

气相色谱-质谱法测定鸡肉组织中残留的氯羟吡啶

刘祥国¹, 苏贻娟², 方炳虎¹, 丁焕中¹, 贺利民^{1*}, 曾振灵¹, 陈杖榴¹

(1. 华南农业大学兽医学院兽医药理研究室, 广东 广州 510642;
2. 华南农业大学农学院化学生态研究室, 广东 广州 510642)

摘要 :建立了气相色谱-质谱(GC-MS)测定鸡肉组织中氯羟吡啶残留的确证方法。采用乙腈提取鸡肉组织中的待测物,经碱性氧化铝层析柱净化,Sylon BFT衍生剂衍生后,采用选择离子监测(SIM)模式检测。对氯羟吡啶三甲基硅烷化衍生物的电子轰击(EI)质谱碎片进行解析,选择 m/z 212, 214, 248 和 263 等4个特征离子作为定性离子,其中 m/z 248 为定量离子。同时还考察了检测过程中的基质效应。氯羟吡啶衍生物的响应与其质量浓度在 5.0 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系,相关系数大于 0.998;以3倍信噪比(S/N)计算方法的检出限达 0.5 $\mu\text{g/kg}$,在 5, 10 和 20 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下鸡肉组织中待测物的平均回收率分别为 77.0%、84.5% 及 89.4%,相对标准偏差小于 6.9%。结果表明,该方法简单、灵敏、可靠,适用于鸡肉组织中氯羟吡啶残留的分析确证。

关键词 :气相色谱-质谱法;氯羟吡啶;残留;鸡肉

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)01-0086-05 栏目类别 :研究论文

Determination of clopidol residues in chicken muscle by gas chromatography-mass spectrometry

LIU Xiangguo¹, SU Yijuan², FANG Binghu¹, DING Huanzhong¹, HE Limin^{1*},
ZENG Zhenling¹, CHEN Zhangliu¹

(1. Department of Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Department of Ecology, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract : A confirmative method to determine clopidol residues in chicken muscle by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was developed. The analyte was extracted with acetonitrile, and then purified with an Alumina-B cartridge column. The drug was derived at 80 °C for 60 min with Sylon BFT, and more toluene was added and then applied to GC-MS. The mass spectral characteristics of trimethylsilyl derivative of clopidol were interpreted, and selected ion monitoring (SIM) mode was performed at m/z 212, 214, 248 and 263. The clopidol was qualitatively identified by the ratio of relative abundance of the selected ions and determined quantitatively by SIM mode at m/z 248. In the meantime, the matrix effect was evaluated. The range of linearity was 5.0 – 500 $\mu\text{g/L}$ with the correlation coefficients better than 0.998, and the detection limit was 0.5 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N = 3$) for clopidol. The average recoveries from chicken muscle fortified at 5, 10 and 20 $\mu\text{g/kg}$ were 77.0%, 84.5% and 89.4%, respectively, and the relative standard deviations (RSD) were less than 6.9%. The established method is simple, sensitive and reproducible for the identification and quantification of clopidol residues in chicken muscle tissue.

Key words : gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); clopidol; residue; chicken muscle

氯羟吡啶(即3,5-二氯-2,6-二甲基-4-羟基吡啶),其商品名为克球粉(coyden),是一种预防鸡球虫病的饲料药物添加剂,在国内养鸡业中被广泛应

用。长期使用或不按规定用药会造成氯羟吡啶在动物体内和组织中残留。近年来药物残留一直是动物及动物源产品国际贸易中令人关注的焦点之一,欧

* 通讯联系人:贺利民,硕士,副研究员. E-mail: liminokhe@scau.edu.cn.

基金项目:农业行业标准制定专项(No. 070106-69)和“十一五”国家科技支撑计划重点项目(No. 2006BAD31B06).

收稿日期:2008-07-06

盟以及美国、日本、中国都已规定并不断修订各种动物组织中氯羟吡啶残留的最高限量标准。我国规定无公害禽肉组织中其残留限量为 0.05 mg/kg^[1]。

国内外关于氯羟吡啶残留量的分析报道不多,主要有液相色谱法^[2-6]、气相色谱法^[7-11]和色谱-质谱法。气相色谱法一般通过酸酐酯化将氯羟吡啶分子中的活泼羟基去极性后形成易于汽化的衍生物,再采用电子捕获检测器检测,但衍生反应危险,重复性较差,检测时干扰多,液相色谱法一般需经两次固相萃取净化,前处理步骤繁多,灵敏度达不到现行限量要求,选择性也较差。Pang 等^[12]报道了用液相色谱-质谱检测鸡肉组织中的氯羟吡啶残留,检出限达 5 μg/kg。本研究采用气相色谱-质谱法(GC-MS)测定鸡肉组织中的氯羟吡啶残留量。通过对样品前处理方法、硅烷化衍生反应条件和气相色谱-质谱分析条件的优化以及氯羟吡啶硅醚衍生物的质谱特征离子碎裂机理的解析、测定过程中基质效应的探讨,建立了一种简单、灵敏、可靠地检测鸡肉组织中氯羟吡啶残留量的 GC-MS 确证方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

AUTOSYSTEM GC-TURBOMASS 型气相色谱-质谱联用仪(Perkin Elmer 公司);UNIVERSAL 32R 离心机(Hettich 公司);KS501 digital 轨道式摇床(IKA 公司)。

乙腈、丙酮、甲醇、乙酸乙酯和甲苯等均为分析纯(广州化学试剂厂);硫酸钠(分析纯),使用前需在马弗炉内 550 °C 条件下煅烧 4 h,然后于干燥器中冷却,过 100 目筛后备用;碱性氧化铝(分析纯),使用前需在马弗炉内 300 °C 条件下煅烧 3 h,冷却后按每 100 g 加入 5 mL 去离子水混匀,然后于干燥器中过夜,再在 105 °C 条件下活化 1 h 后备用。

标准溶液:将氯羟吡啶标准品(纯度 98%) (Sigma 公司)用甲醇配制成标准储备液。根据实验要求,用甲醇将标准储备液稀释成相应的标准工作液。

基质标准溶液:按“1.2”节所述制备鸡肉空白基质溶液,加入适量氯羟吡啶标准工作液制成基质标准溶液。此溶液和样品同步吹干、衍生、测定。

衍生剂:Sylon BFT(即体积比为 99:1 的 *N,O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷)(Lot:LB10799, Supelco 公司)。

碱性氧化铝层析柱的制备:采用具塞的玻璃柱(300 mm × 15 mm),下端带 G₃ 砂芯板;先于柱中加适量乙腈,再加入约 1 cm 高的硫酸钠,中间填充 4 cm 高的碱性氧化铝层,然后在柱上端填充 1 cm

高的硫酸钠。

1.2 样品前处理

1.2.1 提取

称取搅碎的鸡肉 5 g(精确到 0.01 g)置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 乙腈,均质 1 min,振荡 30 min。在 4 °C 条件下以 6 000 r/min 离心 10 min,倾出上清液,沉淀物用 10 mL 乙腈再提取 1 次。合并上清液,加入 5 mL 异丙醇,于旋转蒸发仪上 50 °C 水浴蒸至近干,用 5 mL 乙腈溶解。

1.2.2 净化

用 15 mL 乙腈活化碱性氧化铝层析柱后加入样品液,待其自然流干后用 10 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液。

1.2.3 衍生

用氮气小心吹干洗脱液,加入 100 μL 甲苯溶解残渣,再加入 100 μL 衍生剂,密封后于 80 °C 衍生 60 min。冷却后加 800 μL 甲苯,混匀,上机分析。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:熔融石英毛细管柱 DB-1MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);载气为高纯氦气,流量为 0.8 mL/min;不分流进样,进样量 1 μL,进样口温度 220 °C;程序升温,起始柱温 100 °C(保持 1 min),以 30 °C/min 的速率升至 200 °C,再以 5 °C/min 的速率升至 205 °C(保持 1 min),然后以 30 °C/min 的速率升至 280 °C(保持 3 min)。

1.3.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源,电子能量 70 eV;离子源温度 230 °C;接口温度 280 °C。采用选择离子监测(SIM)模式检测,定性离子为 m/z 212, 214, 248 和 263;定量离子为 m/z 248。

1.4 定性依据

在 SIM 模式下依次比较氯羟吡啶标准品和鸡肉基质中氯羟吡啶三甲基硅醚的特征离子 m/z 212 与 m/z 214 及 m/z 212、 m/z 263 与基峰 m/z 248 的相对丰度比,据此对待测物进行定性分析。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的优化

为了有效地提取鸡肉组织中的氯羟吡啶残留,采用乙腈、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷等不同有机溶剂进行提取试验。试验中发现,丙酮与乙腈的提取回收率相当,但丙酮提取液中脂肪等杂质的含量相对高些;乙酸乙酯和二氯甲烷难以从未除去水的鸡肉组织中提取氯羟吡啶,回收率低。因此,本实验最终选择乙腈作为提取溶剂。

在实验中还对市售氧化铝固相萃取(SPE)小柱(如 LC-Alumina-B, AccuBOND Alumina-B)的净化效果进行了试验,结果表明装填量在 2 g 以下的商品 SPE 小柱都不能很好地保留待测物。为此,采用自装填氧化铝层析柱净化提取试液,并对装填氧化铝层分别为 2, 3, 4 和 5 cm 等 4 个不同高度的自装填氧化铝层析柱进行比较,取 100 $\mu\text{g/L}$ 基质匹配标准溶液 5 mL 过柱,回收率试验结果见图 1。结果发现,氧化铝层为 2 cm 和 3 cm 高的层析柱回收率较低,4 cm 和 5 cm 高的层析柱回收率高,二者差异不明显,洗脱液也相对干净。因此选择氧化铝层的填充高度为 4 cm。实验同时发现,在一定的上样量条件下,层析柱的内径大小(1.5 mm 与 1.0 mm)对实验结果无显著影响。

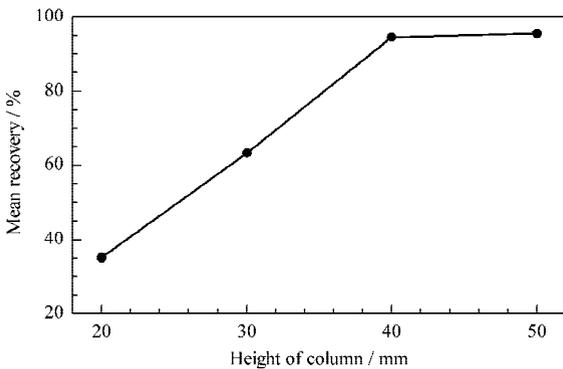


图 1 氧化铝层高度对回收率的影响($n=5$)

Fig. 1 Effect of the height of Alumina-B column on the recovery of clopidol in chicken muscle tissue ($n=5$)

2.2 衍生化方法的选择

氯羟吡啶极性较大,挥发性低,必须通过衍生化反应转化为稳定的、易汽化的衍生物,才能进一步进行 GC-MS 分析。此外,衍生化还能增加检测的灵敏度和选择性。文献报道氯羟吡啶衍生化过程多采用重氮甲烷化^[7]或酸酐衍生化^[10,11],操作危险、繁琐,选择性也差。为了使衍生过程操作简单快速、有效安全,实验中选择硅烷化试剂为衍生剂,比较了 Sylon HTP, BSTFA(即 *N,O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺)及 Sylon BFT 硅烷化试剂对氯羟吡啶的衍生效果。其中 Sylon HTP 体系反应剧烈,受环境湿度影响大,重复性差;BSTFA 及 Sylon BFT 体系反应温和,都可获得满意结果。为了有效地衍生鸡肉基质中的氯羟吡啶,实验最终选择活性更强的 Sylon BFT 作为衍生剂,并对衍生反应条件进行了优化。实验中还考察了反应温度(60, 70, 80 及 90 $^{\circ}\text{C}$)、反应时间(20, 40, 60 及 80 min)、衍生剂用量(50, 100 及 150 μL)及甲醇、乙腈、己烷和甲苯等为溶剂对衍生化的影响。结果发现,衍生前在 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预处

理样品试管 5 min,可有效地提高衍生反应效率和获得稳定的平行测定结果。各温度下衍生反应 20 min,各项测定结果明显偏低,回收率小于 70%;当反应时间为 40 min 时衍生反应已基本完成,回收率达 95%;反应时间为 60 min 时可确保获得稳定的衍生结果。衍生剂用量为 50 μL 时测定结果不稳定,特别是对于油脂含量相对较高的试样;衍生剂用量为 100 或 150 μL 时测定结果没有显著差异。溶剂甲醇本身可与衍生剂反应,而已烷、乙腈因沸点相对较低,在衍生和检测过程中有可能挥发而影响分析结果;甲苯是较好的衍生溶剂。为此,本实验确定以甲苯为溶剂,采用 Sylon BFT 为衍生剂(其用量为 100 μL),在 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下衍生反应 60 min。

2.3 分析参数的确定

实验中对 DB-5MS(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)与 DB-1MS(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)毛细管色谱柱对氯羟吡啶硅烷化衍生物的分离情况进行了考察。用 DB-5MS 柱分离时,在氯羟吡啶衍生物附近有一个较大的色谱峰,影响其定量;而用 DB-1MS 柱可以很好地将其他杂质与氯羟吡啶衍生物分离,灵敏度也较 DB-5MS 柱高,所以最终选择 DB-1MS 柱作为分离分析柱。在程序升温试验中,选择起始温度 100 $^{\circ}\text{C}$,既可保证溶剂在 3 min 内出峰,保护离子源灯丝,又可加快氯羟吡啶衍生物的出峰,减少分析时间,提高灵敏度;选择 205 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温 1 min,可确保氯羟吡啶衍生物出峰时基线不漂移。通过对氯羟吡啶硅醚衍生物全扫描获得 EI 质谱图(见图 2),其特征碎片离子归属 m/z 263 为分子离子,基峰 m/z 248 为分子失去 1 个甲基($-\text{CH}_3$), m/z 212 为 m/z 248 进一步脱去 1 个氯原子($-\text{Cl}$), m/z 214 为 m/z 212 的 ^{37}Cl 同位素峰。为此,选择 m/z 212, 214, 248 及 263 特征离子,采用 SIM 模式对氯羟吡啶进行定性和定量分析。

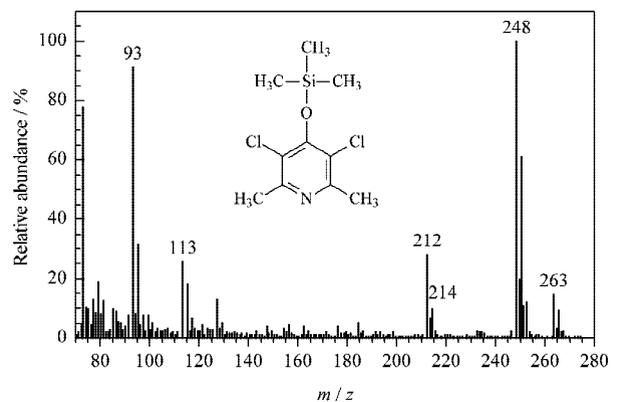


图 2 氯羟吡啶三甲基硅醚衍生物的质谱图
Fig. 2 Mass spectrum of trimethylsilyl derivative of clopidol

2.4 定性分析

实验得到的定性分析结果见表 1。由表 1 的数据可见,在 25、50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 3 种添加水平条件下,在纯溶剂和鸡肉基质中各特征碎片离子(m/z

212 与 m/z 214 及 m/z 212、 m/z 263 与基峰 m/z 248)的相对丰度比都符合 2002/657/EC 规定的要求^[13],检测结果在允许的偏差范围内。其典型的离子流色谱图见图 3。

表 1 GC-MS 对鸡肉组织中氯羟吡啶的确证分析结果($n=5$)

Table 1 Summary of qualitative analysis of clopidol in chicken muscle tissue by GC-MS ($n=5$)

Analyte	characteristic ions (m/z)	The relative abundance ratio of the characteristic ions/%					Difference in the ratio /%	Requirements* to difference in the ratio/%
		25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	mean	RSD		
Clopidol in pure reagent	212/214	36.7	39.1	37.4	37.7	3.2	3.7	± 25
	212/248	28.8	29.6	30.1	29.5	2.4	-2.4	
	263/248	14.0	15.2	13.3	14.2	7.0	7.0	± 30
Clopidol in chicken muscle tissue	212/214	38.7	37.5	36.1	37.4	3.5	3.5	± 25
	212/248	28.1	31.4	30.6	30.0	5.7	-6.3	
	263/248	14.6	14.1	15.3	14.7	4.1	4.1	± 30

* Regulation in 2002/657/EC.

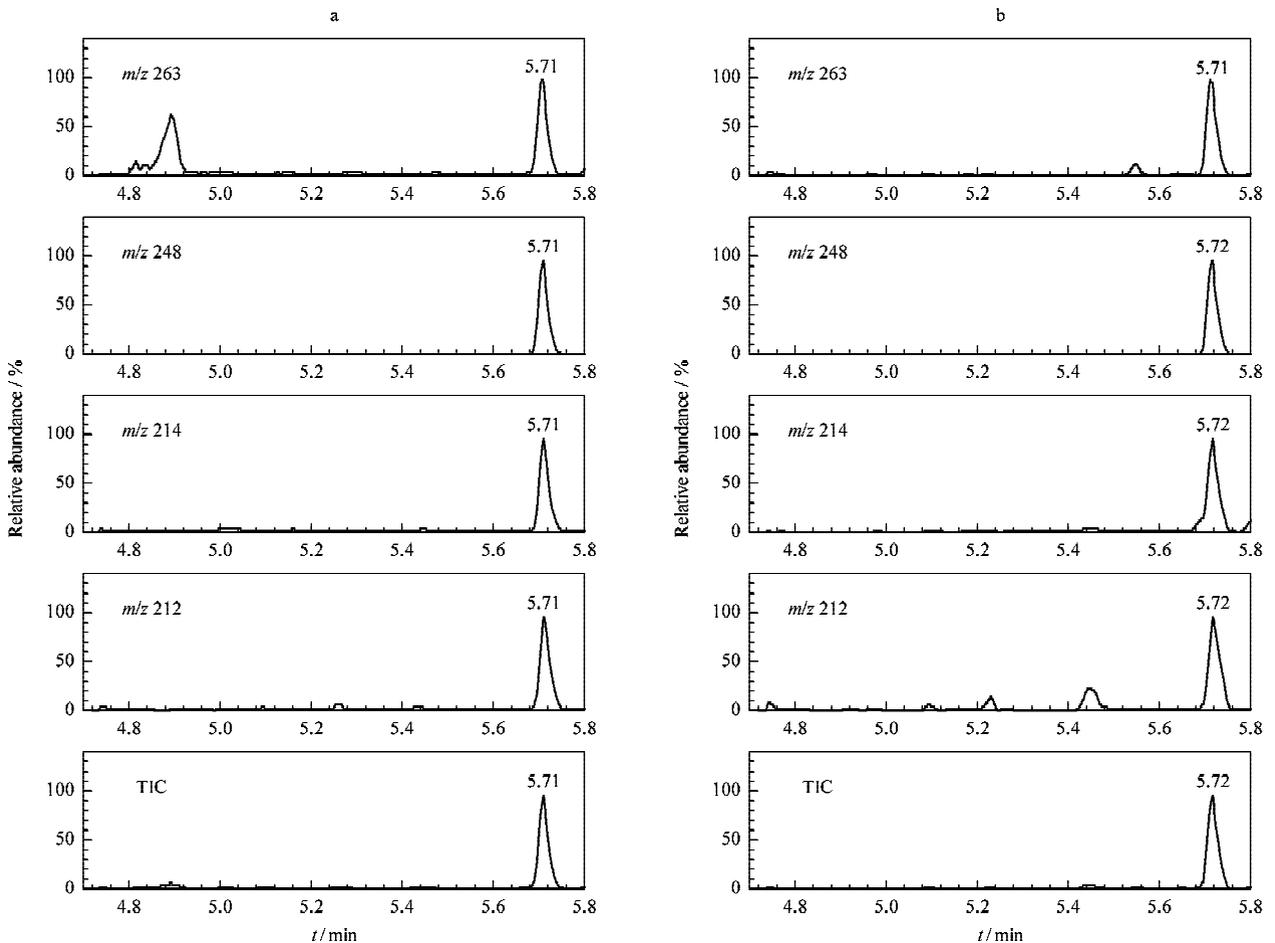


图 3 (a)标准溶液和(b)阳性鸡肉组织试样溶液中氯羟吡啶三甲基硅醚衍生物的总离子流图 and 选择离子色谱图

Fig. 3 Chromatograms of total ion current (TIC) and selected ions of clopidol derivative in (a) standard solution and (b) a typical chicken muscle tissue sample

2.5 基质效应及其补偿

基质效应一般指样品中除了待测物以外的其他基质成分对待测物测定值的影响^[14]。基质成分引起的分析物响应增强效应是严重影响定量准确度的主要问题之一。实验中考察了不同浓度水平的氯羟

吡啶在鸡肉基质提取溶液中的响应情况与纯溶剂中的响应情况(见图 4),发现随着氯羟吡啶浓度的增加,基质效应愈加明显。为了补偿基质效应和提高测定结果的准确度,本实验采用基质标准溶液进行回收率计算。

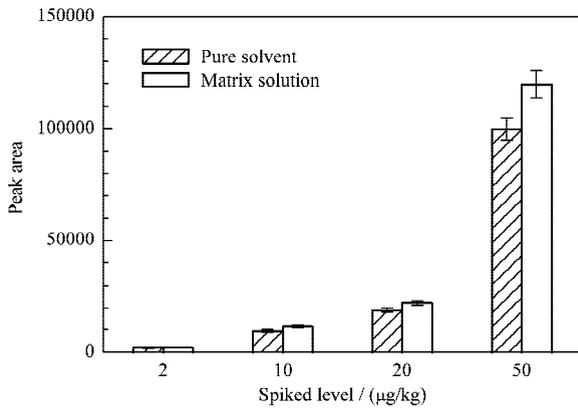


图 4 在甲苯纯溶剂和鸡肉基质标准溶液中氯羟吡啶三甲基硅醚衍生物的选择离子(m/z 248)色谱峰面积的比较

Fig. 4 Peak areas of trimethylsilyl derivative of clopidol (m/z 248) in pure solvent and in matrix-matched standard solution by spiking the clopidol

2.6 方法的评价

2.6.1 线性范围与检出限

准确配制 6 个浓度梯度(5, 10, 20, 100, 250 和 500 $\mu\text{g/L}$)的氯羟吡啶基质标准溶液,求得回归方程为 $y = 998.0x + 108.1$,其中 y 代表氯羟吡啶的峰面积, x 代表氯羟吡啶的质量浓度($\mu\text{g/L}$),相关系数 $r = 0.998$ 。结果表明,氯羟吡啶在 5.0 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内的线性关系良好。以 3 倍信噪比计算方法的检出限,鸡肉组织中氯羟吡啶的检出限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$,远低于我国规定的无公害食品禽肉中氯羟吡啶的残留限量(0.05 mg/kg)。

2.6.2 回收率和精密度

以不含氯羟吡啶的鸡肉作为基质,在 5, 10 及 20 $\mu\text{g/kg}$ 低、中、高 3 个添加水平下进行回收率试验,每个添加水平下平行测定 3 次,3 日内重复测定 5 次。氯羟吡啶的批内平均回收率为 71.2% ~ 95.2%,相应的相对标准偏差(RSD)为 1.0% ~ 8.4%,氯羟吡啶的批间平均回收率分别为 77.0%, 84.5% 及 89.4%,RSD 分别为 6.9%, 5.5% 和 5.3%。

2.7 方法的应用

将该方法用于 20 个市售鸡肉样品的检测,其中 4 个试样中检出目标物残留,其含量为我国规定的氯羟吡啶残留限量(0.05 mg/kg)的 2 ~ 50 倍。

3 结论

通过实验获得了氯羟吡啶三甲基硅醚衍生物的 EI 质谱结果,并对其特征碎片离子进行了归属。本实验方法的样品前处理简单易行,利于推广;使用 Sylon BFT 为衍生剂,采用选择离子监测模式,大大提高了检测灵敏度;使用基质标准溶液进行校准,避免了基质效应对检测结果的影响,提高了测定结果的准确度。建立的方法可以用于禽肉中氯羟吡啶残留量的快速检测与确证。

参考文献:

- [1] NY 5034-2005
- [2] Zhang R, Duan H A. Chinese Journal of Veterinary Drug (张睿, 段宏安. 中国兽药杂志), 2002, 38(5): 39
- [3] Pang G F, Cao Y Z, Fan C L, et al. J AOAC Int, 2001, 84: 1347
- [4] Wang H, Gan Y R. Journal of Anhui Agricultural Sciences (王惠, 甘一如. 安徽农业科学), 2007, 35(15): 4410
- [5] Pi X E, Ying Y F, Fei D B, et al. Acta Agriculture Zhejiang (皮雄娥, 应永飞, 费笛波, 等. 浙江农业学报), 2005, 17(4): 200
- [6] GB/T 20362-2006
- [7] Horwitz W. J AOAC Int, 1980, 13: 13
- [8] Suzuki E, Matsuda M, Momose A. J AOAC Int, 1980, 63: 1211
- [9] Mu J, Rong H, Chen M Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (牟峻, 荣会, 陈明岩, 等. 色谱), 1996, 14(6): 478
- [10] Dusi G, Faggionato E, Gamba V. J Chromatogr A, 2000, 882(1/2): 79
- [11] SN/T 0212.3-1993
- [12] Pang G F, Cao Y Z, Fan C L, et al. J Chromatogr A, 2000, 882: 231
- [13] EC Decision 2002/657. Off J Eur Commun, 2002, L221: 8
- [14] He L M, Liu X G, Zeng Z L. Chinese Journal of Chromatography (贺利民, 刘祥国, 曾振灵. 色谱), 2008, 26(1): 98