

QuEChERS-混合型吸附剂分散固相萃取-气相色谱-三重四级杆串联质谱法测定鸡肉和猪肉中的五氯酚

徐玲珍, 胡明友, 姚建花

湖州市疾病预防控制中心, 浙江 湖州 313000

摘要: **目的** 建立 QuEChERS-混合型吸附剂分散固相萃取-气相色谱-三重四级杆串联质谱法 (gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, GC-MS/MS) 测定鸡肉和猪肉中五氯酚的方法。 **方法** 样品用 5% 的三氯乙酸沉淀蛋白质, 加入乙腈和 QuEChERS 萃取包提取, 混合型吸附剂进行分散固相萃取净化, 乙酸酐-吡啶溶液衍生。GC-MS/MS 测定, 以 2,4,6-三溴酚为内标定量。 **结果** 本实验测定的五氯酚具有良好的线性关系 ($r>0.999$), 检出限 ($S/n=3$) 为 $0.01 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $0.03 \mu\text{g/kg}$, 回收率为 $89.8\% \sim 115.2\%$, 相对标准偏差为 $1.6\% \sim 11.3\%$ 。 **结论** 该方法操作简单, 定量准确, 重现性和精密度良好, 检出限较低, 适用于鸡肉和猪肉中五氯酚的检测。

关键词: 五氯酚; 气相色谱-三重四级杆串联质谱法; 混合型吸附剂分散固相萃取; 鸡肉; 猪肉

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2022)11-1351-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.11.016

Determination of pentachlorophenol in chicken and pork by QuEChERS-mixed adsorbent dispersive solid phase extraction with gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

XU Ling-zhen, HU Ming-you, YAO Jian-hua

Huzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Huzhou, Zhejiang 313000, China

Abstract: **Objective** To establish a method for the determination of pentachlorophenol in chicken and pork using QuEChERS-mixed adsorbent dispersive solid phase extraction with gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS). **Methods** Five percent trichloroacetic acid was added to samples to precipitate proteins, then acetonitrile and QuEChERS extraction package were added to extract. Mixed adsorbents were used to disperse solid phase extraction and purification, and derived with acetic anhydride pyridine solution. GC-MS/MS was applied to determination, and 2,4,6-tribromophenol was selected as internal standard for quantification. **Results** The pentachlorophenol measured in this experiment had a good linear relationship ($r>0.999$). The limit of detection ($S/n=3$) was $0.01 \mu\text{g/kg}$, and the limit of quantification $0.03 \mu\text{g/kg}$. The recoveries ranged from 89.8% to 115.2% , and the relative standard deviation from 1.6% to 11.3% . **Conclusion** The method is simple in operation, accurate in quantification, good in reproducibility and precision, and of low detection limit. It is suitable for the detection of pentachlorophenol in chicken and pork.

Keywords: pentachlorophenol; gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry; mixed adsorbent dispersed solid phase extraction; chicken; pork

五氯酚及其钠盐作为一种杀菌剂、杀虫剂及防霉剂,曾被广泛应用于农业、工业和养殖业中。然而稳定的化学性质,能够使其长时间残留于肝、肾和脂肪组织中,产生肝肾毒性,严重影响人体的内分泌系统^[1-4]。2019 年,我国发布的《食品动物中禁止使用的兽药及其化合物清单》中规定所有食品动物禁止使用五氯酚钠,在动物源食品中不得检出。

目前应用于各种基质中五氯酚及其钠盐的检测方

作者简介: 徐玲珍, 硕士, 助理工程师, 主要从事卫生理化检验工作。

法主要有气相色谱法^[5-7]、气相色谱-质谱法^[8-9]、气相色谱-三重四级杆质谱法^[10-11]、液相色谱^[12]、超高效液相色谱-串联质谱法^[13]。但在实际测定时,动物组织前处理过程中会出现不同程度的乳化,基质效应干扰大。这不仅增加前处理的难度,也严重影响检测的重现性和准确性。本研究建立 QuEChERS-混合型吸附剂分散固相萃取-气相色谱-三重四级杆串联质谱法 (gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, GC-MS/MS) 测定鸡肉和猪肉中五氯酚的检测方法,通过使用 QuEChERS 法提取,混合型吸附剂分散固相萃

取净化,去除了动物组织中含有的大量蛋白质和脂肪,降低因乳化、基质效应干扰等造成的影响。同时,使用内标法定量,增强了该方法的可操作性、重现性和准确性。

1 仪器与方法

1.1 主要仪器与试剂 气相色谱-三重四极杆串联质谱仪(Agilent 6890A-7000C,美国 Agilent 公司);千分之一天平[MS303S,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);氮吹仪(美国 Organomation 公司)。乙腈、正己烷均为分析纯;2,4,6-三溴酚(26163YM,2 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$);五氯酚标准溶液[1.04 mg/ml ,中国计量科学研究院,GBW(E)080475];QuEChERS 萃取包(1.0 g 氯化钠和 4.0 g 无水硫酸镁,Agilent technologies);Primary Secondary Amine (PSA):Cleaner PSA Agela technologies INC.;ODSC18 粉:Cleaner ODSC18 Agela technologies INC.;中性氧化铝粉:层析用(用前于 600 $^{\circ}\text{C}$ 马弗炉烘烤);衍生试剂(乙酸酐:吡啶=1:1)

1.2 方法

1.2.1 样品处理 准确称取样品约 5 g,加入 50 μl 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 2,4,6-三溴酚内标,10 ml 水,15 ml 5%三氯乙酸溶液,60 $^{\circ}\text{C}$ 超声 10 min,取出,加入 10 ml 乙腈及含有 1.0 g 氯化钠和 4.0 g 无水硫酸镁的 QuEChERS 萃取包,振荡 15 min,10 000 r/min 离心 10 min,取 5 ml 上层有机相置于装有 300 mg 混合型吸附剂(100 mg PSA,100 mg ODSC18 粉,100 mg 中性氧化铝粉)的 15 ml 塑料管中,振荡 5 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 10 ml 玻璃试管,60 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至 1.0 ml 残余物待衍生。在上述残余物中加入 0.5 ml 衍生试剂,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴衍生 15 min,取出冷却,加入 1 ml 正己烷,2.0 ml 0.2 mol/L 碳酸钾溶液,混匀,10 000 r/min 离心 2 min,取上清液进样。

1.2.2 仪器条件 色谱柱:DB-5MS(30 m \times 250 $\mu\text{m}\times$ 0.25 μm);流量:1.2 ml/min;进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;进样量:1.0 μl ;程序升温:70 $^{\circ}\text{C}$ 维持 2 min,以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温到 250 $^{\circ}\text{C}$,维持 2 min;接着将温度以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温到 280 $^{\circ}\text{C}$,维持 2 min。载气:氮气,纯度>99.999%;不分流进样。质谱:多反应检测扫描(multi-reaction monitoring,MRM);电子轰击离子源,230 $^{\circ}\text{C}$,70 eV;传输线温度:280 $^{\circ}\text{C}$;溶剂延迟:5.0 min;四极杆温度:150 $^{\circ}\text{C}$,碰撞气:高纯氮气。五氯苯乙酸酯的定量离子为 m/z 266,定性离子为 m/z 264, m/z

268, m/z 308;2,4,6-三溴苯乙酸酯的定量离子为 m/z 330,定性离子为 m/z 328, m/z 332。2,4,6-三溴苯乙酸酯和五氯苯乙酸酯的总离子流图见图 1。

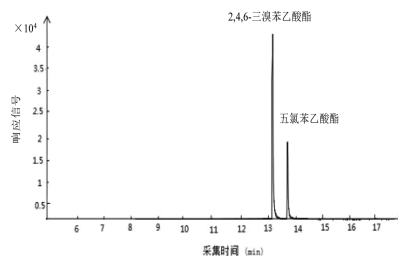


图 1 2,4,6-三溴苯乙酸酯和五氯苯乙酸酯的总离子流图

1.3 标准曲线绘制 取 8 个 10 ml 离心管,分别取 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 五氯酚标准溶液 10、25、50、100、200、500 μl 和 1 000 μl ,分别加入 50 μl 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 2,4,6-三溴酚内标,用乙腈定容至 1 ml,分别加入 0.5 ml 衍生试剂,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴衍生 15 min,取出冷却,加入 1 ml 正己烷,2.0 ml 0.2 mol/L 碳酸钾溶液,混匀,10 000 r/min 离心 2 min,取上清液进样,得到 0、10、25、50、100、200、500、1 000 ng/ml 标准系列。按照上述条件测定,以标准与内标定量离子峰面积比为纵坐标(y),以标准浓度为横坐标(x),绘制标准曲线,内标法定量。

2 结果

2.1 吸附剂的选择 分别考察了 PSA、ODSC18 粉、中性氧化铝及混合型吸附剂(100 mg PSA,100 mg ODSC18 粉,100 mg 中性氧化铝粉)对鸡肉和猪肉组织的净化效果。结果表明:单一的 PSA 能去除动物性组织的脂肪酸和色素,但对五氯酚也存在一定的吸附,且前处理乳化现象严重,得到不同加标浓度的回收率偏低;单一的 ODSC18 粉和单一的中性氧化铝粉能够去除动物性组织中的蛋白质和脂肪酸,但基质干扰大,得到不同加标浓度的回收率偏低;采用混合型吸附剂进行分散固相萃取净化,既能除去动物性组织中的蛋白质和脂肪,也能去除动物性组织的脂肪酸和色素,显著减弱乳化现象和基质效应的干扰,得到不同加标浓度的回收率较高。所以本实验选择混合型吸附剂进行分散固相萃取净化,见图 2。

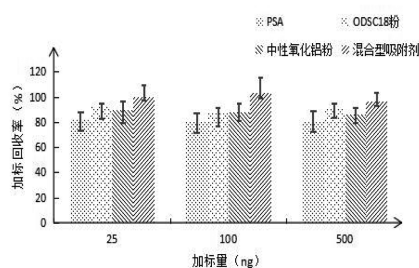


图 2 不同加标量在不同吸附剂中得到的加标回收率

2.2 吸附剂加入量的选择 分别考察了吸附剂加入量(50~350 mg)对加标回收率的影响。结果表明,随着混合型吸附剂加入量的增加,加标量为 100 ng 时,加标回收率增加,当吸附剂加入量为 300 mg 时,得到的回收率最高,之后随着混合型吸附剂加入量的增加,加标回收率并未明显增加。因此,本实验选择混合型吸附剂的加入量为 300 mg,见图 3。

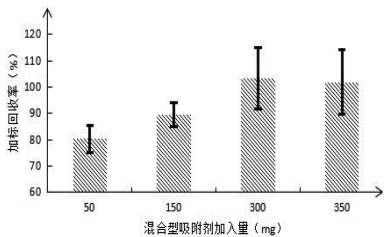


图3 混合型吸附剂加入量对加标回收率的影响

2.3 净化方式的选择 考察了通过 QuEChERS 法提取之后,分别使用 SLC 柱和混合型吸附剂进行净化。结果表明,使用 SLC 柱净化,乳化现象明显,在操作上需要较长时间,净化效果明显低于混合型吸附剂。所以本实验选择混合型吸附剂进行分散固相萃取净化。

2.4 衍生剂的选择 五氯酚与乙酸酐发生乙酰化反应,吡啶作为催化剂。结果显示:单一的乙酸酐作为衍生剂,得到的加标回收率偏低。乙酸酐:吡啶(1:2)作为衍生剂,得到的加标回收率也偏低;乙酸酐:吡啶(1:1)和乙酸酐:吡啶(2:1)作为衍生剂时,得到的加标回收率较高。由于乙酸酐属于易制毒试剂,在回收率符合要求的情况下,选择乙酸酐:吡啶(1:1)作为衍生试剂。本实验选择乙酸酐:吡啶(1:1)作为衍生剂,见图 4。

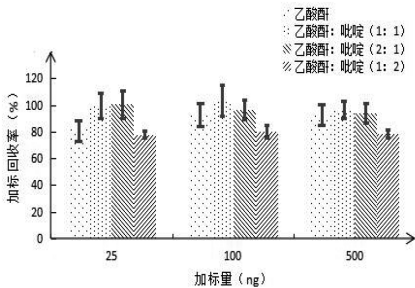


图4 不同加标量在不同衍生剂中得到的加标回收率

2.5 线性关系、检出限和定量限 在 10~1 000 ng/ml 的线性范围内,得到良好的线性回归方程: $y = 0.023070x - 0.040984$, 相关系数 $r > 0.999$, 在空白猪肉和鸡肉中加入五氯酚,以信噪比($S/n = 3$)确定检出限,得到检出限为 0.01 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 0.03 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.6 精密度和回收率 向空白鸡肉和猪肉样品中分别加入 25、100 和 500 μl 浓度为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 五氯酚标

准溶液和 50 μl 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 2,4,6-三溴酚内标。按照上述色谱和质谱的条件测定,从表 1 中可知:回收率为 89.8%~115.2%,相对标准偏差为 1.6%~11.3%($n = 8$)。

表1 鸡肉和猪肉中五氯酚的加标回收率实验结果($n = 8$)

样品	样品本底值/(ng)	加标值/(ng)	加标回收率/%	相对标准偏差/%
鸡肉	ND	25	90.6~109.5	10.4
	ND	100	91.6~115.2	7.5
	ND	500	89.8~103.4	2.6
猪肉	ND	25	91.3~105.2	11.3
	ND	100	92.6~103.2	6.5
	ND	500	90.8~101.2	1.6

2.7 实际样品检测 分别从农贸市场和超市购买猪肉和鸡肉样本各 20 份,按照上述的方法进行分析,都未检出五氯酚。说明动物组织中五氯酚的污染水平较低。

3 小 结

本研究建立 QuEChERS-混合型吸附剂分散固相萃取-GC-MS/MS 法测定鸡肉和猪肉中的五氯酚的方法。该方法不仅操作简单,内标法定量准确,重现性和准确性良好,且具有较低的检出限,适用于鸡肉和猪肉中五氯酚的检测要求。

参考文献

[1] 王旭刚,孙丽蓉.五氯酚的污染现状及其转化研究进展[J].环境科学与技术,2009,32(8):93-100.

[2] 宋瑞霞,阮鸿洁,刘征涛,等.五氯酚钠致突变性研究[J].中国公共卫生,2008,24(3):337-339.

[3] 夏勇,董晓岚,孟真,等.五氯酚钠的发育毒性和遗传毒性研究[J].预防医学,2016,28(11):1081-1086.

[4] 王诗生,王芳,蒋新.五氯酚在土壤生态系统中的环境行为研究进展[J].生态学报,2010,5(7):1894-1902.

[5] 张渊,谢萍娟,刘芬,等.气相色谱法测定沉积物中三氯酚和五氯酚[J].山西农业科学,2016,44(6):805-807.

[6] 杭学宇,冯晓青,汪怡,等.气相色谱法测定小龙虾中五氯酚[J].现代预防医学,2014,41(5):803-805.

[7] 何旭峰,黄小兰,易良键,等.气相色谱质谱法检测鸡蛋中五氯酚酸钠残留[J].食品安全导刊,2018,8(23):73-74.

[8] 林长钦,苏哪锋,李家宏,等.QuEChERS-气相色谱-质谱法测定不同食品基质中五氯酚及其钠盐残留量[J].安徽农业科学,2021,49(6):190-192.

[9] 史玉坤,杨梅桂,杨清华,等.气相色谱-质谱法快速检测水产品中五氯酚[J].中国食品卫生杂志,2015,7(1):19-21.

[10] 曾涛,杨荣,邓芬芳,等.气相色谱-三重四极杆串联质谱测定动物组织中五氯酚残留[J].医学动物防制,2019,35(3):259-266.

[11] 赵舰,程莉,唐晓琴,等.气相色谱-离子阱质谱同位素内标衍生法测定鸡肉和猪肉中的五氯酚[J].中国卫生检验杂志,2016,26(19):2773-2775.

[12] Fan C, Li n, Cao XL.Determination of chlorophenols in honey samples using in-situ ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography [J].Food Chem, 2015,174(5):446-451.

[13] 王连珠,方恩华,王彩娟,等.QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中痕量五氯酚及其钠盐[J].色谱,2018,36(6):518-522.