

# 应用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱 鉴定克伦特罗在猪尿中的主要代谢产物

王鹤佳, 李丹, 毕言锋\*, 孙雷, 徐士新

(中国兽医药品监察所 国家兽药残留基准实验室, 北京 100081)

**摘要:** **目的** 应用超高效液相色谱/四级杆-飞行时间质谱技术分析鉴定克伦特罗在猪尿中的代谢产物, 并推测克伦特罗在猪体内的主要代谢途径。 **方法** 按 10 mg/kg bw 的剂量, 给猪经口灌食克伦特罗, 分别采集给药前及给药后的尿液样品。应用超高效液相色谱/四级杆-飞行时间质谱技术对样品进行分析, 采用 MetaboLynx XS 软件进行数据处理, 共检测到 6 种克伦特罗的代谢产物, 并根据碎片离子信息进行了结构鉴定。 **结果** 猪尿中克伦特罗的代谢产物包括 4-N-羟基克伦特罗(4-N-OH-CLE)、4-硝基克伦特罗(4-NO<sub>2</sub>-CLE)、克伦特罗及 4-N-OH-CLE 的葡萄糖醛酸结合物(GLU-CLE 和 GLU-OH-CLE)等。 **结论** 根据所检测到的代谢产物, 克伦特罗在猪体内的代谢途径包括 4-N-氧化和葡萄糖醛酸结合等。

**关键词:** 克伦特罗; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法; 猪尿; 代谢产物

## Identification of major metabolites of clenbuterol in swine urine using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry

WANG He-Jia, LI Dan, BI Yan-Feng\*, SUN Lei, XU Shi-Xin

(Reference Laboratory for the Test of Veterinary Drug Residues, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**ABSTRACT: Objective** To detect and identify the metabolites of clenbuterol in swine urine by using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS).

**Methods** Swines were administered a single dose of 10 mg/kg bw clenbuterol by oral gavage. Urine samples were collected before and after oral administration and were analyzed using UPLC/Q-TOF MS. With MetaboLynx XS software, six metabolites were screened in swine urine collected 0~24 h after administration and identified based on their fragmentation ions. **Results** The detected metabolites of clenbuterol in swine urine were 4-N-hydroxylated-clenbuterol (4-N-OH-CLE), 4-NO<sub>2</sub>-clenbuterol (4-NO<sub>2</sub>-CLE) and glucuronic acid conjugates of clenbuterol and 4-N-OH-CLE. **Conclusion** Base on the identified metabolites, the metabolic pathways of clenbuterol included 4-N-oxidation and glucuronidation of parent and hydroxylated-clenbuterol.

**KEY WORDS:** clenbuterol; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; swine urine; metabolites

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201947)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201947)

\*通讯作者: 毕言锋, 副研究员, 主要研究方向为兽药及污染物的代谢和残留检测技术。Email: byf006@163.com

\*Corresponding author: BI Yan-Feng, Associate Professor, China Institute of Veterinary Drug Control, No.8, Zhongguancun South Street, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: byf006@163.com

## 1 引言

克伦特罗(clenbuterol, CLE)是一种临床上常用的 $\beta$ -肾上腺素受体激动剂类( $\beta$ -adrenergic agonists,  $\beta$ -AAs)平喘药,同时,也是在养殖中非法使用较多的“瘦肉精”类动物促生长剂。20世纪八九十年代,西班牙、法国、意大利等国家先后发生了上百起食品中CLE残留导致的严重食品中毒事件<sup>[1-3]</sup>。因此,为了保障动物源食品的质量和消费者健康,欧盟的96/23/EC禁止了 $\beta$ -AAs类物质在食品动物养殖中作为促生长剂使用,并且在动物源食品中不得检出 $\beta$ -AAs残留<sup>[4]</sup>。2002年,我国也开始禁止盐酸CLE等 $\beta$ -肾上腺素类物质在饲料和畜牧生产中使用<sup>[5]</sup>。

研究<sup>[6,7]</sup>表明,CLE在动物体内的主要代谢途径包括氧化和结合代谢。在狗体内,CLE的代谢途径主要为侧链氧化、葡萄糖醛酸结合、硫酸结合和乙基化等<sup>[6]</sup>。<sup>14</sup>C同位素标记代谢实验表明,在牛体内,除已发现的侧链氧化和结合代谢外,苯胺的N-氧化也是CLE的重要体内代谢途径<sup>[8]</sup>。残留消除实验表明,在牛组织和排泄物中,CLE的主要残留形式是未代谢的原形,各种代谢产物的含量都较低<sup>[9]</sup>。因此,一般将原形作为食品中CLE残留检测的目标物。目前,由于CLE在猪体内的代谢研究还未见报道,将原形作为猪尿或组织中CLE残留监控的目标物缺乏科学的实验基础。

本研究将利用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UPLC/Q-TOF MS)技术,检测和鉴定猪口服CLE后尿液中的主要代谢产物,并推测CLE在猪体内的主要代谢途径,为CLE的残留监控和风险评估提供科学依据。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪(Waters Acquity UPLC- SYNAPT HDMS, 美国Waters公司);猪代谢笼(北京人和机械厂);高速离心机(德国Thermo公司);恒温振荡器(上海精宏科学仪器厂);克伦特罗(含量>95%,中国食品药品检定研究院);乙腈(色谱纯, Fisher Scientific);甲酸(分析纯,北京试剂公司)

### 2.2 样品采集及处理

长白猪(北京市苏家坨养殖场),体重30~40 kg。代谢实验前,动物在代谢笼中适应1周,饲喂空白饲料,自由饮水。给药前禁食12 h,不禁水。按10 mg/kg bw的剂量,口服给药1次。给药后,自由采食进水。收集给药前12 h~0 h内的尿液,作为空白样品。给药后,收集0~24 h内的尿液。将尿液样品以8000 r/min离心10 min,取上清液于-20℃冷冻保存。

取以上样品0.5 mL于5 mL塑料离心管中,加入乙腈溶液2 mL,充分涡旋振荡后,5000 r/min离心10 min,转移上清液。按照以上方法,重复提取1次。合并上清液,在50℃氮气流下浓缩至小于0.5 mL。用水定容至0.5 mL后,12000 r/min离心10 min,取上清液过0.22  $\mu$ m滤膜后,供UPLC/Q-TOF MS分析。

### 2.3 仪器分析条件

色谱柱采用ACQUITY HSS T<sub>3</sub>柱(100 mm×2.1 mm i.d., 1.7  $\mu$ m),柱温30℃,流速为0.4 mL/min,进样体积2  $\mu$ L。流动相A为含0.1%甲酸的乙腈,流动相B为含0.1%甲酸的水溶液,液相分离的梯度洗脱程序:0~1 min,保持2% A;1~5 min,流动相A的比例由2%线性变化至30%;5~7 min,流动相A的比例由30%线性变化至60%;7~9 min,流动相A的比例保持95%;9~11 min,保持流动相A的比例为2%。

Q-TOF MS采用电喷雾离子源,正离子模式;毛细管电压3 kV;电离源温度120℃,锥孔电压为20 V,数据采集质量范围为50~1000 Da;数据采集方式为MS<sup>E</sup>模式,一级质谱(MS)碰撞电压为4 eV,二级质谱(MS/MS)碰撞电压为10~30 eV。检测前,采用甲酸钠溶液进行精确质量校正,并用亮氨酸-脑啡肽溶液([M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  556.2771 Da)进行实时质量锁定。

### 2.4 代谢物鉴定

采用MetaboLynx XS<sup>TM</sup>软件对UPLC/Q-TOF MS采集的数据进行处理。首先,对数据进行质量亏损过滤(mass defect filtering, MDF)处理,消除内源性代谢物的干扰。然后,根据代谢途径的精确质量变化,采用离子色谱峰提取(extracted ion chromatogram, EIC)的方法,筛查可能的代谢产物。其中,在EIC处理中,保留时间和精确质量的误差分别为0.05 min和 $\pm$ 10 mDa。最后,提取MS<sup>E</sup>采集的MS/MS信息,对比代谢产物和原形的主要碎片离子,对代谢产物的结构进

行鉴定。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 CLE 质谱裂解特征研究

根据 UPLC/Q-TOF MS 采集的分子离子和碎片离子信息(图 1), CLE 的分子离子( $m/z$  277)可以产生 4 个主要的碎片离子, 分别为  $m/z$  259、 $m/z$  203、 $m/z$  168 和  $m/z$  132。其元素组成、精确质量数(exact mass, EM)和不饱和度(double bond equivalent, DBE)分别见表 1。

由于 CLE 分子中含有两个 Cl 原子, 分子离子  $m/z$  277 与其同位素峰  $m/z$  279 的丰度比约为 3:2。同时, 碎片离子  $m/z$  259 与  $m/z$  261,  $m/z$  203 与  $m/z$  205 的丰度比也都为 3:2, 说明两个碎片离子中也都含有两个 Cl 原子。而  $m/z$  168 与  $m/z$  170 丰度比为 3:1, 说明只含有一个 Cl 原子。碎片离子  $m/z$  132 没有典型的 Cl 原子同位素峰, 说明两个 Cl 原子都已经失去。

根据元素组成和同位素峰特征, 可以推测 CLE 的  $[M+H]^+$  ( $m/z$  277) 的裂解过程(图 2)。首先, CLE 的  $[M+H]^+$  ( $C_{12}H_{19}N_2Cl_2^+$ ) 容易失去一分子  $H_2O$  生成  $m/z$  259 ( $C_{12}H_{17}N_2Cl_2^+$ )。然后, 碎片离子  $m/z$  259 继续脱去侧链脂肪仲胺上的叔丁基, 生成  $m/z$

203 ( $C_8H_9N_2Cl_2^+$ )。碎片离子  $m/z$  203 依次失去两个 Cl, 生成碎片离子  $m/z$  168 ( $C_8H_9N_2Cl^+$ ) 和  $m/z$  132 ( $C_8H_8N_2^+$ )。以上 CLE 的质谱裂解特征研究将为代谢物的结构鉴定提供实验基础。

#### 3.2 代谢产物鉴定

除 CLE 原形外, 在猪尿液中共检测到 6 种 CLE 的代谢产物, 其中, I 相代谢产物 2 种, II 相代谢产物 4 种。CLE 及其代谢产物的保留时间(retention time, RT)、精确质量数(exact mass, EM)、元素组成和相对含量等见表 2。

##### 3.2.1 I 相代谢产物

CLE\_M1 的  $[M+H]^+$  ( $m/z$  293.0822, RT=3.76 min) 对应的元素组成为  $C_{12}H_{19}N_2O_2Cl_2$  (EM 理论值为 293.0824 Da), 比 CLE 多 1 个 O 原子。同时, 两个同位素峰( $m/z$  293 与  $m/z$  295) 的丰度比为 3:2。在 MS/MS 图中, CLE\_M1 的碎片离子  $m/z$  275 和  $m/z$  219, 比 CLE 的碎片离子( $m/z$  259 和  $m/z$  203) 大 16 Da, 说明 CLE\_M1 是 CLE 的氧化产物。另外, 碎片离子  $m/z$  219 ( $C_8H_9N_2OCl_2$ ) 失去 1 个 OH 自由基后, 生成碎片离子  $m/z$  202 ( $C_8H_8N_2Cl_2$ )。碎片离子  $m/z$  167 ( $C_8H_8N_2Cl$ ) 是由  $m/z$  202 失去 1 个 Cl 产生的, 其两个同位素峰 ( $m/z$  167 与  $m/z$  169) 的丰度比约为 3:1, 也证明只含有

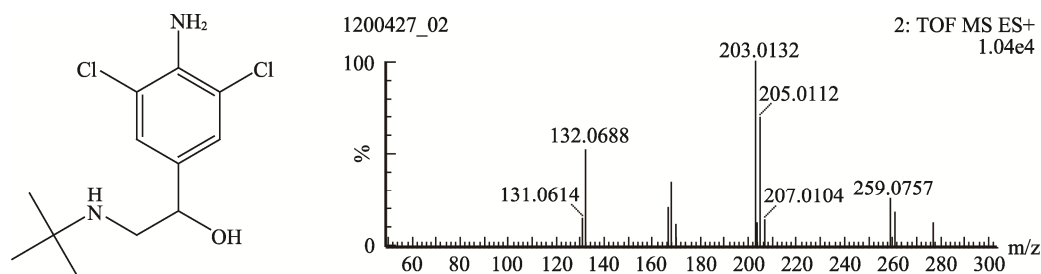


图 1 CLE 的结构式和 MS/MS 质谱图

Fig. 1 The structure and MS/MS spectra of clenbuterol

表 1 CLE 的  $[M+H]^+$  及其碎片离子的元素组成、精确质量数 (EM) 理论值及测量值、不饱和度和质量偏差  
Table 1 Element compositions, exact masses, DBEs and mass errors of  $[M+H]^+$  and fragment ions of clenbuterol

元素组成	EM 测量值 (Da)	EM 理论值 (Da)	不饱和度 (DBE)	质量偏差 (ppm)
$C_{12}H_{19}N_2OCl_2^+$	277.0865	277.0874	8.5	-3.25
$C_{12}H_{17}N_2Cl_2^+$	259.0757	259.0769	9.5	-4.63
$C_8H_9N_2Cl_2^+$	203.0132	203.0143	4.5	-5.42
$C_8H_9N_2Cl^+$	168.0454	168.0459	4.5	-2.98
$C_8H_8N_2^+$	132.0688	132.0687	4.5	0.76

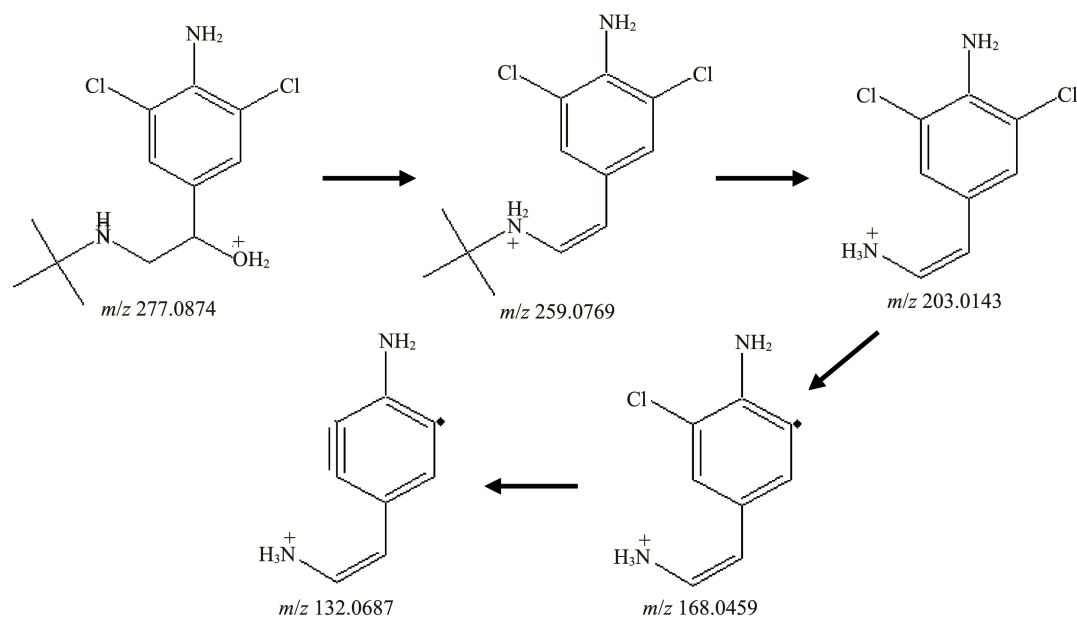


图 2 CLE 的质谱裂解过程

Fig. 2 Proposed fragmentation pathways of CLE

表 2 CLE 及其代谢产物[M+H]<sup>+</sup>的保留时间(RT)、精确质量数(EM)、元素组成和相对含量  
 Table 2 Retention times, exact masses, element compositions, metabolic pathways and relative percentages of CLE and its metabolites

代谢物	[M+H] <sup>+</sup>				元素组成	代谢途径	相对含量(%)
	RT(min)	EM 测量值 (Da)	EM 理论值 (Da)	质量误差 (ppm)			
CLE	4.85	277.0870	277.0874	-1.44	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub>	/	73.9
CLE_M1	3.76	293.0822	293.0824	-0.68	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OH-CLE	20.2
CLE_M2	6.41	307.0606	307.0616	-3.26	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> -CLE	0.37
CLE_M3	4.41	453.1201	453.1195	1.32	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub>	GLU-CLE	2.12
CLE_M4	4.53	453.1173	453.1195	-4.86	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub>	GLU-CLE	0.18
CLE_M5	4.47	453.1197	453.1195	0.44	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub>	GLU-CLE	0.27
CLE_M6	2.73	469.1143	469.1144	-0.21	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	GLU-OH-CLE	2.96

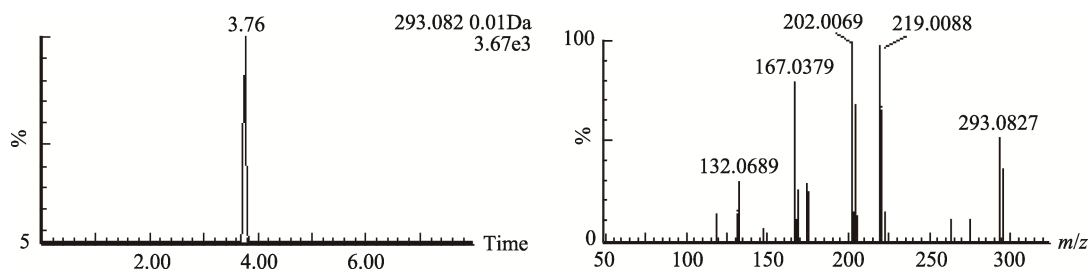


图 3 猪尿中 CLE\_M1 的 EIC 和 MS/MS 图

Fig. 3 EIC and MS/MS spectra of CLE\_M1 in swine urine

1 个 Cl 原子。以上的碎片离子说明, 氧化代谢反应发生在苯环上。已有体内和体外代谢研究也表明, CLE 苯环上氧化主要发生在苯环的胺基上。因此, CLE\_M1 被确定为 CLE 的苯胺羟基化代谢产物(4-N-OH-CLE)。

CLE\_M2 的  $[M+H]^+$  (RT=6.41 min) 的 EM 测量值为 307.0606 Da, 对应的元素组成为  $C_{12}H_{16}N_2O_3Cl_2$  (EM 理论值为 307.0616 Da), 比 CLE 多两个 O 原子, 但少两个 H 原子。同时, 两个同位素峰 ( $m/z$  307 与  $m/z$  309) 的丰度比为 3:2, 提示 CLE 分子中的胺基可能被氧化为硝基 (EM 变化理论值为 29.9741 Da)。在 MS/MS 图 (图 4) 中, 碎片离子  $m/z$  289 和  $m/z$  233 分别比 CLE 的碎片离子 ( $m/z$  259 和  $m/z$  203) 大 30 Da, 碎片离子  $m/z$  132 与 CLE 相同, 证明苯环上的伯胺基被氧化, CLE\_M2 为 4-硝基-克伦特罗 (4-NO<sub>2</sub>-CLE)。

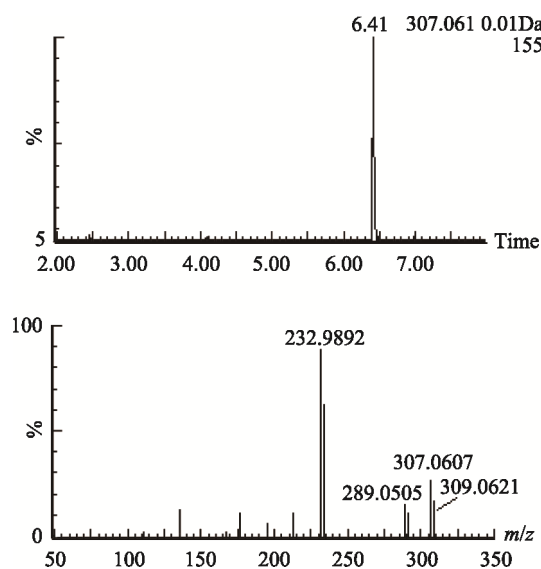


图 4 猪尿中 CLE\_M2 的 EIC 和 MS/MS 图

Fig. 4 EIC and MS/MS spectra of CLE\_M2 in swine urine

Debrauwer 等<sup>[10]</sup>分别合成了 CLE 的羟胺和硝基衍生物, 并利用电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 研究了其裂解特征。在本研究中, CLE\_M1 和 CLE\_M2 的主要特征碎片离子与 Debrauwer 等<sup>[10]</sup>的结果一致。以上结果进一步证明, CLE\_M1 和 CLE\_M2 为 CLE 的两种苯胺氧化产物 (4-N-OH-CLE 和 4-NO<sub>2</sub>-CLE)。

### 3.2.2 II 相代谢产物

CLE\_M3 ( $m/z$  453.1201, RT=4.41 min, 图 5)、CLE\_M4 ( $m/z$  453.1173, RT=4.47 min, 图 5) 和 CLE\_M5 ( $m/z$  453.1197, RT=4.53 min, 图 5) 的  $[M+H]^+$

的元素组成都是  $C_{18}H_{26}N_2O_7Cl_2$  (EM 理论值为 453.1195 Da), 比 CLE 的多  $C_6H_8O_6$  (176.0321 Da)。另外, CLE\_M3、CLE\_M4 和 CLE\_M5 也能生成与 CLE 相同的特征碎片离子  $m/z$  203 (图 6)。因此, CLE\_M3、CLE\_M4 和 CLE\_M5 被确定为 CLE 的葡萄糖醛酸结合产物 (GLU-CLE) 的 3 种同分异构体, 可能的结合位点包括  $\beta$ -羟基、脂肪仲胺和苯胺基。

CLE\_M6 ( $m/z$  469.1136, RT=3.38 min) 的  $[M+H]^+$  所对应的元素组成为  $C_{18}H_{26}N_2O_8Cl_2$  (EM 理论值为 469.1145 Da), 比 4-OH-CLE 的多  $C_6H_8O_6$  (EM 理论值 176.0321 Da)。同时,  $[M+H]^+$  的同位素峰  $m/z$  469 和  $m/z$  471 的丰度比约为 3:2。另外, CLE\_M6 也能生成

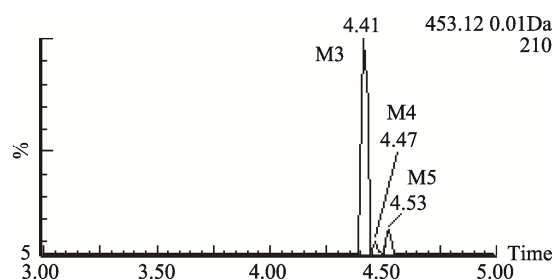


图 5 猪尿中 CLE\_M3、M4 和 M5 的 EIC 图

Fig. 5 EIC of CLE\_M3, M4 and M5 in swine urine

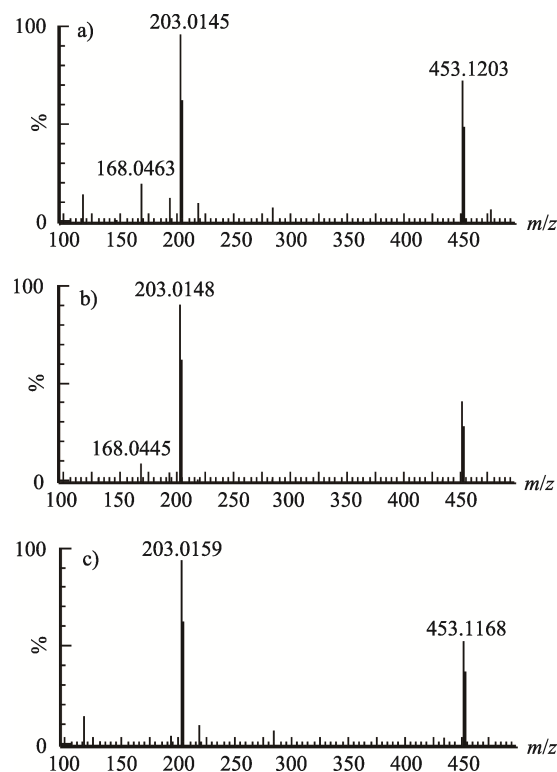


图 6 猪尿中 CLE\_M3(a)、M4(b) 和 M5(c) 的 MS/MS 图

Fig. 6 MS/MS spectras of CLE\_M3, M4 and M5 in swine urine

与 4-OH-CLE 相同的特征碎片离子  $m/z$  202(图 7)。因此, CLE\_M6 被确定为 4-OH-CLE 的葡萄糖醛酸结合产物(GLU-OH-CLE)。

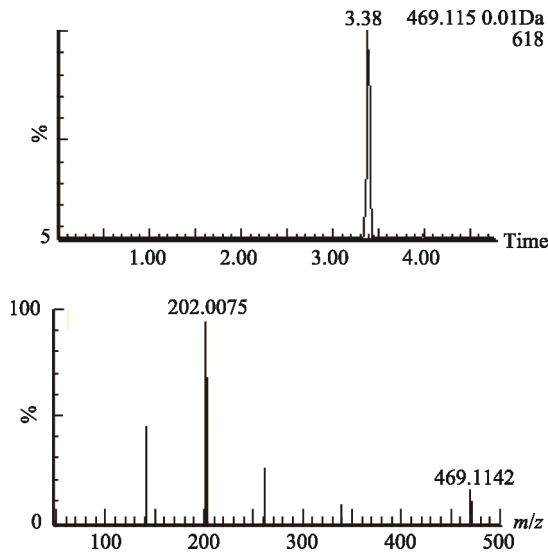


图 7 猪尿中 CLE\_M6 的 EIC 和 MS/MS 图

Fig. 7 EIC and MS/MS spectra of CLE\_M2 in swine urine

Alonen 等<sup>[11]</sup>通过酶催化和化学方法合成了 CLE 的葡萄糖醛酸结合物, 并证明侧链的  $\beta$ -羟基更容易与葡萄糖醛酸发生结合。从图 5 可以看出, CLE\_M3 的质谱响应明显高于 CLE\_M4 和 CLE\_M5。根据以上结果, 可以推测 CLE\_M3 的结合反应可能发生在  $\beta$ -羟基上。然而, 由于合成所有 II 相代谢产物的标准物质非常困难, 只根据利用高分辨质谱可以采集代

谢物的精确质量数和 MS/MS 信息, 还无法确定葡萄糖醛酸结合的准确位点。

### 3.3 CLE 在猪体内的代谢途径

早期的研究<sup>[6]</sup>表明, CLE 在动物体内的氧化代谢主要发生在侧链上, 包括 C-N 键断裂氧化以及叔丁基的羟基化等。而 Zalko 等<sup>[8]</sup>的研究发现, 除侧链氧化外, 苯胺氧化是 CLE 在牛体内的一个重要代谢途径。体外代谢研究<sup>[12]</sup>表明, CLE 在猪肝微粒体中代谢产物也主要是 4-N-OH-CLE。本研究中, 在猪尿中发现了两种苯胺的氧化代谢产物: 4-N-OH-CLE 和 4-NO<sub>2</sub>-CLE, 没有发现侧链氧化和烷基断裂的代谢产物。以上结果表明, CLE 在猪体内的氧化代谢主要为苯环伯胺的羟基化, 并最终生成硝基。另外, 有研究<sup>[13,14]</sup>表明, 对于含苯胺基团的药物, N-氧化代谢过程可能生成某些活性中间代谢产物或自由基, 并容易与 DNA、蛋白等结合。因此, CLE 的苯胺氧化代谢导致的潜在毒理作用应该引起注意。

研究<sup>[6,8]</sup>发现, CLE 在牛和狗体内的结合代谢包括葡萄糖醛酸结合、苯胺的硫酸结合和  $\beta$ -羟基的乙基化等。Schmid 等<sup>[6]</sup>报道, 在狗体内, CLE 的葡萄糖醛酸结合主要发生在  $\beta$ -羟基上。本研究中, 在猪尿中只发现了葡萄糖醛酸结合产物(CLE\_M3~M8), 没有检测到硫酸结合和乙基化代谢产物。然而, 只根据质谱信息还无法准确判断葡萄糖醛酸结合的位点。

根据所检测到的代谢产物, 可以推测 CLE 在猪体内的代谢途径(图 8)。由于无法得到所有代谢

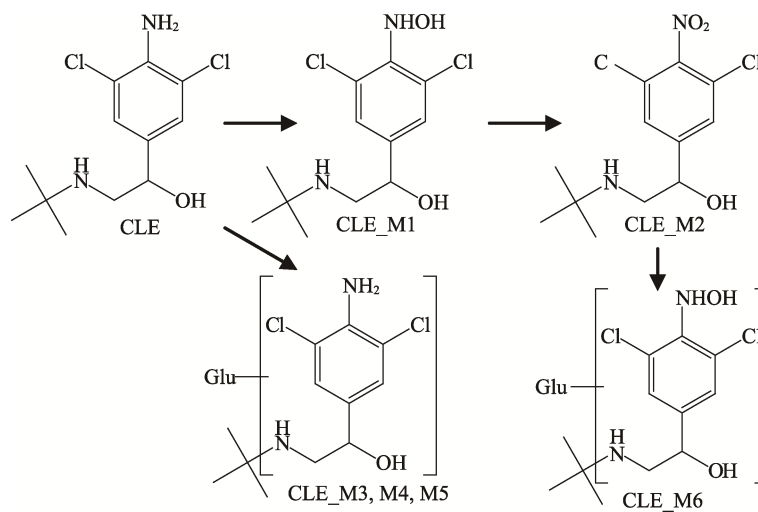


图 8 CLE 在猪体内的主要代谢途径

Fig. 8 Proposed metabolic pathways of clenbuterol in swine

物的对照品, 因此, 只能根据相应离子色谱峰的峰面积估算 CLE 及其代谢产物的相对含量(表 2)。结果表明, 在猪尿液中, 未代谢的 CLE 原形的含量约为 73.9%, 为主要的残留形式。另外, 含量最大的代谢产物为 4-N-OH-CLE(20.2%), 其他代谢产物的含量都很小。因此, CLE 在猪体内的主要代谢途径为苯胺的氧化。

## 4 结 论

在本研究中, 按 10 mg/kg bw 的剂量给猪口服克伦特罗后, 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱技术在给药后的尿液中检测和鉴定了克伦特罗的 6 种代谢产物。根据代谢物鉴定结果, 推测克伦特罗在猪体内的主要代谢途径为苯环上的 N-氧化, 同时也可以发生葡萄糖醛酸结合。另外, 未代谢的克伦特罗原形是猪尿液中的主要残留形式。

## 参考文献

- [1] Pulce C, Lamaison D, Keck G, *et al.* Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver [J]. *Vet Hum Toxicol*, 1991, 33 (5): 480–481.
- [2] Martínez-Navarro JF. Food poisoning related to consumption of illicit beta-agonist in liver [J]. *Lancet*, 1990, 336 (8726): 1311.
- [3] Salleras L, Dominguez A, Mata E, *et al.* Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain [J]. *Public Health Rep*, 1995, 110 (3): 338–342
- [4] Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists[Z]. *Off J Eur Communities*, 1996, L125: 3–9
- [5] 禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录. 农业部公告[2002]第 176 号[Z]. 北京, 2002  
Ministry of Agriculture of China, Announcement No. 176 of the Ministry of Agriculture[Z]. Beijing, 2002
- [6] Schmid J, Prox A, Zimmer A, *et al.* Biotransformation of clenbuterol[J]. *Fresenius J Anal Chem*, 1990, 337: 121.
- [7] Smith DJ. The Pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76 (1): 173–194.
- [8] Zalko D, Bories G, Tulliez J. Metabolic fate of clenbuterol in calves [J]. *J Agr Food Chem*, 1998, 46 (5): 1935–1943.
- [9] Smith DJ, Paulson GD. Distribution, elimination, and residues of [<sup>14</sup>C]clenbuterol HCl in Holstein calves [J]. *J Anim Sci*, 1997, 75 (2): 454–461.
- [10] Debrauwer L, Zalko D, Bories G, *et al.* Electrospray ionization mass spectrometric study of N-oxidation products of clenbuterol [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, 11: 1089–1094.
- [11] Alonen A, Gartman M, Aitio O, *et al.* Synthesis, structure characterization, and enzyme screening of clenbuterol glucuronides [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37 (5): 581–587.
- [12] Montesissa C, Anfossi P, Biancotto G, *et al.* In vitro metabolism of clenbuterol and bromobuterol by pig liver microsomes [J]. *Xenobiotica*, 1998, 28(11): 1049–1060
- [13] Siraki AG, Jiang J, Mason RP. Investigating the mechanisms of aromatic amine-induced protein free radical formation by quantitative structure-activity relationships: implications for drug-induced agranulocytosis[J]. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23(5): 880–887.
- [14] Narwaley M, Michail K, Arvadia P, *et al.* Drug-induced protein free radical formation is attenuated by unsaturated fatty acids by scavenging drug-derived phenyl radical metabolites[J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(7): 1031–1039.

(责任编辑: 张宏梁)

## 作者简介



王鹤佳, 助理研究员, 主要研究方向为兽药及污染物的代谢和残留检测。  
E-mail: wanghejia@ivdc.gov.cn



毕言锋, 副研究员, 主要研究方向为兽药及污染物的代谢和残留检测。  
E-mail: byf006@163.com