

小型化毛细管电泳-电化学检测法测定 猪尿和猪饲料中的 β -兴奋剂

王伟宇, 张玉莲, 邢晓平, 王金妍, 石 雪, 叶建农

(华东师范大学化学系, 上海 200062)

摘要 :采用小型化毛细管电泳-电化学检测技术测定了猪尿和猪饲料中的克伦特罗(clenbuterol ,俗称瘦肉精)及其替代品莱克多巴胺(ractopamine)和沙丁胺醇(salbutamol)。考察了工作电极的氧化电位、运行缓冲液的酸度和浓度、分离电压和进样时间等因素对分离和检测的影响。以直径 300 μm 的碳圆盘电极为工作电极 ,检测电极电位为 +0.95 V (vs SCE) ,在 100 mmol/L 的硼酸盐(pH 9.15)运行缓冲液中 ,上述 3 种组分在 7 min 内实现了较好的分离。被测物浓度与峰电流在 3 个数量级范围内呈良好的线性关系 ,检测限为 $1.20 \times 10^{-7} \sim 2.06 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ 。该方法简单可靠 ,已成功应用于猪尿和猪饲料样品中 3 种 β -兴奋剂的测定 ,是一种有效的食品安全分析检测方法。

关键词 :小型化毛细管电泳-电化学检测法 ;克伦特罗 ;莱克多巴胺 ;沙丁胺醇 ;猪尿 ;猪饲料

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)02-0228-04 栏目类别 :研究论文

Determination of β -adrenergic agonists in pig urine and pig fodder using miniaturized capillary electrophoresis with electrochemical detection

WANG Weiyu , ZHANG Yulian , XING Xiaoping , WANG Jinyan , SHI Xue , YE Jiannong

(Department of Chemistry , East China Normal University , Shanghai 200062 , China)

Abstract : A method of miniaturized capillary electrophoresis with electrochemical detection has been developed for the determination of β -adrenergic agonists in pig urine and pig fodder. Several important factors , including running buffer acidity , separation voltage , working electrode potential , etc. , were evaluated to acquire optimum analysis conditions. Under the selected optimum conditions , these analytes can be well separated in 7 min. Good linear relationship was established between the peak current and the concentration of each analyte over 3 orders of magnitude. The detection limits ranged from 1.20×10^{-7} to $2.06 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ ($S/N = 3$). The proposed method has been successfully applied for the determination of β -adrenergic agonist in pig urine and pig fodder with satisfactory results , providing a useful monitoring method for food safety.

Key words : miniaturized capillary electrophoresis-electrochemical detection ; clenbuterol ; ractopamine ; salbutamol ; pig urine ; pig fodder

β -兴奋剂(β -adrenergic agonist ; β -agonist)的全称为 β -肾上腺素兴奋剂(BAA) ,又称 β -激活剂 ,是一种化学结构和生理功能类似肾上腺素和去甲肾上腺素的苯乙醇类衍生物 ,它能与动物体内大多数 β -肾上腺素受体相结合 ,导致细胞代谢过程改变。20 世纪 80 年代有人发现 ,在饲料中添加 β -兴奋剂具有营养成分再分配作用 ,能使肌肉比例提高 ,增大

禽畜的瘦肉率 ,因此 β -兴奋剂一度被用作畜牧业中的饲料添加剂。 β -兴奋剂易在动物组织特别是内脏中积聚残留 ,并可通过食物链进入人体 ,严重危害人类健康。欧美等国先后立法禁止在畜禽生产中使用 β -兴奋剂作为饲料添加剂^[1]。我国政府也明令禁止使用克伦特罗(俗称瘦肉精)、沙丁胺醇等作为饲料添加剂 ,且严格控制动物性食品中 β -兴奋剂的残留

收稿日期 2007-07-19

第一作者 :王伟宇 ,硕士研究生。Tel : (021) 62233528 , E-mail : wywang1983@ hotmail. com.

通讯联系人 :叶建农 ,教授 ,博士生导师。Tel : (021) 62233528 , E-mail : jiannongye@ hotmail. com.

基金项目 :上海市科研计划项目(06DZ05125)。

量。为更好地控制克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等的非法使用,迫切需要建立一种快速、简便、有效的检测方法。

薄层色谱法^[2]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[3,4]、高效液相色谱法(HPLC)^[5-8]、免疫分析法(IA)^[9,10]等已经应用于 β -兴奋剂的检测,但上述方法普遍存在检测周期长、分析成本高、某些方法灵敏度比较低等缺点,有些还需复杂的样品前处理或衍生化。毛细管电泳(CE)具有分离效率高、分析速度快、重现性好、样品和试剂用量少等优点,是高效的分离分析技术之一。它与电化学检测方法(ED)联用,对具有电活性的物质有很高的灵敏度和选择性。小型化毛细管电泳分离装置与常规毛细管装置相比,分析速度更快,适宜于实际样品中被测成分的快速检测。本文使用小型化的毛细管电泳-电化学检测技术测定猪尿和猪饲料中的克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇,在 7 min 内即可实现上述 3 种物质的分离检测,为食品安全监控提供了一种有效快速的分析测试方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

小型化的毛细管电泳-电化学检测系统(CE-ED)为自组装,包括直流高压电源(中国科学院上海应用物理研究所);固定毛细管和检测池及进样转盘的有机玻璃(如图 1,在有机玻璃的左端,固定有检测池,里面是三电极体系;右端是进样用的转盘,转盘的外侧有用于插进样管的小圆孔,旋转转盘即可连续进样);14.5 cm 长熔融石英毛细管(内径 25 μm ,外径 360 μm ,Polymicro Technologies, USA),BAS LC-3D 安培检测器(Bioanalytical Systems, USA),XWDT-164 型双笔记录仪(上海大华仪表厂),TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

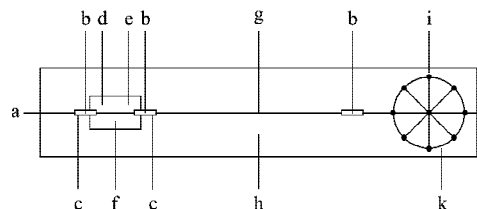


图 1 小型化 CE-ED 系统的简图

Fig. 1 Top view of the schematic diagram of the small-sized CE-ED system

a. working electrode; b. carbon working electrode; c. grounding tube electrode; d. Pt auxiliary electrode; e. Ag/AgCl reference electrode; f. detection cell; g. capillary; h. plexiglass plate; i. plastic cuvette containing sample solution or running buffer; k. rotating sampling disk.

克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇均购自上海安谱公司,其他试剂均为分析纯,各标准品均按说明使用。猪尿分别取自湖北和吉林的个体养殖户,猪饲料购自饲料供应站。用蒸馏水配制 3 种标准品质量浓度均为 1.0×10^{-3} g/mL 储备液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,其他不同浓度的工作液,用运行缓冲液稀释储备液得到。

1.2 样品处理

将猪尿离心(2 000 r/min)10 min 后,用 0.22 μm 的聚丙烯滤膜将上层清液过滤后存于 5 mL 容器中备用。

将猪饲料磨成粉状,准确称取其粉末 2.00 g,置于 25 mL 容量瓶中,加入乙醇-水(体积比为 4:1)混合溶液 10 mL,超声萃取 2 h(50 Hz,19 W),离心(2 000 r/min)10 min,上层清液经 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤后存于 5 mL 容器中备用。

1.3 碳圆盘电极的制作

将铜导线与直径为 300 μm 的碳棒相连,然后将碳棒外侧用聚氨酯清涂料包覆制成碳圆盘电极,在室温下放置 24 h 固化后备用。使用前碳圆盘电极端面用金相砂纸抛光,并置于二次蒸馏水中超声清洗 5 min。

1.4 实验方法

使用自组装的小型化 CE-ED 装置,电化学检测为三电极体系,直径 300 μm 的碳圆盘电极为工作电极,Ag/AgCl 电极(SCE)为参比电极;铂丝为辅助电极。采用电动进样,条件为在 1.15 kV 下从毛细管阳极端进样 6 s。运行缓冲液为 100 mmol/L 硼砂溶液(pH 9.15)。试液与运行缓冲液均经 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤后再使用。

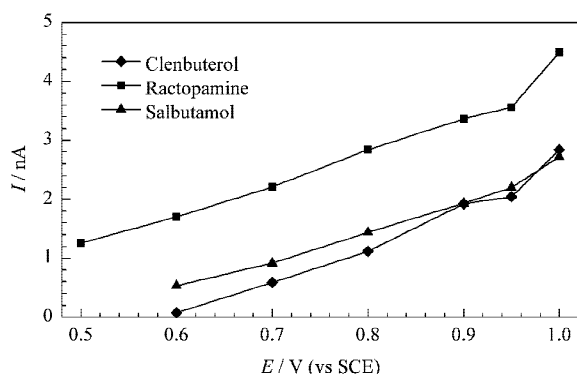
2 结果与讨论

2.1 电泳条件的选择

2.1.1 电极电位的选择

在电化学检测中,加在工作电极上的工作电位直接影响检测的灵敏度、检测限和电极的稳定性。因此,有必要研究电极电位对被测物峰电流的影响以确定最佳的检测电位。

工作电极的工作电位对被测物峰电流的影响如图 2 所示。随着工作电位的增加,峰电流增大。当工作电位超过 +0.50 V(vs SCE)后,峰电流迅速上升;当工作电位超过 +0.95 V(vs SCE)后,虽然所有被测物都产生更大的峰电流,但同时由于基线电流也急剧增加,信噪比反而有所降低。综合考虑选择工作电极的工作电位为 +0.95 V(vs SCE),此时信噪比较高,电极的稳定性较好。

图 2 3 种 β -兴奋剂标准品的动态伏安曲线图Fig. 2 Hydrodynamic voltammograms (HDVs) of three β -agonist standards

Working conditions: fused-silica capillary, 14.5 cm $\times$ 25 μ m; working electrode; 300 μ m diameter carbon disc electrode; running buffer, 100 mmol/L borax (pH 9.15); separation voltage, 1.15 kV; injection time, 1.15 kV $\times$ 6 s; analyte concentrations, 10 μ g/mL for each.

2.1.2 运行缓冲液的酸度和浓度的选择

运行缓冲液的酸度直接影响毛细管的 ξ 电位, 从而影响电渗流 (EOF) 的速率, 同时溶液的酸度也决定样品中各组分分子的电荷情况, 进而影响各组分的迁移时间和分离度, 所以对运行缓冲液的酸度进行优化是获得良好分离条件的关键。本文选择 pH 9.15 的缓冲液作为运行缓冲液, 在此 pH 条件下, 各组分间的分离度较好。

除了运行缓冲液的 pH 值外, 缓冲液的浓度也是影响分离度、峰电流、迁移时间等的另一个重要因素。在 pH 9.15 的条件下, 随着缓冲液浓度的增加, 被测组分的分离度得到了提高, 但同时被测组分的迁移时间变长。为了取得较好的分离效果, 本文选择 100 mmol/L 硼砂溶液 (pH 9.15) 作运行缓冲液。

2.1.3 分离电压和进样时间的选择

对于一定长度的毛细管, 分离电压决定电场强

度, 从而影响被测组分的迁移速度和电渗流的速度, 进而影响各组分的迁移时间。分离电压对迁移时间的影响如图 3 所示。分离电压越高, 迁移时间越短, 但过高的分离电压会降低分离度; 而过低的分离电压, 会导致分析时间过长, 使被测组分峰展宽。在本实验中, 当分离电压为 1.15 kV 时, 所有被测组分在 7 min 内实现了较好的分离, 因此选择 1.15 kV 为工作电压。

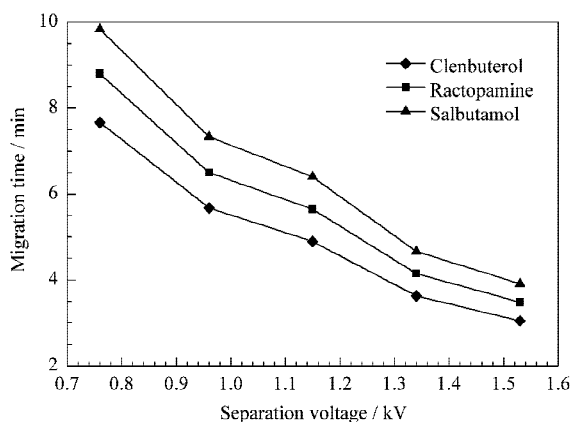


图 3 分离电压对被测物迁移时间的影响

Fig. 3 Effect of separation voltage on migration time of analytes

Working electrode potential: +0.95 V (vs SCE); other conditions as shown in Fig. 2.

分离电压为 1.15 kV 时, 选择进样时间分别为 2 4 6 8 10 s, 测定克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇的峰高与进样时间的关系, 发现进样时间高于 6 s 后峰高增加幅度不大, 却引起电泳峰展宽、峰拖尾等现象发生, 所以本文在分离电压为 1.15 kV 时, 选择进样时间为 6 s。

在优化条件下测得的克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇的混合标准溶液和实际样品的电泳谱图如图 4 所示。

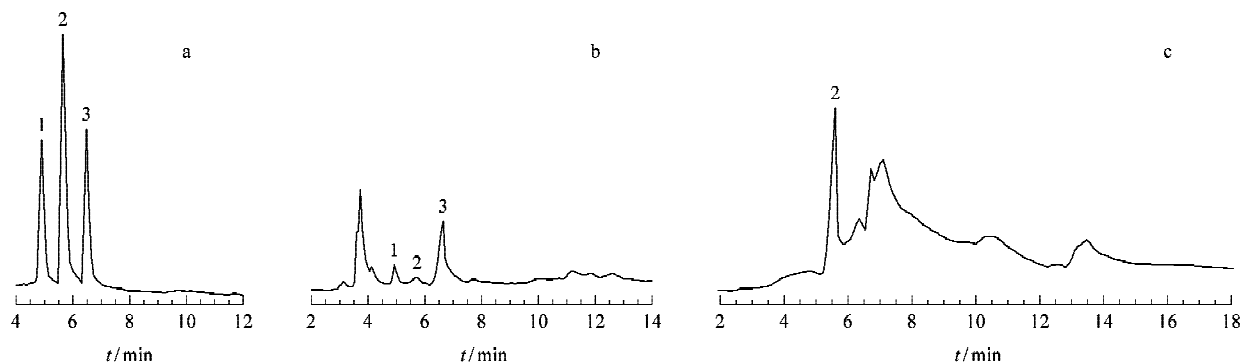
图 4 β -兴奋剂标准品和实际样品的色谱图

Fig. 4 Electropherograms of (a) standard solution (1.0×10^{-5} g/mL for each analyte), (b) pig urine and (c) pig fodder samples
Working electrode potential: +0.95 V (vs SCE); other conditions as shown in Fig. 3.

1. clenbuterol; 2. ractopamine; 3. salbutamol.

2.2 重现性、线性范围及检测限

在上述优化条件下,将 1.0×10^{-5} g/mL 克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇的混合标准溶液连续进样 7 次,峰高的相对标准偏差(RSD)分别为 2.90% , 3.02% 和 1.69% ,结果表明方法的重现性良好。

表 1 3 种β-兴奋剂的线性回归方程和检测限
Table 1 Regression equations and the detection limits of three β-adrenergic agonists

Compound	Regression equation	Correlation coefficient	Linear range/ (g/mL)	Detection limit/ (g/mL $\bar{X}$ S/N=3)
Clenbuterol	$Y = 0.3690 + 1.767 \times 10^5 X$	0.9994	$5.0 \times 10^{-7} - 5.0 \times 10^{-4}$	2.06×10^{-7}
Ractopamine	$Y = 0.4199 + 2.912 \times 10^5 X$	0.9991	$2.0 \times 10^{-7} - 2.0 \times 10^{-4}$	1.20×10^{-7}
Salbutamol	$Y = 0.0867 + 1.897 \times 10^5 X$	0.9995	$2.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-4}$	1.50×10^{-7}

Y : peak height , nA ; X : mass concentration of analyte , g/mL.

2.3 样品及回收率测定

分别取经 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤后的猪尿和猪饲料适量(使实际样品中的峰高既不低于检测限,也不超出所选量程),用运行液稀释至 1 mL ,在优化条件下测定。取等量的实际样品,加入 3 种标准品,稀释至 1 mL ,在优化的条件下检测,通过峰高的增长来对实际样品中的物质进行定性。猪尿和猪饲料中 3 种β-兴奋剂的含量如表 2 所示。检测结果表明,所有实际样品中均含有克伦特罗的替代品沙丁胺醇或莱克多巴胺,说明由于相关部门加强了对瘦肉精的监管和打击力度,不法商人改头换面,以沙丁胺醇或莱克多巴胺作为瘦肉精的替代品,企图逃避监管,继续非法牟利。

表 2 猪尿和猪饲料中β-兴奋剂的测定结果(n = 3)

Table 2 Determination results of β-agonists in pig urine and pig fodder samples (n = 3)

Sample	β-Agonist	Found	RSD/%
Pig urine 1	clenbuterol	ND	
	ractopamine	ND	
	salbutamol	5.24×10^{-4} g/mL	2.0
Pig urine 2	clenbuterol	2.89×10^{-5} g/mL	2.7
	ractopamine	5.69×10^{-6} g/mL	2.3
	salbutamol	8.33×10^{-5} g/mL	1.7
Pig fodder 1	clenbuterol	ND	
	ractopamine	0.78 g/kg	3.5
	salbutamol	ND	
Pig fodder 2	clenbuterol	ND	
	ractopamine	ND	
	salbutamol	0.37 g/kg	4.0

ND : not detected.

取等量的实际样品(猪尿),加入如表 3 所示的标准品,测得加标后的峰高,从而计算出回收率。回收率的测定结果见表 3。

配制一系列不同浓度的 3 种组分的混合标准液,在优化条件下,考察各组分的线性范围,得出各组分的线性回归方程,并以 3 倍信噪比对应的浓度为检测下限。3 种组分的线性范围和检测下限如表 1 所示。

表 3 3 种β-兴奋剂在猪尿中的加标回收率(n = 3)

Table 3 Spiked recoveries in a pig urine sample (n = 3)

β-Agonist	Original/ (μg/mL)	Added/ (μg/mL)	Found/ (μg/mL)	Recovery/ %	RSD/ %
Clenbuterol	2.87	10.0	12.6	97.3	2.1
Ractopamine	0.579	0.800	1.35	96.4	3.0
Salbutamol	8.35	10.0	18.0	96.5	1.5

上述分析结果表明,本方法准确性好、灵敏度高,为猪尿和猪饲料中 3 种β-兴奋剂的同时分析检测提供了一种行之有效的方法。

参考文献 :

[1] He J Y , Ma L , Li Y Y , et al. Chinese Journal of Food Hygiene (何洁仪,马林,李迎月,等.中国食品卫生杂志), 2003 , 15(1) : 54

[2] Henion J , Maylin G A , Thomson B A. J Chromatogr , 1983 , 271 : 107

[3] Liu X , Zhang Y Z , Zhang C J , et al. Acta Pharmaceutica Sinica (刘欣,张亦中,张长久,等.药学报), 1994 , 29 (6) : 454

[4] He L M , Su Y J , Zeng Z L , et al. Anim Feed Sci Tech , 2007 , 132 : 316

[5] Qin Y P , Zou Y G , Liang M Z , et al. Chinese Pharmaceutical Journal (秦永平,邹远高,梁茂植,等.中国药学杂志), 2000 , 35(7) : 475

[6] Fu M , Ge Q H , Zhou Z , et al. Chinese Journal of Pharmaceuticals (傅民,葛庆华,周臻,等.中国医药工业杂志), 2001 , 32(3) : 123

[7] Shishani I , Chai S C , Jamokha S , et al. Anal Chim Acta , 2003 , 483 : 137

[8] Antignac J P , Marchand P , Le Bizec B , et al. J Chromatogr B , 2002 , 774 : 59

[9] Malucelli A , Ellendorff F , Meyer H H. J Anim Sci , 1994 , 72 : 1 555

[10] Degand G , Bernes-Duyckaerts A , Maghuin-Rogister G. J Agric Food Chem , 1992 , 40 : 70