

气相色谱-质谱法同时测定动物尿样中莱克多巴胺和克伦特罗

应永飞¹, 皮雄娥², 吴平谷³, 陈慧华¹, 朱聪英¹, 陆春波¹

(1. 浙江省畜产品质量安全检测中心, 浙江 杭州 310020; 2. 浙江省农业科学院植物保护与微生物所, 浙江 杭州 310021;
3. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310020)

摘要:建立了固相萃取-气相色谱-质谱法(SPE-GC/MS)同时测定动物尿样中的莱克多巴胺和克伦特罗的方法。试样中的药物经乙酸乙酯提取后,经 SLH 固相萃取柱净化,氮吹至干,衍生化后进行气相色谱-质谱测定。两种药物的检出限均为 0.3 $\mu\text{g/L}$,定量限均为 1.0 $\mu\text{g/L}$,线性范围为 0.02~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。加标浓度在 4.0~20.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内,莱克多巴胺加标回收率为 78.6%~101.2%,批内相对标准偏差 \leq 7.0%;克伦特罗加标回收率为 92.3%~112.2%,批内相对标准偏差 \leq 6.9%。

关键词:固相萃取-气相色谱-质谱法;莱克多巴胺;克伦特罗;残留量;动物尿样

中图分类号:O657.63;R974.3 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2006)02-74-05

Simultaneous Determination of Ractopamine and Clenbuterol Residues in Animal Urine with Gas Chromatography-Mass Spectrometry

YING Yong-fei¹, PI Xiong-e², WU Ping-gu³, CHEN Hui-hua¹, ZHU Cong-ying¹, LU Chun-bo¹

(1. Animal Products Quality Testing Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310020, China;

2. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academic of Agriculture Science, Hangzhou 310021, China;

3. Disease Prevent and Control Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310020, China)

Abstract: A new solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPE-GC/MS) method for simultaneous determination of ractopamine and clenbuterol in animal urine was reported. The drugs were extracted with ethyl acetate from sample. The extraction was evaporated at 40 °C. After the residue was dissolved in ethyl acetate, it was purified by passing through SLH solid-phase extraction (SPE) cartridges. The eluate was evaporated by nitrogen blow and derivatized with BSTFA, and then assayed by GC/MS. The limits of detection (LOD) were 0.3 $\mu\text{g/L}$, and the limits of quantitation (LOQ) were 1.0 $\mu\text{g/L}$. The calibration curves were linear between 0.02 $\mu\text{g/mL}$ and 1.0 $\mu\text{g/mL}$ for ractopamine and clenbuterol. Recoveries of ractopamine and clenbuterol were 78.6%-101.2% and 92.3%-112.2%, and the intra-relative standard deviation ($n=5$) less than 7.0% and 6.9%, respectively, at spiked levels of 4.0~20 $\mu\text{g/L}$.

Key words: solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPE-GC/MS); ractopamine; clenbuterol; residues; animal urine

莱克多巴胺和克伦特罗属于 β -兴奋剂,具有促进动物体内营养物质由脂肪组织向肌肉组织转移的作用。但是动物在食用含莱克多巴胺和盐酸克伦特罗的饲料后,会造成肌肉及组织中不同程度的残留,人体过量的摄入这种药物会发生中毒等毒副作用。因此,很多国家严禁使用含有此类药物的动物饲料,并制定了其在动物性食品中的最高检出限^[1],我国已经明确将莱克多巴胺和盐酸克伦特罗列入禁用药品目录^[2]。

动物组织中 β -兴奋剂的仪器检测方法主要有高效液相色谱法^[3-5]、气相色谱-质谱法^[6-9]和液相色谱-质谱法^[10-12]。由于 β -兴奋剂在动物体内代谢较快,往往以原形排出体外,检测动物尿样具有取样方便、快速、准确等特点,建立动物尿样中莱克多巴胺和克伦特罗的检测方法,可以对畜产品整个生产过程中使用 β -兴奋剂的现象进行有效监控。本文采用气相色谱-质谱法,建立了动物尿样中两种 β -兴奋剂的残留检测方法,同时进行阳性样品的确证和定量分析。本法测定准确度和精密度高,阳性判定结果准确可靠,检出限和应用范围满足目前国内外检测限量的要求^[1,13]。

1 实验部分

1.1 主要仪器

GC6890N-5973 气相色谱-质谱仪(带自动进样器);美国安捷伦(Agilent)公司产品,配MSD ChemStation 工作站, NIST2.0a 谱库;Sigma 2k15 冷冻离心机;BüCHI B-490 旋转蒸发仪;MS2 minishaker 漩涡混匀器;METTLER AG-285 电子天平;氮吹仪;自制 10 个样位的固相萃取装置。

1.2 主要材料与试剂

盐酸克伦特罗:中国药品生物制品检定所提供;莱克多巴胺:浙江省兽药监察所提供;N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA):美国SPELCO 公司提供;甲苯:色谱纯,美国TEDIA 公司提供;实验用水为 milli-Q 超纯水;其它试剂均为分析纯。固相萃取柱包括聚苯乙烯柱(SLA),硅藻土和硅胶柱(SLH),SCX 柱,C₁₈ 柱,硅胶柱等规格为 100 mg/mL,以上柱子均由杭州富裕科技服务有限公司提供。

1.3 标准溶液的配制

分别精密称取 25 mg 莱克多巴胺和盐酸克伦特罗对照品置于同一 100 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解后定容,摇匀,为对照品储备液,置于 -20 °C 冰箱中保存。使用时用甲醇稀释至所需浓度即可。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱:HP-5MS 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m);升温程序:初始温度 120 °C,保持 3 min,以 15 °C/min 的速率升温至 230 °C,保持 5 min,然后以 15 °C/min 的速率升温至 280 °C,保持 10 min;进样口温度 250 °C;载气(高纯氦)流速:1.0 mL/min;不分流进样,进样量 1 μ L。

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;溶剂延迟时间 10 min;采用选择离子监测(SIM)模式进行检测,具体条件见表 1。

1.5 样品处理

1.5.1 试样提取 量取动物尿样 10.0 mL 至 50 mL 聚丙烯离心管中,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 10.0±0.1,摇匀后加入 1 g 氯化钠,轻摇数秒,加 10 mL 乙酸乙酯提取,涡旋 2 min,中速振荡 10 min,7 000 r/min 离心 5 min,取上清液经无水硫酸钠过滤,收集于 50 mL 鸡心瓶中;另取 10 mL 乙酸乙酯重复提取一次。用 2 mL 乙酸乙酯洗涤无水硫酸钠,提取液旋转蒸发至干。

1.5.2 试样净化 固相萃取柱先经 5 mL 乙酸乙酯润洗;用 2 mL 乙酸乙酯溶解鸡心瓶中的残留物,过 SLH 固相萃取柱;另取 5 mL 3% 甲醇/乙酸乙酯洗涤鸡心瓶中的残留物一次,过柱;再用 5 mL 50% 甲醇/乙酸乙酯洗脱,收集洗脱液于 5 mL 具塞玻璃试管中,氮气吹至干。

1.5.3 试样衍生和检测 加 0.1 mL BSTFA 于 1.5.2 所得剩余物中,加盖并于漩涡混合器上涡旋振荡 1 min,密封后在 80 °C 的烘箱中衍生 1.0 h,冷却后氮气吹至干,加入 0.2 mL 甲苯溶解,进行 GC/MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 质谱定性定量分析

由于莱克多巴胺和克伦特罗都是沸点较高的极性物质,且都含有—OH 结构,直接采用气相色谱进行分离较为困难。为了改善其气相色谱性质,在进行仪器检测前必须对样品进行衍生化。莱克多巴胺和克伦特罗经 BSTFA 衍生化后,所含羟基上的氢均被三甲基硅烷(TMS)所取代,此时的色谱行为良好。衍生化后莱克多巴胺和克伦特罗的质谱图见图 1,由质谱图可知,莱克多巴胺的衍生物在 m/z 179、250、267、502 有特征离子,这些碎片离子的比例关系可用于莱克多巴胺的定性分析。定量离子采用 m/z 250, 因为此特征离子有一定的丰度,而且受杂质的干扰较少。克伦特罗的衍生物在 m/z 86、243、262、277 有特征离子,这些碎片离子的比例关系可用于克伦特罗的定性分析。定量离子采用 m/z 86, 因为此特征离子丰度最高,有助于提高

检测的灵敏度。由于莱克多巴胺和克伦特罗的色谱保留时间相差较大,8 个监测离子分为两组进行扫描,以提高检测的灵敏度。表 1 是莱克多巴胺和克伦特罗的保留时间和质谱条件。

2.2 线性方程和检测限

按 1.4 建立的仪器条件,取浓度范围在 0.02 ~ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的莱克多巴胺和克伦特罗混合标准溶液各 0.2 mL,氮气吹干后,按 1.5.3 的方法衍生后进行 GC/MS 分析。分别以 m/z 250 和 m/z 86 离子的峰面积对浓度作图,所得标准曲线方程分别为: $Y=2\ 766X-18.28$ 和 $Y=4\ 271X-38.82$, 相关系数 r 分别为 0.997 4 和 0.998 1。

以 3 倍信噪比为检出限(LOD),计算得到试样中莱克多巴胺和克伦特罗的检出限为 0.3 $\mu\text{g/L}$, 均优于文献报道^[7-8]。

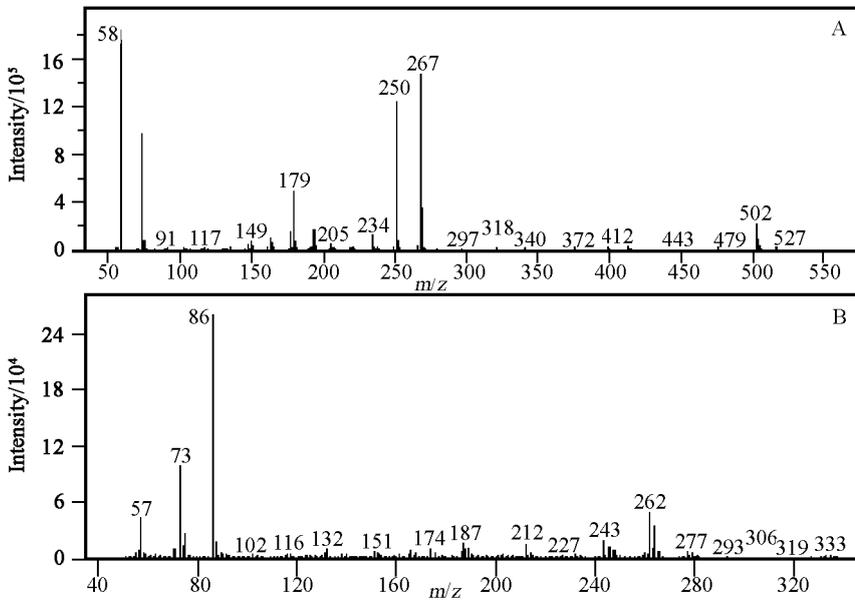


图 1 (A)莱克多巴胺和(B)克伦特罗的 EI-MS 谱

Fig. 1 EI mass spectra of (A) ractopamine and (B) clenbuterol

表 1 莱克多巴胺和克伦特罗的保留时间和质谱条件

Table 1 GC retention time and optimized MS conditions for ractopamine and clenbuterol

化合物 Compound	开始时间 Start time t/min	保留时间 Retention time t_R/min	甲基化数 TMS number n	选择离子 Selected ions m/z	定量离子 Quantification ion m/z
莱克多巴胺 ractopamine	13	19.55	3	250, 267, 179, 502	250
克伦特罗 clenbuterol	10	11.07	1	86, 243, 262, 277	86

2.3 固相萃取条件的确立

2.3.1 固相萃取柱的选择 目前,兽药残留检测中最常用的净化手段是固相萃取(SPE)法,用于 β -兴奋剂净化的固相萃取柱有硅藻土、 C_8 、 C_{18} 、硅胶、阳离子交换柱、DAU 柱等。本课题组对 SLA、SLH、SCX、 C_{18} 、硅胶 5 种 SPE 净化柱除杂及过柱回收率进行了比较,结果见表 2。

经过以上比较,选择 SLH 型 SPE 柱作为动物尿样中莱克多巴胺和克伦特罗净化柱,样品提取物经过 SLH 柱净化后,可以达到较好的净化效果,过柱回收率在 85% 以上。

2.3.2 固相萃取条件的确定 固相萃取柱先经 5 mL 乙酸乙酯润洗和活化。用 2 mL 乙酸乙酯溶解鸡心瓶中的残余物,淋洗液过 SLH 固相萃取柱。用 3% 甲醇/乙酸乙酯溶液淋洗柱子,当淋洗液为 5 mL 时回收率较高,而且杂质干扰较少。然后用 50% 甲醇/乙酸乙酯溶液洗脱收集,先用 5 mL 洗脱液洗脱,另取 5 mL 洗脱液重复一次,同法检测,未发现莱克多巴胺和克伦特罗,说明 5 mL 可以将吸附在柱子上的莱克多巴胺和克伦特罗完全洗脱。故理想的淋洗液用量为 3% 甲醇/乙酸乙酯溶液 3 mL,洗脱液用量为 50% 甲醇/乙酸乙酯溶液 5 mL。

图 2 是莱克多巴胺和克伦特罗对照品、空白加标样品和空白样品的总离子流(TIC)图。此

时,上机液中莱克多巴胺和克伦特罗的浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (即加标量为 4 $\mu\text{g}/\text{L}$)。

2.4 重复性试验

取同一批号的空白动物尿样,加适量混合标准工作液,使莱克多巴胺和克伦特罗的加标量在 1.0~20 $\mu\text{g}/\text{L}$,按 1.5 项下的方法处理后进行分析。每个浓度点取 5 份样品,求其平均回收率,并计算批内相对标准偏差。表 3 是加标量为 4.0~20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时的回收率结果。

由表 3 的数据可知,动物尿样中莱克多巴胺加标浓度为 4.0~20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,回收率比较稳定。此时的批内相对标准偏差 $\leq 7.0\%$,回收率在 78.6%~101.2%;而克伦特罗的加标量为 4.0~20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,批内相对标准偏差 $\leq 6.9\%$,回收率在 92.3%~112.2%。

2.5 样品分析

应用建立的分析方法,对经酶联免疫(ELISA)法筛选得到的莱克多巴胺阳性样品和克伦特罗阳性样品各 10 份进行测定,其中 1 份样品检测出含有克伦特罗,含量为 2.1 $\mu\text{g}/\text{L}$;2 份样品检测出含有莱克多巴胺,含量分别为 26.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 12.9 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。该检测结果表明,本方法能满足我国对动物尿样中莱克多巴胺和克伦特罗进行监控的需要^[13]。

表 2 不同净化柱净化效果比较

Table 2 Comparison of experimental results in different cartridges

	SLA	SLH	SCX	C_{18}	silica gel
recovery/% ractopamine	72.2	92.9	69.5	59.5	62.5
recovery/% clenbuterol	65.3	86.5	76.2	60.2	46.5
去脂 degreasing	clear	clear	clear	unclear	unclear
脱色 decoloring	unclear	clear	unclear	unclear	unclear

表 3 回收率试验结果

Table 3 Recoveries of ractopamine and clenbuterol in different spiked level

化合物 Compound	添加量 Spiked/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 Recovery/%	平均回收率 Mean recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
莱克多巴胺 ractopamine	4.05	89.4,81.7,81.3,88.3,78.6	82.5	5.0
	10.12	90.7,87.1,88.3,91.2,101.2	92.0	7.0
	20.25	96.4,98.5,89.7,100.5,90.2	94.7	5.9
克伦特罗 clenbuterol	4.02	94.5,104.2,98.5,112.2,102.4	104.3	5.5
	10.05	95.6,110.8,101.5,107.2,106.9	106.6	3.8
	20.10	96.5,102.3,92.3,107.9,106.5	102.2	6.9

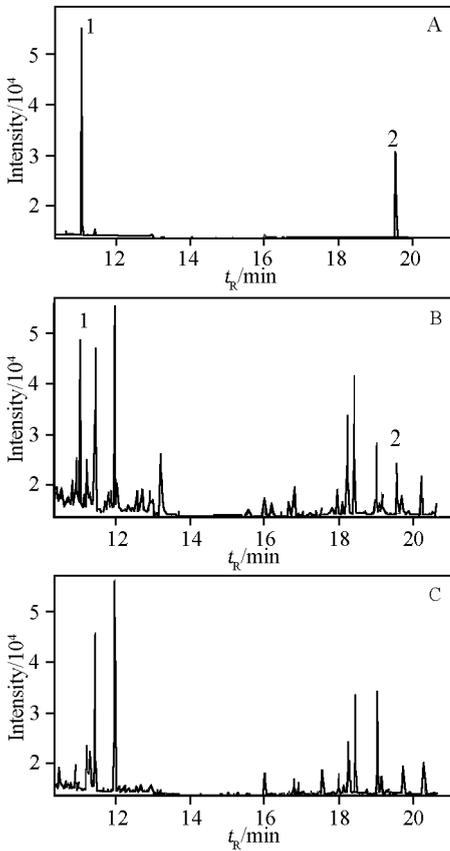


图 2 总离子流图(A)对照溶液;
(B)空白加标样品;(C)空白样品

Fig. 2 TIC of (A) reference, (B) spiked sample
and (C) blank sample

1—克伦特罗 clenbuterol; 2—莱克多巴胺 ractopamine

3 结 论

β -兴奋剂是我国明令禁止使用的药物^[2],但由于这些药物的化学结构差别很大,理化性质不同,要实现 β -兴奋剂的多残留检测难度很大。本文建立了同时测定动物尿样中违禁药物莱克多巴胺和克伦特罗残留量方法,大大缩短了检测时间,节约了检测成本。在本文的色谱条件下,被测样品中的各组分得到较好的分离,出峰时间合适。该方法条件易于控制,结果准确、加标回收率稳定、重现性好,适用于动物尿样中莱克多巴胺和克伦特罗的定性、定量测定。

参考文献:

[1] EC Council directive 96/22/EC of 29 April 1996 (replacement of 88/146/EC). Concerning the Prohibition on the Use in Stock Farming of Substances Having β -Agonist Action, and Repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EC[M]. Off J Eur Commun, 1996, L 125:3.

[2] 农业部,卫生部,国家药品监督管理局. 农业部 176 号公告[M]. 禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录.

[3] Turberg M P, Rodewald J M, Coleman M R. Determination of Ractopamine in Monkey Plasma and Swine Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection [J]. J Chromatogr B, 1996, 675: 279-285.

[4] Poletini A, Montagnana M, Hogendoorn E A, et al. Applicability of Coupled-Column Liquid Chromatography to the Analysis of β -Agonists in Urine by Direct Sample Injection [J]. J Chromatogr A, 1995, 695: 19-31.

[5] Lin L A, Tomlinson J A, Satzger R D. Detection of Clenbuterol in Bovine Retinal Tissue by High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection [J]. J Chromatogr A, 1997, 762 (1-2): 275-280.

[6] 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, 30(11): 1308-1311.

[7] Fernando R, Assuncao Cr, Paulo C, et al. Clenbuterol Food Poisoning Diagnosis by Gas Chromatography-Mass Spectrometric Serum Analysis [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 207-213.

[8] 朱坚,李波,方晓明,等. 气相色谱-质谱法测定肝、肾和肉中 11 中 β -受体激动剂残留量 [J]. 质谱学报, 2005, 26(3): 129-137.

[9] 贺利民,苏娟娟,张嘉慧. 气相色谱-质谱法测定动物组织及饲料中克伦特罗 [J]. 质谱学报, 2005, 26(3): 168-171.

[10] Antignac J P, Marchand P, Bizet B L, et al. Identification of Ractopamine Residues in Tissue and Urine Samples at Ultra-trace Level Using Liquid Chromatography-Positive Electrospray Tandem Mass Spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2002, 774: 59-66.

[11] Shishani E, Chai S C, Jamokha S, et al. Determination of Ractopamine in Animal Tissues by Liquid Chromatography-Fluorescence and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 137-145.

[12] Doerge D R, Churchwell M I, Holder C L, et al. Detection and Confirmation of β -Agonists in Bovine Retina Using LC/APCI-MS [J]. Anal Chem, 1996, 68(11): 1918-1923.

[13] 吴永宁,苗虹,赵云峰,等. GB/T5009.192-2003. 动物性食品中克伦特罗残留量的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.