

辐照对盐酸克伦特罗降解效应的初步研究

顾可飞^{1,2} 陈志军³ 周昌艳¹ 褚云霞^{1,2} 邓 珊^{1,2} 李振兴⁴

¹ (上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所 上海 201106)

² (农业部植物新品种测试(上海)分中心 上海 201106)

³ (上海束能辐照技术有限公司 上海 201106)

⁴ (中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003)

摘要 采用电子束辐照处理盐酸克伦特罗,应用液相色谱串联质谱、红外光谱等技术研究盐酸克伦特罗辐照降解规律及辐解产物的结构,分析辐照对盐酸克伦特罗的降解效应。实验结果表明,原始浓度为 18 mg·kg⁻¹ 和 45 mg·kg⁻¹ 的盐酸克伦特罗水溶液浓度随吸收剂量增加而降低,且在吸收剂量为 5 kGy 和 10 kGy 时降解率达到 90%以上;在低剂量下(≤5 kGy)盐酸克伦特罗分子的-OH 和-Cl 基团脱落,随着剂量的增加-OH, -NH₂, -NH-和-C(CH₃)₃ 等基团也发生了不同程度的改变或脱落,表明电子束辐照可有效降解盐酸克伦特罗。

关键词 盐酸克伦特罗, 辐照降解, 质谱, 红外光谱

中图分类号 TL13

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.040301

盐酸克伦特罗 (Clenbuterol hydrochloride, 7-[2-甲基丙烷-2-亚氨基-甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐) 属于儿茶酚胺衍生合成的一类化合物, 是一种 β₂ 受体兴奋剂, 俗称“瘦肉精”, 因能促进动物肌肉蛋白质合成, 抑制脂肪合成和积累, 使胴体瘦肉率提高^[1-2], 而常被用作饲料添加剂, 以提高动物产品的经济价值, 但因其稳定性极强, 动物食用后可在内脏和组织蓄积, 人食用后可产生严重的毒副作用^[3-7], 故各国已严禁使用。目前, 仍有一些不法养殖业主违法使用, 危及肉制品安全^[8]。有研究表明, 辐照可降解食品中有害残留物^[9-10], 宋莉晖等^[11] 和杨郡亭等^[12] 分别利用 γ-射线和电子束辐照处理盐酸克伦特罗, 发现辐照可有效降解盐酸克伦特罗。本文利用质谱和光谱技术分析了盐酸克伦特罗电子束辐照降解效应和降解产物结构^[13-14], 为更好地监督肉品安全, 了解辐照降解规律和辐解产物提供危害分析基础数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ESS-010-03 型电子直线加速器(日本 IHI 公司)(射线能量 2.5 MeV, 功率 2.5 kW, 清华同方);

TSQ Quantum Ultra 型液相色谱/质谱联用仪(美国 Thermo 公司), 电喷雾电离源(ESI), 正离子模式采集; 液相色谱柱 Intersil ODS-3C18 (2.1 mm×50 mm, 3 μm, GL Sciences Inc); 红外光谱仪(Nicolet iS10 傅里叶变换红外光谱仪); 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); 盐酸克伦特罗(纯度 99.2%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 甲醇等试剂均为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 辐照后盐酸克伦特罗浓度的变化

盐酸克伦特罗以色谱纯水配制成原始浓度分别为 18 mg·L⁻¹ 和 45 mg·L⁻¹ 的溶液, 液相色谱质谱测定辐照前后浓度。室温下辐照, 电子束能量 5 MeV, 束流强度 200 μA, 剂量 100 kGy·s⁻¹, 辐照距离 30 cm, 吸收剂量分别为 1、3、5、7 和 9 kGy。液相色谱测试方法参考 GB/T5009.192-2003^[8], 液相色谱测定条件: 色谱柱: ODS 柱, 250 mm×4.6 mm, 5 μm; 流动相: 甲醇+水(45+55); 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 柱温: 25 °C; 紫外检测器: 244 nm。

1.2.2 盐酸克伦特罗辐解产物的液相色谱质谱分析

将经辐照处理的盐酸克伦特罗(吸收剂量为 1、3、5、7、10、20、30 和 40 kGy, 辐照条件同 1.2.1)水溶液(浓度 10 mg·L⁻¹)进行质谱分析, 质谱条件:

基金资助: 上海市科技兴农重点攻关项目子课题(沪农科攻字(2009)第 6-1 号)和山东省科技发展计划(2013GGB01192)资助

第一作者: 顾可飞, 女, 1977 年 10 月出生, 2007 年于中国农科院研究生院获硕士学位, 助理研究员, 主要从事食品安全检测技术和食品安全控制技术研究, E-mail: xyz694@163.com

收稿日期: 初稿 2014-02-26; 修回 2014-03-26

流动相甲醇、流速 $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ；采集方式：单级质谱扫描(Q1)、二级质谱扫描(子离子)和多反应监测扫描(MRM)。

1.2.3 盐酸克伦特罗辐解产物的红外光谱分析

准确称取盐酸克伦特罗，去离子水配制浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，于 1.5 mL 离心管中，常温下于辐照设备中进行辐照（吸收剂量分别为 1、3、5、7、10、20、30 和 40 kGy ，辐照条件同 1.2.1），辐照后样品于 -40°C 冰箱中预冻，待冻实后于冷冻干燥机中干燥备用。取适量干燥后样品至 ATR 试验台（样品量以可以覆盖探头为准），测定其图谱，初步确定样品中基团存在。取溴化钾（光谱纯） $200\text{--}300 \text{ mg}$ ，烤灯下研磨至无颗粒感，加入 1 mg 左右样品（干燥好的样品先于红外烤灯下适度烘烤），继续研磨至均匀，取适量加入压片磨具至可以铺满底部，并于 20 MPa 压制 1 min ，将压片放入机器样品光路中，设置实验参数，进行光谱扫描。实验参数：扫描波长为 $400\text{--}4000 \text{ nm}$ ，扫描次数为 32 次，分辨率 4，校正除水与二氧化碳，并自动大气背景扣除，采集样品图谱后基线校正并适当平滑曲线，标明图谱中各个峰位置，确定样品中基团数量，获得的光谱图利用基团归属性分析其基团结构的变化情况。

2 结果与分析

2.1 盐酸克伦特罗辐照降解效应分析

盐酸克伦特罗经安全剂量($\leq 10 \text{ kGy}$)辐照处理后，降解率见图 1。由图 1 可见，在 $1\text{--}9 \text{ kGy}$ 吸收剂量下，随着剂量增加盐酸克伦特罗（原始浓度分别为 $18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）含量逐渐降低，两种浓度的原始溶液在处理剂量为 1 kGy 时降解率分别为 83% 和 23%，且在剂量 5 kGy 和 9 kGy 时降解率达到 90% 以上，低浓度较高浓度的溶液降解率高。

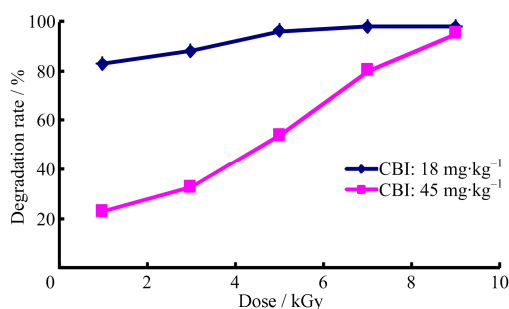


图 1 电子束辐照下盐酸克伦特罗的降解变化
Fig.1 Clenbuterol hydrochloride degradation after irradiation with electronic beam
CBI: Clenbuterol concentration before irradiation

2.2 盐酸克伦特罗辐解产物的质谱分析

盐酸克伦特罗分子量为 $276(^{35}\text{Cl})$ ，其质谱全扫描的结果见图 2，盐酸克伦特罗分子离子($m/z 277$)在碰撞气体的作用下，形成碎片离子。其两个主要碎片离子为 $m/z 203$ 和 $m/z 259$ ，故在多反应监测中选择的转换离子对为 $m/z 277\text{--}203$ 和 $m/z 277\text{--}259$ 。

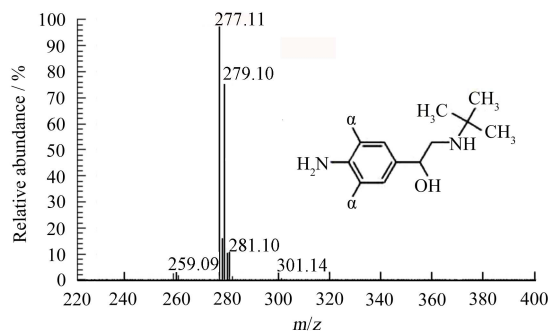


图 2 盐酸克伦特罗全扫描质谱图
Fig.2 Full scan mass spectrum (MS) of clenbuterol hydrochloride

盐酸克伦特罗溶液辐照处理后质谱全扫描结果见图 3。从图 3 可见，与未辐照前相比，在较低剂量时(3 kGy 和 5 kGy)，质谱检测到碎片离子 $m/z 203$ 、 $m/z 225$ 、 $m/z 243$ 和 $m/z 259$ 。而在大于 5 kGy 时，降解程度很大，检测不到明显的质谱信号。根据盐酸克伦特罗分子结构推断 $m/z 203$ 和 $m/z 259$ 应为盐酸克伦特罗分子离子 $m/z 277$ 的碎片离子，而离子 $m/z 243$ 推断可能为降解物，碎片离子 $m/z 225$ 可能为 $m/z 243$ 的碎片离子。

针对离子 $m/z 243$ 色谱分离总离子流图 (Total ion chromatogram, TIC) 和二级质谱分析结果如图 4 和图 5 所示。从图 4 和图 5 可见，质谱监测到碎片离子 $m/z 225$ 和 $m/z 169$ ，推断为 $m/z 243$ 在离子源作用下脱水脱基团 $\text{--C}_4\text{H}_4$ 产生的子离子（其分解和子离子形成过程图解参见文献[11]），这一结果表征离子 $m/z 243$ 可能为 OH 自由基进攻卤代化合物，导致有机物降解，同时 e-aq 具有较强的脱卤功能，可与不饱和卤代有机化合物反应生成 H 加成物（离子 $m/z 243$ 结构见图 5），与宋莉晖等[11]研究部分结果一致。

当剂量为 10 kGy 时，质谱全扫描发现有高于盐酸克伦特罗分子量的分子离子，分析可能是辐照过程中，高能电子束使产物发生聚合反应。而当吸收剂量增至 20 kGy 、 30 kGy 和 40 kGy 时，质谱检测不到有价值的信号，表明高剂量时降解程度大或降解产物无质谱信号[15]。

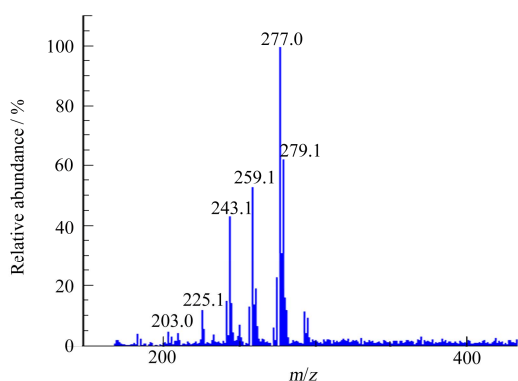


图3 辐照后盐酸克伦特罗液质全扫描质谱图(剂量 3 kGy)

Fig.3 Full scan mass spectrum (MS) of clenbuterol hydrochloride after irradiation at dose of 3 kGy

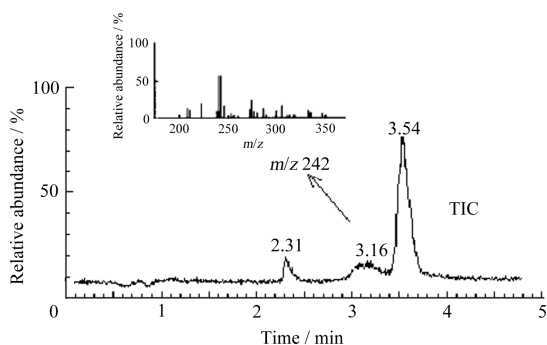


图4 辐照后盐酸克伦特罗总离子流图(剂量 3 kGy)

Fig.4 TIC spectrum (MS) of clenbuterol hydrochloride after irradiation at dose of 3 kGy

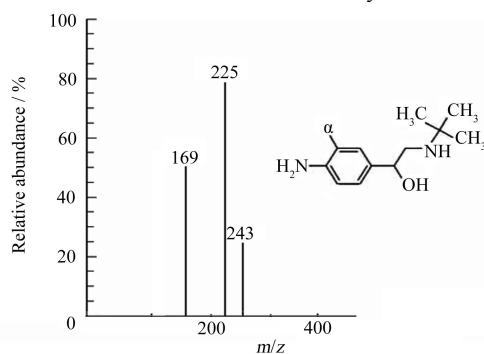


图5 降解产物 m/z 243 的二级质谱图

Fig.5 Tandem mass spectrometry of degrading product of m/z 243

2.3 盐酸克伦特罗辐解产物的红外光谱分析

盐酸克伦特罗经电子束辐照处理后, 利用中红外光谱技术研究了辐照后盐酸克伦特罗分子中 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、苯环- CH 和 $\text{C}-\text{Cl}$ 等基团的红外特征吸收谱的变化情况。盐酸克伦特罗标准溶液的红外吸收光谱如图 6 所示, 根据光谱图基团归属性分析, 其中波长 3294 cm^{-1} 、 3250 cm^{-1} 和 1103.43 cm^{-1} 为 $-\text{OH}$ 特征峰; $3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ 、 1283 cm^{-1} 和 1210 cm^{-1} 为 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{NH}-$ 特征峰; 633.15 cm^{-1} 和 536.32 cm^{-1} 为 $-\text{Cl}$ 特征峰; 1624 cm^{-1} 、

1560 cm^{-1} 、 1486 cm^{-1} 和 1452 cm^{-1} (以上 4 峰为苯环骨架振动, 是确定苯环存在的特征峰)、 848 cm^{-1} (苯环 1, 2, 3, 5 四取代) 为苯环特征峰。而 2972.77 cm^{-1} 、 2779.70 cm^{-1} 和 848.32 cm^{-1} 分别代表 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}$ 和 $-\text{CH}_2$ [16] (详见图谱 6)。

盐酸克伦特罗溶液经不同剂量辐照处理后, 冻干后的红外吸收图谱如图 7。由图 7 可见, 吸收剂量不超过 10 kGy 时, 各样品红外光谱仍具有较大的相似性, 但与标准溶液的红外光谱对比, $-\text{OH}$ 、 $-\text{Cl}$ 、苯环、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 等基团的特征吸收峰发生了显著变化, 其中波长 3250 cm^{-1} 、 3294 cm^{-1} 和 1103.43 cm^{-1} 的 $-\text{OH}$ 特征吸收峰在 1 kGy 时减弱, 在 3 kGy 时消失, 结合质谱监测结果, 推测认为基团 $-\text{OH}$ 在水分子辐照产生的自由基作用下发生改变或脱去, 这也可能是上述质谱检测不到 m/z 209 产物离子碎片的原因 (也可能 m/z 209 的含量很低); 而苯环 1、2、3 和 5 取代 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动吸收峰 848.32 cm^{-1} 在剂量 1 kGy 和 3 kGy 时减弱, 5 kGy 及以上剂量下消失, 以及 $-\text{Cl}$ 的特征吸收峰 633.15 cm^{-1} 和 536.32 cm^{-1} 随着吸收剂量的增加而减弱到消失, 推测其中的取代基团发生改变 (判断为脱氯反应), 致使苯环三取代的结构破坏, 这与质谱分析时 $-\text{Cl}$ 离子发生自由基还原反应相吻合。而在 $1\text{--}10\text{ kGy}$ 的剂量范围内, 从红外光谱 $1400\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ 和 $500\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ 波长的吸收峰变化情况来看, 苯环的结构可能没有遭到破坏。而当剂量超过 10 kGy 时, 苯环的 1500 cm^{-1} 附近特征吸收峰消失, 表明苯环结构在高于 10 kGy 的剂量下遭到破坏, 盐酸克伦特罗分子结构降解程度较大, 这与前人研究发现高剂量辐照可降解苯环结构的结果一致 [17-20]。

基团 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 和 $-\text{CH}$ 的变化比较复杂, 由图 7 可见 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 的 $\text{C}-\text{C}$ 骨架振动特征峰 1241.99 cm^{-1} 随着吸收剂量的增加而减弱到消失, 而 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 和 $-\text{CH}$ 共有的 $\text{C}-\text{H}$ 的伸缩峰 2972.77 cm^{-1} 随着剂量的增加先增后减 (达到 5 kGy 时相对其它吸收峰最强, 此后逐渐减弱) 表征基团 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 随着剂量的增加 $\text{C}-\text{C}$ 键断裂, 在一定剂量范围内产生了更多的 $-\text{CH}$ 基团, 而随着剂量的进一步加大, 降解程度加大, 从而致使 $\text{C}-\text{H}$ 的伸缩峰强度先增后减; $-\text{NH}_2$ 的特征吸收峰 $3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$, 在吸收剂量 10 kGy 以内变宽, 苯环上 $-\text{NH}_2$ 的特征峰 1283 cm^{-1} 和非苯环 $-\text{NH}-$ 的特征峰 1210 cm^{-1} 随着剂量的增加减弱并且

分别在剂量为 9 kGy 和 5 kGy 时消失, 表征这一结构也遭到了辐照破坏。

当吸收剂量超过 10 kGy 时, 各样品红外光谱与标准光谱有了较大的差异, 这说明在高剂量下, 盐

酸克伦特罗降解程度较大, 大部分的特征基团都发生了改变, 这也解释了高剂量下质谱检测不到明显的产物质谱信号。

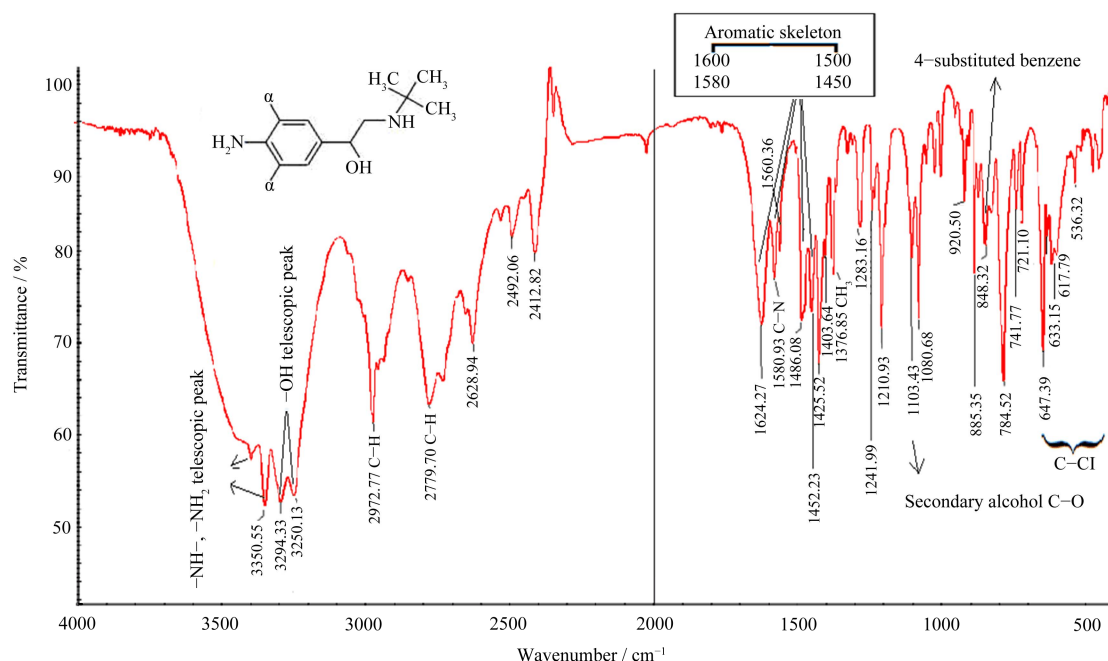


图 6 盐酸克伦特罗红外光谱图
Fig.6 Near-infrared spectrum (MS) of clenbuterol hydrochloride

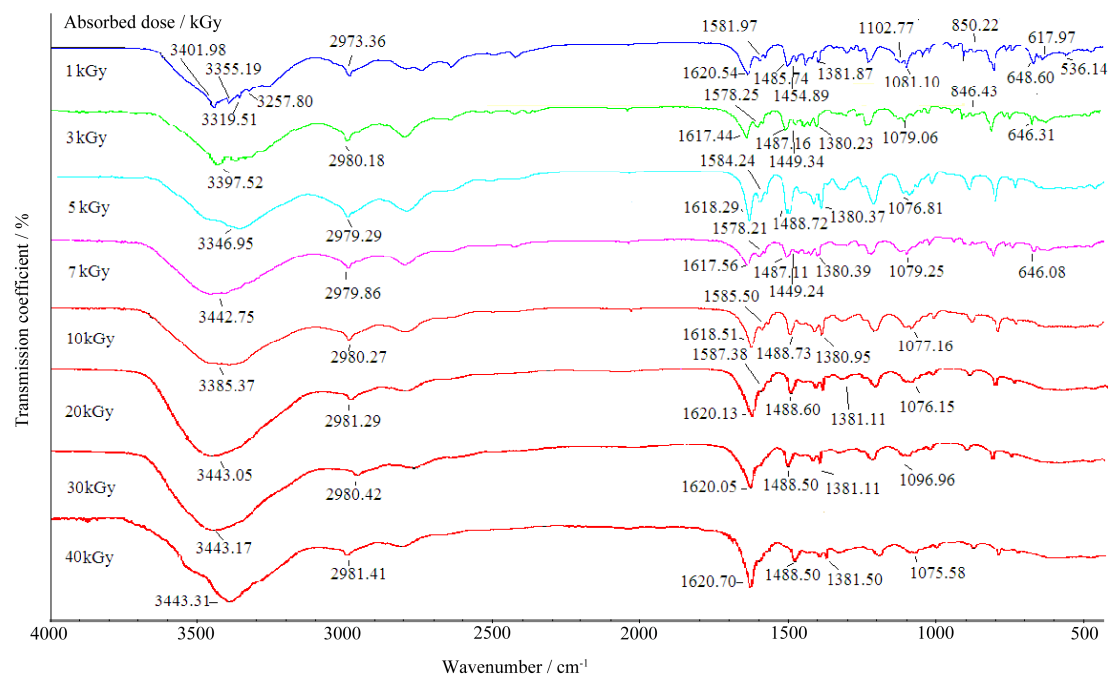


图 7 辐照后盐酸克伦特罗红外光谱图
Fig.7 Near-infrared spectrum (MS) of clenbuterol hydrochloride after irradiation

3 结论

经辐照处理后, 降解效应以及质谱光谱分析表明电子束辐照可有效降解盐酸克伦特罗, 低浓度的盐酸克伦特罗在安全吸收剂量下(≤ 10 kGy)的降解率可达 90%以上; 在安全剂量电子束辐照下, 盐酸克伦特罗可发生脱-Cl 反应, 并且分子中-OH, -NH₂, -NH-和-C(CH₃)₃ 基团等均遭到了不同程度的破坏, 表明辐照可有效破坏盐酸克伦特罗分子结构。

参考文献

- René J L, Louise B, Kevin L S, *et al.* Clenbuterol has a greater influence on untrained than on previously trained skeletal muscle in rats European [J]. *Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 1996, **73**(3): 304-310.
- Ronald B, Young K Y, Bridge A J, *et al.* Effect of serum from chickens treated with clenbuterol on myosin accumulation, β -adrenergic receptor population, and cyclic AMP synthesis in embryonic chicken skeletal muscle cell cultures [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2002, **38**(2): 102-110.
- 严莉, 陈一资. 盐酸克伦特罗及肉品卫生 [J]. *肉类工业*, 2003(9): 34-37.
YAN Li, CHENG Yizi. Clenbuterol hydrochloride and meat hygiene [J]. *Meat Industry*, 2003(9): 34-37.
- 刘志明, 朱永仁. 浅谈盐酸克伦特罗的作用及副作用 [J]. *江西饲料*, 2007(6): 30-31.
LIU Zhiming, ZHU Yongren. Discussion on clenbuterol effects and side effects [J]. *Jiangxi Feed*, 2007(6): 30-31.
- Smith D T, 万美梅, 谭滇湘, 等. ¹⁴C-盐酸克伦特罗在猪体内混饲的残留消除研究 [J]. *中国动物保健*, 2003(Z1): 9-12.
Smith D T, WAN Meimei, TAN Dianxiang, *et al.* ¹⁴C-elimination of clenbuterol hydrochloride residue in pig [J]. *China Animal Health*, 2003(Z1): 9-12.
- Patrick G, Vincent H M, Vivian W. Y, *et al.* Acute clenbuterol overdose resulting in supraventricular tachycardia and atrial fibrillation [J]. *Journal of Medical Toxicology*, 2007, **3**(2): 56-60.
- Yan K, Li L F, Xia F H, *et al.* Acute clenbuterol induces hypotension, atrioventricular block and cardiac asystole in the rabbit [J]. *Cardiovascular Toxicology*, 2012, **13**(1): 85-89.
- 黄慧萍, 王永刚, 李学云. 两起盐酸克伦特罗食物中毒调查 [J]. *职业与健康*, 2011, **4**: 425-426.
HUANG Huiping, WANG Yonggang, LI Xueyun. Two clenbuterol food poisoning [J]. *Occupation and Health*, 2011, **4**: 425-426.
- Abdel A S, Dessouki A M, Sokker H H. Degradation of some pesticides in aqueous solutions by electron beam and gamma-radiation [J]. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2001, **250**(2): 329-334.
- 黄佳佳, 徐振林, 罗翠红. 电子束辐照在食品中兽药残留降解的应用 [J]. *食品工业科技*, 2011, **1**: 313-317.
HUANG Jiajia, XU Zhenlin, LUO Cuihong. The application of electron beam irradiation degradation of veterinary drug residues in food [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, **1**: 313-317.
- 宋莉晖, 杨成对, 刘密新. 电子束辐照下克伦特罗的降解研究 [J]. *分析化学研究简报*, 2005, **7**: 1007-1009.
SONG Lihui, YANG Chengdui, LIU Mixin. Study of clenbuterol degrading by electronic beam irradiation [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, **7**: 1007-1009.
- 杨郡亭, 冯敏, 赵永富. γ 辐照降解肉制品中克伦特罗的初步研究 [J]. *江苏农业科学*, 2010, **6**: 414-416.
YANG Juntao, FENG Min, ZHAO Yongfu. Preliminary study on irradiation degradation of clenbuterol in meat [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010, **6**: 414-416.
- GB/T5009. 192-2003 动物性食品中盐酸克伦特罗残留量的测定 [S].
GB/T5009. 192-2003 Determination of clenbuterol residues in animal food [S].
- 宋岩. 近红外光谱技术在药物检测中的应用研究 [D]. 长春: 吉林大学. 2009.
SONG Yan. Application of near infrared spectroscopy in pharmaceutical detection [D]. Changchun: Jilin University. 2009.
- ZHOU Jiaxin, WU Minghong, XU Gang, *et al.* Decomposition mechanism of chloramphenicol under electron beam irradiation [J]. *Journal of Shanghai University (English Edition)*, 2010, **14**(4): 286-291.
- Ralph L S. 有机化合物系统鉴定手册 [M]. 北京, 化学

- 工业出版社, 2007: 155-185.
- Ralph L S. The systematic identification of organic compounds [M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2007: 155-185.
- 17 Hategan A, Popescu A, Butan C, *et al.* High energy electron beam inactivation of lactate dehydrogenase suspended in different aqueous media Czechoslovak [J]. Journal of Physics, 1999, **49** (Supplement 1): 535-540.
- 18 Qun Liu, Xingzhang Luo, Zheng Zheng, *et al.* Factors that have an effect on degradation of diclofenac in aqueous solution by gamma ray irradiation [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2011, **18**(7): 1243-1252.
- 19 Rayna S, Nikola V V, Stefan L S. Spassov Irradiation of food, current legislation framework, and detection of irradiated foods [J]. Food Analytical Methods, 2010, **3**(3): 225-252.
- 20 Byung Y C, Sang G L, Jae Y C. Advanced oxidation process of veterinary antibiotic tetracycline by electron beam irradiation [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2009, **52**(6): 675-680.

Preliminary study of the irradiation effects on clenbuterol hydrochloride

GU Kefei^{1,2} CHEN Zhijun³ ZHOU Changyan¹ CHU Yunxia^{1,2} DENG Shan^{1,2} LI Zhenxing⁴

¹(Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

²(Shanghai Station for DUS Testing Center of New plant Varieties MOA. P. R. China, Shanghai 201106, China)

³(Shanghai Shuneng Irradiation Technology Co. Ltd., Shanghai 201106, China)

⁴(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT The degradation effect of electron beam irradiation on clenbuterol hydrochloride was investigated with the method of liquid chromatography-tandem mass spectrometry and infrared spectroscopy. Experimental results showed that the concentration of clenbuterol hydrochloride aqueous solution with original level of 18 ppm and 45ppm decreased with the increase of absorbed dose, and its degradation efficiency was higher than 90% at 5 kGy and 9 kGy respectively. The mass spectrometry showed that -OH and -Cl fell off at low absorbed dose. And with the increase of absorbed dose, the ions such as -NH₂, -NH-, -C(CH₃)₃, -Cl were changed or lost. It indicates that electron beam irradiation could efficiently degrade clenbuterol hydrochloride.

KEYWORDS Clenbuterol hydrochloride, Radiolysis, Mass spectrometry, Infrared spectroscopy

CLC TL13