

HPLC - MS 法测定鸡肉中氯吡多的残留

乐健, 吴小虎, 刘畅, 梅妮, 冯恺, 陈桂良

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的:建立鸡肉中氯吡多残留的 HPLC - MS 检测方法。**方法:**鸡肉组织经乙腈提取, 用氧化铝柱和葡聚糖凝胶阴离子交换柱净化, 洗脱液浓缩后用含内标物对乙酰氨基酚的甲醇溶液溶解。采用 Ultimate XB - C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 甲酸溶液 - 乙腈 (85:15) 作为流动相; 定量离子通道为 [M + H]⁺ *m/z* 192 (氯吡多) 和 *m/z* 152 (内标), 以同位素离子通道 *m/z* 194, 196, 192 中氯吡多的峰面积比值作为定性依据。**结果:**氯吡多的线性范围为 20 ~ 400 ng · mL⁻¹ (*r* = 0.9994); 将氯吡多以 0.005, 0.010, 0.015 mg · kg⁻¹ 分别添加到空白鸡肉组织中, 测得回收率分别为 84.0%, 86.8%, 84.8%, RSD 均小于 7%; 用该方法测定鸡肉中氯吡多残留的检测限、CC_α 和 CC_β 分别为 0.0002, 0.011, 0.012 mg · kg⁻¹。**结论:**该方法专属性好, 灵敏度高, 可用作鸡肉中氯吡多残留的检测。

关键词:氯吡多; 残留; 鸡肉; 高效液相/质谱

中图分类号: R917.

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2008)04 - 0578 - 04

HPLC - MS determination of clopidol residues in chicken muscle

LE Jian, WU Xiao - hu, LIU Chang, MEI Ni, FENG Kai, CHEN Gui - liang

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To establish a high - performance liquid chromatographic - mass spectrometry (HPLC - MS) method for identification and quantitative determination of clopidol residues in chicken muscle. **Method:** Clopidol was extracted from muscle with acetonitrile. The extract was cleaned up on an alumina column followed by an anion - exchange column, the eluate was evaporated and residue was dissolved in methanol containing paracetamol as internal standard. Clopidol was separated on an Ultimate XB - C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 5 μm) by using 0.1% formic acid solution - acetonitrile (85:15) as mobile phase. The clopidol was identified by the ratios of its peak areas at *m/z* 194 and *m/z* 192 and those at *m/z* 196 and *m/z* 192, and it was determined quantitatively by selected ion monitoring mode at [M + H]⁺ *m/z* 192 (clopidol) and *m/z* 152 (internal standard). **Result:** The linear range for clopidol was 20 - 400 ng · mL⁻¹ (*r* = 0.9994). Recoveries of clopidol spiked to muscle tissues at levels of 0.005, 0.010 and 0.015 mg · kg⁻¹ were 84.0%, 86.8% and 84.8%, respectively, with RSDs less than 7%. The limit of detection, CC_α and CC_β were 0.0002, 0.011 and 0.012 mg · kg⁻¹, respectively. **Conclusion:** This method is specific, sensitive and suitable for residue testing of clopidol in chicken muscle.

Key words: clopidol; residue; chicken muscle; HPLC - MS

氯吡多 (clopidol), 又称氯羟吡啶、二氯二甲吡啶酚, 是一种广谱抗球虫增效剂, 主要用于预防和治疗畜禽的球虫病, 例如以 125 mg · kg⁻¹ 添加于饲料中能有效地预防鸡球虫病的爆发。但是, 该药物的长期使用或不按规定用药会造成氯吡多在动物体内和组织中残留, 直接影响人类的健康。现在, 美国、加拿大、日本以及中国都规定了各种动物组织中氯吡多残留最高限量标准, 其中又以我国和日本的规

定最为严格。美国 FDA 规定的氯吡多在鸡组织中的最高残留限量 (MRL) 标准为肌肉 5 mg · kg⁻¹、肝脏 15 mg · kg⁻¹, 我国农业部曾在 1999 年规定氯吡多在禽类肌肉中的 MRL 为 5 mg · kg⁻¹, 现与日本均统一为鸡肉中的 MRL 为 0.01 mg · kg⁻¹[1,2]。动物组织中氯吡多残留的检测方法主要采用高效液相色谱法^[1-4]、气相色谱^[5] 和气相色谱/质谱联用法 (GC/MS)^[5] 等。高效液相色谱法具有简便快速的

特点,但灵敏度低是其主要缺点,该方法的检测限无法满足各国对鸡肉组织中氯吡多残留的限度要求,GC法通常需要衍生化处理,相对麻烦。本文建立一种快速、简便、灵敏的高效液相色谱/质谱联用法测定鸡肉中氯吡多的残留,并且将氯吡多同位素离子通道 m/z 194、 m/z 196 与 $[M+H]^+$ 通道 m/z 192 的氯吡多峰面积比值作为定性依据,可以减少假阳性率的发生,提高定性的可靠性。

1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱质谱联用仪(美国 Agilent 公司),配二元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器和 MSD 检测器(四极杆)、Chem-Station 工作站控制系统。

氯吡多对照品:批号为 4324x,纯度 99.8%,购自 Sigma-Aldrich 公司。对乙酰氨基酚对照品:批号为 110713-200208,购自中国药品生物制品检定所。氧化铝:层析用,中性,70~230 目,上海五四化学试剂厂。阴离子交换树脂:Dowex 1X8-200 离子交换树脂, Sigma-Aldrich 公司。其他所有试剂均为分析纯或色谱纯,所用溶液均用重蒸馏水配制。

样品均为我单位作为“中国百胜餐饮集团特约食品安全实验室”接受中国百胜餐饮集团委托检验的鸡肉样品,共 5 批。

2 仪器条件及参数

色谱条件:采用 Welch Materials Ultimate™ XB-C₁₈ 柱(100 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 0.1% 甲酸溶液-乙腈(85:15),流速 0.3 mL·min⁻¹;柱温:30℃。

质谱条件:离子化方式:API-ES(+)。干燥气流速:10 L·min⁻¹,干燥气温度:350℃。雾化气压力:2900 kPa。毛细管电压:4000 V,氯吡多和内标的碎裂器电压分别为 80 V 和 110 V。SIM 模式,检测离子: $[M+H]^+$ m/z 192、同位素离子 m/z 194 和 m/z 196(氯吡多)以及 $[M+H]^+$ m/z 152(内标)。

3 储备液的制备

氯吡多对照品储备液:取氯吡多对照品 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得。

内标储备液:称取对乙酰氨基酚对照品 1 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得。

内标液:精密量取内标物储备液 10 mL,置 100

mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得。

4 层析柱的填装与处理

4.1 氧化铝层析柱 柱尺寸为 30 cm×1.8 cm,下填玻璃棉塞,柱内装约三分之一甲醇,缓缓加入氧化铝 15 g,用甲醇 20 mL 预洗柱子。

4.2 阴离子交换树脂层析柱 将 Dowex 1X8-200 离子交换树脂 200 g 浸入 20% 醋酸钠溶液中,不时搅拌,浸泡 6 h 后,倾入布氏漏斗中,用 20% 乙酸钠溶液淋洗至仅存痕量氯离子(用饱和硝酸银丙酮溶液检验,呈微混浊),再用水淋洗至无氯离子,再依次用 200 mL 下列溶液淋洗:甲醇、0.25% 醋酸甲醇溶液、甲醇。淋洗后,贮存于试剂瓶中,加甲醇浸泡备用。柱尺寸为 17 cm×1 cm,下填玻璃棉塞,加入上述树脂悬浮液,使沉降后高约 2~3 cm,用甲醇洗之,使用前,再依次用 0.5% 醋酸甲醇溶液 20 mL 和甲醇 20 mL 洗涤。

5 试验方法

5.1 提取和净化 称取搅碎的鸡肉样品 5 g(精确至 0.01 g)和无水硫酸钠 5 g 于 50 mL 离心管中,加乙腈 25 mL,匀浆 2 min,3000 r·min⁻¹ 离心 5 min。将上清液倾入下接阴离子交换柱的氧化铝柱中,使提取液通过 2 个净化柱净化。再用乙腈 20 mL 提取残渣 1 次,离心后同样将上清液倾入氧化铝柱中净化。待提取液全部过柱后,用甲醇 20 mL 淋洗 2 个柱子,弃去全部淋洗液。取下氧化铝柱,将 25 mL 离心管置于阴离子交换柱下,用 0.5% 醋酸甲醇溶液 20 mL 洗脱氯吡多,洗脱液蒸干,精密加内标液 0.5 mL 溶解残渣,经 14000 r·min⁻¹ 高速离心 3 min 后,取上清液测定。

5.2 标准曲线 分别精密量取氯吡多对照品储备液 20, 60, 100, 160, 200, 400 μL, 各加内标储备液 100 μL, 再分别加甲醇 880, 840, 800, 740, 700, 500 μL, 混匀。按上述色谱条件进样, 计算氯吡多与内标物峰面积之比值, 进行线性回归。

5.3 回收率 称取搅碎的鸡肉样品 5 g(精确至 0.01 g)若干份,分置 50 mL 离心管中,各加无水硫酸钠 5 g,分别加氯吡多对照品储备液 25, 50, 75 μL。经“5.1”项下提取和净化后检测,计算氯吡多与内标物峰面积之比值,代入标准曲线求得氯吡多在 0.005, 0.010, 0.015 mg·kg⁻¹ 水平上在鸡肉组织中的回收率。

5.4 检测灵敏度 将氯吡多对照品储备液加至空白鸡肉中,使鸡肉中含氯吡多分别为 0.005, 0.010, 0.015 mg·kg⁻¹, 经“5.1”项下提取和净化后检测,

按离子通道 m/z 192 中氯吡多峰的信噪比为 3 计算检测限,并根据文献[7]计算 $CC\alpha$ 和 $CC\beta$ 。

6 结果

6.1 在本实验选定的色谱和质谱条件下,内标物和氯吡多的保留时间分别为 8.0 min 和 9.4 min,色谱峰峰形较佳。空白鸡肉提取液在上述保留时间无色谱峰出现。各离子通道的色谱图见图 1。

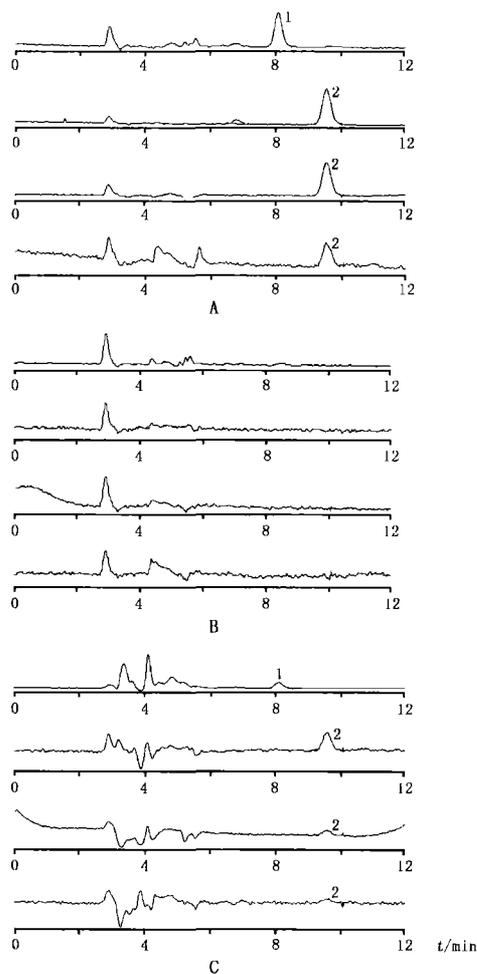


图 1 HPLC-MS 法测定鸡肉中氯吡多的色谱图

Fig 1 HPLC-MS chromatograms of clopidol in chicken muscle

A. 氯吡多对照品 (clopidol reference standard) B. 空白鸡肉组织 (blank tissues) C. 添加于空白鸡肉组织的氯吡多 (clopidol spiked to tissues)

1. 内标物 (internal standard) 2. 氯吡多 (clopidol)

6.2 标准曲线 线性回归方程为

$$Y = 0.2386X - 1.3381 \quad r = 0.9994$$

其中 Y 代表氯吡多和内标物峰面积比值, X 代表氯吡多对照品溶液浓度 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 线性范围为 20 ~ 400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

6.3 回收率 测得 0.005, 0.010, 0.015 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个添加水平的鸡肉组织回收率分别是 84.0%,

86.8%, 84.8%, RSD 均小于 7%。结果表明, 该检测方法可靠, 重现性好。

6.4 检测灵敏度 应用本实验建立的检测方法, 测得鸡肉组织中氯吡多最低检测限, $CC\alpha$ 和 $CC\beta$ 分别为 0.0002, 0.011, 0.012 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结果表明该方法的灵敏性高, 完全能满足最严格 MRL 要求的氯吡多检测需要。

6.5 样品检测结果 5 批样品中氯吡多检测均为阴性。

7 讨论

7.1 氯吡多在有机溶剂中溶解性较好, 一般文献均使用有机溶剂将其从生物体组织中提取, 经浓缩或净化处理后直接进行仪器测定。考虑到分析仪器价格昂贵以及方法的耐用性, 大多文献特别是法定标准加强了提取液的净化处理, 采用了氧化铝柱和阴离子交换柱相结合的方法, 并在净化的同时达到浓缩的目的^[4,5,8-10]。经过层析柱处理后的样品溶液基本不含干扰成分, 尤其可以提高专属性不强的仪器的检测灵敏度和方法的准确性^[4]。因此, 本文在样品处理中基本参考了上述通用的做法并略加调整。

7.2 实验中曾在质谱检测器前串接 1 台二极管阵列检测器, 在紫外波长 270 nm 处与质谱检测器同时检测, 结果表明质谱检测器的灵敏度较紫外检测器高 50 余倍。由于氯吡多的化学结构中既存在着氯和羟基这样含孤对电子的基团, 同时羟基本身也是质子给予体, 因此, 氯吡多在质谱的离子化方式中可以采用正离子化或负离子化 2 种方式, 但由于给电子效应更强些, 表现在质谱的检测灵敏度上, 本文的 API-ES(+) 离子化方式较文献^[8] 的负离子化方式约有 1 个数量级的提高。当然, 灵敏度的提高也与本文的流动相中加了有利于质子化的试剂甲酸有关。

7.3 质谱的灵敏度虽高, 但受干扰的因素亦多, 因此在实验中发现质谱的响应波动较大, 进样精密度不高, 尤其是在样品溶液进样结束后再回进对照品溶液的时候。文献[8]亦称紫外检测的重现性要优于质谱检测可能就是这个原因。在样品溶液制备的最后一步加入结构与氯吡多类似的对乙酰氨基酚内标液, 可以有效降低质谱检测器的波动对结果重现性的影响。

7.4 在欧盟的限用化合物目录中虽然没有列出氯吡多的 MRL, 但是可以根据欧盟 96/23/EC 法令判断氯吡多仍属于法令附录 I 中 B 类化合物(2) 其他

兽药(b)驱球虫药类的范畴^[11],因此与之相应的确认分析检测要求至少应达到3个鉴别分^[7],而本文选定3个测定离子 m/z 192,194,196正好可以满足欧盟对该化合物检测的需要。另外,根据含氯化物同位素峰丰度比值理论推算,氯吡多在 m/z 192,194,196通道的峰面积比的理论值应为1:0.65:0.11,这与我们实际测定结果相差均在10%以内,尤其是 m/z 192与 m/z 194离子通道峰面积的比值与理论值误差小于3%。在氯吡多日常的确认检测中,应将此比值作为氯吡多阳性结果的必要条件,这样可以减少假阳性率的发生。

7.5 欧盟在当今的食品污染物和残留检测中逐步引入统计学的概念,以满足实验室认可和规范的要求。例如,在欧盟2002/657/EC法令中^[7]提出了 $CC\alpha$ 和 $CC\beta$ 指标,不确定度的理念被引入检测灵敏度中,并有取代传统的检测限和定量限的趋势。本文计算出的 $CC\alpha$ 和 $CC\beta$ 实际意义在于:当实验测定结果大于 $0.011\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,我们判断氯吡多残留超标的准确率大于95%;当样品中氯吡多实际含量大于 $0.012\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,采用本文测定方法漏判的可能性小于5%。

参考文献

- 1 PI Xiong-e(皮雄娥), YING Yong-fei(应永飞), FEI Di-bo(费笛波), *et al.* Determination of clopidol in chicken muscle by high performance liquid chromatography method(鸡肉中氯羟吡啶的高效液相色谱法测定). *Acta Agric Zhejiang*(浙江农业学报), 2005, 17(4):200
- 2 NIE Hong-yong(聂洪勇), YUAN Zhi-neng(袁智能), PENG San-he(彭三和). Rapid determination of clopidol residue in chicken muscle by HPLC(HPLC快速测定鸡肉中二氯二甲吡啶酚残留). *J Instrum Anal*(分析测试学报), 1993, 12(5):23
- 3 Dusi G, Faggionato E, Gamba V, *et al.* Determination of nicarbazin and clopidol in poultry feeds by liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2000, 882(1):79
- 4 SHEN Jian-zhong(沈建忠), XIAO Xi-long(肖希龙), ZHU Bei-lei(朱蓓蕾), *et al.* Studies on residues of clopidol in chicken tissues(氯羟吡啶在鸡组织中的残留研究). *Acta Vet Zootech Sin*(畜牧兽医学报), 1997, 28(3):238
- 5 LIAN Jin-ming(连锦明), HUANG Ying(黄颖), TONG Qing-song(童庆松), *et al.* Detection of dichlorodimethyl pyridol in food of animal origin by gas chromatography(气相色谱法测定动物性食品中二氯二甲吡啶酚的研究). *Chin J Heal Lab Tech*(中国卫生检验杂志), 2004, 14(1):30
- 6 ZHANG Rui(张睿), DUAN Hong-an(段宏安). GC/MS determination of clopidol in poultry meat(禽肉中氯羟吡啶残留量的GC/MS测定法). *Chin J Vet Med*(中国兽医杂志), 2002, 38(5):39
- 7 Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). *Offic J Europ Communit* 17. 8. 2002
- 8 Pang Guo-fang, Cao Yan-zhong, Fan Chun-lin, *et al.* Determination of clopidol residues in chicken tissues by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2000, 882(1):85
- 9 Veterinary Bureau of Agriculture Department(农业部畜牧兽医局). HPLC determination of clopidol residue in meat(动物源食品中氯羟吡啶残留检测方法-高效液相色谱法). *Chin J Vet Med*(中国兽医杂志), 2002, 36(7):13
- 10 Professional standard of the People's Republic of China for import and export commodity inspection SN/T 0212. 1-93(中华人民共和国进出口商品检验行业标准 SN/T 0212. 1-93). Method for determination of clopidol residues in poultry meat for export - Liquid chromatography(出口禽肉中二氯二甲吡啶酚残留量检验方法-液相色谱法)
- 11 Council Directive of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC (96/23/EC) amended by (EC) No 806/2003 and amended by ACT of 2004. *Offic J Europ Communit* 23. 05. 1996

(本文于2007年5月10日收到)