

Research on Concentration of Clenbuterol in the Pig Urine at Different Storage Conditions*

Shufeng Wang^{1#}, Qiushi Huang¹, Enping Guan¹, Jun Chen², Qian Zhang¹, Jianguo Gao³

¹Huangdao Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao

²Longda Foodstuff Group Co., Ltd., Yantai

³Qingdao Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao

Email: #huangqiushi1002@163.com

Received: May 13th, 2013; revised: May 23rd, 2013; accepted: June 10th, 2013

Copyright © 2013 Shufeng Wang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Purpose: A study of the stability of CL in pig urine samples under different time and temperature is reported. **Method:** The piglets with were administered CL at a rate of 1.5 mg/kg of feed for 35 days. Urine samples were spiked with ractopamine at the last day of administration and immediately stored at room temperature, 4°C and frozen. CL was quantified by using UPLC-MS/MS on days 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 after sample collection. **Result:** There was no obvious change of the concentration of Clenbuterol in 7 days of changed storage conditions; however, the sense of samples at room temperature changed a lot. The changes have interference to the test. **Conclusion:** The room temperature storage is not recommended.

Keywords: Clenbuterol; Pig Urine; Storage Condition; UPLC-MS/MS

不同贮藏时间及温度下猪尿中克伦特罗残留浓度变化的研究*

王树峰^{1#}, 黄秋实¹, 管恩平¹, 陈军², 张倩¹, 高建国³

¹黄岛出入境检验检疫局, 青岛

²山东龙大集团, 烟台

³青岛出入境检验检疫局, 青岛

Email: #huangqiushi1002@163.com

收稿日期: 2013年5月13日; 修回日期: 2013年5月23日; 录用日期: 2013年6月10日

摘要: 目的: 研究猪尿液中克伦特罗浓度在不同温度下贮藏不同时间后残留浓度的变化。 **方法:** 实验猪以含 1.5 mg/kg 盐酸克伦特罗的饲料饲喂 35 天, 收集停药第 0 天的尿液在室温、冷藏和冷冻条件下立即贮藏。在贮藏的 0、1、2、3、4、5、6 d 后分别用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)对样品中的克伦特罗进行定量检测。 **结果:** 贮藏 7 天内, 室温、冷藏和冷冻三种贮藏条件对尿液中克伦特罗残留浓度没有显著影响, 但是常温贮藏样品感官变化大, 对检测有一定干扰。 **结论:** 不建议常温存放。

关键词: 克伦特罗; 猪尿; 保藏条件; 超高效液相色谱串联质谱

1. 引言

盐酸克伦特罗(Clenbuterol, CL)是一种 β -兴奋剂,

*基金项目: 国家质检总局科学研究和技术开发项目, 编号 2011IK189。

#通讯作者。

商品名称为克喘素、氨哮素等, 俗称瘦肉精。作为药物, 可以选择性作用于肾上腺 β_2 受体, 松弛气管平滑肌, 增加肺活量, 降低气道阻力, 增加支气管纤毛运动和促进痰液排除, 常用于治疗哮喘、肺气肿等呼

吸系统疾病^[1]。当使用剂量达到治疗剂量的 5~10 倍,能激动脂肪组织的 β -肾上腺素受体,改变营养物质的代谢途径,促进动物肌肉,特别是骨骼肌中蛋白质的合成,抑制脂肪的合成和积累,使生长速度加快,瘦肉相对增加^[2]。该物质在动物体内肠道吸收快,作用时间长,尤其是在动物肺脏、肝脏等器官有较高残留,人食用了含有“瘦肉精”的猪肉、内脏,轻者可使健康人肌肉发生震颤,心慌,恶心呕吐,头痛等;重者可使突然昏迷,抽搐,特别是对患有高血压、心脏病、甲亢和前列腺肥大等疾病的人危害更大,严重时能致人猝死^[3]。由于克伦特罗不属于蛋白质激素,性质稳定,加热到 172℃时才能够分解,一般加热方法不能将其破坏,因此克伦特罗具有较强的危害性。鉴于其危害性,世界各国及我国农业部早已明令禁止以能量分配为目的在动物饲养中使用盐酸克伦特罗。但是自 1998 年以来,我国相继发生至少 19 起较大规模的瘦肉精中毒事件,中毒人数达 4000 多人。2009 年,日本通报从我国出口的熟制猪、牛肉制品检出 39 批次“瘦肉精”(克伦特罗)残留,不仅造成了巨额的经济损失,也对我国的出口肉类产品质量安全声誉造成了不良影响。2011 年央视在“3·15”消费者权益日播出了一期《“健美猪”真相》的特别节目,一时间瘦肉精事件受到高度关注。在国家对“瘦肉精”严厉打击的情况下,“瘦肉精”残留导致的肉类食品安全问题仍然存在,利用快速检测方法对尿液进行检测方便、快捷、经济是目前我国畜牧兽医监管部门对克伦特罗的重要监管手段,但是尿样样品贮藏过程中其残留浓度是否随贮藏条件不同发生变化尚没有相关报道研究。

基层的畜牧兽医监管中对克伦特罗的监管最常使用尿液样本作为监控的手段,通过本实验数据所得结论,为克伦特罗的日常监管检测提供理论依据,指导对猪尿样品采样及留存过程。

目前,克伦特罗的常用检测方法有酶联免疫吸附法^[4,5]、气相色谱-质谱法^[6,7]和液相色谱-质谱法^[8,9]。酶联免疫吸附法简便、快速、成本较低,但其检测限较低,且假阳性率较高;气相色谱-质谱法具有更高的灵敏度,克伦特罗分子极性较大需衍生化,前处理环节复杂;液相色谱-质谱法有优越的分离能力和定性能力,不需衍生化,是有效和常用的分析方法之一。

2. 材料和方法

2.1. 仪器与试剂

超高效液相质谱联用仪(Agilent1290 + 6490 美国安捷伦公司);超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);低速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);食品加工机(飞利浦);真空过柱装置(安捷伦公司);电热恒温水浴锅(金坛市新航仪器厂);漩涡混和器(上海精科实业有限公司);微量移液器(100 μ L、1000 μ L);旋转蒸发仪(东京理化);Oasis MCX 阳离子交换柱。

盐酸克伦特罗标准品(Sigma);盐酸克伦特罗-D9 内标(Dr. Ehrenstorfer GmbH); β -葡萄糖醛酰酶/芳基硫酸酯酶;氯化钠(分析纯,科密欧);乙酸乙酯(分析纯,Merck);异丙醇(分析纯,科密欧);甲醇(色谱纯,Merck);甲酸(色谱纯,天津市光复精细化工研究所);乙腈(色谱纯,Merck);无水硫酸钠(分析纯,科密欧);氢氧化钠(分析纯,科密欧);氨水;高氯酸。

2.2. 标准溶液的制备

准确称取 7.54 mg 盐酸克伦特罗标准品于 100 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配置浓度为 71.6 mg/L 的储备液,于-18℃条件下贮藏。

标准工作液:取上述储备液用甲醇稀释至适当浓度的标准工作液备用。

0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液:称取 13.6 g 乙酸钠,溶解于 500 ml 水中,用适量乙酸调节 pH 至 5.2。

2.3. 阳性尿液采集

3 月龄,体重约 50 kg 的三元猪作为实验猪只,按每公斤饲料添加 1.5 mg 盐酸克伦特罗的剂量添加到饲料中,自由采食,连续饲喂 35 天后,换无盐酸克伦特罗的普通饲料喂养。

分别取五只实验猪只停药第 0 天的尿样,按常温(25℃~28℃)、冷藏(0℃~4℃)、冷冻(-10℃)三种储存条件分别储存 7 天,每天检测各储存条件下尿样中克伦特罗的残留浓度。

2.4. 样品前处理

采用 GB/T 22286-2008 进行检测。

2.4.1. 提取

用移液器移取 1.0 ml 尿液于 50 ml 离心管中,加

入 8 ml pH 5.2 的乙酸钠缓冲液,充分混匀,再加 50 μ L β -葡萄糖醛酐酶/芳基硫酸酯酶,混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴水解 12 h。

加入 0.5 ml 克伦特罗-D9 浓度为 100 μ g/L 的工作液,加盖涡旋混合 15 min,离心 10 min (5000 r/min),取 4 ml 上清液加入 0.1 mol/L 高氯酸溶液 5 ml,混匀,用高氯酸调节 pH 值到 1 ± 0.2 ,5000 r/min 离心 10 min 后,上清液全部转移至另一 50 ml 离心管中,用 10 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 值到 11,加入 10 ml 饱和氯化钠溶液和 10 ml 异丙醇-乙酸乙酯(6+4)混合溶液,充分提取,5000 r/min 离心 10 min。

转移全部有机相,在 40 $^{\circ}$ C 下减压浓缩干燥。加入 5 mL 乙酸钠缓冲液,超声混匀,使残渣充分溶解后备用。

2.4.2. 净化

将上述残渣溶液过预先用 3 ml 甲醇、3 ml 水活化的 MCX 柱,然后依次用 2 mL 水、2 mL 2% 甲酸水溶液和 2 mL 甲醇洗涤柱子并彻底抽干,最后用 2 mL 的 5% 氨水甲醇溶液洗脱柱子上的待测成分,流速控制在 0.5 mL/min。洗脱液在 40 $^{\circ}$ C 水浴下氮气吹干。加入 10 ml 定容液振荡溶解残渣后,取其中 2.0 ml 转移到离心管中,15000 r/min 离心 10 min,取 1 ml 上清液过滤膜上机。

2.5. 色谱质谱条件

色谱条件: ACQUITYUPLC HSS T3 色谱柱(2.1 \times 100 mm \times 1.8 μ m);流速为 0.4 mL/min;进样量为 2 μ L;柱温: 30 $^{\circ}$ C;流动相 A 为甲醇, B 为 0.1% 甲酸(含 5 mmol/L 乙酸铵),梯度洗脱,洗脱程序见表 1。

质谱条件: 干燥气温度为 220 $^{\circ}$ C;干燥气流速为 15 L/min;雾化气压力为 20 psi;脱溶剂气温度为 350 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流速为 12 L/min;毛细管电压为 2200 V;扫描模式为 MRM。

3. 结果与讨论

3.1. 质谱分析条件的优化

根据 CL 的结构特征,选择 ESI (+)作为电离模式,根据一级质谱全扫描(full scan),确定准分子离子并优化其去簇电压,以其准分子离子为母离子,通过氦气碰撞产生碎片离子进行二级质谱扫描(daughter scan),

Table 1. MS gradient program for the analysis
表 1. 梯度洗脱程序

时间(min)	流速(mL)	A (%)	B (%)
0	0.25	90	10
1.00	0.25	90	10
3.00	0.25	30	70
4.00	0.25	10	90
4.50	0.25	10	90
5.00	0.25	90	10

选择丰度较高的离子作为特征离子同时优化碰撞能量,最大程度提高了检测的灵敏度。选取的离子对数符合欧盟 2002/657/EC 决议对兽药残留物质谱确证分析的方法学的要求(Identification Points \geq 4)。内标的特征离子及优化的质谱分析参数见表 2。

准确的定性分析需结合 CL 的保留时间和一级、二级质谱信息。方法定量选用丰度最高的子离子作为定量离子,同位素标记内标法定量,CL 及内标定量离子流图见图 1、图 2、图 3。

3.2. 阳性尿样 UPLC-MS/MS 检测结果

阳性样品的实测样结果如表 3 所示,本实验的连续测定 7 天的批间变异系数仅为 3%~4%。

3.3. 讨论

Shelner^[10]报道,生物基质会加速转化药物转化成代谢物,从而影响检测结果。赖卫华等^[11]报道兽药残留浓度会受贮藏条件的影响。本实验以 UPLC-MS/MS 为检测方法,研究不同贮藏温度下,不同贮藏时间对尿样中克伦特罗浓度的影响。基层的畜牧兽医监管中对克伦特罗的监管最常使用尿液样本作为监控手段,通过本实验数据所得结论,为克伦特罗的日常监管检测提供理论依据,指导对猪尿样品采样及留存过程。

为保证阳性样品的准确定量,本研究采用了国标的方法对样品进行前处理和定量检测,液相色谱-质谱法有优越的分离能力和定性能力,不需衍生化,是有效和可靠的分析方法。

在贮藏期间,冷冻猪尿样状态无明显感官变化,颜色气味基本与新鲜猪尿一致;冷藏猪尿样感官检验颜色稍稍有些变深,气味也略有增加;常温猪尿样感官变化最为明显,颜色变为棕褐色,气味刺鼻难闻,

Table 2. MS/MS conditions and optimized MS parameters for CL and internal standard
表 2. 克伦特罗及克伦特罗内标的质谱参数

化合物	保留时间 (/min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
克伦特罗	5.03	277	203*	22	17
		277	168	22	24
克伦特罗内标	5.01	286	204*	22	17

*定量离子。

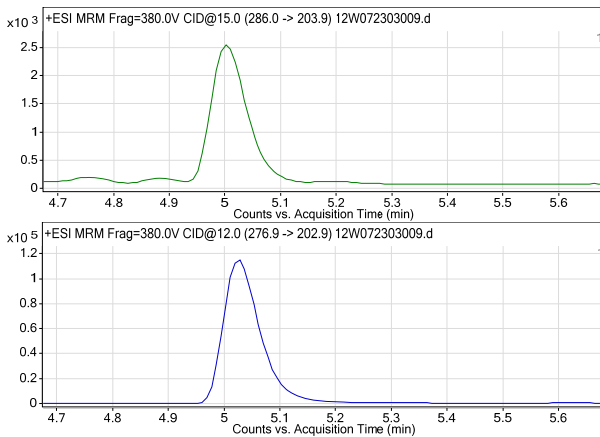


Figure 1. Quantitative ion current chromatograms of CL in the pig urine at room temperature and the internal standard
图 1. 室温贮藏尿液中 CL 及内标定量离子流图

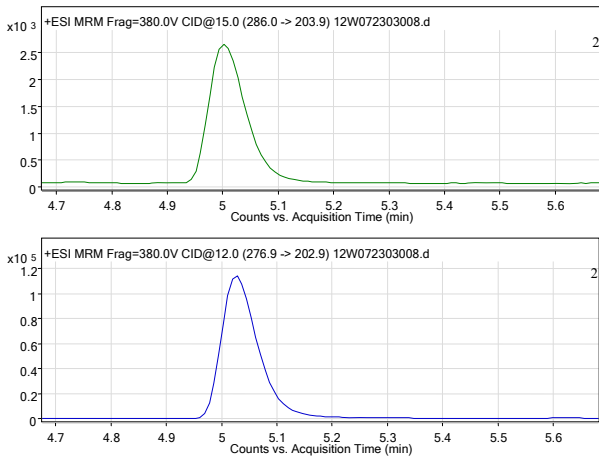


Figure 2. Quantitative ion current chromatograms of CL in the pig urine at 4°C temperature and the internal standard
图 2. 冷藏贮藏尿液中 CL 及内标定量离子流图

对检测有一定的干扰，不建议将待检样品常温存放。

根据农业部 2003 年 1 号文件《兽药残留试验技术规范(试行)》要求，药物不同添加浓度回收率和精密密度要求见表 4，残留药物浓度在 0.1 mg/kg 变异应满足小于 26%，而本实验的连续测定 7 天的批间变异系

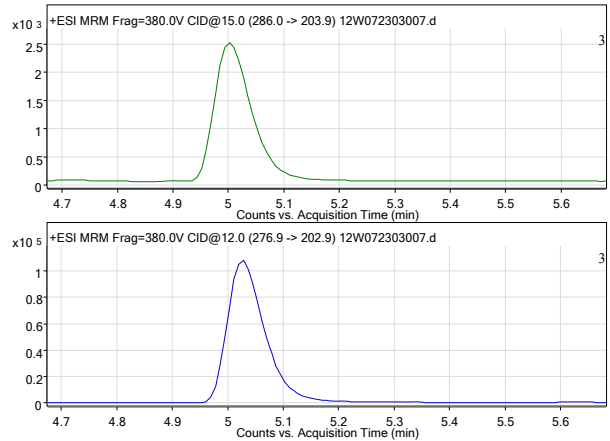


Figure 3. Quantitative ion current chromatograms of CL in the pig urine at frozen and the internal standard
图 3. 冷冻贮藏尿液中 CL 及内标定量离子流图

Table 3. Change of concentration of CL when positive samples are stored at room temperature, 4°C and frozen (ng/mL⁻¹)
表 3. 不同存放条件猪尿中克伦特罗的含量

保存条件	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	变异系数
常温	219.97	203.38	211.29	208.68	212.83	220.52	219.61	3.07%
冷藏	210.17	200.78	195.98	196.40	215.25	211.15	209.24	3.76%
冷冻	209.95	197.37	197.69	201.92	212.49	202.48	210.79	3.10%

Table 4. The range of precision
表 4. 不同待测物浓度的精密密度要求

待测物浓度(mg/kg)	批内变异系数(CV%)	批间变异系数(CV%)
100	1.5	2.3
10	7	11
1	11	16
0.1	17	26
0.01	21	32
0.001	30	45
0.0001	43	64

数仅为 3%~4%。远远小于 26%，所以认为温度和贮藏时间对残留浓度不构成影响，即不同的保存条件下，猪尿液中克伦特罗浓度残留浓度无变化。

参考文献 (References)

- [1] 徐国茂, 胡翊炜, 王琤, 韦华. 盐酸克伦特罗检测中存在的问题[J]. 广东饲料, 2007, 16(3): 37-38.
- [2] 杨浩峰, 严蕾. 盐酸克伦特罗的药理作用、危害及检测[J]. 地方病通报, 2006, 21(1): 101-104.

- [3] 黄永生, 廖细军. 浅谈“瘦肉精”的危害与防治[J]. 肉类工业, 2002, 9(257): 30-31.
- [4] G. Degand, A. Bernes-Duyckaerts. Determination of pagonists in urine by an enzyme immunoassay based on the use of an anti-salbutamol antiserum. *Analytica Chimica Acta*, 1993, 275: 241-247.
- [5] C. Y. Elliott, W. J. Mccaughey and H. D. Shortt. Residues of the Beta—Agonist clenbuterol in tissues of medicated farm animals. *Food Additives and Contaminants*, 1993, 10(2): 231-244.
- [6] 许国旺. 现代实用气相色谱法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004, 290-301.
- [7] 吴宁鹏, 班付国, 周红霞等. 浅谈气质联用测定盐酸克伦特罗[J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(10): 72.
- [8] M. W. F. Nielen, J. J. P. Las aroms and M. L. Essers. Multiesidue an alysis of bet agonist s in bovine and porcine urine, feed and hair using liquid chromatograph y elect rosprayionisat ion t and emmass spectrometry. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391: 199-210.
- [9] 凌文婷, 刘畅, 徐伟东. 毛发中克仑特罗的液相微萃取 LC-MS/MS 检测[J]. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(7): 521-523.
- [10] W. L. Shelver, D. J. Smith. Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ractopamine in incurred samples from food animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 2742-2747.
- [11] 赖卫华, 张国华, 徐国茂. 不同贮藏时间及温度下莱克多巴胺浓度变化的研究[J]. *食品与机械*, 2009, 25(6): 99-101.