

高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱同时 分析鸡肉中洛克沙生、阿散酸和硝苯胂酸

杨丽君, 刘玉敏, 崔凤杰, 郭伟*, 徐成钢, 李兆杰
(威海出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 山东 威海 264205)

摘要: 建立一种同时测定鸡肉中洛克沙生、阿散酸和硝苯胂酸等3种有机砷类制剂的高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(high performance liquid chromatography tandem inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)分析方法。样品经甲醇溶液提取, 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱, 体积分数0.05%的三氟乙酸溶液-甲醇作为流动相进行洗脱, 经高效液相色谱分离, 电感耦合等离子体质谱进行定性和定量分析。结果表明: 1~50 μg/kg 范围内各砷制剂线性良好, 相关系数 r^2 均在0.99以上; 在1、2、10 μg/kg 三个加标水平下进行方法验证, 平均回收率为85.4%~103.1%, 相对标准偏差为3.3%~7.2%; 3种有机砷类制剂的定量限均为1 μg/kg。方法重现性好、灵敏度高、前处理简单, 各项指标均满足国内外法规要求, 适用于鸡肉中有机砷类制剂残留的分析检测。
关键词: 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS); 洛克沙生; 阿散酸; 硝苯胂酸; 鸡肉; 鸡肝

Simultaneous Determination of Roxarsone, Arsanilic and Nitarosone in Chicken by High Performance Liquid Chromatography/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

YANG Li-jun, LIU Yu-min, CUI Feng-jie, GUO Wei*, XU Cheng-gang, LI Zhao-jie
(Inspection and Quarantine Center, Weihai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264205, China)

Abstract: An analytical method was developed to simultaneously determine roxarsone, arsanilic and nitarosone in chicken by high performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). Samples were extracted with methanol/water solution. The chromatographic separation was performed on a Phenomenex Luna C₁₈ using methanol and water (containing 0.05% trifluoroacetic acid) as the mobile phase. Identification and quantification were achieved by using ICP-MS. Good linearity was observed in the range of 1 to 50 μg/kg with correlation coefficients above 0.99. The method was validated at the spike levels of 1, 2, 10 μg/kg. The validation results indicated that the average recoveries of arsenicum praeparatum ranged from 85.4% to 103.1% with a relative standard deviation of 3.3% - 7.2%. The quantification limits of 3 arsenicum praeparatum were 1 μg/kg. The method had good reproducibility, high sensitivity and simple pre-treatment. Its performance could meet both domestic and international legislation requirements. This method is applicable for simultaneous determination of arsenicum praeparatum in chicken.

Key words: high performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS); arsanilic; nitarosone; roxarsone; chicken; chicken liver

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0202-03

阿散酸、洛克沙生和硝苯胂酸等有机砷类制剂作为饲料添加剂已广泛应用于畜禽养殖业。有机砷类制剂具有刺激动物生长的作用和较广的抗菌谱, 可改善禽肉肉质、提高饲料利用率, 对于畜牧业的发展具有重要意义

义, 但是有机砷也具有一定毒性, 过量添加可使动物中枢神经系统失调, 并促使脑病和视神经萎缩的发病率升高, 而且有机砷在动物体内的代谢过程可能残留或降解为其他砷化物, 对动物产生毒害作用, 同时威胁人

收稿日期: 2010-11-11

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研计划项目(20101k148)

作者简介: 杨丽君(1969—), 女, 高级工程师, 本科, 研究方向为食品检测。E-mail: whylij2000@yahoo.com.cn

*通信作者: 郭伟(1981—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品检测。E-mail: guoweijd2005@163.com

体健康。我国食品和饲料卫生标准均对食品和饲料原料产品中的砷含量作了严格规定,日本肯定列表规定禽肉产品中洛克沙砷和硝苯砷酸的允许残留量分别为0.15mg/kg和0.20mg/kg。为了监控有机砷类制剂的使用和潜在危害,建立准确可靠的检测方法具有重要的现实意义。

目前,有机砷类制剂的检测方法主要有高效液相色谱法^[1-3]、气相色谱质谱法^[4]、液相色谱质谱法^[5-6]、液相色谱-氢化物发生-原子荧光法^[7-8]和高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(high performance liquid chromatography tandem inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)^[9-10]。其中,高效液相色谱法灵敏度低、受杂质干扰较大,气相色谱质谱法需进行衍生化、样品前处理复杂、方法重现性差,液相色谱质谱法易受基质干扰、方法的前处理要求较高,而高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法具有前处理简单、抗干扰能力强和灵敏度高等特点。本研究拟采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法,建立同时分析鸡肉中洛克沙砷、阿散酸和硝苯砷酸的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

洛克沙砷(ROX, 98%)、阿散酸(ASA, 98%)和硝苯砷酸(NPAA, 96.5%)标准品 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。先分别精确称取各标准品 10mg 于 100mL 容量瓶,加入少许去离子水,待完全溶解后再用去离子水定容,配制 100mg/L 的各药物标准储备液。

甲醇(HPLC 级) 美国 Fisher 科技公司;三氟乙酸(化学纯) 上海展云化工有限公司;25% 氨水等其他试剂均为分析纯;实验用水为去离子水。

1.2 仪器与设备

1200 高效液相色谱仪(Instrument online 色谱工作站)、7500cx 电感耦合等离子体质谱仪(Top 系统控制软件和 Chromatography data analysis 数据处理软件) 美国 Agilent 公司; Milli-Q Gradient 超纯水净化器 美国 Millipore 公司; Uhra-Turrax T25 均质器、Vortex genius 3 旋涡混匀器 德国 IKA 公司; CR22G N/M 高速冷冻离心机 日本日立公司。

1.3 HPLC-ICP-MS 工作条件

1.3.1 高效液相色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈(150mm × 4.6mm, 5 μm) 高效液相色谱柱;柱温: 30 °C;进样量: 20 μL;流动相 A 为体积分数 0.05% 的三氟乙酸溶液,流动相 B 为甲醇, A: B = 9:1;运行时间 15 min。

1.3.2 电感耦合等离子体质谱条件

同心雾化器;炬管 1.5mm;采样锥/ 截取锥 1.0/0.4

(Ni);雾化室温度 - 5 °C;高频发射功率: 1500W;采样深度: 7.0mm;蠕动泵: 0.3r/min;载气流量: 0.72L/min;载气补偿气流量: 0.35L/min。

1.4 样品前处理

准确称取 2.00g(精确到 0.01g)样品于 50mL 聚丙烯离心管中,加入甲醇-水(1:9, V/V)提取液 20mL,旋涡混匀 30s, 10000r/min 均质 2min, 4 °C、6000r/min 冷冻离心 10min,收集上层清液过 0.45 μm 有机滤膜,供 HPLC-ICP-MS 测定。

2 结果与分析

2.1 质谱分析条件的优化

使用 Agilent 公司提供的调谐液(Li、Y、Co、Ce 和 Tl 质量浓度为 1 μg/L)对仪器进行调谐,以保证仪器的最佳状态和仪器状态的稳定性。砷的电离能较高,难以电离,采用高电离能 1500W,保证有机砷类制剂能完全解离,同时调节采样深度、载气流速以及提取透镜等仪器参数,降低氧化物和双电荷的比率,满足氧化物产率为 CeO/Ce < 1.5%,双电荷产率 Ce²⁺/Ce⁺ < 2%。

2.2 色谱分离条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

根据目标化合物的理化性质,分别选用不同型号的 C₁₈ 色谱柱对 3 种药物的分离度和灵敏度进行对比试验,可知不同型号 C₁₈ 色谱柱对于目标药物的分离效果和检测灵敏度存在很大差异。采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱,3 种药物均具有很好的分离效果和较高的灵敏度(图 1)。

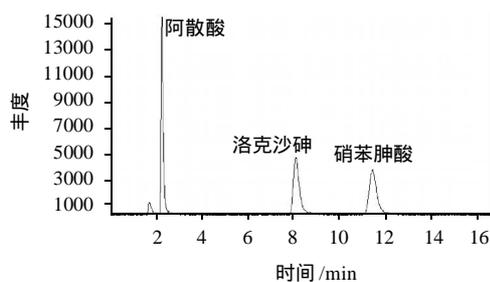


图 1 加标鸡肉样品的 HPLC-ICP-MS 图

Fig.1 HPLC/ICP-MS chromatograms of chicken sample spiked with 3 arsenics

2.2.2 流动相的选择与优化

流动相的 pH 值对目标化合物的分离和保留具有显著影响,实验通过添加一定量的甲酸、乙酸或三氟乙酸来控制流动相的 pH 值,发现 0.05% 的三氟乙酸溶液作为流动相可得到对称、尖锐的峰,并且灵敏度较高。流动相中加入一定比例的甲醇可有效缩短分析时间,并

保证分离效果,最终采用甲醇和0.05%三氟乙酸溶液做为流动相等度洗脱(1:9, V/V),在15min内实现3种目标药物的良好分离(图1)。

2.3 提取条件的优化

常见的提取方法包括水、纯有机溶剂(甲醇、乙腈、三氯甲烷等)或以有机溶剂和水按一定比例混合的溶液提取。本实验在国内外研究的基础上,比较了纯水和不同比例的甲醇水混合液作为提取液进行提取试验,可知含水比例高可显著提高目标药物的回收率,但鸡肉样品中蛋白质含量较多,提取液较浑浊,提取液中添加一定比例的甲醇可很好地去除样品基质中的蛋白质,当采用甲醇-水(1:9, V/V)混合溶液时提取效率最高,各药物回收率均达到85%以上,提取液中的蛋白质沉淀较好,提取液澄清,完全满足提取要求。

2.4 线性范围

在1~50 μg/kg范围内配制1、2、5、10、20、50 μg/kg的3种药物的系列混合标准溶液。据各药物的峰面积 y 为纵坐标、相应药物的质量浓度 x (μg/kg)为横坐标,绘制各有机砷类制剂的标准校正曲线,经Chromatography data analysis软件分析可知,在1~50 μg/kg范围内,3种有机砷类制剂标准校正曲线的线性良好,相关系数均大于0.99(表1)。

表1 3种有机砷类制剂的线性回归方程及相关系数 r^2

Table 1 Linear regression equations and correlation coefficients of 3 arsenics

砷制剂	线性回归方程	r^2
洛克沙砷	$y = 1.17 \times 10^5 x + 2.34 \times 10^4$	0.999
阿散酸	$y = 1.93 \times 10^5 x - 2.21 \times 10^4$	1.000
硝苯砷酸	$y = 1.19 \times 10^5 x - 3.02 \times 10^4$	0.998

2.5 回收率、精密度和定量限

表2 3种有机砷类制剂的添加回收率和精密度($n = 6$)

Table 2 Spiked recoveries and precision RSDs for 3 arsenics ($n = 6$)

样品	添加水平/ (μg/kg)	洛克沙砷		阿散酸		硝苯砷酸	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
鸡肉	1	103.1	7.2	87.5	4.7	92.6	6.1
	2	95.4	5.1	93.7	5.2	97.1	4.3
鸡肝	10	96.6	5.8	86.4	3.7	93.2	4.5
	1	96.2	4.9	85.4	6.4	86.5	3.3
鸡肝	2	88.7	5.7	91.3	5.0	90.1	4.5
	10	91.3	4.5	87.5	6.7	89.6	4.9

选用不含3种待测药物的空白样品,分别添加1、2、10 μg/kg三个水平的3种药物混合标准溶液,4放置过夜,按建立的方法处理样品,分析测定并计算其回收率和精密度,测得平均回收率($n = 6$)为85.4%~103.1%,相对标准偏差在3.3%~7.2%之间(表2),加标鸡肉样品的HPLC-ICP-MS图见图1。

本实验在标准添加的最低添加水平点1 μg/kg时,3种有机砷类制剂的信噪比(R_{SN})均大于10,并且具有较好的回收率,故确定3种有机砷类制剂的定量限为1 μg/kg。

3 结论

高效液相色谱对砷化物的良好分离,以及电感耦合等离子体质谱所具有抗干扰能力强、灵敏度高和线性范围宽的优势,为建立同时分析畜禽养殖中3种常用砷制剂的分析方法提供了技术支持。本实验所建立的方法前处理简单、灵敏度高、重现性好、实用性强,能满足国内外对3种砷制剂的分析要求,适用于动物源性食品中砷制剂的分析检测。

参考文献:

- [1] 徐锦萍, 何珩, 徐梦依, 等. 反相高效液相色谱法测定饲料添加剂阿散酸中的阿散酸及掺假物质对氨基苯磺酸[J]. 色谱, 2010, 28(2): 218-220.
- [2] 肖亚兵, 韦玮, 高健会, 等. 固相萃取/高效液相色谱法对饲料中阿散酸、硝苯砷酸和洛克沙砷的同时测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(9): 964-967.
- [3] 曹庆云, 颜惜玲, 周武艺, 等. 高效液相色谱测定鸡肝中洛克沙砷的方法研究[J]. 应用化学, 2005, 34(10): 640-643.
- [4] AARON R R, JOSEPH H A. Sensitive method for the determination of roxarsone using solid-phase microextraction with multi-detector gas chromatography[J]. J Chromatogr. A, 2004, 1057(1/2): 177-183.
- [5] PERGANTIS S A, CULLEN W R, CHOW D T, et al. Liquid chromatography and mass spectrometry for the speciation of arsenic animal feed additives[J]. J Chromatogr. A, 1997, 764(2): 211-222.
- [6] PERGANTIS S A, WINNIK W, BETOWSKI D. Determination of ten organoarsenic compounds using microbore high performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry-mass spectrometry[J]. J Anal At Spectrom, 1997, 12(5): 531-536.
- [7] 刘建静, 于洪侠, 杨曙明. 液相色谱-氢化物发生-原子荧光联用同时测定预混合饲料中阿散酸和洛克沙砷[J]. 应用化工, 2008, 37(6): 694-696.
- [8] 黄连喜, 何兆桓, 曾芳, 等. 液相色谱-氢化物发生-原子荧光联用同时测定洛克沙砷及其代谢物[J]. 分析化学, 2010, 38(9): 1321-1324.
- [9] 肖亚兵, 高健会, 曾宇, 等. HPLC-ICP-MS法对动物源性食品中阿散酸、硝苯砷酸和洛克沙砷残留量的测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(11): 1206-1209.
- [10] 王培龙, 田静, 苏晓欧. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱测定饲料中有机砷的研究[J]. 分析化学, 2008, 36(2): 215-218.