

气相色谱 - 质谱法测定动物性食品及生物材料中的克伦特罗残留

苗 虹¹ 吴永宁¹ 赵京玲¹ 王凌琰¹ 赵云峰¹ 彭 红²

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050;

2. 北京市兽医卫生监督检查所, 北京 100044)

摘 要:为监测食品中的克伦特罗残留, 采用气质联机法测定动物性食品及生物材料中的克伦特罗残留。试样用高氯酸提取, 经超声加热后, 用异丙醇 + 乙酸乙酯 (40 + 60) 萃取, 萃取液以弱阳离子交换柱分离富集, 用乙醇 + 浓氨水 (98 + 2) 溶液洗脱并浓缩, 经 N, O - 双三甲基硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA) 衍生, 选择离子监测方式进行气相色谱质谱测定。以美托洛尔 (metoprolol) 为内标, 内标法定量。用猪肝和鸡肉为本底做了不同水平的回收实验, 回收率在 49.6 % ~ 82.4 % 之间和 51.6 % ~ 88.4 % 之间, 相对标准偏差 (RSD) 在 13.8 % ~ 17.6 % 之间。方法的定量限 (LOQ) 为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。通过实验室协同性实验对动物肝脏、肌肉、尿液, 人体尿液和血液进行测定, 结果良好。本方法灵敏度高、特异性强, 测定结果准确可靠, 可用于动物性食品及生物材料中克伦特罗残留的确证检测。

关键词:碎片质谱法; 克伦特罗; 肉制品; 生物相容性材料

Determination of clenbuterol residues in animal foods and biological materials by gas chromatographic-mass spectrometric method

Miao Hong, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050)

Abstract: A gas chromatographic-mass spectrometric method was developed for the determination of residues of clenbuterol in animal foods and biological materials. A three-step pretreatment is performed, involving sample extraction by a perchloric acid solution, liquid-liquid partition by mixture of isopropanol and ethyl acetate (40 60) and purification on a LC-WCX column, and then clenbuterol was eluted from the column by 6 mL of ethanol: ammonium hydroxide (98 2). The analyte was determined as the di-trimethylsilyl derivative and quantified against an internal standard of metoprolol. The recovery experiment was done with three clenbuterol levels in chicken and pork samples respectively, they are 0.5 $\mu\text{g/kg}$, 1.5 $\mu\text{g/kg}$, 2.5 $\mu\text{g/kg}$, and the results were from 49.6 % to 88.4 %, RSD was 13.8 % ~ 19.6 %. The LOQ of the GC-MS method is 0.5 $\mu\text{g/kg}$. We used the GC-MS method to determine clenbuterol residues in samples of chicken, pork, pork liver, urine and blood of poisoned persons, and got satisfactory results.

Key Words: Mass Fragmentography; clenbuterol; Meat Products; biological materials

国际上发展了一系列畜禽产品中的克伦特罗定量检测方法, 如高效液相色谱紫外法 (HPLC-UV) 和电化学检测法 (HPLC-ECD) 以及两种检测器串联、^[1-3] 气质联机方法 (GC-MS), ^[4,10] 液质联机方法 (LC-MS), ^[5] 毛细管电泳 - 紫外检测法 (CE-UV), ^[6] 微分脉冲伏安法^[7] 等。目前, 对于大量样品首先采用酶联免疫法 (ELISA)^[9] 和放射免疫法 (RIA)^[8] 进行

筛选实验, 阳性样品再进行定量验证。我国农业部的 NY/T468 - 2001 气相色谱质谱法测定动物组织中盐酸克伦特罗方法^[11] 采用 Supelclean LC - 18 固相萃取柱和 Supelclean LC-SCX 离子交换柱对试样进行净化; 测定时, 以保留时间定性, 未采用特征碎片离子的峰强度比进行确证。由于克伦特罗属于禁用兽药, 在动物性食品中不得检出, 对方法灵敏度和特异

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7012029), 科技部基础性科研项目。

作者简介: 苗虹 女 助理研究员 硕士

This work was supported by the Natural Science Funds of Beijing, China (7012029) and Basic Research Funds of ministry of Science and Technology, China.

性的要求很高,要求能够在 0.5 ng/g 水平得到确证,需要建立以结构为基础的质谱定量方法。本文采用高氯酸提取,异丙醇+乙酸乙酯(40+60)萃取分离,弱阳离子交换柱(LC-WCX)净化等步骤对试样进行前处理。提取液用 BSTFA 衍生后用气质联用仪进行分析,以相对保留时间和特征碎片离子的峰强度比定性,以内标法单点或多点校准定量。对动物肝脏与肌肉、动物尿液、人体尿液和血液进行测定,结果良好。

1 材料和方法

1.1 仪器和材料

气相色谱-质谱联用仪(Fison MD 800,英国 VG);具塞磨口玻璃离心管(11.5 cm ×3.5 cm);5 mL 玻璃离心管;匀浆器;超声波清洗器;酸度计;离心机;振荡器;旋转蒸发器;涡旋式混合器;恒温加热器; N_2 -蒸发器;弱阳离子交换柱(LC-WCX)(3 mL);针筒式微孔过滤膜(0.45 μ m,水相)。

1.2 试剂

除另有规定,试剂均为分析纯,水为蒸馏水。盐酸克伦特罗(纯度 99.5%);美托洛尔(纯度 99%);甲醇(HPLC 级);甲苯(色谱纯);N,O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA);高氯酸溶液(0.1 mol/L);氢氧化钠溶液(1 mol/L);磷酸二氢钠缓冲液(0.1 mol/L, pH=6.0);异丙醇+乙酸乙酯(40+60);乙醇+浓氨水(98+2)。

美托洛尔内标标准溶液:准确称取美托洛尔标准品,用甲醇溶解配成浓度为 240 mg/L 的内标储备液,贮于冰箱中,使用时用甲醇稀释成 2.4 mg/L 的内标使用液。

克伦特罗标准溶液:准确称取克伦特罗标准品,用甲醇溶解配成浓度为 250 mg/L 的标准储备液,贮于冰箱中,使用时用甲醇稀释成 0.5 mg/L 的克伦特罗标准使用液。

1.3 分析步骤

1.3.1 提取

1.3.1.1 肌肉、肝脏、肾脏试样

称取肌肉、肝脏或肾脏试样 10 g(精确到 0.01 g),用 20 mL 高氯酸溶液(0.1 mol/L)匀浆,置于磨口玻璃离心管中,水浴超声 20 min 后于 80 °C 水浴中加热 30 min。取出冷却后离心(4 500 r/m)15 min。倾出上清液,沉淀用 5 mL 高氯酸溶液(0.1 mol/L)洗涤,再离心,合并上清液。用氢氧化钠溶液(1 mol/L)调 pH 值至 9.5 \pm 0.1,若有沉淀产生,再离心(4 500 r/m)10 min,将上清液转移至磨口玻璃离心管中,加入 8 g 氯化钠,混匀,加入 25 mL 异丙醇+乙酸乙酯

(40+60),振荡萃取 20 min。萃取完毕,放置 5 min(若有乳化层稍离心一下)。用吸管小心将上层有机相移至旋转蒸发瓶中,用 20 mL 异丙醇+乙酸乙酯(40+60)再重复萃取一次,合并有机相,于 60 °C 旋转蒸发浓缩至近干。用 1 mL 磷酸二氢钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.0)充分溶解残留物,过滤后完全转移并定容至 5 mL。

1.3.1.2 尿液试样

用移液管量取尿液 5 mL,加入 20 mL 高氯酸溶液(0.1 mol/L),超声 20 min 混匀。置于 80 °C 水浴中加热 30 min。下同 1.4.1.1 从“用氢氧化钠溶液(1 mol/L)调 pH 值至 9.5 \pm 0.1”开始操作。

1.3.1.3 血液试样

将血液于 4 500 r/m 离心,用移液管量取上层血清 1 mL 置于 5 mL 玻璃离心管中,加入 2 mL 高氯酸溶液(0.1 mol/L),混匀,水浴超声 20 min,然后于 80 °C 水浴中加热 30 min。取出冷却后离心(4 500 r/m)15 min。倾出上清液,沉淀用 1 mL 高氯酸溶液(0.1 mol/L)洗涤,离心(4 500 r/m)10 min,合并上清液,再重复一遍洗涤步骤。向上清液中加入约 1 g 氯化钠,加入 2 mL 异丙醇+乙酸乙酯(40+60),振荡萃取 5 min,放置 5 min(若有乳化层稍离心一下),小心移出有机相于 5 mL 玻璃离心管中,按以上萃取步骤重复萃取两次,合并有机相并浓缩至干。用 1 mL 磷酸二氢钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.0)充分溶解残留物,经过滤完全转移并定容至 5 mL。

1.3.2 净化

依次用 10 mL 乙醇、3 mL 水、3 mL 磷酸二氢钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.0),3 mL 水淋洗弱阳离子交换柱,取适量 4.1.1、4.1.2 和 4.1.3 的提取液至弱阳离子交换柱上,弃去流出液,分别用 4 mL 水和 4 mL 乙醇淋洗柱子,弃去流出液,用 6 mL 乙醇+浓氨水(98+2)淋洗柱子,收集流出液。将流出液以氮气浓缩至干。

1.3.3 衍生化

于净化、吹干的试样残渣中加入 100~500 μ L 甲醇,加入 50 μ L 的内标工作液(2.4 mg/L),氮气浓缩至干,迅速加入 40 μ L 衍生剂(BSTFA),盖紧塞子,涡旋混匀 1 min,置于 75 °C 恒温加热衍生 90 min。衍生反应完成后取出凉至室温并混匀 30 s,以氮气浓缩至干。加入 200 μ L 甲苯,充分混匀,待气质联用仪进样。同时用克伦特罗标准使用液做系列同步衍生。

1.3.4 气相色谱-质谱法测定

1.3.4.1 气相色谱-质谱法测定参数设定

气相色谱柱:DB-5MS 柱,30 m \times 0.25 mm \times 0.25

μm;载气:He;柱前压:8 psi;进样口温度:240 ;进样量:1 μL,不分流;柱温程序:70 保持 1 min,以 18 /min 速度升至 200 ,以 5 /min 的速度再升至 245 ,再以 25 /min 升至 280 并保持 2 min。

质谱 离子化:EI 源。电子轰击能:70 eV。离子源温度:200 。接口温度:285 。溶剂延迟:12 min。

检测特征质谱峰 克伦特罗:m/z 86,187,243,262,264,277,333;美托洛尔:m/z 72,223。

1.3.4.2 测定

吸取 1 μL 衍生的试样液或标准液注入气质联用仪中,以试样峰 (m/z 86,187,243,262,264,277,333)与内标峰 (m/z 72,223)的相对保留时间和各选择离子与基峰的相对强度与标准相应选择离子相对强度确定阳性试样。要求试样峰的各选择离子相对强度(与基峰的比例)不超过标准相应选择离子相对强度平均值的 3 倍标准差。以试样峰 (m/z 86)与内标峰 (m/z 72)的峰面积比单点或多点校准定量。

1.4 计算

按内标法单点或多点校准计算试样中克伦特罗的含量。公式: $X = A \times f / m$

式中: X—试样中克伦特罗的含量 (μg/kg 或 μg/L); A—试样色谱峰与内标色谱峰的峰面积比值对应的克伦特罗质量 (ng); f—试样溶液的稀释倍数; m—试样的质量式体积 (g 或 mL)。

2 结果与讨论

2.1 选择性离子监测(SIM)方式气相色谱 - 质谱检测

从图 1 中可以看到克伦特罗通过 SIM 方式可以得到很好的分离,以 m/z 86 为监测离子进样 2.5 pg 得到 32 倍的 S/N,则在 10 倍 S/N 条件下仪器的检出限为 0.25 pg。

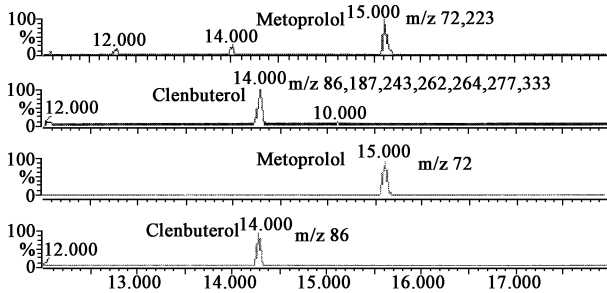


图 1 克伦特罗标准与美托洛尔内标的衍生物的总离子流图

2.2 线性实验

准确移取 0、10.0、20.0、40.0、100.0、200.0、1000.0 μL 的克伦特罗标准使用液 (0.5 mg/L),分别

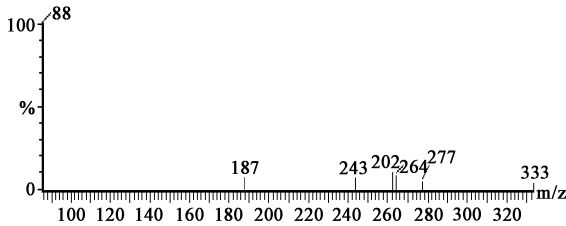


图 2 克伦特罗标准衍生物的 SIM 质谱图

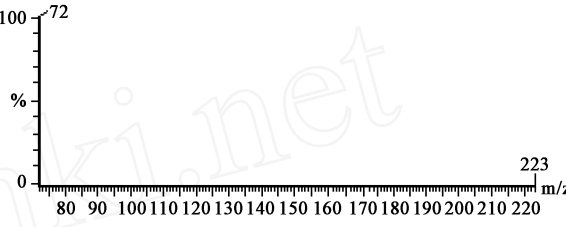


图 3 美托洛尔内标衍生物的 SIM 质谱图

置于各加 50 μL 的美托洛尔内标使用液 (2.4 mg/L) 的衍生瓶 (2 mL) 中,以甲醇稀释定容,其中克伦特罗的质量分别为 0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 和 500.0 ng,按 1.3.3 进行衍生后测定。以克伦特罗的峰面积与内标的峰面积的比值对克伦特罗标准的质量进行线性回归 (表 1),得方程 $y = 0.0105x - 0.061$,相关系数 $r = 0.9992$ 。

表 1 线性范围实验结果

克伦特罗的量 ng	相对保留时间 RRT	峰面积比 As/Ais
5	0.916	0.048
10	0.914	0.098
20	0.915	0.167
50	0.916	0.463
100	0.914	0.838
500	0.914	5.230

2.3 克伦特罗衍生物的稳定性

以 5 ng 克伦特罗标准的量进行衍生后于 4 保存 48 h,衍生后的试样在不同时间内克伦特罗/美托洛尔的峰面积比值变化很小,说明 2 d 内衍生化产物稳定 (表 2)。

表 2 克伦特罗衍生物的稳定性

时间	0 h	5 h	13 h	21 h	48 h
峰面积比值 As/Ais	0.054	0.051	0.054	0.053	0.048

2.4 精密度和准确度实验

2.4.1 添加回收实验

以回收率表示方法的准确度,以相对标准偏差 (RSD) 表示方法的精密密度。

测定了从菜市场购买的猪肝试样和鸡肉试样,均不含克伦特罗。在此两种试样中分别添加 3 个水平的克伦特罗标准,每一水平 7 份平行,进行加标回收实验。其回收率和 RSD 符合兽药残留的痕量分

析要求,特别是在加标水平为 0.5 ng/g 时,回收率大于 50 %,RSD 小于 20 %,以该方法对试样中克伦特罗进行确证和准确定量的定量限 (LOQ) 为 0.5 μg/kg(表 3)。

2.4.2 重复性实验

采用因食用克伦特罗高残留食物中毒者的尿样,每次5mL进行提取、净化和衍生,在同一天内进

表 3 动物性食品试样的加标回收实验					
样品名称	加标水平 μg/kg	n	回收率 %		RSD %
			范围	$\bar{x} \pm s$	
猪肝	2.5	7	53.9~81.2	68.1 ±10.1	14.8
	1.5	7	49.6~72.9	59.5 ±8.8	14.8
	0.5	7	56.5~82.4	68.8 ±10.6	15.4
鸡肉	2.5	7	54.9~84.5	74.9 ±10.4	13.8
	1.5	7	59.8~87.0	74.9 ±10.9	14.5
	0.5	7	51.6~88.4	69.4 ±12.2	17.6

行 6 次重复性测定,RSD 为 4.7 %(表 4)。

2.4.3 再现性实验

两个不同实验室人员不同时间对同一肝脏试样添加克伦特罗标准,进行回收测定,平均回收率为 59.5 ±8.2 %和 69.3 ±10.3 %;RSD 分别为 13.7 %和 14.9 %(表 5)。

表 4 中毒者尿样的日间重复性实验			
编号	相对保留时间 RRT	峰面积比值 As/Ais	含量 μg/L
1	0.915	0.109	2.64
2	0.915	0.114	2.81
3	0.916	0.108	2.63
4	0.916	0.121	2.98
5	0.915	0.114	2.79
6	0.915	0.115	2.82
$\bar{x} \pm s$	0.915 ±0.001	0.114 ±0.005	2.78 ±0.13
RSD %	0.06	4.1	4.7

表 5 肝脏加标回收的不同实验室再现性实验									
检测单位	测 定 回 收 率 ⁽¹⁾				$\bar{x} \pm s$ %			RSD %	
营养与食品安全所	72.9	69.3	52.4	56.7	54.1	49.6	61.5	59.5 ±8.2	13.7
中国肉类食品综合研究中心	68.7	55.4	86.6	77.3	55.8	72.3	69.1	69.3 ±10.3	14.9

注:(1)加标水平为 1.5μg/kg 时的回收率。

2.5 实验室间试样比对协同性实验

应用本方法对于菜市场购买的鲜猪肝、鸡肉和猪肉,中毒者食用的熟猪肝,中毒者的尿液、血液进行了测定。先用酶联免疫法对试样进行了筛选实验,然后不同实验室对相同试样进行了测定,实验室间 RSD 小于 20 %。结果见表 6。

表 6 实验室样品比对协同性实验					μg/kg
样品名称	ELISA 筛选结果	测定结果			
		营养与食 品安全所	中国肉类食品 综合研究中心	北京市疾病 预防控制中心	
鸡肉	0.10	<0.5	<0.5	<0.5	
鲜猪肝	0.14	<0.5	<0.5	<0.5	
猪肉	0.25	<0.5	<0.5	<0.5	
熟猪肝	184.68	124.65	137.40	101.09	
中毒者尿液	4.311 ⁽¹⁾	4.59 ⁽¹⁾	4.86 ⁽¹⁾	4.10 ⁽¹⁾	
中毒者血液	0.101 ⁽¹⁾	<0.5 ⁽¹⁾	<0.5 ⁽¹⁾	<0.5 ⁽¹⁾	

注:(1)单位为 μg/L。

3 结论

由线性实验、精密度和准确度实验、试样测定、验证单位的加标回收实验以及实验室间协同实验结果表明该方法测定结果准确可靠,可用于动物性食品及生物材料中克伦特罗残留的确证检测。

(致谢:中国肉类食品综合研究中心赵榕、郭文萍和北京市疾病预防控制中心吴国华、涂晓明参加了实验室验证和协同性实验工作)。

参考文献:

[1] Lawrence JF, Menard C. Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic cleanup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection [J]. J Chromatogr B. 1997, 696 : 291—297.

[2] Qureshi A, Erilsson A. Determination of clenbuterol and mabuterol in equine plasma by ion-pair liquid chromatography with electrochemical detection. chromatographic and electrochemical characteristics [J]. J Chromatogr, 1988, 441 : 197—205.

[3] Lin LA, Tomlinson JA, Satzger RD. Detection of clenbuterol in bovine retinal tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. J Chromatogr A, 1997, 762:275—280.

[4] Whaites LX, Murgy EJ. Determination of clenbuterol in bovine urine using gas chromatography-mass spectrometry following clear-up on an ion-exchange resin [J]. J Chromatogr B, 1999, 728:67—73.

[5] Guy PA, Ssavoy M-C, Stadler RH. Quantitative analysis of clenbuterol in meat products using liquid chromatography-electrospray ionizations tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 1999, 736:209—219.

[6] Gausepohl C, Blaschke G. Sereoselective determination of clenbuterol in human urine by Capillary electrophoersis^[1] J Chromatogr B, 1998, 713:443—446.

[7] Moane S, Smyth MR, O'keeffe M. Differential-pulse volta-

mmetric determination of clenbuterol in bovine using a Nafion[®]-modified carbon paste electrode [J]. Analyst 1996, 121(7): 779—784.

[8] Collins S, Michael O 'keeffe M. Multi-residue analysis for Betaragonists in urine and liver Samples using Mixed phase columns with determination by radioimmunoassay [J]. Analyst, 1994, 119(10):2671—2674.

[9] Haasnoot W, Stouten P, Schilt R, et al. A fast immunoassay for the screening of α -agonists in hair [J]. Analyst, 1998,

123: 2707—2710

[10] Fente CV, Vazquez BI, Cepeda A, et al. Determination of clenbuterol residues in bovine hair by using diphasic dialysis and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 1999, 726:133—139.

11 NY/T 468—2001. 动物组织中盐酸克伦特罗的测定, 气相色谱法-质谱法[S].

[收稿日期:2002-09-29]

中图分类号:R15;O657.63;R971.93

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2003)01-0018-05

中华人民共和国卫生部

卫办法监函[2002]207号

卫生部办公厅关于查处深圳市海森林生物科技有限公司生产的“乳多宝口服液”违法生产经营的通知

广东省卫生厅:

近日,北京市卫生局在整顿和规范市场经济秩序工作中发现,标识为深圳市海森林生物科技有限公司生产的“乳多宝口服液”涉嫌盗用卫生部批准文号进行违法生产经营活动(见附件)。现请你厅尽快组织对该企业的违法生产经营行为进行查处。如触犯刑律,应及时向公安、司法机关移送。

有关查处工作中的情况,请及时函告我部法监司。

附件:北京市卫生局《关于查处深圳市海森林生物科技有限公司生产的“乳多宝口服液”盗用卫生部批准文号的请示》(略)

卫生部办公厅

二 二年六月十九日

卫生部文件

卫法监发[2002]221号

卫生部关于撤销

“路德牌普丽新胶囊”保健食品批准证书的通知

北京三株路德医疗器械有限责任公司:

根据群众举报,我部对你公司生产的“路德牌普丽新胶囊”进行了监督检查。监督检查中发现,“路德牌普丽新胶囊”擅自变更产品名称,声称的产品功能与卫生部审查批准的不一致。以上事实有其产品说明书等为证。

我部根据《保健食品管理办法》第二十七条的规定,对你公司生产的“路德牌普丽新胶囊”进行了重新审查。经审查,我部确认,你公司的行为严重违反了《中华人民共和国食品卫生法》第二十三条、《保健食品管理办法》第二十三条的规定。现依据《保健食品管理办法》第二十七条的规定,我部决定撤销你公司“路德牌普丽新胶囊”的保健食品批准证书(批准文号:卫食健字(1997)第348号)。

如不服本决定,可以依照有关法律提起行政复议或行政诉讼。

中华人民共和国卫生部

二 二年九月十一日