

猪肉中盐酸克伦特罗的 GC-MS 分析

王成娟

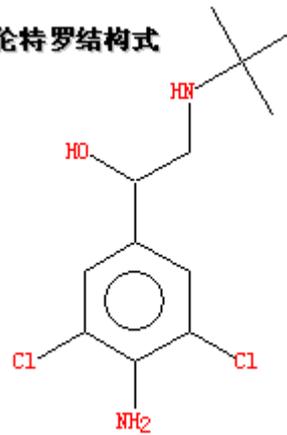
摘要: 本文参照标准“NY/T 468-2006”建立了猪肉中盐酸克伦特罗的 GC-MS 分析方法。对样品在碱化的条件下用乙酸乙酯提取,然后用稀盐酸反萃取,萃取的样液 PH 调至 5.2 后过 SCX 固相萃取小柱净化,净化液用氮吹仪浓缩,经衍生试剂(BSTFA+TMCS 99:1)衍生后,于气相色谱-质谱联用仪上进行测定;外标法定量。

关键词: 猪肉, 盐酸克伦特罗, GC-MS, 外标法

盐酸克伦特罗,属于 β_2 兴奋剂类,俗称瘦肉精,英文名称 clenbuterol,分子式 $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O \cdot HCl$, CAS 号 37148-27-9,熔点 $172 \sim 175^\circ C$,白色微结晶粉末,易溶于乙醇,甲醇,水,微溶于氯仿,不溶于苯。

克伦特罗,莱克多巴胺,沙丁胺醇,特布他林等统称为瘦肉精,均属于 β_2 兴奋剂类,其具有促进动物体内脂肪代谢,增加蛋白质合成,显著提高胴体瘦肉率的作用,因此一些不法分子受经济利益驱使将其添加入饲料中,从而达到节约成本,提高瘦肉率的目的。克伦特罗等易在动物体内残留积累,人食用了含有瘦肉精的猪肉后积累到一定程度会中毒,如心慌,心跳加快,双手发抖等症状。

克伦特罗结构式



1 实验部分

1.1 设备与试剂

1.1.1 仪器及设备

气质联用仪 GC-MS3100 (北京东西分析仪器有限公司), 固相萃取装置, 氮吹仪, 超声波仪, 离心机, 50mL 具塞 聚四氟乙烯离心管, 涡旋混合器, 恒温箱, 分析天平 (感量: 0.0001g), 移液枪(20 μ L~200 μ L, 100 μ L~1000 μ L), 离心管 (5mL,10mL), 固相萃取小柱: SCX 小柱, 60mg, 3mL

1.1.2 试剂和溶液

所有试剂, 如未注明规格, 均指分析纯。

克伦特罗标准品 (纯度 99.3%), 甲醇 (色谱纯), 正己烷, 氨水, 盐酸 (优级纯)

衍生试剂: N, O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺 (99%BSTFA) 和三甲基氯硅烷 (1%TMCS)

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。

2.5mol/L 氢氧化钠溶液: 称取氢氧化钠标准品 5g 于 50mL 容量瓶定容即成。

1.2 标准溶液配制

精确称取适量的盐酸克伦特罗标准品, 用甲醇 1mg/mL 的标准储备液。然后将储备液用甲醇稀释成浓度为 0.05mg/L, 0.2mg/L, 0.5mg/L, 1mg/L 标准系列溶液。

1.3 样品前处理

1.3.1 试样提取

称取粉碎过的猪肉试样10g, 置于50mL离心管中, 加入15mL乙酸乙酯, 再加入3mL 10% 碳酸钠溶液, 于涡旋振荡器上涡旋60s, 然后以5000r/min 的速度离心5min, 吸取上层有机溶剂于另一离心管中, 在残渣中再加入10mL 乙酸乙酯涡旋混合1min, 离心后吸取上层有机溶剂并合并提取液。在收集的有机溶剂中加入5mL 0.1mol/L 的盐酸溶液, 漩涡混合30s, 以5000r/min 的速度离心5min, 吸取下层溶液, 同样步骤重复萃取一次, 合并两次萃取液, 用2.5mol/L 氢氧化钠溶液调节PH至5.2。

1.3.2 试样净化

依次用 5ml 甲醇、5ml 水、5ml 0.03mol/L 的盐酸溶液活化固相萃取柱，然后将上述萃取液上样至固相萃取小柱中，弃去流出液，依次用 5ml 水和 5ml 甲醇淋洗柱子，在溶剂流过固相萃取柱后，抽干小柱，再用 5ml 4% 氨化甲醇溶液洗脱，收集洗脱液。

1.3.3 衍生化

在 50℃ 下于氮吹仪上吹干上述洗脱液，加入 400 μL 正己烷和 100 μL 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，同时吸取 0.5mL 标准工作液加入到 4.5 mL 4% 氨化甲醇溶液中，用氮气吹干后同样品操作，衍生化完成后冷却至室温，转移至小样品瓶中供 GC-MS 分析。

1.4 分析条件

1.4.1 色谱条件

Equity™-5(30 m×0.25 mm×0.25μm)毛细管柱，载气:氦气 (99.999%)，柱前压80KPa，

柱流量: 1.0mL/min，进样口温度:290℃，不分流进样，进样量:2uL

柱温程序：100℃保持1min，然后以20℃ / min升至220℃保持6min,然后再以20℃ / min升至290℃保持3min。

1.4.2 质谱条件

EI 源，电子能量:70eV，离子源温度:200℃，接口温度:290℃,溶剂延迟:5min,倍增器高压:1550
全扫描定性，扫描范围：50~400u。

选择离子扫描定量，监测离子：86，212，243，262；定量离子：86。

2 实验结果

2.1 标准样品衍生物谱图

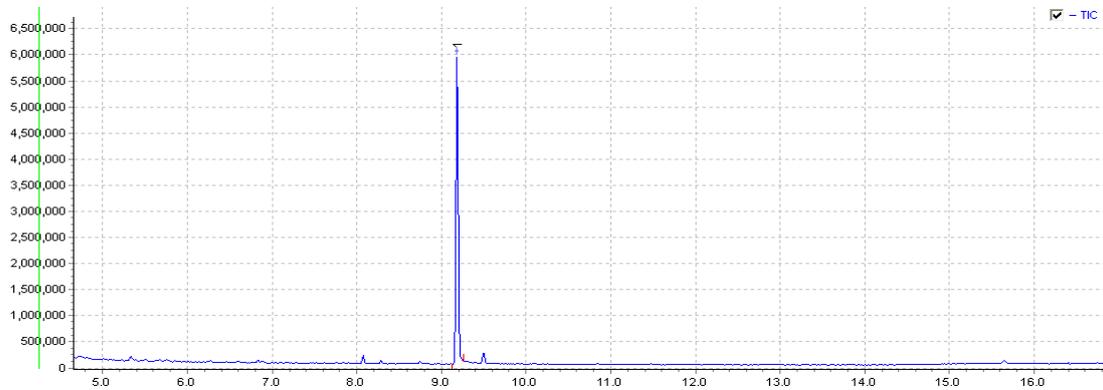


图 1 克伦特罗标样衍生物全扫描 TIC 图

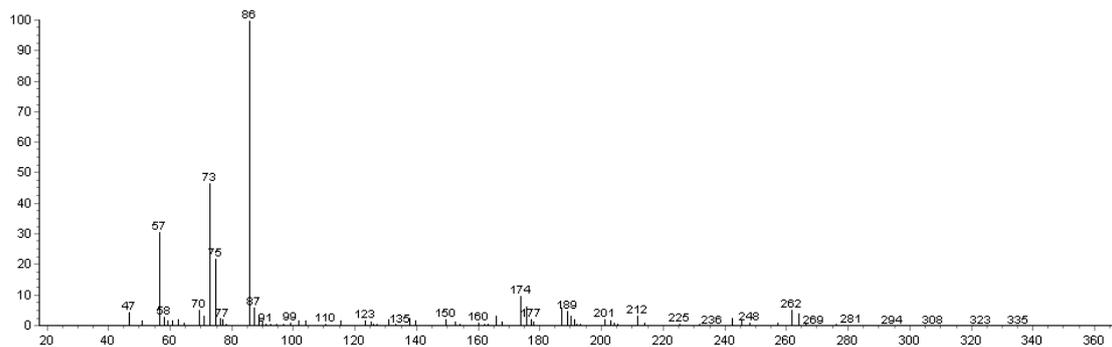


图 2 克伦特罗衍生物全扫描质谱图

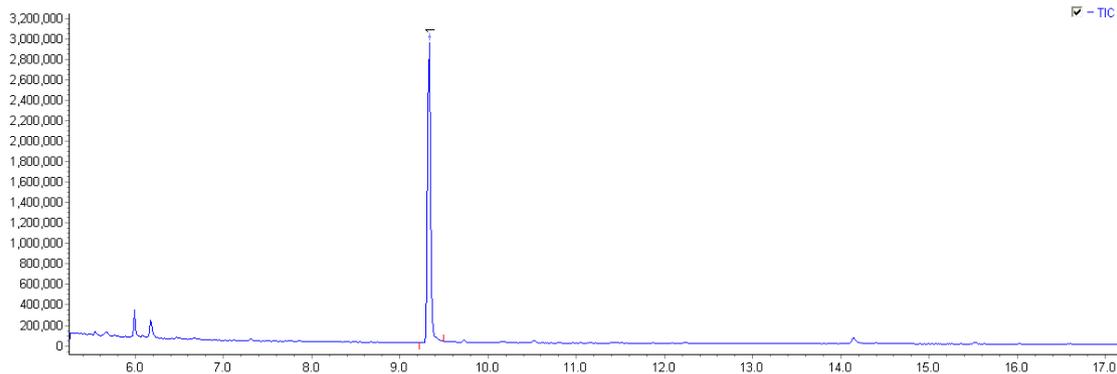


图 3 克伦特罗标样衍生物选择离子扫描 TIC 图 (1ug/mL)

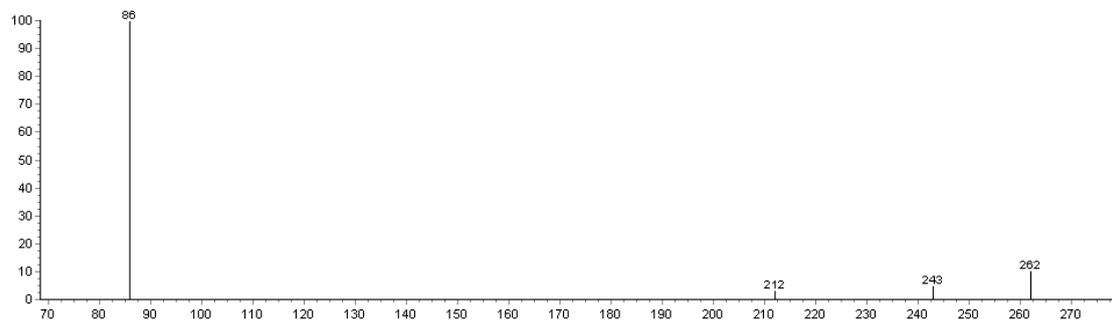


图 4 克伦特罗标样衍生物 SIM 扫描质谱图

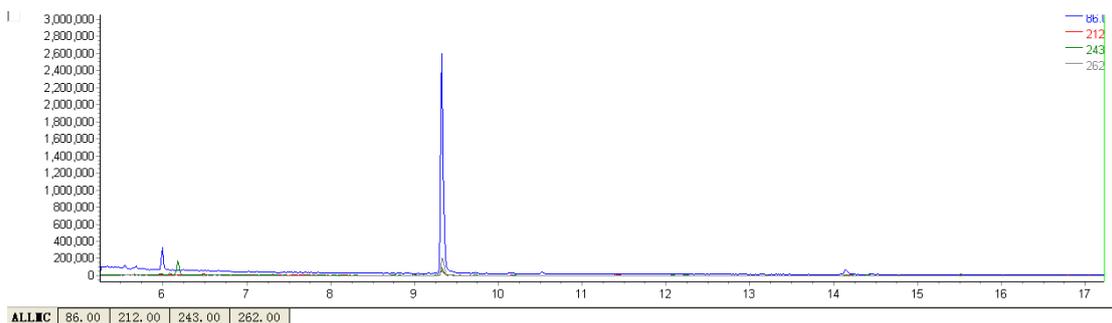


图 5 克伦特罗标样衍生物 MC 图

2.2 标准样品直接进样谱图

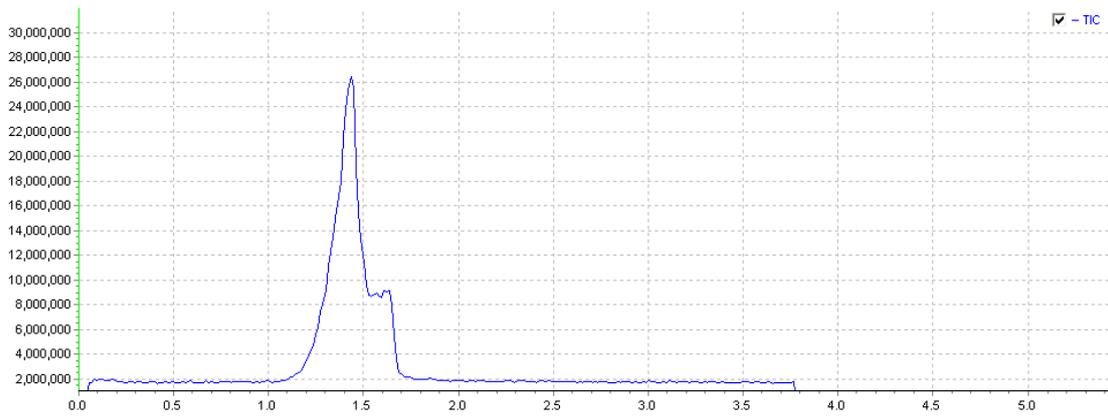


图 6 克伦特罗标样直接进样 TIC 图 (DIP-100 直接进样器分析)



Clenbuterol
 LibID:-1 分子式:C₁₂H₁₈Cl₂N₂O 分子量:276 离子数量:88
 SI%:86 CAS#:37148279 NIST#:74553

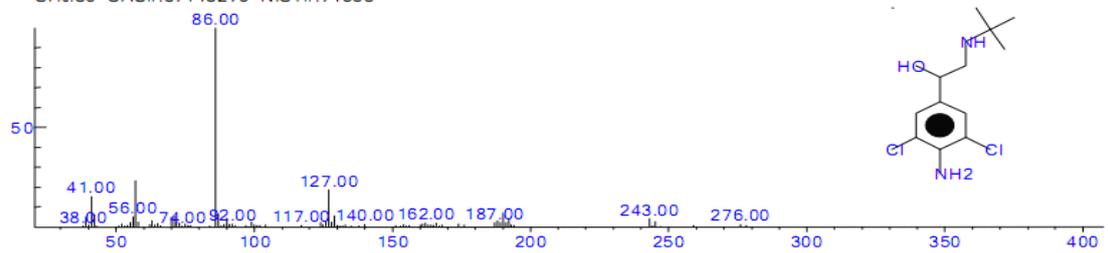


图 7 克伦特罗标准品直接进样质谱图及检索结果

2.3 样品谱图

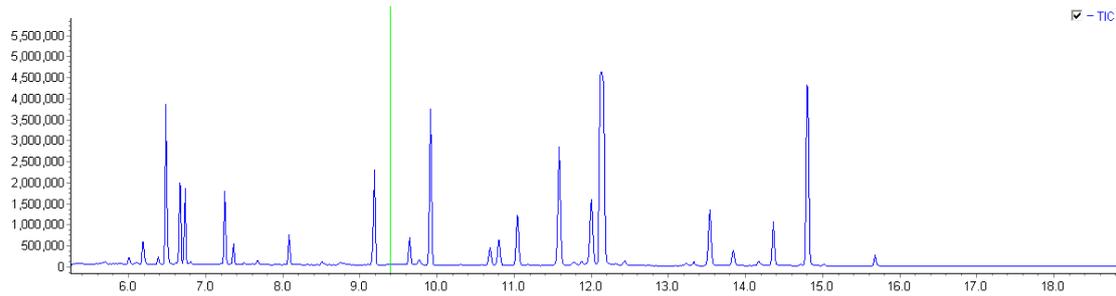


图 8 猪肉样品选择离子扫描 TIC 图

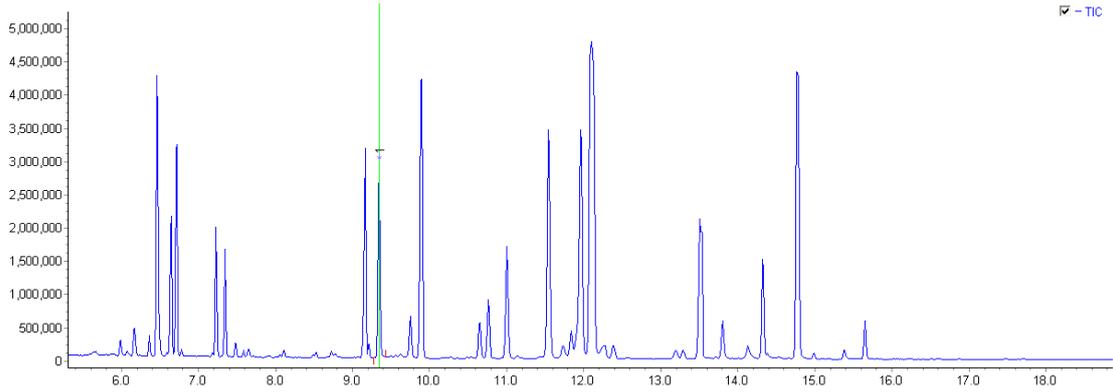


图 9 猪肉样品加标选择离子扫描 TIC 图 (0.05µg/g)

2.4 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。

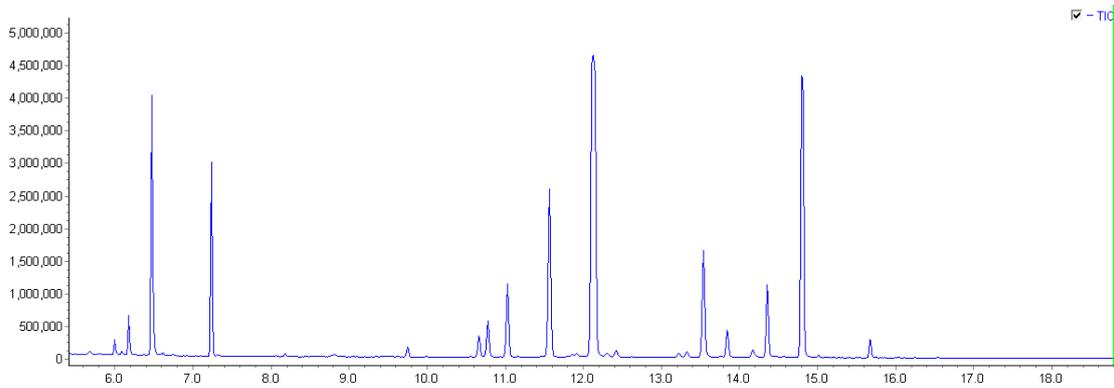


图 10 空白样品选择离子扫描 TIC 图

2.5 线性与精密度

以定量离子峰面积为纵坐标，标准样品浓度为横坐标绘制标准工作曲线，盐酸克伦特罗在测定浓度范围内线性良好，线性回归方程为 $y = 7E+06x + 1910$ ，线性相关系数为 0.9972。精密度良好，相对标准偏差 $\leq 14\%$ 。此猪肉样品中未检出盐酸克伦特罗。

2.6 回收率

准确称取 10g 经绞碎过的猪肉样品，做 0.05µg/g 浓度水平的三个平行试验，按照上述方法进行前处理，测得平均回收率为 85.2%。

2.7 实验方法探讨

2.7.1 衍生用溶剂选择

标准方法中采用甲苯作为衍生用的溶剂，但考虑到甲苯毒性比较大，故选择了比甲苯毒性小的正己烷来代替甲苯进行试验，结果表明效果良好，同时又减少了对实验人员和环境的危害。

2.7.2 实验过程中注意事项

- 1) 在衍生化过程中要注意防潮防水, 因为衍生化试剂对水敏感; 由于克伦特罗衍生物不稳定, 易分解, 故衍生化后的样品最好在 48h 内上机测试。
- 2) 氮吹过程中, 要严格控制氮气流量, 否则样品会在氮吹的过程中损失, 从而导致实验失败。
- 3) 4% 氨化甲醇溶液最好现配现用。

3 结果与讨论

本文建立了盐酸克伦特罗的 GC-MS 分析方法; 该方法在测定浓度范围内线性关系良好, 精密度良好, 实验结果表明, 在保证样品前处理成功的前提下, GC-MS3100 可以满足此方面的分析测试工作。