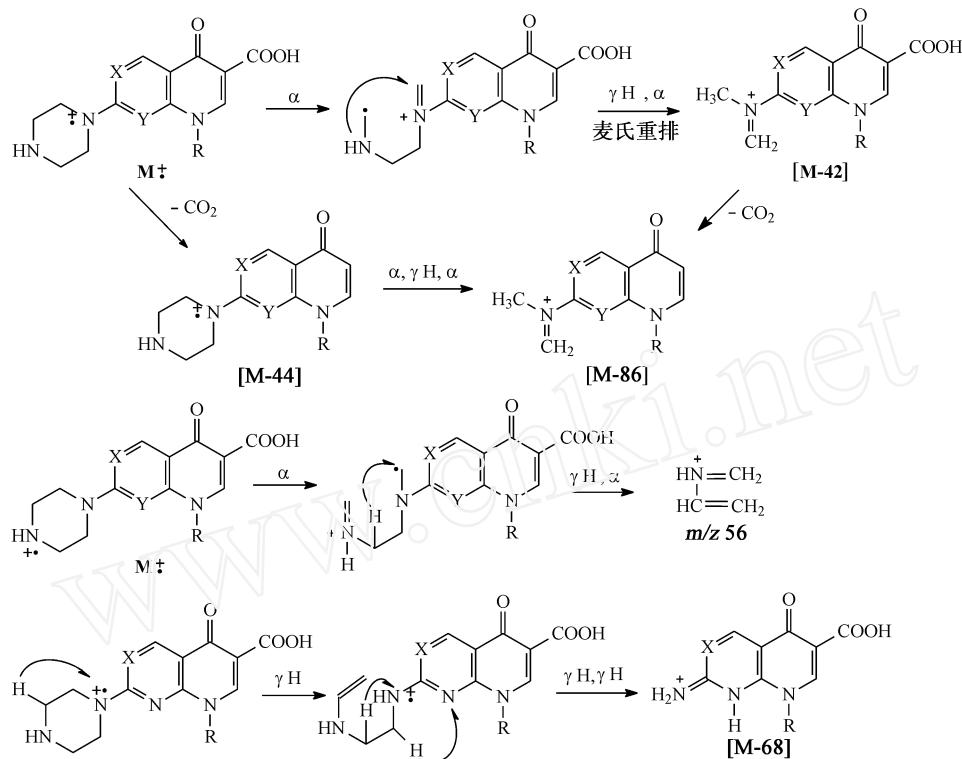


图 2 化合物 A、B、C 的裂解方式

Fig. 2 Proposed fragmentation pathway of compound A, B and C

## 参考文献：

- [1] 洪山海. 光谱解析法在有机化学中的应用 [M]. 科学出版社, 1981. 271~273.
- [2] Nishino T, Gotoh N, Ishimura T, et al. Bacteriological Evaluation on a New Synthetic Antimicrobial Agent Amr-715[J]. Chemotherapy, 1981, 29 (S-4): 27~30.
- [3] Kouno K, Inoue M, Mitsuhashi S. In Vitro and in Vivo Antibacterial Activity of AT-2266 [J].

Chemotherapy, 1984, 32 (S-3): 1~5.

- [4] 熊雁琼, 余兰香, 刘京芳, 等. 新型喹诺酮类抗菌剂 IMB-86001 的药效学研究 [J]. 中国新药杂志, 1992, 1(1): 6~10.
- [5] 张致平. 喹诺酮类抗菌药研究的进展 (一) [R]. 中国新药杂志, 1992, 1(1): 16~22.
- [6] 余志立, 安明. 7-哌嗪喹诺酮类化合物的质谱研究 [J]. 质谱学报, 1998, 19(4): 34~35.

(上接第 171 页)

- [4] Poleccio A, Segara J, Comzalez G, et al. Clenbuterol and -Agonistic Drugs Detected in Hair of Treated Animals by ELISA [J]. Clin Chem, 1995, 41: 945~946.
- [5] 王选年, 杨艳艳, 邢广旭. 盐酸克伦特罗单抗快速检测试剂盒的研制 [J]. 中国兽医学报, 2004, (1): 74~78.
- [6] 李永香, 李志岭, 明佳佳, 等. 气质联机测定不同样品中盐酸克伦特罗 [J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(4): 445~446.
- [7] 王树槐, 门立强, 刘棋. 液质联用 (LC/MS) 定性及定量检测猪视网膜组织中盐酸克伦特罗残留量方法研究 [J]. 现代仪器分析, 2003, (1): 41~43.
- [8] Abukhalaf J K, Deutsch D A, Parks B A, et al. Comparative Analytical Quantitation of Clen-

buterol in Biological Matrices Using GC-MS and EIA [J]. Biomed Chromatography, 2000, 14: 99~105.

- [9] 动物性食品中克伦特罗残留量测定 [S]. GB/T 5009.192—2003.
- [10] 动物组织中盐酸克伦特罗的测定 [S]. NY/T 468—2001.
- [11] 饲料中盐酸克伦特罗的测定 [S]. NY/T 438—2001.
- [12] 猪尿中盐酸克伦特罗的测定 [S]. NY/XQ 421—2003.
- [13] 谢孟峡, 刘媛, 蒋敏. 固相萃取-气相色谱-质谱分析肉样中盐酸克伦特罗的残留量 [J]. 分析化学, 2002, (11): 1308~1311.