

## 食物中毒样品中克伦特罗检测方法的比较

高燕红 梁春穗 鲁琳

(广东省疾病预防控制中心,广东 广州 510300)

**摘要:**为测定食物中毒样品中克伦特罗含量,分别用瘦肉精快速检测卡、高效液相色谱法、气-质联用法3种方法测定猪肺汤、猪肺中克伦特罗残留量。用速测卡检测猪肺汤、猪肺均呈阳性;液相法经光谱确认猪肺汤、猪肺均含克伦特罗,含量分别为0.65 mg/kg、0.59 mg/kg;气-质联用法确证猪肺汤、猪肺中均含有克伦特罗,含量分别为0.47 mg/kg、0.23 mg/kg。3种方法各有特点,可分别满足对食物中毒样品中克伦特罗检测的不同要求,同时也提示了今后在公共卫生应急事件理化检测中应加强检测方法的研究。

**关键词:**克伦特罗;食物中毒;肉;化学,分析

### Study on determination method of clenbuterol in food poisoning specimens

GAO Yan-hong, LIANG Chun-sui, LU Lin

(Guangdong Provincial Center for Disease Prevention and Control, Guangdong Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** The clenbuterol quick-measure card, HPLC and GC-MS method were used respectively to determine clenbuterol in samples of pork lung and pork lung soup from a case of food poisoning. The results of determination were positive on the quick-measure card. Confirmed by spectrometry, the results by HPLC were also positive in pork lung soup and pork lung with contents 0.65 mg/kg and 0.59 mg/kg respectively, and GC-MS method proved positive results as well. Each of the three methods has its specificity, and should be selected for different demands of testing clenbuterol in food poisoning samples. It also shows that we should strengthen the research on the methods of analytical examination in public health emergencies.

**Key Words:** Clenbuterol; Food Poisoning; Meat; Chemistry, Analytical

目前国际上对盐酸克伦特罗的分析方法主要有各种联用技术分析、液相色谱法、免疫分析法、以及薄层色谱法<sup>[1-4]</sup>。我国从1998年香港首次因食用猪内脏引起“瘦肉精”中毒事件后,卫生部、农业部等部门组织开展盐酸克伦特罗等一兴奋剂残留量检测方法的研究,并制定相应的国标、部标<sup>[5,6]</sup>。HPLC检测方法、GC-MS方法和免疫分析法各有特点及适用范围,本文通过用3种方法检测一起“瘦肉精”食物中毒样品,探讨3种方法的特点、关系以及今后在公共卫生应急事件理化检测中如何选择检测方法。

2004年9月26日广东省揭阳市部分市民因食用猪肺汤引起食物中毒,出现心跳加快、血压升高、四肢颤抖、头晕、呕吐、低热等临床症状,疑似“瘦肉精”即盐酸克伦特罗引起的食物中毒,抽取酒店剩余猪肺汤进行实验室理化检验。

### 1 材料和方法

#### 1.1 仪器和材料

HP1100 高效液相色谱仪(附二极管阵列检测器);HP 5973 GC/MS 气相色谱-质谱联用仪(四极杆);LC-WCX 弱阳离子交换柱(3 ml);“瘦肉精”快速检测卡,中德大地公司出品,批号:40827;IKA<sup>R</sup> IL;TURRAX T18BASIC 匀质器、酸度计、R205 Rotavapor 减压旋转蒸发仪、Zymark 水浴氮气吹干仪、针筒式微孔过滤膜(0.22 μm,水相)。

#### 1.2 试剂

除另有说明,试剂均为分析纯,水为蒸馏水。盐酸克伦特罗(Sigma公司)、甲醇(HPLC级)、乙腈(色谱纯)、甲苯(色谱纯)、BSTFA(N,O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺,美国 Supelco 公司)、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)

基金项目:广东省医学科研立项课题 项目编号(A2003073)

作者简介:高燕红 女 副主任技师 硕士

This work was supported by the Grant from Medicinal Scientific Research Program Funds of Guangdong Province. (A2003073)

pH=6.0)、乙酸乙酯、乙醇+浓氨水(98+2)。

**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500 mg/L的标准储备液,贮于冰箱中,使用时用甲醇稀释成1.0 mg/L的克伦特罗标准使用液。

### 1.3 方法

**1.3.1 速测卡法** 将猪肺汤装入离心管中,15 000 r/min离心5 min,将检测卡平放于台面,取上清液1滴(约20~30  $\mu$ l)滴加到瘦肉精快速检测卡的加样孔中,30 s后再加入展开液2~3滴(约60~80  $\mu$ l)。反应10 min后,展开区出现紫色条带为阴性结果,无条带者为阳性结果。

#### 1.3.2 高效液相色谱法及气相色谱-质谱法测定

**提取和净化 猪肺:**用匀浆机将猪肺匀浆后,称取10 g(精确到0.001 g),转移于磨口玻璃离心管中,加入20 ml高氯酸溶液,水浴超声20 min后于80  $^{\circ}$ C水浴中加热30 min。取出冷却后离心(4 500 r/min)15 min。倾出上清液,沉淀用5 ml高氯酸溶液洗涤,再离心,合并上清液,按国标<sup>[5]</sup>从“用氢氧化钠溶液调pH值至9.5  $\pm$ 0.1”起开始操作。猪肺汤:称取猪肺汤10 g(精确到0.001 g),参考国标<sup>[5]</sup>,从“用氢氧化钠溶液调pH值至9.5  $\pm$ 0.1”起开始操作。

**高效液相色谱条件** ZOBAX SB C<sub>18</sub>色谱柱、二极管阵列检测器,流动相:乙腈+0.02 mol/L醋酸铵(pH=6.8)=30+70;进样量:20.00  $\mu$ l;流速:1.0 ml/min;检测波长:243 nm;柱温:30  $^{\circ}$ C。

**气相色谱-质谱条件** 色谱柱:DB-5MS 30 m  $\times$ 0.25 mm  $\times$ 2.5  $\mu$ m。不分流进样,进样口温度:230  $^{\circ}$ C;载气流速:1 ml/min;进样量:1.0  $\mu$ l;柱温程序:70  $^{\circ}$ C保持1 min,以18  $^{\circ}$ C/min速度升至200  $^{\circ}$ C,以5  $^{\circ}$ C/min的速度升至245  $^{\circ}$ C,以25  $^{\circ}$ C/min升至280  $^{\circ}$ C并保持2 min。质谱:EI离子源,电子能量70 eV;接口温度:280  $^{\circ}$ C;电子倍增器电压:1 576 V。溶剂延迟:4 min。

**高效液相色谱法测定** 于净化、吹干的试样残渣中加入500  $\mu$ l流动相,充分振摇、溶解残渣,溶液过0.22  $\mu$ m滤膜,滤液上机。吸取20  $\mu$ l标准溶液及试样液注入液相色谱仪,以保留时间和光谱定性,以峰面积定量。

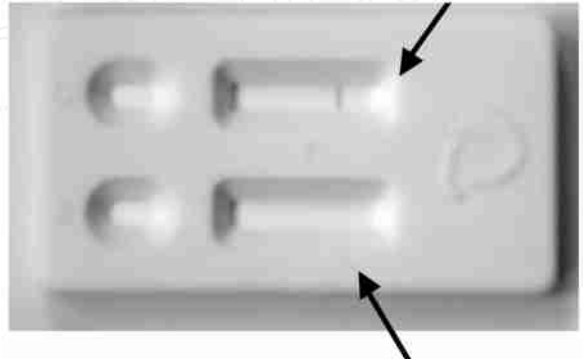
**气相色谱-质谱法测定** 于净化、吹干的试样残渣中加入500  $\mu$ l甲醇,氮气浓缩至干,迅速加入100  $\mu$ l衍生剂BSTFA,盖紧塞子,涡旋混匀1 min,置于75  $^{\circ}$ C恒温加热衍生90 min。衍生反应完成后取出凉至室温并混匀30 s,以氮气浓缩至干。加入200  $\mu$ l甲苯,充分混匀,在气质联用仪进样。同时用克伦特罗标准使用液做系列同步衍生。

吸取1  $\mu$ l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、277)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)峰面积定量。

## 2 结果

**2.1 速测卡测定结果** 瘦肉精快速检测卡反应10 min后,展开区无条带者出现,说明猪肺汤、猪肺中克伦特罗均呈阳性。速测卡测定的条带见图1。

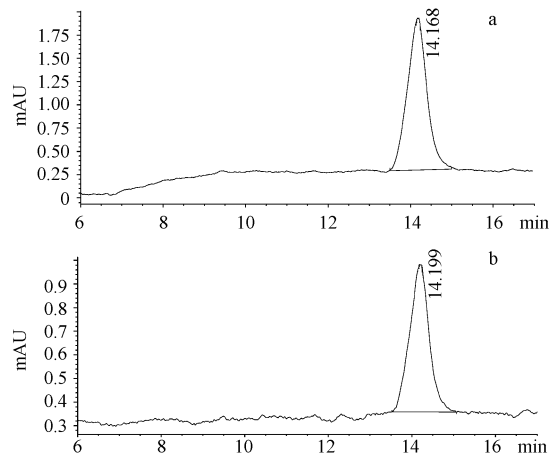
展开区条带出现,表示瘦肉精阴性结果



展开区条带不出现,表示瘦肉精阳性结果

图1 速测卡测定条带图

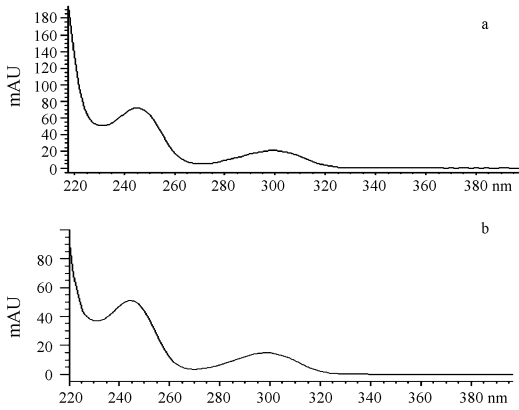
**2.2 高效液相测定结果** 经光谱确认猪肺汤和猪肺中均含有克伦特罗,两者的含量分别是0.65 mg/kg、0.59 mg/kg,标准品和猪肺汤色谱见图2,标准品和猪肺汤目标物的光谱见图3。



a. 克伦特罗标准品溶液 b. 猪肺汤

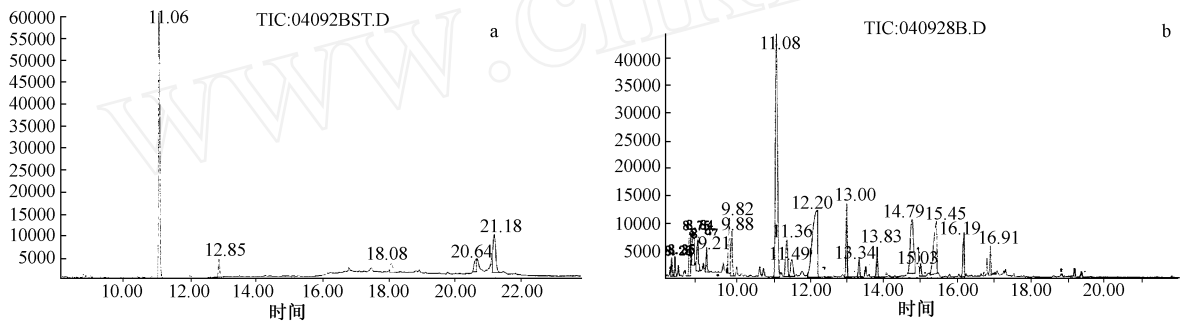
图2 高效液相色谱图(RT:14.168)

**2.3 气相色谱-质谱测定结果** 从猪肺汤和猪肺的离子碎片峰中可以看出,主要的离子碎片为86、187、243、262、277,而克伦特罗的标准谱图的碎片离



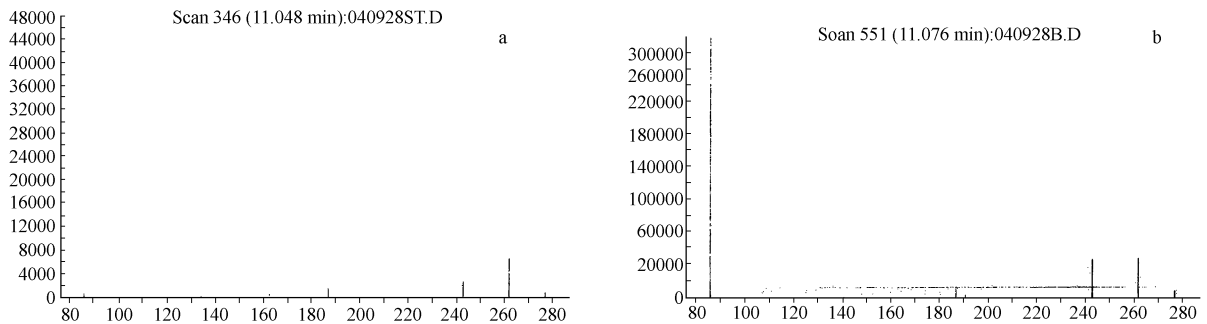
a. 克伦特罗标准品溶液 b. 猪肺汤

图3 克伦特罗光谱图( $\lambda_1 = 243 \text{ nm}$   $\lambda_2 = 300 \text{ nm}$ )



a. 克伦特罗标准品(375 ng/200  $\mu\text{L}$ ) b. 猪肺汤

图4 经BSTFA衍生的总离子流图(RT:11.07min)



a. 克伦特罗标准品( $m/z$  86,187,243,262,277) b. 猪肺汤( $m/z$  86,187,243,262,277)

图5 衍生物的SIM质谱图

用法确证猪肺汤、猪肺中均含有克伦特罗,含量分别为0.47 mg/kg、0.23 mg/kg。气-质联用法检测的猪肺汤、猪肺中的克伦特罗结果比高效液相色谱法的检出结果低。主要原因是气-质联用法比液相色谱法多了衍生化的步骤,包括挥干乙醇+氨、加入BSTFA衍生剂衍生、再挥干衍生剂、定容等过程。首先,如果乙醇+氨挥干不彻底,含羟基的乙醇将会同克伦特罗竞争与BSTFA衍生;还有在用气密针加入BSTFA衍生剂时,如果动作不迅速,会引入水分影响衍生的质量,在天气潮湿的南方城市影响尤其明显;

子主要为86,187,243,262,277;比较样品峰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,样品峰的各选择离子相对强度都不超过标准相应选择离子相对强度平均值的3倍标准差;谱库检索的匹配度也很高,因此可以确定猪肺汤和猪肺中均含有克伦特罗。选择86为定量离子,猪肺汤和猪肺的含量分别是0.47 mg/kg和0.23 mg/kg。标准品和猪肺汤衍生物的总离子流图见图4,对应的碎片峰离子强度见图5。

### 3 讨论

3.1 综合上述实验结果,速测卡检测猪肺汤、猪肺,均呈阳性;液相法经光谱确认猪肺汤、猪肺均含克伦特罗,含量分别为0.65 mg/kg、0.59 mg/kg;气-质联

此外,衍生条件的控制、挥干乙醇+氨或衍生剂过程中可能也带走少量目标物等,都会造成目标物损失、衍生不彻底,从而直接影响方法的回收率和灵敏度。

3.2 速测卡应用胶体金技术,具有简捷、快速、省时、费用低等特点,适用于检测大量样品时的初筛,样本渗出液的检出限为3ng/ml。但会出现假阳性结果,须通过仪器法确证。

HPLC法前提取步骤少、回收率较高,通过二极管阵列检测器进行半定性,并准确定量,由于高效液相色谱仪比较普及,因此HPLC法容易推广,是基层

单位检测中毒样品的主要手段之一。

气-质联用法在克伦特罗残留检测方面具有独特的优点,灵敏度高,可以准确地对克伦特罗进行定性和定量分析,对免疫分析法初步检测得到的阳性试样可以进一步进行确认。但由于受到仪器条件等各方面限制,且其操作步骤复杂,目前该方法在基层单位中应用还有一定困难,随着各级疾病预防控制中心设备不断改进,今后可望得到普及。

3.3 类似测定食物中毒样品中克伦特罗含量出现的不同方法回收率有差异,得出不同的测定结果,报告结果的差异将直接影响公共卫生应急事件的处理。另外,公共卫生应急事件每次发生比较突然,通常国内还没有制定出相应的国标或行标,提示了今后在公共卫生应急事件理化检测中应加强检测方法的研究和统一。

[参加本次中毒样品检测的还有梁旭霞、吴西梅、李敏、李少霞,特此致谢!]

## 参考文献

- [1] EUR15127-EN. 兽药残留,动物性食品及制品-参考物质和分析方法,欧盟兽药残留方法:动物性食品中兽药残留的测定方法[Z]. 第2版,1994年.
- [2] Hernández-Carrasquilla M. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of  $\alpha$ -agonists in bovine retina [J]. Analytica. Chemical Acta, 2000, 408(1-2): 285-290.
- [3] 刘国艳,梁春彦. 动物性产品中盐酸克伦特罗(瘦肉精)检测方法研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2002, 19(4): 32-34.
- [4] 马金才,宋秀红,高志贤. 生化样品中  $\beta_2$ -激动剂克伦特罗检测技术研究进展. 国外医学卫生学分册. 2002, 29(.5): 305-309.
- [5] GB/T 5009. 192—2003. 动物性食品中克伦特罗残留量的测定[Z].
- [6] NY 438—2001. 饲料测定方法[Z].

[收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;O651 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)02-0167-04

[上接导读]

甚至可使用定性计划来评价一批产品中微生物的平均浓度。在进行微生物危险性管理时,采用这种微生物的采样方案可以对食品的安全目标进行评价(FSO)。

### Russ Flowers 博士 美国 Silliker 公司

目前许多由企业和政府部门制定的限量值,缺少作为一个完整的微生物标准的必要组成部分。规定食品中的某些病原菌的限量值为零是很平常的事情,如沙门菌,但实际上并没有可行的采样方法和检测手段确保食品不含有该病原菌。另一个普遍存在的问题是设定的限量标准没有规定采样计划和检测方法。此外定义的指标并不适应实际情况,主要是在确定指标时,不十分清楚食品中靶微生物的分布情况和状态。

使用单个样本来确定已建立的微生物限量值是否恰当也是问题,这样做结果的可信度非常低。使用单个样本时,只有得出不适用标准的结果才是有价值的信息。当结果不能满足标准时,食品企业通常会重新取样,如果这次的结果和标准一致,食品企业就会推断前面的检测结果是错误的。

### Jianghong Meng 食品安全先进技术 现状及未来应用

在过去的10年中,建立了许多用于微生物病原菌的检测以及特征描述的新方法:PCR、脉冲场凝胶电泳(PFGE 鉴定几种食源性病原菌亚型的标准方法)、等温DNA扩增、生物传感器、多位点可变数目衔接重复分析(MLVA)、表型微阵列、DNA微阵列。

2005年应读者和形势的要求我们开展了继续教育刊授工作。由于许多读者是收到第一期后才得知这一信息的,怕时间已晚报名来不及,电话询问的很多。借导读我们再说明:只要是在2005年6月31日以前,什么时间报名都可以。报名费100元(10人以上9折,西部及国家级贫困县7折),教材78元,需要挂号邮寄的另加挂号费18元。提醒一点,答题只能在教材上做,复印无效。

许多省市的编委、热心的作者对我们的继续教育给予了大力的支持,在此表示深深的谢意。

有部分学员对学习内容提出了一些要求,我们非常欢迎。一方面可以帮助我们在本次继续教育中不断调整、充实教学内容,另一方面也会对我们今后的工作有所帮助。