

肉类食品激素残留检测技术研究进展

张国胜, 董学芝*, 李 畅, 王爱芳

(河南大学化学化工学院污控研究所, 河南 开封 475001)

摘 要: 本文讨论了现代分析中肉类食品激素残留检测的萃取分离和检测技术, 综述了这些方法的原理及其应用, 探讨了肉类食品激素残留检测的萃取分离和检测技术的发展方向。

关键词: 激素残留; 萃取分离; 检测技术

Development of Determination Technique of Hormone Residues in Meat Products

ZHANG Guo-sheng, DONG Xue-zhi*, LI Chang, WANG Ai-fang

(Pollution Control Institute, College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstracts: The technique of extraction and determination of hormone residues in meat products in modern analysis was dissertated in this paper. Principles and applications of methods used in the extraction and determination were summarized, based on which the developmental direction were discussed.

Key words hormone residues; extraction and separate; technique of determination

中图分类号: R155.55

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0481-06

动物源性食品中违禁药物的残留已成为困扰世界范围内食品卫生的难题, 严重威胁着人们的身体健康。其中激素残留造成的异性化现象、乳腺癌、卵巢癌等疾病, 以及近几年来以克仑特罗为代表的 β -受体激动剂动物性食品的中毒事件^[1-4], 使各国都加强了激素残留的监督检测。目前我国激素残留检测方法多数灵敏度较低, 达不到欧美等发达国家的检测要求, 甚至有些激素残留项目无检测方法^[5-6]。近年来由于新的萃取净化处理技术、更加灵敏的检测技术, 获得了更多的样品处理简单、回收率更高分的离萃取技术, 以及检出限更低、准确度和灵敏度更高的检测方法。本文对激素残留分离和检测研究进展作一综述。

1 肉类食品中残留激素的分离

由于肉类食品中激素残留水平较低, 内源性干扰物质较多, 所以激素残留分析中样品的前处理是分析工作中至关重要的环节。方法的检出限、回收率、准确度与样品的萃取净化分离效果密切相关, 但是目前常用的一些样品处理技术已经难以满足高灵敏度、高选择性、快速自动化的分析要求, 如何获得高的萃取净化效果成为激素残留分析中的重要课题, 因此许多的分析工作者在这一领域内进行了积极的探索, 并取得了一些新的进展。

1.1 液-液萃取(LLE)

LLE 是激素残留检测中最常用的一种分离萃取技术。常用萃取剂中三氯甲烷应用最为广泛^[7]。激素具有两性基团, 碱性条件下溶于水, 在碱性条件下提取后, 调节溶液为中性或酸性萃取至有机相, 样品中激素提取率可达 90% 以上^[8]。LLE 法样品处理简单, 设备要求条件较低, 但是该方法萃取率较低, 干扰成分较多, 特别在色谱分析中常常导致组分不能完全分离, 色谱峰相互重叠, 检测周期过长, 甚至污染色谱柱, 造成使用寿命降低。近年来发展的微波辅助萃取^[9]、超声波辅助萃取^[10]以及涡旋震荡萃取等有关 LLE 萃取术, 极大地提高了萃取分离效果。涂晓明^[11]等以甲醇-丙酮萃取动物组织中的 5 种激素, 回收率在 79.0%~106.3% 之间; 方赤光^[8]等用乙醚和石油醚萃取畜禽肉肝肾中激素残留量, 当加入样品中 1.0ml 10 μ g/L 激素混合标准溶液后, 回收率在 76.7%~96.4% 之间, 方法的检出限为 0.05ng; 宋莉晖^[12]等以 0.1mol/L 高氯酸溶液超声辅助萃取猪肉组织中的克仑特罗, 加标回收率为 90%。

1.2 固相萃取(SPE)

SPE 是一种固体吸附剂吸附萃取技术, 其原理与液相色谱相似, 根据样品在吸附剂与溶液中的溶解度的差异及功能团的相互作用的最佳化而达到分离的目的^[13]。与 LLE 相比, SPE 分离效率高、回收率高、不需要使

收稿日期: 2006-12-15

作者简介: 张国胜(1972-), 男, 硕士, 研究方向为食品分析。E-mail: jyzxgssz@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 董学芝(1949-), 女, 教授, 主要从事造纸黑液污染治理研究。E-mail: dxz@henu.edu.cn

用超纯溶剂、有机溶剂的使用量少,减少了对环境的危害、能处理小体积试样、无相分离操作、容易收集分离物组分、操作简单、省时省力、易于自动化^[14]。但是部分分析物可能穿透SPE柱,也有可能不被完全洗脱,仍有部分残留在柱上而造成损失^[15]。近年来新型的薄膜SPE具有截面积大、不易堵塞、可用高流量、处理时间短等优点^[16-17],正逐步取代柱型SPE^[18]。谢孟峡等^[19]用SPE萃取肉羊中盐酸克伦特罗,样品经C₁₈和离子交换固相萃取净化,用双三甲基硅基三氟乙酰氨(BSTFA)衍生后测定,萃取回收率在75%~95%之间,加标回收率在70%~85%之间,相对标准偏差在4.95%~13.4%之间,最低检出限为1μg/kg;康莉等^[20]以HPLC测定肉中的盐酸克伦特罗,样品经超声萃取后离心,经C₁₈净化后测定,方法的检出限为1.7ng,回收率在81.6%~91.4%之间;杨景贤等^[21]用C₁₈固相萃取柱萃取,七氟丁酸酐衍生后测定19-去甲睾酮,检出限为1μg/kg,回收率为61%~101%,Suo J J等^[22]用GS-MS法同时测定甾体类激素和合成激素,样品在超声萃取后,再经过C₈-SPE柱萃取,回收率在95%~106%之间,然后经硅胶萃取柱萃取,回收率在96%~103%之间,总回收率经测定在90%以上;Shao B等^[23]用LC-MS法测定动物组织中的11种激素,样品经HLB-SPE柱萃取后,再经氨基丙烷键合萃取柱萃取后测定,11种激素平均回收率在64%~104%之间。SPE既可用于复杂样品中微量或痕量目标化合物的提取、又可用于净化、浓缩或富集,是目前样品前处理中的主流技术之一。

1.3 固相分散萃取技术(MSPD)

Barker^[24]等在1989年提出了一种新的快速样品处理萃取技术,称为固相分散萃取。此技术能够同时萃取和净化样品^[25],避免了样品匀化、转溶、乳化、浓缩造成的待测物损失。洗涤和洗脱剂的选择及其使用顺序是MSPD成功的关键^[26],分析者可改变洗脱分离模式以获得好的结果;根据柱性质和相互作用范围,可使用单一溶剂或不同的溶剂洗脱,使不同极性的待测物与基体分离。MSPD缩短了样品的处理时间,大大减少了溶剂的使用量,简化了样品的处理程序。丁雅韵等^[27]取0.5g匀浆后的动物组织肝脏加入2g左右的C₁₈填料和100μl己烯雌酚,研磨混匀装柱,用正己烷和乙酸乙酯分别淋洗萃取柱,再用N-甲基, N-三甲基硅烷三氟乙酰胺(MSTFA)衍化,经GS-MS测定不同标准品加入量的加标回收率在80%~101%,5ng标准品经MSPD萃取步骤的加标回收率高达99.3%±2.6%(n=4);Horne等^[28]采用MSPD法处理牛肝样品中的克伦特罗残留,取0.5g匀浆后的牛肝样品加入2g C₁₈填料研磨混匀装柱,用8ml的正乙烷-乙醚(60:40)淋洗,以8ml甲醇洗脱克伦特罗,放射免疫分析法测定,效果良好。

1.4 超临界流体萃取技术(SFE)

SFE是80年代后期发展起来的一门分离净化技术,近年来该技术成为分离科学中发展较快的一个领域^[29-30]。超临界流体是一种理想的萃取剂^[31]。在实际工作中,常用的萃取剂要求是临界温度和压力较低的物质,用得最多的是CO₂^[31]。萃取极性和离子化的化合物时,可用极性大的物质作萃取剂或添加剂。提高萃取率除了正确选择萃取剂之外,改变压力和温度也可以取得较好的效果^[32],因此采取程序升压就能把溶解度从小到大的物质先后从样品中萃取出来,达到提取与分离的目的。它主要用于处理固体样品,特别适合萃取非极性脂溶性化合物,SFE与其它技术如溶剂萃取、蒸馏、常规柱色谱等相比,显示了许多特点,如速度快、效率高、选择性强、几乎不消耗溶剂等优点^[33],广泛应用于动物组织样品前处理中^[34-35]。甾类同化激素包括性激素和肾上腺皮质激素,具有较高的脂溶性,即便在温和的条件下超临界CO₂对甾类同化激素仍有相当好的溶解性,已有不少SFE在甾类同化激素净化中的应用报道^[36-37]。一般首先将组织冻干、研碎,与适量的助滤剂混匀后装入SFE萃取池萃取。多数苯乙胺类药物为中等极性的疏水物质,样品处理用SEF也较合适,Jimenez^[38]等采取离子对型的克伦特罗,CO₂为萃取剂,在38.3MPa和80℃下萃取30min,回收率达87%。

1.5 免疫亲和色谱(IAC)

IAC是极为有效的样品前处理方法,它是以抗原抗体的特异性、可逆性免疫结合反应为原理从样品基质中分离出待测组分的色谱技术。IAC的最显著优点在于对待测物的高效、高选择性保留能力、耗时少、节省溶剂、操作简便,特别适用于复杂样品痕量组分的净化与富集。IAC作为一项颇具发展潜力的技术开始应用激素分析中样品前处理过程,它的高选择性的净化和富集能力使得很多繁琐的样品处理难题迎刃而解。IAC在激素残留样品的净化中应用广泛^[39-41],已有不少商品柱出售。许多分析方法中,IAC是激素分析的关键净化步骤,有时是唯一的净化方法,并且可以将两种以上的抗体混合偶联成固定相或将两种以上免疫抗体固定相混合使用,可同时分离多种激素。Ginke V等^[42]曾用7种免疫固定相装填IAC柱来净化样品中的甾类同化激素。Bostsoglou N A等^[43]首次用IAC柱净化组织中的克伦特罗。Blokland M H等^[44]将自制多抗体IAC柱,萃取10ml猪血清中的激素,LC-MS测定,检出限为10ng/ml。Talat等^[45]等精密称取均质后的动物组织样品5g,酶解后,经IAC柱萃取,洗脱液再经衍生、浓缩后GC-MS测定,三种β-受体激动剂、五种类固醇激素的回收率82%~96%之间。但是一般IAC商品柱价格昂贵,分析成本比较高,限制了它的广泛应用。

除上述之外, 还有一些高效的样品提取净化分离技术, 如固相微萃取 (SPME)、膜分离技术 (渗析、超滤)、分子印迹技术 (MIP)、吹扫捕集 (SCD)、制备色谱法等也在激素残留分析中得到应用^[46-50]。近年来发展起来的这些样品前处理方法, 在激素残留分析中的应用上各有其特点。固相萃取 (SPE) 的应用最为普遍成熟, SPE 柱已是商品化产品, 方法容易标准化, 可选择的品种很多, 一次性使用, 是目前残留分析样品前处理中的主流技术。特别是 SPE 通过柱切换装置以适当的结构与 HPLC、GC 连接, 实现了样品净化富集过程自动化, 但 SPE 的高选择性的优点不够突出, 容易将共存的干扰物一起萃取出来, 对于待测组分浓度极低的样品, 富集倍数有限, 可能达不到测定要求; 基质固相分散 (MSPD) 对生物组织样品的处理较有效, 但研磨的粒度大小和填装技术的差别可能会使淋洗曲线有所差异, 方法不易标准化; 免疫亲和色谱 (IAC) 是目前净化和富集效能最强的样品处理技术, 但尚处探索阶段; 超临界流体萃取 (SFE) 速度快、效率高、几乎不消耗溶剂, 但装置价格昂贵。

2 肉类食品中激素残留的检测方法

由于肉类食品中激素残留量相对较低, 过去常用的检测方法相对滞后, 分辨率和灵敏度低的检测手段已经不能满足当前高分辨、高灵敏度、低检测限的激素分析发展的要求。所以近年来国内外食品分析工作者都十分关注激素残留的检测技术, 发展了一些新的检出限更低, 分辨率和灵敏度更高的测定方法。

2.1 气相色谱法

近年来有气相色谱法测定激素的报道, 一般将萃取后的激素样品先甲基硅烷化, 然后用 2% OV-17 的填充柱和备有氢火焰检测器的气相色谱仪分离测定^[51]。由于激素是高沸点、低挥发性物质, 一般不适宜采用气相色谱法直接进行测定。谢维平^[52]等用气相色谱直接测定盐酸克仑特罗, 样品经均质, 超声萃取后, 再经 C₁₈ 小柱净化分离, HP-1 石英毛细管柱程序升温, 该法相对标准偏差 7.5% (n=6), 平均回收率为 86%, 相关系数 $r=0.9993$, 线性范围 0.1~40mg/L, 检出限为 0.03mg/L。崔晓明^[53]用气相色谱衍生测定盐酸克仑特罗, 样品固相萃取后, 用 40 μ l BSTFA 衍生, 该方法相关系数 $r=0.9996$, 回收率大于 72%, 检出限为 1.0 μ g/kg。

2.2 高效液相色谱法 (HPLC)

HPLC 是目前应用最广泛的测定激素的方法, 它是 20 世纪 70 年代迅速发展起来的一项高效分离技术, 可分析热稳定性差、沸点高、摩尔质量大的有机物, 具有选择性高、操作相对比较简单等特点, 所以它是国内一般实验室激素检测中常用的分析方法。姚笋平^[54]等人用 HPLC 测定动物组织中己烯雌酚, 以甲醇提取、Zorbax

SB-C₁₈ 柱为固定相, 甲醇-水 (70:30) 为流动相, 该法回收率大于 85%, 己烯雌酚浓度在 0~200 μ g/kg 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 灵敏度达 0.15mg/kg; 蔡玉枝^[55]等人用 HPLC 测定猪组织中盐酸克仑特罗, 以 60% 甲醇超声提取, 用 Dionan sil C₁₈ 柱为固定相, 甲醇-0.01mol/L 磷酸二氢钠 (33:67) 为流动相。回收率大于 86%; 罗晓燕^[56]等人用固相萃取 (SPE) HPLC 法同时测定畜禽组织中雌雄性激素残留, 固相萃取柱为 Alltech Extract-clean columns C₁₈ 200mg/4.0ml, 以甲醇为洗脱液, SUPELCO Discovery C₁₈ 5 μ m 250 $\times$ 4.6mm 柱为固定相, 流动相为甲醇-水 (85:15), 该法线性关系良好, 己烯雌酚的相关系数为 0.999, 检出限为 9.5 μ g/kg; 丙酸睾酮的相关系数为 0.99994, 最低检出限为 8.4 μ g/kg。回收率在 92%~98% 之间; 林奕芝^[57]等用 HPLC 法同时测定肉与肉制品中沙丁醇和 8 种雌性激素残留量, 经甲醇超声萃取、离心、浓缩后, 0.45 μ m FH 膜过滤后, 利用高效液相色谱分析, 相关系数大于 0.999, 变异系数 $CV \leq 1.1\%$, 检出限 ≤ 6 ng, 回收率在 84.5%~101% 之间; 吴启陆^[58]等用 HPLC 法同时测定鸡蛋中 4 种激素残留量, 最低检出限为 0.01 μ g/ml。方法回收率在 75.8%~104.3% 之间; Lurie I S^[59]用 1.7 μ m C₁₈ 液相色谱小柱、二极管阵列检测器检测类固醇激素和苯乙胺类药物, 乙腈-磷酸盐缓冲溶液 (pH1.7) 为流动相, 15 种激素在 2.5min 内得到分离, 比普通液相色谱和毛细管电泳分别快 12 倍和 3 倍。

2.3 免疫分析法

免疫分析法实际上是一种以抗体或抗原为分析试剂的特殊分析方法, 免疫分析法包括酶联免疫分析法、放射免疫分析法和荧光免疫分析法, 这三种方法特异性强, 灵敏度高 (可达 10^{-12} g), 操作简单易行, 条件要求不高, 然而抗体缺乏高灵敏试剂所具有的分析信号反差, 其假阳性很高, 免疫分析法正逐渐成为激素残留分析初筛时常用的方法。

2.3.1 酶联免疫分析法 (ELISA)

酶联免疫分析法是免疫分析法中应用最广泛的一种分析方法, 它采用酶联竞争原理。上海赛群生物科技有限公司生产的丁胺醇残留酶联免疫试剂盒平均检测下限为 0.1ng/g, 回收率 75%~105%^[60]; 宓晓黎等^[61]自制盐酸克仑特罗酶联免疫试剂盒在 12.5~0.1ng/ml 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.9980, 灵敏度达 0.1ng/ml。

2.3.2 放射免疫分析法 (RIA)

它是生物化学中的免疫分析, 加上放射性“标记”, 创立的一种新的生物化学分析方法。它对于测定极其微量的生物活性物质具有独到的优越性, 解决了以往的化学分析、生化分析和仪器分析解决不了的超微量分析的难题, 样品处理简单, 放射免疫法分析法不

仅保留了免疫反应的高度精密的专一性,而且又引入了放射性分析的高度灵敏性,其灵敏度可达 $10^{-9}\sim 10^{-12}$,Elizabeth等^[62]用RIA试剂盒测定牛肝中的盐酸克仑特罗,盐酸克仑特罗在1ng/g和2.5ng/g时平均回收率为 $95\%\pm 15\%$ 和 $89\%\pm 9\%$ 。虽然放射免疫法分析法有很好的特异性和灵敏度,但是其半衰期较短,且有少量辐射,限制了它的广泛应用。

2.3.3 荧光免疫分析法(FIA)

FIA是由Coons等首创的一种免疫标记,抗体结合,它结合了免疫学反应的特异性以及在黑暗背景中发光易被发现的敏感性的优点,同放射免疫相比、克服了放射免疫分析法中的核辐射缺点,同色谱法相比,样品处理简单,并且一次能测定多个样品,但是它存在对温度依赖性强,荧光强度取决于激发波长的缺点。Small B C等^[63]用时间分辨FIA技术测定鱼中的生长激素检出限为0.2ng/ml,回收率大于90%。20世纪80年代发现起来的荧光免疫发光分析技术,它将发光分析与免疫分析结合起来,具有高灵敏度、特异性强的优点,胶体全免疫标记技术,利用特异性抗原抗体反应,在光镜、电镜下对抗原物质进行定位、定性、定量研究。

2.4 毛细管电泳检测技术(CE)

1981年Jorgenson和Lukace阐明了CE的有关理论^[64],为CE的发展奠定了基础,从此,CE的研究与应用迅速发展,各种分离模式相继建立,各种操作技术日益完善,成为分析化学领域中发展最快的分离技术^[65]。与其他检测技术相比,CE的灵敏度较高,常用的紫外检测器的检测限可达 $10^{-13}\sim 10^{-15}\text{mol}$,激光诱导荧光检测器高达 10^{-21}mol ^[66],分辨率较高,理论塔板数为几十万,达几百万甚至千万,速度快,最快可在60s内完成,样品用量少,1~10nl就可分析,试剂无毒且用量少,消耗费用低,只需几毫升的流动相,自动化程度较高。但是其存在着设备过于昂贵,不能成为实验室常用仪器设备的缺陷。管清月^[67]等用液液萃取分离,毛细管电泳-电化学检测器(CE-ED)检测,测定盐酸克仑特罗、沙丁胺醇,测下限分别为 1.11×10^{-7} 和 $9.80\times 10^{-8}\text{mol/L}$,回收率为79%~103%;苏萍^[68]等用毛细管电泳免疫法分析雌三醇,雌三醇的检测限为31.6ng/L,线性范围50~500ng/L,回收率大于91%。

2.5 联用技术

联用技术是将两种或两种以上的仪器通过仪器硬件接口和计算机将它们自动联接起来,利用分离手段和鉴定方法中的各自优点,从而提高了方法的灵敏度、准确度,以及复杂混合物的分辨力,获得了单个方法所无法具备的某些功能。由于计算机技术的迅速发展,极大地推进了联用技术的发展速度。

2.5.1 气质联用法(GC-MS)

气质联用法是将气相色谱仪的分离系统与质谱仪的检测系统联接起来,GC-MS系统既发挥了色谱法的高分离能力又发挥了质谱法的高鉴别能力。Inmaculada等^[69]对GC-MS法检测克仑特罗不同样品的处理方法,以及不同的检测模式进行了系统的阐述;孟娟^[70]等建立了气质法同时测定动物性食品中的8种 β 兴奋剂的残留量,结果相关系数大于0.999,检出限为0.5 $\mu\text{g/kg}$,回收率范围为51.9%~101.7%($n=6$),相对标准偏差为2.7%~16.0%;Negrusz A等^[71]用固相萃取GC-MS测定狗血浆中的 β 兴奋剂的残留量,相关系数为0.995,检出限为5ng/ml,线性范围10~500ng/ml。

2.5.2 液质联用技术(LC-MS)

对于高极性、热不稳定、难挥发的大分子物质,使用GC-MS有困难,LC-MS的应用不受沸点的限制并能对热稳定性差的待测物进行分离、分析,LC-MS已成功应用于分析热稳定性差,分子量大的化合物,其分辨率高、灵敏度高、选择性高,定量定性能同时进行。王树槐^[72]等用LC-MS测定盐酸克仑特罗,该方法相关系数为0.9984,线性范围50~200ng/g;高燕红^[73]等用液质联用测定莱克多巴胺和克仑特罗,方法检出限分别为1.50、3.07 $\mu\text{g/kg}$;Hooijerink H等^[74]用LC-MS测定动物板油中的促孕激素,检出限为0.3ng/g。Shao B等^[2]用LC-MS测定动物组织样品中的11中激素,萃取后测定,线性范围为1~120ng/kg。

2.5.3 超临界流体色谱联用技术(SFC)

SFC是以超临界流体为流动相的临界分离检测技术。它弥补了GC和HPLC各自的不足,由于超临界流体具有气体和液体的双重性质,其黏度小、传质阻力小、扩散速度快,其分离能力和速度可与GC相比。另外,其密度、溶解力和速度可与HPLC相比。利用流体的物理、化学性质,在SPC中采用程序升密度相对于GC中的程序升温 and HPLC中的梯度淋洗,其突出的特点是SPC可以与大部分GC和HPLC的检测器相连,可与FID、ECD、FPD、UVC以及MS、FTIR等联用,这样就极大地拓宽了其应用范围,许多在GC和HPLC上需经过衍生才能分析的样品,都可以用SFC直接测定。David等^[75]用超临界流体色谱-紫外检测器-质谱仪对克仑特罗等激动剂进行了分离和测定,实验表明,该法线性范围宽(1~50 μg),重复性好,检出限低(2.5ng)。但由于其设备昂贵,限制了广泛应用。

2.5.4 其他联用技术

免疫亲和层析-酶免疫法是近几年来发展起来的一种新的分析方法,它是利用免疫亲和层析分离技术和酶免疫法检测结合起来,检测限达2pg^[76];高效液相色谱酶免疫分析法,它是利用HPLC分离系统和酶免分析

检测方法结合起来,检测限可达 $1 \times 10^{-6} \text{g/L}$ ^[76]; Praisler M^[77]用气相色谱-傅里叶变换红外光谱仪定性检测苯乙基类化合物;近几年来毛细管电泳技术与质谱的结合使激素的分离、定性、定量水平获得了极大的提高, Lotta^[78]用胶束电动毛细管色谱-质谱法测定6种类固醇激素,检出限均小于 $90 \mu\text{g/L}$,检测时间小于14min,相关系数大于0.994。

3 结 论

对残留量在 mg/kg 以下的激素残留水平进行定量定性分析时,必须建立高效和高灵敏度的检测方法。建立快速的分离系统和高灵敏度相结合的检测系统、以及多种残留同时快速分离测定方法,成为激素残留分析的一个重要研究方向^[79]。气相色谱和液相色谱与质谱的联用成为最有效的检测手段^[80]。一般说来,在各种检测方法中,酶联免疫分析法适于大量样品的快速测定,由于假阳性高,目前欧盟和美国等国家将酶免疫法作为筛选法,HPLC法有较高的准确率,带有半确认性质,GS-MS和HL-MS法有足够的灵敏度,一般作最后确认与仲裁,在欧盟重新修订修订的肉类食品中的甾体激素检测中,GC-MS作为最后的确认方法^[81]。

参考文献:

- [1] 王选年,康晓迪,潘耀谦,等. 盐酸克伦特罗的残留及监测[J]. 动物医学进展, 2002, 23(3): 41-46.
- [2] EYERHH. Tillegal practice resulting risks versus the controlled use of licensed drugs: views on the present situation in Germany[J]. Ann Reach Vet, 1991, 22(3): 299-304.
- [3] SALLERAS L, DOMINGUEZ A, MATA E, et al. Epidemiologic study of an outbreak of clenbutol poisoning in Catalonia Spain[J]. Public Health Rep, 1995, 110(3): 338-342.
- [4] J ASHBY E, HOUTHOF S T, KENNEDY J, et al. The challenge posed by endocrine disrupting chemicals[J]. Environ Health Perspect, 1997, 105: 164-169.
- [5] GB/T14931. 2-1994 禽畜肉中己烯雌酚残留的检测[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [6] Regulation (EC) No 882/2004 兽药残留 动物性食品中兽药残留的检测方法. 欧盟兽药残留方法[S].
- [7] 陈永红, 叶蔚云. 高效液相色谱法测定食品种甾体激素残留量的研究[J]. 中国公共卫生, 1997, 13(11): 696.
- [8] 方赤光, 李青, 王代. 液相色谱法同时测定畜禽肉肝肾激素残留量[J]. 中国卫生工程学, 2003, 2(3): 166-168.
- [9] 永良. 微波萃取技术概述[J]. 贵州化工, 2004, 29(4): 8-9.
- [10] 譙斌宗, 杨元, 高玲. 微波萃取在卫生检验中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(5): 632-634.
- [11] 涂晓明, 孙淳, 罗仁才, 等. 高效液相色谱法同时测定品种5种激素[J]. 中国食品卫生杂志, 1995, 7(4): 5-11.
- [12] 宋莉晖, 杨成对. 克伦特罗残留的分析方法研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 187-190.
- [13] 郭江峰, 孙锦荷. 固相微萃取技术的原理及应用[J]. 农药科学与管理, 1997(4): 14-17.
- [14] 张海霞, 祝彭龄. 固相萃取[J]. 分析化学, 2000, 28(9): 1172-1180.
- [15] SNYDER L R, GLAJCH J L, KIRLAND J J. Practical HPLC method development[M]. 2nd ed. New York: Wiley, 1997.
- [16] HOEKSTRA W J, MARYANOFF B E, ANDRADE-GORDON P, et al. Solid-phase parallel synthesis applied to leas optimization: discover of potent analogues of the gl11b/IIIa antagonist RWJ-50042[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1996, 20(6): 2371-2376.
- [17] WYNNE P M, BATTY D C, VINE J H, et al. Approaches to the solid-phase extraction of equine urine[J]. Chromatographia, 2004, 59: S51-S60.
- [18] 黄骏雄. 样品制备与处理的进展-无溶剂萃取技术[J]. 化学进展, 1997, 9(2): 179-191.
- [19] 谢孟峡, 刘媛. 固相萃取-气相色谱-质谱分析肉样中盐酸克伦特罗残留[J]. 分析化学, 2002, 30(11): 1308-1311.
- [20] 康莉, 仲岳桐. 固相萃取-高效液相色谱法测定肉中的盐酸克伦特罗[J]. 中国卫生检验杂志, 2003(11): 53-54.
- [21] 杨景贤, 李波, 郭德华, 等. 动物组织中人工合成性激素——19-去甲睾酮残留的GC-MS测定方法的研究[J]. 分析测试学报, 2004, 23: 268-269.
- [22] SUO J J, KIM H Y, CHUNQ B C, et al. Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1607: 303-306.
- [23] SHAO B, ZHAO R, MENG J, et al. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytic Chimica Acta, 2005, 548: 41-50.
- [24] LONG A R, HSIEH C, MALBROUGH M S, et al. Matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in pork muscle tissue[J]. Journal of Composition and Analysis, 1996, 3(1): 20-26.
- [25] 庄宛, 叶玫, 刘海新, 等. 兽药残留分析中的样品处理技术进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(6): 780-783.
- [26] 王绪卿, 吴永宁. 色谱在食品安全分析中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [27] 丁雅韵, 徐晓云, 谢孟峡, 等. 动物组织中己烯雌酚残留的基体固相扩散-气相色谱-质谱分析方法的研究[J]. 分析化学, 2003, 31(11): 1356-1359.
- [28] HORNE E, O'KEEFFE M, DESBROW C, et al. A novel sorbent for the determination of clenbuterol in bovine liver[J]. Analyst, 1998, 123(12): 2517-2520.
- [29] TAYLOR K Z, WADDELL D S, REINER E J, et al. Direct elution of solid phase extraction disks for the determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in effluent samples[J]. Analytical Chemistry, 1995, 167(7): 1186-1190.
- [30] PACE P F, SENSEMAN S A, KETCHRSID M L, et al. Supercritical fluid extraction and solid-phase extraction of AC 263, 222 and imazethapyr from three texas soils[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1999, 37(4): 440-444.
- [31] SIHVONEN M, JARVENPAA E, HIETANIEMI V, et al. Advances in supercritical carbon dioxide technology[J]. Trends in Food Science & Technology, 1999, 10(6/7): 217-222.
- [32] CASTRO M D L, TENA M T. Strategies for supercritical fluid extraction of polar and ionic compounds[J]. Trends in Analytical Chemistry, 1996, 115(1): 32-37.
- [33] 崔兆杰, 高连存, 王淑仁, 等. 超临界流体萃取实验技术[J]. 仪器分析, 1995(1): 69.
- [34] BJORKLUND E, NILSSON T, BOWADT S, et al. Introducing selective supercritical fluid extraction as a new tool for determining sorption/desorption behavior and bioavailability of persistent organic pollutants in sediment[J]. Biochem Biophys Methods, 2000, 43(1/3): 295-311.
- [35] BERG H, MAGARD M, JOHANSSON G, et al. Development of a supercritical fluid extraction method for determination of lipid classes and total fat in meats and its comparison with conventional methods[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 785(1/2): 345-352.
- [36] SIHVONEN M, JARVENPAA E, HIETANIEMI V, et al. Advances in

- supercritical carbon dioxide technologies[J]. Trends in Food Science & Technology, 1999, 10(6): 217-222.
- [37] TOLKER A A M, GINKEL L A, ZOONTJES P W. The use of supercritical fluid extraction for the determination of steroids in animal tissues[J]. The Analyst, 1998, 123(12): 2671-2676.
- [38] JIMENEZ-CARMONA M M, TENA M T, LUQUE M D. Ion-pair—supercritical fluid extraction of clenbuterol from food samples[J]. Journal of Chromatography A, 1995, 711: 269-276.
- [39] BOTSOGLOU N A, FLETOURIS D J. 20 Sample preparation, drug residues in foods; pharmacology[M]. Food Safety and Analysis, 2001.
- [40] BAGNATI R, RAMAZZA V, ZUCCHI M, et al. Analysis of dexamethasone and betamethasone in bovine urine by purification with an on-line immunoaffinity chromatography high-performance liquid chromatography system and determination by gas, chromatography mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 1235(2): 119-126.
- [41] BRABANDER H F, VAN G L A, WASCH K D, et al. Multi-laboratory study of the analysis and kinetics of stanozolol and its metabolites in treated calves[J]. The Analyst, 1998, 123(12): 2599-2604.
- [42] STOLKER A A M, TRICHT E F, ZOONTJES P W, et al. Rapid method for the determination of stanozolol in meat with supercritical fluid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483(1/2): 1-9.
- [43] BOTSOGLOU N A, FLETOURIS D J. 20 Sample preparation, drug residues in foods; pharmacology. food safety and analysis[M]. New York-Basel: Marcel Dekker Inc, 2001.
- [44] BLOKLAND M H, STERK S S, GINKEL L A, et al. Analysis for endogenous and recombinant porcine somatotropine in serum[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 438(1/2): 201-206.
- [45] SAEED T, AHMAD N, SAAYA W N. Assessment of the levels of anabolic compounds in Kuwait meat industry: optimization of a multiresidue method and the results of a preliminary survey[J]. Food Control, 1999, 10(3): 169-174.
- [46] 楼蔓娜, 商振华. 固相萃取技术的发展与应用[J]. 分析仪器, 1998(1): 1-6.
- [47] 陆峰, 林培英, 杨金根. 色谱分析前处理技术的新进展[J]. 药学实践杂志, 2002, 20(2): 91-94.
- [48] 刘俊亭. 新一代萃取分离技术—固相微萃取[J]. 色谱, 1997, 15(3): 118-119.
- [49] 高虹, 金玲仁, 李红莉. 气相色谱分析样品的提取与富集技术[J]. 化学分析计量, 2004, 13(2): 57-59.
- [50] 张杰, 王永建. 分子印迹技术在甾体物质识别和应用[J]. 化学试剂, 2005, 27(6): 331-335; 351.
- [51] 安登魁. 药物分析[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 1992.
- [52] 谢维平, 黄盈煜, 胡桂莲. 气相色谱法直接测定动物组织中盐酸克伦特罗的残留量[J]. 色谱, 2003, 21(2): 192-193.
- [53] 崔晓明, 谢成喜. 固相色谱法测定动物组织中盐酸克伦特罗残留量[J]. 分析测试技术与仪器, 2004, 10(3): 173-175.
- [54] 姚浔平, 金米聪, 李小平. HPLC测定动物组织中己烯雌酚的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 722.
- [55] 蔡玉枝, 罗晓燕, 苏文周. 高效液相色谱测定猪组织中盐酸克伦特罗[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 28(3): 66-67.
- [56] 罗晓燕, 林玉娜, 刘莉治, 等. 固相萃取高效液相色谱法同时测定畜禽组织中雌雄激素的残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(4): 387-298.
- [57] 林奕芝, 张石英, 梁伟, 等. HPLC法同时测定肉与肉制品中沙丁醇和8种雌性激素残留量[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(12): 96-98.
- [58] 吴启陆, 沈清. HPLC法同时测定鸡蛋中4种激素残留量[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(5): 877-878.
- [59] LURIE I S. High-performance liquid chromatography of seized drugs at elevated pressure with 1.7 μ m hybrid C₁₈ stationary phase columns[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 54(9): 1-8.
- [60] 上海赛群生物科技有限公司生产的丁胺醇残留酶联免疫试剂盒说明书
- [61] 宓晓黎, 李利东, 成恒嵩盐, 等. 酸克伦特罗酶联免疫试剂盒的研制—II克伦特罗酶联免疫检测的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(3): 292-294.
- [62] HORNE E, O'KEEFFE M, DESBROW C, et al. A novel sorbent for the determination of clenbuterol in bovine liver[J]. The Analyst, 1998, 123: 2517-2520.
- [63] BRIAN C S, BRIAN C P. Establishment of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) in fish: effect of fasting on plasma concentrations and tissue mRNA expression of IGF-I and growth hormone (GH) in channel catfish [J]. Domestic Animal Endocrinology, 2005, 2(28): 202-215.
- [64] 高向阳. 新编仪器分析[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [65] 吴性良, 朱万森, 马林. 化学分析原理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [66] 李杰, 张新祥, 常文保. 毛细管电泳免疫分析[J]. 分析科学学报, 2000, 16(5): 413-421.
- [67] 管清月, 楚清脆, 叶建农. 肉制品中 β -兴奋剂的毛细管电泳-电化学检测方法[J]. 华中师范大学学报, 2005(2): 85-90.
- [68] 苏萍, 王永城, 张新祥. 毛细管电泳免疫法分析雌三醇[J]. 分析化学, 2003, 31(4): 385-388.
- [69] GARCIA I, SARABIA L, ORTIZ M, et al. Three-way models and detection capability of a gas chromatography-mass spectrometry metrics: the 2002/657/EC European Decision[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 565: 55-63.
- [70] 孟娟, 邵兵, 吴国华, 等. 气相色谱-质谱法同时测定动物性食品中的8种 β 兴奋剂的残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 641-643.
- [71] NEGRUSZ A, MOORE C M, MCDONAGH N S, et al. Determination of phenethylamine, a phenethyl isothiocyanate marker, in dog plasma using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with chemical ionization[J]. Journal of Chromatography B, 1998, 718: 193-198.
- [72] 王树槐, 门立强, 刘琪. 液质连用(LC/MS)定性及定量检测视网膜组织中盐酸克伦特罗残留方法研究[J]. 现代科学仪器, 2003(1): 41-43.
- [73] 高燕红, 吴西梅. 液质联用快速测定饲料中的莱克多巴胺和克伦特罗[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 643-645.
- [74] HOOIJERINK H, BENNEKOM O, NIELEN M W F. Screening for gestagens in kidney fat using accelerated solvent extraction and liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 51-59.
- [75] JONES D C, DOST K, DAVIDSON G, et al. The analysis of beta-agonists by packed-column supercritical fluid chromatography with ultra-violet and atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometric detection[J]. The Analyst, 1999, 124(6): 827-831.
- [76] 赵亚华. 动物性食品中 β 2-受体激动剂残留检测技术的研究概况[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(3): 387-390.
- [77] PRAISLERE M, BOCKLAER V, LEENHEER A D, et al. Chemometric detection of thermally degraded samples in the analysis of drug of abuse with gas chromatography-Fourier-transform infrared spectroscopy[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 962(1/2): 161-173.
- [78] AMUNDSEN L K, KOKKONEN J T, ROVIO S, et al. Analysis of anabolic steroids by partial filling micellar electrokinetic capillary chromatography and electrospray mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1040(1): 123-131.
- [79] STOLKER A M, BRINKMAN U A T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review[J]. J Chromatogr A, 2005, 1067: 15-53.
- [80] BIZEC B L, MARCHAND P, MAVME D, et al. Monitoring anabolic steroids in meat-producing animals: review of current hyphenated mass spectrometric techniques[J]. Chromatographia, 2004, 59(1): S3-S11.
- [81] STOLKER A A M, LINDERS S H M A, GINKEL S H M A, et al. Application of the revised EU criteria for the confirmation of anabolic steroids in meat using GC-MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 378(5): 1313-1321.