

## RP-HPLC 法测定猪肝中盐酸克伦特罗的残留量

孙 蕾 刘桂琴 吕宪禹

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

**摘 要** 本文采用液相萃取法和固相萃取法提取猪肝中的盐酸克伦特罗(Clenbuterol Hydrochloride),并用 210nm 单波长检测的 RP-HPLC 法测定盐酸克伦特罗的含量,方法简单,结果准确,可靠。

**关键词** RP-HPLC 法 盐酸克伦特罗 猪肝

盐酸克伦特罗(Clenbuterol Hydrochloride)<sup>1</sup>即我们通常所说的瘦肉精,它是一种 $\beta$ -肾上腺素激动剂受体(B-agonist),具有促进动物生长,提高禽兽瘦肉比的作用,但由于它会在动物体内残留,通过食物链危害人类健康,故欧美各国严禁使用盐酸克伦特罗<sup>2,3</sup>。我国农业部也明文禁止盐酸克伦特罗作为饲料添加剂使用<sup>4</sup>,但仍有少数饲料厂和养殖户为自身利益所趋,置消费者健康于不顾。因此,对动物肉类或内脏中盐酸克伦特罗的监督检测显得十分必要。在本研究中,肉类样品经提取、过滤、净化、反相液相色谱分离<sup>5</sup>,通过保留时间和光谱扫描图定性,样品峰面积查标准曲线定量,该方法准确,快速,有效。

## 1 材料与试剂

### 1.1 仪器

岛津 LC-4A 型高效液相色谱仪;岛津 SPD-2AS 型紫外监测器;柱温箱;超声波清洗器;高速离心机;电热恒温水浴锅;pHS-25 型酸度计;0.45 $\mu$ m 有机系针筒式微孔滤膜过滤器;C-18 固相萃取小柱,2mL。

### 1.2 药品与试剂

盐酸克伦特罗对照品,由中国药品生物制品检定所提供;甲醇,乙醚,磷酸,36%乙酸,30%三氯乙酸,2mol/L NaOH,无水硫酸钠均为分析纯;无离子水。

## 2 实验方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C-18,5 $\mu$ ,250 $\times$ 4.6mm I.D.;流动相:甲醇:水=33:67,用磷酸调 pH 至 3;流速:1mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:210nm;进样量:10.0 $\mu$ L。

### 2.2 标准系列配制

配制浓度为 1.00ng/mL 的盐酸克伦特罗标准溶液作为储备液:

精确称取 10.00mg 盐酸克伦特罗对照品于 10mL 容量瓶中,加甲醇 1mL 溶后,然后用无离子水定容至

10mL。

准确量取标准储备液 10 $\mu$ g,20 $\mu$ g,50 $\mu$ g,100 $\mu$ g,200 $\mu$ g,500 $\mu$ L,分别至于 10mL 容量瓶中,稀释成浓度为 1.0 $\mu$ g/mL,2.0 $\mu$ g/mL,5.0 $\mu$ g/mL,10.0 $\mu$ g/mL,20.0 $\mu$ g/mL,50.0 $\mu$ g/mL 的标准使用液。

### 2.3 液相萃取法<sup>1</sup>

样品为采自本市各集贸市场的猪肉、猪肝等样品。将样品切碎成糜状,称取样品 10.0g 于 50mL 具塞离心管中,加入 0.1mol/L 盐酸溶液 2.0mL,甲醇溶液 18.0mL,搅匀,超声萃取 20min,离心 10min(4000r/min),取上清液于 125mL 分液漏斗中,用 2mol/L NaOH 溶液调至 pH 为 12,加乙醚三次萃取(每次 20mL),震荡,静置,合并上层有机相于锥形瓶中,加入无水硫酸钠,放置 10min,过滤至蒸发皿中,将蒸发皿置水浴上(约 60 $^{\circ}$ C)挥发蒸干后用 1.0mL 流动相溶解,经 0.45 $\mu$ m 有机系滤膜过滤后供高效液相色谱仪测定。

### 2.4 固相萃取法

将样品切碎成糜状,称取样品 10.0g 于 50mL 具塞离心管中,加入三氯乙酸 5.0mL,无离子水 15.0mL,混匀,超声提取 20min,取出置于 90 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30min,取出放冷后离心 10min(4000r/min),将上清液转移至试管中。沉淀再提取一次,将上清液合并经滤纸过滤备用。用 5.0mL 甲醇,5.0mL 水活化 C18 固相萃取小柱,将萃取液分次缓慢过柱,用 5.0mL 水冲洗小柱,抽干小柱液体,用酸化甲醇 1.0mL(10.0mL 36%乙酸用甲醇定容至 100mL)洗脱,收集洗脱液,经 0.45 $\mu$ m 为孔滤膜过滤后进样 10.0 $\mu$ L 测定。

### 2.5 测定方法

按 2.1 的色谱条件,分别把盐酸克伦特罗标准系列溶液及试样液 10.0 $\mu$ L 依次注入 HPLC,以峰面积外标法定量。

### 2.6 计算

样品中的盐酸克伦特罗含量按下式计算:

$$X = C \cdot V / A_2 \cdot m$$

式中, X: 样品中盐酸克伦特罗含量, mg/kg; C: 标准浓度,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; A1: 样品峰面积; A2: 标准峰面积; V: 洗脱液体积, mL; m: 取样量, g。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 标准曲线及线性关系

用上述配置的标准使用液进样分析 ( $n=6$ ), 以峰面积和盐酸克伦特罗浓度 ( $\text{ng}/\text{L}$ ) 进行回归, 得回归方程为  $Y=1.879X+4.552$ ,  $r=0.9996$ 。结果表明, 在  $1.0 \sim 50.0 \text{ ng}/\text{L}$  范围内, 线性关系良好。

#### 3.2 方法的精密度, 最小检出量和回收率

精密度分别以低浓度标准溶液 ( $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和高浓度标准溶液 ( $50.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 各进样 6 次测定精密度, RSD 分别为 1.37% 和 3.53% (见表 1)。

表 1 精密度测定结果 ( $n=6$ )

标准浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	峰面积	RSD (%)
2.0	9798, 10892, 9680, 10128, 11003, 10084	3.53
50.0	248587, 248671, 247802, 248030, 248905, 248307	1.37

回收率以 6 份猪肝样品中分别加入一定量的盐酸克伦特罗标准, 按方法进行测定, 计算后得出回收率, 液相萃取的回收率在 68.3%~78.0% 之间, 固相萃取的回收率在 74.8%~78.9% 之间。

以三倍噪声值计, 本方法最低检出浓度为  $0.1 \text{ ng}/\text{kg}$ 。

#### 3.3 样品的测定及结果分析

取盐酸克伦特罗标准溶液及样品溶液, 按上述所述色谱条件进行分析, 得到标准品及样品的色谱图 (见图 1)。

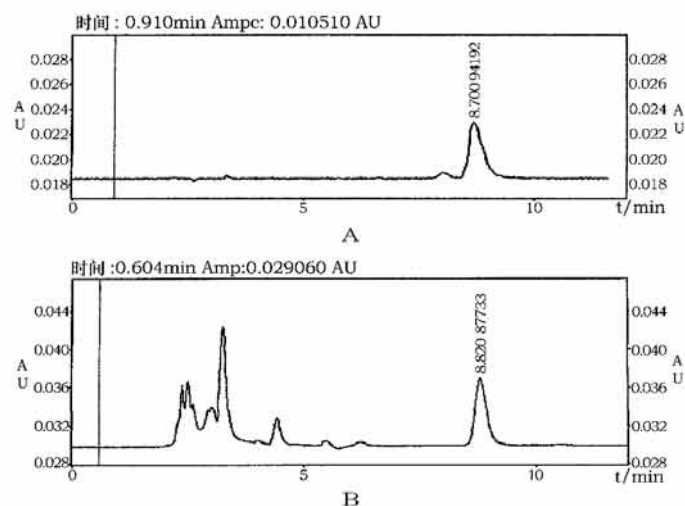


图 1 盐酸克伦特罗标准品(A)及样品(B)色谱图

对于如图 2 的可疑阳性样品再通过光谱扫描图加以确证。标准盐酸克伦特罗德光谱图在 210nm, 243nm, 296nm 处有 3 个特征的吸收强峰 (见图 2), 由此可根据可疑阳性样品的光谱扫描图来对样品加以确证。如果某一疑检出盐酸克伦特罗的猪肝样品的光谱扫描图, 有 3 个特征的吸收峰, 则可以判定该样品中有盐酸克伦特罗。

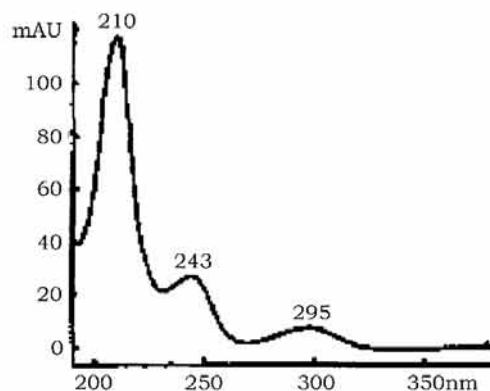


图 2 盐酸克伦特罗标准品的紫外吸收光谱图

#### 3.4 讨论

在筛选流动相时使用多种溶剂系统, 结果表明, 采用流动相水 + 甲醇 = 67 + 33 (v/v), 流速为  $1.0 \text{ mL}/\text{min}$  时, 杂质峰与盐酸克伦特罗峰分离完全, 保留值也最适宜, 不受杂质和溶剂等干扰。流动相得 pH 值也是影响分离效果好坏的重要条件。pH 值偏大会造成峰拖尾, pH 太小又会影响柱寿命, 因此综合考虑选择 pH=3。

本试验通过对固相萃取法和液相萃取法两种方法的比较, 应用固相萃取法得到的样品回收率平均高于液相色谱法, 而固相萃取法相对又有试剂用量少, 不污染环境, 对杂质的去除效果好等优点, 因此要优于液-液萃取的方法。需要注意的是, 当酸性样品溶液经过 C-18 小柱时, 盐酸克伦特罗基本不被吸附, 只有把 pH 调成中性时, 才能获得满意的回收率。

#### 参考文献

- 1 陈新谦, 金有豫. 新编药理学 (第 14 版) M, 北京: 人民卫生出版社, 1999
- 2 Mersman H J. Evidence of Classic  $\beta$ -adrenergic receptors in porcine adipocytes (J. Jamin Sci, 1996, 74: 984~992)
- 3 Council Directive 96/22/EC on the prohibition of the use of certain substances having a anal and thyrostatic action and  $\beta$ -agonists in animal husbandry (S. Off J Eur Com, 1996, L125)
- 4 中华人民共和国农业部, 动物性食品中兽药最高残留限量 (Z. 1997, 农牧发 (1997) 7 号)
- 5 Solid phase extraction of clenbuterol from plasma using immunoaffinity follow by HPLC (J. J Pharm Biomed Anal, 1999, 21(3): 63)

乙醇稀释至一定体积,待测。

1.2.3 色谱条件 色谱柱型号:DB-5ms, 30m × 0.25mm, 柱温 50~250℃(5min), 升温速率 20℃/min; 分流比 20:1; 进样口温度 250℃。

1.2.4 质谱条件 EI 离子源温度 250℃; 电子能量 70eV; 扫描范围 20~600m/z。

## 2 结果与讨论

### 2.1 试样的测定

大蒜素的测定结果(见图1、表1)。

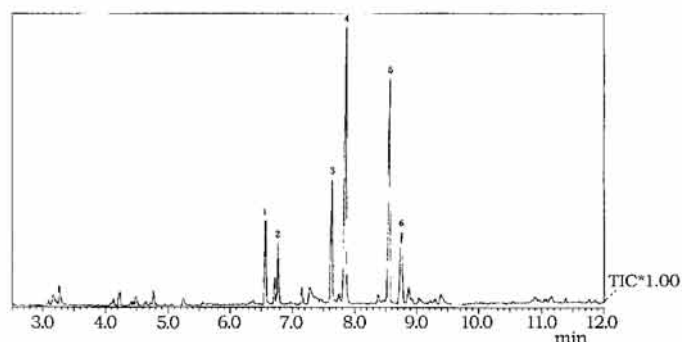


图1 大蒜素的GC离子流图(TIC图)

本研究利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪对大蒜中大蒜素等含硫化合物进行测定。确定大蒜素的成分主要包含二烯丙基一硫醚,二烯丙基二硫醚,二烯丙基三硫醚,3-乙烯基-1,2-二硫杂4-环己烯,6-乙烯基-1,2-二硫杂3-环己烯等在内的多种含硫化合物。经实验方法和样品分析结果表明该实验方法准确,快速,简便,可靠。

表1 大蒜素的GC-MS测定结果

峰号	化合物	保留时间 /min	峰面积 /%
1	二烯丙基二硫醚	6.567	9.33
2	二烯丙基一硫醚	6.767	4.82
3	3-乙烯基-1,2-二硫杂4-环己烯	7.633	14.84
4	6-乙烯基-1,2-二硫杂3-环己烯	7.850	35.55
5	二烯丙基三硫醚	8.550	24.51
6	二烯丙基三硫醚	8.750	10.95
			100.00

### 参考文献

- 1 王晓文,刘红辉. 大蒜油的研制[J],中草药,1996,27(8): 466
- 2 余伯良,吴士业,穆芳. 不同脱臭方法对大蒜抗菌效力的影响,中国调味品,1998(8): 8
- 3 黄玉德,等. 泌乳牛日粮中添加大蒜素粉德饲喂实验[J],中国奶牛,1997(6): 25
- 4 Huh K et al Study on Apoptosis of Human Acute Tlymphocyte Leukemia Cell Line Induced by Allicin [J], Arch Pharmacol Res, 1986, 9(4): 265
- 5 Mhammad S F et al Ligustrazini, allicin and shear-induced platelet aggregation [J], Thromb Res, 1986, 44(1): 793
- 6 杨佳栋,魏凤菊. 大蒜素的功能与处理方法,动物营养,2004,21(5): 66
- 7 孙毅,魏金凤,陈光辉等. 综合开发大蒜资源—大蒜脱臭产品及大蒜油提取,环境与开发,1999,14(1): 26
- 8 B Pederson Removing bitterness from protein hydrolysates [J], Food technology, 1994,(10): 96~98
- 9 葛保胜,王秀道,石滨. 药用大蒜提取物的超临界CO<sub>2</sub>萃取研究,中成药,2002,24(8): 571

## Identification of allicin and sulfur compounds in the garlic by GC-MS

Li Xue Li Yingfeng Liu Biqian

(Institute of chemistry Chinese academy of sciences, Beijing 100080)

**Abstract** The separation and determination of the efficient components in garlic were performed by extraction and then by following GC-MS. The efficient components of allicin were identified as diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, etc.

**Key words** Allicin GC-MS Ethanol extraction

(上接第15页)

## Determination of clenbuterol hydrochloride in pork liver by RP-HPLC

Sun Lei Liu Guiqin Lv Qianyu

(College of Life Sciences, Nankai University Tianjin 300071)

**Abstract** Set up a method to extract the Clenbuterol Hydrochloride in pork liver with the liquid state extraction and solid state extraction. Then its content is determined by RP-HPLC. The detection wavelength is 210nm. The method is a simple, available method with a good precision to determine the Clenbuterol Hydrochloride.

**Key words** RP-HPLC Clenbuterol Hydrochloride Pork liver