

气相色谱-质谱法测定鸡蛋、牛奶中氯羟吡啶残留

张青杰, 郭宏斌, 郑亚秋, 贺利民, 魏艳玲, 骆 飏

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:建立了气相色谱-质谱(GC-MS)测定鸡蛋、牛奶中氯羟吡啶残留的检测方法. 采用甲醇提取鸡蛋、牛奶中待测物,经碱性氧化铝层析柱净化,Sylon BFT 衍生剂 80 °C 衍生 60 min,对氯羟吡啶三甲基硅烷化衍生物采用选择离子监测模式(SIM)进行检测. 氯羟吡啶衍生物响应信号与其质量浓度在 5.00 ~ 500.00 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系,相关系数大于 0.99;在 5、10 和 20 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下,鸡蛋中待测物的平均回收率分别为 68.4%、75.2% 和 80.1%,牛奶中待测物的平均回收率分别为 79.5%、87.1% 和 90.0%,批内、批间相对标准偏差均小于 10%;以 3 倍信噪比(S/N)计算方法的检出限达 2.0 $\mu\text{g/kg}$;以 10 倍信噪比(S/N)计算方法的定量限为 5.0 $\mu\text{g/kg}$.

关键词:气相色谱-质谱法;氯羟吡啶;残留;鸡蛋;牛奶

中图分类号:S859.7

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)04-0108-04

Determination of Clopidol Residues in Egg and Milk by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

ZHANG Qing-jie, GUO Hong-bin, ZHENG Ya-qiu, HE Li-min, WEI Yan-ling, LUO Biao

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A confirmative method to determine clopidol residues in egg and milk by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was established. The analyte was extracted with methanol, and then purified with a Bond Elut Alumina-B. 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 selected ion monitoring (SIM) mode was performed at m/z 212, 214, 248 and 263. The linearity was good in the range of 5.00 and 500.00 $\mu\text{g/L}$ with the correlation coefficients better than 0.99. The average recoveries fortified at 5, 10 and 20 $\mu\text{g/kg}$ were 68.4%, 75.2% and 80.1% in egg and 79.5%, 87.1% and 90.0% in milk, respectively. The relative standard deviations (RSD) of intra-day and inter-day were less than 10%. The limit of detection ($S/N=3$) was 2.0 $\mu\text{g/kg}$ and the limit of quantification ($S/N=10$) was 5.0 $\mu\text{g/kg}$ for clopidol in egg and milk.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); clopidol; residue; egg; milk

氯羟吡啶(3,5-二氯-2,6-二甲基-4-羟基吡啶),商品名为克球粉(coyden),是一种抗球虫添加剂.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食品生产中使用,日本也禁止氯羟吡

啶用于家禽,我国农业部168号公告“饲料药物添加剂使用规范”中规定蛋鸡产蛋期禁用氯羟吡啶.欧盟、美国、日本和中国等都已规定并不断修订各种动物组织中氯羟吡啶的最高残留限量,我国规定氯羟吡啶在鸡肉中的残留限量为10 $\mu\text{g/kg}$ ^[2],牛奶中为20 $\mu\text{g/kg}$ ^[3],尚没有制定鸡蛋中的最高残留限量.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(GC)^[4]、高效液相色谱法

收稿日期:2009-11-11

作者简介:张青杰(1982—),女,硕士研究生;通信作者:贺利民(1967—),男,副研究员,E-mail:liminokhe@scau.edu.cn

基金项目:农业部2007年农业行业标准项目(070106)

(HPLC)^[5-8],气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[9-10],液相色谱-质谱联用法(LC/MS)^[11]和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[12-13]等.而有关鸡蛋、牛奶等蛋白质含量液态基质中氯羟吡啶残留检测的报道较少,且多采用液相色谱法^[14].本研究建立了一种简单、灵敏、可靠地检测鸡蛋、牛奶中氯羟吡啶残留量的气相色谱-质谱定性定量分析方法.

1 材料与方法

1.1 试剂及溶液

乙酸乙酯、二氯甲烷、乙腈、甲醇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℃条件下煅烧4h,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350℃条件下煅烧3.5h,冷却后按每100g加入5mL去离子水混匀,然后于干燥器中过夜,再在105℃条件下活化1h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.根据试验要求,稀释成相应的标准工作液.

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:LB10842,Supelco公司).

碱性氧化铝层析柱的制备:采用具塞的玻璃柱(300mm×15mm),下端带G3砂芯板;先于柱中加适量乙腈,再加入1cm高的硫酸钠,中间填充5cm高的碱性氧化铝层,最后在柱上端填充1cm高的硫酸钠.

1.2 仪器

AUTOSYSTEM GC-TURBOMASS型气相色谱-质谱联用仪(Perkin Elmer公司);KS501 digital轨道式摇床(IKA公司).

1.3 样品前处理

准确称取牛奶和经匀浆机搅拌均匀后的鸡蛋各2g置于50mL聚丙烯离心管中,加入5mL甲醇均质1min,振荡30min.在4℃,6000r/min离心10min,倾出上清液于鸡心瓶中;沉淀物用5mL甲醇重复提取1次,合并上清液,加入2mL异丙醇,于旋转蒸发仪上50℃水浴旋至近干,加入5mL乙腈溶解,混匀待净化.用15mL乙腈活化碱性氧化铝层析柱,加入样品提取液,待其自然流下近干时用10mL乙腈洗脱.从上样即开始收集,直至洗脱完毕,将洗脱液旋转蒸干,进一步放80℃烘箱中干燥5min.取出冷却后,加入100μL甲苯溶解残渣,再加入100μL衍生剂,密封后于80℃衍生60min.冷却后加800

μL甲苯,混匀,上机.

1.4 GC-MS 仪器分析条件

1.4.1 GC 条件 色谱柱:熔融石英毛细管柱 DB-1MS(30m×0.25mm×0.25μm);载气为高纯氮气,流量为0.7mL/min(鸡蛋为0.8mL/min);不分流进样,进样量2μL;进样口温度220℃;程序升温:起始柱温90℃(保持1min),以30℃/min的速率升至200℃,再以5℃/min的速率升至205℃(保持1min),然后以30℃/min的速率升至280℃(保持3min).

1.4.2 MS 条件 电子轰击(EI)离子源,电子能量70eV;离子源温度230℃;接口温度280℃.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.

2 结果与分析

2.1 提取净化条件的确定

鸡蛋、牛奶都是高蛋白含量的液态基质,为了有效提取其中残留的氯羟吡啶,我们进行了乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇和乙腈等不同有机溶剂的提取试验.试验结果表明,乙酸乙酯和二氯甲烷为提取溶剂时,提取液杂质较多,难以吹干,衍生效果差,回收率低;采用甲醇和乙腈为提取溶剂,待测物回收率都比较理想.虽然甲醇提取液中杂质相对较多,但经5cm高氧化铝层析柱处理后^[10],可得到满意的净化效果.又考虑甲醇较乙腈经济,为此,本研究最后选用甲醇沉淀鸡蛋和牛奶试样中的蛋白质,达到了提取和净化目的.

2.2 定性依据

SIM模式下,依次比较纯溶剂与鸡蛋、牛奶基质中氯羟吡啶三甲基硅醚特征离子*m/z* 212与214及212、263与基峰248的相对丰度比,依据2002/657/EC相关规定的要求,在允许偏差的范围内,对待测物进行定性分析.结果表明,鸡蛋空白基质中*m/z* 212、214、263与基峰248都无背景峰,与纯标准比较,相对丰度比符合2002/657/EC规定要求,氯羟吡啶三甲基硅醚响应信号强度与鸡肉组织中类似,也存在一定强度的基质增强效应;牛奶空白基质中*m/z* 212、214在部分试验样品中存在背景干扰,特别是*m/z* 214碎片有时有强干扰峰,但*m/z* 248和263无干扰峰,因此,在阳性样品的定性判定中,比较保留时间的同时,离子相对丰度比的比较要考虑扣除相应背景.

2.3 线性范围与检测限

在上述色谱条件下,将标准工作液(5、10、20、

100、250 和 500 $\mu\text{g/L}$) 依次从低质量浓度到高质量浓度进样,每一质量浓度进样 3 次,按其所得峰面积的平均值与对应的标准溶液质量浓度($\mu\text{g/L}$)作标准曲线,并计算标准曲线的回归方程及相关系数. 试验测得氯羟吡啶三甲基硅醚衍生物在 5.00 ~ 500.00 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性(r 为 0.997 6),标准曲线回归方程为 $y = 461.5x - 72.8$. 以 3 倍信噪比(S/N)计算,本方法鸡蛋、牛奶中氯羟吡啶检测限均

达 2.0 $\mu\text{g/kg}$;以 10 倍信噪比(S/N)计算,本方法鸡蛋、牛奶中氯羟吡啶定量限均为 5.0 $\mu\text{g/kg}$.

2.4 准确度和精密度

采用标准添加法,将适量氯羟吡啶加入到空白鸡蛋和空白牛奶样品中,制成 5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g/kg}$ 低、中、高 3 个质量比添加样品进行回收率试验. 各质量比共测定 5 批次,每批次测试 5 个平行样品,结果见表 1,典型离子流色谱图如图 1 ~ 4.

表 1 鸡蛋、牛奶中添加氯羟吡啶的准确度和精密度
Tab.1 Accuracy and precision of clopidol spiked in egg and milk

$n = 5$

样品	$w_{\text{添加}}(\text{氯羟吡啶})/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率($\bar{x} \pm \text{SD}$)/%					批间
		1	2	3	4	5	
鸡蛋	5.0	75.0 $\pm$ 4.4	65.4 $\pm$ 3.9	62.8 $\pm$ 1.8	68.4 $\pm$ 4.9	70.6 $\pm$ 4.0	68.4 $\pm$ 5.9
	10.0	74.4 $\pm$ 4.4	73.5 $\pm$ 2.7	83.0 $\pm$ 4.1	77.7 $\pm$ 1.9	67.1 $\pm$ 4.9	75.2 $\pm$ 6.4
	20.0	87.1 $\pm$ 4.9	81.0 $\pm$ 3.9	80.6 $\pm$ 1.7	76.0 $\pm$ 3.2	76.1 $\pm$ 3.8	80.1 $\pm$ 5.3
牛奶	5.0	79.6 $\pm$ 4.9	85.3 $\pm$ 1.1	72.0 $\pm$ 2.7	85.2 $\pm$ 4.8	75.4 $\pm$ 4.6	79.5 $\pm$ 6.5
	10.0	88.3 $\pm$ 3.6	79.9 $\pm$ 3.5	92.4 $\pm$ 2.8	86.4 $\pm$ 1.7	88.2 $\pm$ 4.1	87.1 $\pm$ 5.1
	20.0	92.3 $\pm$ 3.1	95.3 $\pm$ 1.8	83.0 $\pm$ 4.9	88.9 $\pm$ 3.6	90.6 $\pm$ 2.4	90.0 $\pm$ 5.2

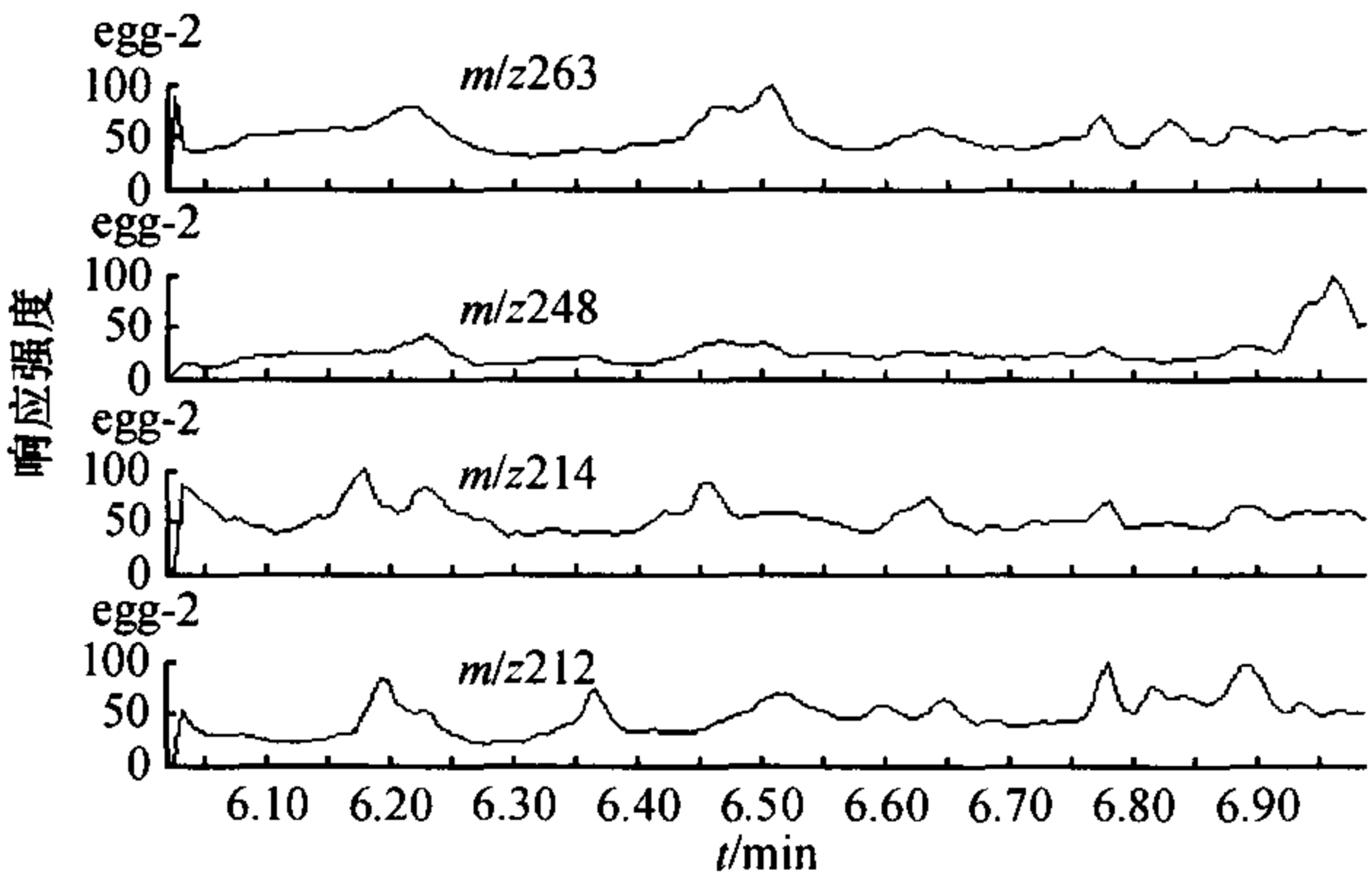


图 1 空白鸡蛋选择离子流色谱图
Fig.1 SIM chromatogram of blank egg sample

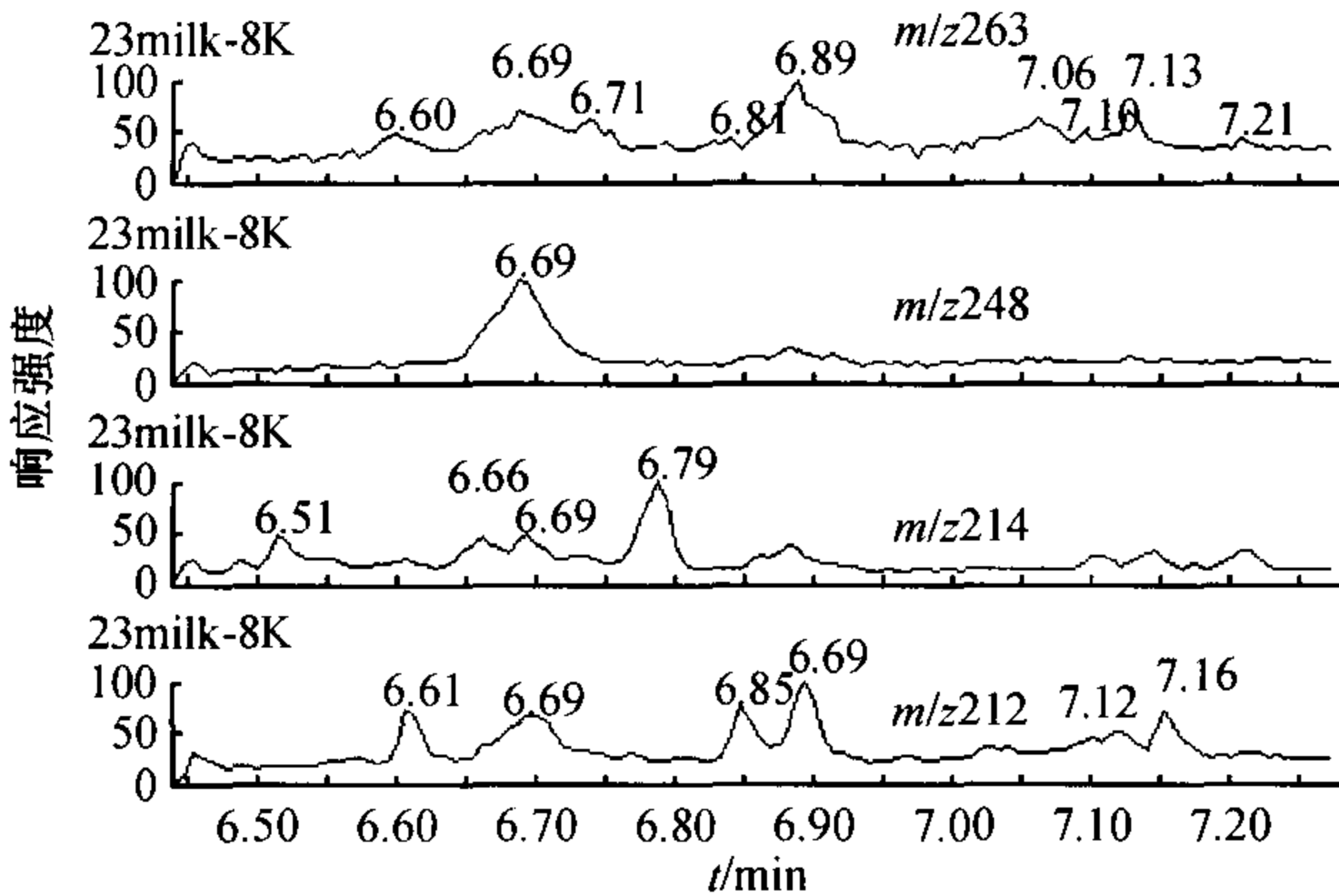


图 3 空白牛奶选择离子流色谱图
Fig.3 SIM chromatogram of blank milk sample

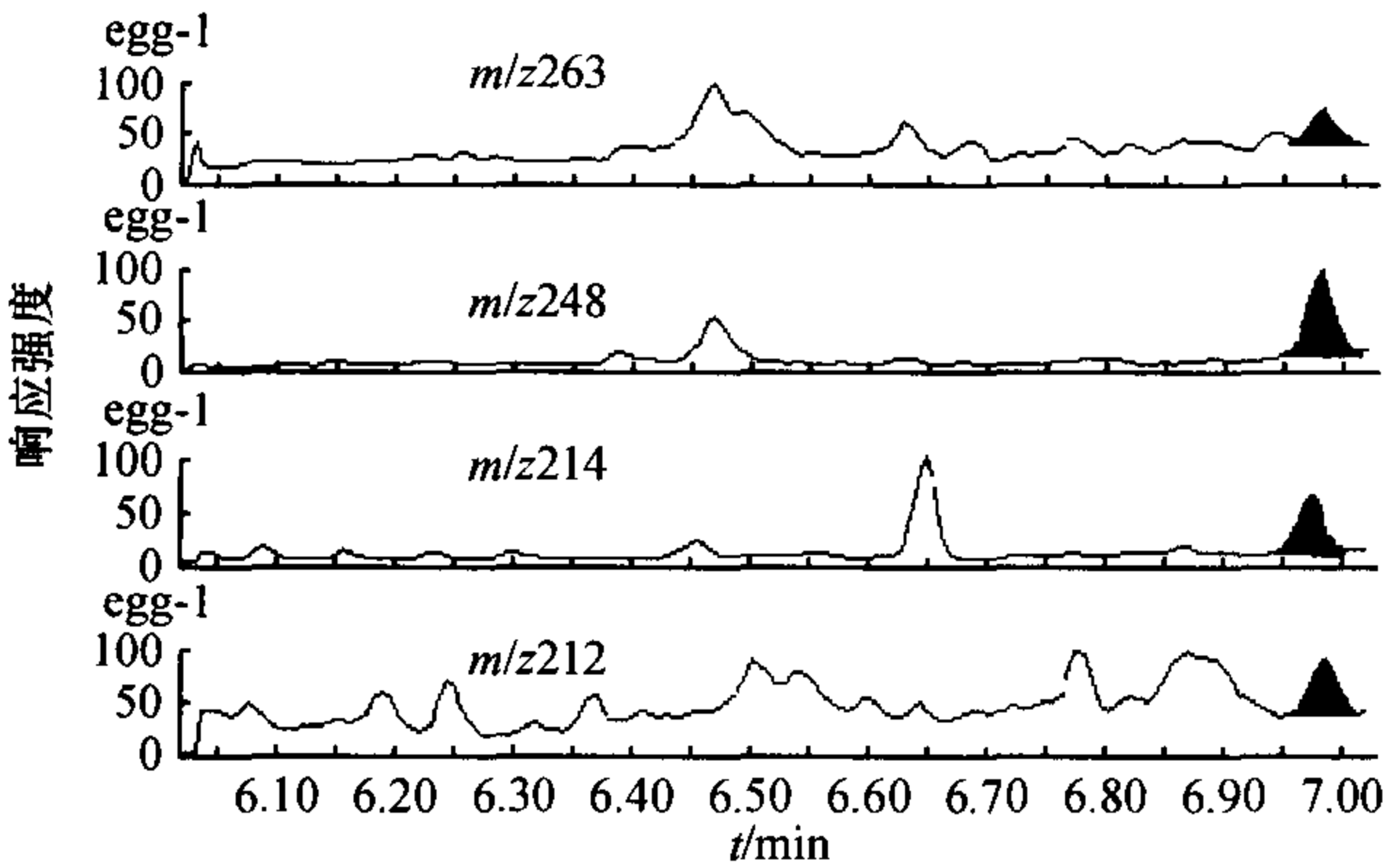


图 2 鸡蛋添加氯羟吡啶选择离子流色谱图(添加质量比为 5.0 $\mu\text{g/kg}$)
Fig.2 SIM chromatogram of clopidol derivative from spiked egg sample (5.0 $\mu\text{g/kg}$)

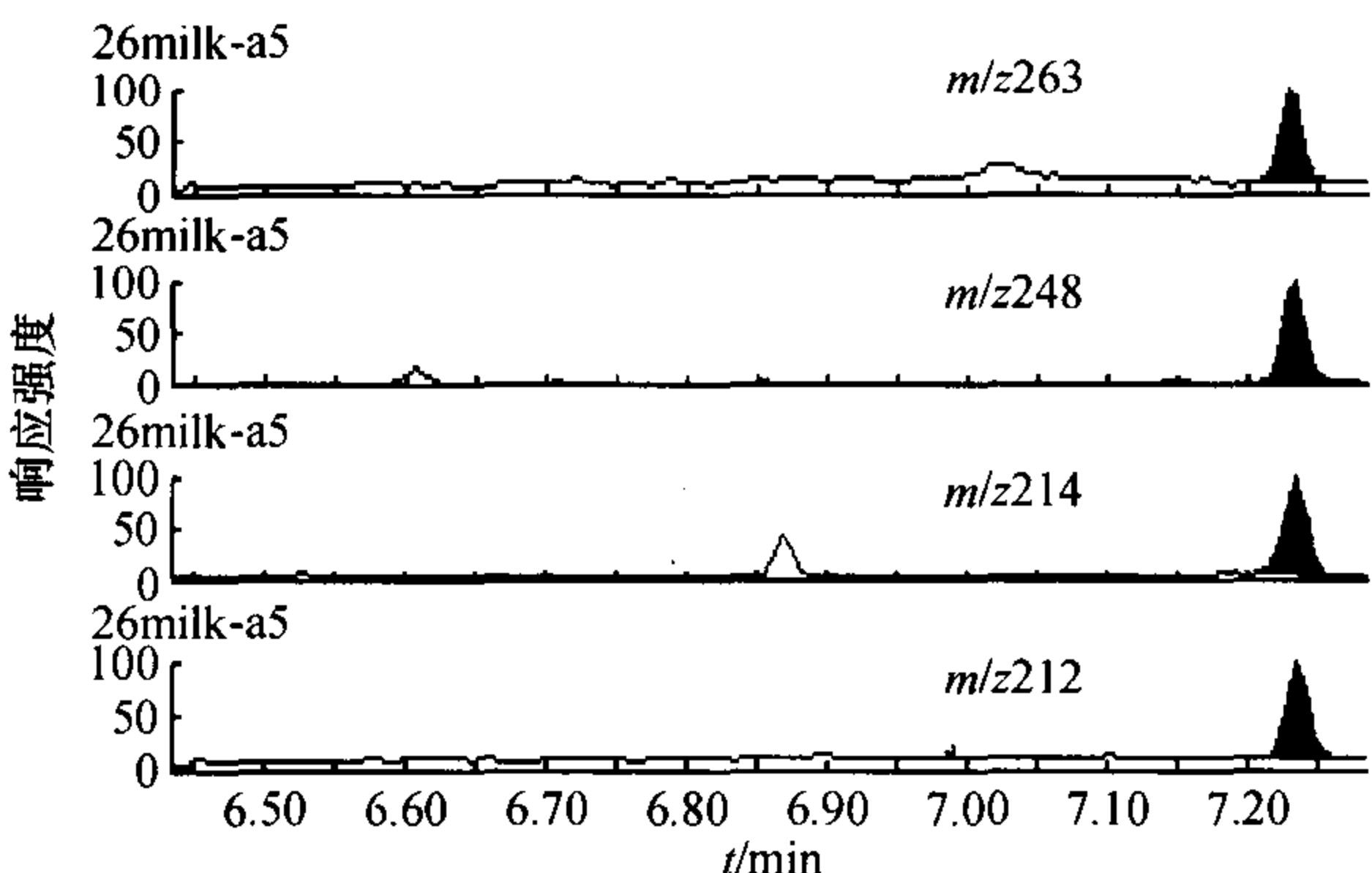


图 4 牛奶添加氯羟吡啶总离子流色谱图 and 选择离子流色谱图(添加质量比为 5.0 $\mu\text{g/kg}$)
Fig.4 Chromatograms of total ion current and selected ions of clopidol derivative in milk sample(5.0 $\mu\text{g/kg}$)

从表1可看出,在5.0~20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上,鸡蛋中氯羟吡啶的平均回收率在68.4%和80.1%之间,牛奶中氯羟吡啶的平均回收率在79.5%和90.0%之间,变异系数均小于10%,表明该方法稳定性、重现性较好,检测限远低于规定的有关最大残留限量,能满足鸡蛋、牛奶中氯羟吡啶残留分析检测的要求。

2.5 实际样品检测

将建立的方法用于50批市售鸡蛋和牛奶试样的监测,牛奶试样均未检出氯羟吡啶残留,有5批鸡蛋检出氯羟吡啶残留,其中1批氯羟吡啶质量比达800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 结论

本文通过对高蛋白质含量液态基质中有效提取氯羟吡啶残留的溶剂筛选,建立了鸡蛋、牛奶中氯羟吡啶残留的气相色谱-质谱确证分析方法。该方法样品用量少,操作简单、快速,且重现性好、灵敏度高、准确可靠,完全满足对氯羟吡啶残留要求越来越严的鸡蛋、牛奶等实际样品的测定。

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[J]. 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[M]. 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[J]. 中国兽药杂志,2003,37(3):5-11.
- [4] SUZUKI E, MATSUDA M, MOMOSE A, et al Improved method for gas liquid chromatographic determination of clopidol in chicken tissues[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1980,63:1211-1214.
- [5] 王惠,甘一如. 液相色谱-库仑阵列电化学法检测鸡肝中氯羟吡啶残留[J]. 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[J]. 理化检验-化学分册,2007,43(2):741-742.
- [7] 沈建忠,肖希龙,朱蓓蕾,等. 氯羟吡啶在鸡组织中的残留研究[J]. 畜牧兽医学报,1997,28(3):238-244.
- [8] 皮雄娥,应永飞,费笛波,等. 鸡肉中氯羟吡啶的高效液相色谱法测定[J]. 浙江农业学报,2005,17(4):200-202.
- [9] 张睿,段宏安. 禽肉中氯羟吡啶残留量的GC/MS测定法[J]. 中国兽药杂志,2002,38:39-41.
- [10] 刘祥国,苏贻娟,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[J]. 色谱,2009,27(1):86-90.
- [11] PANG Guo-fang, CAO Yan-zhong. Determination of clopidol residues in chicken tissues by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A,2000,882:85-88.
- [12] MACNEIL J D. Committee on drugs and related topics-drug residues in animal tissues[J]. Journal of AOAC INTERNATIONAL,2003,86(1):116-127.
- [13] 杨雯笙,徐锦忠,杨功俊,等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法测定禽类产品中克秋酚的残留[J]. 色谱,2009,27(2):144-148.
- [14] ERNST M M, CORNELIS A K, VAN HENDRIK W G. An automated HPLC determination of meticlorpindol in eggs with UV absorbance detection, using on-line dialysis and pre-concentration as sample clean-up; occurrence in and carry over to eggs[J]. Z Lebensm Unters Forsch,1990,190:25-30.

【责任编辑 柴 焰】