

气相色谱-质谱法测定动物组织及饲料中克伦特罗

贺利民¹, 苏贻娟², 张嘉慧¹

(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 $\mu\text{g/L}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ (或 1 $\mu\text{g/L}$)。猪肝试样和尿样在 1、10 和 100 $\mu\text{g/kg}$ (或 $\mu\text{g/L}$) 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-min¹, SU Yi-juan², ZHANG Jia-hui¹

(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 $\mu\text{g/L}$, and relevant coefficient was more than 0.999, and the method detection limits were about 1 $\mu\text{g/kg}$ or 1 $\mu\text{g/L}$. Recoveries from pig's liver and urine fortified at 1, 10 and 100 $\mu\text{g/kg}$ or 1 $\mu\text{g/L}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 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 β_2 -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^[1],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^[2~5],再用气相(液相)色谱-质谱进行确认及定量测定^[6~8]。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^[8~13],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-质谱联用仪:美国 Perkin Elmer 公司产品;KS01 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(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 % 氯化甲醇溶液稀释。

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 \times 0.25 mm \times 0.25 μm);进样口温度:250 °C;无分流进样,进样量 2.0 μL ;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(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 °C 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 °C 在旋转蒸发器上浓缩至近干。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 °C 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% 氯化甲醇溶液 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 °C 脱水 10 min 后,加入 100 μ L 甲苯溶解残渣,加入 100 μ L 衍生剂 BSTFA,涡旋混匀,于 80 °C 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

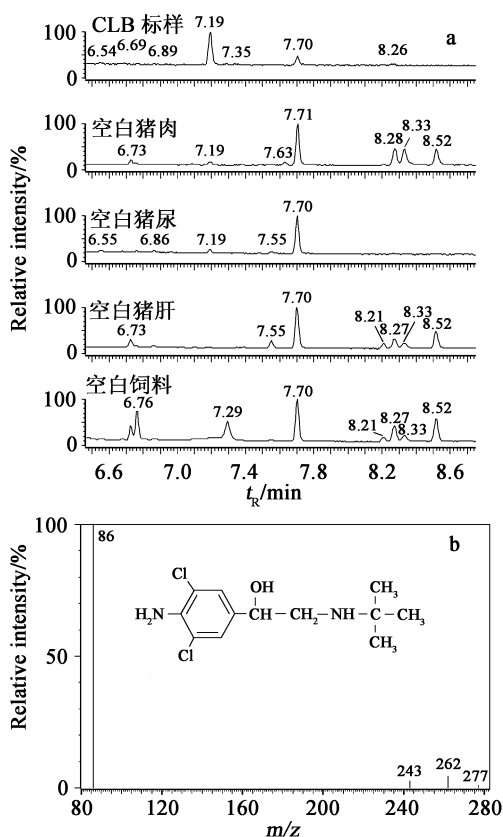


图 1 克伦特罗衍生物的(a)SIM 色谱图与(b)质谱图

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^[9,12],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。

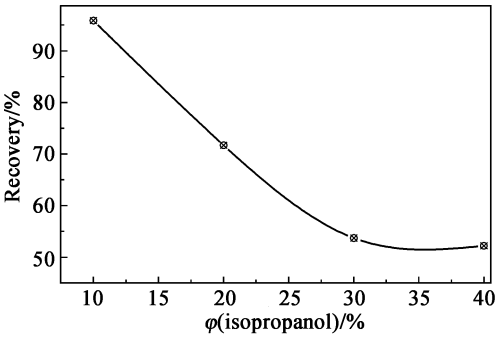


图 2 异丙醇-乙酸乙酯比率
对克伦特罗回收率的影响
Fig. 2 Effect of ratio of isopropanol
to ethyl acetate on recovery of clenbuterol

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 C₁₈ 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,衍生产物在 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 ⁻¹)	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 ⁻¹)	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	100	84.4	11
	10.0	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 α -Agonists Residues in Bovine and Hair[J]. Vet Rec, 1995,137:643~644.

(下转第 174 页)

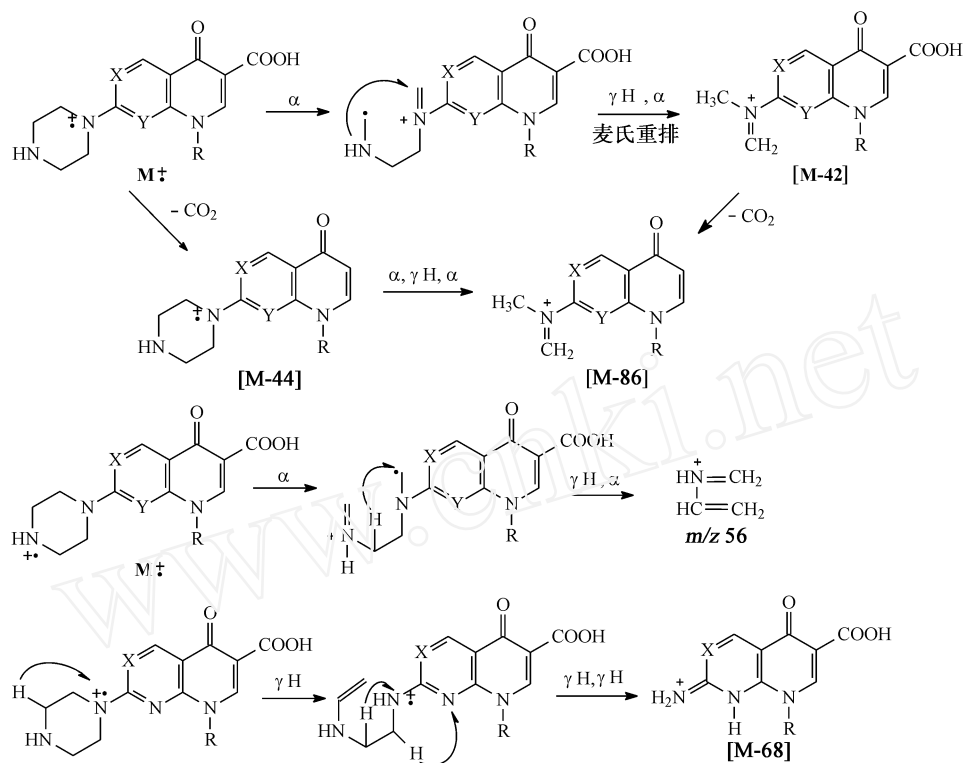


图 2 化合物 A、B、C 的裂解方式

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 Anr715[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] Poleccioi A, Segara J, Comzalez G, et al. Clenbuterol and α -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. 气质联用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 Clenbuterol 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/T 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.