

饲料中盐酸克伦特罗、沙丁胺醇 高效液相色谱测定

戴 华, 袁智能, 黄志强, 陈新焕

(湖南出入境检验检疫局 技术中心, 湖南 长沙 410007)

摘 要: 建立了用液相色谱法同时测定饲料中违禁药物盐酸克伦特罗、沙丁胺醇含量的方法; 样品经甲醇-盐酸溶液提取后, 经液-液萃取、固相萃取小柱净化, 用 Zorbax CN 柱分离, 二极管阵列检测器检测、外标法定量; 盐酸克伦特罗、沙丁胺醇的定量下限 (w) 分别为 0.10×10^{-6} 、 0.36×10^{-6} , 回收率分别大于 88% 和 74%, RSD ($n=5$) 分别小于 6.4% 和 3.0%。

关键词: 盐酸克伦特罗; 沙丁胺醇; 饲料; 高效液相色谱

中图分类号: O657.72 S816.73 S859.793 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2003)03-0057-03

盐酸克伦特罗 (clenbuterol hydrochloride) 又称咳喘素, 也称瘦肉精; 沙丁胺醇 (salbutamol) 又称舒喘宁, 是两种 β_2 -肾上腺素能兴奋剂, 其作用机理和肾上腺素相同。当它们用于家畜饲养超过治疗剂量几倍时, 可以产生瘦肉含量更高的酮体, 加快肉用家畜的生长速度。自 1990 年欧洲发生了食用残留 β_2 -兴奋剂的牛肝引起的食物中毒事件后, 欧盟颁布了法规禁止 β_2 -兴奋剂作为生长促进剂使用^[1]。我国农业部已明令禁止在猪饲料中使用沙丁胺醇和盐酸克伦特罗。

关于饲料中 β_2 -兴奋剂的检验方法报道不多, 其中液相色谱法集中在盐酸克伦特罗的测定^[2, 3], 要采用柱后衍生, 操作繁琐; 多种 β_2 -兴奋剂的同时测定多采用气相色谱-质谱法^[2, 4], 而同时测定饲料中盐酸克伦特罗和沙丁胺醇液相色谱法国内外尚未见报道。作者建立了一种用 HPLC 同时分离测定饲料中盐酸克伦特罗、沙丁胺醇含量的方法。方法的定量下限 (w): 盐酸克伦特罗为 0.10×10^{-6} ; 沙丁胺醇为 0.36×10^{-6} 。方法的回收率和精密度均满足检测要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Shimadzu LC-10AT 高效液相色谱仪, 配 Shimadzu SPD-M10AVP 二极管阵列检测器和 Shimadzu CTO-10AVP 柱温箱; BRANSON B5200S-DT 超声清洗器; Sep-Pak 真空抽滤装置, 带真空泵。

磷酸二氢钾溶液: 7.5 mmol/L, pH 3.0。4% (φ) 氨化甲醇: 取 4.0 mL 氨水 (密度 0.88 g/mL) 用甲醇稀释至 100 mL。标准储备液 (1 000 mg/L): 分别称取 0.050 0 g 盐酸克伦特罗和沙丁胺醇 (Sigma 产品, 纯度 $\geq 99\%$) 于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 作为标准储备液, 再根据需要稀释成适当含量的混合标准工作液。

1.2 测定步骤

准确称取 5.00 g 试样于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 0.1 mol/L 盐酸-甲醇溶液 (体积比 1: 9), 于混匀器上混匀后, 置超声波清洗器中超声 30 min (期间每 10 min 取出混匀 1 次), 超声后冷却至室温, 于 2 500 r/min 离心 5 min, 将上清液过滤到 50 mL 容量瓶中, 残渣用 0.1 mol/L 盐酸-甲醇溶液 (体积比 1: 9) 再混匀提取 2 次, 每次 10 mL, 合并提取液, 用盐酸-甲醇溶液洗涤滤纸并定容至刻度。

定量取 25 mL 提取液于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 正己烷于混匀器上混匀 1 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 用尖嘴吸管将有机相去掉, 共处理 2 次。水相用 2.0 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 12, 用乙酸乙酯-正丁醇溶液 (体积比 6: 4, 用水饱和) 提取 3 次, 每次 5 mL, 混匀 2 min, 于 2 500 r/min 离心 5 min, 用尖嘴吸管将上层有机相取到另一离心管中, 于 $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$ 下, 氮气流浓缩至近干, 用 1 mL 0.1 mol/L 盐酸-甲醇溶液 (体积比 1: 9) 溶解残渣。

将 2 根 Supelclean LC-SCX (3 mL) 小柱串联接好安装在真空抽滤装置上, 保持洗脱液流速为 1 mL/min, 依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水和 5 mL 0.030 mol/L 盐酸溶液处理小柱后, 将样品提取液加到小柱

上,再用 1 mL 0.1 mol/L 盐酸-甲醇溶液(体积比 1:9)洗涤试管并一起转移至小柱中;依次用 5 mL 水、5 mL 甲醇淋洗小柱。在溶液流过固相萃取柱后,保持真空抽气状态至少 5 min。于真空装置下放好刻度收集管,用 5 mL 4% 氯化甲醇溶液洗脱并收集洗脱液。将洗脱液于 $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$ 下,氮气流浓缩至近干,用甲醇溶解残渣并定容至 2.0 mL,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜后,供液相色谱测定。

1.3 色谱条件

色谱柱: Zorbax CN(25 cm $\times$ 4.6 mm ID, $10\ \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈-7.5 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(体积比 85:15),混匀后用磷酸调节 pH 至 3.0,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜;流速: 1.0 mL/min;检测波长: 215 nm;进样量: $20\ \mu\text{L}$,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

盐酸克伦特罗在 211 nm 吸收最大,沙丁胺醇在 226 nm 吸收最大,选择 215 nm 作为测定波长,可以保证同时分析两组分,提高定量下限。

文献报道测定 β -兴奋剂的液相色谱法均采用 C_{18} 色谱柱分析盐酸克伦特罗^[1,2]。作者分别选用 C_{18} 柱和 CN 柱对盐酸克伦特罗、沙丁胺醇分离进行试验,结果表明用 CN 柱更为适宜。选择 Zorbax CN 柱作为分析柱,在流速为 0.5 mL/min 的条件下,对流动相组成进行优化(图 1、图 2),结果表明分离盐酸克伦特罗、沙丁胺醇较佳的流动相组成为乙腈含量在 85% (φ) 左右, KH_2PO_4 浓度在 5.0~10 mmol/L 之间, pH 在 3.0 (保证盐不析出)。

2.2 提取及净化方法的选择

盐酸克伦特罗和沙丁胺醇在饲料中均是混合添加,在酸性条件下它们以离子态存在,易溶于水、酸溶液,难溶于正己烷等非极性有机溶剂;在碱性溶液中以游离形式存在,克伦特罗易溶于大多数有机溶剂,而沙丁胺醇则易溶于异丙醇等极性的有机溶剂中,其离子态和游离态均易溶于甲醇。实验表明用含少量 0.1 mol/L 盐酸的甲醇溶液对饲料中沙丁胺醇、盐酸克伦特罗同时提取,提取率为 100%。

关于在碱性溶液中提取沙丁胺醇、盐酸克伦特罗, Collins 等^[5]采用异丙醇-乙酸乙酯作为提取剂,但要加 NaCl,才能使水相与有机相分开,操作麻烦;我们选择了在水中溶解度不大,极性与异丙醇相当的正丁醇,将其与乙酸乙酯配成混合提取液(用水饱和),能完全将沙丁胺醇、盐酸克伦特罗从碱性溶液中提取出来,并能去除大量杂质。

通过试验发现只要使用阳离子固相萃取小柱即能满足净化的要求,我们比较了 Supelclean LC_SCX(3 mL)、Waters OASIS MCX(1 mL, 30 mg) 两种阳离子交换柱固相萃取小柱(SPE),它们对沙丁胺醇、盐酸克伦特罗净化效果一致,且单根柱均能吸附 1 000 μg 以上沙丁胺醇、盐酸克伦特罗,这类 SPE 柱在酸性条件下对 β -兴奋剂有非常强的吸附性能,而用 5 mL 4% (φ) 氯化甲醇溶液又很容易使它们洗脱下来,且回收率好。其洗脱曲线见图 3。

对盐酸克伦特罗、沙丁胺醇混合标准溶液进行了稳定性实验,结果表明在甲醇溶液中,于 4°C 冰箱中冷藏保存半年内稳定;在加热浓缩时,加热温度在 80°C 以下稳定。

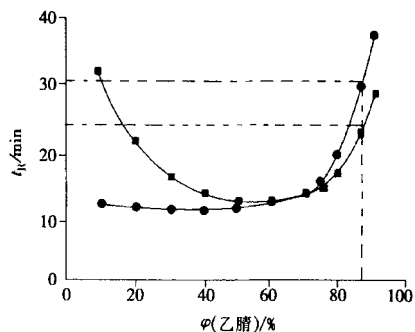


图 1 流动相中乙腈含量对盐酸克伦特罗(●)、沙丁胺醇(■)保留时间的影响

Fig.1 Effect of acetonitrile content in mobile phase on t_R of clenbuterol hydrochloride (●) and salbutamol (■)

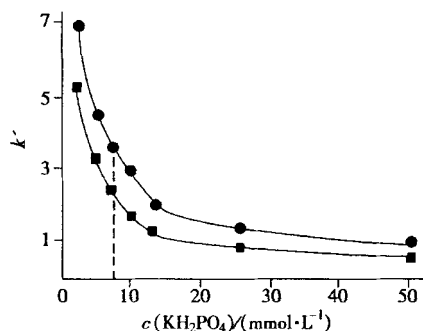


图 2 流动相中 KH_2PO_4 浓度对盐酸克伦特罗(●)和沙丁胺醇(■)容量因子的影响

Fig.2 Effect of potassium dihydrogen phosphate concentration on the capacity factors of clenbuterol hydrochloride (●) and salbutamol (■)

2.3 线性范围与定量下限

分别配制含盐酸克伦特罗 0.125~ 10.0 mg/L、沙丁胺醇 0.450~ 36.0 mg/L 的混合标准溶液, 在选定的色谱条件下进行分析, 盐酸克伦特罗、沙丁胺醇标准溶液质量浓度与峰面积呈线性关系, 其线性方程: 盐酸克伦特罗 $Y=1.1387\times 10^{-5}X+0.000345$, $r=0.9997$; 沙丁胺醇 $Y=3.7854\times 10^{-5}X+0.003096$, $r=0.9998$ (Y 为标准液质量浓度, X 为峰面积)。在此质量浓度范围内, 它们分别相当于样品含盐酸克伦特罗 $0.10\times 10^{-6}\sim 8.0\times 10^{-6}$ (w)、沙丁胺醇 $0.36\times 10^{-6}\sim 28.8\times 10^{-6}$ (w); 故盐酸克伦特罗定量下限为 0.10×10^{-6} (w), 沙丁胺醇的定量下限为 0.36×10^{-6} 。

2.4 方法的回收率与精密度

用配合饲料、预混料空白值为零样品分别添加 5 个水平盐酸克伦特罗、沙丁胺醇, 进行实验室内回收率、精密度实验 ($n=20$); 经厦门、湖北出入境检验检疫局等 5 个实验室进行重现性和回收率实验, 用空白值为零样品分别作 3 个水平添加, 样品总数为 20。结果分别见表 1。饲料空白样品中添加 0.10×10^{-6} (w) 盐酸克伦特罗和 0.36×10^{-6} (w) 沙丁胺醇分离色谱图见图 4。

3 结 论

配合饲料中添加盐酸克伦特罗达 2×10^{-6} (w)、沙丁胺醇为 8×10^{-6} (w) 时才能有明显的促生长效果, β_2 -兴奋剂在全价饲料中的使用量至少要大于 0.5×10^{-6} (w) 才能开始起到改善生畜胴体的效果^[6,7], 以上数据表明, 本法的各项技术指标满足 SN/T 0001_1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》的要求, 方法的定量下限、精密度和回收率均满足对饲料中添加违禁药物盐酸克伦特罗、沙丁胺醇进行检测的要求。

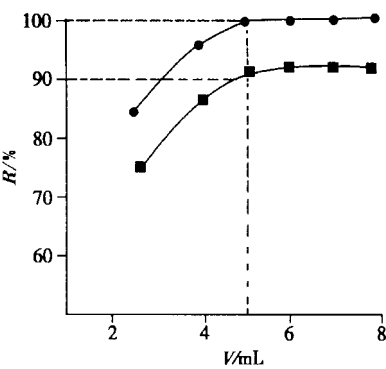


图 3 SCX 柱上吸附的盐酸克伦特罗(●)和沙丁胺醇(■)的 4% 胺化甲醇洗脱曲线图
Fig. 3 Elution curves of clenbuterol hydrochloride(●) and salbutamol(■) on SCX SPE by 4% ammoniated methanol

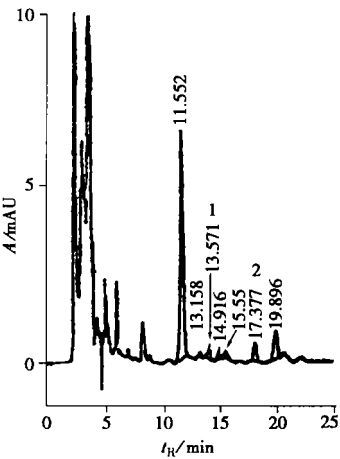


图 4 饲料空白样品中添加 0.10×10^{-6} (w) 盐酸克伦特罗、 0.36×10^{-6} (w) 沙丁胺醇的分离色谱图
Fig. 4 Chromatogram of feed spiked 0.10×10^{-6} (w) clenbuterol hydrochloride and 0.36×10^{-6} (w) salbutamol
1. clenbuterol hydrochloride; 2. salbutamol

表 1 方法的回收率、精密度数据
Table 1 Recovery and RSD results from feed spiked clenbuterol hydrochloride and salbutamol

Component	Intra_laboratory				Inter_laboratory			
	Added $w_A/10^{-6}$	Found $\bar{w}_F/10^{-6}$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Added $w_A/10^{-6}$	Found $\bar{w}_F/10^{-6}$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Clenbuterol hydrochloride (盐酸克伦特罗)	8.00	7.76	97	1.4	8.00	7.58	95	4.1
	4.00	3.84	96	1.4				
	1.00	0.956	96	1.4	1.00	0.922	92	5.4
	0.50	0.47	93	1.4				
Salbutamol (沙丁胺醇)	0.10	0.091	91	2.3	0.10	0.088	88	6.4
	28.8	24.2	84	2.0	28.8	23.9	83	2.0
	14.4	11.9	82	2.1				
	3.60	2.68	74	2.6	3.60	2.74	76	2.6
	1.80	1.39	77	2.9				
	0.36	0.27	75	3.0	0.36	0.27	75	3.0

树脂酸性组分的氢氧化四甲铵甲基化与 GC- MS 分析

刘千钧^{1,2}, 詹怀宇¹, 王旭¹

(1. 华南理工大学 制浆造纸工程国家重点实验室, 广东 广州 510641;
2. 广东工业大学 实验研究中心, 广东 广州 510080)

摘要: 利用氢氧化四甲铵(TMAH)对马尾松树脂(塔罗油)进行甲基化, 并对其产物进行 GC- MS 分析; 研究表明 TMAH 甲基化后进行 GC- MS 分析是测定树脂中酸性组分的一种快速有效的方法, 但酸性组分中的脂肪酸要比树脂酸难于甲基化, 因此为了确保甲基化反应完全, 应当适当延长甲基化反应时间。

关键词: 氢氧化四甲铵; 甲基化反应; 树脂; 酸性组分; 气相色谱- 质谱法

中图分类号: O657. 63; Q946. 86 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004- 4957(2003) 03- 0060- 03

木材中的树脂是引起制浆造纸工业中树脂障碍问题的主要原因。研究表明, 针叶木树脂中含有较多的酸性组分, 它们易与金属离子生成金属皂进而产生沉积^[1]。因此, 分析和鉴定这些酸性组分对于研究树脂沉积的机理和控制树脂障碍具有重要意义。

树脂成分的分析一般采用直接进样气相色谱法(GC), 但该方法往往需要较高的柱温和较长的时间, 且无法确定其具体的化学组成, 不利于树脂成分的快速测定。在 GC 测定前, 对酸性组分进行甲基化是提高出峰速度和缩短分析时间的常用方法。常规的甲基化法大都需要较复杂的反应装置和较长的反应时间。近年来发展的一种甲基化方法——氢氧化四甲铵(TMAH)甲基化法较好地弥补了上述缺点。此法多用于酸性物质的裂解气相色谱- 质谱联用分析(Py-GC- MS)时的在线甲基化反

收稿日期: 2002- 07- 03; 修回日期: 2003- 03- 13

基金项目: 福建省科技基金资助课题(014460)

作者简介: 刘千钧(1971-), 女, 山西介休人, 助理研究员, 在职博士研究生。

- [2] SCHILT R, HOOIJERINK H, COURTHEYN D, *et al.* β - Agonists in animal feed I : First intercomparison of methods of analysis for clenbuterol in animal feed materials[J]. Food Additives and Contaminants, 1996, 13(5) : 477- 492.
- [3] COURTHEYN D, DESAEVER C, VERHE R. High- performance liquid chromatographic determination of clenbuterol and cimaterol using post column derivatization[J]. J Chromatogr, 1991, 564(3) : 537- 549.
- [4] VAN CINKEL L A, STEPHANY R W, VAN ROSSUM H J. Development and validation of a multiresidue method for β - agonists in biological samples and animal feed[J]. J AOAC Int, 1992, 75(3) : 554- 560.
- [5] COLLINS S, O'KEEFFE M, SMYTH M R. Multi- residue analysis for beta- agonists in urine and liver samples using mixed phase columns with determination by radioimmunoassay[J]. Analyst, 1994, 119(12) : 2671- 2674.
- [6] 王彦文, 史兆国, 宋志琪. β - 兴奋剂对肉用仔鸡屠宰性能和肉品质的影响[J]. 中国饲料, 1995, (14): 17- 18.
- [7] 孙琉秀. β - 兴奋剂在动物饲养中的正负效果[J]. 中国饲料, 1996, (1): 16- 18.

Determination of Clenbuterol Hydrochloride and Salbutamol in Feed by HPLC

DAI Hua, YUAN Zhi_neng, HUANG Zhi_qiang, CHEN Xin_huan

(Hunan Entry- Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410007, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of illicit drugs clenbuterol hydrochloride and salbutamol in feed by HPLC with diode array detector(DAD). The clenbuterol hydrochloride and salbutamol in samples were extracted by hydrochloric acid solution containing methanol and the extract was cleaned up by liquid- liquid extraction and solid phase extraction, then clenbuterol hydrochloride and salbutamol were determined by HPLC with DAD, using external standard method. Chromatographic separation was performed in Zorbax CN column(25 cm $\times$ 4. 6 mm ID, 10 μ m) with an eluent consisting of acetonitrile- 7. 5 mmol/L KH₂PO₄(85: 15 by volume), and the eluate was monitored at a wavelength of 215 nm. The limits of determination, recoveries and RSD of the method were $0. 1 \times 10^{-6}$ (w), greater than 88% and less than 6. 4% (n= 5) for clenbuterol hydrochloride, and $0. 36 \times 10^{-6}$ (w), greater than 74% and less than 3. 0% (n= 5) for salbutamol, respectively.

Key words: Clenbuterol hydrochloride; Salbutamol; Feed; HPLC