

动物性食品中克伦特罗残留量的测定高效液相色谱法方法改进

王琦, 张笑, 邢文, 张宇

(辽宁省大连市甘井子区疾病预防控制中心, 辽宁大连 116031)

[摘要] 目的: 改进现有利用高效液相色谱仪检测动物性食品中克伦特罗残留量的国标方法。方法: 采用液-液萃取和固相萃取提取纯化样品, 利用高效液相色谱法, Hypersil-C18柱, 流动相为 0.1% 甲酸的乙腈-0.1% 甲酸的乙酸铵水溶液 (25-75)。结果: 此方法检测限为 0.05 mg/kg, 方法精密度 $RSD = 4.46\%$, 回收率为 88.0% ~ 93.4%。结论: 本方法对国标方法的样品处理过程和标准溶液配置过程以及色谱条件均进行了改进, 优化了色谱条件, 简化样品处理过程, 降低方法检出限, 具有更好的灵敏度、精密度和准确度。

[关键词] 高效液相色谱仪; 克伦特罗; 肉类食品

[中图分类号] O657.7⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)06-1363-02

Improvement on the method for determination of Clenbuterol Residues in Meat Food by HPLC

WANG Qi, ZHANG Xiao, XING Wen, ZHANG Yu

(Ganjingzi District Center Disease for Control and Prevention Dalian 116031, China)

[Abstract] **Objective** To improve the method in National Standards for determination of Clenbuterol Residues in Meat Food by HPLC. **Methods** The clenbuterol in sample was extracted and separated by Liquid-liquid extraction and solid phase extraction. The separation was performed on Hypersil-C18 Column with elution using 1% formic acid in acetonitrile and 1% formic acid aqueous solution of ammonium acetate (25-75). **Results** The detection limits of this method is 0.05 mg/kg, the relative standard is 4.46%, and the recoveries ranging from 88.0% to 93.4%. **Conclusion** The improved method is more sensitive and accurate, may apply extensively to determine clenbuterol residues in meat food.

[Key words] HPLC; Clenbuterol; Meat food

克伦特罗俗名“瘦肉精”, 是一种 β_2 肾上腺受体激动药, 具有促进动物生长, 提高畜禽瘦肉比的作用, 但由于它在动物体内有残留, 可通过食物链危害人类健康。国家已明令禁止添加克伦特罗, 但据报道非法添加事件仍时有发生, 因此进行克伦特罗残留量检测仍十分必要。国标 GB/T 5009.192-2003 第二法高效液相色谱法^[1]所提供色谱条件不能适用, 样品处理存在一定问题。本文对该检测方法进行了改进, 优化了色谱条件, 简化样品处理过程, 降低方法检出限。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪 [含四元梯度泵、真空在线脱气机、自动进样器、恒温柱温箱、紫外检测器 (VWD)、安捷伦 B.03.01 版化学工作站], SB3200 超声波清洗器、LD5-2A 型离心机、DK-600 电热恒温水槽。

1.2 主要试剂

含 0.1% 甲酸的乙腈; 含 0.1% 甲酸的乙酸铵

(0.02 mol/L) 水溶液: 称取 1.54 g 乙酸铵, 加水溶解, 加入 1 mL 甲酸定容至 1000 mL 以上试剂除乙腈为色谱纯外均为分析纯试剂, 均需经 0.45 μm 滤膜过滤后方可使用。125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 克伦特罗标准储备液: 称取盐酸克伦特罗 (BW 3815) 0.0250 g 溶于 1% 盐酸水溶液^[2]中, 转移到 250 mL 容量瓶内, 用 1% 盐酸稀释至刻度。克伦特罗标准系列: 吸取克伦特罗标准溶液 0.0 mL、0.1 mL、0.3 mL、0.6 mL、1.0 mL 用流动相定容至 25 mL 配成 0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准工作液。

1.3 色谱条件

色谱柱: Hypersil-C18, 250 \times 4.6 mm (5 μm); 流动相: 含 0.1% 甲酸的乙酸铵 (0.02 mol/L) 水溶液 / 含 0.1% 甲酸的乙腈 = 75:25; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL ; 检测波长: 244 nm。

1.4 样品处理

提取: 称取 10 g (精确至 0.01) 样品于 50 mL 具塞离心管中, 加入 20 mL 高氯酸溶液 (0.1 mol/L) 匀浆, 超声提取 20 min, 水浴 (80 $^{\circ}\text{C}$) 加热提取 30 min, 冷却后 4500 r/min 离心 15 min, 倾出上清液, 用 NaOH 溶液 (1 mol/L) 调 pH 值至 9.5 左右, 再次离心 (4000 r/min) 5 min, 上清液用 25 mL 异丙醇/乙

[作者简介] 王琦 (1980-), 女, 硕士, 主要从事理化检验工作。

酸乙酯(40/60)萃取,2000 r/min离心 2 min,取出乙酸乙酯层,水层再萃取一次合并两次乙酸乙酯层挥干。净化:用 5 ml磷酸二氢钠缓冲液(pH=6)溶解,加至经 6 ml甲醇,3 ml水,3 ml磷酸二氢钠缓冲液活化后的弱阳离子交换固相萃取柱(3 ml),依次用 4 ml甲醇,4 ml水,冲洗柱子,弃去流出液,用 6 ml 氯化甲醇(5%)冲洗柱子并收集流出液。所得溶液氮气吹干,用 1 ml流动相溶解,经 0.2 μm 有机相滤膜过滤后备用。

1.5 测定

吸取 20 μl 标准溶液和试样液注入液相色谱仪,以保留时间定性,用外标法多点校准法定量。

2 结果与讨论

2.1 样品处理探讨

肉类样品基质比较复杂,含有大量的蛋白质、脂肪和水溶性物质。针对这一特点,本法采用高氯酸水溶液提取样品,水浴加热,可有效地除去蛋白质和大部分脂肪,后利用克伦特罗在碱性条件下可溶于有机溶剂的性质^[3],用乙酸乙酯萃取提取液,除去水溶性物质。但因提取液中含有一定量的油脂在萃取过程中极易乳化,国标方法加入 8 g 氯化钠破乳,但实验证明这一方法并不可取,因在碱性环境下加入氯化钠促进了油脂的皂化,产生乳胶层,降低了提取率与方法精密度,实验表明只需在乙酸乙酯中加入一定比例的异丙醇^[4]并在萃取后稍离心,即可得到很好的破乳效果,萃取时亦无需振荡器萃取,手动即可,萃取更完全。所得提取液经固相萃取净化,再进行液相分析,便不会产生大量杂质干扰。

2.2 色谱条件选择

受色谱柱所限,因甲醇溶剂化作用,经实验表明凡含甲醇的流动相系统 30 min 内均不出峰,故选择乙腈代替甲醇作为流动相。鉴于被测物质为一弱碱性化合物,在弱酸性条件下较易洗脱,因此先后用弱酸性缓冲盐 0.01 mol/ml 磷酸二氢钠和 0.02 mol/ml 乙酸铵(含甲酸)作为流动相进行比较,结果发现用磷酸二氢钠 30 min 内不能出峰,而用乙酸铵短时间内出峰,峰型较好。故决定用乙酸铵作为缓冲盐,甲酸微调酸性,并调整两种流动相的比例,最终确认当乙酸铵水溶液所占比例为 75%,流动相 pH 值在 5 左右时,被测物与杂质得到较好的分离,保留时间也较理想。见图 1、图 2。

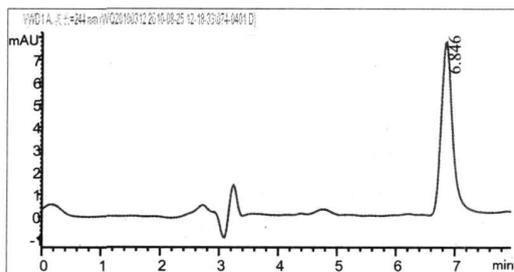


图 1 克伦特罗标准品液相色谱图

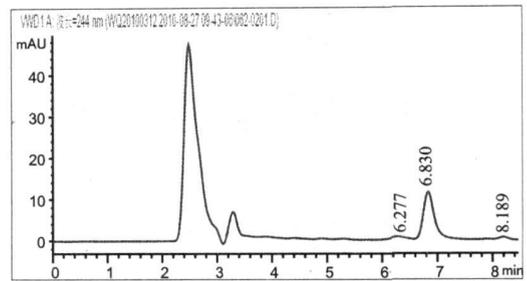


图 2 样品液相色谱图

2.3 线性范围与最小检出量

用浓度 0 μg/ml、0.5 μg/ml、1.5 μg/ml、3.0 μg/ml、5.0 μg/ml 的标准液进样分析,测得标准曲线进行线性回归:克伦特罗标准液浓度在 0 μg/ml~5 μg/ml 范围内,相关系数为 $r=0.99997$ 。取 10.00 g 样品进行分析最小检测浓度为 0.05 mg/kg。

2.4 精密度及准确度

精密度:向 6 份相同质量(10.00 g)的同一肉类样品中加入克伦特罗标准液 1.50 μg 按方法进行测定,计算后得相对标准偏差 4.66%,见表 1。准确度:向 4 份肉类样品(10.00 g)中分别加入一定量克伦特罗标准,按方法进行测定,计算后得出回收率,回收率在 88.0%~93.4% 之间,见表 2。由结果可见,方法的精密度和回收率均达到分析要求。

表 1 精密度测定结果 (n=6)

试验次数	1	2	3	4	5	6
测得含量(μg)	1.47	1.39	1.29	1.38	1.36	1.45
平均值 X=1.39 μg 标准差 S=0.0648 相对标准偏差 RSD=4.66%						

表 2 回收率测定结果

加标量(μg)	实测含量(μg)	回收率(%)
0.75	0.66	88.0
0.75	0.68	90.6
5.00	4.46	89.2
5.00	4.67	93.4

[参考文献]

- [1] GB/T 5009.192-2003. 动物性食品中克伦特罗残留量的测定 第二法高效液相色谱法[S].
- [2] 何佳璐. 高效液相色谱法测定猪肉中的盐酸克伦特罗[J]. 海峡预防医学杂志, 2006, 12(2): 47-48.
- [3] 林奕芝, 刘奋, 戴京晶, 等. 高效液相色谱法测定肉与肉制品中盐酸克伦特罗[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(2): 180-181.
- [4] 栾燕, 迂君, 张玉黔, 等. 高效液相色谱法测定食品中盐酸克伦特罗[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(10): 1257-1258.

(收稿日期: 2011-01-07)