

高效液相色谱法检测猪肉中盐酸克伦特罗的前处理方法

Research on pre-treatment method for HPLC determination of clenbuterol hydrochloride in pork

朱晓艾¹ 陈雅君¹ 陈雪香¹ 贺丽苹^{1,2} 夏旭¹ 曹庸¹

ZHU Xiao-ai¹ CHEN Ya-jun¹ CHEN Xue-xiang¹ HE Li-ping^{1,2} XIA Xu¹ CAO Yong¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学测试中心, 广东 广州 510642)

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China;

2. Instrumental Analysis and Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

摘要:通过优化样品前处理方法和高效液相的检测条件,建立快速简便测定猪肉组织中盐酸克伦特罗的高效液相色谱法。结果表明,优化后的样品前处理方法只需提取、蛋白质沉淀两个过程,且采用 C18 色谱柱,流动相乙腈:0.02 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)=25:75,流速 1.0 mL/min,进样量 20 μ L,检测波长 243 nm,可以获得良好的色谱峰,检测限为 0.025 mg/kg,样品加标回收率达 88.55%~94.03%,精密度 RSD<2%。该方法能达到准确、快速、低成本、简便的要求,适用于猪肉组织中盐酸克伦特罗的快速检测。

关键词:盐酸克伦特罗;猪肉组织;高效液相色谱法;样品前处理

Abstract: The method of detection of clenbuterol hydrochloride in pork by high-performance liquid chromatography was established after simplifying the steps of the national standard method to optimize the chromatographic conditions. The results showed that, the optimized conditions just require two processes of extraction and protein precipitation, by using Alonsil C18 HPLC column, optimized parameters for HPLC running were mobile phase ratio of acetonitrile to ammonium acetate 25:75, flow rate 1.0 mL/min, injection volume 20 μ L, detection wavelength 243 nm and detection limit was 0.025 mg/kg. The coefficient of recovery was up to 88.55%~94.03% and the relative standard deviation (RSD) was less than 2%. This method is accurate, rapid, low-cost and simple, which is suitable for rapid detection of clenbuterol in pork.

Keywords: clenbuterol; pork organization; HPLC; pre-treatment method

盐酸克伦特罗(clenbuterol, CLB),俗称瘦肉精,是一种白色或类白色的结晶粉末状选择性 β -肾上腺素受体激动剂,溶于水、乙醇,微溶于丙酮,不溶于乙醚^[1],常用作支气管扩张剂、兴奋剂,治疗慢性阻塞性肺疾病^[2]。盐酸克伦特罗化学性质稳定,能够改变动物体内的代谢途径,促进肌肉,特别是骨骼肌中蛋白质的合成,抑制脂肪的合成,从而加快增长速度,增加瘦肉含量,改善胴体品质^[3,4]。人食用了饲喂盐酸克伦特罗的动物所产生的畜产品后,残留在人体内的盐酸克伦特罗可导致人体出现肌肉震颤、心悸、目眩、恶心、呕吐、发烧等症状^[5]。2002 年 9 月 10 日中国农业部、卫生部和国家药品监督管理局发布的《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》明确把盐酸克伦特罗等 7 种“瘦肉精”列为禁用药品。

为了彻底控制盐酸克伦特罗的残留,保障食品安全,对盐酸克伦特罗的有效检测和监控刻不容缓^[6]。目前盐酸克伦特罗分析方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)和免疫化学法如酶联免疫分析法(ELISA)、胶体金免疫检测试纸条(DIGFA)、毛细管电泳(EC)等^[7,8]。其中,高效液相色谱分析盐酸克伦特罗时不需要衍生,利用 β -肾上腺素受体激动剂分子可与 C18 或 C8 固定相分子相互作用,应用反相柱检测 β -激动剂类物质,且 HPLC 检测精密度高、假阳性低。中国 GB/T 5009.192—2003《动物性食品中克伦特罗残留量的测定》也将其列为第二法。但 GB/T 5009.192—2003 中高效液相色谱法的前处理方法较为复杂,需要进行提取、萃取、净化等多步处理过程,其操作繁琐、耗时长。近年来研究人员因国标方法存在的不足而提出了一些新的前处

基金项目:国家科技支撑计划课题(编号:2012BAK17B00)

作者简介:朱晓艾(1989—),女,华南农业大学在读硕士研究生。

E-mail: zhuxiaoai1114@126.com

通讯作者:曹庸

收稿日期:2014-12-15

理方法,王琦等^[9]在 GB/T 5009.192—2003 第二法的基础上,在样品前处理过程中减少加入氯化钠,同时优化了色谱条件,但样品前处理过程仍然操作繁琐、耗时长;吴林阳等^[10]在 GB/T 5009.192—2003 第二法的基础上,简化了前处理过程,但色谱条件较复杂。本试验拟在前人研究的基础上,提出 4 种样品前处理方法,并与 GB/T 5009.192—2003 和文献[9]的预处理方法进行比较,再对高效液相色谱条件进行优化,旨在猪肉组织中盐酸克伦特罗的检测提供一种简便、快速的定量方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

- 猪肉组织:华南农业大学三角市市场;
- 盐酸克伦特罗标准品:分析纯,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;
- 乙酸铵、亚铁氰化钾、乙酸锌、甲酸:分析纯,天津富宇精细化工有限公司;
- 乙腈:色谱纯,美国 J. T. Baker 公司;
- 电子天平:AL104 型,梅特勒—托利多仪器有限公司;
- 超声波清洗器:KQ-250 型,苏州江东精密仪器有限公司;
- 紫外可见分光光度计:UV-1750 型,日本岛津公司;
- 离心机:L530 型,湖南湘仪实验仪器开发有限公司;
- 旋转蒸发器:R204B3 型,上海申生科技有限公司;
- 高效液相色谱仪:LC-10AT 型,日本岛津公司;
- C18 色谱柱:Agilent,安捷伦科技有限公司。

1.2 方法

- 1.2.1 检测波长的选择 使用紫外分光光度计对 10 μg/mL 的盐酸克伦特罗标准溶液进行全波长扫描,确定检测波长。
- 1.2.2 高效液相色谱条件的选择 色谱柱:Agilent C18 色谱柱,250 mm×4.6 mm(5 μm);检测器:紫外检测器;检测波长:243 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;流动相:分别以甲醇—水、甲醇—0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液(pH=2.5)、乙腈—0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液(pH=2.5)、乙腈—含 0.1%甲酸的 0.02 mol/L 乙酸铵溶液、0.02 mol/L 硫酸铵—甲醇—乙腈作流动相进行测定。
- 1.2.3 标准溶液的配制与标准曲线的绘制 精密称取盐酸克伦特罗 1 mg 溶解于 1 mL 乙腈,配制成浓度为 1 mg/mL 的储备液。精密吸取储备液,分别稀释成 0.4,0.2,0.1,0.05,0.025 μg/mL,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,以选定的高效液相色谱条件测定,以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 X 为横坐标绘制标准曲线,并进行线性回归分析。
- 1.2.4 样品的预处理方法

- (1) 方法①:GB/T 5009.192—2003 第二法的预处理方法。
- (2) 方法②:文献[9]的预处理方法。
- (3) 方法③:根据文献[10],修改如下:称取 5.00 g 样品

于 50 mL 离心管中,分别加入 0.02 mol/L 硫酸铵 20 mL,106 g/L 亚铁氰化钾 2 mL,220 g/L 乙酸锌 2 mL,乙腈 5 mL,流动相定容至 50 mL,超声(40 kHz,250 W)15 min,5 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤备用。

(4) 方法④:在方法③基础上,将硫酸铵换为乙酸铵,超声时间换为 20 min,定容体积换为 40 mL。

(5) 方法⑤:在方法④的基础上,将离心后上清液加至经 6 mL 甲醇,3 mL 水,3 mL 磷酸二氢钠缓冲液活化后的弱阳离子交换固相萃取柱,依次用 4 mL 甲醇,4 mL 水冲洗柱子,弃去流出液,用 6 mL 氨化甲醇(5%)冲洗柱子并收集流出液。所得溶液氮气吹干,用 1 mL 流动相溶解,经 0.22 μm 滤膜过滤备用。

(6) 方法⑥:按方法④提取两次,将上清液合并转移至旋转蒸发瓶浓缩至干,3 mL 乙腈洗脱,收集洗液并经 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

- 1.2.5 加标回收率试验 称取 5.00 g 样品,加入 8 μg 盐酸克伦特罗标准品,按照 1.2.4 方法④处理样品并进行加标回收率试验,重复 5 次。
- 1.2.6 精密度试验 称取 5.00 g 样品,加入 8 μg 盐酸克伦特罗标准品,按照 1.2.4 方法④处理样品,重复测定 10 次,计算出峰时间和峰面积的相对标准偏差(RSD),以确定该方法的精密度。
- 1.2.7 稳定性试验 取 5.00 g 猪肉,加入 8 μg 盐酸克伦特罗标准品,按照 1.2.4 方法④处理后,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进行测定,重复 3 次,计算出峰时间和峰面积的相对标准偏差(RSD),以确定样品的稳定性。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 检测波长的选择 使用紫外分光光度计对 10 μg/mL 的盐酸克伦特罗标准品进行全波长扫描,结果见图 1。由图 1 可知,在 210,243,295 nm 处均有明显的吸收峰,其中 243 nm 处吸收强,且干扰少、基线稳定。所以选择 243 nm 为检测波长。

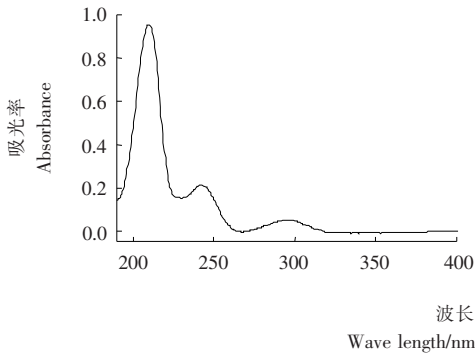


图 1 盐酸克伦特罗紫外全波长扫描图谱
Figure 1 The full wavelength scanning of clenbuterol hydrochloride

2.1.2 流动相的选择 本试验选取 5 种流动相进行测定,当流动相为乙腈:含 0.1% 甲酸的 0.02 mol/L 乙酸铵溶液为 25:75 时,获得良好的分离度和色谱峰形,故选择该溶液作为流动相。

2.2 盐酸克伦特罗标准曲线

将盐酸克伦特罗标准溶液以选定的高效液相色谱条件测定,以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 X 为横坐标绘制标准曲线,如图 2 所示,并进行线性回归分析,得其回归方程为: $Y=57\,093X-157.37$, $R^2=0.999\,6$ 。

2.3 样品前处理条件的选择

本研究采用 6 种前处理方法处理样品,每种方法各有优缺点,具体分析见表 1。

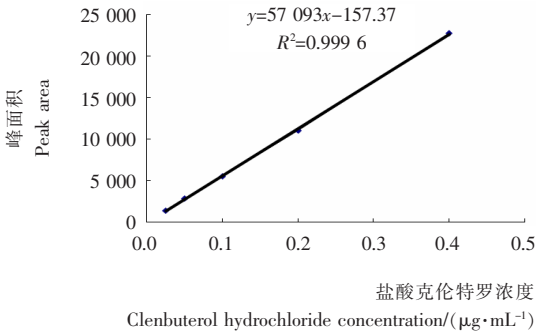


图 2 盐酸克伦特罗标准曲线

Figure 2 The standard curve of clenbuterol hydrochloride

表 1 样品前处理条件的比较

Table 1 Comparison of sample pre-treatment conditions

方法	操作过程	耗时/h	色谱峰	回收率/%
方法①	蛋白质沉淀、萃取(加氯化钠)、浓缩、固相萃取	5	峰型良好,杂峰分离效果佳	30.0
方法②	蛋白质沉淀、萃取、浓缩、固相萃取	3	峰型良好,杂峰分离效果佳	17.6
方法③	硫酸铵溶液提取、蛋白质沉淀	1	峰型良好,杂峰分离效果佳	89.7
方法④	乙酸铵溶液提取、蛋白质沉淀	1	峰型良好,杂峰分离效果佳	92.5
方法⑤	硫酸铵溶液提取、蛋白质沉淀、固相萃取	3	峰型良好,杂峰分离效果佳	20.4
方法⑥	乙酸铵溶液提取、蛋白质沉淀、浓缩	3	杂峰多,目标峰与杂峰难以分离	—

综合考虑,前处理方法①、②、⑤、⑥操作繁琐、耗时长,且加标回收率低;前处理方法③、④操作方便,杂峰与目标峰分离效果佳且峰型良好,但方法③加标回收率低,因此本试验选择方法④为样品前处理方法,该法提取样品的色谱图见图 3。

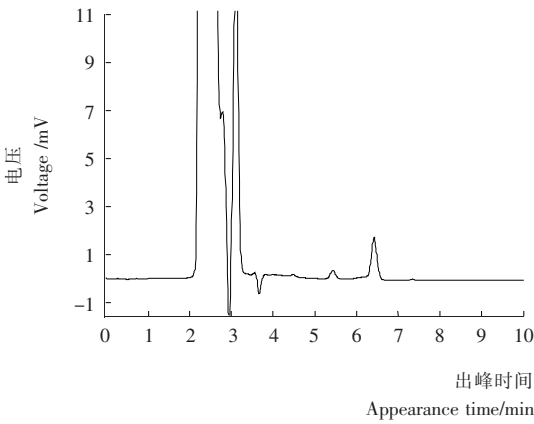


图 3 方法④提取样品的色谱图

Figure 3 The chromatogram of sample treated with method 4

2.4 方法评价

2.4.1 精密度试验 由表 2 可知,盐酸克伦特罗标准品出峰时间的 RSD 为 0.127%,峰面积的 RSD 为 1.56%,均不超

表 2 精密度试验结果

Table 2 Results of precision tests

编号	出峰时间/s	峰面积
1	6.382	19 354
2	6.388	19 248
3	6.381	19 536
4	6.381	19 197
5	6.372	18 924
6	6.363	19 085
7	6.367	19 443
8	6.374	19 026
9	6.367	19 806
10	6.371	19 770
平均值	6.375	19 339
RSD%	0.127	1.56

过 2%,说明该仪器具有良好的精密度,符合分析试验要求。

2.4.2 回收率试验 由表 3 可知,样品加标回收率在 88.55%~94.03%,说明该方法的准确性良好,检测效果准确可靠。

2.4.3 稳定性试验 由表 4 可知,盐酸克伦特罗标准品出峰时间的 RSD 为 0.317%,峰面积的 RSD 为 1.74%,均不超

表 3 加标回收率试验结果

Table 3 Results of recovery tests

编号	加标/ μg	测得/ μg	回收率/%
1	8	7.09	88.68
2	8	7.15	89.43
3	8	7.52	94.03
4	8	7.08	88.55
5	8	7.40	92.45

表 4 稳定性试验结果

Table 4 Results of stability tests

时间/h	出峰时间/s	峰面积
0	6.34	23 660
2	6.37	23 550
4	6.39	24 272
8	6.38	24 268
12	6.34	23 237
24	6.38	23 934
平均值	6.36	23 820
RSD%	0.317	1.74

过 2%，表明样品在 24 h 内保持稳定。

3 结论

本试验建立了一种快速、简便、准确的高效液相色谱检测方法,线性范围为 0.025~0.400 $\mu\text{g/mL}$,线性相关系数 R^2 为 0.999 6,保留时间 RSD 为 0.127%,峰面积 RSD 为 1.56%,回收率达 88.55%~94.03%。本试验重点对样品前处理方法进行了研究,优化的前处理方法对样品的前处理只需提取、蛋白质沉淀两个过程,简单快速,出峰时间短。与

GB/ T 5009.192—2003 相比,前处理过程简化,分析时间缩短,适合于盐酸克伦特罗含量的快速、准确测定;同时优化了文献[9]中的前处理方法及文献[10]中的色谱条件,提高了回收率,因此可作为对快速检测出阳性或疑似阳性的样品进行复检的方法,适用于样品数量较多的快速检测。

参考文献

1 Brockway J M, MacRae J C, Williams P E. Side effects of clenbuterol as a repartitioning agent[J]. The Veterinary Record, 1987,120(16):381~383.

2 Qiao Feng-xia, Du Jing-jing. Rapid screening of clenbuterol hydrochloride in chicken samples by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2013,923~924:136~140.

3 王安如,陈丽仙,宋维平,等. 瘦肉精的“前世今生”及解决方式探索[J]. 兽医导刊, 2011(4):4~6.

4 Posyniak 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):61~67.

5 姚小兵,金福源,陶艳华. 盐酸克伦特罗的危害及其检测技术[J]. 中国畜禽种业, 2010(12):41~43.

6 李正明. 食品安全体系的建立与运作[J]. 食品与机械, 2002(2):4~5.

7 李靖靖,郭林. 免疫法检测瘦肉精的现状及其发展[J]. 食品与机械, 2012,28(3):266~269.

8 彭涛,赖卫华,张富生,等. 20 种 β_2 -受体激动剂的性质及检测方法研究进展[J]. 食品与机械, 2013,29(3):254~260.

9 王琦,张笑,邢文,等. 动物性食品中克伦特罗残留量的测定高效液相色谱法方法改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2011,21(6):1 363~1 364.

10 吴林阳,冯亮. 高效液相检测盐酸克伦特罗(瘦肉精)方法改进[J]. 中国计量, 2011(11):86~87.

信息窗

研究称儿童定期少量摄入花生制品或可避免过敏

中新网 2 月 25 日电 据外媒报道,食物过敏为生活带来不便,花生过敏更是美国因食物过敏致死个案的头号杀手。专家以往呼吁父母尽量减少幼儿接触可致敏食物,但《新英格兰医学期刊》刊登的最新研究显示,在儿童年幼时定期喂食少量含花生制品,反而有助减少或避免患上花生过敏。

研究团队在英国招募 640 名在 4 个月至 11 个月之间、被认为属花生过敏高风险的幼儿,进行为期 5 年的观察。

科学家把幼童随机分成两组,其中一组每周至少摄取 6 g 花生蛋白(相当于 24 粒花生),另一组则完全避开含花

生食品。结果发现,完全避开进食花生但最终出现花生过敏的儿童占 17.2%,相反定期进食花生的只有 3.2%。

研究发现,让幼童定期摄取花生,有助避免免疫系统对花生蛋白变得过分敏感。团队目前正进一步观察,此前定期摄取花生的群组若停止食用花生一段时间,能否继续维持无过敏状态,预计今年稍后公布结果。

不过专家呼吁,父母不应突然开始为年幼子女喂食花生,担心部分人可能产生激烈反应,应该先向医生查询。

(来源:www.foodmate.net)