

# 饲料中盐酸克仑特罗 GC-MS 检测方法研究

范理, 常碧影, 宋荣, 闫慧文

(国家饲料质量监督检测中心, 北京 100081)

摘要:建立了饲料中盐酸克仑特罗气谱-质谱联用检测方法,试样中的盐酸克仑特罗经提取、净化、衍生化,采用 GC-MS 方法测定,外标法定量。研究表明,盐酸克仑特罗的线性范围为 0.05~10 mg/kg,方法回收率为 84.0%~100.1%,最小检出限为 0.01 mg/kg。

关键词:盐酸克仑特罗;衍生化;气谱-质谱联用

## Study on Detection of Clenbuterol in Feed by GC-MS Method

FAN Li, CHANG Bi-ying, SONG Rong, YAN Hui-wen

(National Centre for Quality Supervision and Test of Feed, Beijing 100081)

Abstract: An analytical method for Clenbuterol in feed by gas chromatography-mass spectrum was described. Extract purification was based on Solid-Phase Extract (SPE). The analytcs were derivatized to trimethylsilyl (TMS) and detected by GC-MS and quantitated by external standard method. The linear range is from 0.05 to 10 mg/kg. Recovery is in the range of 84.0%~100.1%. The minimum detectable quantities is 0.01 mg/kg.

Key words: Clenbuterol; Derivative; GC-MS

盐酸克仑特罗(clenbuterol hydrochloride)是一种  $\beta_2$  肾上腺素受体激动药,临床上用于治疗人的支气管哮喘,20 世纪 60 年代初,发现它能促进动物生长,20 世纪 70 年代美国将之引入畜禽生产,确实起到了促进肌肉生长,减少胴体脂肪,改善生产性能的效果,于是它便风行一时,成为世界上应用最广的  $\beta$ -激动素<sup>[1]</sup>。但人们很快就发现,这种人工合成的化学物质在具有很好的口服活性的同时,也有极强的热稳定性和生化稳定性,动物食用后,能在内脏和组织中形成蓄积性残留,人食用了含有这些药物残留的动物组织后,会引起心悸、心痛、手震,对心脏病患者危害更大<sup>[2]</sup>。世界上欧盟等国家已严禁使用,我国农业部也于 1997 年 3 月发布[农牧发(1997)13 号文]郑重禁止使用  $\beta$ -激动素。然而,滥用行为却屡禁不止,以至酿成 1998 年 5 月香港  $\beta$ -激动素事件,造成了巨大经济损失和极坏的政治影响,因此,尽早制定饲料中违禁  $\beta$ -激动素的检测方法,配合国家法律法规严惩这些行为,不仅是保障国民健康的当务之

急,而且是我国加入 WTO,维护国家声誉和扩大对外贸易的当务之急。

国外不少国家制定了监测动物组织、血液、饲料和尿中盐酸克仑特罗和其他  $\beta$ -激动素残留量的方法。目前应用最广的筛选方法有酶联免疫(ELISA)法<sup>[3]</sup>、放射免疫(RIA)法和高效液相色谱(HPLC)法<sup>[4]</sup>,确证法则只有气谱-质谱联用(GC-MS)法<sup>[5-9]</sup>和液谱-质谱联用(HPLC-MS)<sup>[10]</sup>。本方法采用气-质联用法,在气谱定性的基础上,从结构上得到化合物特征碎片离子质谱棒状图,避免了“假阳性”结果而引起的误判和纠纷。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

以下试剂除特别注明者外均为分析纯,水为蒸馏水。

1.1.1 提取液 0.5%偏磷酸溶液(14.29g 偏磷酸溶解于水,并稀释至 1L)  $\diamond$  甲醇 = 80  $\diamond$  20。2 mol/

收稿日期:2000-12-28

基金项目:中国农业科学院院长基金

作者简介:范理(1966-),女,北京市人,副研究员,硕士,主要从事饲料有毒有害物质检测工作。Tel:010-68975911

L 氢氧化钠溶液。

1.1.2 溶剂 乙醚, 甲醇, 甲苯。

1.1.3 无水硫酸钠。

1.1.4 固相萃取 (SPE) 用试剂 30 mg/ml Oasis HLB 固相萃取小柱 (Waters 公司提供) 或同等效果净化柱。

1.1.5 盐酸克仑特罗标准溶液 贮备液: 200 μg/ml, 10.00 mg 盐酸克仑特罗溶于甲醇并定容至 50 ml; 工作液: 2.00 μg/ml, 用微量移液器移取贮备液 500 μl 以甲醇稀释至 50 ml; 标准系列: 用微量移液器移取工作液 25 50 100 500 1 000 μl, 以甲醇稀释至 2 ml, 该标准系列的相应浓度为: 0.025、0.050、0.100、0.500、1.00 μg/ml。

1.1.6 衍生剂 N, O-双三甲基甲硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA)。

1.1.7 仪器、设备 超声水浴; 离心机, 4 000 r/min; 电热块或沙浴: 可控制温度至 50 ~ 70 °C ± 5 °C; 烘箱: 温度可控制在 70 °C ± 5 °C; 气相色谱-质谱联用仪: Fision MD-800 GC-MS Masslab 工作站。

## 1.2 分析步骤

1.2.1 提取 称取样品 5 g, 精确至 0.001 g, 置于 100 ml 三角瓶中, 准确加入提取液 50 ml, 振摇使全部润湿, 放在超声水浴中超声提取 15 min 其间每 5 min 用手振摇 1 次。于离心机上 4000 r/min 下离心 10 min。

1.2.2 净化 准确吸取上清液 10 ml, 置 150 ml 分液漏斗中滴加 2 mol/L 氢氧化钠溶液, 充分振摇, 将 pH 调至 11 ~ 12, 溶液用 30.25 ml 乙醚萃取 2 次, 令醚层通过无水硫酸钠干燥, 用少许乙醚淋洗分液漏斗和硫酸钠, 并用乙醚定容至 50 ml。准确吸取 25 ml 于 50 ml 烧杯中, 置通风橱内, 50 °C 加热块或沙浴上蒸干, 残渣溶于 2 ml 0.02 mol/L 盐酸溶液, 取 1 ml 置于预先已分别用 1 ml 甲醇和 1 ml 去离子水处理过的 SPE 小柱上, 过柱速度不超过 1 ml/min, 再分别用 1 ml SPE 淋洗液-1 (含 2% 氨水的 5% 甲醇水溶液) 和淋洗液-2 (含 2% 氨水的 30% 甲醇水溶液) 淋洗, 最后用甲醇洗脱, 洗脱液置 70 ± 5 °C 沙浴上, 用氮气吹干。

1.2.3 衍生 于净化、吹干的样品残渣中加入 BSTFA 50 μl, 充分涡旋混合后, 置 70 ± 5 °C 烘箱中, 衍生反应 30 min。吹干后溶于 100 μl 甲苯, 即可上机测定。

1.2.4 GC-MS 测定参数设定 色谱柱: DB-5 MS, 30 m × 0.25 mm I. D × 0.25 μm; 载气: He, (高纯氮

99.999%) 载气流速 1 ml/min; 柱头压: 50 KPa; 进样口温度: 260 °C; 进样量: 1 μl, 不分流; 柱温程序: 70 °C 保持 1 min, 以 25 °C/min 速度升至 280 °C, 保持 6 min; EI 源电子轰击能: 70 eV; 检测器温度: 200 °C; 接口温度: 250 °C。质量扫描范围: 60 ~ 400 AMU; 溶剂延迟: 7 min; 检测用克仑特罗三甲基硅烷衍生物的特征质谱峰: m/z = 86 187 243 262。

1.2.5 定性定量方法 定性方法: 样品与标准品保留时间相差不大于 3 s。特征离子基峰百分数与标准品相差不大于 20%。

定量方法: 选择离子监测 (SIM) 法计算峰面积, 单点或多点校准法定量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 克仑特罗的确证

克仑特罗属难挥发性化合物, 欲用 GC-MS 测定必须将其生成易挥发性化合物, 文献报道应用的衍生剂有 N, O-双三甲基甲硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA)、五氟丙酸酐 (PFPA)、六甲基二硅烷 (HMDS)、甲烷硼酸和乙酸酐等, 其中应用最广的还是 BSTFA, 衍生产物为 TMS-克仑特罗, 产生容易辨别的碎片离子 (图 1), 其本身是良好的溶剂, 过量的衍生剂还能除去体系少量水分, 保护衍生产物。克仑特罗 [A] 离子 m/z = 86 为基峰, 欧盟规定必须不少于 4 个特征离子, 才能予以确证。考虑与国际接轨, 我们选择 m/z = 86 187 243 262 等 4 个特征离子, 并规定样品与标准品保留时间相差不大于 3 s。特征离子基峰百分数与标准品相差不大于 20%。图 2 给出了饲料样品中的克仑特罗总离子流图和质谱图。显然, 样品中克仑特罗得到了较好的分离, 其峰前后均未见杂质干扰。如条件允许, 可用 PCI 源进一步确证。其特征离子为 m/z = 349 (M + 1) 351 333 259。

### 2.2 方法的最低检出限

克仑特罗属禁用违规药物, 根据国内外有关报道, 在猪、牛、羊、鸡等产肉动物生产中均有应用, 在配合饲料中的剂量大多在 1 ~ 30 mg/kg 范围内, 个别可低至 0.25 mg/kg, 因此, 评价该检测方法标准的好坏, 最首要的指标当属是否有足够的检测灵敏度, 我们以配合饲料作添加试验证明 GC-MS 法可达 0.01 mg/kg。

### 2.3 方法的线性响应

我们在 5 g 配合饲料样品中添加 0.05、0.10、0.50、1.00、4.00 和 8.00 mg/kg 的盐酸克仑特罗标

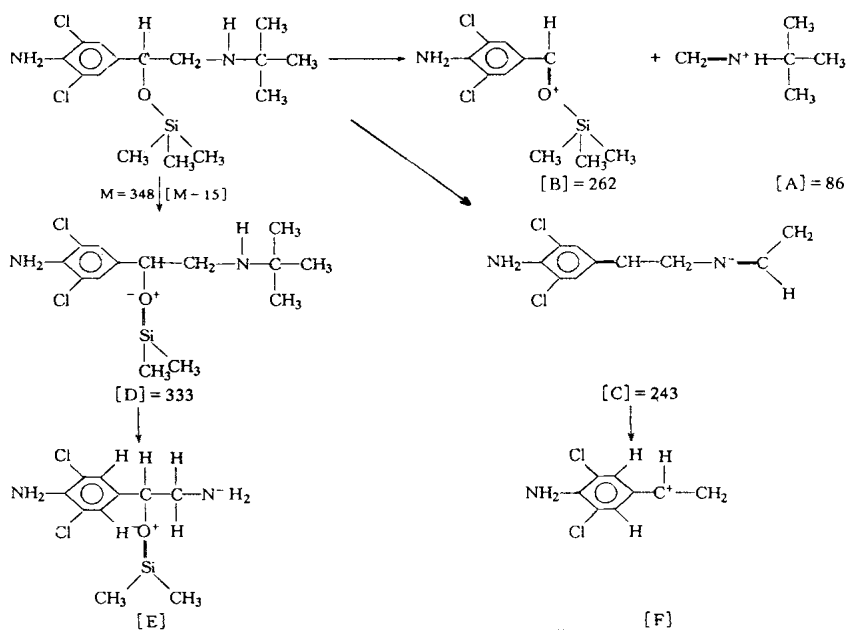


图 1 克伦特罗-TMS 产生离子碎片方式  
Fig.1 Fragmentation pattern of clenbuterol-TMS

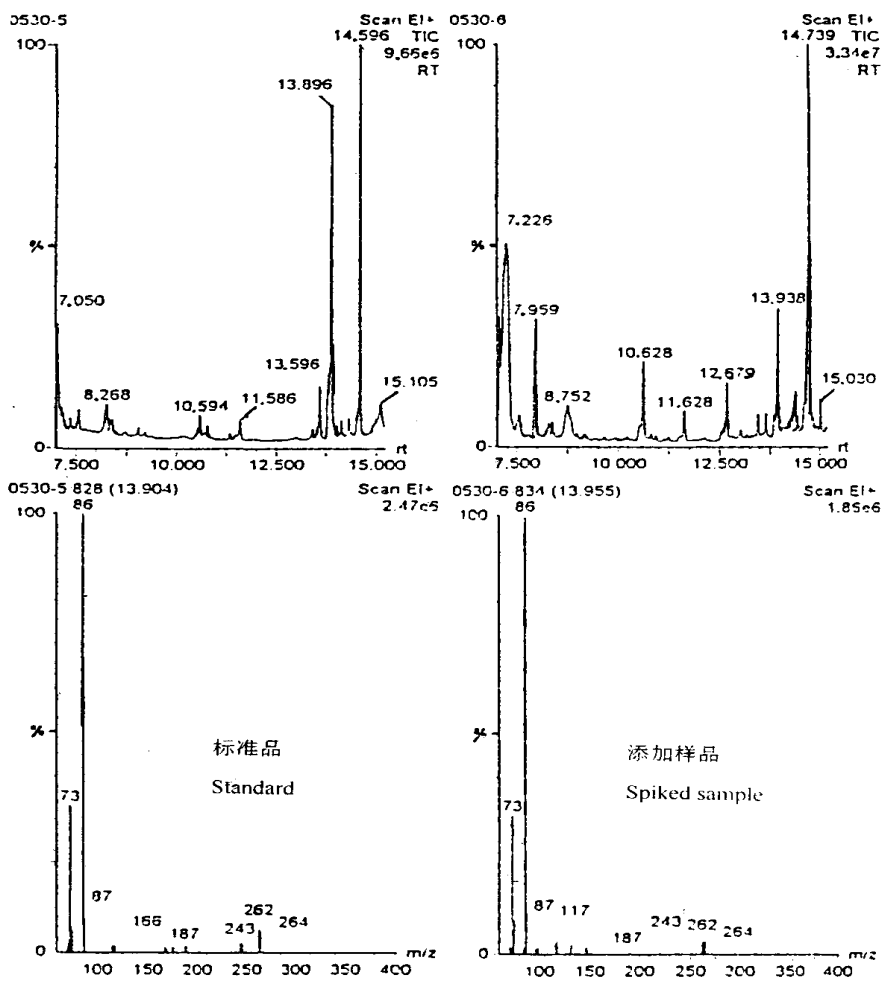


图 2 标准品与对应量样品的总离子流图、质谱图  
Fig.2 Mass chromatograms and spectrum of clenbuterol-TMS

准溶液,进行提取、净化、浓缩、测定,线性回归方程  
相关系数  $r = 0.9998$ 。

#### 2.4 方法的准确度与精密度

方法确立之后,我们在配合饲料中添加不同量的盐酸克仑特罗,进行多级、多次的添加回收率测定,考察方法的准确度与精密度,结果见表。

#### 2.5 方法的适用范围

由于本标准基本是以典型的配合饲料为基础建立的,为考察其适用性,我们按可能的实际用量添加,测定了不同的配合饲料、预混合饲料和浓缩饲料,本方法同样适用。

表 配合饲料中盐酸克仑特罗的添加回收率

Table Recovery of clenbuterol in formula feed(n = 5)

添加量 Dose of addition( mg/ kg)	回收率 Recovery( %)	变异系数 CV( %)
4	97.0	2.6
1	100.1	7.0
0.1	84.0	9.3

#### References :

- [ 1 ] Catherine A R. Use of  $\beta$  agonist to alter fat and muscle deposition in steers .J. Anim .Sci.1984 , 59 :1237 - 1247 .
- [ 2 ] Leendert A, et al. Development and validation of Multiresidue method for  $\beta$  agonists in biological samples and animal feed. J. AOAC International , 1992 ,75(3) :554 - 560 .
- [ 3 ] Visser T, et al. Cryotrapping gas chromatography-fourier transform infrared spectrometry: A new technique to conform the presence of  $\beta$  agonists in animal material. Analytica Chimica Acta , 1993 , 275 :205 - 214 .
- [ 4 ] Courtheyn D, et al. High-performance liquid chromatographic determination of clenbuterol and cimaterol using post-column derivatization. J. of Chromatography , 1991 , 564 : 537 - 549 .
- [ 5 ] Leysens L, et al. Determination of  $\beta$  receptor agonists in bovine and liver by gas chromatography-tandem mass spectrometry. J. of Chromatography , 1991 ,564 : 515 - 527 .
- [ 6 ] Leendert A, et al. Development and Validation of a Multiresidue method for  $\beta$  Agonists in Biological Samples and Animal Feed. J. of AOAC International , 1992 , 75 (3) : 554 - 560 .
- [ 7 ] Wilson R T, et al. Holland Carolyn Henry, Determination of Clenbuterol in Cattle ,Sheep ,and Swine Tissues by Electron Ionization Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. J. of AOAC International , 1994 , 77 (4) : 917 - 924 .
- [ 8 ] Montrade M P, et al. Multir residue analysis for  $\beta$  agonistic drugs in urine of meat-producing animals by gas chromatography-mass spectrometry. Analytica Chimica Acta , 1993 , 275 : 253 - 268 .
- [ 9 ] Dumasia M C, et al. Screening and confirmatory analysis of  $\beta$  agonists,  $\beta$  antagonists and their metabolites in house urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry. J. of Chromatography , 1991 , 564 : 503 - 513 .
- [ 10 ] Meyer H H D ,et al. Residue screening for the  $\beta$  agonists clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high performance liquid chromatography. J. of Chromatography , 1991 , 564 :551 - 564 .