

气相色谱质谱联用测定猪肉中的瘦肉精的含量

GCMS-070

摘要：建立了猪肉中盐酸克伦特罗的气相色谱-质谱联用的检测方法。样品提取后，用C₁₈小柱和聚(甲基丙烯酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯)整体柱进一步富集净化，经N,O-双三甲基硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)衍生，选择离子监测方式进行气相色谱质谱测定。该方法以克伦特罗同位素(Clenbuterol-D₉)为内标，内标法定量。猪肉中克伦特罗的检出限为0.13 μg/kg，在0.5 ~ 50 μg/kg的浓度范围内具有良好的线性关系，r大于0.999。日内、日间相对标准偏差不高于20%，加标回收率大于75%。结果表明，该方法简单、快速、灵敏度高、重现性好，适用于猪肉中克伦特罗的测定。

关键词：盐酸克伦特罗 气相色谱-质谱

克伦特罗(clenbuterol)是一种β₂-受体激动剂，它可显著提高猪、牛、羊等家禽的瘦肉率和饲料转化率。但如长期食用，会在动物体内形成积累性残留，引起急性中毒。然而有些不法分子为追求经济效益，仍将其利用于畜牧业生产中。因此建立一种快速、灵敏、准确、稳定的检测方法是控制克伦特罗非法使用的迫切任务。

目前，常用的检测方法有酶免疫法、HPLC法、LC-MS法、GC-MS法等。因GC-MS法具有灵敏度高、假阳性率低的特点，常用作筛选后阳性样品的确证。本实验针对盐酸克伦特罗的化学性质，建立了C₁₈小柱和聚(甲基丙烯酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯)整体柱二维萃取的方法，本方法具有灵敏、准确、稳定的特点。

实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器：岛津GCMS-QP2010 Ultra

试剂：盐酸克伦特罗(Clenbuterol, CLB)标准品，内标(Clenbuterol-D₉, CLB-D₉)，N,O-双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)，C₁₈固相萃取小柱(100 mg, 3 mL)

标准溶液的配制：准确称取盐酸克伦特罗和内标的标准品，用甲醇配成浓度为1 mg/mL的标准储备液，放

置于4℃冰箱中避光保存，使用时用甲醇稀释成1 μg/mL的标准使用液和内标使用液。

1.2 分析条件

色谱柱：Rtx-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)

进样口温度：220℃

柱温程序：70℃(0.6 min) 25℃/min 220℃(6 min)
25℃/min 280℃(5 min)

恒线速度方式，柱流量0.9 mL/min

不分流进样，进样时间1 min

接口温度：280℃

离子源温度：200℃

溶剂切割时间：8 min

检测离子：

CLB：检测m/z 86, 187, 243, 262

CLB-D₉：检测m/z 95, 187, 262

以克伦特罗(m/z 86)与内标峰(m/z 95)的峰面积比较准定量。

1.3 样品制备

精密称取(2±0.01)g已绞碎的猪肉于具塞离心管中，加入4 mL 0.1 mol/L盐酸溶液，旋涡振荡5 min，超声10 min，12000 r/min离心5 min后，倾出上清液，沉淀再分别用0.1 mol/L盐酸4 mL，2 mL两次提取，提取方法同上，合并上清液。

将上清液全部上样至C₁₈柱，用5 mL水清洗小柱后，使用0.8 mL甲醇：20 mmol/L磷酸溶液=1:1(v/v)的酸化甲醇解析，加磷酸缓冲液调至pH=7，定容至2 mL。将该溶液以0.1 mL/min的流速推过聚(甲基丙烯酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯)毛细管整体柱萃取后，用0.2 mL的甲醇解析，加50 μL的内标使用液后以氮吹仪浓缩至干。加入100 μL甲苯和100 μL BSTFA，涡旋混匀30 s，置于微波炉中小火衍生5 min。衍生反应完成后取出冷却至室温后再加入300 μL甲苯，充分混匀，待气质联用仪进样。

分析结果

2.1 盐酸克伦特罗的GCMS测定

图1为衍生化克伦特罗和内标的质谱图，本文以克伦特罗碎片离子(m/z 86)与内标碎片离子(m/z 95)的浓度比值为横坐标，峰面积比值为纵坐标进行定量。图2为空白猪肉和添加2.5 μg/kg克伦特罗的猪肉样品提取液的离子流图，内标(Peak 1)和克伦特罗(Peak 2)的保留时间分别为9.83 min和9.92 min，空白猪肉样品在被测物及内标处均无干扰。

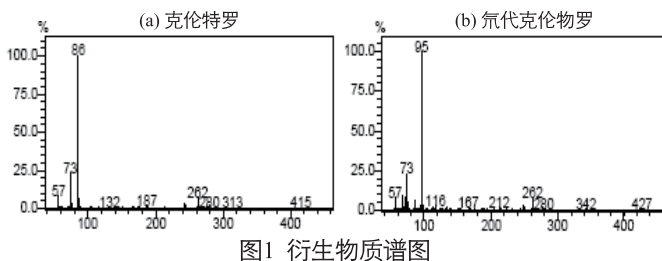


图1 衍生物质谱图

2.2 标准曲线

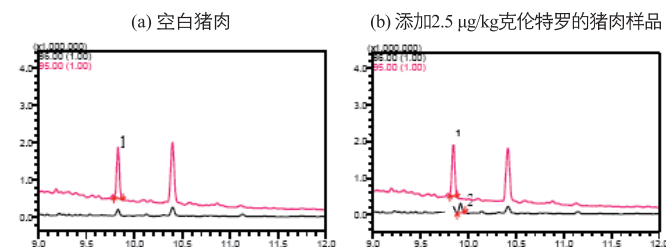


图2 GC-MS-MIC离子流图

分别添加不同体积的克伦特罗标准溶液(1 μg/mL)和50 μL内标溶液于2 g猪肉样品中(其中克伦特罗的质量分别为1, 5, 10, 20, 40和100 ng)，样品的处理方法如上所述，以克伦特罗与内标的峰面积的比值对浓度比值进行线性回归，发现克伦特罗在0.5-50 μg/kg的浓度范围内，线性关系良好，相关系数大于0.999。

2.3 检测限及精密度

以信噪比的3倍和10倍分别计算检测限和定量限，方法检测限为0.13 μg/kg，定量限为0.43 μg/kg。该方法有较好的日内及日间精密度，在定量限附近，相对标准偏差小于20%(见表1)，可满足分析要求。

表1 克伦特罗的方法学数据

添加浓度 (μg/kg)	回收率 (%)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)
0.5	76.5	14.7	19.7
5	92.3	10.8	11.7
25	80.4	4.6	5.4

2.4 实际样品分析

根据以上建立的方法，对市场上五种不同品牌的猪肉进行了分析(n=3)，其中3种未检出克伦特罗，2种猪肉中的克伦特罗超过国家标准，具体结果见表2。

表2 样品检测结果

样品	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5
平均浓度(μg/kg)	n.d.	n.d.	0.72	n.d.	1.67

注：n.d.指在本方法的仪器检测限下未检出

结论

本文建立了气相色谱质谱联用测定猪肉中盐酸克伦特罗的分析方法。该方法具有检测限低、重现性好、回收率高、样品用量少等特点，适合于猪肉样品中盐酸克伦特罗的定性、定量测定。