

文章编号: 1000-8020(2005)03-0365-02

实验研究

气相色谱 - 质谱法测定动物组织中的 β_2 -兴奋剂含量

吴平谷 虞晓珍

浙江省疾病预防控制中心理化所, 杭州 310009

摘要:应用气相色谱 - 质谱 (GC-MS) 联用技术建立动物组织中 β_2 -兴奋剂的测定方法。动物组织加 1% 的高氯酸溶液匀浆, 用乙酸乙酯: 异丙醇 (6:4) 萃取, 经固相萃取柱净化, BSTFA + 1% TMCS 衍生后进行 GC-MS 测定。样品中最低检出浓度分别为特布他林 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、克伦特罗 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、沙丁胺醇 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

关键词:动物组织 β_2 -兴奋剂 气相色谱 - 质谱法

中图分类号: TS207.5 R155.55

文献标识码: A

检测 β_2 -兴方法 ELISA、HPLC、HPLC-MS、LC-MS、GC-MS 几种方法^[1-4], ELISA 用于样品中 β_2 -兴奋剂筛选, 不能确定何种 β_2 -兴奋剂, 且试剂盒对不同 β_2 -兴奋剂响应值相差很大; HPLC-MS 仪器价格贵; GC-MS 灵敏度、分辨率高, 常用于兴奋剂残留的测定。本研究采用 GC-MS 方法对常见且有代表性的沙丁胺醇 (Salbutamol)、克伦特罗 (Clenbuterol)、特布他林 (Terbutaline) β_2 -兴奋剂进行检测, 对动物组织中三种 β_2 -兴奋剂进行同时提取、净化, 然后用 GC-MS 法对其进行定性、定量进行研究, 从而建立动物组织中 β_2 -兴奋剂多残留检测技术平台, 现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 6890GC-5973MS 气相色谱 - 质谱联用仪 (惠普); RE-52AA K-D 旋转蒸发仪 (上海亚荣); KQ2200 超声清洗器 (昆山); T25 basic 高速组织捣碎机。

1.1.2 试剂 硫酸沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、硫酸特布他林 (Sigma 公司), 甲醇、乙酸乙酯、异丙醇、高氯酸、氢氧化钠、甲苯、无水硫酸钠等均为分析纯; BSTFA + 1% TMCS: 迪马公司; CLE-SLX、CLE 硅胶、CLE 胺基、CLE 酸性氧化铝等净化柱: 500mg/5ml 杭州市富裕科技服务有限公司。

标准试剂 1.0mg/ml 贮备液: 分别称量 12.1mg 硫酸沙丁胺醇, 11.3mg 盐酸克伦特罗, 12.2 mg 硫酸特布他林, 用 1% 氯化乙醇溶解并定容至 10ml, 置于 4℃ 冰箱备用。

三种 β_2 -兴奋剂混合应用液 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 按实验浓度要求取上述标准储备液, 进行混合, 用乙醇稀释, 稀释液在 4℃ 冰箱中可放置 1 个月。

1.2 操作步骤

1.2.1 色谱条件 色谱柱: HP-5MS 5% 苯基甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱 (30m \times 0.25mm \times 0.25 μm); 进样口温度: 300; 柱温程序: 初温 150, 保持 3min, 然后以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 240, 保持 1min, 再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 280, 保持 3min; 载气: 高纯氮气 (99.999%), 流速 1.0ml/min, 不分流进样

1.2.2 质谱条件 EI 源, 源温 230; 电子能量 70eV; 接口温度 280, 电子倍增器电压 1388V, 质谱扫描范围 50 ~ 550amu;

溶剂延迟: 8min。

1.3 样品处理

称取 5.0g 经过绞碎样品, 加 1% 高氯酸溶液 30ml, 在高速组织匀浆机中匀浆 1min, 然后在 80℃ 下超声 15min, 在 5000 r/min 下离心 10min, 上清液移至分液漏斗中, 用 50% 氢氧化钠调节至碱性, 加 30ml 有机溶剂振荡提取, 离心, 有机相移入磨口具塞三角瓶中, 重复提取一次, 合并有机相, 通过无水硫酸钠, 在 50℃ 下旋转蒸发至干。先用 3ml 乙腈与 3ml 正己烷溶解移入试管, 混匀后分出正己烷相, 乙腈相蒸干后用 3% 乙醇/乙酸乙酯溶解定容至 2ml。取 Cle-SLX 柱先用 5ml 3% 乙醇/乙酸乙酯淋洗, 然后加 1ml 样品提取液, 加 5ml 5% 甲醇/乙酸乙酯淋洗收集得组分 1, 然后用 10ml 50% 甲醇/乙酸乙酯淋洗收集得组分 2, 洗脱液分别用氮气吹干。加 100 μl BSTFA + 1% TMCS, 在 60℃ 下衍生 30min, 氮气吹干, 加 200 μl 甲苯溶解离心, 取 1.0 μl 进行 GC/MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 三种 β_2 -兴奋剂衍生物质谱特征

特布他林、克伦特罗、沙丁胺醇标准经硅烷化衍生后的总离子流图见附图, 衍生物的质谱特征见表 1。

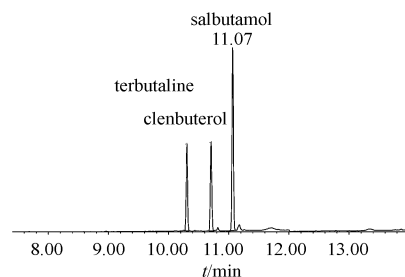


图 1 三种 β_2 -兴奋剂标准品衍生物的总离子流色谱图

表 1 三种 β_2 -兴奋剂标准品的质谱特征

兴奋剂	分子量	羟基数	保留时间 (min)	衍生物分子离子峰	特征离子 (SIM 离子)
特布他林	225	3	10.30	441	86、356 ⁽¹⁾
克伦特罗	276	1	10.70	348	86、262 ⁽¹⁾ 、243
沙丁胺醇	239	2	11.07	455	86、369 ⁽¹⁾

注: (1) 定量离子

由附图可知, 三种 β_2 -兴奋剂标准品经硅烷化后的衍生物

基金项目: 浙江省卫生厅 2002 年优秀青年人才专项基金资助

可以采用 GC/MS 法测定,可以满足实验要求,且灵敏度高。按表 1 选择相应的离子进行离子选择监测方式,可以大大降低检出限,进一步提高灵敏度。分别选择离子碎片 262、369、356 为克伦特罗、沙丁胺醇、特布他林的定量离子,86 (m/z) 为

叔丁基类 β_2 -兴奋剂特征离子碎片,而且响应较大,将 86 作为三种 β_2 -兴奋剂的辅助定量离子。按照上述色谱条件,在 50~1000ng/ml 浓度范围内对三种 β_2 -兴奋剂测定结果,浓度与响应值关系见表 2。

表 2 三种 β_2 -兴奋剂测定浓度与响应值线性特征

兴奋剂名称	50ng/ml	100ng/ml	250ng/ml	500ng/ml	1000ng/ml	回归曲线	r 值
特布他林	8822	15835	37799	94113	165787	$Y = 168.86X + 304.41$	0.996
克伦特罗	6658	13847	31400	78761	135381	$Y = 138.03X + 758.54$	0.995
沙丁胺醇	8066	17806	44224	109148	207889	$Y = 213.25X - 3610$	0.998

2.2 pH对三种 β_2 -兴奋剂萃取效率的影响

β_2 -兴奋剂根据苯环取代基结构分为苯胺型如克伦特罗、苯酚型如沙丁胺醇和间苯二酚型如特布他林,它们分子结构中都有氨基和羟基,具有酸碱两性,因此采用液液萃取时,pH 值对样品中不同 β_2 -兴奋剂的提取效率影响较大。

由表 3 可知,当 pH10 时,特布他林和克伦特罗溶剂提取最高,而沙丁胺醇在 pH11 时最高,在实际样品检测中采用 pH10 进行样品提取。

2.3 不同溶剂对三种 β_2 -兴奋剂萃取效率的效果

特布他林、沙丁胺醇、克伦特罗结构中含羟基极性较大,本文选择不同的溶剂对三种 β_2 -兴奋剂的提取效率进行了实验研究,结果见表 4。

表 3 pH对于三种 β_2 -兴奋剂萃取效率的影响

兴奋剂名称	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11	pH12	pH13
特布他林	63.0	70.6	67.8	83.3 ⁽¹⁾	19.9	15.6	0
克伦特罗	79.2	76.3	75.5	102.0 ⁽¹⁾	89.7	82.4	86.3
沙丁胺醇	86.1	57.2	85.8	83.3	89.45 ⁽¹⁾	58.2	55.6

由表 3 可知,以上各种溶剂对克伦特罗的提取均较好,但对极性较大的特布他林、沙丁胺醇,只有叔丁基甲醚 异丙醇(5 1)、乙酸乙酯 异丙醇(6 4)这两种溶剂提取效率较好。本方法选择乙酸乙酯 异丙醇(6 4)进行 β_2 -兴奋剂多残留分析,由于乙酸乙酯 异丙醇(6 4)混合溶剂极性大,提取物杂质含量也相对较高,本研究采用固相净化柱进一步净化。

表 4 不同溶剂对三种 β_2 -兴奋剂萃取效率的效果

溶剂名称	乙醚	乙酸乙酯	乙腈	叔丁基甲醚	叔丁基甲醚 异丙醇(5 1)	乙酸乙酯 异丙醇(6 4)
特布他林	0	0	45.1	51.5	94.7	95.1
克伦特罗	97.2	95.0	96.2	98.1	102.7	98.7
沙丁胺醇	0	0	35.7	44.7	67.7	89.4

2.4 固相萃取净化柱的选择

用于 β_2 -兴奋剂净化的固相萃取柱有正相(如硅藻土、C8、硅胶、氧化铝、SLX 等)净化柱、反相(如 C18)净化柱、强阳离子交换柱和弱阳离子交换柱等。作者在实际样品检测过程中发现反相净化柱或离子交换净化柱对克伦特罗效果普遍较好,但特布他林、沙丁胺醇回收率低,且杂质干扰大,因此本研究采用正相净化柱。从除杂及过柱回收率等方面比较 CLE-SLX、CLE-硅胶、CLE-酸性氧化铝、CLE-胺基 4 种 SPE 净化柱,选择 CLE-SLX 型 SPE 净化柱作为 β_2 -兴奋剂多残留分析净化

柱,具体步骤见样品处理部分。由于苯胺型 β_2 -兴奋剂如克伦特罗和苯酚型 β_2 -兴奋剂沙丁胺醇、特布他林极性相差较大,前者容易洗脱 且在实际样品检测过程,有杂质对沙丁胺醇进行干扰,该杂质与克伦特罗在组分 1,对组分 2 中沙丁胺醇没有干扰,样品溶剂提取物经过 CLE-SLX 柱净化后,可以较好的达到净化目的,且过柱回收率均在 85%以上。

2.5 方法精密度和灵敏度

按照上述样品提取、净化,分别在猪肝脏加标至 10 μ g/kg、猪肉中加标至 30 μ g/kg 后测定 3 种 β_2 -兴奋剂,其回收率特布他林 70%、74.7%,克伦特罗 86%、90.0%,沙丁胺醇 72%、78.0%;相对标准偏差特布他林 8.9%、8.9%,克伦特罗 6.9%、3.1%,沙丁胺醇 6.9%、5.0%。方法的回收率及精密度均可以满足样品测定要求,且特布他林、沙丁胺醇的回收率均较好,最低检出浓度按照样品测定噪音 2 倍计,3 种 β_2 -兴奋剂最低检出浓度分别为特布他林 0.5 μ g/kg、克伦特罗 1.0 μ g/kg、沙丁胺醇 0.2 μ g/kg。

2.6 实际样品测定

采用本方法,对送检的 54 份组织进行 3 种 β_2 -兴奋剂残留检测,克伦特罗检出 5 份,沙丁胺醇 1 份。

3 结论

克伦特罗、沙丁胺醇、特布他林在 pH10 下,用乙酸乙酯 异丙醇(6 4)提取,然后用 CLE-SLX 固相萃取柱净化,分组分 1、组分 2 洗脱,克伦特罗在组分 1、沙丁胺醇、特布他林在组分 2。然后用 BSTFA + 1% IMCS 衍生后进行 GC-MS 测定。样品中最低检出浓度分别为特布他林 0.5 μ g/kg、克伦特罗 1.0 μ g/kg、沙丁胺醇 0.2 μ g/kg。

4 参考文献

- 1 Stevenson D. Review immuno-affinity solid extraction. J Chromat B, 2000, 745:39-48
- 2 Guy PA, Marie-Claude. Quantitative analysis of clenbuterol in meat products using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Chromat B, 1999, 736:209-219
- 3 吴平谷. 生物材料中克伦特罗的气相色谱-质谱法测定. 分析测试学报, 2002, 21:19-21
- 4 Martin Y. Influence of the storage conditions on the concentration of clenbuterol in cattle urine samples. Analytica Chimica Acta, 2002, 452: 115-122

(2004-10-14 收稿)