

同时适用 ELISA 和 GC-MS 快速测定猪肉中盐酸克伦特罗的前处理方法研究

吴银良, 杨 挺, 朱 勇, 赵 剑, 皇甫伟国

(农业部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波), 浙江 宁波 315040)

摘 要: 建立同时适用于 ELISA 和 GC-MS 方法快速测定猪肉中盐酸克伦特罗残留量的前处理方法。猪肉样品在碱化的条件下用乙酸乙酯提取, 再用稀盐酸萃取去除脂肪, 调 pH 值后再经乙酸乙酯反萃取, 乙酸乙酯反萃取液均分成两份用氮气吹干, 一份加水用于 ELISA 检测, 另一份经双三甲基硅基三氟乙酰氨(BSTFA)衍生, 采用选择离子模式(m/z 86、212、262、277)进行测定, 外标法定量, GC-MS 检出限为 $0.30 \mu\text{g/kg}$ 。在加标浓度为 1.0、2.0、 $5.0 \mu\text{g/kg}$ 时, 加标回收率为 72.1%~105.6% (ELISA) 和 79.1%~95.7% (GC-MS), 批间相对标准偏差(RSD)为 12.5%~16.8% (ELISA) 和 4.6%~6.9% (GC-MS)。衍生物的峰面积与样品浓度在 $0.005 \sim 1.000 \text{mg/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 线性回归系数大于 0.999。

关键词: 猪肉; 酶联免疫分析; 气相色谱-质谱法; 盐酸克伦特罗; 残留

A Pre-treatment Method Suitable for ELISA and GC-MS Determination of Clenbuterol in Pork

WU Yin-liang, YANG Ting, ZHU Yong, ZHAO Jian, HUANGFU Wei-guo

(Supervision, Inspection and Testing Center of Agricultural Products Quality and Security, Ministry of Agriculture, Ningbo, Ningbo 315040, China)

Abstract: A pre-treatment method was developed for determining residual clenbuterol in pork by ELISA and GC-MS. Samples were extracted with ethyl acetate under basic condition, and the extracts were further extracted using diluted hydrochloric acid to remove fat. The hydrochloric acid extracts were re-extracted using ethyl acetate following pH adjustment, and the final extract obtained was divided into two equal parts and each of them was dried by nitrogen blow. Water was added to one part prior to ELISA determination. After derivatization with bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) another part was detected by GC-MS in selected ion monitoring mode (selected ions: 86, 212, 262, 277) and quantitatively analyzed by external standard method. The GC-MS detection limit was $0.30 \mu\text{g/kg}$. The recoveries for clenbuterol determined by ELISA in pork spiked at the levels of 1.0 — $5.0 \mu\text{g/kg}$ were 72.1% — 105.6%, and by GC-MS 79.1% — 95.7%, and the intra-day relative standard deviations for ELISA and GC-MS determination were 12.5% — 16.8% and 4.6% — 6.9%, respectively. There was a good linear correlation (the calibration coefficient was above 0.999) between peak area and concentration of clenbuterol derivative in the range of 0.005 to 1.000 mg/L.

Key words: pork; ELISA; gas chromatography-mass spectrometry; clenbuterol; residue

中图分类号: TS207.5.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0204-03

克伦特罗(clenbuterol) 又称克喘素, 俗称“瘦肉精”, 是人工合成的 β - 肾上腺素能受体兴奋剂之一, 一般用其盐酸盐即 α - (叔丁氨基)甲基-4- 氨基-3,5- 二氯苯甲醇盐酸盐。当它高剂量添加在饲料中, 可导致动物体内的脂肪分解代谢增强, 蛋白质合成增加, 显著提高酮体的瘦肉率^[1]。由于盐酸克伦特罗易在动物组织

中形成残留, 并易导致食物中毒, 所以目前我国已禁止将其作为生长促进剂使用。但由于受经济利益的驱使, 目前仍被少数不法分子非法使用, 因此, 检测动物组织中的盐酸克伦特罗残留具有十分重要的意义。

针对动物组织和尿液中盐酸克伦特罗的检测方法主要有酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,

收稿日期: 2008-10-15

基金项目: 农业部 2008 年农业行业标准资助专项(2008259)

作者简介: 吴银良(1975 —), 男, 高级工程师, 博士, 主要从事食品中药物残留分析方法研究。

E-mail: wupaddyfield@tom.com

ELISA)^[2-3]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[4-6]、高效液相色谱法(HPLC)^[7]及高效液相色谱-质谱法^[8]等,其中ELISA方法常用于样品的筛选,而GC-MS法具有灵敏度高、假阳性率低的特点,常用作经筛选后阳性样品的确证。目前,已报道的方法中先进行ELISA再进行GC-MS确证的方法主要集中在动物尿液的分析^[9-10],尚未见同一前处理方法同时应用在组织样品筛选和确证方面的报道。

由于组织样品筛选和确证方法前处理的不同,在实际样品检测中造成了样品检测时间长、检测经费高等问题,于是有必要开发同时适用于ELISA和GC-MS方法的前处理方法。本实验针对盐酸克伦特罗的化学特性,拟建立有机溶剂提取-稀盐酸反萃取-有机溶剂再反萃取相结合的方法,以期适用于ELISA和GC-MS前处理。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

猪肉(瘦肉)为2008年农业部“无公害食品行动计划”抽样样品。

盐酸克伦特罗标准品 中国药品生物制品检定所;双三甲基硅基三氟乙酰氨(BSTFA) 美国Supelco Park公司;所用溶剂和试剂均为分析纯或色谱纯。

96孔盐酸克伦特罗试剂盒 英国朗道公司;酶标仪MK3 芬兰雷勃公司;Agilent 6890-5973气质联用仪 美国Agilent公司。

1.2 仪器条件

质谱条件:EI源;电离电压70eV;源温200℃;四极杆温度160℃;选择离子模式(SIM)测定: m/z 86、212、262、277。

色谱条件:色谱柱:HP-5MS毛细管柱(30m×0.25mm, 0.25μm);进样口温度:280℃;传输线温度:280℃;载气流量:高纯He 0.9ml/min。柱温:70℃(0.6min) $\xrightarrow{25^\circ\text{C}/\text{min}}$ 200℃(4min) $\xrightarrow{25^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280℃(4min);不分流进样;进样量1.0μl。

1.3 方法

1.3.1 样品中盐酸克伦特罗的提取和净化

称取(5±0.05)g猪肉样品于带盖的聚四氟乙烯离心管中,加入3ml 10.0%碳酸钠溶液,再加入20ml乙酸乙酯,然后以10000r/min以上的速度均质60s,盖上盖子以5000r/min的速度离心2min,吸取上层有机溶剂于离心管中。在收集的有机溶剂中加入5ml 0.10mol/L的盐酸溶液,旋涡混合30s,以5000r/min的速度离心2min,吸取下层溶液;同样步骤重复萃取一次,合并两次萃取液,用2mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至8.5~9.0,然后在盐酸提取液中再加入20ml乙酸乙酯进行萃取,旋涡

混合30s后以5000r/min的速度离心2min,吸取上层有机相分成两份,在50℃水浴中用氮气吹干。

1.3.2 ELISA测定

在一份吹干的样品中加入1ml水,旋涡混合30s,静置待进行ELISA测定,ELISA测定步骤按照试剂盒操作说明书进行操作。

1.3.3 衍生化

在另一份吹干的试管中加入100μl甲苯和100μl BSTFA,加盖并于旋涡混合器上振荡15s,在80℃的烘箱中加热衍生1h(加盖),待冷却后转入进样小瓶中,进行气相色谱-质谱分析。

1.3.4 GC-MS线性实验

称取10.0mg盐酸克伦特罗标准品于100ml容量瓶中,用甲醇定容至刻度,得盐酸克伦特罗标准储备液。然后用甲醇稀释配制5、20、50、150、500和1000μg/L浓度的系列标准工作液,分别取0.2ml于5ml具塞试管中,再加入5.0ml空白样品洗脱液,氮气吹干后,按1.3.3节衍生化步骤衍生和气质分析。

1.3.5 稳定性实验

分别进行了吹干后样品放置时间和样品衍生化后放置时间对结果的影响实验。空白样品乙酸乙酯萃取液中加入100μl 50μg/L的标准溶液,吹干后样品放置时间分别为0、6和12h,衍生化放置时间为0、6、12和24h,实验均重复3次,每次每个时间点3个样品。

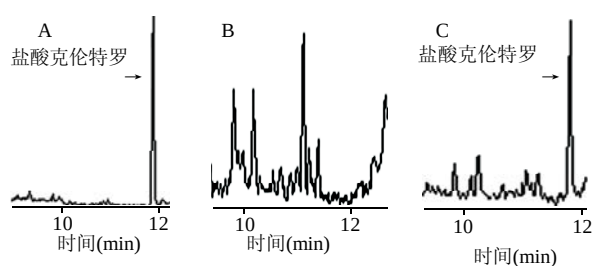
1.3.6 加标回收率实验

加标回收率实验样品处理同1.3.1节,猪肉中盐酸克伦特罗的添加浓度为1.0、2.0、5.0μg/kg。

2 结果与分析

2.1 提取与净化

提取动物组织中盐酸克伦特罗残留绝大部分方法^[4,7]均用稀酸溶液提取,少数采用有机溶剂提取,而盐酸克伦特罗属于苯胺型β₂-受体激动剂,碱性条件下呈分子状态,利用这一特点,在提取过程中先加入一定量的碳酸钠溶液,再加乙酸乙酯提取,同时根据盐酸克伦特罗易溶于稀酸的特性,采用稀盐酸反萃取,有效去除了肉组织提取液中的脂肪和非极性杂质,稀盐酸萃取液调pH值后再经乙酸乙酯反萃取,有利于进一步去除溶液中的极性杂质。整个提取和净化过程和NY/T 468—2006相比^[11],省去了固相萃取步骤同时增加了一步萃取过程,节约了时间和检测成本,而未降低样品的净化效果;同样该过程省去了以往动物组织中ELISA方法C₁₈固相萃取步骤,进一步节约了检测成本。从图1可知,盐酸克伦特罗出峰时间为11.90min,未发现干扰峰。



A. 盐酸克伦特罗标准溶液; B. 肉样空白样品; C. 肉样添加样品(添加浓度为 $2.0 \mu\text{g/kg}$)。

图1 气相色谱-质谱测定盐酸克伦特罗色谱图

Fig.1 GC-MS chromatograms of clenbuterol standard (A) blank pork sample(B)and pork sample fortified at $2.0 \mu\text{g/kg}$ (C)

2.2 GC-MS 线性实验

当采用气相色谱-质谱法分析动物组织中盐酸克伦特罗残留量的时候均有一定的基质效应,经实验加入空白样品洗脱液或氦化甲醇均可消除基质效应对准确定量的影响,本实验中在制备标准样品时加入了 5.0ml 空白样品洗脱液。对盐酸克伦特罗在 $0.005\sim 1.000\text{mg/L}$ 浓度范围内以峰面积对浓度作图,所得曲线方程为 $y=2389.0x-320.4$,相关系数大于 0.999 ,说明本方法适用于盐酸克伦特罗的定量分析。

2.3 样品稳定性实验

经 ELISA 筛选后有阳性的样品才会进一步进行 GC-MS 确证分析,所以必须了解烘干后的样品放置时间对 GC-MS 检测结果是否有影响。经测定,样品放置 12h 内的检测结果和 0h 没有明显的差异。同样实验结果也表明衍生化后样品放置 24h 内,检测结果没有明显的变化。

2.4 方法的检出限、加标回收率和重现性

表1 猪肉中盐酸克伦特罗的检出限、加标回收率和重现性

Table 1 Limits of detection, spike recoveries and detection precision of clenbuterol in pork by ELISA and GC-MS

方法 类型	添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	批内平均回 收率(%)	批间平均 回收率(%)	批间 RSD(%)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)
ELISA	1.0	72.1、95.0、80.6、77.6、79.3、87.5	82.0	12.5	—
	2.0	84.2、80.1、95.3、105.6、82.4、73.6	86.9	16.8	
	5.0	91.3、96.8、78.6、82.4、99.2、78.3	87.8	13.9	
GC-MS	1.0	85.2、89.6、84.6、95.7、80.7、87.9	87.3	6.9	0.30
	2.0	91.6、82.8、85.1、83.6、79.1、84.5	84.4	5.7	
	5.0	85.1、88.3、90.4、81.9、87.0、88.2	86.6	4.6	

注:本底值未检出。

采用在空白样品中添加标准溶液的方法,对猪肉样品中盐酸克伦特罗进行了加标回收率实验,每个浓度点进行 6 次重复实验,每次 3 个样品,分别进行 ELISA 和 GC-MS 测定,实验结果见表 1。从表 1 可见,猪肉样品中各浓度点加标回收率在 $72.1\%\sim 105.6\%$ (ELISA)和

$79.1\%\sim 95.7\%$ (GC-MS)范围内,批间相对标准偏差(RSD)在 $12.5\%\sim 16.8\%$ (ELISA)和 $4.6\%\sim 6.9\%$ (GC-MS)之间,可见该方法具有较好的准确性和稳定性。同时按信噪比(S/N)为 3 计算该方法对猪肉中的盐酸克伦特罗的检出限为 $0.30 \mu\text{g/kg}$ (GC-MS)。

2.5 样品测定

利用该方法测定了来自农贸市场和批发市场猪肉样品 40 个,其中两个经 ELISA 测定为阳性(结果超过 $1.0 \mu\text{g/kg}$),其中 1 个经 GC-MS 测定为盐酸克伦特罗含量 $5.62 \mu\text{g/kg}$ 。

3 结论

本研究建立了同时适用于 ELISA 和 GC/MS 方法快速测定猪肉中盐酸克伦特罗残留量的前处理方法。其中 ELISA 测定时,在加标浓度 1.0 、 2.0 和 $5.0 \mu\text{g/kg}$ 范围内,加标回收率范围为 $72.1\%\sim 105.6\%$,批间相对标准偏差为 $12.5\%\sim 16.8\%$ 。同样的加标浓度下,GC-MS 测定时加标回收率为 $79.1\%\sim 95.7\%$,批间相对标准偏差为 $4.6\%\sim 6.9\%$ 。

参考文献:

- [1] 李俊锁,邱月明,王超.兽药残留分析[M].上海:上海科学技术出版社,2002: 644.
- [2] HAASNOOT W, STREPPLE L, CAZEMIER G, et al. Development of a tube enzyme immunoassay for 'on-site' screening of urine samples in the presence of beta-agonists[J]. Analyst, 1996, 121: 1111-1114.
- [3] BACIGALUPO M A, LUS A, MERONI G, et al. Comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and immunoenzymometric assay for clenbuterol[J]. Analyst, 1996, 120: 2269-2271.
- [4] 谢孟峡,刘媛,蒋敏.固相萃取-气相色谱-质谱分析肉样中盐酸克伦特罗的残留量[J].分析化学,2002,30(11): 1308-1311.
- [5] LEYSSEN L, DRIESSEN C, JACOBS A. Determination of 2-receptoragonists in bovine urine and liver by gas chromatography mass spectrometry[J]. J Chromatogr, 1991, 564: 515-519.
- [6] LEE X, WHAITES E, MURBY J. Determination of clenbuterol in bovine urine using gas chromatography-mass spectrometry following clean-up on an ion-exchange resin[J]. J Chromatogr. B, 1999, 728: 67-73.
- [7] 张雪竹,甘一如,赵福年.液相色谱电化学法检测猪肉及肝中残留的盐酸克伦特罗[J].药学学报,2004,39(4): 276-280.
- [8] GUY P A, SSAVOY M C, STADLER R H. Quantitative analysis of clenbuterol in meat products using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 1999, 736: 209-219.
- [9] 杨艳艳,王选年,魏红,等.猪尿液中盐酸克伦特罗残留的 ELISA 法和 GC-MS 法检测[J].中国兽医杂志,2004,40(10): 9-11
- [10] WANG J P, SHEN J Z. Immunoaffinity chromatography for purification of salbutamol and clenbuterol followed screening and confirmation by ELISA and GC-MS[J]. Food and Agricultural Immunology, 2007, 18 (2):107-115
- [11] NY/T 468—2006 动物组织中盐酸克伦特罗的测定气相色谱-质谱法[S].