

中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.192—2003

动物性食品中克伦特罗残留量的测定

Determination of 4-amino-3,5-dichloro- α
[(tert-butylamino) methyl]-benzyl alcohol
(clenbuterol) residues in animal foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准修改采用了 EUR 15127-EN《兽药残留,动物性食品及制品——参考物质和分析方法,2nd Ed,Sg2.1、Cg2.3、Sg 2.4 和 Cy2.3 欧盟兽药残留方法:动物性食品中兽药残留的测定方法》(1994 年英文第二版)。

本标准与欧盟《动物性食品中兽药残留的测定方法》Sg2.1、Sg2.3、Sg 2.4 和 Cy2.3 不同之处为:

——Sg2.1、Sg2.3、Sg 2.4 和 Cy2.3 为动物性食品中 β -兴奋剂的多组分残留检测方法。

本标准仅提出动物性食品中克伦特罗单一组分残留的检测方法。

——Sg2.1 为牛尿液中 β -兴奋剂的 GC-MS 筛选方法,Sg2.3 为牛尿液中 β -兴奋剂的 ELISA 筛选方法,Sg 2.4 为牛肝、肾和肉中 β -兴奋剂的 GC-MS 筛选方法,Cy2.3 为牛尿液中 β -兴奋剂的 GC-MS 确证方法。本标准则提出从酶联免疫法(ELISA)筛选、高效液相色谱法(HPLC)定量到气质联机法(GC-MS)确证和定量的一套方法,以满足我国动物性食品中克伦特罗残留监控的需要。

——本标准中酶联免疫法(ELISA)筛选和气质联机法(GC-MS)的测定原理、操作过程和要求、主要技术参数及检测灵敏度与欧盟方法一致。本标准中的高效液相色谱法(HPLC)是根据实验资料及验证结果提出的。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位:中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所、中国肉类食品综合研究中心、北京市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:吴永宁、苗虹、赵云峰、赵京玲、赵榕、吴国华、王凌琰。

引 言

克伦特罗,为强效选择性 β_2 -受体激动剂,有强而持久的松弛支气管平滑肌的作用,用于治疗哮喘。克伦特罗可促进动物生长,改善动物体内脂肪分配,并增加瘦肉率。20 世纪 90 年代,我国错误地将其作为科研成果开始以饲料添加剂引入并推广,被俗称为“瘦肉精”。一连串因食用含克伦特罗的食物而引起的中毒事件发生后,使克伦特罗成了世界上普遍禁用的饲料添加剂。1997 年以来,我国有关部门多次明令禁止畜牧行业生产、销售和使用盐酸克伦特罗。但我国各地克伦特罗中毒事件仍然频繁发生,说明非法使用克伦特罗现象依然存在。为了对畜禽产品中的克伦特罗开展监测,加强市场监督检查力度,预防中毒事件的发生,必须建立有效的检测方法。

我国在这方面的检测工作起步较晚,伴随着国际和国内对克伦特罗的禁用和监控要求,迫切需要发展适合我国国情的从筛选到确证的一套检测方法。为此,本标准提出了从酶联免疫法(ELISA)筛选、高效液相色谱法(HPLC)定量到气质联机法(GC-MS)确证和定量这一套方法来满足我国动物性食品中克伦特罗残留监控的需要。

动物性食品中克伦特罗残留量的测定

1 范围

本标准规定了动物性食品中克伦特罗的测定方法。

本标准适用于新鲜或冷冻的畜、禽肉与内脏及其制品中克伦特罗残留的测定。

本标准也适用于生物材料(人或动物血液、尿液)中克伦特罗的测定。

本方法检出限:第一法气相色谱-质谱法为 $0.5 \mu\text{g/kg}$;第二法高效液相色谱法为 $0.5 \mu\text{g/kg}$;第三法酶联免疫法为 $0.5 \mu\text{g/kg}$ 。线性范围:第一法气相色谱-质谱法为 $0.025 \text{ ng} \sim 2.5 \text{ ng}$;第二法高效液相色谱法为 $0.5 \text{ ng} \sim 4 \text{ ng}$;第三法酶联免疫法为 $0.004 \text{ ng} \sim 0.054 \text{ ng}$ 。

第一法 气相色谱-质谱法(GC-MS)

2 原理

固体试样剪碎,用高氯酸溶液匀浆。液体试样加入高氯酸溶液,进行超声加热提取,用异丙醇+乙酸乙酯(40+60)萃取,有机相浓缩,经弱阳离子交换柱进行分离,用乙醇+浓氨水(98+2)溶液洗脱,洗脱液浓缩,经 N,O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)衍生后于气质联用仪上进行测定。以美托洛尔为内标,定量。

3 试剂

- 3.1 克伦特罗(clenbuterol hydrochloride),纯度 $\geq 99.5\%$ 。
- 3.2 美托洛尔(metoprolol),纯度 $\geq 99\%$ 。
- 3.3 磷酸二氢钠。
- 3.4 氢氧化钠。
- 3.5 氯化钠。
- 3.6 高氯酸。
- 3.7 浓氨水。
- 3.8 异丙醇。
- 3.9 乙酸乙酯。
- 3.10 甲醇:HPLC级。
- 3.11 甲苯:色谱纯。
- 3.12 乙醇。
- 3.13 衍生剂:N,O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)。
- 3.14 高氯酸溶液(0.1 mol/L)。
- 3.15 氢氧化钠溶液(1 mol/L)。
- 3.16 磷酸二氢钠缓冲液(0.1 mol/L , $\text{pH}=6.0$)。
- 3.17 异丙醇+乙酸乙酯(40+60)。
- 3.18 乙醇+浓氨水(98+2)。
- 3.19 美托洛尔内标标准溶液:准确称取美托洛尔标准品,用甲醇溶解配成浓度为 240 mg/L 的内标储备液,贮于冰箱中,使用时用甲醇稀释成 2.4 mg/L 的内标使用液。
- 3.20 克伦特罗标准溶液:准确称取克伦特罗标准品,用甲醇溶解配成浓度为 250 mg/L 的标准储备液,贮于冰箱中,使用时用甲醇稀释成 0.5 mg/L 的克伦特罗标准使用液。

3.21 弱阳离子交换柱(LC-WCX)(3 mL)。

3.22 针筒式微孔过滤膜(0.45 μm ,水相)。

4 仪器

4.1 气相色谱-质谱联用仪(GC/MS)。

4.2 磨口玻璃离心管:11.5 cm(长) \times 3.5 cm(内径),具塞。

4.3 5 mL 玻璃离心管。

4.4 超声波清洗器。

4.5 酸度计。

4.6 离心机。

4.7 振荡器。

4.8 旋转蒸发器。

4.9 涡漩式混合器。

4.10 恒温加热器。

4.11 N_2 -蒸发器。

4.12 匀浆器。

5 分析步骤

5.1 提取

5.1.1 肌肉、肝脏、肾脏试样

称取肌肉、肝脏或肾脏试样 10 g(精确到 0.01 g),用 20 mL 0.1 mol/L 高氯酸溶液匀浆,置于磨口玻璃离心管中;然后置于超声波清洗器中超声 20 min,取出置于 80℃ 水浴中加热 30 min。取出冷却后离心(4 500 r/min) 15 min。倾出上清液,沉淀用 5 mL 0.1 mol/L 高氯酸溶液洗涤,再离心,将两次的上清液合并。用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 9.5 ± 0.1 ,若有沉淀产生,再离心(4 500 r/min) 10 min,将上清液转移至磨口玻璃离心管中,加入 8 g 氯化钠,混匀,加入 25 mL 异丙醇+乙酸乙酯(40+60),置于振荡器上振荡提取 20 min。提取完毕,放置 5 min(若有乳化层稍离心一下)。用吸管小心将上层有机相移至旋转蒸发瓶中,用 20 mL 异丙醇+乙酸乙酯(40+60)再重复萃取一次,合并有机相,于 60℃ 在旋转蒸发器上浓缩至近干。用 1 mL 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(pH6.0)充分溶解残留物,经针筒式微孔过滤膜过滤,洗涤三次后完全转移至 5 mL 玻璃离心管中,并用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(pH6.0)定容至刻度。

5.1.2 尿液试样

用移液管量取尿液 5 mL,加入 20 mL 0.1 mol/L 高氯酸溶液,超声 20 min 混匀。置于 80℃ 水浴中加热 30 min。以下按 5.1.1 从“用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 9.5 ± 0.1 ”起开始操作。

5.1.3 血液试样

将血液于 4 500 r/min 离心,用移液管量取上层血清 1 mL 置于 5 mL 玻璃离心管中,加入 2 mL 0.1 mol/L 高氯酸溶液,混匀,置于超声波清洗器中超声 20 min,取出置于 80℃ 水浴中加热 30 min。取出冷却后离心(4 500 r/min) 15 min。倾出上清液,沉淀用 1 mL 0.1 mol/L 高氯酸溶液洗涤,离心(4 500 r/min) 10 min,合并上清液,再重复一遍洗涤步骤,合并上清液。向上清液中加入约 1 g 氯化钠,加入 2 mL 异丙醇+乙酸乙酯(40+60),在涡漩式混合器上振荡萃取 5 min,放置 5 min(若有乳化层稍离心一下),小心移出有机相于 5 mL 玻璃离心管中,按以上萃取步骤重复萃取两次,合并有机相。将有机相在 N_2 -浓缩器上吹干。用 1 mL 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(pH6.0)充分溶解残留物,经筒式微孔过滤膜过滤完全转移至 5 mL 玻璃离心管中,并用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(pH6.0)定容至刻度。

5.2 净化

依次用 10 mL 乙醇、3 mL 水、3 mL 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(pH6.0),3 mL 水冲洗弱阳离子交换柱,取适量 5.1.1、5.1.2 和 5.1.3 的提取液至弱阳离子交换柱上,弃去流出液,分别用 4 mL 水和

4 mL乙醇冲洗柱子,弃去流出液,用6 mL乙醇+浓氨水(98+2)冲洗柱子,收集流出液。将流出液在 N_2 -蒸发器上浓缩至干。

5.3 衍生化

于净化、吹干的试样残渣中加入100 μ L~500 μ L甲醇,50 μ L 2.4 mg/L的内标工作液,在 N_2 -蒸发器上浓缩至干,迅速加入40 μ L衍生剂(BSTFA),盖紧塞子,在涡漩式混合器上混匀1 min,置于75℃的恒温加热器中衍生90 min。衍生反应完成后取出冷却至室温,在涡漩式混合器上混匀30 s,置于 N_2 -蒸发器上浓缩至干。加入200 μ L甲苯,在涡漩式混合器上充分混匀,待气质联用仪进样。同时用克伦特罗标准使用液做系列同步衍生。

5.4 气相色谱-质谱法测定

5.4.1 气相色谱-质谱法测定参数设定

气相色谱柱:DB-5MS柱,30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m。

载气:He,柱前压:8 psi。

进样口温度:240℃。

进样量:1 μ L,不分流。

柱温程序:70℃保持1 min,以18℃/min速度升至200℃,以5℃/min的速度再升至245℃,再以25℃/min升至280℃并保持2 min。

EI源

电子轰击能:70 eV。

离子源温度:200℃。

接口温度:285℃。

溶剂延迟:12 min。

EI源检测特征质谱峰:克伦特罗: m/z 86、187、243、262;美托洛尔: m/z 72、223。

5.4.2 测定

吸取1 μ L衍生的试样液或标准液注入气质联用仪中,以试样峰(m/z 86,187,243,262,264,277,333)与内标峰(m/z 72,223)的相对保留时间定性,要求试样峰中至少有3对选择离子相对强度(与基峰的比例)不超过标准相应选择离子相对强度平均值的 $\pm 20\%$ 或3倍标准差。以试样峰(m/z 86)与内标峰(m/z 72)的峰面积比单点或多点校准定量。

5.4.3 克伦特罗标准与内标衍生后的选择性离子的总离子流图及质谱图

见图1~图3。

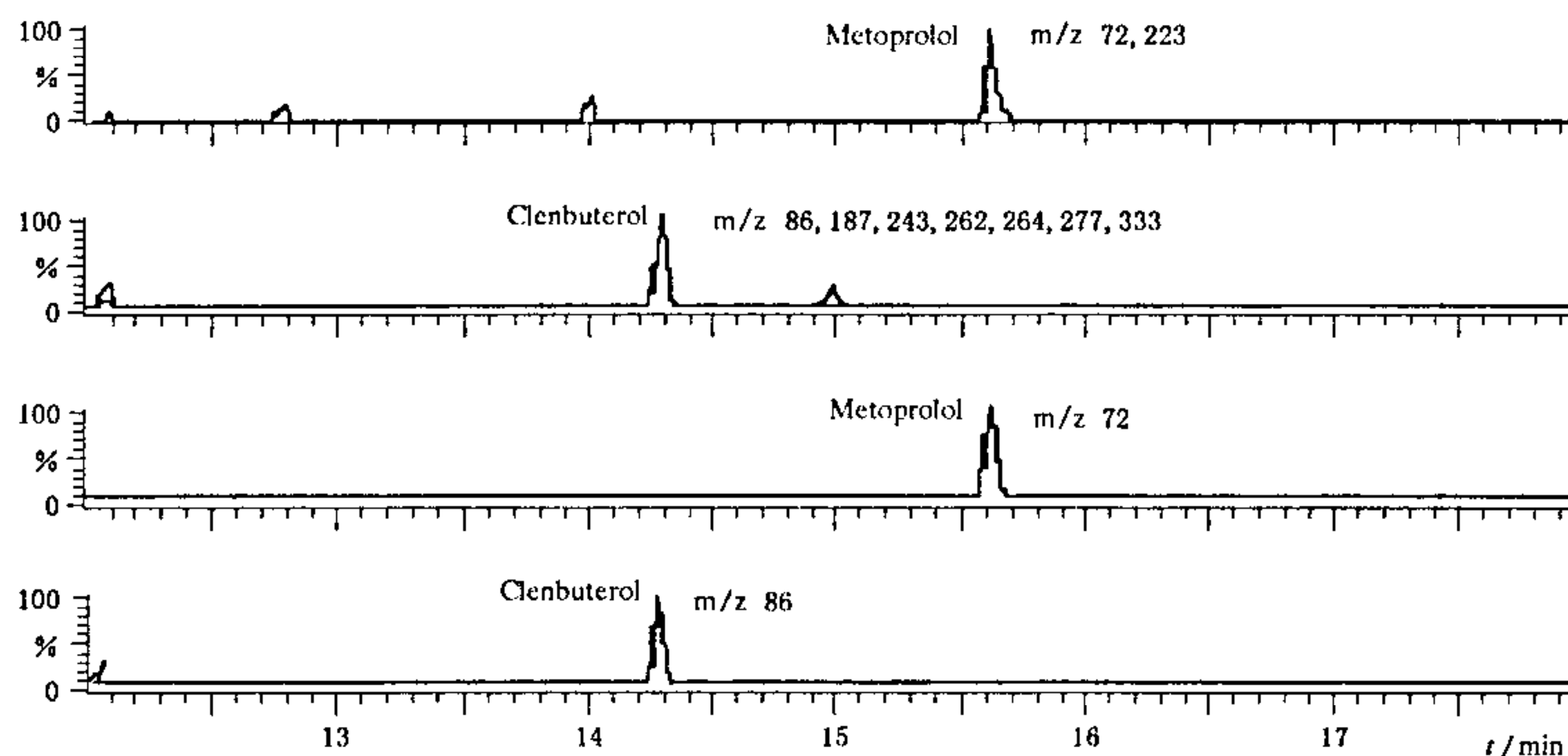


图1 克伦特罗与内标衍生物的选择性离子总离子流图

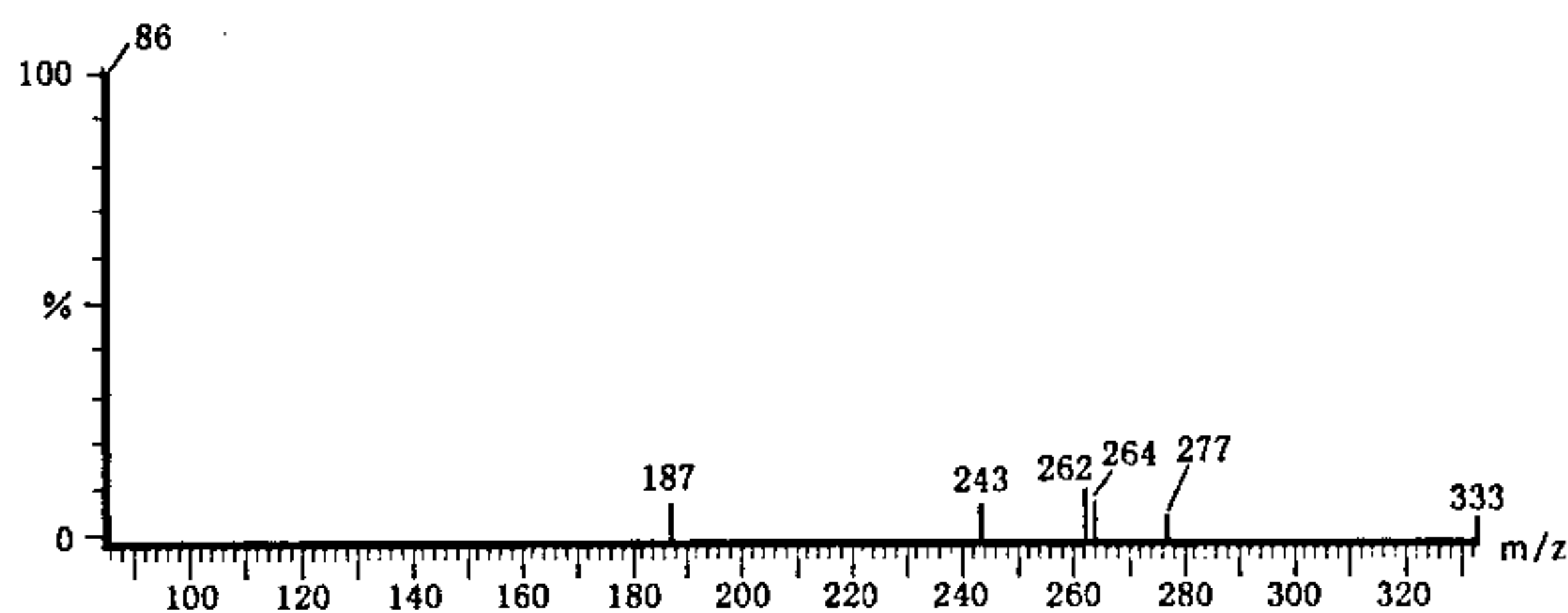


图 2 克伦特罗衍生物的选择离子质谱图

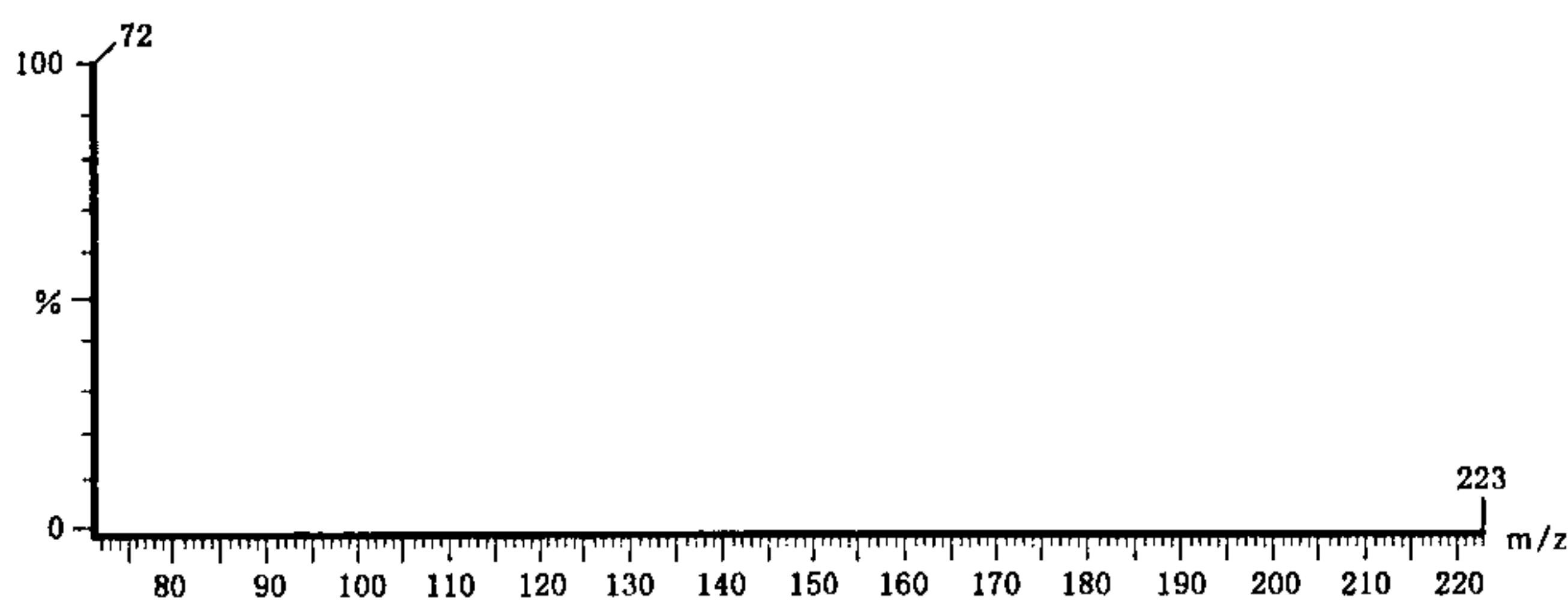


图 3 内标衍生物的选择离子质谱图

5.5 结果计算

按内标法单点或多点校准计算试样中克伦特罗的含量。

见式(1)：

$$X = \frac{A \times f}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X——试样中克伦特罗的含量,单位为微克每千克(或微克每升)[μg/kg(或 μg/L)]；
- A——试样色谱峰与内标色谱峰的峰面积比值对应的克伦特罗质量,单位为纳克(ng)；
- f——试样稀释倍数；
- m——试样的取样量,单位为克(或毫升)[g(或 mL)]。

计算结果表示到小数点后两位。

6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

第二法 高效液相色谱法(HPLC)

7 原理

固体试样剪碎,用高氯酸溶液匀浆,液体试样加入高氯酸溶液,进行超声加热提取后,用异丙醇+乙酸乙酯(40+60)萃取,有机相浓缩,经弱阳离子交换柱进行分离,用乙醇+氨(98+2)溶液洗脱,洗脱液经浓缩,流动相定容后在高效液相色谱仪上进行测定,外标法定量。

8 试剂与材料

- 8.1 克伦特罗(clenbuterol hydrochloride),纯度 $\geq 99.5\%$ 。
- 8.2 磷酸二氢钠。
- 8.3 氢氧化钠。
- 8.4 氯化钠。
- 8.5 高氯酸。
- 8.6 浓氨水。
- 8.7 异丙醇。
- 8.8 乙酸乙酯。
- 8.9 甲醇:HPLC级。
- 8.10 乙醇。
- 8.11 高氯酸溶液(0.1 mol/L)。
- 8.12 氢氧化钠溶液(1 mol/L)。
- 8.13 磷酸二氢钠缓冲液(0.1 mol/L, pH=6.0)。
- 8.14 异丙醇+乙酸乙酯(40+60)。
- 8.15 乙醇+浓氨水(98+2)。
- 8.16 甲醇+水(45+55)。
- 8.17 克伦特罗标准溶液的配制:准确称取克伦特罗标准品用甲醇配成浓度为 250 mg/L 的标准储备液,贮于冰箱中;使用时用甲醇稀释成 0.5 mg/L 的克伦特罗标准使用液,进一步用甲醇+水(45+55)适当稀释。
- 8.18 弱阳离子交换柱(LC-WCX)(3 mL)。

9 仪器

- 9.1 水浴超声清洗器。
- 9.2 磨口玻璃离心管:11.5 cm(长) \times 3.5 cm(内径),具塞。
- 9.3 5 mL 玻璃离心管。
- 9.4 酸度计。
- 9.5 离心机。
- 9.6 振荡器。
- 9.7 旋转蒸发器。
- 9.8 涡漩式混合器。
- 9.9 针筒式微孔过滤膜(0.45 μ m,水相)。
- 9.10 N_2 -蒸发器。
- 9.11 匀浆器。
- 9.12 高效液相色谱仪。

10 分析步骤

10.1 提取

- 10.1.1 肌肉、肝脏、肾脏试样
同 5.1.1。

- 10.1.2 尿液试样
同 5.1.2。

10.1.3 血液试样

同 5.1.3。

10.2 净化

同 5.2。

10.3 试样测定前的准备

于净化、吹干的试样残渣中加入 100 μL~500 μL 流动相,在涡漩式混合器上充分振摇,使残渣溶解,液体浑浊时用 0.45 μm 的针筒式微孔过滤膜过滤,上清液待进行液相色谱测定。

10.4 测定

10.4.1 液相色谱测定参考条件

- 色谱柱:BDS 或 ODS 柱,250 mm×4.6 mm,5 μm。
- 流动相:甲醇+水(45+55)。
- 流速:1 mL/min。
- 进样量:20 μL~50 μL。
- 柱箱温度:25℃。
- 紫外检测器:244 nm。

10.4.2 测定

吸取 20 μL~50 μL 标准校正溶液及试样液注入液相色谱仪,以保留时间定性,用外标法单点或多点校准法定量。

10.4.3 克伦特罗标准的液相色谱图

见图 4。

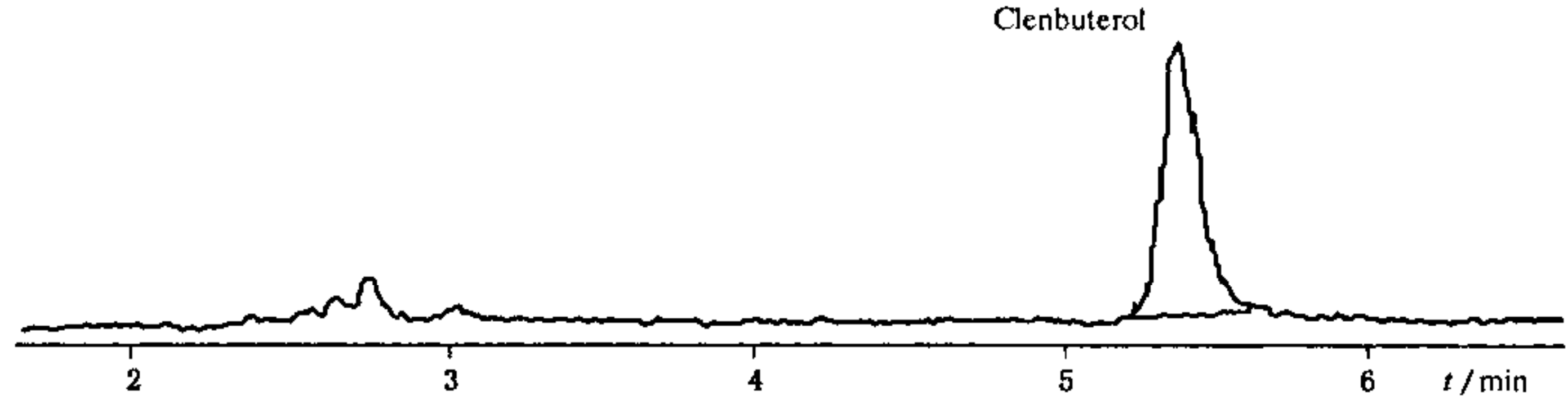


图 4 克伦特罗标准(100 μg/L)的高效液相色谱图

10.5 结果计算

按外标法计算试样中克伦特罗的含量。
见式(2):

$$X = \frac{A \times f}{m} \dots\dots\dots (2)$$

- 式中:
- X——试样中克伦特罗的含量,单位为微克每千克(或微克每升)[μg/kg(或 μg/L)];
 - A——试样色谱峰与标准色谱峰的峰面积比值对应的克伦特罗的质量,单位为纳克(ng);
 - f——试样稀释倍数;
 - m——试样的取样量,单位为克(或毫升)[g(或 mL)]。
- 计算结果表示到小数点后两位。

11 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

第三法 酶联免疫法(ELISA 筛选法)

12 原理

基于抗原抗体反应进行竞争性抑制测定。微孔板包被有针对克伦特罗 IgG 的包被抗体。克伦特罗抗体被加入,经过孵育及洗涤步骤后,加入竞争性酶标记物、标准或试样溶液。克伦特罗与竞争性酶标记物竞争克伦特罗抗体,没有与抗体连接的克伦特罗标记酶在洗涤步骤中被除去。将底物(过氧化尿素)和发色剂(四甲基联苯胺)加入到孔中孵育,结合的标记酶将无色的发色剂转化为蓝色的产物。加入反应停止液后使颜色由蓝转变为黄色。在 450 nm 处测量吸光度值,吸光度比值与克伦特罗浓度的自然对数成反比。

13 试剂

- 13.1 磷酸二氢钠。
- 13.2 高氯酸。
- 13.3 异丙醇。
- 13.4 乙酸乙酯。
- 13.5 高氯酸溶液(0.1 mol/L)。
- 13.6 氢氧化钠溶液(1 mol/L)。
- 13.7 磷酸二氢钠缓冲液(0.1 mol/L, pH=6.0)。
- 13.8 异丙醇+乙酸乙酯(40+60)。
- 13.9 针筒式微孔过滤膜(0.45 μm , 水相)。
- 13.10 克伦特罗酶联免疫试剂盒。
 - 13.10.1 96 孔板(12 条 \times 8 孔)包被有针对克伦特罗 IgG 的包被抗抗体。
 - 13.10.2 克伦特罗系列标准液(至少有 5 个倍比稀释浓度水平,外加 1 个空白)。
 - 13.10.3 过氧化物酶标记物(浓缩液)。
 - 13.10.4 克伦特罗抗体(浓缩液)。
 - 13.10.5 酶底物:过氧化尿素。
 - 13.10.6 发色剂:四甲基联苯胺。
 - 13.10.7 反应停止液:1 mol/L 硫酸。
 - 13.10.8 缓冲液:酶标记物及抗体浓缩液稀释用。

14 仪器

- 14.1 超声波清洗器。
- 14.2 磨口玻璃离心管:11.5 cm(长) \times 3.5 cm(内径),具塞。
- 14.3 酸度计。
- 14.4 离心机。
- 14.5 振荡器。
- 14.6 旋转蒸发器。
- 14.7 涡漩式混合器。
- 14.8 匀浆器。
- 14.9 酶标仪(配备 450 nm 滤光片)。
- 14.10 微量移液器:单道 20 μL 、50 μL 、100 μL 和多道 50 μL ~250 μL 可调。

15 试样测定

15.1 提取

15.1.1 肌肉、肝脏及肾脏试样

同 5.1.1。

15.1.2 尿液试样

若尿液浑浊先离心(3 000 r/min)10 min,将上清液适当稀释后上酶标板进行酶联免疫法筛选实验。

15.1.3 血液试样

将血清或血浆离心(3 000 r/min)10 min,取血清适当稀释后上酶标板进行酶联免疫法筛选实验。

15.2 测定

15.2.1 试剂的准备

15.2.1.1 竞争酶标记物

提供的竞争酶标记物为浓缩液。由于稀释的酶标记物稳定性不好,仅稀释实际需用量的酶标记物。在吸取浓缩液之前,要仔细振摇。用缓冲液以 1:10 的比例稀释酶标记物浓缩液(如 400 μ L 浓缩液+4.0 mL 缓冲液,足够 4 个微孔板条 32 孔用)。

15.2.1.2 克伦特罗抗体

提供的克伦特罗抗体为浓缩液,由于稀释的克伦特罗抗体稳定性变差,仅稀释实际需用量的克伦特罗抗体。在吸取浓缩液之前,要仔细振摇。用缓冲液以 1:10 的比例稀释抗体浓缩液(如 400 μ L 浓缩液+4.0 mL 缓冲液,足够 4 个微孔板条 32 孔用)。

15.2.1.3 包被有抗抗体的微孔板条

将锡箔袋沿横向边压皱外沿剪开,取出需用数量的微孔板及框架,将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于 2℃~8℃。

15.2.2 试样准备

将 10.1 的提取物取 20 μ L 进行分析。高残留的试样用蒸馏水进一步稀释。

15.2.3 测定

使用前将试剂盒在室温(19℃~25℃)下放置 1 h~2 h。

15.2.3.1 将标准和试样(至少按双平行实验计算)所用数量的孔条插入微孔架,记录标准和试样的位置。

15.2.3.2 加入 100 μ L 稀释后的抗体溶液到每一个微孔中。充分混合并在室温孵育 15 min。

15.2.3.3 倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每行拍打 3 次)以保证完全除去孔中的液体。用 250 μ L 蒸馏水充入孔中,再次倒掉微孔中液体,再重复操作两遍以上。

15.2.3.4 加入 20 μ L 的标准或处理好的试样到各自的微孔中。标准和试样至少做两个平行实验。

15.2.3.5 加入 100 μ L 稀释的酶标记物,室温孵育 30 min。

15.2.3.6 倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每行拍打 3 次)以保证完全除去孔中的液体。用 250 μ L 蒸馏水充入孔中,再次倒掉微孔中液体,再重复操作两次以上。

15.2.3.7 加入 50 μ L 酶底物和 50 μ L 发色试剂到微孔中,充分混合并在室温暗处孵育 15 min。

15.2.3.8 加入 100 μ L 反应停止液到微孔中。混合好尽快在 450 nm 波长处测量吸光度值。

15.3 结果计算

用所获得的标准溶液和试样溶液吸光度值与空白溶液的比值进行计算。见式(3):

$$\text{相对吸光度值(\%)} = B/B_0 \times 100 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

B ——标准(或试样)溶液的吸光度值;

B_0 ——空白(浓度为 0 的标准溶液)的吸光度值。

将计算的相对吸光度值(%)对应克伦特罗浓度(ng/L)的自然对数作半对数坐标系统曲线图,校正曲线在 0.004 ng~0.054 ng(200 ng/L~2 000 ng/L 范围内)呈线性,对应的试样浓度可从校正曲线算出。

见式(4):

$$X = \frac{A \times f}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- X——试样中克伦特罗的含量,单位为微克每千克(或微克每升)[μg/kg(或 μg/L)];
- A——试样的相对吸光度值(%)对应的克伦特罗含量,单位为纳克每升(ng/L);
- f——试样稀释倍数;
- m——试样的取样量,单位为克(或毫升)[g(或 mL)]。

计算结果表示到小数点后两位。阳性结果需要经过第一法确证。

16 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。
