

液相色谱-电喷雾串联质谱法测定禽类产品中克球酚的残留

杨雯奎^{1*}, 徐锦忠¹, 杨功俊², 丁 涛¹, 齐涓菲²,
柳 菡¹, 沈崇钰¹, 吴 斌¹, 余 枢¹

(1. 江苏出入境检验检疫局食品实验室, 江苏 南京 210001 ; 2. 扬州大学化学化工学院, 江苏 扬州 225009)

摘要 :建立了禽类产品中克球酚残留的液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)检测方法。用甲醇对样品进行提取,提取液用正己烷萃取去油脂,然后用 LC-18 柱和阴离子交换柱净化, LC-ESI-MS/MS 测定。利用基质校正曲线对克球酚准确定量。在 2, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 个添加水平下,克球酚的平均回收率稳定在 55.38% ~ 132.44% 之间,日内精密度小于 9.54%, 日间精密度小于 15.27%。在 1 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内色谱峰面积与克球酚含量呈良好的线性关系,检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法选择性好,抗干扰能力强,可作为禽类产品中克球酚残留检测的确证方法。

关键词 :液相色谱-电喷雾串联质谱联用 ;固相萃取 ;克球酚 ;禽类产品 ;基质效应

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)02-0144-05 栏目类别 :研究论文

Determination of clopidol residue in poultry products by liquid chromatography-electrospray ion trap tandem mass spectrometry

YANG Wenquan^{1*}, XU Jinzhong¹, YANG Gongjun², DING Tao¹, QI Juanfei²,
LIU Han¹, SHEN Chongyu¹, WU Bin¹, YU Shu¹

(1. Laboratory of Food, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China ;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract : A method is presented for the determination of clopidol residue in poultry products by liquid chromatography-electrospray ion trap tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Clopidol residue was extracted with methanol and cleaned-up by *n*-hexane from different poultry products. The extract was cleaned-up by an LC-18 column and an ion exchange solid phase extraction (SPE) column. Quantification was achieved by matrix calibration. The recoveries of clopidol in poultry products were in the range from 55.38% to 132.44% at the four spiked levels, 2, 5, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The intra-day relative standard deviation (RSD) and inter-day RSD were less than 9.54% and 15.27%, respectively. The linearity of the method was good from 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The limit of detection (LOD) was 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limit of quantification (LOQ) was 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method is selective without interference and suitable for the determination and confirmation of clopidol residue in poultry products.

Key words : liquid chromatography-electrospray ion trap tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) ; solid phase extraction (SPE) ; clopidol ; poultry products ; matrix effect

克球酚,又名氯羟吡啶,化学名为 3,5-二氯-2,6-二甲基-4-羟基吡啶,是一种预防畜、兔球虫病的饲料药物添加剂。球虫病是畜禽业养殖过程中的主要疾病之一,不有效地加以控制会给广大养殖户造成很大的经济损失^[1]。长期使用或不按规定用药会造成药物在动物体内和组织中残留。欧盟、美国、加

拿大、日本和中国(包括台湾地区)都规定了各种动物组织中克球酚残留量最高限量标准^[2]。目前有文献报道的检测方法多为高效液相色谱法(HPLC)^[3-7]、气相色谱法(GC)^[8]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[2]和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[9],这些方法都未提及基质效应。GC 及 GC-

* 通讯联系人:杨雯奎,学士,助理工程师。E-mail : xiaoquan025@163.com.

基金项目 : 科技部质检公益项目(200810099)。

收稿日期 : 2008-08-25

MS法虽然灵敏度较高,可以满足检测要求,但需要对样品进行衍生化后再进样分析,方法繁琐,干扰多,容易污染仪器(尤其是离子源);HPLC法具有简便快速的特点,但很难达到目前国内外对克球酚的残留限量($5\text{ }\mu\text{g/kg}$)要求;文献[9]利用LC-APCI(大气压化学电离源)/MS法,以选择离子模式检测克球酚残留,仅检测了3个负离子模式下的同位素母离子,没有进行二级碎片分析和检测,未达到目前国际通行的质谱检测中物质的定性分析的4个确证点的要求。

本文采用甲醇提取鸡产品中的克球酚药物残留,通过串联固相萃取柱净化,利用液相色谱-电喷雾串联质谱法(LC-ESI-MS/MS)对鸡产品中的克球酚残留进行分析,利用基质匹配标准溶液校准法对其进行定量,方法准确方便,满足了日常检测工作中对禽类产品中克球酚残留的确证要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液相色谱-质谱联用仪由Surveyor液相色谱系统和Thermo-Finnigan LCQ DECA离子阱质谱仪构成,包括Autosampler 1.3和MS Pump 2.0;软件使用Xcalibur 1.4版。WH-861旋涡混匀器(太仓科教器材厂);5S1022 12管萃取装置(德国MN公司)。N-EVAPTM 111氮气吹干仪(美国Organomation Associates公司);KH-500B超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);Sigma 2-16离心机(德国Sartorius公司);Milli Q去离子水发生器(美国Millipore公司)。

甲醇(色谱纯,Merck);甲酸(分析纯,南京化学试剂有限公司);氨水(分析纯,南京化学试剂有限公司);水(二次去离子水);阴离子交换柱(PAX 60 mg 3 mL;Agela Technologies Cleanert);LC-18固相萃取(SPE)柱(3 mL 500 mg;Supelclean);克球酚标准品:纯度 $\geq 98.5\%$ (Dr. Ehrenstorfer GmbH)。

1.2 标准溶液

1.2.1 标准储备液的配制

克球酚标准储备溶液:准确称取10 mg克球酚标准物质,用甲醇定容至50 mL容量瓶中,得200 mg/L的标准储备液,储存在4℃冰箱中,可保存半年。

1.2.2 标准工作液的配制

用阴性样品提取液稀释克球酚储备液,分别配成克球酚质量浓度为5,10,20,50,100和200 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液。该工作液在4℃下可保存两周。

1.3 实验步骤

1.3.1 样品制备

分别将新鲜鸡肉绞碎、新鲜蛋类混匀,于-18℃冷冻保存。

1.3.2 提取

准确称取5.00 g($\pm 0.01\text{ g}$)样品于50 mL塑料离心管中,加入10 mL甲醇,涡旋30 s,超声提取10 min,离心(8 000 r/min)5 min后,将上清液过滤于50 mL塑料离心管中;再加入10 mL水、500 μL 氨水、10 mL正己烷,涡旋30 s,离心(8 000 r/min)5 min后,将下层清液吸出准备过柱。

1.3.3 净化

通过连接头把LC-18柱与阴离子交换柱串联起来,依次用3 mL甲醇、3 mL水对其进行活化,上样;待样品溶液流完后,弃去LC-18柱,分别用3 mL水和3 mL甲醇淋洗阴离子交换柱,抽干;用5 mL 5%甲酸甲醇溶液洗脱,接收洗脱液于小试管中,于40℃水浴中用氮吹仪吹干,用甲醇-水(体积比为3:7)溶解并定容至1.0 mL,过0.45 μm 滤膜,供液相色谱-质谱仪分析。

1.4 仪器参数与测定条件

1.4.1 液相色谱条件

AQ C₁₈色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm 5 μm ,Ultimate公司)。流动相:水(A)+甲醇(B),流速0.20 mL/min。梯度洗脱:0 min 90% A,0 $\rightarrow$ 4 min 10% B $\rightarrow$ 90% B,4 $\rightarrow$ 8 min 90% B,8.1 $\rightarrow$ 10 min 10% B。柱温:室温。进样量25 μL 。

1.4.2 质谱条件

离子源:ESI;正离子扫描;分离宽度(isolation width): m/z 2.0;母离子: m/z 192.2;定量离子: m/z 101.0;质量范围(mass range):70~200 u;毛细管温度350℃;鞘气流速(sheath gas flow)10 L/min;辅助气流速6 L/min;源电压5 kV。

1.4.3 液相色谱-质谱测定

将克球酚基质标准工作溶液在设定条件下分别进样,以定量离子峰面积 y 为纵坐标,克球酚含量($\mu\text{g/kg}$)为横坐标 x ,绘制6点标准工作曲线。用该标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中克球酚的响应值均应在仪器测定的线性范围内。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件

克球酚含氮,在ESI源中很容易得到其带一个正电荷的母离子(m/z 192.2 [$\text{M} + \text{H}]^+$),进一步碰撞分裂后,产生4个特征子离子 m/z 101.1, 128.1, 156.1和174.2。离子阱质谱与四极杆质谱

相比,进行定量分析时的基线噪声会较高,但离子阱质谱能得到化合物的全扫描质谱图,能更准确地进行定性分析。本文选用 1 个母离子和 4 个子离子进行分析,完全满足国际上关于质谱确证分析的 4 个识别点的要求。克球酚的色谱-质谱图如图 1 所示。

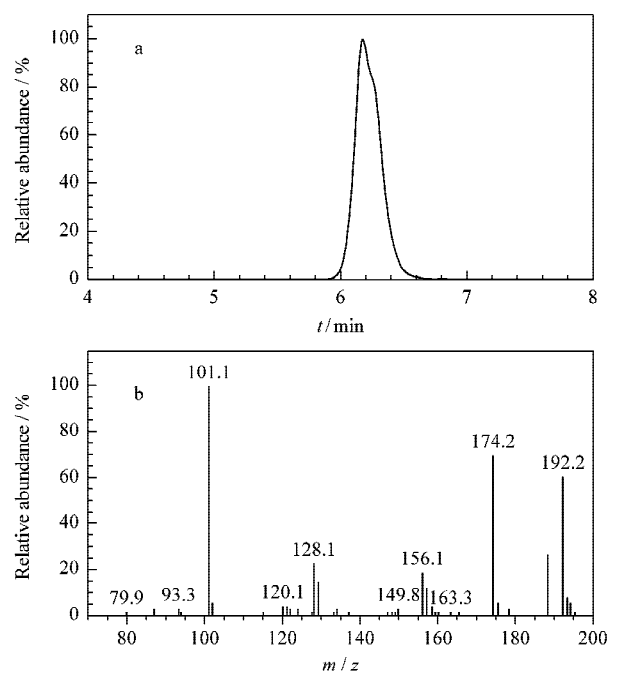


图 1 克球酚(50 $\mu\text{g/L}$)的(a)色谱图和(b)质谱图
Fig. 1 (a) Chromatogram and (b) mass spectrum of clopidol (50 $\mu\text{g/L}$)

2.2 样品的提取与净化

克球酚的化学性质较特殊,在正己烷、乙酸乙酯等非极性溶剂中不能溶解,在水中也不溶解,只在甲醇和乙腈中微溶。因此在选择提取溶剂时,主要考察了甲醇和乙腈两种溶剂。结果表明甲醇比乙腈具有更好的提取回收率,因此选择甲醇为提取溶剂。

选用甲醇为提取溶剂时,得到的提取液杂质很多,若直接进行分析,容易导致质谱的离子传输管堵塞,而且杂质的存在会对克球酚的质谱信号产生很强的抑制效应,使定量不准确,因此需要进行净化处理。目前文献报道的主要是氧化铝柱和阴离子交换柱净化法^[2 3 5 6 8]。

实验中发现,采用氧化铝柱和阴离子交换柱联合净化方法依旧不能很好地除去脂肪等杂质,在质谱分析中的抑制作用还是非常强。通过分析发现,甲醇的极性比较大,对于氧化铝柱的洗脱能力很强,许多杂质在甲醇上样的时候不能被氧化铝柱所吸附,因而不能通过氧化铝柱达到净化的目的。

LC-18 柱填料是反相的填料,脂肪等杂质可通过分配作用保留在该柱上。在实验中,通过加入水来降低提取液中的甲醇比例,可增强杂质在 LC-18

柱上的保留。即使在 LC-18 柱上不能保留的非离子型的极性杂质和其他非阴离子的杂质,也可在 PAX 柱的净化中,通过水淋洗和甲醇淋洗除去。

为了减少 LC-18 柱的填料用量,本实验在采用该柱净化前的提取步骤中,通过正己烷液-液分配净化,去除掉完全非极性的脂肪等成分。

实验中对鸡爪、鸡腿、鸡翅和鸡蛋 4 个基质样品进行了研究,其中鸡爪样品基质空白和加标样品的色谱-质谱图分别见图 2 和图 3。

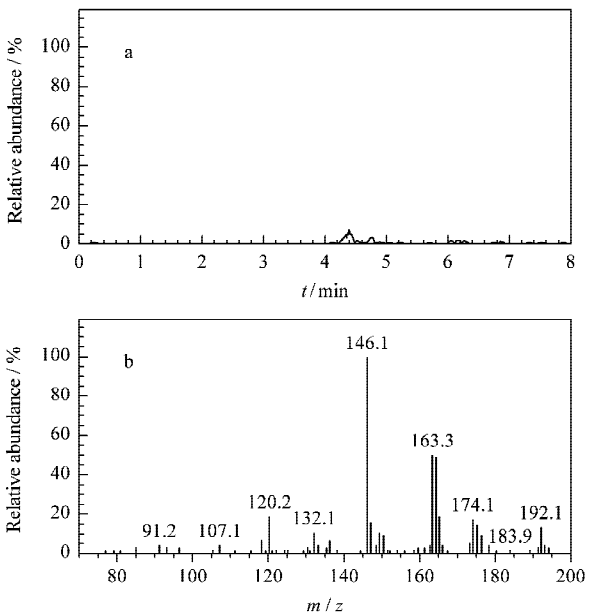


图 2 鸡爪的基质空白样品的(a)色谱图和(b)质谱图
Fig. 2 (a) Chromatogram and (b) mass spectrum of a matrix blank chicken toe sample

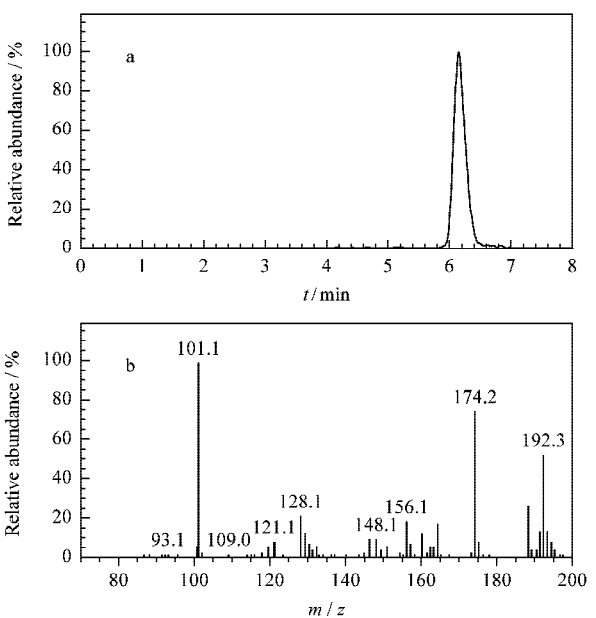


图 3 添加 10 $\mu\text{g/kg}$ 克球酚的鸡爪样品的(a)色谱图和(b)质谱图
Fig. 3 (a) Chromatogram and (b) mass spectrum of a chicken toe sample spiked with 10 $\mu\text{g/kg}$ of the clopidol standard

通过 4 种基质样品的色谱-质谱图可发现,加标样品中的质谱图与克球酚标准质谱图的离子丰度比基本一致,满足欧盟关于药物残留的确证要求。

2.3 线性方程、检出限(LOD)和定量限(LOQ)

在建立该方法的实验中发现,无论什么基质的样品,在用溶剂校正曲线校正加标结果时,回收率都在 10%~30% 左右,即使在样品溶液中加入一定量的标准溶液,用溶剂校正曲线校正,回收率仍然较低,由此可见存在较为严重的基质抑制效应。因此,我们对其进行了基质效应的考察。有文献提出在液相色谱-质谱方法开发和确证过程中需对基质效应做出评价^[10-15],而目前还未有文献报道克球酚检测过程中所遇到的基质效应问题。本文通过基质匹配标准溶液校准方法来准确定量。

比较 4 种基质样品的溶剂曲线、基质曲线和加标提取曲线(见图 4)可以看出,鸡产品的 4 种基质均存在非常明显的基质抑制效应。在前期净化中,我们选择了反相色谱和离子交换两种机理的固相萃取柱串联净化都不能消除这种基质效应;而且从后面的添加回收数据中可以看出,低浓度的加标反而基质抑制效应弱,浓度高反而基质抑制效应强。由于这种基质效应很难消除,因此我们在定量中采用基质校正曲线。4 种基质样品的基质校正曲线的线性方程、相关系数如表 1 所示。根据仪器的信噪比 $S/N \geq 3$ 时的响应值,可以推断本方法的检出限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$;由加标回收试验中最低添加水平 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 的响应值满足 $S/N \geq 10$,可以确定定量限为 $2.0 \mu\text{g/kg}$ (见表 1)。

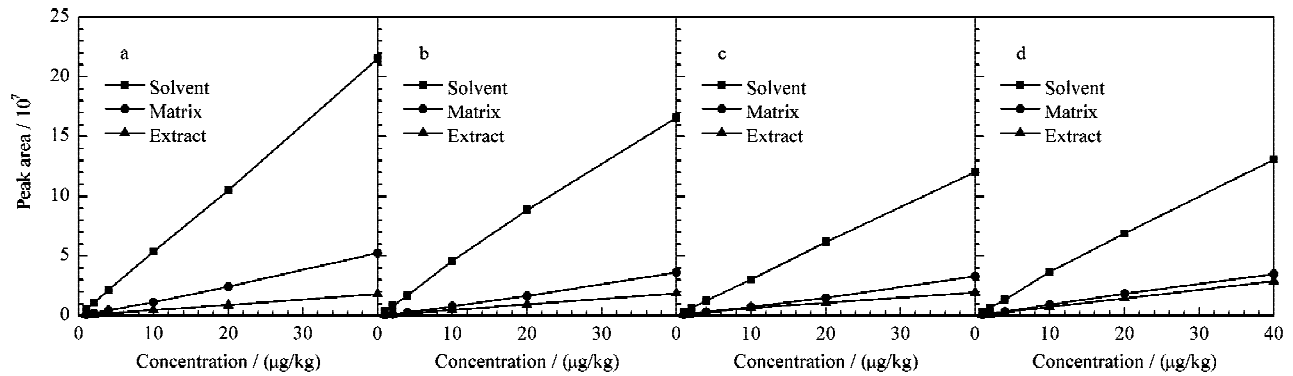


图 4 (a)鸡爪、(b)鸡腿、(c)鸡翅、(d)鸡蛋的溶剂校正曲线、基质校正曲线和萃取校正曲线

Fig. 4 Solvent, matrix and extract calibrations of (a) chicken toe, (b) chicken leg, (c) chicken wing, (d) hen egg

表 1 线性方程、相关系数、检出限(LOD)和定量限(LOQ)

Table 1 Linear equations, the correlation coefficients (r^2), limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ)				
Matrix	Linear equation *	r^2	LOD/($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/($\mu\text{g/kg}$)
Chicken toe	$y = -920080 + 1321050x$	0.9984	0.5	2.0
Chicken leg	$y = -1052240 + 8709900x$	0.9974	0.5	2.0
Chicken wing	$y = -291856 + 812348x$	0.9970	0.5	2.0
Hen egg	$y = -1282460 + 1366830x$	0.9928	0.5	2.0

* y : peak area; x : concentration ($\mu\text{g/kg}$). Linear range: 1–40 $\mu\text{g/kg}$.

2.4 方法的回收率和精密度

通过对阴性样品进行加标回收试验来考察方法的准确度和精密度。按照前面的提取净化步骤,在阴性的鸡爪、鸡腿、鸡翅、鸡蛋 4 种基质样品中分别

添加相当于 2.5, 10, 20 $\mu\text{g/kg}$ 水平的克球酚标准溶液进行加标回收试验,每个添加水平下测定 8 个平行样,重复 3 d。其平均回收率及其日内、日间精密度见表 2。

表 2 鸡爪、鸡腿、鸡翅、鸡蛋中克球酚在 4 个添加水平下的平均回收率(R , $n=8$)及其日内精密度(RSD_1 , $n=8$)和日间精密度(RSD_2 , $n=3$)

Table 2 Average recoveries (R , $n=8$) and their intra-day precision (RSD_1 , $n=8$) and inter-day precision (RSD_2 , $n=3$) of clopidol at four spiked levels in chicken toe, chicken leg, chicken wing and hen egg												%
Spiked/ ($\mu\text{g/kg}$)	Chicken toe			Chicken leg			Chicken wing			Hen egg		
	R	RSD_1	RSD_2	R	RSD_1	RSD_2	R	RSD_1	RSD_2	R	RSD_1	RSD_2
2	132.44	2.51	5.90	99.82	7.18	10.83	94.48	5.60	7.68	84.88	3.50	6.54
5	98.49	1.86	4.95	67.15	3.58	6.93	70.23	6.09	11.35	67.09	6.47	10.14
10	88.80	4.03	7.41	59.18	4.36	8.79	67.83	6.34	13.22	57.27	5.48	7.56
20	80.44	3.70	9.53	55.38	1.54	4.75	69.14	8.66	15.27	56.87	4.27	8.15

表 2 结果显示 ,在 2.5 ,10 ,20 μg/kg 4 个添加水平下 ,方法的平均回收率稳定在 55.38% ~ 132.44% 之间 ,日间精密度小于 15.27% ,说明方法的准确度高 ,通用性好。

3 结语

本文所建立的方法 ,简单易操作 ,在 2.5 ,10 ,20 μg/kg 水平下各种基质中克球酚的回收率稳定在 55.38% ~ 132.44% 之间 ,日间精密度小于 15.27% ;方法灵敏度高 ,LOQ 为 2.0 μg/kg ,选择性好 ,抗干扰能力强 ,可以作为畜禽肉中克球酚残留的分析确证方法。

参考文献 :

[1] Ying Y F , Pi X E , Lin X J. Physical Testing and Chemical Analysis Part B : Chemical Analysis (应永飞 ,皮雄娥 ,林仙军. 理化检验 :化学分册) ,2007 ,43(2) :147

[2] Zhang R , Duan H A. Chinese Journal of Veterinary Medicine (张睿 ,段宏安. 中国兽医杂志) ,2002 ,38(5) :39

[3] Pang G F , Cao Y Z , Fan C L. Chinese Journal of Chromatography (庞国芳 ,曹彦忠 ,范春林. 色谱) ,1993 ,11(3) :172

[4] Pi X E , Ying Y F , Fei D B , et al. Acta Agriculturae Zhejiangensis (皮雄娥 ,应永飞 ,费笛波 ,等. 浙江农业学

报) ,2005 ,17(4) :200

[5] Ministry of Agriculture Raising Livestock Veterinarian Bureau. Chinese Journal of Veterinary Drug (农业部畜牧兽医局. 中国兽药杂志) ,2002 ,36(7) :13

[6] Gong Y Q , Shao D J , Geng S W. China Poultry (贡玉清 ,邵德佳 ,耿士伟. 中国家禽) ,2002 ,24(5) :9

[7] Dusi G , Faggionato E , Gamba V , et al. J Chromatogr A , 2000 ,882 :79

[8] Mou J , Rong H , Chen M Y , et al. Chinese Journal of Chromatography (牟俊 ,荣会 ,陈明岩 ,等. 色谱) ,1996 ,14(6) :478

[9] Pang G F , Cao Y Z , Fan C L , et al. J Chromatogr A , 2000 ,882 :85

[10] Pizzutti I R , de Kok A , Zanella R , et al. J Chromatogr A , 2007 ,1142 :123

[11] Dodder N G , Peck A M , Kucklick J R , et al. J Chromatogr A , 2006 ,1135 :36

[12] Rogatsky E , Stein D. J Am Soc Mass Spectrom , 2005 ,16 :1757

[13] Kloepfer A , Quintana J B , Reemtsma T. J Chromatogr A , 2005 ,1067 :153

[14] Fernandez-Figares I , Rodriguez L C , Gonzalez-Casado A. J Chromatogr B , 2004 ,799 :73

[15] Niessen W M A , Manini P , Andreoli R. Mass Spectrom Rev , 2006 ,25 :881