

气相色谱 - 质谱法测定动物源性食品中的氯羟吡啶残留

吕建霞 余翀天

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

单四级杆质谱仪；兽药；碱性氧化铝小柱；TG-5MS 色谱柱

目标

建立高效的气相色谱质谱检测方法，灵敏、快速测定动物源性食品中的氯羟吡啶的残留量

样品中的氯羟吡啶用乙腈提取，经碱性氧化铝小柱净化，衍生后气质联用仪分析

方法检出限远远低于食品安全国家标准中规定的氯羟吡啶最大残留限量 10 μ g/kg

引言

氯羟吡啶（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，氯羟吡啶对 9 种鸡艾美耳球虫的防治均有良好效果且价格便宜，因此在畜禽生产中应用广泛，但长期使用或不按照规定使用将会造成氯羟吡啶在动物性食品中残留。有研究显示氯羟吡啶具有一定的致畸性和胚胎毒副作用^[1]，现在，欧盟已全面禁止氯羟吡啶在动物性食品生产中使用，日本也禁止氯羟吡啶用于家禽。我国规定氯羟吡啶在鸡肉中的残留限量为 10 μ g/kg^[2]，牛奶中为 20 μ g/kg^[3]。

目前，有关动物组织中氯羟吡啶残留的检测方法报道较多，主要有气相色谱法^[4]、高效液相色谱法^[5-8]、气相色谱质谱法^[9-10]、液相色谱串联质谱法^[11]等。本研究建立了一种简单、灵敏、可靠的检测动物源性食品中氯羟吡啶残留量的方法。方法检出限为 5 μ g/kg，远远低于我国对鸡肉和牛奶中氯羟吡啶的限量要求。



仪器

Trace1310-ISQ 气相色谱质谱联用仪，配 EI 源（Thermo Scientific）；AS1310 自动进样器（Thermo Scientific）

恒温干燥箱（Thermo Scientific）

离心机（Thermo Scientific）

天平

漩涡混合器（Thermo Scientific）

耗材

色谱柱：TG-5MS（30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m）（Thermo Scientific, PN: 26098-1420）

碱性氧化铝固相萃取小柱：2g, 6mL

试剂与标准品

氯羟吡啶标准品：含量 \geq 99%；

甲苯、乙腈、甲醇均为色谱纯（ThermoFisher）；无水硫酸钠：优级纯，使用前在马弗炉内 450 $^{\circ}$ C 灼烧 4h，于干燥器中冷却备用；氯化钠：分析纯；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）

标准溶液的制备

储备液：准确称取 10.0mg 氯羟吡啶标准品，用甲醇溶解稀释并定容至 100mL，得到 100mg/L 标准储备液，储存在冰箱中备用。

标准中间液：准确移取氯羟吡啶储备液 1mL，用甲醇稀释定容至 10mL，得浓度为 10mg/L 的标准中间液。

样品前处理

鸡肉样品：称取 2.0 g 于 50 mL 离心管中，加入乙腈 10 mL，于漩涡混匀器上振荡 1 min，再加入氯化钠 1.0 g，继续振荡 1 min。于 10000 rpm 离心 10 min，取上清液 2.5 mL 待净化。碱性氧化铝小柱（2g，6mL）上层填入 1.0g 无水硫酸钠，先用 5mL 甲醇、5mL 乙腈活化，然后加入待净化的样品，再用 10mL 甲醇洗脱，用试管接收甲醇洗脱液，将洗脱液在 55℃ 下氮气吹干。待衍生。

牛奶样品：称取样品 1.0g 于 50 mL 离心管中，加入乙腈 5mL，于漩涡混匀器上振荡 1 min，再加入氯化钠 1.0 g，继续振荡 1 min。于 10000 rpm 离心 10 min，取上清液 2.5 mL 待净化。碱性氧化铝小柱（2g，6mL）上层填入 1.0g 无水硫酸钠，先用 5mL 甲醇、5mL 乙腈活化，然后加入待净化的样品，再用 10mL 乙腈淋洗小柱，待自然流下近干后用 10mL 甲醇洗脱，用试管接收甲醇洗脱液，将洗脱液在 55℃ 下氮气吹干。待衍生。

衍生：在上述试管中加入 100 μ L 甲苯溶解残渣，再加入 100 μ L 衍生试剂，密封后于 80℃ 衍生 60min，冷却后加入 800 μ L 甲苯，混匀后过 0.22 μ m 滤膜，待 GCMS 分析。

实验条件

色谱柱：TG-5MS（30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m）；
柱温：90 $^{\circ}$ C（1 min），30 $^{\circ}$ C /min 到 200 $^{\circ}$ C，5 $^{\circ}$ C /min 到 205 $^{\circ}$ C（1min），30 $^{\circ}$ C /min 到 280 $^{\circ}$ C（10 min）；
进样模式：不分流进样，不分流时间为 1min；进样量：2 μ L；
进样口温度：250 $^{\circ}$ C；
载气：氦气（99.999%），恒流模式，1 mL/min；
质谱离子源温度：300 $^{\circ}$ C，传输线温度：300 $^{\circ}$ C；
扫描模式：选择离子监测模式，m/z=248, 263, 212, 214，定量离子为 248

结果与讨论

前处理条件的优化：采用乙腈为提取溶剂，提取效率较高，加入氯化钠使乙腈与水分层，避免水对后续分析的影响。用碱性氧化铝小柱净化时，用甲醇洗脱氯羟吡啶，可得到满意的回收率。

仪器分析方法优化：以全扫描的方式对氯羟吡啶三甲基硅醚衍生物进行测定，得到其质谱图（图 1）。根据其全扫描质谱图和保留时间，选择氯羟吡啶衍生物的定性和定量的特征目标监测离子。测定时，可根据标准物和待测物的定量离子流图中的峰面积，外标法定量。确证时，可根据碎片离子及其丰度比作为其阳性判别的依据。在选定的色谱条件下，标准品衍生后得到产物的色谱图见图 2。

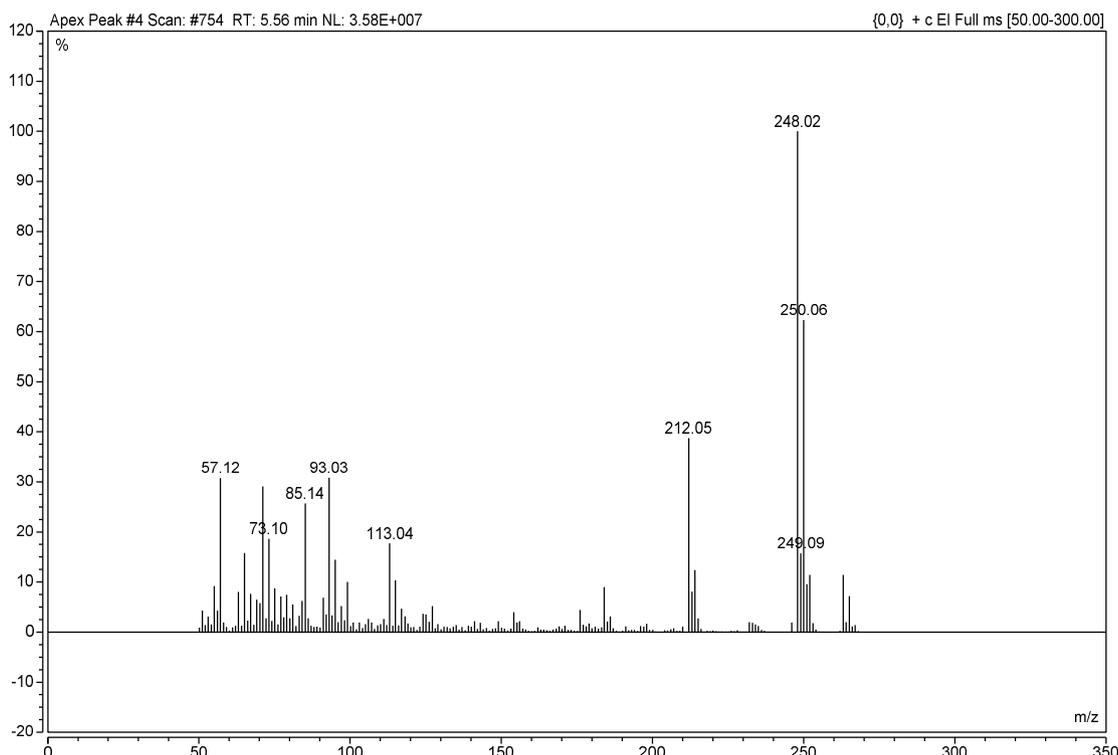


图 1. 氯羟吡啶的三甲基硅醚衍生物的质谱图

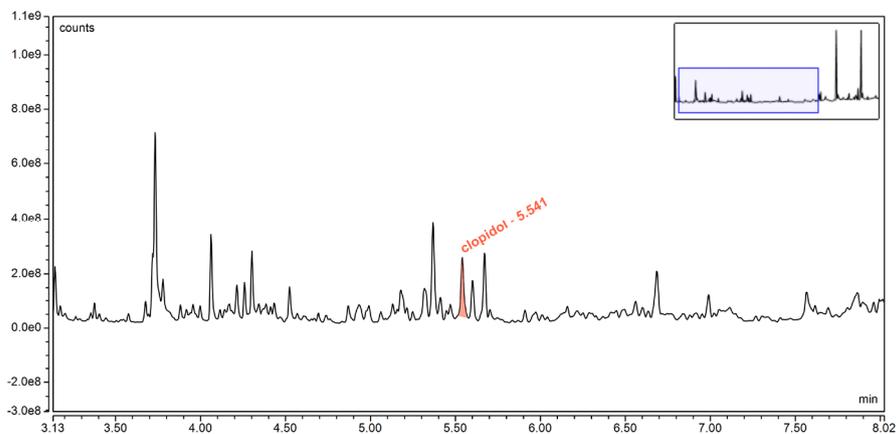


图 2. 氯羟吡啶标准溶液衍生后的全扫描谱图

线性关系及测定低限: 准确移取氯羟吡啶标准溶液适量, 氮气吹干后按上述步骤进行衍生, 得到浓度为 0、2.5、5、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ 的一系列标准工作液, 供气相色谱质谱测定。以测定峰面积为纵坐标, 对应的标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线如图 3。方法检出限以 3 倍信噪比计算得到, 本方法的测定低限为 5 $\mu\text{g/kg}$ 。

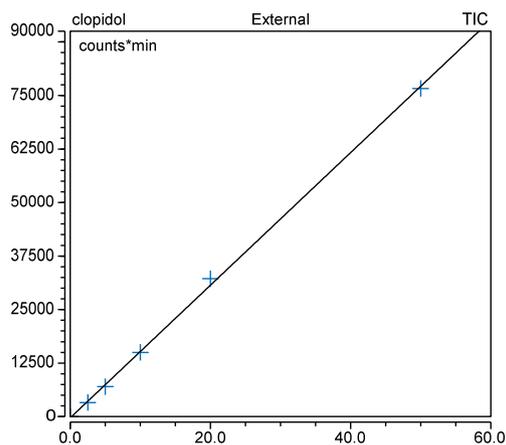


图 3. 氯羟吡啶三甲基硅醚的线性情况

回收率及精密度实验: 用标准添加法, 在空白样品中, 添加氯羟吡啶标准溶液, 做加标回收实验, 按规定方法进行提取、净化和测定, 添加浓度为 5 $\mu\text{g/kg}$ 、20 $\mu\text{g/kg}$ 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 三个水平, 各做 3 个平行, 空白样品、添加谱图见图 4, 结果见表 1。

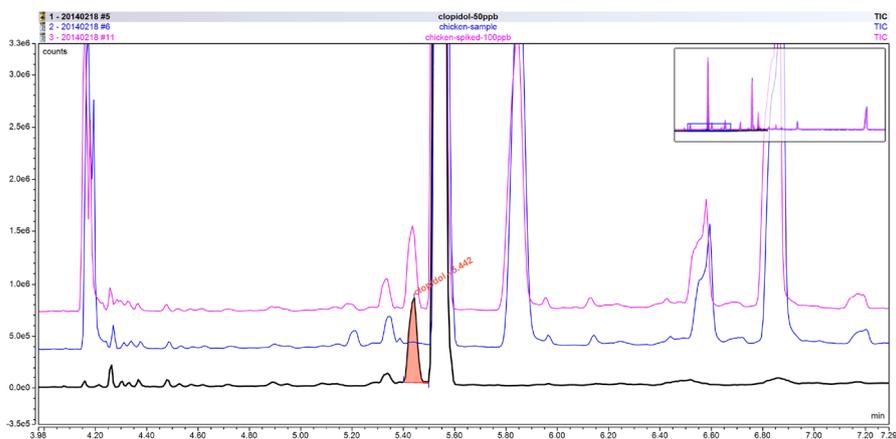


图 4a. 牛奶样品空白和样品加标谱图 (黑色为标准溶液衍生产物谱图, 蓝色为样品空白, 紫色为样品加标)

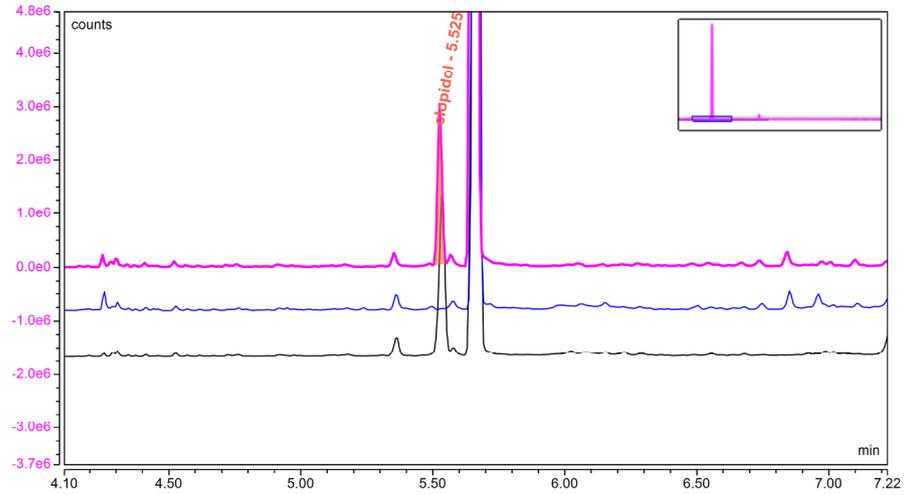


图 4b. 鸡肉样品空白和样品加标谱图（黑色为标准溶液衍生产物谱图，蓝色为样品空白，紫色为样品加标）

表 1a. 空白牛奶样品添加实验回收率和精密度

	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	5.0	20.0	100.0
1	2.8	17.58	72.1
2	3.2	18.46	74.4
3	3.6	15.79	73.2
4	3.1	17.54	74.6
5	2.7	17.14	72.6
平均值	3.08	17.30	73.38
RSD (%)	11.57	5.62	1.49
平均回收率 (%)	61.60	86.51	73.38

表 1b. 空白鸡肉样品添加实验回收率和精密度

	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	5.0	20.0	100.0
1	4.22	19.18	99.34
2	4.56	21.14	97.45
3	4.37	20.65	102.21
平均值	4.38	20.32	99.67
RSD (%)	3.89	5.02	2.40
平均回收率 (%)	87.67	101.62	99.67

结论

动物源性样品中的氯羟吡啶用乙腈提取后，碱性氧化铝小柱净化后，经过衍生，采用赛默飞世尔新型的气相色谱质谱仪检测和确证，外标法定量。结果表明，方法的平均回收率为61.60-101.62%，3次平行测定的RSD值 \leq 11.57%，方法测定低限为5 μ g/kg。此法操作简单，科学准确，灵敏度高，能够满足动物源性食品中氯羟吡啶的残留分析要求。

参考文献

- [1] 姜中其, 包鸿俊, 史晓丽. 氯羟吡啶的特殊毒性 - 致畸作用. 中国兽医学报, 1999, 19(4): 390-392
- [2] 庄天忌. 各国食品和饲料中农药兽药残留限量大全. 北京: 中国对外经济贸易出版社, 1995: 983
- [3] 农业部畜牧兽医局. 农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量: 续. 中国兽药杂志, 2003, 37(3): 5-11
- [4] Suzuki E, Matsuda M, Momose A, et al. Improved method for gas chromatographic determination of clopidol in chicken tissues. J Assoc of Anal Chem, 1980, 63: 1211-1214
- [5] 王惠, 甘一茹. 液相色谱 - 库伦阵列电化学法检测鸡肝中氯羟吡啶残留. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4410-4411
- [6] 应永飞, 皮雄娥, 林仙军. 高效液相色谱法测定兔肉中氯羟吡啶. 理化检验 - 化学分册, 2007, 43(2): 741-742
- [7] 沈建忠, 肖喜龙, 朱蓓蓓, 等. 氯羟吡啶在鸡组织中的残留研究. 畜牧兽医学报, 1997, 28(3): 238-244
- [8] 皮雄娥, 应永飞, 费迪波, 等. 鸡肉中氯羟吡啶的高效液相色谱法测定. 浙江农业学报, 2005, 17(4): 200-202
- [9] 张睿, 段红安. 禽肉中氯羟吡啶残留量的GC/MS测定法. 中国兽药杂志, 2002, 38: 39-41
- [10] 刘祥国, 苏怡娟, 方炳虎等. 气相色谱质谱法测定鸡肉组织中残留的氯羟吡啶. 色谱, 2009, 27(1): 86-90
- [11] Macneil JD. Committee on drugs and related topics-drug residues in animal tissues. Journal of AOAC International, 2003, 86(1): 116-127

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线: 800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC