

盐酸克伦特罗检测技术的研究进展

韩 森,马国霞 李卫芬

(浙江大学饲料研究所动物与分子营养实验室,浙江 杭州 310029)

克伦特罗(clenbuterol, CL)又称“瘦肉精”、“克喘素”等,由于其同时具有营养重分配的作用,故有人将其用于畜牧业生产中以提高畜禽瘦肉率,但对人畜健康造成了较为严重的威胁。笔者介绍了盐酸克伦特罗的基本结构及性质,并对其检测方法进行了综述。

1 盐酸克伦特罗概述

盐酸克伦特罗即 4-氨基- α -(叔丁氨基)-3,5-二氯苯甲醇,是一种人工合成的 β_2 -肾上腺受体激动剂,临床一般用其盐酸盐,分子量为 313.65,分子式 $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O \cdot HCl$ 。

该物质常温下为白色或微黄粉末状固体,熔点为 170~176 $^{\circ}C$,极易溶于水、甲醇和乙醇,微溶于氯仿,不溶于苯。克伦特罗的各部位通过结合不同基团可以形成一系列类似物,其有多个可结合位点(见图 1),可发生多种化学反应,化学性质较为活泼^[1]。克伦特罗人工合成的 β_2 -肾上腺素受体激动剂(β_2 -激动剂),常作为支气管扩张剂用于防治支气管哮喘、哮喘性慢性支气管炎及肺气肿等呼吸系统疾病所致的支气管痉挛。当其应用剂量达治疗量的 5~10 倍时,CL 可增强肌肉发育,降低脂肪沉积,因此又称为“瘦肉精”。由于这种特殊的生物学功能,常被作为饲料添加剂非法用于肉用动物的生产之中。但由于 CL 在动物体内吸收快、分布广、脂溶性高,具有残留性积累和半衰期长等药理特性^[2]。人们在食用残留 CL 肉品后引起的中毒事件不断发生^[3],因此,各国政府都禁止 CL 作为饲料添加剂用于肉用动物的生产之中,我国政府也规定严禁在饲料中添加 CL,同时制订了 CL 的最高残留限量标准。

目前,已经有多种技术可以对克伦特罗进行

收稿日期 2005-10-27 改回日期 2006-03-07
 作者简介 韩森(1978—),男,在读硕士研究生,主要研究方向为动物分子营养。

摘要:随着人民生活水平的逐步提高,动物性食品的安全问题日益成为人们关注的焦点,相关的检测技术也得到了发展和完善。笔者以盐酸克伦特罗为例,对其检测方法进行综述,主要包括色谱技术、波谱与色谱联用技术、电化学技术与免疫酶技术。

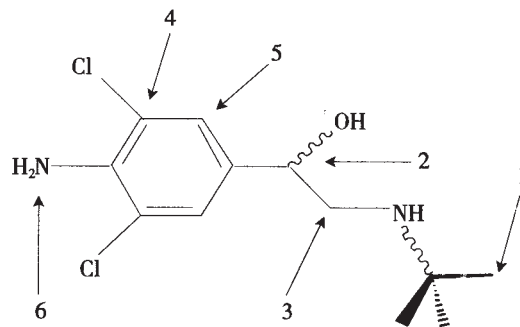
关键词:盐酸克伦特罗;检测;进展
 中图分类号:S816.701.7 文献标识码:A
 文章顺序编号:1672-5190(2006)02-0033-03

较为灵敏的检测,主要有色谱技术,包括高效液相色谱、气相色谱、凝胶渗透色谱等;波谱与色谱联用技术,如气相色谱—质谱联用技术、液相色谱—质谱联用技术;电化学技术,包括修饰电极技术、生物传感器技术、高效毛细管电泳等;免疫酶技术,主要是酶联免疫技术。各种检测技术和检出浓度见表 1。

2 检测技术

2.1 色谱技术

在一般情况下,不同物质在不同的两相,即固定相和流动相中具有不同的分配系数,当这些物



1.甲基可氧化为羧酸;2.用格氏试剂引入烷基;3.引入其他的羧酸基团;4,5.烷基取代位点;6.重氮化位点

图 1 克伦特罗分子上可能的修饰位点

表1 克伦特罗的检测技术和最低检出浓度^[2]

检测技术	最低检出浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)
离子色谱附电化学检测器	0.5
高效液相色谱和酶免疫分析联用	1.0
酶免疫分析测试条	5.0
高效液相色谱、高效薄层色谱	0.5
高效液相色谱附电化学检测器	5.0
气相色谱——质谱联用	0.5
毛细管液相色谱——质谱联用	0.05

质随着流动相移动时,它们在两相中反复多次分配从而使各物质得到完全的分,这种分离技术称为色谱法,亦称作层析法。这种分离技术用于分析测定,就是色谱分析。色谱技术运用更多的是与其他技术相结合,使得对检测物质更为灵敏和可信。一种利用高压泵以增加分离效率的液相色谱——高液相色谱(HPLC)适于分离生物、医学大分子和离子化合物、不稳定的天然产物、种类繁多的其他高分子及不稳定化合物的检测。其原理是用加入甲醇的稀酸溶液将饲料中的盐酸克伦特罗盐酸盐溶出,溶液碱化,经液液萃取和固相萃取净化后,直接在HPLC仪上分离、测定。高效液相色谱还可以和其他技术结合,如用高效液相色谱法和紫外检测结合对小牛尿液中盐酸克伦特罗的最低检测浓度达到 $0.5 \mu\text{g}/\text{L}^{[4]}$ 。另外,国家规定以高效液相色谱技术为检测盐酸克伦特罗的仲裁方法。

2.2 质谱与色谱联用技术

质谱(mass spectrometry)是带电原子、分子或分子碎片按质荷比(或质量)的大小顺序排列的图谱。质谱仪是一类能使物质粒子高化成离子并通过适当的电场、磁场将它们按空间位置、时间先后或者轨道稳定与否实现质荷比分离,并检测强度后进行物质分析的仪器。质谱仪主要由分析系统、电学系统和真空系统组成。通过质谱分析,可以获得分析样品的分子量、分子式、分子中同位素构成和分子结构等多方面的信息^[5]。用气相色谱——质谱联用方法以马鬃毛及尾部毛为材料进行检测,其对盐酸克伦特罗的最低检出浓度达 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}^{[6]}$;采用液相色谱——质谱联用方法对牛尿液中的克伦特罗残留进行检测,其检测范围达到 $1.0\sim 4.0 \mu\text{g}/\text{L}^{[7]}$ 。用改进的离子监测质谱技术使得对样品中的克伦特罗检出浓度达到 $0.20 \mu\text{g}/\text{kg}^{[8]}$,该方法的稳定性及优化条件还需要进一步研究。运用液相色谱——质谱联用方

法,其检测的样品为动物肝脏和视网膜,同样达到了较为理想的效果,肝脏样品中克伦特罗的检测浓度达到 $0.2\sim 0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,视网膜样品中克伦特罗的检测浓度达到 $1.0\sim 3.0 \mu\text{g}/\text{kg}^{[9]}$ 。

2.3 电化学技术

电化学技术应用范围非常广泛,主要的检测方法包括修饰电极技术、高效毛细管电泳和生物传感器技术。近年来,修饰电极技术越来越引起有关研究人员的重视,用Nafion修饰电极技术检测饲料中的克伦特罗,使检测下限达到 $1\times 10^{-9} \text{mol}/\text{L}^{[10]}$ 。20世纪60年代中期最早的生物传感器——葡萄糖传感器问世,自此生物传感器的研究有了较大的发展^[11]。生物传感器是一种利用生物的因子或生物学原理来检测或计量化合物的装置。通常生物传感器利用纯化的酶、免疫系统、组织、细胞器或完整细胞作为催化剂,这些催化剂通常被固定化制成膜并与物化仪器相结合使用。物化仪器用来监测欲进行分析的物质在固定化催化剂的作用下所发生的化学变化,并转换成电信号。生物传感器的基本构成及工作原理见图3^[12]。

另有学者研制了检测克伦特罗残留的免疫传感器感受器部件,对克伦特罗残留的最低检测下限可达到 $0.3 \mu\text{g}/\text{L}^{[13]}$ 。

2.4 免疫酶技术

1971年以后酶联免疫吸附剂测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)用于IgG定量测定的方法成为当前应用最广、发展最快的一项免疫酶技术。其基本原理是:将抗原(或抗体)吸附在固相载体上,酶标记抗体(或抗原)与相应的抗原(或抗体)反应,结合在免疫复合物上的酶在遇到相应底物时,可以催化底物水解、氧化或还原并产生有色物质,颜色的深浅与相应的抗体(或抗原)量成正比,故可以借助成色反应的程度来定性或定量抗体(或抗原)。ELISA的关键在于利用抗原(或抗体)的特异性

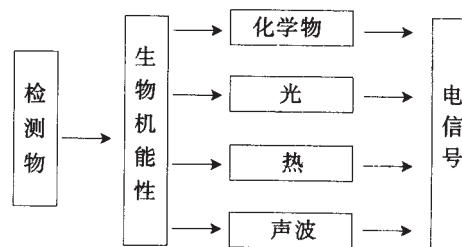


图3 生物传感器的基本工作原理

吸附,在固相载体上逐步叠加,最后必须是酶标记物。ELISA 的测定方法有间接法(用于测定抗体)、双抗夹心法(用于测定抗原)、竞争法(用于测定小分子半抗原)等^[14]。盐酸克伦特罗分子量较小,不能成为完全抗原,只能将其偶联于载体蛋白,达到产生抗体的目的。供选择的载体蛋白一般有牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)和兔血清白蛋白等。采用 ELISA 方法以绵羊尿液和眼睛为材料检测克伦特罗残留,其中对尿液样品的检出下限达 0.270 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而对眼睛样品的检出下限为 1.54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[15]。另有专家比较了若干种以酶联免疫法原理的快速检测试剂盒,检出范围为 1.2~11.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[16]。对服用盐酸克伦特罗(治疗量)的马的尿液进行残留检测,在停药 11 d 后,仍可检出 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的药物残留^[17]。

3 结语

随着人们对动物性食品需求量的增加和质量的提高,动物性食品中盐酸克伦特罗等药品的残留越来越成为全社会共同关注的问题。虽然我国从 1997 年明文规定了在饲料中禁止添加使用盐酸克伦特罗,但非法使用仍有发生。因此在进一步完善畜禽盐酸克伦特罗等兽药残留限量标准的同时,还需要有灵敏准确的检测方法对其进行严格的监控。以上涉及到的检测方法各有优势和不足,在实际工作中需结合实际情况灵活运用。

参考文献:

- [1] 焦奎,张书圣.酶联免疫技术实验[M].北京:化学工业出版社,2004.
- [2] Mitchell G A, Donovan G. Illegal use of beta - adrenergic agonists in the United States[J]. J Anim Sci, 1998, 76(1): 208~211.
- [3] 王选年,康晓迪,潘耀谦,等.盐酸克伦特罗的残留及检测[J].动物医学进展,2002,22(3):41~46.
- [4] Blomgren A, Berggren C, Holmberg A, et al. Extraction of clenbuterol from calf urine using a molecularly imprinted polymer followed by quantitation by high-performance liquid chromatography with UV detection[J]. J Chromatogr A, 2002, 975(1):157~64.
- [5] 杨稜原,钱小红,盛龙生.生物质谱技术与方法[M].北京:科学出版社,2003.
- [6] Schlupp A, Anielski P, Thieme D, et al. The beta-agonist clenbuterol in mane and tail hair of horses[J]. Equine Vet J, 2004, 36(2):118~122.
- [7] Dickson L C, MacNeil J D, Lee S, et al. Determination of beta-agonist residues in bovine urine using liquid chro-

matography-tandem mass spectrometry[J]. J AOAC Int, 2005, 88(1):46~56.

- [8] Engelmann M D, Hinz D, Wenclawiak B W. Anal solid-phase micro extraction (SPME) and headspace derivatization of clenbuterol followed by GC-FID and GC-SIMMS quantification [J]. Bioanal Chem, 2003, 375(3): 460~464.
- [9] Fesser A C, Dickson L C, MacNeil J D, et al. Determination of beta-agonists in liver and retina by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J AOAC Int, 2005, 88(1):61~69.
- [10] 柴春彦,刘国艳,朱元凯. Nafion 修饰电极检测饲料中克伦特罗的研究[J]. 饲料工业, 2004, 25(2):47~49.
- [11] 温志立,汪世平,沈国勋. 免疫传感器的发展概述[J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(4):642~646.
- [12] 张宪恩. 生物传感器技术原理与应用[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1991.
- [13] 刘国艳,柴春彦,朱建国,等. 用于检测盐酸克伦特罗残留的免疫传感器感受器部件的研制[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(6):64~66.
- [14] Irfar Y, Kohji. Enzyme immunoassay for clenbuterol and β_2 -adrenergic stimulant [J]. Journal of immunoassay, 1982, 3(2):155~171.
- [15] Sawaya W N, Lone K, Husain A, et al. Saeed screening for b-agonists in sheep urine and eyes by an enzyme-linked immunosorbent assay in the state of Kuwait[J]. Food Control, 2000, (11):1~5.
- [16] Hahnau S, Julicher B. Evaluation of commercially available ELISA test kits for the detection of clenbuterol and other beta 2-agonists [J]. Food Addit Contam, 1996, 13(3):259~274.
- [17] 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. □

