

猪内脏中盐酸克伦特罗的毛细管电泳电导检测^{*}

郑妍鹏¹, 曾红惠², 廖华勇², 莫金垣¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州510275;

2. 南海市卫生防疫站, 广东 南海 528200)

摘要:建立了可用于检测猪内脏中盐酸克伦特罗含量的毛细管电泳电导检测方法, 考察了实验参数对分离、检测的影响。采用醋酸/醋酸氨缓冲体系为运行电泳介质, 在最佳实验条件下, 盐酸克伦特罗的线性范围为1.2~20 mg/L, 检测限为0.6 mg/L, 是一种较好的检测盐酸克伦特罗的方法。

关键词:毛细管电泳; 电导检测; 盐酸克伦特罗; 猪内脏

中图分类号: O658.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 05-0057-03

克伦特罗 (Clenbuterol, 简称 CL) 又称克喘素, 是人工合成的 β 肾上腺素能受体兴奋剂之一, 一般用其盐酸盐即 α [(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐。CL常用于防治哮喘性慢性支气管炎、肺气肿等呼吸系统疾病, 当高剂量添加于动物饲料中时, 可以减缓蛋白质分解代谢, 提高脂肪分解, 可作为生长促进剂提高畜牧生产效益^[1]。但由于CL对热稳定, 使用后会在动物组织中形成累积性残留, 当人们食用含克伦特罗的动物内脏后, 多次发生中毒事件, 所以CL被禁止作为生长促进剂使用。但由于CL有促进脂肪代谢, 提高瘦肉率等效果, 目前仍被少数不法分子非法使用, 近年来, 中国各地已有多起瘦肉精中毒事件发生, 因此, 检测猪内脏中的盐酸克伦特罗残留有着十分重要的意义。CL的检测方法主要有酶联免疫吸附法(ELISA)^[2]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[3]及高效液相色谱法(HPLC)^[4]等。电化学检测器结构简单, 可选择的方法比较灵活^[5], 本文采用毛细管电泳电导检测猪内脏中盐酸克伦特罗的含量, 是一种准确、快速、有效的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

CES98毛细管电泳仪, 高压电源, CZE30PN10/MCN22, 美国 Spellman High Voltage Electronics Corporation; 电导检测器; 毛细管电泳数据站, 中山大学电分析室研制; pH3-3C精密酸度计, 上海电光器件厂; 石英毛细管柱45 cm \times 75 μ m (i. d.), 河北

永年光导纤维厂。

所用试剂: 乙酸 (AR), 广州化学试剂厂; 乙酸铵 (AR), 广州化学试剂厂; 乙酸钠 (AR), 广州化学试剂厂; 磷酸 (AR), 广州化学试剂二厂; 磷酸二氢钠 (AR), 广州化学试剂二厂; 盐酸克伦特罗对照品 (AR), 美国 Sigma 公司; 所用水为二次去离子重蒸水。

1.2 溶液制备与样品处理

盐酸克伦特罗标准储备溶液的制备: 取盐酸克伦特罗对照品10 mg, 用甲醇溶解, 定容至25 mL。

缓冲溶液的制备: 分别制备100 mmol/L的乙酸、乙酸氨、乙酸钠、磷酸、磷酸二氢钠储备液, 各取适量, 配成乙酸/乙酸氨、乙酸/乙酸钠、磷酸/磷酸二氢钠缓冲体系。

样品处理: 称取经切碎混匀的样品20 g (内含一定量的盐酸克伦特罗标准品), 加入30 mL φ =60%乙醇, 超声震荡30 min, 4 000 r/min离心20 min, 将上清液移入125 mL分液漏斗中。将残渣按上述过程再处理1次, 合并2次上清液。分别用60, 40 mL乙醚萃取2次, 分出有机相, 水浴蒸干, 用甲醇溶解并定容至2 mL, 然后经0.5 μ m双层滤膜离心过滤后, 即可进行毛细管电泳分析。

1.3 电泳条件

毛细管柱在使用前用0.1 mol/L NaOH、H₂O和运行电泳介质溶液分别洗约5 min, 每次进样后用运行缓冲溶液洗柱3 min。进样采用重力进样方式, 进样高度为10 cm, 进样时间为12 s, 分离电压为14 kV。实验在恒温(18 $^{\circ}$ C)、恒湿(相对湿度

* 收稿日期: 2002-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29675033); 广东省自然科学基金资助项目(001237)

作者简介: 郑妍鹏(1974年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 莫金垣, E-mail: cesmjy@zsu.edu.cn

65%) 的实验条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 背景电解质的选择

缓冲溶液背景电解质的选择对于毛细管区带电泳分离效果有十分明显的影响。分别采用乙酸/乙酸氨、乙酸/乙酸钠、磷酸/磷酸二氢钠缓冲体系进行了实验比较, 结果表明磷酸/磷酸二氢钠体系背景电导值和电流较高, 体系相对不稳定; 乙酸/乙酸钠体系比较理想, 但不如乙酸/乙酸氨体系检测灵敏。因此, 选择乙酸/乙酸氨体系作为缓冲溶液。

2.2 缓冲溶液浓度及 pH 值对分离的影响

图 1 表示乙酸/乙酸氨缓冲溶液的浓度和 pH 值对盐酸克伦特罗迁移时间的影响。从图 1(a) 中可以看出, 盐酸克伦特罗的迁移时随乙酸氨浓度 (用乙酸调节 pH 值至 5.2) 的增大而增大, 继续增大缓冲液的浓度, 不但会使分析时间延长而且会产生较大的热量, 引起区带增宽, 所以选择缓冲溶液的浓度为 4 mmol/L。从图 1(b) 中可以看出, 盐酸克伦特罗的迁移时间随缓冲溶液 pH 的增大而减少, 继续增加 pH 值, 各物质的迁移时间减小, 对分离不好, 所以, 选择 pH=5.2。

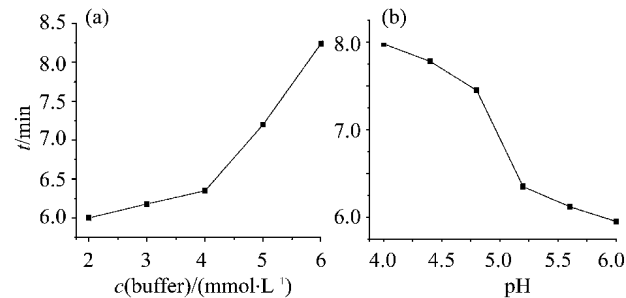


图 1 缓冲溶液的浓度和 pH 对盐酸克伦特罗电泳迁移时间的影响

Fig. 1 Influence of the concentration and pH of buffer on migration time

(a) 乙酸氨浓度的影响, pH=5.2

(b) pH 值的影响

操作条件: 缓冲液浓度为 4 mmol/L 乙酸氨, 用乙酸调节至相应 pH 值; 电压为 +14 kV; 进样高度为 10 cm; 进样时间为 12 s

2.3 操作电压和进样时间对分离的影响

操作电压也是影响分离的重要因素。在选择好的优化条件下, 分别在 +8, +10, +12, +14, +16 和 +18 kV 的电压下进样分析, 结果如表 1 所示。随着电压的升高, 可以缩短分析时间。但在电压升高的同时, 产生的热量也增多, 导致缓冲液的电导增加, 电流增大, 区带增宽, 同时也不利于电

泳体系的恒温^[7]。权衡两种因素, 选择 +14 kV 作为电泳电压。

表 1 操作电压对电泳迁移行为的影响

Tab. 1 The influence of voltage on migration time and current

项目	V/kV					
	+8	+10	+12	+14	+16	+18
迁移时间/min	12.70	9.73	8.16	6.35	5.46	4.70
I/A	7.9	8.1	8.4	8.8	9.7	10.6

分别在 6, 8, 10, 12, 14 和 16 s 时间下进样分析, 发现进样时间在 14 s 后, 峰高趋于稳定, 但分离度和柱效均降低, 这是因为进样时间过长, 进样量增大, 引起样品扩散, 导致峰形扩宽。但进样时间少于 6 s 时, 进样量少, 检测精度低, 所以, 鉴于这二者的考虑, 选择进样时间为 12 s。

2.4 线性范围

选择好的优化条件下进标准样品分析, 盐酸克伦特罗的线性回归方程为:

$$Y = -99.3 + 144.8X$$

式中, Y 为峰面积, X 为浓度, 单位 mg/L, 相关系数 $r = 0.9943$; 线性范围为 1.2~20.0 mg/L; 检出限为 0.6 mg/L。

2.5 猪内脏样品的测定

猪内脏中盐酸克伦特罗较易提取、分离, 加标回收率较好, 实验结果见图 2 和表 2 (原样品中不含盐酸克伦特罗)。

表 2 样品加标回收结果

Fig. 2 Recovery of clenbuterol in samples

样品	加入量 (mg·L ⁻¹)	测量值 (mg·L ⁻¹)	回收率/%
猪肝	3.0	2.6±0.1	86.7±3.3
猪肺	2.5	2.1±0.1	85.3±2.3
猪肾	1.5	1.3±0.1	84.5±3.9

3 结论

对于盐酸克伦特罗的测定, GC/MS 即可定性, 又可定量, 是有效、准确的方法, 但比较费时, 不能一次大批量检测样品, HPLC 在实际工作中常用于饲料的分析, 但是它与 GC/MS 一样都需要昂贵的仪器。毛细管电泳电化学检测, 虽然在检测限方面, 不如以上两种仪器和毛细管电泳光学检测, 但有其优点, 线性范围宽和选择性高, 而且设备简单, 价格低廉, 便于推广使用, 希望随着仪器检测技术的发展, 取得更好的检测效果。

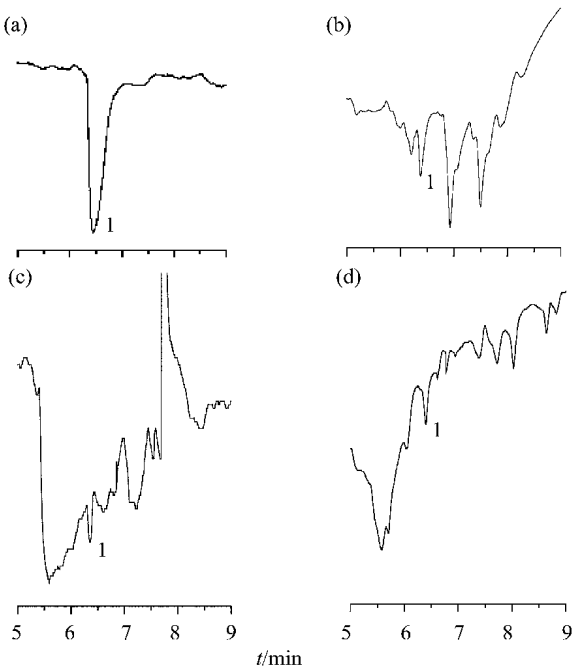


图2 标准溶液和样品溶液的毛细管电泳图

Fig. 2 Capillary electropherogram of standard solution and samples

峰1为盐酸克伦特罗;

- (a) 盐酸克伦特罗对照品, 浓度为 10 mg/L;
 (b) 猪肝提取液; (c) 猪肺提取液; (d) 猪肾提取液
 操作条件: 缓冲液浓度为 4mmol/L 乙酸氨, 用乙酸
 调节 pH=5.2; 电压为+14 kV; 进样高度为 10 cm;
 进样时间为 12 s

参考文献:

- [1] 杨藻宸. 临床用药的药理学基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991: 449—453.
 [2] ELLIOTT C T, CROOKS S R H, MCCAUGHEY W J, et al. Development of a rapid screening test to detect β -agonist residues in bovine and hair[J]. Veterinary Record, 1995, 137: 643—644.
 [3] LEYSSENS L, DRIESSEN C, JACOBS A. Determination of (β)-agonists in bovine urine and liver by gas chromatography mass spectrometry[J]. J Chromatography, 1991, 564: 515—519.
 [4] GINKEL Van. Determination of clenbuterol in animal feed by high performance liquid chromatography[J]. J ADAC International, 1992, 75: 554—558.
 [5] 郑妍鹏, 谢天尧, 莫金垣. 几种常见阴离子的高效毛细管电泳电导[J]. 分析测试学报, 2001, 20(6): 12—14.
 [6] ISSAQ H J, ATAMNIA I Z, MUSCHIK G M, et al. The effect of electric field strength, buffer type and concentration on separation parameters in capillary zone electrophoresis[J]. Chromatographia, 1991, 32: 155—161.

Determination of Clenbuterol in Pig Tissues by Capillary Zone Electrophoresis with Conductivity Detection

ZHENG Yan peng¹, ZENG Hong hui², LIAO Hua yong², MO Jin yuan¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering,

Sun Yat sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

2. Sanitary and Antiepidemic Station of Nanhai City, Nanhai 528200, China)

Abstract: A capillary zone electrophoresis with conductivity detection for determining clenbuterol has been developed. Optimal conditions for the quantitative separation were investigated. A background electrolyte solution consisting of acetic acid and acetic ammonia buffer, hydrodynamic injection and 14 kV of separation voltage were used. Under the chosen condition, the linear range of clenbuterol was 1.2~20 mg/L and detection limits of 0.6 mg/L was obtained. The developed method is rapid and sensitive and it has been applied to determine clenbuterol in pig tissues.

Key words: capillary electrophoresis; conductivity detection; clenbuterol; pig tissues