

胶体金读数仪法快速检测动物肌肉中 克伦特罗含量

张晓丽*

(山东省运动康复研究中心, 济南 250002)

摘要: 目的 建立用于运动队肉食品克伦特罗(clenbuterol, CL)快速检测的方法。**方法** 采用克伦特罗胶体金检测卡确定阳性结果, 胶体金读数仪法确定克伦特罗含量。**结果** 已知克伦特罗含量为 0.94 ng/g 的羊肉, 测试结果平均值为 1.21 ng/g。**结论** 从运动员饮食安全角度出发, 胶体金读数仪法快速检测动物肌肉中克伦特罗暂时无法完全达到含量检测的要求, 经过检测卡和胶体金读数仪的进一步优化改进, 可以给运动队尤其是外训队伍提供了一种快速、便捷的检测方法。

关键词: 胶体金读数仪; 胶体金法; 克伦特罗; 正交试验

Rapid detection of Clenbuterol in animal muscle by colloidal gold reader

ZHANG Xiao-Li*

(Shandong Province Sports Rehabilitation Research Center, Jinan 250002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid detection of Clenbuterol in meat food of sports teams. **Methods** The positive results were confirmed by Clenbuterol colloidal gold detection card, and the specific content was determined by colloidal gold reader method. **Results** The average value of mutton with the known Clenbuterol content of 0.94 ng/g was 1.21 ng/g. **Conclusion** From the point of view of athletes' food safety, the rapid detection of Clenbuterol in animal muscles by colloidal gold reader can not completely meet the requirements of content detection for the time being. After further optimization and improvement of the detection card and colloidal gold reader, a fast and convenient detection method can be provided for the sports teams, especially for the external training teams.

KEY WORDS: colloidal gold standard reader; colloidal gold method; Clenbuterol; orthogonal test

1 引言

克伦特罗(Clenbuterol, CL)是一种 β 受体激动剂, 常用于平喘。克伦特罗具有促进动物肌肉特别是骨骼肌中蛋白质合成的蛋白同化作用, 因此为兴奋剂, 该药物是世界反兴奋剂机构(World Anti-Doping Agency, WADA)禁止运动员使用的一种蛋白同化制剂^[1]。CL 属于中度蓄积性药物,

易在动物组织内残留蓄积, 人食用残留 CL 的动物组织会导致食物中毒或引起潜在的健康危害^[2], 运动员尤其要防范食药源性兴奋剂事件的发生^[3]。动物组织中的克伦特罗检测方法很多, 常用的检测 CL 的方法有胶体金法^[4-6]、酶联免疫吸附法^[7]、气相色谱-质谱法^[8,9]、超高效液相色谱串联质谱法等^[10-12], 这些检测方法所需设备体积大, 价格昂贵, 不适宜于经常外出携带, 操作复杂而且需要稳定的环

*通讯作者: 张晓丽, 主管药师, 主要研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: 270919515@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Xiao-Li, Pharmacist, Shandong Province Sports Rehabilitation Research Center, Jinan 250002, China. E-mail: 270919515@qq.com

境, 不适合运动队经常外出训练时携带。本研究建立可以用于运动队肉食品中 CL 快速检测的方法, 以期保障运动员在外出外训期间的饮食安全。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

克伦特罗胶体金检测卡、TND09-M-J 胶体金读数仪(杭州天迈生物科技有限公司); Happy-T4GL 离心机(济南福的机械有限公司); HH-4 恒温水浴锅(常州第二纺织机械有限公司); 国华 878-A 组织粉捣碎匀浆机(常州国华电器有限公司); 盐酸克伦特罗标准品(上海楚定分析仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 检测原理

利用克伦特罗胶体金检测卡进行检测时, 样品中的克伦特罗和标记抗体竞争结合偶联物, 检测限为 3–5 ng/mL。根据检测带(T)随 CL 浓度的大小而出现深浅不同的变化, 而对照带(C)颜色比较稳定, 利用胶体金读数仪读取胶体金试纸条检测带(T)与对照带(C)的颜色比值能间接反应出的待测物 CL 的含量, 提高胶体金检测法的检测限。

2.2.2 检测方法^[13]

称取 4 g 粉碎的精肉或者肝脏组织, 加入具塞离心管; 沸水浴 10 min, 取出离心管, 将离心管中上清液转移入一次性试管中备用。按胶体金卡使用方法, 将 150 μ L 上清液加入胶体金卡反应小杯, 5 min 后, 用一次性胶头滴管, 吸放混匀 10 次, 将全部溶液加入点样孔, 静置 10 min 后, 上机检测。

2.2.3 不同浓度 CL 的猪肉样品配备

取按照 SN/T 1924-2011《进出口动物源食品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和特布他林残留量的测定。液相色谱-质谱/质谱法》方法检测, 克伦特罗检测结果为阴性

的肉为空白(克伦特罗检测限为 0.05 μ g/kg), 将猪肉去除脂肪后用匀浆器匀浆, 取 4 g 碎的瘦肉样本于 15 mL 离心管中, 加 CL 溶液调整成 1 ng/g、0.5 ng/g 浓度的溶液, 每个浓度 3 个样品, 拧紧盖子, 沸水浴中加热 10 min, 取上清液检测。如煮出液有明显黄色浑浊需离心(3000 r/min, 5 min)。

2.2.4 克伦特罗阳性肉的胶体金读数仪法检测

取用气相色谱串联质谱(gas chromatography tandem mass spectrometry, GC-MS-MS)方法测得已知克伦特罗含量为 0.94 ng/g 的羊肉, 按上述方法同法测试。

3 结果与分析

3.1 克伦特罗胶体金检测卡直接检测结果

对测试过的克伦特罗胶体金检测卡进行直接观测 1 ng/g、0.5 ng/g 的样品检测均呈阳性结果。

3.2 胶体金读数仪检测结果

胶体金读数仪检测结果见表 1。

已知克伦特罗含量为 0.94 ng/g 的羊肉, 克伦特罗阳性肉的胶体金读数仪法检测结果分别为 0.77、1.30、1.57 ng/g, 平均值为 1.21 ng/g。从运动员饮食安全角度出发, 实验中探讨的胶体金读数仪法快速检测动物肌肉中克伦特罗暂时无法完全达到其要求。

3.3 正交试验筛选测试条件

在不同浓度 CL 猪肉样品测试中, 检测结果的相对误差和相对标准偏差(RSD)较大, 表明测量结果准确度和精确度不够高。利用正交试验设计选择 L9(3⁴)对测试条件进行优化, 有关测试因素与水平, 令因素 1: 蒸煮时间, 10、15、20 min。因素 2: 组织液温度, 常温放置(手握凉热适宜), 常温放置 15 min, 常温水冷 5 min。因素 3: 点样层析时间, 6、8、10 min。正交表见表 2。

表 1 胶体金读数仪检测结果
Table 1 Test results of colloidal gold standard reader

配制浓度/(ng/g)	样品编号	测定浓度值/(ng/g)	平均值/(ng/g)	标准差(SD)	绝对误差(δ)	相对误差/%	相对标准偏差/%
	1	1.705					
1	2	1.437	1.588	0.137	0.588	58.8	8.6
	3	1.621					
	4	0.351					
0.5	5	0.517	0.385	0.119	-0.115	23.0	30.8
	6	0.287					

表 2 正交表 L9(3⁴)
Table 2 Orthogonal table L9 (3⁴)

试验号	因素 1	因素 2	因素 3	测试值
1	1	1	1	1.088
2	1	2	2	0.936
3	1	3	3	0.969
4	2	1	2	1.154
5	2	2	3	1.019
6	2	3	1	1.252
7	3	1	3	1.405
8	3	2	1	0.954
9	3	3	2	1.098
均值 1	0.998	1.216	1.098	
均值 2	1.142	0.970	1.063	
均值 3	1.152	1.106	1.131	
极差	0.154	0.246	0.068	

通过极差分析方法,可知各因素的影响大小依次为组织液冷却温度>肉样蒸煮时间>层析时间。选较优条件:蒸煮 10 min,放置 15 min 冷却,点样层析 8 min。即检测条件,肉样碎称量大于 4 g(或 10 mL 具塞离心管约 4/5 管),置于沸水中具塞蒸煮 10 min,取出后即刻将离心管中液体分离置于 5 mL 一次性试管中,常温静置 15 min。用一次性胶头滴管,将 5 滴溶液加入点样孔,静置 8 min 后,上机检测。

4 讨论

4.1 盐酸克伦特罗在动物各组织中的分布

文献报道试验牛按体重饲喂克伦特罗的饲料,连续 21 d 后,最后一次给药 8 h 后,各组织均检测到药物残留。按照屠宰组织中药物残留浓度从高到低的顺序,分别是肝、眼组织(去晶状体和房水)、胆汁、肾、肺、房水、脾、眼周肌肉、心、背最长肌、臀中肌,其中肝组织最高(93 $\mu\text{g}/\text{kg}$),臀中肌中的残留浓度(1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)最低,背最长肌残留浓度(2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[14]。

克伦特罗在前腿三角肌、后腿股二头肌和腰椎肌的 3 部分残留没有统计学显著差异,存在三角肌中的残留(7.6 ng/g)高于股二头肌(6.9 ng/g)和腰椎肌(6.5 ng/g)的趋势。

这种各组织中的差异可能与组织中的 β 受体密度(主要分布在心脏、支气管、血管平滑肌等)和克伦特罗与 β 受体亲和度有关,心、肺、肾、肝脏组织中的 β 受体密度大于肌肉、骨骼等 β 受体密度,心脏组织中 β 受体密度高、残留低与克伦特罗和 β 受体亲和度不高有关^[15]。

4.2 肌肉中胶原蛋白含量的分布

文献报道苏尼特羊在同一月龄不同部位的总胶原蛋白、可溶性胶原蛋白、不溶性胶原蛋白的含量变化的大小顺序依次为斜方肌>股二头肌>背最长肌>半腱肌。6 月龄羊肌肉中胶原蛋白含量大小依次为,斜方肌(6.0 mg/g)>股二头肌(5.8 mg/g)>背最长肌(4.1 mg/g)>半腱肌(3.9 mg/g); 12 月龄斜方肌(6.5 mg/g)>股二头肌(6.4 mg/g)>背最长肌(4.5 mg/g)>半腱肌(4.1 mg/g); 18 月龄斜方肌(6.7 mg/g)>股二头肌(6.5 mg/g)>背最长肌(5.1 mg/g)>半腱肌(4.5 mg/g)^[9]。

4.3 肌肉中脂肪含量分布

文献报道羊各部位脂肪含量由大到小的排序为:半腱肌>背最长肌>股二头肌>斜方肌; 6 月龄羊的背最长肌、股二头肌差异不显著,12 月龄半腱肌、背最长肌差异不显著^[16,17]。

由于肉样中脂肪、胶原蛋白含量对于检测干扰明显,含量过高会堵塞检测试纸的毛细管,造成结果不准确或无效检测。在检测过程中建议优先选择克伦特罗残留较高、胶原蛋白含量较少、脂肪含量较少的背最长肌待检,其次选择股二头肌。

5 结论

本实验按照优化后的测试条件,对多份样品进行了验证,结果发现部分肉样的蒸煮液液胶质多,流动性差,无法进行后续上机测试。从运动员饮食安全角度出发,实验中探讨的胶体金读数仪法快速检测动物肌肉中的克伦特罗含量暂时无法完全达到其要求。但李超辉等^[4,5]的研究,证明了经过盐酸抽提、碱调 pH、高速离心等操作,胶体金法可以在实验室中定量检测猪肉中的克伦特罗,相信经过检测卡和胶体金读数仪的进一步优化改进,可以给运动队尤其是外训队伍提供了一种快速、便捷的检测方法。

参考文献

- [1] AntiWorld-Doping Agency The 2009 prohibited list international standard. http://www.Wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_program/WADP-Prohibited-list/WADA_prohibited_list2009EN.PDF. 2009. 4-4 [Z].
- [2] 张园园, 吴永宁. 克伦特罗的毒性作用及其中毒机制[J]. 卫生研究, 2002, 31(4): 328-330.
Zhang YY, Wu YN. The toxic effect of Clenbuterol and its toxic mechanism [J]. J Hyg Res, 2002, 31(4): 328-330.
- [3] 张建丽, 王占良, 高照, 等. 人体食源性克伦特罗尿样兴奋剂检查阳性可能性研究[J]. 中国运动医学杂志, 2010, (5): 580-583.
Zhang JL, Wang ZL, Gao Z, et al. The possibility of positive urine for doping of clenbuterol hydrochloride resulting from edible meat [J]. Chin J Sports Med, 2010, (5): 580-583.
- [4] 李超辉, 罗薇, 徐波, 等. 胶体金免疫层析试纸条定量检测猪尿中克伦特罗[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 114-118.

- Li CH, Luo W, Xu B, *et al.* Quantitative determination of Clenbuterol in pig urine with colloidal gold immunochromatographic strip [J]. *Food Sci*, 2013, 34(12): 114–118.
- [5] 李超辉, 陈雪岚, 郭亮, 等. 胶体金免疫层析法定量检测猪肉中克伦特罗[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(4): 167–171.
- Li CH, Chen XL, Guo L, *et al.* Quantitative determination of clenbuterol in pork by colloidal gold immunochromatography [J]. *Food Ferment Ind*, 2013, 39(4): 167–171.
- [6] 韩宁娟, 杜玮, 常春, 等. 食品中 β_2 受体激动剂快速检测方法的建立与应用[J]. *西北药学杂志*, 2016, (6): 574–578.
- Han NJ, Du W, Chang C, *et al.* Establishment and application of thin layer chromatography method for rapid detection of 4 kinds of β_2 agonists in food [J]. *Northwest J Pharm*, 2016, (6): 574–578.
- [7] 韦林洪, 张军, 王承莉, 等. 免疫分析法在克伦特罗残留检测中的应用[J]. *化学试剂*, 2019, (7): 675–681.
- Wei LH, Zhang J, Wang CL, *et al.* Application of immunoassay in the determination of Clenbuterol residue [J]. *Chem Reagent* 2019, (7): 675–681.
- [8] 江勇, 胡贵祥, 朱慧芳. 固相萃取与气相色谱-质谱联用测定肉产品中的克伦特罗[J]. *肉类研究*, 2014, 28(4): 11–13.
- Jiang Y, Hu GX, Zhu HF. Determination of Clenbuterol in meat products by solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Meat Res*, 2014, 28(4): 11–13.
- [9] 黄仕稳, 曾婷, 马丽. 气相色谱-质谱法测定动物类食品中盐酸克伦特罗[J]. *理化检验-化学分册*, 2014, 50(6): 763–765.
- Huang SW, Zeng T, Ma L. Determination of Clenbuterol hydrochloride in animal foods by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Phys Test Chem Anal Part B(Chem Anal)*, 2014, 50(6): 763–765.
- [10] 邱启东, 李聪, 蔡艳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定瘦猪肉中的克伦特罗[J]. *广东化工*, 2014, 41(10): 142–143.
- Qiu QD, Li C, Qi Y, *et al.* Determination of Clenbuterol in lean pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2014, 41(10): 142–143.
- [11] 刘珊, 王曼曼, 艾连峰, 等. 新型强阳离子交换在线净化固相萃取整体柱与液相色谱串联质谱联用测定猪肉中的克伦特罗[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(5): 547–552.
- Liu S, Wang MM, Ai LF, *et al.* Determination of Clenbuterol in pork by a novel solid phase extraction column coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line purification by strong cation exchange [J]. *J Instr Anal*, 2013, 32(5): 547–552.
- [12] 陈肇臻, 刘小刚. 猪肝中克伦特罗的测定——反相高效液相色谱法[J]. *质量技术监督研究*, 2014, 1: 14–17, 27.
- Chen ZZ, Liu XG. Determination of Clenbuterol in pig liver—High-performance liquid chromatography [J]. *Qual Tech Superv Res*, 2014, 1: 14–17, 27.
- [13] 张瑞, 苏小川. 瘦肉精检测前处理方法研究进展[J]. *应用预防医学*, 2018, (4): 332–335.
- Zhang R, Su XC. Research progress of pretreatment methods for detection of clenbuterol [J]. *Appl Prev Med*, 2018, (4): 332–335.
- [14] 李励军. 盐酸克伦特罗在肉牛体内残留消除规律[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- Li LJ. Clenbuterol hydrochloride residues in beef cattle elimination law [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.
- [15] 方炳虎, 陈杖榴, 黄显会. 克伦特罗在猪体内的生物利用度及药动力学研究[J]. *畜牧兽医学报*, 1997, 28(3): 233–237.
- Fang BH, Chen ZL, Huang XH. Study on the bioavailability and pharmacokinetics of Clenbuterol in pigs [J]. *Acta Veter Et Zoote Chnica Sinca*, 1997, 28(3): 233–237.
- [16] 严莉. 盐酸克伦特罗在动物组织中残留分布及其毒性的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2004 年.
- Yan L. Study on the residual distribution and toxicity of Clenbuterol hydrochloride in animal tissues [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2004.
- [17] 李颖. 肉羊主要器官中盐酸克伦特罗检测方法及其代谢残留规律的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013 年.
- Li Y. Study on the determination method of Clenbuterol hydrochloride in the main organs of mutton sheep and the law of metabolic residue [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



张晓丽, 主管药师, 主要研究方向为天然药物研究与开发。

E-mail: 270919515@qq.com