

克伦特罗残留 GC-MS 检测方法的建立 及对自制试纸条性能的确证

邓瑞广¹, 张海棠², 王自良², 钟华², 张改平¹

(¹河南省动物免疫学重点实验室, 河南郑州 450002; ²河南科技学院动物科学学院, 河南新乡 453003)

摘要:建立了猪尿液中盐酸克伦特罗(CL)残留的 GC-MS 检测方法, 并对自主研制的 CL 残留快速检测免疫金标试纸条(CL-Strip)进行了比较分析。结果表明, GC-MS 的检测限为 0.5ng/ml, CL-Strip 的检测限为 1.0ng/ml; CL-Strip 与 GC-MS 两者的加标测定实验结果完全一致; 用 CL-Strip 检测出的 100 份阴性尿样和 18 份阳性尿样, 与 GC-MS 检测结果完全一致。说明 CL-Strip 与 GC-MS 同样灵敏、准确、稳定, 由于 CL-Strip 具有简便、直观、快速、敏感、特异、准确等优点, 建议在 CL 残留快速检测中推广应用。

关键词:气相色谱-质谱; 试纸条; 盐酸克伦特罗; 检测; 确证

中图分类号: S859.84 文献标识码: A

Development of GC-MS Method for Detecting Clenbuterol Residues and Confirmation of Self-made Strip Performance

Deng Ruiguang¹, Zhang Haitang², Wang Ziliang², Zhong Hua², Zhang Gaiping¹

(¹Henan Provincial Key Laboratory for Animal Immunology, Zhengzhou Henan 450002;

²College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang Henan 453003)

Abstract: GC-MS method of detection for Clenbuterol Hydrochloride (CL) residues in swine urine was established and compared with the method of self-made strip (CL-Strip). The results showed that the detection limits of GC-MS and CL-Strip were 0.5ng/ml and 1.0ng/ml respectively. The detection results of CL added in samples were consistent completely. The detection results of 100 negative swine urine samples and 18 positive swine urine samples by CL-Strip method were agreed with GC/MS method analysis results. It can be concluded that the sensitivity, accuracy and stability of CL-Strip method were about at the same degree as GC-MS method, and CL-Strip method was recommended to be extended for its advantages in convenience, direct-viewing, rapidity, sensitivity, specificity and accuracy.

Key words: GC-MS, strip, Clenbuterol hydrochloride, detection, confirmation

盐酸克伦特罗 (Clenbuterol Hydrochloride, CL) 被非法用作动物促生长剂, 其残留对人体的毒性危害作用已是人所共知^[1]。在 CL 残留分析中, 气-质联用法 (GC-MS) 由于存在需要昂贵的仪器、样品前处理复杂、繁琐费时、不能现场操作等缺陷等问题, 推广应用受到了限制, 但作为比较经典成熟的方法, 具有较高

的灵敏性、精密性和稳定性, 仍不失为一种较好的 CL 残留分析确证方法^[2,3]。为确证自主研制成功的 CL 残留快速检测免疫金标试纸条 (CL-Strip) 的性能^[4], 研究在建立猪尿液中 CL 残留的 GC-MS 检测方法基础上, 应用 GC-MS 和 CL-Strip 同时检测猪尿液中 CL 的残留量, 并进行了比较分析。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAK02A21) 和国家农业科技成果转化资金项目(2006GB2D000170)资助。

第一作者简介: 邓瑞广, 男, 1960 年出生, 本科学历, 副研究员, 主要从事动物性食品安全快速检测技术研究。通信地址: 450002 河南省郑州市农业路 1 号河南省动物免疫学重点实验室, Tel: 0371-65853030, E-mail: rgd999@163.com。

通讯作者: 张改平, 男, 1960 年出生, 博士学位, 研究员, 主要从事细胞与分子免疫学研究。通信地址: 450002 河南省郑州市农业路 1 号河南省动物免疫学重点实验室, Tel: 0371-65738179, E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2008-04-02, 修回日期: 2008-07-31。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

实验于2007年9月至12月在河南省动物免疫学重点实验室进行。

1.2 材料

1.2.1 主要仪器 6890 GC-5973 MS 联用仪, 美国 Agilent 公司, 四极杆, EI 离子源, MSD ChemStation 工作站, NT4.0 英文工作站, HP-5MS 弹性石英毛细管色谱柱 (30m×0.25mm×0.25 μ m); TSR3000 读条仪, 美国 BioDot 公司; 3K-18 高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; RCT90 旋转式蒸发器, 法国 JOUAN 公司; AE260 电子天平, 德国 METTLER 公司; HI9321 酸度计, 美国 HANNA 公司; N-EVAPTM111 氮吹仪, 美国 Organomation Associates 公司; XW-80A 旋涡混合仪, 上海沪西分析仪器厂。

1.2.2 试剂与耗材 盐酸克伦特罗 (clenbuterol hydrochloride, CL), Sigma 产品, 分子量 313.68Da, 纯度 >99%; β - 葡萄糖苷酸酶 / 芳基硫酸酯酶, 30U/ml, Sigma 产品; 美托洛尔 (metoprolol, MTR), Sigma 产品, 纯度 >90%; N,O- 双三甲基硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA), 三甲基氯硅烷 (TMCS), 美国 Supelco 产品; 甲醇、甲苯, HPLC 级; 其它试剂为 AR 级; 实验用水为 milli-Q 超纯水; 固相萃取 (SPE) 硅藻土和硅胶柱 (SLH), 500mg/ml, 美国 Supelco 产品; CL-Strip 由该课题组研制; CL 储备液与标准品, 用甲醇配成 1mg/ml 储备液, 根据实验需要用阴性猪尿液或甲醇配制所需浓度的标准品; MTR 内标液, 用甲醇配成 1mg/ml 储备液, 使用时稀释成 1 μ g/ml 的工作液。

1.3 方法

1.3.1 CL-Strip 法

(1) 样品准备 尿样不需要特殊处理, 可直接用于检测; 若尿样中污染有杂物或呈浑浊状时要经 5000r/min 离心 10min 取上清液检测或过滤后取滤液检测。

(2) CL-Strip 的配置与性能 按一定工艺组装而成 CL-Strip, 取样塑料吸管, CL 标准品 1、2 (0、1.0 ng/mL)。根据 BioDot-TSR3000 读条仪对不同 CL 标准品读取的相对光密度值 (G/D×A-ROD×pixel), 以不同浓度标准品与 0 浓度标准品相对光密度的百分率 (G/D×A-ROD×pixel%) 为纵坐标, 以不同标准品浓度的对数值为横坐标, 绘制出标准曲线, 回归方程为 $y = -32.289x + 38.92$, $R^2 = 0.9736$, 取 G/D×A-ROD×pixel% = 50% 为其检测限 1.0ng/ml^[56]。

(3) 检测步骤 打开包装取出所需试纸放于平面上, 用塑料吸管取待检尿样加入试纸加样孔 2~3 滴 (约 100 μ l), 注意每个样品需要更换 1 个吸管, 5~10min 判定结果。

(4) 检测结果判定 用肉眼观察, 根据检测线与对照线的有无和颜色的深浅进行判定。显色区出现检测线 (T 线) 和对照线 (C 线) 2 条线, 且 T 线颜色明显浅于 C 线颜色或显色区只出现一条 C 线, 而 T 线不显色, 检测结果 ≥ 1.0 ng/ml, 判为阳性; 显色区出现检测线 (T 线) 和对照线 (C 线) 2 条线, 且 T 线颜色不浅于 C 线颜色, 检测结果 < 1.0ng/ml, 判为阴性; 显色区 2 条线 (T 线和 C 线) 均不出现, 表明操作有误或试纸条失效, 判为无效 (图 1)。

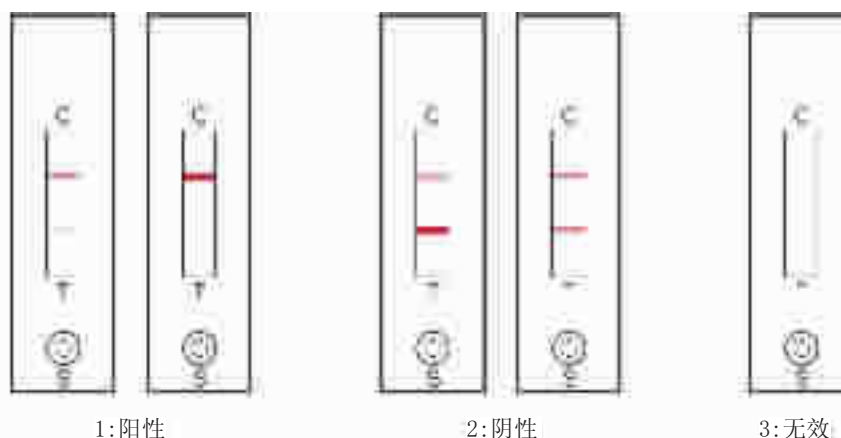


图 1 CL-Strip 检测结果判定示意图

1.3.2 GC-MS 检测

(1) 样品处理 ①提取 吸取 5000r/min 离心 10min 后的猪尿样 10ml 于 50ml 离心管中, 加入 20mmol/L 的乙酸铵缓冲液 20ml, 均质 5min, 加入 50 μ l β - 盐酸

葡萄糖苷酸酶 / 芳基硫酸酯酶溶液, 震荡, 超声 15min 后, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中酶解 18h, 3000r/min 离心 5min, 过滤上清液以备净化。②净化 依次用 5ml 甲醇、5ml 乙酸乙酯活化 SLH 柱, 上样, 用 5ml 50% 甲醇 / 乙

酸乙酯洗脱,收集洗脱液于具塞玻璃试管中,氮气吹干,以备衍生。③衍生 试管中加入 50 μ l 内标工作液,氮气吹干后迅速加入 100 μ l 衍生化试剂(BSTFA/TM-CS=99/1, v/v),于旋涡混合器上涡旋振荡 1min,密封后 80 $^{\circ}$ C 衍生化 1h,冷却至室温,氮气吹干,加入 200 μ l 甲苯溶解,用于 GC-MS 分析。

(2)GC-MS 分析条件 ①色谱条件 色谱柱: HP-5MS 弹性石英毛细管色谱柱 (30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m);柱温程序:120 $^{\circ}$ C (保持 3min),以 15 $^{\circ}$ C/min 升温至 230 $^{\circ}$ C (保持 5min),再以 15 $^{\circ}$ C/min 升温至 280 $^{\circ}$ C (保持 1min);进样口温度:250 $^{\circ}$ C;载气(高纯 He)流速:1.0ml/min(恒流);进样方式:不分流;进样体积:1 μ l。②质谱条件 离子源:EI;电子能量:70eV;离子源温度:230 $^{\circ}$ C;接口温度:280 $^{\circ}$ C;溶剂延迟时间:10min。

(3)GC-MS 标准曲线的建立与检测限的确定 将 1mg/ml CL 储备液用甲醇稀释成 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0ng/ml 标准品,加入 50 μ l 内标工作液,衍生后按色谱条件以选择性离子检测法(SIM)

进样测定,以 CL 与 MTR 的峰面积对 CL 的质量浓度进行线性回归,推导回归方程。取信噪比为 3:1 时的 CL 浓度为其检测限。

1.3.3 加标测定实验 将 CL 添加到相应检测方法要求的稀释液中,使终浓度分别为 0、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL,每个标样设 20 个重复,以加标测定结果确证 CL-Strip 的性能。

1.3.4 应用符合实验 应用 CL-Strip 对郑州市、许昌市、新乡市、南阳市等地养殖场户采集的 3000 多份生猪尿样进行筛检,对其中的 100 份阴性尿样和 18 份阳性尿样用 GC-MS 进行符合确证。

2 结果与分析

2.1 标准曲线、线性方程、回归系数、线性范围及检测限的比较

CL-Strip 的相对光密度曲线图见图 2,标准曲线见图 3,GC-MS 的质谱图见图 4,标准曲线见图 5,比较结果见表 1。由表 1 可知,两种检测方法的检测限基本接近,在 CL 残留检测实际中均可使用。

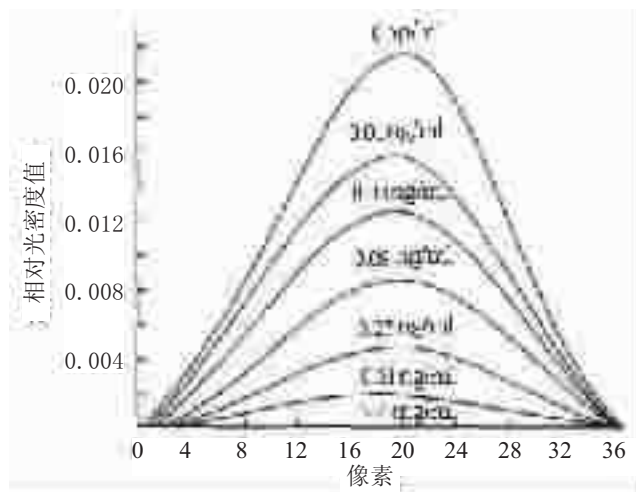


图 2 CL-Strip 的相对光密度曲线图

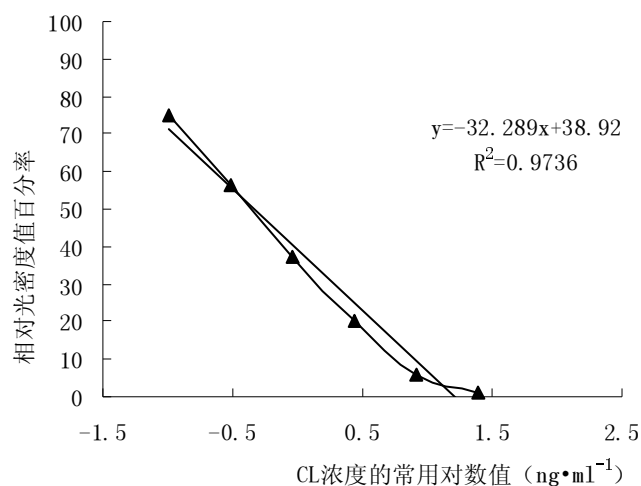


图 3 CL-Strip 的标准曲线

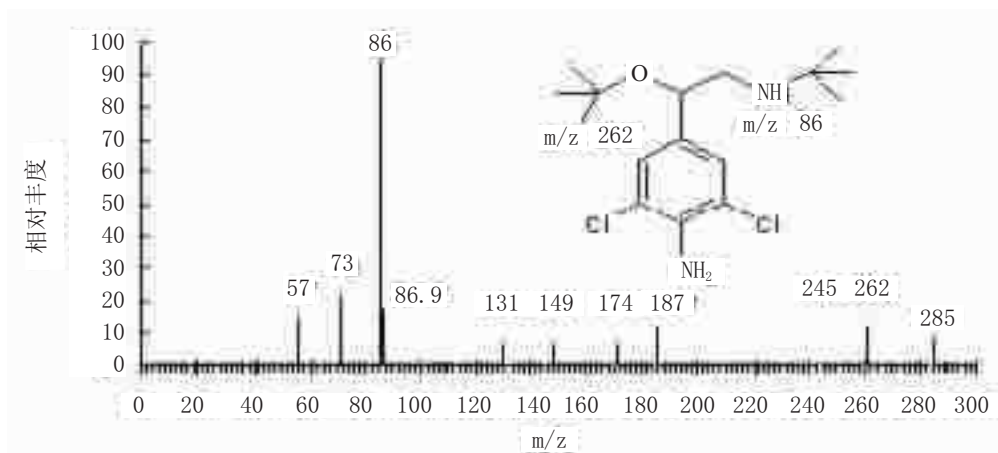


图 4 CL 的质谱图

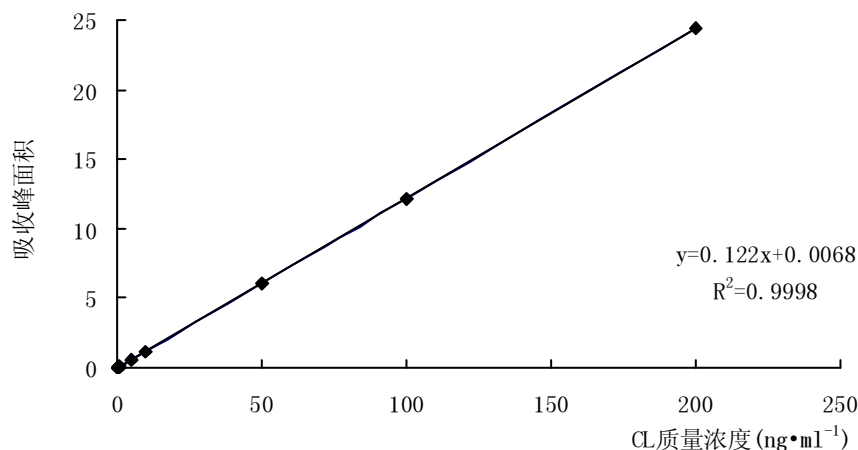


图5 GC-MS的标准曲线

表1 CL-Strip和GC-MS检测方法的线性方程、回归系数、线性范围及检测限的比较

方法	线性方程	回归系数	检测范围/(ng·ml ⁻¹)	检测限/(ng·ml ⁻¹)
CL-Strip	$y = -32.289x + 38.92$	0.9736	-	1.0
GC-MS	$y = 0.122x + 0.0068$	0.9998	0.5~200	0.5

表2 CL-Strip和GC-MS的加标实验结果比较

CL添加量/(ng·ml ⁻¹)	样品数/n	CL-Strip		GC-MS	
		阳性	阴性	阳性	阴性
0	20	0	20	0	20
1.0	20	20 ^①	0 ^①	20	0
2.0	20	20 ^②	0 ^②	20	0
5.0	20	20	0	20	0
10.0	20	20	0	20	0

2.2 加标测定实验

结果见表2。CL-Strip与GC-MS两者的检测结果完全一致。

2.3 应用符合实验

结果见表3和表4。表3可知,对用CL-Strip检测

出的100份阴性尿样,与GC-MS检测结果完全一致,符合率为100%。表4可知,对用CL-Strip检测出的18份阳性尿样,用GC-MS进行符合,结果完全一致。说明CL-Strip与GC-MS具有较好的一致性,CL-Strip可用于CL残留的快速检测。

表3 阴性尿样符合实验结果比较

比较项目	CL-Strip	GC-MS
样品数	100	100
阳性数	0	0
阴性数	100	100
符合率/%	100	100

表4 阳性尿样符合实验结果比较

比较项目	CL-Strip	GC-MS
样品数	18	18
阳性数	18	18
阴性数	0	0
符合率/%	100	100

表5 CL-Strip和GC-MS的应用综合评价

检测方法	评价项目					
	灵敏性	准确性	简便性	工作量	时间/min	费用
CL-Strip	*	*	***	*	10	10元左右
GC-MS	*	*	*	***	400	200元以上

注:*表示程度。

2.4 灵敏性、准确性、简便性、工作量、所需时间和费用等的综合评价

综合评价结果见表5。CL-Strip和GC-MS的检测

限分别为1.0ng/ml和0.5ng/ml,均具有较高的灵敏性。加标测定实验与应用符合实验结果表明,两种方法均具有较好的准确性。从简便性和劳动量看,CL-Strip不

局限检测地点,可进行现场检测,不需要任何附加设备与试剂,不作任何专业程度限制,人人均可操作,结果直观,只需根据颜色深浅判定即可;GC-MS 则要求较高,必须在实验室进行,需要特殊的仪器和试剂,只有专业人员才能操作,且工作量大。从检测时间看,CL-Strip 只需 10min 便可得到检测结果,而 GC-MS 需耗时约 400min;从检测成本看,GC-MS 高出很多,是 CL-Strip 的 20 倍。

3 讨论

3.1 CL-Strip 检测方法的建立及其性能

3.1.1 CL-Strip 检测方法的建立 CL-Strip 的基本原理是 HAuCl_4 在还原剂作用下聚合成金颗粒,由于金颗粒之间的静电作用和布朗运动,使其保持水溶胶状态,即胶体金 (Colloidal gold)^[7],胶体金富含电子和强大的给电子能力,在溶液 pH8.2 条件下,以非共价键与 CL mAb 结合形成金标抗体,将金标抗体干燥在玻璃棉上,一端与固定有 BSA-CL (T 线)和二抗 RaMIgG (C 线)的 NC 膜相连,另一端与样品垫相连,加入待测样品后,金标抗体重新水化并与样品相互反应,在毛细管的扩散作用下沿着吸水纸方向移动,若样品中不含 CL,至 T 线时,金标抗体就会与 RaMIgG 反应而被截获,金颗粒富集而出现红色条带,至 C 线时同样会出现红色条带;若样品中含有 CL,CL 已与金标抗体反应而占据了抗体上的有限位点,不再与 RaMIgG 反应而越过 T 线,不出现红色条带,仅在 C 线出现红色条带。

3.1.2 CL-Strip 检测方法的性能 由于该研究所用抗体为高亲和力 CL mAb,设计组装的检测试纸的检测限为 1.0ng/ml。准确性是由 CL-Strip 标准曲线标准点的设置所决定的,根据金标试纸采用的反对数曲线拟合合成直线进行线性定量的原理,将不同浓度 CL 相对光密度值的百分率与 CL 浓度的对数值设置在同一条曲线上体现其线性,通过与 GC-MS 的符合实验证实,试验所设标准点合理,检测结果准确。经反复试验证实,研究所制备的 CL-Strip 灵敏度高,准确性好,特异性强,可用于 CL 的残留检测。

3.2 GC-MS 检测方法的建立及其性能

3.2.1 GC-MS 检测方法的建立

(1)样品处理 在 CL 残留分析中,样品的处理是提高检测方法分辨率和灵敏度的前提,样品处理包括提取、净化和衍生化三个方面。在猪尿液中 CL 主要以游离的原药和结合的葡萄糖醛酸和硫酸酯化物形式存在,由于结合的酯化物含有多个羟基、羧基、硫酸基团,水溶性高,热稳定性差,难以提取和净化,需要将其水解为游离形式再行测定^[8],实验根据 Boyd 等^[9]的实验

结果,选择 β - 盐酸葡萄糖苷酸酶 / 芳基硫酸酯酶对样品进行酶解提取。样品的净化方法有液 - 液分配法、免疫亲和色谱法 (IAC)、SPE 法等,由于 SPE 法效果较为理想,但不同 SPE 柱过柱程序不同,净化效果存在较大差异,常用的 SPE 柱有聚苯乙烯柱 (SAL)、硅胶柱、 C_8 柱、 C_{18} 柱、SCX 柱、SLH 柱等,根据应永飞^[10]等的实验结果,SLH 柱操作简便,效果较好,故该实验选择 SLH 柱净化样品。样品的衍生化可采用多种方法,如环状二甲基硅烷吗啉 (DMS)、甲基硼酸 (MBA)、五氟丙酮、BSTFA 等,Visser^[11]、Wilson 等^[12]进行了系列实验,BSTFA 法效果较好,实验选用 BSTFA 为衍生试剂。

(2) 检测条件的优化 猪尿样尽管经过了净化处理,但不可避免一些杂质的存在,进而干扰检测结果,为达到各组分分离完全,该实验选择程序升温和不分流进样方式,消除了进样分流比的不稳定对检测结果的影响。CL 的碎片离子分别为 m/z 86、187、243、262 等,其基峰为 m/z 86,MTR 的碎片离子分别为 m/z 72、223 等,基峰为 m/z 72,采取 SIM 检测方式,以 CL 基峰与 MTR 基峰的峰面积之比进行定量,取得了较为理想的效果。

3.2.2 GC-MS 检测方法的性能 在实验条件下,通过加标回收实验,CL 浓度在 0.5~200ng/ml 线性关系良好,相关系数 $R^2=0.9998$,直线回归方程 $y=0.122x+0.0068$,以 3 倍信噪比确定其检测限为 0.5ng/ml;加标回收实验结果表明,GC-MS 的加标回收率为 79.5%~91.6%,平均 87.15%,CV 在 9.3%~12.2%,平均 10.5%,GC-MS 检测方法具有较好的灵敏度、准确度和精密度,可用于 CL 残留的定量检测。

4 结论

比较分析了 CL-Strip 和 GC-MS 的测定结果,确证了 CL-Strip 的敏感性、特异性、稳定性和时效性,尤其是 CL-Strip 所具有的简便(无需任何附加仪器、试剂且人人均可操作)、直观(以颜色变化判断结果)、快速(5~10min 可得出结果)、敏感(检出限为 1ng/ml)、特异(与其它药物无交叉反应)、准确(与 GC-MS 检测结果等同性好)等特点,更适用于 CL 残留快速检测的推广应用。

参考文献

- [1] Chan T Y. Health hazards due to clenbuterol residues in food [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 1999, 37(4):517-9.
- [2] Dickson L C, MacNeil J D, Lee S, et al. Determination of beta-agonist residues in bovine urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 2005, 88(1):46-56.

- [3] Harkins J D, Woods W E, Lehner A F, et al. Clenbuterol in the horse: urinary concentrations determined by ELISA and GC/MS after clinical doses[J]. *J Vet Pharmacol Ther.*, 2001, 24(1):7-14.
- [4] Zhang G P, Wang X N, Yang J F, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of beta-adrenergic agonist Clenbuterol residues[J]. *J Immunol Methods*, 2006, 312(1-2):27-33.
- [5] Cho J H, Peak S H. Semiquantitative, bar code version of immunochromatographic assay system for human serum albumin as model analyte[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 75(6):725-732.
- [6] Joon Tam Y, Mohd Lila M A, Bahaman A R. Development of solid-based paper strips for rapid diagnosis of Pseudorabies infection[J]. *Trop Biomed*, 2004, 21(2):121-134.
- [7] Li Y, Ning Y S, Li L, et al. Preparation of a monoclonal antibodies against Plasmodium falciparum glutamate dehydrogenase and establishment of colloidal gold-immunochromatographic assay [J]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 25(4):435-438.
- [8] Haasnoot W, Ploum M E, Paulussen R J, et al. Rapid determination of clenbuterol residues in urine by high-performance liquid chromatography with on-line automated sample processing using immunoaffinity chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1990, 519 (2): 323-35.
- [9] Boyd D, Keeffe M, Smyth MR. Matrix solid-phase dispersion as a multiresidue extraction technique for beta-agonists in bovine liver tissue[J]. *Analyst*, 1994, 119,1467-1470.
- [10] 应永飞,皮雄娥,吴平谷,等.气相色谱-质谱法同时测定动物尿样中莱克多巴胺和克伦特罗.质谱学报,2006,27(2):74-78.
- [11] Visser T, Vredenburg M J, de Jong A P, et al. Confirmational analysis of beta-agonists by cryotrapping gas chromatography Fourier transform infrared spectrometry[J]. *Analyst*, 1994, 119:2681-2685.
- [12] Wilson R T, Groneck J M, Holland K P, et al. Determination of clenbuterol in cattle, sheep, and swine tissues by electron ionization gas chromatography/mass spectrometry [J]. *J of AOAC International*, 1994, 77(4):917-924.