

盐酸克伦特罗在小鼠毛发与肝肾和肌肉中残留量关系的研究

赵晶晶^{1,2}, 李云兰¹, 梁晋琼², 李青山^{1*}

(1. 山西医科大学药学院, 太原 030001; 2. 山西省兽药监察所, 太原 030027)

摘要 目的: 建立盐酸克伦特罗 (CBL) 小鼠慢性中毒模型, 研究其在小鼠毛发、肝肾和肌肉中分布的关系。方法: 按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}$ 给予实验小鼠盐酸克伦特罗水溶液, 灌胃 30 d 从第 9 d 开始采集样本, 运用衍生化法和气/质联用技术对样本中盐酸克伦特罗残留量进行定性和定量分析。结果: 慢性中毒小鼠毛发、肝肾和肌肉中盐酸克伦特罗残留量按浓度大小依次为: 毛发 > 肝肾 > 肌肉。结论: 盐酸克伦特罗大量残留在毛发当中, 对于盐酸克伦特罗残留量的检测极有意义。

关键词: 气/质联用; 盐酸克伦特罗; 残留

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)08-1277-05

Contribution and correlation of residual clenbuterol hydrochloride in hair, liver, kidney and muscle of rat

ZHAO Jing-jing^{1,2}, LI Yun-lan¹, LIANG Jin-qiong², LI Qing-shan¹

(1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001;

2. Institute of Veterinary Drug Control, Shanxi Province, Taiyuan 030027)

Abstract Objective To develop a model of chronic clenbuterol hydrochloride poisoned rats and studied its contribution and the corresponding correlation in hair, liver, kidney and muscle of rats. **Methods** Rats were administered with clenbuterol hydrochloride solutions ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}$) for 30 days to set up chronic clenbuterol hydrochloride poisoned animal model, then specimens were collected from the ninth day. Specimens were derived and the level of clenbuterol hydrochloride in hair, liver, kidney and muscle of rats was determined with gas chromatography/mass spectrometry. **Results** The order of concentration of clenbuterol hydrochloride was as follows: hair > liver > kidney > muscle. **Conclusion** Clenbuterol hydrochloride is mainly distributed in hair of chronic poisoned rats.

Key words GC/MS; clenbuterol hydrochloride; residual

盐酸克伦特罗 (clenbuterol hydrochloride, CBL) 为人工合成的 β -肾上腺素能兴奋剂。在临床上作为支气管解痉药物。但由于 CBL 能使能量重分配, 降低骨骼肌脂肪, 增加瘦肉率, 使骨骼肌变得强壮有力, 近年在人类减肥药品、运动员食品以及动物性食品中相继发现 CBL^[1], 由于克伦特罗具有热稳定性, 一般烹调方法 (100°C) 不能破坏其生物活性, 油炸 (260°C) 5 min 活性损失 50%^[2]。成年人食用 $2.5 \mu\text{g}$ 以上克伦特罗就会产生反应, 按平均 60 kg 体重换算, 人出现反应的最低剂量仅为 $42 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}$ ^[3], 按每人 1 次食用 100 g 动物组织或内脏计算, 人食用残留量高于 $0.025 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的肉及内脏即可引起中毒反应。鉴于动物性食品在人民群众饮

食结构中占有相当大的比例, 动物性食品中残留的 CBL 必然会严重危害人们的健康与生命安全。研究小鼠毛发与肝肾和肌肉中 CBL 残留量的关系, 其目的就是通过易采集、运输、保存的毛发中 CBL 残留量的检测来推测动物活体中肝肾和肌肉中 CBL 的残留状况, 从而在动物宰前做出安全性处理, 这对于加强食品安全监测具有重大实际意义。本研究建立了 CBL 水溶液灌胃中毒小鼠模型, 应用衍生化技术和气/质联用 (GC/MS) 检测方法建立了毛发中 CBL 的定性定量方法, 并对毛发和肝肾、肌肉中的分布进行了研究, 为食品安全性检测提供了依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 小鼠 132 只, 雌雄各半, 体重 ($20 \pm$

* 通讯作者, Tel: (0351)4690322 E-mail: qingshan@yahoo.com

2) g 购于山西医科大学实验动物中心, 适应性喂养 3 d。饲养环境: 温度 18~22 °C, 湿度 45%~65%, 通风换气良好, 光照合理, 笼具和垫料卫生、无毒。喂营养颗粒饲料和高压消毒灭菌水。

1.2 试剂 盐酸克伦特罗对照品 (批号: 41006 含量为 99.0%) 购于 Labor Dr Ehrenstorfer-Schafers • Bgm - Schlosser- Str 6A 86199 Augsburg Germany, *N, O*-双三甲基硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA, 衍生剂) 购于美国 Supelco 生产, 批号为 LB47446 甲苯为色谱纯, 其余试剂为分析纯。精密称取盐酸克伦特罗对照品, 用水稀释成 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液作为灌胃用药剂, 精密称取盐酸克伦特罗对照品 0.1265 g 用甲醇稀释成 $1.265 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液作为储备液。取储备液用甲醇稀释成 1.265, 6.325, 12.65, 63.25, 126.5, 1265, 3795, 10120 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液作为工作液。

1.3 慢性中毒小鼠模型的建立 将 132 只小鼠随机取雌雄各 6 只作为阴性对照组, 剩余 120 只按雌雄分为 2 个实验组。以最敏感的心肌损害为指标, 小鼠经口染毒 30 d 的最大无作用剂量 (NOEL) 为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}^{[1]}$, 阳性组小鼠每日按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}$ 进行 1 次灌胃, 灌胃期 30 d 检测期 60 d 即检测延续到停药后 30 d 阴性对照组每日用等体积生理盐水灌胃。从灌胃第 9 d^[4]起阳性组雌雄各取 6 只 20% 乌拉坦 0.5 mL 腹腔注射麻醉, 仰卧于解剖盘上, 立即在室温下解剖取样本: 肝、肾、肌肉。-20 °C 冰冻保存待测 CBL。之后每 5 d 采集样本 1 次, 直至停药 30 d 阴性对照组分别在第 1 次和最后 1 次采集样本, 每次雌雄各 2 只。

1.4 毛发的处理方法

提取: 采集毛发, 用自来水清洗 3 次, 用甲醇浸泡 10 min 再用纯净水洗 3 次, 80 °C 烘箱 30 min 称取 0.15 g 小鼠毛发, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 15 mL, 2000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 旋涡 1 min, 60 °C 水浴过夜 (或 20 h) 后, 8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 倾出上清液, 再加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 3 mL, 8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 合并上清液。用 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 pH 为 5.2。

净化^[5]: 取 LC-18 固相萃取柱, 用水 5 mL, 甲醇 5 mL 活化, 样品提取液过柱, 用水 5 mL, 甲醇-水 (1:1) 的混合溶液 5 mL 淋洗柱子, 抽干萃取柱 2 min 用 4% 氨化甲醇洗柱并收集, 60 °C 水浴 N_2 吹干, 80 °C 烘箱开口放置 5 min 取出冷却。

衍生: 净化物中加入衍生剂 BSTFA 100 μL 和

200 μL 甲苯, 旋涡混匀, 加塞旋紧, 80 °C 烘箱衍生 1 h 取出冷却, 加 200 μL 甲苯, 混匀, 灌瓶。

1.5 动物组织的处理方法^[6]

提取: 取动物组织 (肝肾或肌肉) 1.5 g 置于带盖的聚四氟乙烯离心管中, 加入乙酸乙酯 15 mL, 再加入 10.0% 碳酸钠溶液 3 mL, 然后以 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度均质 60 s 盖上盖子以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 2 min 吸取上层有机溶剂于离心管中, 再加入乙酸乙酯 10 mL 在旋涡混合器上混合 1 min 同前操作离心后合并提取液, 在收集的有机溶剂中加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 5 mL 溶液, 旋涡混合 30 s 以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 2 min 吸取下层溶液, 同样步骤重复萃取 1 次, 合并 2 次萃取液, 用 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 pH 5.2。

净化: SCX 小柱依次用甲醇 5 mL, 水 5 mL 和 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 5 mL 活化后, 然后将萃取液移至固相萃取小柱中, 依次用水 5 mL 和甲醇 5 mL 淋洗柱, 在溶剂流过固相萃取柱后, 用真空泵抽干 SCX 小柱, 再用 4% 氨化甲醇溶液 5 mL 洗脱, 收集全部洗脱液。

衍生: 在 60 °C 水浴中用氮气吹干上述洗脱液, 再加入 BSTFA 100 μL 和甲苯 200 μL , 加盖于旋涡混合器上震荡, 在 80 °C 的烘箱中衍生 1 h 冷却后加甲苯 200 μL , 混匀, 转入进样小瓶中, 进行气相色谱-质谱分析。

1.6 对照溶液的处理 分别吸取 0.5 mL 工作溶液加入到 4.5 mL 4% 氨化甲醇溶液中, 氮气吹干, 再加入 BSTFA 100 μL 和甲苯 200 μL , 加盖于旋涡混合器上震荡, 在 80 °C 的烘箱中衍生 1 h 冷却后转入进样小瓶中, 进行气相色谱-质谱分析。

1.7 仪器 安捷伦 6890N/5973 I 气相色谱-质谱联用仪。EI 源, 安捷伦 7683 自动进样器, HP-5MS 毛细管色谱柱 (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm), Sartorius BP210S 万分之一电子天平, 美国 Eppendorf Research 可调微量移液器 500 μL , 安捷伦 5181-1267 微量注射器 10 μL , 载气为高纯氮气, 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱程序升温: 70 °C (0.6 min), 25 °C $\cdot \text{min}^{-1}$ 至 200 °C (6 min), 25 °C $\cdot \text{min}^{-1}$ 至 280 °C (5 min) 传输线温度为 280 °C, 不分流进样, 进样量 2 μL , 进样口温度为 220 °C。质谱条件: EI 电离源, 电子能量 70 eV, 离子源温为 230 °C, 四极杆温度为 150 °C。选择离子定量分析 (SM) m/z 86 243 262 277。

1.8 统计方法 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数

据均用 Spss11.5 软件进行方差分析和多样本均数多重比较的 LSD 检验。

2 结果

2.1 小鼠在实验过程中的反应 实验过程有 1 只雌鼠于灌胃第 12 d, 1 只雄鼠于灌胃第 28 d 死亡, 死亡之前出现四肢抽搐, 心率加快的症状。阴性对照组小鼠在整个实验过程中未出现异常。在用镊子采集毛发样本时发现阳性组小鼠皮肤变薄, 与阴性组小鼠比较, 毛发更易拔取。打开小鼠腹腔, 阳性组无论是雌鼠还是雄鼠腹腔肠系膜、内脏器官上均不见脂肪组织, 阴性对照组则可见大量脂肪。

2.2 总离子流图与质谱图 按以上仪器条件进样, CBL 保留时间为 10.91 min, 毛发样品总离子流图和质谱图见图 1。

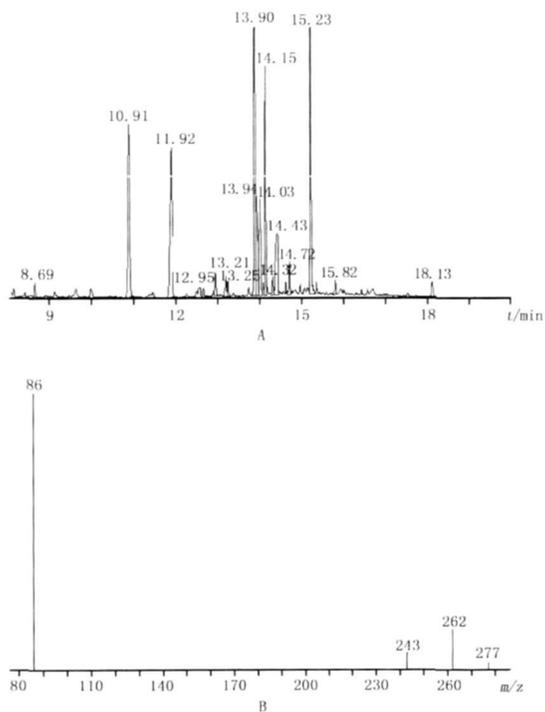


图 1 毛发样品的总离子流图 (A) 和盐酸克伦特罗的质谱图 (SM) (B)

Fig 1 Total ion chromatogram of rat hair (A) and mass chromatogram of CBL (SM) (B)

2.3 CBL 标准曲线及回收率 取 0.15 g 空白小鼠毛发 8 份, 分别添加 1.265, 6.325, 12.65, 63.25, 126.5, 1265, 3795, 10120 ng·mL⁻¹ 甲醇工作液; 取 8 只空白小鼠肝肾样本 8 份, 分别添加 1.265, 2.53, 3.795, 6.325, 10.12, 12.65, 25.3, 50.6 ng·mL⁻¹ 甲醇工作液; 取 8 只空白小鼠肌肉组织样本 8 份, 分别添加 1.265, 2.53, 3.795, 6.325, 10.12, 12.65, 8.975, 25.3 ng·mL⁻¹ 甲醇工作液, 然后按“1.4”样

品处理方法进行提取、净化和衍生, 用 GC/MS 测定。以 CBL 峰面积 *Y* 为纵坐标, 浓度 *X* 为横坐标做线性回归, 毛发、肝肾、肌肉标准曲线分别为:

$$Y = 3.211 \times 10^4 X + 1.569 \times 10^5 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 6.763 \times 10^3 X - 8.641 \times 10^4 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 2.316 \times 10^3 X + 6.196 \times 10^3 \quad r = 0.9990$$

三者的提取率、线性范围和最低检出限见表 1。

表 1 毛发、肝肾、肌肉的提取率、线性范围和最低检出限
Tab 1 Extraction recovery, linear range and the limit of detection in hair, liver, kidney and muscle

样品 (sample)	提取率 (extraction recovery) %	RSD % (n = 8)	线性范围 (range of linear) /ng·mL ⁻¹	LOD /ng·g ⁻¹
毛发 (hair)	92.7	4.3	4.2~33733.3	1
肝肾 (liver and kidney)	81.2	6.1	4.2~168.7	1
肌肉 (muscle)	78.6	7.8	4.2~84.3	1

2.4 阳性小鼠毛发样本中 CBL 残留量随时间的变化 (见图 2)

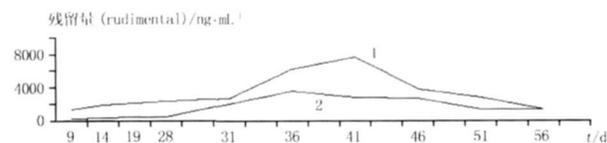


图 2 雌雄小鼠毛发盐酸克伦特罗残留量随时间变化的比较

Fig 2 The comparison of CBL residual in hair of male and female rat along with time

1. 雌鼠 (female rat) 2. 雄鼠 (male rat)

对雌雄小鼠 2 组数据进行多组均数方差分析和多样本均数多重比较的 LSD 检验。结果显示:

雌鼠毛发在第 9 d 到第 31 d 第 46 d 到第 56 d CBL 残留量比较无统计学差异 ($p > 0.05$), 而从第 31 d 到第 41 d CBL 残留量呈上升趋势 ($p < 0.05$), 从第 41 d 到第 46 d CBL 残留量呈下降趋势 ($p < 0.05$), 在第 41 d 达到最高残留。

雄鼠毛发在第 9 d 到第 28 d 第 51 d 到第 56 d CBL 残留量比较无统计学差异 ($p > 0.05$), 而从第 28 d 到第 36 d CBL 残留量呈上升趋势 ($p < 0.05$), 从第 36 d 到第 51 d CBL 残留量呈下降趋势 ($p < 0.05$), 在第 36 d 达到最高残留。

雌雄小鼠毛发中 CBL 残留量随时间的变化有统计学差异 ($p < 0.05$), 即在第 9 到 56 d 范围内雌鼠毛发中 CBL 残留量高于雄鼠毛发中 CBL 残留量, 而雄鼠早于雌鼠达到最大残留。

2.5 阳性小鼠肝肾样本中 CBL 残留量随时间的变

化(见图 3)

对雌雄小鼠 2 组数据进行多组均数方差分析和多样本均数多重比较的 LSD 检验。结果显示:

雌鼠肝肾在第 46 d 到第 56 d CBL 残留量比较无统计学差异 ($p > 0.05$), 而从第 9 d 到第 36 d CBL 残留量呈上升趋势 ($p < 0.05$), 从第 36 d 到第 46 d CBL 残留量呈下降趋势 ($p < 0.05$), 在第 36 d 达到最高残留。

雄鼠肝肾在第 9 d 到第 19 d 第 36 d 到第 56 d CBL 残留量比较无统计学差异 ($p > 0.05$), 而从第 19 d 到第 28 d CBL 残留量呈上升趋势 ($p < 0.05$), 从第 28 d 到第 36 d CBL 残留量呈下降趋势 ($p < 0.05$), 在第 28 d 达到最高残留。

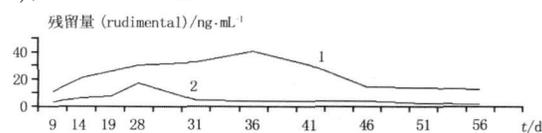


图 3 雌雄小鼠肝、肾盐酸克伦特罗残留量随时间变化的比较

Fig 3 The comparison of CBL rudimental in liver and kidney of male and female rat along with time

1. 雌鼠 (female rat) 2. 雄鼠 (male rat)

雌雄小鼠肝肾中 CBL 残留量随时间的变化有统计学差异 ($p < 0.05$), 即在第 9 到 56 d 范围内雌鼠肝肾中 CBL 残留量高于雄鼠肝肾中 CBL 残留量, 而雄鼠早于雌鼠达到最大残留。

2.6 阳性小鼠肌肉样本中 CBL 残留量随时间的变化(见图 4)

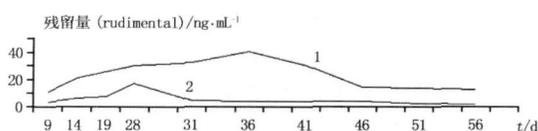


图 4 雌雄小鼠肌肉盐酸克伦特罗残留量随时间变化的比较

Fig 4 The comparison of CBL rudimental in muscle of male and female rat along with time

1. 雌鼠 (female rat) 2. 雄鼠 (male rat)

对雌雄小鼠 2 组数据进行多组均数方差分析和多样本均数多重比较的 LSD 检验。结果显示:

雌鼠肌肉在第 46 d 到第 56 d CBL 残留量比较无统计学差异 ($p > 0.05$), 而从第 9 d 到第 41 d CBL 残留量呈上升趋势 ($p < 0.05$), 从第 41 d 到第 46 d CBL 残留量呈下降趋势 ($p < 0.05$), 在第 41 d 达到最高残留。

雄鼠肌肉在第 41 d 到第 56 d CBL 残留量比较无统计学差异 ($p > 0.05$), 而从第 9 d 到第 36 d CBL 残留量呈上升趋势 ($p < 0.05$), 从第 36 d 到第 41 d

CBL 残留量呈下降趋势 ($p < 0.05$)。在第 36 d 达到最高残留。

雌雄小鼠肌肉中 CBL 残留量随时间的变化有统计学差异 ($p < 0.05$), 即在第 9 到 56 d 范围内雌鼠肌肉中 CBL 残留量高于雄鼠肌肉中 CBL 残留量, 而雄鼠早于雌鼠达到最大残留。

2.7 同一个体, CBL 残留量随时间的变化 取不同时间段的 10 只小鼠毛发、肝肾、肌肉样本中 CBL 残留量资料做统计学分析, 结果为: 对于同一个体, 毛发中 CBL 残留量在整个实验过程中远远高于肝肾和肌肉, 由高到低为毛发 > 肝肾 > 肌肉, 即使停药 1 个月左右毛发中仍有 $1.3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的检出量。肝肾最早达到最高残留, 毛发和肌肉中达到最高残留的时间无显著差异。以峰值为基数, 用呈下降趋势的时间段来计算 CBL 残留量每日下降的百分率由高到低为: 肌肉 > 毛发 > 肝肾。但由于毛发中残留量大, 虽前期降解较快, 但后期降解缓慢, 即使在肝肾、肌肉中不再检出时, 毛发中依然可以很轻松地检测到 CBL。

2.8 性别不同小鼠 CBL 残留量随时间的变化 由“2.4”、“2.5”、“2.6”项的统计分析可知, 在整个实验过程中同一时间采集的同类样本, 雌鼠高于雄鼠 ($p < 0.05$), 雄鼠早于雌鼠达到残留的最高值, 以峰值为基数, 用呈下降趋势的时间段来计算 CBL 残留量每日下降的百分率雌鼠高于雄鼠。

3 讨论

3.1 雌雄小鼠各样本 CBL 残留量有差异 可能与体内激素水平, 与 CBL 作用的生物活性种类不同有关, 其真正原因有待商榷。

3.2 CBL 在各组织中残留量有差异 CBL 在代谢过程中的结合反应主要有: β -羟基和脂肪胺的葡萄糖醛酸化、苯胺基的硫酸化和 β -羟基的乙基化, 其主要的代谢产物有二元醇 CBL、马尿酸 CBL、硫酸化 CBL、葡萄糖醛酸 CBL。代谢产物很可能在某种条件下重新转化为 CBL。由于 CBL 分子中苯环上有卤素原子取代物, 使得 CBL 比其他 β -激动剂具有更高的亲脂性, 并使这些分子不能与一些生物酶结合, 从而阻止了该物质的代谢失活, 导致其在体内长期存留^[3]。由于各组织中 CBL 发生的结合反应不同, 产物不同, 导致各组织中的 CBL 残留量和代谢速度有差异。

3.3 小结 研究结果显示整个实验过程中毛发 CBL 的残留量均远高于肝肾和肌肉, 这一点若推广到可食性动物对食品安全监测具有重大意义: 首先

用毛发作为检测对象, 样本易采集、运输、保存, 最重要的是可以在活体状态下采样检测, 得到可靠结果后, 即时作出安全性处理。其次, 由于毛发中的残留高于动物组织, 用毛发做检测, 可大大降低假阳性率和假阴性率, 很大程度上提高检测结论的科学性、可靠性。第三, 与动物组织的检测过程相比, 其检测过程更趋于简化, 缩短了检测时间, 更有利于大批量检测工作的开展。

参考文献

1 YANG Jie-feng (杨洁峰), YAN Lei (严蕾). Pharmacological effect ham and detection of clenbuterol hydrochloride (盐酸克伦特罗的药理作用、危害及检测). *End Dis Bull* (地方病通报), 2006, 21(1): 101

2 HOU Shi-nong (侯仕农), YAN Qiang (闫强), MA Ai-min (马爱民). Pharmacological effect safety of foodstuff and detection of clenbuterol hydrochloride (盐酸克伦特罗的药理作用、对食品安全的

危害和检测技术). *Inner Mongolia Agr Sci Technol* (内蒙古农业科技), 2006(6): 29

3 WANG Kai-xiong (王开雄), HE Tian-wu (何天武), LU Qin (刘琴). Metabolic and residual rule of clenbuterol hydrochloride in creatural body (盐酸克伦特罗在动物体内代谢与残留规律). *Shanghai fam Vet Com* (上海畜牧兽医通讯), 2007(4): 52

4 Popol MA, Boyer S M aciejewski P, et al Detem ination of clenbuterol in horse hair by gas chromatography - tandem mass spectrometry *Chromatogr Sup*, 2001, 53: 375

5 Hernandez- carrasquilla M. Analysis of β_2 - agonist compounds in bovine hair Evaluation of procedures for extraction of hair *Chromatogr*, 2000, 51(9/10): 601

6 Agriculture Department of PL (中华人民共和国农业部). Detem ination of residual clenbuterol in animal tissues- gas chrom atography/ mass spectrometry (动物组织中盐酸克伦特罗的测定 - 气相色谱 / 质谱法)

(本文于 2008年 6月 25日收到)

您的包...
肉眼看得见的问题 您来解决
肉眼看不见的问题 Labthink 来解决

Labthink®

愈了解, 愈信任!

历经生产、运输、仓储、上架销售等各个环节, 如果包装存在任何质量隐患, 都可能导致产品出现霉变、潮解、破损、保质期缩短等严重问题。Labthink 兰光——包装检测国际知名品牌, 为您提供全方位包装质量与安全解决方案。

济南兰光机电技术有限公司
青岛热敏 0531-85653165
E-mail: labthink@labthink.cn
www.labthink.cn