

固相萃取/气相色谱-质谱同时测定猪肉中 4 种 β 激动剂类药物残留量

孔莹¹, 邱月明², 李鹏², 沈建忠¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要: 建立了用气相色谱-质谱同时检测猪肉中克伦特罗、沙丁胺醇、特布它林和非诺特罗残留量的方法。样品经 β -葡萄糖苷酶水解后, 用乙酸铵溶液提取, MCX 固相萃取柱进一步净化, 再用 *N*, *O*-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷 (BSTFA+TMCS, 99+1) 衍生化。采用选择离子监控模式 (SM) 检测, 所选的离子 (斜体为定量离子) 分别为克伦特罗: 86, 187, 212, 262; 沙丁胺醇: 86, 350, 369, 440; 特布它林: 86, 336, 356, 357; 非诺特罗: 236, 322, 356, 412。克伦特罗和沙丁胺醇的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 线性范围为 0.5~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 特布它林和非诺特罗的检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 线性范围均为 5~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。4 种组分的线性相关系数均大于 0.99。该方法的回收率为 68%~128%, 相对标准偏差为 3%~17%。

关键词: 气相色谱-质谱; 克伦特罗; 沙丁胺醇; 特布它林; 非诺特罗; 固相萃取; 猪肉

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)02-0063-04

Simultaneous Determination of Four β -agonist Residues in Pork Meat by Solid-phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry

KONG Ying¹, QIU Yue-ming², LI Peng², SHEN Jian-zhong¹

(1. Animal Medical Science Department, China Agricultural University, Beijing 100095, China

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract A method was developed for the simultaneous determination of Clenbuterol, Salbutamol, Terbutaline and Fenoterol residues in pork tissues using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The homogenized samples were enzyme digested by β -glucuronidase enzyme and extracted with ammonium acetate. Further cleanup was performed on a MCX cartridge and the purified drugs were derivatized with Sybn BFT [*N*, *O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)-trimethylchlorosilane (TMCS), 99+1]. The selected ion monitoring (SM) method was used for detection, and the monitored ions were *m/z* 86, 187, 212, and 262 for Clenbuterol; *m/z* 86, 350, 369, and 440 for Salbutamol; *m/z* 86, 336, 356, and 357 for Terbutaline; and *m/z* 236, 322, 356, and 412 for Fenoterol, respectively. Quantitation ions were selected at *m/z* 86 for Clenbuterol; *m/z* 369 for Salbutamol; *m/z* 356 for Terbutaline; and *m/z* 322 for Fenoterol. The limits of detection were 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for Clenbuterol and Salbutamol; 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for Terbutaline and Fenoterol. The correlation coefficients were better than 0.99 for the calibration curves for the drugs. The linear range is 0.5~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for Clenbuterol and Salbutamol; 5~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for Terbutaline and Fenoterol. The recoveries were 68%~128%, with relative standard deviations of 3%~17%.

Key words GC-MS; Clenbuterol; Salbutamol; Terbutaline; Fenoterol; Solid-phase extraction; Pork

β -激动剂 (属于苯乙胺类药物, PEAs) 是一类可以引起交感神经兴奋的类似肾上腺素的药物。一些 β -激动剂如克伦特罗、沙丁胺醇、特布它林、非诺特罗可使多种动物 (牛、羊、猪、家禽等) 体内的营养成分由脂肪组织向肌肉组织转移, 从而显著提高胴体的瘦肉率和饲料转化率, 因此常用做饲料添加剂^[1]。人长期食用含有 β -激动剂残留的肉食, 会产生头痛、胸闷、神经过敏、肌肉疼痛、心悸、恶心、呕吐等中毒症状, 严重时可诱发和加重心率失常病人的病情, 引起心室早搏, 四肢、脸、颈部骨骼肌震颤, 另外还引起代谢紊乱, 对糖尿病人可发生酸中毒或酮中毒^[2]。因此很多国家对此类药物的最高残留限量作了严格规定, 有些药物被列入禁用的兽药名单中。

收稿日期: 2005-01-25 修回日期: 2005-04-13

作者简介: 孔莹 (1980-), 女, 北京人, 硕士研究生; 邱月明, 联系人, Tel: 010-85778949, E-mail: pureying@sina.com

目前, 国内外对 β 激动剂类药物残留的检测技术文献报道很多, 主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[3-4]、气相色谱法 (GC)^[5]、高效薄层色谱法 (HPTLC)^[6]、气-质联用分析 (GC-MS)^[7-8]、液-质联用分析法 (LC-MS)^[9]、毛细管电泳法 (CE)^[10]。其中对于克伦特罗、沙丁胺醇的报道较多, 而对于特布它林、非诺特罗的报道则相对较少, 尤其是多残留同时检测技术。另外, 过去常作为饲料添加剂使用的药物, 如克伦特罗 (俗称“瘦肉精”), 由于检测技术的成熟, 有开始被其它同类药物所取代的趋势, 因此对于同类的其它药物有必要研究建立相应的检测方法, 以应对食品安全监测的需求。

本文提出了一种应用 GC-MS 技术快速准确地同时测定猪肉中 4 种 β 激动剂类药物 (克伦特罗、沙丁胺醇、特布它林、非诺特罗) 残留量的方法, 讨论了衍生化条件、洗脱条件对 4 种 β 激动剂药物检测的影响。目前还少有报道。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

6890N 气相色谱-5973i 质谱联用仪, 配有电子轰击源 (EI), 7683 型自动进样器 (美国 Agilent 公司); 固相萃取装置 (美国 Supelco 公司)。

盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、特布它林和非诺特罗标准品 (美国 Sigma 公司); BSTFA + TMCS (99+1, 美国 Supelco 公司); Waters Oasis MCX (3 mL, 60 mg) 固相萃取柱 (美国 Waters 公司); 甲醇和甲苯 (农残级, 瑞士 Fluka 公司); 其它试剂均为国产分析纯; 乙酸铵缓冲液 (20 mmol/L, pH 5.2); 0.1 mol/L 乙酸溶液。

1.2 色谱参数和质谱参数

色谱柱 DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m); 进样口温度: 260 $^{\circ}$ C; 柱温: 初始温度 70 $^{\circ}$ C, 以 25 $^{\circ}$ C /min 升温到 200 $^{\circ}$ C, 保持 6 min, 以 25 $^{\circ}$ C /min 升温到 300 $^{\circ}$ C, 保持 2 min, 载气为高纯 He, 流速为 1.1 mL/min, 不分流进样; 进样体积 1.0 μ L。

离子源温度 230 $^{\circ}$ C; 四极杆温度 150 $^{\circ}$ C; 选择离子扫描: 克伦特罗: 86 187 212 262; 沙丁胺醇: 86 350 369 440; 特布它林: 86 336 356 357; 非诺特罗: 236 322 356 412。

1.3 标准溶液的配制

准确称取 10.0 mg 标准品于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配制成 100 μ g/mL 的标准储备液, 根据需要用甲醇稀释成所需的混合标准工作溶液。

1.4 样品前处理

称取 5 g 绞碎的猪肉样品于离心管中, 加入 50 μ L β -葡萄糖苷酸酶, 涡动混匀。加入 10 mL 20 mmol/L 乙酸铵缓冲液, 涡动混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转移至另一离心管中。

MCX 固相萃取柱依次用 2 mL 甲醇和 2 mL 水活化, 将上述上清液全部上样, 用 2 mL 水、0.1 mL 乙酸溶液、2 mL 甲醇顺序淋洗, 5 mL 三氯甲烷-异丙醇-氨水 (体积比 80:20:5) 洗脱。收集洗脱液用氮气吹干, 向所得的残余物中加入 100 μ L 硅烷化试剂, 密闭后于 70 $^{\circ}$ C 中衍生 1 h, 氮气吹干后加入 1 mL 甲苯定容, 供分析用。

1.5 添加标准曲线的制备

称取 6 份 5 g 磨碎的猪肉样品于离心管中, 分别加入一定量的混合工作标准溶液 (5 10 50 100 200 ng/mL 各 0.5 mL), 用上述样品前处理方法进行处理, 用标准溶液浓度对它们的响应值之比绘制添加标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 选择离子的确定

β 激动剂类药物一般采用 SM 方式以保证得到较高的灵敏度, 为了得到较可靠的定性结果, 本实验中各种药物均选择 4 种离子进行分析。图 1 给出了 4 种 β 激动剂硅烷化衍生物的结构和质谱图。

各种药物均选择丰度大、特异性强的碎片离子进行定性, 选择的离子分别是: 克伦特罗: 86

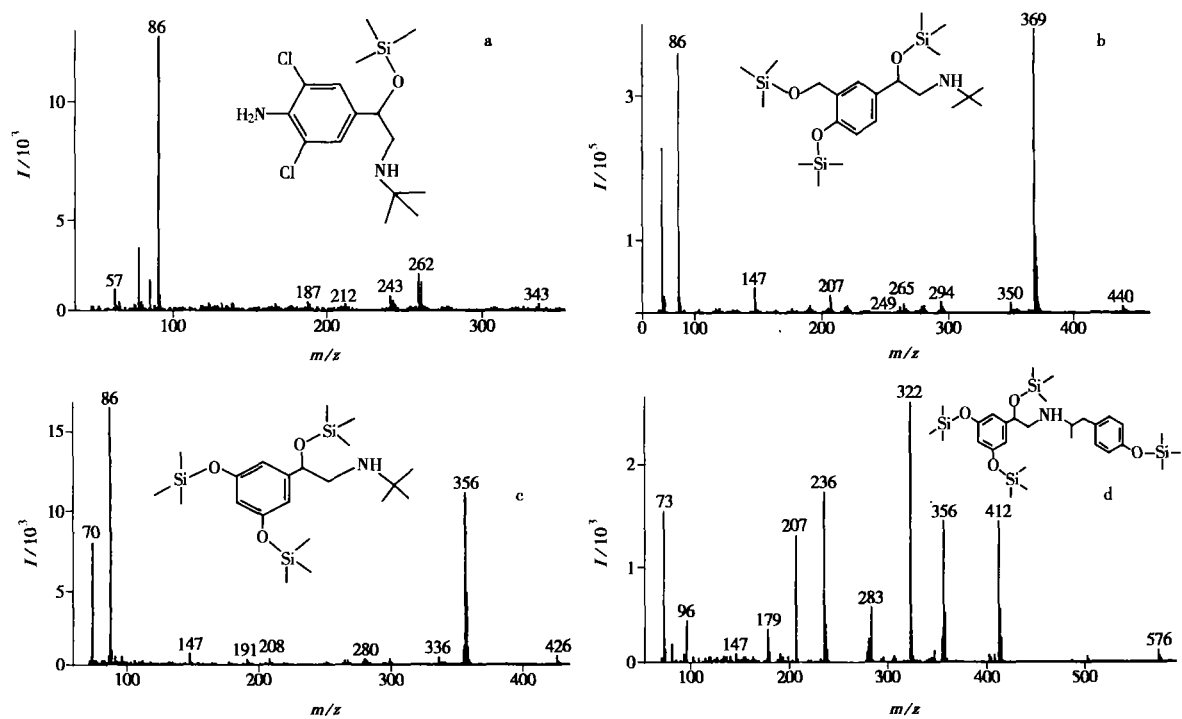


图 1 4种 β -激动剂类药物衍生物质谱图
Fig 1 Mass spectra of TMS derivatives of four PEAs
a Clenbuterol b Salbutamol c Terbutaline d Fenoterol

187、212、262, 沙丁胺醇: 86、350、369、440 特布他林: 86、336、356、357, 非诺特罗: 236、322、356、412。定量离子分别为 m/z 86、369、356和 322。

2.2 衍生化条件的优化

衍生化温度分别为 60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 时, 衍生 1 h与 2 h的产物峰面积均以 70 $^{\circ}\text{C}$ 为最大。因此, 选择 70 $^{\circ}\text{C}$ 为衍生化温度。

在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下衍生化反应时间分别为 0.5、1、1.5、2 h, 结果表明, 衍生化产物峰面积在 0.5 h及 1 h均比 1.5、2 h大。因此, 为保证衍生化反应的完全进行, 选择衍生化时间为 1 h。

衍生化产物分别用甲苯和正己烷定容, 结果表明, 甲苯的响应值要高近 1倍, 因此, 最终选择甲苯为定容溶剂。

2.3 洗脱条件的选择

β -激动剂类药物结构中含有疏水的饱和烃链, 可采用 C_{18} 反相 SPE柱, 但对多残留组分可采用混合型固定相进行净化, 保留效果好回收率高且操作简便。本实验所采用的 MCX 柱即为混合键合相硅胶柱, 含有疏水和阳离子交换两种基团。首先药物被反相机制保留, 将 MCX 柱酸化后, 质子化药物与填料中的离子基团结合, 再用有机溶剂洗涤除去极性强于分析物的碱性杂质, 最后要用含氨水的有机溶剂将药物洗脱下来。

考察不同强度的溶剂三氯甲烷 - 异丙醇 - 氨水 (体积比 90 : 10 : 8)、三氯甲烷 - 异丙醇 - 氨水 (体积比 80 : 20 : 8)、三氯甲烷 - 异丙醇 - 氨水 (体积比 70 : 30 : 8)、甲醇 - 氨水 (体积比 100 : 8)对 4种药物的洗脱能力。结果发现, 三氯甲烷 - 异丙醇 - 氨水 (体积比 90 : 10 : 8)及甲醇 - 氨水 (体积比 100 : 8)不能将药物洗脱下来, 因此, 选择三氯甲烷 - 异丙醇 - 氨水 (体积比 80 : 20 : 8), 但它对克伦特罗的回收率不足 50%, 因而减少氨水的含量, 将洗脱溶剂改为三氯甲烷 - 异丙醇 - 氨水 (体积比 80 : 20 : 5), 结果 4种药物的回收率均在 90% ~ 110% 之间。

因此, 本方法选用三氯甲烷 - 异丙醇 - 氨水 (体积比 80 : 20 : 5)作为洗脱溶剂, 甲醇作为洗涤溶剂。在此条件下, 能够很好地消除杂质的干扰, 并可使色谱组分得到有效分离, 见图 2。

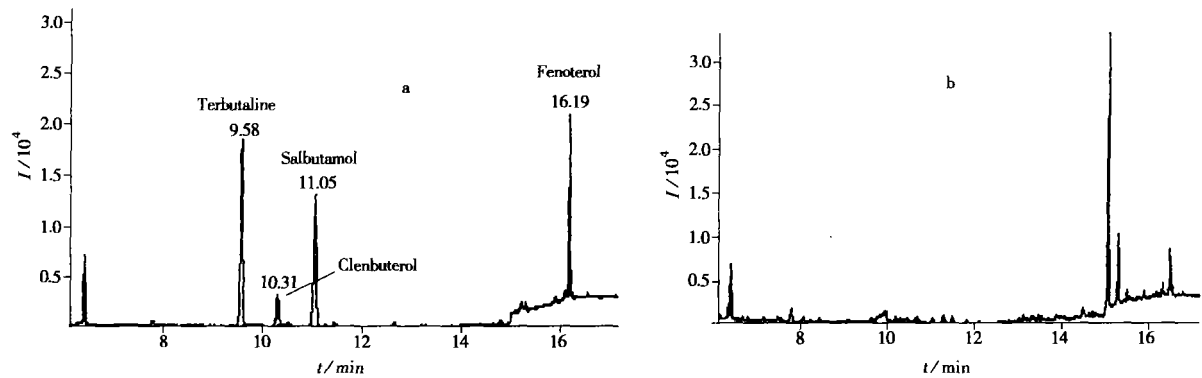


图 2 100 ng/mL 标准品 (a) 及猪肉空白 (b) 的色谱图
Fig 2 Chromatogram of 100 ng/mL reference standard (a) and pork blank (b)

2.4 添加标准曲线

用标准样品直接衍生进样做标准曲线线性不理想，且回收率偏高，如非诺特罗甚至达到 196.5%。而做添加标准曲线线性良好，4 种药物的线性相关系数均大于 0.99，结果如表 1 所示。分析其原因认为：残留分析是痕量分析，分析体系中特别是衬管和色谱柱中微小的活性点对药物的吸附直接影响实验稳定性和回收率。采用绘制添加标准曲线的方法，有利于消除分析体系中活性点对实验结果的影响，同时也可以减小基体效应。

2.5 检出限

在添加水平分别为克伦特罗和沙丁胺醇 0.5 μg/kg、特布他林和非诺特罗 5 μg/kg 时，4 种药物响应最弱的离子色谱峰的信噪比均大于 3，且回收率及精密度均能满足要求，说明此方法克伦特罗和沙丁胺醇的检出限为 0.5 μg/kg，特布他林和非诺特罗的检出限为 5 μg/kg。

2.6 回收率的测定

向 5 g 样品中分别添加 5 个浓度水平的混合标准溶液，每个浓度做 6 个平行，每个平行设 3 个空白对照，按前处理方法处理后测定回收率。每个样品平行连续进针 2 次，用 2 次进针的平均结果计算回收率和相对标准偏差，结果如表 2 所示。

表 1 标准曲线方程及线性相关系数

Table 1 The linear equations and correlation coefficients of the standard curves

Sample	Linear equations ^a	Correlation coefficients <i>r</i>
Clenbuterol(克伦特罗)	$y = 438.0x + 320.2$	0.999 6
Salbutamol(沙丁胺醇)	$y = 1\,217.6x + 2\,969.0$	0.999 6
Terbutaline(特布它林)	$y = 433.3x + 1\,419.3$	0.998 6
Fenoterol(非诺特罗)	$y = 505.4x + 448.9$	0.999 1

^a *y*: the chromatographic peak area; *x*: the added sample concentration (μg/kg)

表 2 不同添加浓度 β-激动剂在猪肉中的回收率 (*n* = 6)

Table 2 The recoveries of four PEA s in pork fortified with different concentrations (*n* = 6)

Sample	Concentration fortification	Average recovery	RSD
	μg/kg	$\bar{R}$ %	<i>s_r</i> %
Clenbuterol(克伦特罗)	5	87	17.1
	10	89	10.1
	50	100	8.3
	100	104	5.2
	200	99	4.2
Salbutamol(沙丁胺醇)	5	96	10.9
	10	82	16.4
	50	107	3.0
	100	99	20.8
	200	100	15.7
Terbutaline(特布它林)	5	96	12.6
	10	128	13.9
	50	101	15.2
	100	93	6.4
	200	102	4.7
Fenoterol(非诺特罗)	5	79	10.7
	10	68	9.4
	50	107	9.8
	100	104	3.8
	200	99	11.8

参考文献:

[1] 李俊锁, 邱月明, 王 超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科技出版社, 2002. 641–668
[2] 刘志清. “瘦肉精”引起食物中毒的调查分析[J]. 现代预防医学, 2003, 30(1): 105

(下转第 70 页)

参考文献:

- [1] 严金龙, 孙汝东, 柏云杉, 等. 明胶的粘度行为和谱学特征[J]. 皮革化工, 1999, 16(6): 1-3
- [2] 中国化工产品大全[M]. 第二版, 下卷, 北京: 化学工业出版社, 1994: 848-912
- [3] 中华人民共和国国家标准. 食品中对羟基苯甲酸乙酯的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999. GB 11672-89.
- [4] MORENO M A, CASTRO D, FRUTOS P, et al. Liquid chromatographic determination of methylparaben and propylparaben in nortriptyline hydrochloride oil-water microemulsions[J]. Chromatographia, 2000, 52(9/10): 589-592
- [5] MAHUZIER P E, ALTRIA K D, CLARK B J. Selective and quantitative analysis of 4-hydroxybenzoate preservatives by microemulsion electrokinetic chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 924(1/2): 465-470
- [6] PAWLISZYN J. Solid phase microextraction: theory and practice[M]. Wiley-VCH, 1997.
- [7] PAWLISZYN J. Applications of solid phase microextraction[M]. Royal Society of Chemistry, 1999.
- [8] 马继平, 王涵文, 关亚风. 固相微萃取新技术[J]. 色谱, 2002, 20(1): 16-20
- [9] AI J. Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations[J]. Anal Chem, 1997, 69(6): 1230-1236
- [10] AI J. Headspace solid phase microextraction: Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium[J]. Anal Chem, 1997, 69(16): 3260-3266

(上接第 66 页)

- [3] RASHID B A, KWASOWSKI P, STEVENSON D. Solid phase extraction of clenbuterol from plasma using immunoaffinity followed by HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 21(3): 635-639
- [4] 戴华, 袁智能, 黄志强, 等. 饲料中盐酸克伦特罗、沙丁胺醇的高效液相色谱测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(3): 57-59.
- [5] ENGEIMANN M D, HNZ D, WENCLAWIAK B W. Solid-phase microextraction (SPME) and headspace derivatization of clenbuterol followed by GC-FID and GC-SMMS quantification[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 375(3): 460-464.3
- [6] POSYNAK 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]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483(1-2): 61-67.
- [7] VENTURA R, DAMASCENO L, FARRE M, et al. Analytical methodology for the detection of β -agonists in urine by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 418(1): 79-92
- [8] 吴平谷. 生物材料中克伦特罗的气相色谱-质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2002, 21(1): 19-21
- [9] LAU J H W, KHOO C S, MURBY J E. Determination of clenbuterol, salbutamol and cimaterol in bovine retina by electrospray ionization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2004, 87(1): 31-38
- [10] JESUS V, ENRIQUE G Y, APRYLL M S. Quantitative determination of clenbuterol, salbutamol and tubuterenanomers by capillary electrophoresis[J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2001, 369(3-4): 212-219.