固液萃取结合全自动前处理仪对马尿中氯丙那林含量的测定

周世豪[1] 石继龙[1] 张东阳[1] 马晓鸣[2]

(1.武汉商学院，湖北 武汉 430056，2.武汉食品化妆品检验所，湖北 武汉 430040)

摘 要：本研究旨在开发并验证一种高效方法，利用固液萃取结合自动化前处理系统，实现马尿液中氯丙那林的准确定量。通过固液萃取与自动化前处理仪器对马尿液样本进行预处理，并对固液萃取条件及萃取溶剂的选择进行了优化。该方法被应用于实际马尿液样本的分析。结果表明，该方法适用性强、实用性高，且具有较高的回收率。它能够实现马尿液样本的自动化、标准化及高通量前处理，提升克伦特罗含量测定的准确性与效率，为马匹药物监测提供了一种快速、可靠的检测手段，有助于保障马术运动的公平公正，并维护马匹的健康与安全。

关键词：固液萃取；全自动前处理仪；马尿；氯丙那林；含量测定

基金项目：武汉商学院大学生创新创业训练计划项目“202411654047”

DOI：doi.org/10.70693/202611143736

Determination of clorprenaline in equine urine by solid-liquid extraction combined with automatic sample pretreatment instrument

Shihao Zhou[1], Jilong Shi[1], Dongyang Zhang[1], Xiaoming Ma[2]

[1]Wuhan Business University, Wuhan, China, [2]Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan, China

Abstract: This study aimed to develop and validate an efficient method for the accurate quantification of clorprenaline in equine urine using solid-liquid extraction coupled with an automated pretreatment system. The horse urine samples are pretreated by solid-liquid extraction combined with an automatic pretreatment instrument; the solid-liquid extraction conditions and the selection of extraction solvents are optimized. The established method is applied to analyze actual horse urine samples. Results show that this method has strong applicability, high practicality, and a high recovery rate. It can realize the automated, standardized, and high-throughput pretreatment of horse urine samples, improve the accuracy and efficiency of determining the content of clorprenaline, provide a rapid and reliable detection means for drug monitoring of horses, and contribute to ensuring the fairness and justice of equestrian sports as well as the health and safety of horses.

Keywords: Solid-liquid extraction; fully automated sample preparation instrument; hippuric acid; clorprenaline; content determination

作者简介：周世豪(2003—)，男，本科，学生，研究方向为违禁物质检测新方法开发；
石继龙(1990—)，男，博士，讲师，研究方向为违禁物质前处理新方法开发与应用；
张东阳(2003—)，男，本科，学生，研究方向为违禁物质前处理新方法开发；
马晓鸣(1996—)，男，博士，工程师，研究方向为食品质量与安全。

通讯作者：石继龙，马晓鸣

1.引言

氯丙那林 (Clorprenaline, CAS 号: 3811-25-4) 是一种有机化合物, 分子式为 $C_{11}H_{16}ClNO$, 分子量为 213.704。该物质呈白色或类白色结晶粉末状，易溶于水。这种亲水性使其在水相实验操作中表现良好，例如在配制标准溶液时能够迅速溶解，从而确保实验高效进行。在药理学方面，氯丙那林可选择性地作用于支气管平滑肌上的β-肾上腺素受体[1]，诱导气道平滑肌松弛，缓解支气管收缩，改善肺通气，从而发挥强效的支气管扩张作用。它对心脏β-肾上腺素受体的激动活性相对较弱，因此心血管方面的不良反应（如心悸）发生率较低[2]。此外，氯丙那林还具有轻微的镇咳和祛痰作用, 有助于减轻咳嗽并促进黏液清除，从而保持气道通畅[3]。在马匹中，使用氯丙那林可显著增强呼吸功能和氧气输送能力，这在竞技比赛中可能会在表象上提升马匹的耐力和持久力。然而，这种违规使用行为公然违背了公平竞争原则，损害了马术运动的完整性。从马匹健康的角度来看，长期或不当使用氯丙那林可能会引发多种潜在的健康风险[4]。尽管其直接的心脏毒性较轻，但持续使用可能会逐渐增加心脏负荷，并诱发心律失常及其他心脏异常[5]。此外，通过药物手段提升运动表现可能会掩盖马匹潜在的健康问题，使其在高强度竞赛环境下更容易受伤。马匹在比赛中受伤，不仅会危及其运动生涯，还会给骑手带来严重的安全隐患[6]。因此，在马术运动中严格禁止使用氯丙那林，并对马匹尿液中的药物残留进行精确定量检测，对于维护马术竞赛的公平公正、保障马匹健康与福利，以及维护马术运动的道德准则至关重要。

本研究旨在建立一种精确、高效的分析方法，通过将固液萃取与自动化样品前处理系统相结合，实现对马匹尿液中氯丙那林的测定。该方法通过对关键固液萃取参数（包括萃取溶剂的选择、萃取时长及温度调控等）进行系统优化，并结合自动化样品处理流程，实现了马匹尿液样本的自动化、标准化和高通量前处理，从而显著提升了氯丙那林定量分析的准确性与效率[7]。该方法能够为兽医和驯马师提供有关马匹用药情况的准确数据，有助于保障马匹的健康与福利，维护竞赛公平，并确保比赛结果真实反映马匹的竞技能力。此外，它还为监管部门制定科学的兴奋剂检测标准及监管策略提供了强有力的技术支撑，从而有效遏制违禁药物的使用，促进马术运动的健康与公平发展。

2.实验内容

2.1 标准曲线所需溶液的配置

2.1.1 母液配置

计算所需氯丙那林的质量:

首先需要根据目标浓度 1000ppm 的标准溶液，计算出所需的氯丙那林质量。1000ppm 表示每升溶液中含有 1000mg 的氯丙那林。假若最终溶液的体积为 100mL，则需要氯丙那林的质量为 100mg。配制计量单位为 1mg/ml = 1000ppm（母液），1ppm = 1mg/L = 1μg/mL。

称取氯丙那林标准品:

使用十万分之一电子天平准确称取 100 mg 的氯丙那林标准品，称量过程中需要注意避免其中掺杂其他物质，这会使得实验结果不准确。

溶解标准品:

将 100mg 氯丙那林标准品放入 100mL 容量瓶，加入适量甲醇溶液，手动轻摇使其溶解。随后将容量瓶置于离心机离心 5-10 分钟，往容量瓶中持续加入甲醇溶液，待标准品完全溶解后，用移液枪精确添加甲醇溶液至容量瓶刻度线，以此减少实验误差。

标准溶液的存储:

将配制好的标准溶液应立即转移到干净储液瓶中，封口保存，并在储液瓶上贴上标签做好标记。此溶液应存放在避光、低温环境下，避免光照和高温对进行研究实验时会出现误差。

2.1.2 溶液的配制与稀释

采用逐级稀释法配制系列标准溶液，如下表 1 所示。分别使用高精度移液枪准确吸取 10μL、20μL、30μL、40μL、50μL、60μL、70μL、80μL、90μL、100μL 的母液，依次加入到装有 990μL、980μL、970μL、960μL、950μL、940μL、930μL、920μL、910μL、900μL 甲醇溶液的试剂瓶中，轻轻摇匀, 配制成浓度分别为 10ppm、20ppm、30ppm、40ppm、50ppm、60ppm、70ppm、80ppm、90ppm、100ppm 的系列标准溶液，在此过程中，需要用到不同的高精度移液枪来确保实验的准确性。然后依次按照顺序在离心机上进行离心，确保溶液摇匀，离心之后再按照顺序放在超声波清洁机中进行 10min 超声波清洁，此举意在使氯丙纳林标准物在甲醛中充分溶解。在吸取母液过程中，使用高精度移液器，其精度可达 ± 0.1μL，严格按照操作规程，避免产生气泡，确保移液体积的准确性，从而保证标准溶液浓度的精准度。

接着，取四支洁净的试剂瓶，分别往里面准确加入 900μL 新鲜采集的马尿样本，操作过程均需要在通风橱内进行，以此来避免尿液挥发产生的异味从而对实验环境造成影响。随后，从已经配制好的 1mg/mL 的氯丙那林母液中精确吸取 100μL, 缓慢加入到上述马尿液中, 轻轻振荡混匀, 配制成四支浓度为 100ppm 的阳性马尿试剂，分别加入不同比例的萃取溶剂，二氯甲烷（DCM）、二氯甲烷:甲醇（DCM:MeOH（75:25））、二氯甲烷:甲醇:氨水(DCM:MeOH:$NH_3 \cdot H_2O$（75:23:2））、二氯甲烷:甲醇:乙酸(DCM:MeOH:CH_3COOH（75:23:2）)，然后依次按照顺序在离心机上进行离心，确保溶液摇匀，离心之后再按照顺序放在超声波清洁机中进行 10min 超声波清洁，如下表 1 所示。

溶液配置体积公式：$x = \frac{x}{900\mu L甲醇 + x} \cdot A$（

x为溶液体积，A为母液)

以序号1，浓度为10ppm的情况为例子：

$$\frac{100\mu L}{900\mu L甲醇 + 100\mu L \bullet A} \cdot A = 10ppm$$

表1 不同浓度溶液配制体积的对应关系

No	MeOH (B)	Stock Solutions (A)	Concentration
1	995 μL	5 μL	5 ppm
2	990 μL	10 μL	10 ppm
3	985 μL	15 μL	15 ppm
4	980 μL	20 μL	20 ppm
5	975 μL	25 μL	25 ppm
6	970 μL	30 μL	30 ppm
7	965 μL	35 μL	35 ppm
8	960 μL	40 μL	40 ppm
9	950 μL	50 μL	50 ppm
10	940 μL	60 μL	60 ppm
11	930 μL	70 μL	70 ppm
12	920 μL	80 μL	80 ppm
13	910 μL	90 μL	90 ppm
14	900 μL	100 μL	100 ppm

2.2.全自动前处理仪操作流程

仪器检查：在使用之前，需要全面检查全自动前处理仪的各部件连接是否稳固，管路有无破损情况；检查进样针、萃取装置等关键部件是否完好；查看仪器的电源、气源等供应是否正常。

实验处理程序：依据实验对马尿中氯丙那林含量测定的要求，在仪器的操作界面或配套软件上编制前处理程序。设置固液萃取的相关参数，确定萃取溶剂的种类和用量，设定萃取时间、萃取温度以及振荡频率等，以确保能高效萃取氯丙那林；

样品与试剂准备及加载：准备适量的新鲜马尿样品，确保样品采集后保存得当，无变质或污染情况；按照实验设计准备好所需的四种洗脱溶剂 DCM 、DCM:MeOH （75:25）、DCM:MeOH:$NH_3 \cdot H_2O$ （75:23:2）、DCM:MeOH:CH_3COOH（75:23:2）分别装入对应的试剂瓶，并把试剂瓶密封良好，贴上清晰的标签；在加载过程中，要严格避免样品和试剂受到污染，防止交叉污染影响实验结果。

启动运行与监控：在仪器操作界面上再次确认各项参数设置无误后，启动全自动前处理仪。仪器运行期间，密切关注仪器的运行状态，观察进样针的移动、溶剂的抽取和注入、萃取装置的振荡或搅拌等操作是否正常，查看仪器显示屏上有无报错信息。

样品收集与仪器维护：待仪器完成前处理程序之后，从仪器的样品收集区取出处理后的马尿样品，将其妥善保存，准备用于后续对氯丙那林含量的测定，转移过程中要注意避免样品损失或被污染。

2.3.样品前处理方法

方法设置:编辑方法全自动固相萃取仪器使用之前，设置相应的固液萃取步骤见图 1。

活化柱子：用 2mL 的甲醇溶液去活化柱子，在 N_2 氛围下，0.8bar 的压力持续 105s.

平衡柱子:用 2mL 的 10％甲醇水溶液去平衡柱子，在 N_2 氛围下，1.2bar 的压力持续 105s。

上样：分别取待处理样品（即四等份阳性马尿）于 4 个试管中，放入全自动前处理仪的试管架上。混匀 5 次。用 1mL (PH=8.5)的乙酸铵去缓冲液清洗试管，在 N_2 氛围下，0.3bar 的压力持续 30s,0.8 bar 120s,1.6bar 30s.

除杂：用 0.1%的氨水去清洗柱子，1bar 持续 120s，2bar 持续 30s，再用 10%甲醇水溶液去清洗柱子，1bar 持续 120s，2bar 持续 30s，小柱吹干 5min。

洗脱：用 DCM、DCM:MeOH （75:25）、DCM:MeoH:$NH_3 \cdot H_2O$ （75:23:2）、DCM:MeOH:CH_3COOH (75:23:2) 作为洗脱溶剂，在 N_2 氛围下，梯度压力洗脱：0.3bar 持续 135s，0.8bar 持续 30s，重复进行一次梯度压力洗脱，小柱吹干，持续 10 分钟。

复溶：氮吹，再用 1mL 甲醇进行复溶，　　滤膜过滤，最后转移到样品瓶。

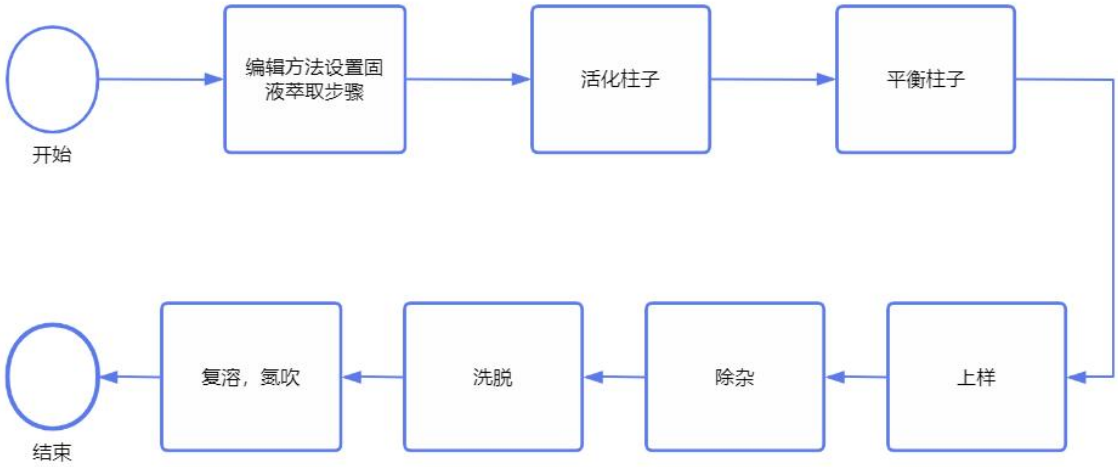


图 1 样品前处理流程图

2.4 洗脱溶剂的选择与使用

固液萃取结合全自动前处理仪测定马尿中氯丙那林含量的实验里，这四种洗脱溶剂分别配比为 DCM 、 DCM:MeOH （ 75:25 ） 、 DCM:MeOH:$NH_3 \cdot H_2O$ （ 75:23:2 ） 、 DCM:MeOH:CH_3COOH (75:23:2) 作用各有不同，主要体现在对氯丙那林的溶解性、分离效果、对杂质的去除能力以及对后续检测的影响等方面。

2.4.1 DCM

二氯甲烷作为常用的一类有机溶剂，有着较强的溶解能力，并且二氯甲烷与水不相溶，这可以让我们在实验中更快速高效将氯丙那林与水分离，提高实验萃取的纯度和速率。氯丙那林具有一定的脂溶性，二氯甲烷则可以有效地将氯丙那林从马尿中萃取出来。二氯甲烷的沸点较低（39.8℃），在固液萃取完成之后比较容易通过挥发去除，不会对后面的实验结果造成偏差。

2.4.2 DCM:MeOH（75:25）

二氯甲烷有着对氯丙那林的基本溶解能力，即二氯甲烷的溶脂性，甲醇的加入则增加了洗脱溶剂的亲水性。此外，马尿中成分的化学结构和性质差异很大，这使得马尿成为一个复杂的混合物体系，但是这可以通过后续的净化步骤去除，总体上有助于提高对氯丙那林的萃取效率，增大了实验中萃取的选择性，可以使得检测结果更准确地反映马尿中氯丙那林的真实含量。

2.4.3 DCM:MeOH:$NH_3 \cdot H_2O$（75:23:2）

二氯甲烷和甲醇按比例配成的混合液为氯丙那林提供了基本的溶解能力和萃取能力。而氨水的加入则会让此溶剂呈现为碱性，氯丙那林在碱性条件中存在的形态会发生变化，这有利于氯丙那林从马尿基质中转移到有机相，提高萃取的效率。

2.4.4 DCM:MeOH:CH_3COOH（75:23:2）

乙酸的加入会使此溶剂体系呈酸性，在酸性环境下，氯丙那林可能以不同的离子形态存在，这会影响其在马尿与有机相之间的分配系数，也有利于将氯丙那林从马尿中萃取到有机相中；而且会对一些碱性杂质有抑制作用，能够使它们以盐的形式存留，提高了萃取的选择性，减少了杂质的干扰，可以让检测信号更准确地反映氯丙那林的真实含量。

3.结果与讨论

3.1 标准曲线绘制与线性范围

将配制好的一系列标准溶液，按照优化后的色谱条件进行检测，用氯丙那林的浓度作为横坐标，对应的峰面积作为纵坐标，来绘制标准曲线。利用专业绘图软件进行数据拟合，得到的标准曲线方程，相关系数用于衡量线性关系的优劣。

通过实验数据绘制出的标准曲线，如图 2 所示，呈现出良好的线性关系，相关系数为 99.38%，表明在特定的浓度范围内，氯丙那林的浓度与峰面积之间具有高度的线性相关性。根据实验结果，确定本方法测定马尿中氯丙那林的线性范围为 10ppm-100ppm，在此范围内可精准定量马尿中的

氯丙那林含量。

在此次研究实验中，当我们要建立目标物质即马尿中的氯丙那林含量与检测信号色谱峰面积之间的关系时，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，用小二乘法的方法来处理这些数据画出一条能代表这些数据的线，这条线就是标准曲线。根据下图 2 中标准曲线所得出方程式 y=6.5x-2.7922，这里 y 是峰面积，x 是样品浓度。所得出的线性关系为 $R^2 = 0.9938$，其中 R^2越接近于 1，就说明浓度与峰面积之间的关系越紧密。

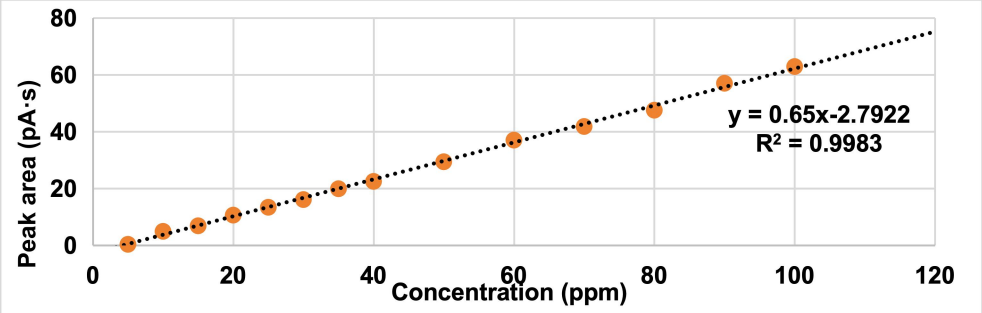


图 2 样品浓度和峰面积的标准曲线图

3.2 实验结果分析

回收率计算公式是从上面线性图表中得出的方程式 y= 6.5x-2.7922, 其中 y 即代表的是峰面积, 将峰面积 y 带入到方程式之中即可得出浓度 x, 得出浓度 x 之后再用 100ppm 除以浓度 x, 即可得出回收率，根据实验测得数据，4 组不同洗脱剂体系的峰面积及回收率结果如表 2 所示。

表2 不同洗脱剂峰面积和回收率对应关系图

序号	洗脱剂种类	峰面积 (pA·s)	回收率
1	DCM	42.83	70.14%
2	DCM: MeOH=75:25	34.36	57.15%
3	DCM:MeOH:$NH_3 \cdot H_2O$= 73:23:2	40.81	67.05%
4	DCM:MeOH:CH_3COOH =73:23:2	40.54	66.62%

极性调节对洗脱效率的影响：当在 DCM 中加入一定比例的强极性溶剂 MeOH，比例 75:25 后，目标物回收率由 70.14%显著下降至 57.15%。这表明过高的溶剂极性反而不利于氯丙那林从马尿基质中有效洗脱，或导致共萃杂质增加干扰了测定。

酸碱度调节的影响：在 DCM:MeOH 体系中分别加入 2%的氨水或乙酸调节酸碱环境后 (序号 3 和序号 4), 回收率分别回升至 67.05%和 66.62%, 说明酸碱环境的调节能够改善混合溶剂的洗脱能力，但两者的提取效率仍略低于纯 DCM。

最优条件确定：综合对比峰面积响应值与回收率数据，纯 DCM 作为洗脱剂时表现最佳，其峰面积最高 (42.83)，回收率达到 70.14%。因此，在利用全自动前处理仪对马尿中氯丙那林进行液液萃取时，建议优先选用纯 DCM 作为洗脱溶剂，不仅操作简便、无需配制混合试剂，且能获得稳定、高效的提取回收率。

3.3.检出限与定量限

以空白马尿作为基质, 配制 6 个浓度水平 (范围为 1-240μg/mL) 的基质匹配标准工作溶液进行加标分析。通过绘制标准曲线建立定量关系，其中横坐标为待测物的质量浓度，纵坐标为相应的色谱峰面积。在计算过程中，各浓度水平采用相同的权重因子。检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别基于信噪比 (S/N) 为 3 和 10 来确定。结果显示，LOD 为 0.1-0.2μg/mL，LOQ 为 1-2μg/mL。

3.4.自动前处理仪器与人工操作的对比分析

本研究阐明了自动样品前处理仪器相较于人工操作的优势。与人工操作相比，自动前处理仪器能显著降低人为误差，缩短处理时间，提高重复性及目标化合物的回收率，并确保检测过程具有更高的稳定性和可靠性。此外，该仪器还降低了劳动强度，避免了操作偏差，为马尿中氯丙那林的定量分析提供了一个更稳健、更高效的平台。

3.结论

本研究建立了一种测定马尿中氯丙那林的方

法，该方法采用固液萃取技术，并结合了自动样品前处理系统。通过严谨的实验设计与反复优化，确定了最佳的固液萃取条件，涵盖了萃取溶剂、萃取时间及萃取温度等关键参数。借助自动前处理仪器，实现了马尿样品的自动化、标准化及高通量制备，显著提升了分析效率。此外，通过对气相色谱分析条件的优化，确保了对氯丙那林的准确定性与定量分析，有效避免了假阳性或假阴性结果的出现。

参考文献：

[1]张凤妹,石云峰.复方氯丙那林溴已新胶囊溶出度测定方法的建立[J].海峡药学,2022,34(9):62-65.

[2]郭琳,孙秀菊,郭艳琼,等.动物源性食品中β-受体激动剂残留检测的方法验证[J].现代农业科技,2022,(13):167-171.

[3]王成斌,王桂云,张青,等.清肺十八味丸联合盐酸氯丙那林治疗老年咳嗽变异性哮喘并发阻塞性肺气肿临床研究[J].陕西中医,2018,39(11):1536-1539.

[4]张晓男,马智超,李要南,等.高效液相色谱-高分辨质谱法检测马尿中 20 种非甾体抗炎药禁用药物[J].化学分析计量,2026,35(2):72-80.

[5]张晓男,马智超,刘安,等.QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定马尿中 33 种非甾体抗炎药残留[J].色谱,2026,44(9):1028-1037.

[6]袁琳.马匹健康管理中智能化监测的应用与经济效益分析[J].数字农业与智能农机,2026,(4):106-108.

[7]赵天张,卢秀梅.孕马尿收集及树脂柱自动化提取集成装置开发研究[J].草食家畜,2019,(2):23-35.