

猪肉中莱克多巴胺的 GC-MS 分析

王成娟

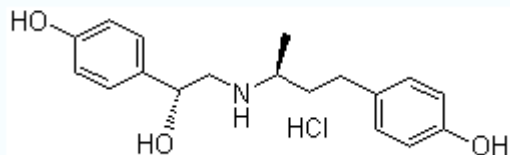
摘要: 本文建立了猪肉中莱克多巴胺的 GC-MS 分析方法。样品用高氯酸溶液匀浆, 进行超声加热提取, 在碱化的条件下用乙酸乙酯萃取, 然后用稀盐酸反萃取, 固相萃取小柱净化, 用 4% 氯化甲醇溶液洗脱, 洗脱液经氮吹仪浓缩, 经 N,O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA+TMCS 99:1) 衍生后进气质联用仪分析, 外标法定量。

关键词: 猪肉, 莱克多巴胺, GC-MS, 外标法

莱克多巴胺, 英文名称 ractopamine, 分子式 $C_{18}H_{23}NO_3$, 分子量 337.85, CAS 号 97825-27-7, 可溶于水和乙醇, 属于苯乙醇胺类的 β_2 - 肾上腺素受体激动剂, 能改变能量分配, 提高肌肉生长速度, 从而改善猪的体重和胴体瘦肉率。

β_2 - 兴奋剂的检测方法很多, 有酶联免疫法, 气质联用法, 高效液相色谱法, 液质联用法等。本文建立了猪肝中莱克多巴胺的 GC-MS 分析方法, 样品用甲醇超声提取, 提取液经固相萃取小柱净化, 净化液氮吹仪浓缩至干, 经 N,O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA+TMCS) 衍生后进气质联用仪分析, 外标法定量。

结构式:



1 实验部分

1.1 设备和试剂

设备: 气质联用仪 GC-MS3100, 分析天平 (感量: 0.0001g), 超声波仪, 酸度计, 涡旋振荡器, 固相萃取仪, 阳离子固相萃取小柱 (SCX 小柱, 60mg, 3mL), 氮吹仪, 离心机, 恒温箱; 50ml 磨口玻璃离心管, 5 ml 磨口玻璃离心管, 均具塞。10mL 磨口具塞比色管, 容量瓶, 胶头滴管, 移液枪。

所有试剂, 如未注明纯度, 均指分析纯; 所有实验室用水均为去离子水。

试剂: 莱克多巴胺标准品 (纯度 $\geq 99\%$), 甲苯 (分析纯), 衍生试剂 BSTFA+TMCS (99:1), 高氯酸, 碳酸钠, 氯化钠, 乙酸乙酯, 盐酸, 甲醇 (色谱纯), 氨水, 去离子水。

0.1 mol/L 高氯酸溶液：取 8mL 高氯酸（70%~72%）于 1L 容量瓶中，用去离子水定容即成。

0.1 mol/L 盐酸溶液：取盐酸 9mL，加水至 500mL，摇匀，即得。

30 mmol/L 盐酸溶液：取 0.2mol/L 盐酸溶液 15mL，加水至 100mL，摇匀，即得。

4% 氨化甲醇溶液：取氨水 4ml 于 100mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，混匀，即配即用。

10% 碳酸钠溶液：称取 10g 无水碳酸钠溶解于 90mL 去离子水中混匀即成。

1.2 样品前处理

1.2.1 提取

称取粉碎好的猪肉肉馅 5g（精确到 0.01g）于 50ml 离心管中，加入 10ml 0.1mol/L 高氯酸溶液，于涡旋振荡器上涡旋 1min，放入超声波仪中超声 20min，取出置于 80℃ 恒温箱中加热 30min，冷却后以 5000r/min 离心 5min，取上层清液。在残渣中再加入 10ml 0.1mol/L 高氯酸溶液，涡旋振荡 30s 后离心 5min，将两次上清液合并。用碳酸钠溶液（10%）调 PH 至 10，加入 4g 氯化钠，涡旋混匀，加入 10ml 乙酸乙酯，涡旋混合 1min，离心 5min，吸取上层有机相于另一离心管中；在残渣中再加入 10ml 乙酸乙酯，涡旋混合 1min，离心 5min，吸取上层有机相合并提取液。然后于提取液中加入 4ml 0.1mol/L 盐酸溶液，涡旋混合 1min，离心 5min，吸取下层溶液同样步骤重复萃取一次，合并两次萃取液，调 PH 至 2.0，作为备用液。

1.2.2 净化

依次用 5ml 甲醇、5ml 水、5ml 0.03mol/L 的盐酸溶液润洗阳离子固相萃取小柱，取上述备用液过柱，弃去流出液，依次用 5ml 水和 5ml 甲醇淋洗柱子，弃去流出液，再用 5ml 4% 氨化甲醇溶液洗脱，收集洗脱液。

1.2.3 衍生化

在 50℃ 下于氮吹仪上吹干上述洗脱液，加入 400 μ L 甲苯，涡旋 30s，再加入 100 μ L 衍生化试剂 BSTFA+TMCS（99:1），涡旋振荡 1min，在 80℃ 的烘箱中加热衍生 1h，完成后取出冷却至室温，待 GC-MS 分析。

1.3 标准曲线的制备

准确量取适量莱克多巴胺标准储备液于容量瓶中，用甲醇稀释成浓度为 0.05mg/L, 0.1mg/L, 0.5mg/L, 1mg/L, 2mg/L 系列标准工作溶液，各取 0.5ml 在 50℃ 下氮吹至干（与样品液同步氮吹），然后按上述衍生化步骤进行衍生。以莱克多巴胺标准溶液浓度为横坐标，相应的定量离子的峰面积为纵坐标建立标准曲线。

1.4 分析条件

色谱条件: Equity-5(30 m×0.25 mm×0.25μm)石英毛细管柱,柱前压:80Kpa, 柱流量: 1ml/min
进样口: 300℃, 柱箱: 100℃保持 1min,以 20℃/min 速率升至 290℃保持 5min。不分流进样,
分流比: 30:1,溶剂延迟: 8min。

质谱条件: EI 源, 电子能量: 70eV,离子源温度: 200℃, 接口温度: 290℃, 扫描方式: 全
扫描定性, 扫描范围: 44.5~400u; 选择离子扫描(SIM)定量,监测离子: 58,179,234,250 ;
定量离子: 58, 电子倍增器高压: 1550。

2 实验结果

2.1 标准样品谱图

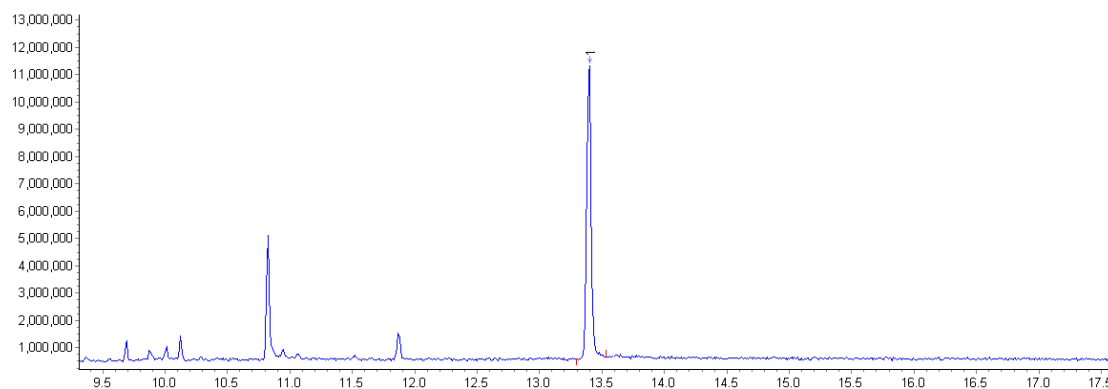


图 1 莱克多巴胺标样衍生物全扫描 TIC 图

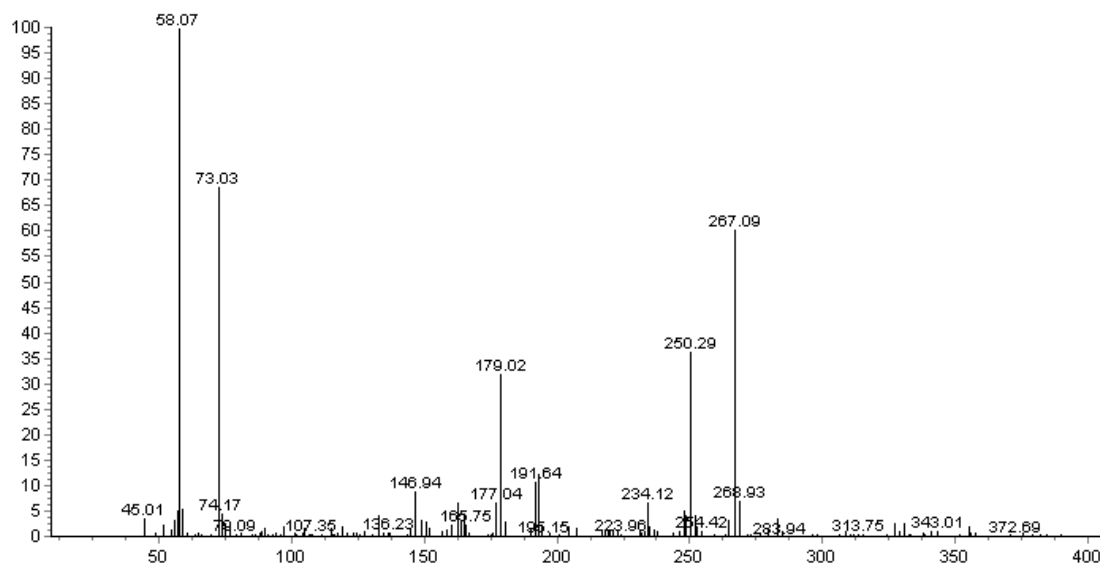


图 2 莱克多巴胺衍生物质谱图

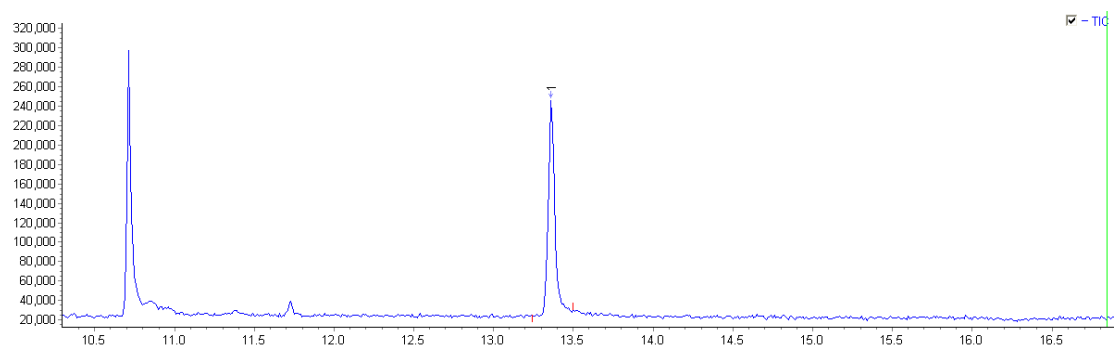


图 3 莱克多巴胺标样衍生物 SIM 扫描 TIC 图 (1ug/ml)

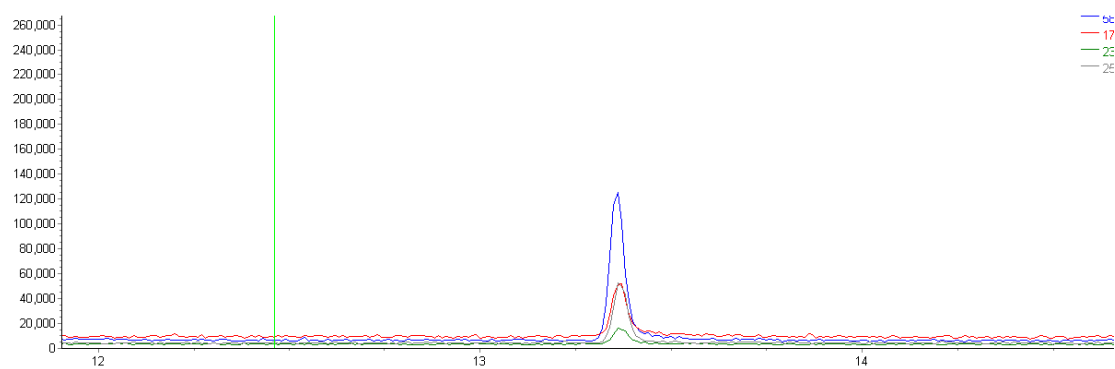


图 4 莱克多巴胺标准样品衍生物 MC 图

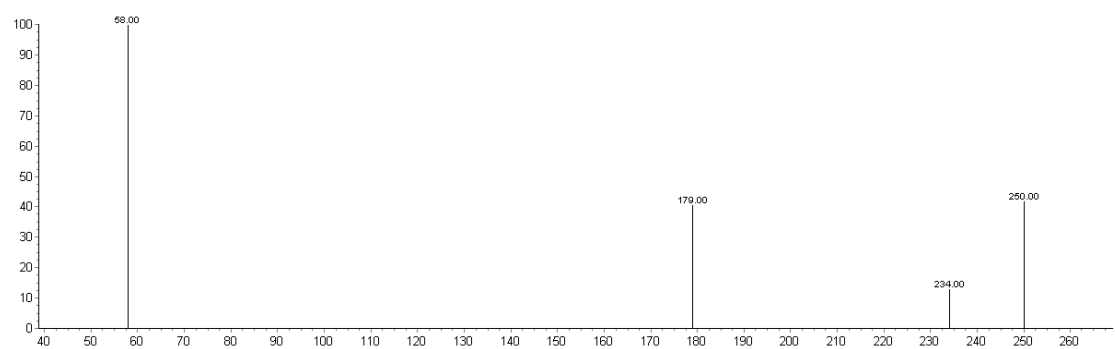


图 5 莱克多巴胺衍生物选择离子扫描质谱图

2.2 样品谱图

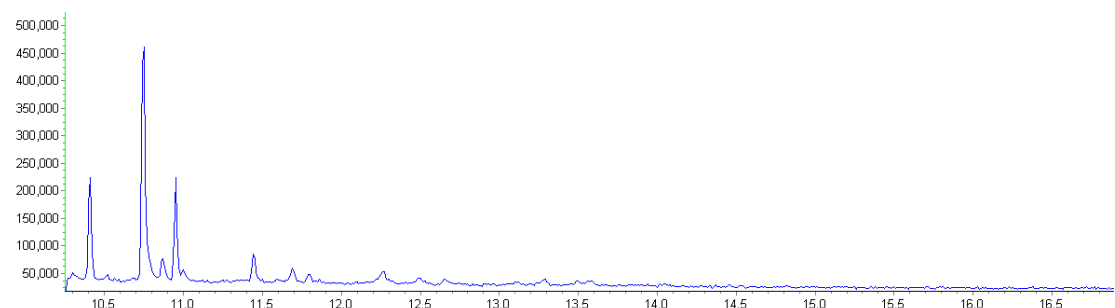


图 6 猪肉实际样品选择离子扫描 TIC 图

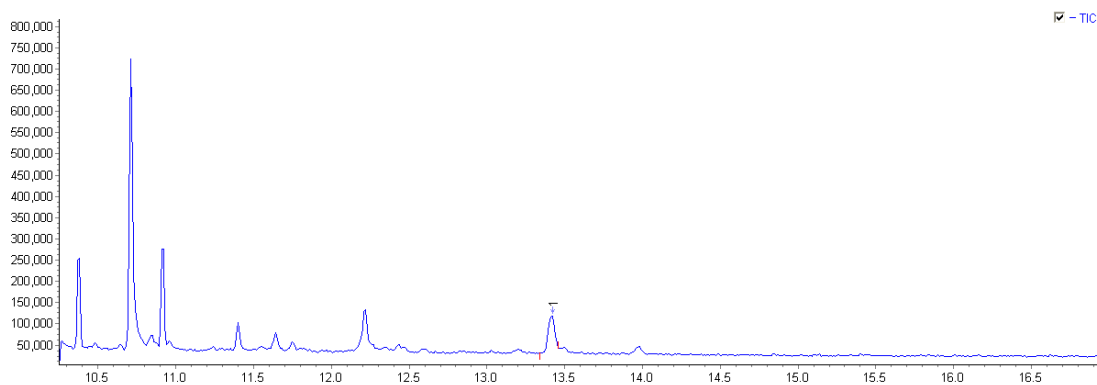


图 7 猪肉实际样品加标选择离子扫描 TIC 图 (0.05µg/g)

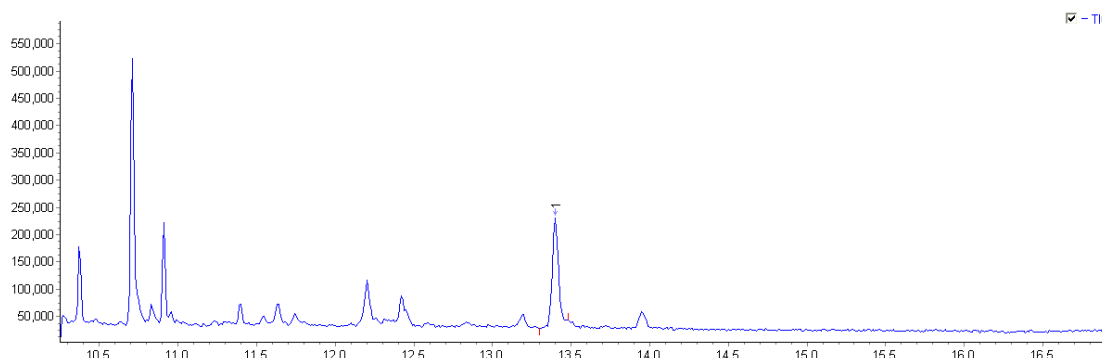


图 8 猪肉实际样品加标选择离子扫描 TIC 图 (0.10µg/g)

2.3 空白实验

除不加猪肉样品外，采用与实际样品完全相同的处理和测定步骤进行平行操作。空白实验结果谱图如下。

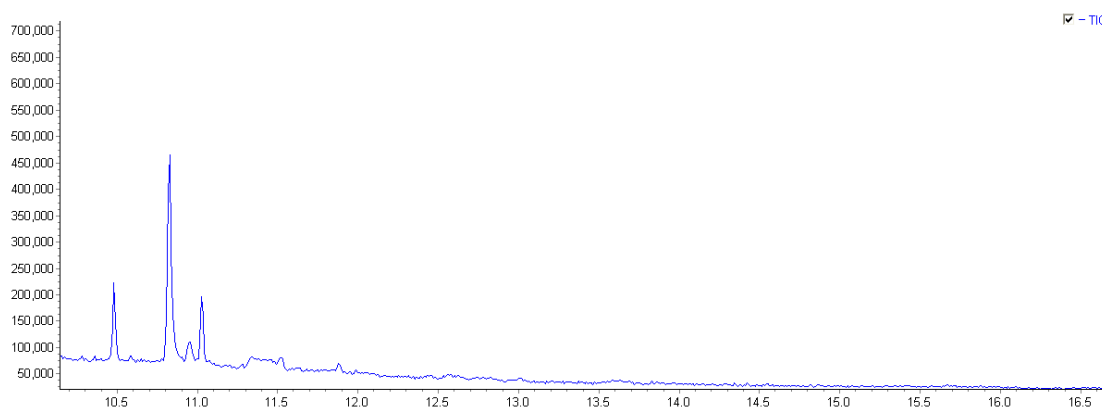


图 9 空白选择离子扫描 TIC 图

2.4 标准曲线及检测结果

以莱克多巴胺标准溶液浓度为横坐标，相应的定量离子峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线。莱克多巴胺衍生物保留时间为 13.42 min，在测定浓度范围内具有良好的线性关系，线性相关系数为 0.997，线性方程为 $y = 3E+06x + 2266.5$ ，相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，加标回收率大于 75%。此猪肉中未检出莱克多巴胺。

2.5 回收率

准确称取 5g 经绞碎过的猪肉样品，添加浓度为 0.05ug/g 、0.1ug/g，每个浓度平行两次试验，按照上述方法进行前处理，测得平均回收率分别为 76%和 80%。

3 结果与讨论

3.1 实验过程注意事项

- 1) 用氮吹仪浓缩过程中，要严格控制氮气流量，不能太大，否则样品会在氮吹的过程中损失，从而导致实验失败。
- 2) 由于衍生试剂对潮气比较敏感，因此一定要吹干，然后才能加衍生试剂衍生。空气湿度亦对实验有影响。
- 3) 衍生用的甲苯最好用无水硫酸钠除下水。
- 4) 莱克多巴胺衍生物不稳定，容易分解，不可放置时间太长。

3.2 结论

本文部分参照“农业部 958 公告-4-2007”标准，建立了猪肉中莱克多巴胺的 GC-MS 分析方法；该方法在测定浓度范围内线性关系良好，加标回收率大于 75%，精密度良好；实验结果表明，该方法适合于莱克多巴胺的定性、定量测定。