

免疫亲和色谱-气相色谱/质谱法(IAC-GC/MS)检测猪肝中的沙丁胺醇与克伦特罗

王建平^{1,2}, 史为民¹, 沈建忠^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071000)

摘要: 制备出抗沙丁胺醇的抗血清, 提取、纯化 IgG 制备免疫亲和色谱柱, 针对沙丁胺醇与克伦特罗的动态柱容量分别为 400 ng/mL 基质和 416 ng/mL 基质。猪肝样品匀浆后用稀盐酸提取, 经免疫亲和色谱柱纯化, 再用 GC/MS 检测, 即为 IAC-GC/MS 法。对沙丁胺醇的检测限为 0.5 ng/g, 定量限为 2 ng/g, 对克伦特罗的检测限为 0.8 ng/g, 定量限为 2.5 ng/g。空白组织按照 1、5、10、20 ng/g 的浓度添加药物, 沙丁胺醇在空白肝中的添加回收率为 78.4%~106.9%, 克伦特罗的添加回收率为 77.1%~102.9%。本研究建立的检测猪肝中沙丁胺醇与克伦特罗的 IAC-GC/MS 法乃国内首次报道。

关键词: 沙丁胺醇; 克伦特罗; 免疫亲和色谱; GC/MS; 猪肝

中图分类号: S859.84

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)03-0271-05

Immunoaffinity Chromatography - GC/MS for Determination of Salbutamol and Clenbuterol in Swine Liver

WANG Jian-ping^{1,2}, SHI Wei-min¹, SHEN Jian-zhong^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: An IAC column was developed by coupling the purified specific IgG against salbutamol to CNBr-activated Sephrose 4B with the dynamic capacity of 400 ng/mL gel for salbutamol and 416 ng/mL gel for clenbuterol. After extraction with dilute HCl, the extracts of swine liver homogenization was loaded on the IAC column for purification and determined by GC/MS. The limit of detection for salbutamol and clenbuterol were 0.5 ng/g and 0.8 ng/g, and the limit of quantification for salbutamol and clenbuterol were 2.0 ng/g and 2.5 ng/g respectively. Recoveries ranged 78.4%–106.9% for salbutamol and 77.1%–102.9% for clenbuterol at fortified levels of 1, 5, 10, 20 ng/g in blank swine liver. It was the first time that the IAC-GC/MS for detection salbutamol and clenbuterol in swine liver was reported in China.

Key words: salbutamol; clenbuterol; immunoaffinity chromatography; GC/MS; swine liver

沙丁胺醇 (Salbutamol, SAL) 与克伦特罗 (Clenbuterol, CL) 均属于 β_2 -兴奋剂, 该种药物能选择性作用于动物机体内的 β_2 -受体, 产生拟肾上腺素类药物的药理作用, 医学临床被广泛用于治疗支气

管炎、哮喘等疾病。将其添加至动物饲料中给动物饲喂后, 会使动物生长加快, 促使机体的脂肪组织向肌肉组织转化, 明显提高瘦肉率和饲料转化率, 谓之“再分配作用”, 在一段时间内曾被大量非法用于畜

收稿日期: 2006-01-03

作者简介: 王建平 (1977-), 男, 博士, 讲师, 主要从事兽医药理与毒理学研究

* 通讯作者: 沈建忠, Tel: 010-62732803; E-mail: sjz@cau.edu.cn

牧业生产中^[1]。但 SAL 与 CL 在动物机体内残留量大,残留时间长,给消费者的健康带来很大的威胁,很多国家都禁止 β_2 -兴奋剂应用于畜牧业生产中。但有一些饲养者或饲料厂仍在非法使用,因此,不断有食用含有 β_2 -兴奋剂残留的动物组织而引发中毒的事件发生^[2]。

国内外很多文献资料都探讨了动物组织中的 SAL 与 CL 的残留检测方法,包括液相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-质谱法、酶免疫检测法等,作者也曾报道过检测 SAL 残留的 ELISA 方法^[3]。笔者拟用免疫亲和色谱(IAC)技术结合 GC/MS 法对 SAL 与 CL 进行定性定量检测。免疫亲和色谱是以抗原抗体可发生特异性结合和可逆性解离反应为原理,将特异的抗体与惰性基质偶联,制成固定相装柱,当含有被测组分的样品通过 IAC 柱时,固定相中的抗体可与待测物发生特异性结合,其他不被识别的组分则流出 IAC 柱,洗涤除去杂质后,再用洗脱剂洗脱待测物,则样品被纯化,再进行检测。此方法可大大简化组织样品的前处理过程,并使提取的样品进一步纯化,排除了样品基质中的杂质影响,使实际检测工作更加迅速、准确、简便。

1 材料与方法

1.1 试剂与溶液

用甲醇配制浓度为 1 mg/mL 的沙丁胺醇与克伦特罗贮备液,4 °C 保存。DEAE-纤维素, SIGMA 公司。CNBr 活化的 Sepharose4B 干粉购自 Pharmacia 公司。衍生化试剂为含 1% TMS 的三甲基硅烷三氟乙酸酐(Sigma-Aldrich 公司)。IAC 溶液系统:磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L pH7.4), Tris 缓冲液(0.1 mol/L pH8.0), 碳酸氢钠溶液(0.1 mol/L pH8.4), 乙酸盐缓冲液(0.1 mol/L pH4.0), 硼酸盐缓冲液(0.1 mol/L pH8.0)。乙醇:水:乙酸盐缓冲液(80:15:5, 体积分数)为洗脱液 A, 1 mL 洗脱液 A 加 3 mL 甲醇即为最终洗脱液。

1.2 仪器设备及操作条件

安捷伦 6890 气相色谱仪,配有安捷伦 5973 质量选择检测器与自动进样器。气相色谱柱为 HP-5ms, 0.25 mm×30 m×0.25 μ m。GC/MS 系统的操作条件:EI 源,不分流进样,进样量 1 μ L;进样口温度 250 °C;柱温程序为 70 °C 保持 2 min,再以 18 °C/min 升到 200 °C,然后以 5 °C/min 升到 250 °C,最后以 25 °C/min 升到 300 °C 并保持 5 min。载气

为氦气,流速 1.0 mL/min。传输线温度 280 °C。质谱为 SIM(选择离子监控)模式,SAL 的定性离子为 86、350、369、440,定量离子为 369,CL 的定性离子为 86、243、262、277,定量离子为 86。

1.3 抗原及抗体的制备

SAL 完全抗原的合成,抗血清的制备与鉴定参见王建平^[3]等的报道。

1.4 IgG 的纯化

将所得特异性抗血清采用饱和硫酸铵盐析法(SAS)进行纯化,对血清进行粗提、浓缩,在 PBS 中透析 48h,然后使粗提所得的 IgG 通过 DEAE-纤维素离子交换柱,进一步进行纯化脱盐,即得到用于制备 IAC 柱的纯化 IgG,用紫外分光光度计计算所得纯化 IgG 的浓度。

1.5 IAC 柱的制备与鉴定

1.5.1 免疫吸附剂的制备 将 CNBr 活化的 Sepharose4B 干粉用 1 mmol/L 的稀盐酸进行溶胀处理后,与事先溶于碳酸氢钠溶液(0.1 mol/L pH8.4)中的 IgG 进行偶联,并计算偶联比率。

1.5.2 装柱与柱容量测定 将制备好的免疫吸附剂压积 1.0 mL 装柱(玻璃柱 100 mm×8 mm, G3 滤板),然后依次用 10 mL PBS、5 mL 去离子水、5 mL 乙醇/水(1:4, 体积分数)冲洗 IAC 柱,洗去结合力弱的 IgG,最后再用 10 mL PBS 平衡。将浓度为 25 ng/mL 的 SAL 溶液连续加到 IAC 柱上,使其自然流出,分管收集,GC/MS 检测。当柱结合能力达到饱和后(即流出液浓度与加样浓度相同),用 30 mL 去离子水洗柱,最后用 5 mL 洗脱液洗脱 SAL,收集洗脱液,GC/MS 检测柱容量,按 Davis^[4]的方法计算动态柱容量和绝对柱容量。同法检测 IAC 柱对 CL 的柱容量。

1.5.3 IAC 柱的回收率测定 将二分之一柱容量的 SAL 或 CL 加到 IAC 柱上,自然流出,洗涤,洗脱,GC/MS 检测,计算 IAC 柱的回收率。

1.6 添加回收率测定

取 5 g 匀浆后的猪肝组织,按照 1、5、10、20 ng/g 的浓度添加 SAL 或 CL 后,加入 10 mL 0.01 mol/L 的盐酸溶液,涡动 3 min,然后 3 000 g 离心 10 min,取全部上清液过 0.45 μ m 的滤膜,然后全部上柱进行分离纯化,自然重力下通过 IAC 柱。用 30 mL 去离子水淋洗,最后用 5 mL 洗脱液洗脱,收集于试管中。将收集的 IAC 柱洗脱液在 45 °C 水浴锅中用氮气吹干,然后加入 50 μ L 衍生化试剂,涡动 1

min,然后在 80 °C 条件下反应 1 h。反应完毕后冷却至室温,最后转入进样小瓶中供 GC/MS 检测。

2 结果与分析

2.1 IAC 柱的制备

根据 1.2.3 中的结果,测得抗体 IgG 的偶联率为 98.4%,表明抗体 IgG 与 CNBr 活化的 Sepharose4B 的偶联率很高。计算公式如下:

$$\text{偶联率}(\%) = \frac{\text{偶联前 IgG 总量} - \text{未偶联 IgG 量}}{\text{偶联前 IgG 总量}}$$

×100%

2.2 柱容量与回收率

本试验采用 5 mL 洗脱液就可将全部 SAL 或 CL 洗脱,说明洗脱效果较好且完全,洗脱曲线图见图 1。经测定,IAC 柱针对 SAL 的动态柱容量为 400 ng/mL 基质,回收率为 95%。针对 CL 的柱容量为 416 ng/mL 基质,回收率为 102%。所制备的 IAC 柱在 1 周内重复使用 10 次后,对两种药物的柱容量均在 220 ng/mL 基质以上,柱容量变化情况见图 2。

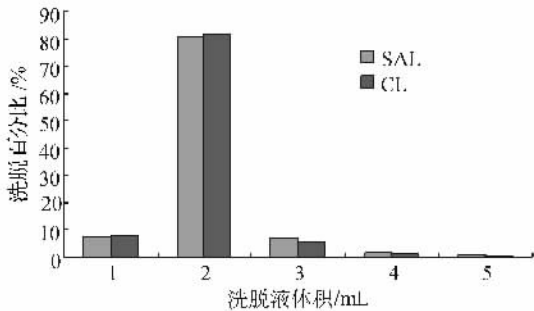


图 1 IAC 柱的洗脱结果

Fig. 1 The elution calibration of IAC column

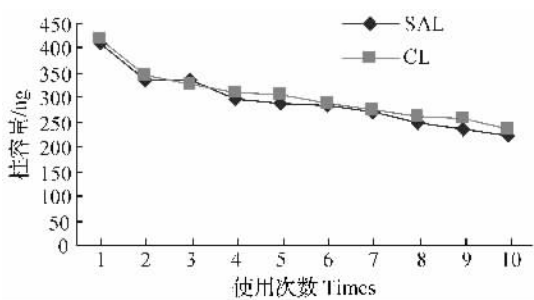


图 2 IAC 柱的柱容量下降趋势

Fig. 2 The change of column capacity

2.3 标准曲线的制备

按 2.5、5.0、10、20、40 ng/mL 系列浓度绘制 SAL、CL 的标准曲线,结果见图 3、图 4。在此浓度范围内两种药物的色谱峰面积与它们的质量浓度呈线性相关,其线性方程分别如下:克伦特罗 $Y = 4.74e^{+004} X - 1.16e^{+005}$,相关系数 $R = 0.997$;沙丁胺醇 $Y = 2.39e^{+004} X - 2.54e^{+004}$,相关系数 $R = 0.996$ 。

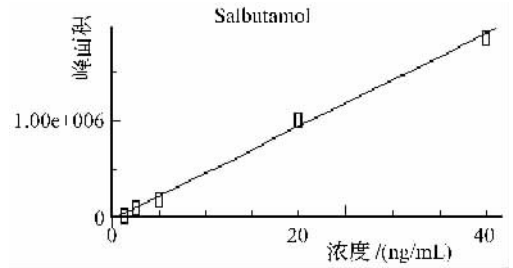


图 3 SAL 的 GC/MS 标准曲线

Fig. 3 The standard calibration of GC/MS for SAL

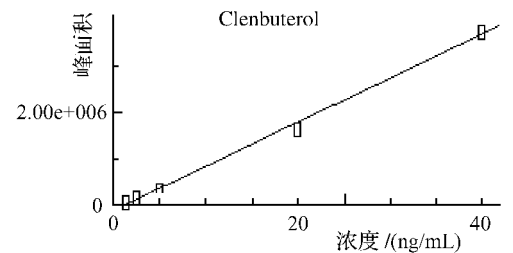


图 4 CL 的 GC/MS 标准曲线

Fig. 4 The standard calibration of GC/MS for CL

2.4 样品添加回收率

以信噪比 ≥ 3 为标准,GC/MS 法的对 SAL 的检测限为 0.5 ng/g,定量限为 2 ng/g,对 CL 的检测限为 0.8 ng/g,定量限为 2.5 ng/g。在猪肝中按 1、5、10、20 ng/g 的浓度添加 SAL 和 CL,样品经 IAC 柱分离纯化后,GC/MS 检测,添加回收率结果见表 1。结果表明,此 IAC-GC/MS 法能够满足 SAL 与 CL 残留检测的需要。

3 讨论

3.1 免疫吸附剂的制备

免疫亲和色谱的特点就在于它有很高的特异性结合能力和样品净化能力,所以该净化富集技术目前已被广泛接受并用于兽药残留的测定。但国内研究者对 β_2 -兴奋剂 IAC 柱的研究还未广泛开展,因

表 1 空白猪肝中 SAL 与 CL 的添加回收率(n=6)

Table 1 The recoveries of SAL and CL fortified in blank swine liver (n=6)

	添加值	检测值	回收率	C. V.
	/(ng/g)	/(ng/g)	/%	/%
SAL	2.5	2.7±0.3	106.9	13.6
	5	4.4±0.7	87.4	14.7
	10	7.8±0.6	78.4	6.3
	20	17.7±1.5	88.6	7.5
CL	2.5	2.6±0.3	102.9	14.5
	5	3.8±0.4	77.1	8.5
	10	8.9±0.6	88.6	6.1
	20	17.1±1.4	85.4	7.2

此作者首先建立了 IAC-GC/MS 法。若要获得性能较好的 IAC 柱,最主要的是要选择高滴度的特异性抗体和一定的惰性基质。制备针对 SAL 特异性抗体的研究作者已进行过探讨^[3],在此不再赘述。惰性基质主要有吸附性硅胶、珠状琼脂糖凝胶、葡聚糖等。目前 IAC 技术中使用最多的基质是 4% 的珠状琼脂糖,商品名为 Sepharose 4B。其分子具有疏松的网状结构,能允许大分子自由扩散,吸水性好,且骨架上有大量羟基供活化和偶联之用^[5],因此,本试验中选用 Sepharose 4B 作为制备免疫吸附剂的基质。

3.2 IAC-GC/MS 法的研究

Haasnoot^[6]等首次报道了将 IAC 原理用于尿液和组织中克伦特罗的提取净化。他们使用抗克伦特罗多克隆抗体制备 IAC 柱,将组织提取液通过 IAC 柱后,以乙酸洗脱,再通过 C18 柱,然后用

HPLC 测定。之后有许多研究者将 IAC 技术应用于 β_2 -兴奋剂的残留检测中。Cooper^[7]等采用克伦特罗多抗制备 IAC 柱,提取沙丁胺醇,柱容量为 270ng/g 基质,添加回收率最高为 60%; Van Ginkel^[8]等报道,用两种混合抗体制备 IAC 柱,可提取猪尿中克伦特罗、沙丁胺醇、马布特罗、西马特罗等,用 GC/MS 检测,检测限达 0.1 ng/g; Pou^[9]等采用 SAL 单克隆抗体制备了 IAC 柱,净化牛组织中的 SAL,用化学荧光免疫检测法测定。Pickett^[10]等建立了 IAC-ELISA 法,采用抗克伦特罗抗体制备 IAC 柱浓缩净化牛尿中的克伦特罗,柱容量为 260 ng/g 基质,ELISA 检测,回收率为 80% 左右。

本试验建立的 IAC-GC/MS 法,采用的是抗沙丁胺醇抗体 IgG 制备 IAC 柱,可同时提取净化猪肝组织中的 SAL 与 CL,柱容量均在 400ng/mL 基质以上,比同类文献报道的柱容量高,且使用 10 次以后,对两种药物的柱容量也均在 220ng/mL 基质以上。在该方法中,样品经稀盐酸提取后可直接通过 IAC 柱,将样品前处理过程大大简化,猪肝经 IAC 柱净化后,在气相色谱的总离子流图中可看出,在目标物周围无其他明显杂峰(见图 7),说明本实验室建立的 IAC 柱对肝组织的净化效果令人满意。在空白肝组织中的添加回收率范围为 77.1%~106.9%,完全能够满足对 SAL 和 CL 残留检测的要求,检测限均在我国农业部规定的检测限以下(NY/T 468-2005, 2.0 ng/g),说明本方法具有很高的实用性。因此,本试验所建立的 IAC-GC/MS 法高效、灵敏,是目前国内较好的检测 SAL 与 CL 残留的方法。

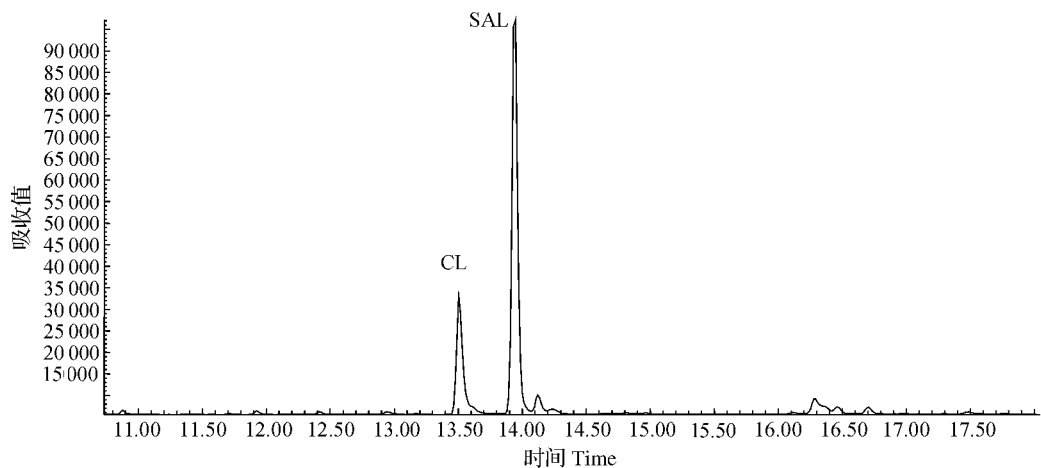


图 5 SAL 与 CL 标准品的气相色谱总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatograms of SAL and CL standard

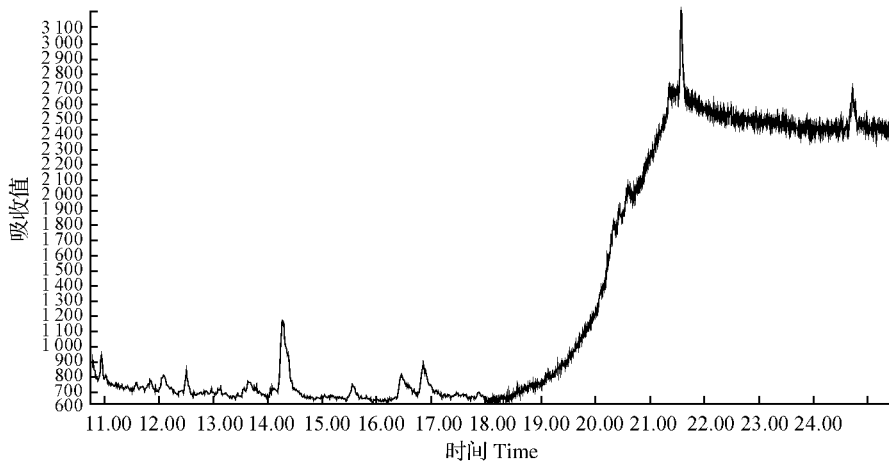


图 6 空白猪肝的气相色谱总离子流图

Fig. 6 Total ion chromatograms of blank swine liver

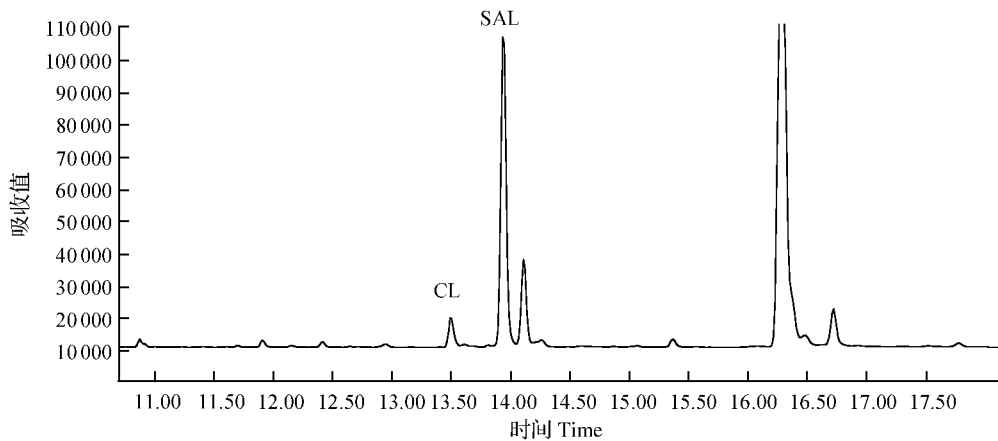


图 7 空白猪肝中添加 SAL 与 CL 的气相色谱总离子流图

Fig. 7 Total ion chromatograms of fortified SAL and CL in blank swine liver

参考文献:

- [1] Smith D J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock [J]. J Anim Sci, 1998, 76: 173~194.
- [2] 王立斌, 梁春穗, 林协勤, 等. 盐酸克伦特罗引起特大食物中毒的调查与思考[J]. 华南预防医学, 2002, 28(1): 54~56.
- [3] 王建平, 沈建忠. 猪肝和猪尿中沙丁胺醇和克伦特罗残留的酶联免疫吸附检测法研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 397~401.
- [4] Davis G C, Hein M B, Chapman D A. Evaluation of immunosorbents for the analysis of small molecules: isolation and purification of cytokinins[J]. J Chromatogr, 1986, 366: 171~189.
- [5] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科技出版社, 2001.
- [6] 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: 323~335.
- [7] Cooper A D, Shepherd M J. Evaluation of a novel immunoaffinity phase for the purification of cattle liver extracts prior to high-performance liquid chromatographic determination of beta-agonists[J]. Food and Agricultural Immunology, 1996, 8(3): 205~213.
- [8] Van Ginkel L A, Stephany R W, Van Rossum H J. Development and validation of a multiresidue method for beta-agonists in biological samples and animal feed[J]. J AOAC Int, 1992, 75(3): 554~560.
- [9] Pou K, Ong H, Adam A, et al. Combined immunoextraction approach coupled to a chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of trace levels of salbutamol and clenbuterol in tissue samples [J]. Analyst, 1994, 119(12): 2659~2662.
- [10] Pickett R J H, Sauer M J. Determination of clenbuterol in bovine urine by enzyme immunoassay following concentration and clean-up by immunoaffinity chromatography[J]. Analytica Chimica Acta, 1993, 275: 269~273.