doi:10.11751/ISSN.1002－1280.2021.4.03

分散固相萃取结合 UPLC－Orbitrap MS 联用测定禽蛋中五氯苯酚残留量

吴剑平[1]，严 凤[1]，张 婧[1]，王 博[1]，潘 娟[1]，贡松松[1*]，达列亚·阿合买提[2]

（1. 上海市兽药饲料检测所，上海 201103；2. 新疆兽药饲料监察所，乌鲁木齐 830063）

［收稿日期］2020－08－21　［文献标识码］A　［文章编号］1002－1280（2021）04－0017－10　［中图分类号］S859.84

［摘　要］　建立了超高效液相色谱－静电轨道阱质谱联用测定禽蛋中五氯苯酚残留量的分析方法。取均质后的禽蛋样品经乙腈溶液提取，加入无水硫酸镁和氯化钠进行脱水和盐析，高速离心分层后，取适量乙腈层溶液经 0.1%（$V:V$）甲酸稀释后，用酸性氧化铝粉末进行样品净化并以 10000 r/min 离心取上清液，过 0.22 μm 滤膜后上机测定。使用反相色谱柱进行分离，流动相为乙腈：0.1% 甲酸＝75：25，采用等度程序进行洗脱，静电轨道阱质谱进行定性定量分析。结果表明，五氯苯酚在 0.5～100 μg/kg 范围内线性关系良好（$r>0.995$），方法的最低检出限为 0.2 μg/kg，最低定量限为 0.5 μg/kg，添加回收率在 74.43%～96.85% 之间，批内批间变异系数 $CV\%<10\%$。该方法具有较好的准确度与精密度，适用于禽蛋中五氯苯酚残留量的测定。

［关键词］　五氯苯酚；分散固相萃取；静电轨道阱质谱

Determination of Pentachlorophenol Residues in Eggs by Dispersive Solid Phase Extraction Combined with Ultra Performance Liquid Chromatography－orbitrap Mass Spectrometry

WU Jian－Ping[1], YAN Feng[1], ZHANG Jing[1], WANG Bo[1], PAN Juan[1],
GONG Song－Song[1*], AHHMAITI · Dalieya[2]

（1. *Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstaff*, *Shanghai* 201103, *China*；
2. *The Institute of Veterinary Drugs and Feed Control in Xinjiang*, *Urumgi* 830063, *China*）

Corresponding author: *GONG Song－song*, *E－mail*: *hsxy－gss*@163.*com*

Abstract: To establish a method for determination of pentachlorophenol residues in eggs by dispersive solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography－orbitrap mass spectrometry, homogenized egg samples were extracted with acetonitrile, and dehydrated and salted out with anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride. After high speed centrifugation, the extract was diluted by the 0.1%（$V:V$）formic acid and purified by the acid alumina powder. After 10000 r/min centrifugation, the extract was filtered by 0.22 μm film

---

作者简介：吴剑平，畜牧师，从事兽药饲料残留分析及农产品质量安全检测研究。

通讯作者：贡松松，E－mail：hsxy－gss@163.com。

and then detected. The targets was separated by isocratic elution with a reverse phase column as the stationary phase and acetonitrile:0.1% formic acid = 75:25 as the mobile phase. Orbitrap mass spectrometry was used for qualitative and quantitative analysis. Results showed that pentachlorophenol had good linear relationships in the range of 0.5 ~ 100 μg/kg, and the correlation coefficients were above 0.995. The limit of detection of the method was 0.2 μg/kg and the minimum limit of quantitative was 0.5 μg/kg. The recovery were between 74.43% and 96.85%, Coefficient of variation(*CV%*) in - batch and between - batch were lower than 10%. This method has good accuracy and precision, which is suitable for the determination of pentachlorophenol residues in eggs.

Key words: pentachlorophenol; dispersive solid phase extraction; orbitrap mass

五氯苯酚又名无氯酚酸(Pentachlorophenol, PCP),其分子式为 C_9HCl_5O, 结构式如图 1, 是一种有机氯农药,其作用机理是将生物代谢过程中的氧化磷酸化解偶联, 具有广谱生物杀伤性[1],常用于杀菌、杀虫、除草、落叶、木材防腐等。有文献报道[2-3],我国从 1958 年以来主要将五氯苯酚钠(PCP - Na)用于杀灭钉螺以控制血吸虫病传播,在长江中下游 11 个省(市)的稻田和池塘使用持续了几十年。PCP - Na 还可作为触杀型灭生性除草剂使用于稻田,主要用于除稗草和幼草。其在 1988 ~ 2000 年的产量超过 7000 吨,之后维持在每年约 3000 吨。PCP 在获得广泛应用的同时, 它所造成的环境问题也日益受到人们的高度重视, 有关研究也日益深入。有研究表明,PCP 也是一种环境激素,其可通过食物链进入人体,经血液循环至全身各组织器官,大约 20% 可蓄积于体内,微量即可导致中枢神经系统、血液、肝肾损伤及内分泌紊乱,而且还是环境污染物二噁英的一种来源,具有强烈的致癌、致畸变作用[4-5]。因此,其于 1975 ~ 1991 年先后被科威特、瑞典、印度尼西亚、瑞士、新西兰和印度全面禁用,1980 ~ 1992 年陆续被奥地利(仅限科研)、中国(仅限木材防腐)、伯利兹(仅限持证者防腐) 和欧盟(仅限非公共场所) 所限用,被美国列入环境激素、优先控制污染物列表[3]。

目前,常见的检测 PCP 方法主要检测对象为木材、家具、纺织品、水体及水产品中的五氯苯酚检测,其主要采用的仪器方法多为气相色谱法和气相色谱质谱联用法[6-7]。由于 PCP 化学结构中苯环上连有 5 个氯离子和一个羟基,其分子极性很强,一般需要衍生化后才能进行气相色谱或气相色谱质谱联用分析[8-10]。也有报道表明[11-13],可以使用液相色谱质谱联用检测 PCP,其无需衍生化,不会因为衍生化效率带来问题。但由于其分子结构的特点,其需要较高的碰撞能量,且一般只能获得母离子与氯离子组成的离子对,在定性时难以获取两个不同的碎片离子导致其方法特异性不佳。静电轨道阱质谱是一种高分辨率质谱,其分辨率一般可以达到 70000 以上,这使其获得的化合物精确质荷比和同位素离子丰度比信息具有极强的特征性[14],可以非常准确地同时定性定量 PCP。禽蛋中富含蛋白质、卵磷脂和脂肪,这些杂质不仅降低了目标物提取的效率,还极易污染检测设备,选择分散固相萃取技术作为前处理步骤可有效防止杂质的干扰和污染[15],有利于更稳定、准确地获得检测结果。目前在禽蛋中检测 PCP,能同时实现精准识别与精确定量的方法并未见报道,而市场中却有对禽蛋中 PCP 的检测需求。高分辨质谱法能同时实现精准识别与精确定量,具有较高的灵敏度和特异性,适合禽蛋中 PCP 的检测需求。

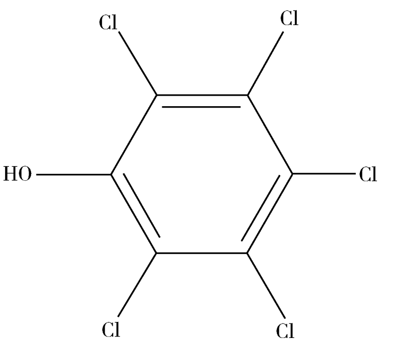


图 1 五氯苯酚化学结构式

Fig 1 Structure of pentachlorophenol

1　材料和方法

1.1　仪器　Ultimate 3000RS 超高效液相色谱、Xcalibur 控制软件、静电轨道阱质谱带 ESI 电离喷雾源（Q Exactive）、Xcalibur 数据处理系统、高速冷冻离心机（Multifuge X1R，ThermoScientific）；精密电子天平（EX125ZH，OHAUS）。

1.2　材料、药品与试剂　五氯苯酚对照品（天津阿尔塔科技有限公司，CAS No：87－86－5，批号：S035895，99.9 μg/mL），上海市定点养殖场（上海军安特种蛋鸡场）采用封闭式管理，以未检出 PCP 阳性饲料进行饲喂，专门提供的一批禽蛋：鸡蛋（批号：JK20190078－80），鸭蛋（批号：JK20190070－72），鸽蛋（批号：JK20190067－69），甲酸、乙腈、甲醇、正己烷、异辛烷（色谱纯）；酸性氧化铝粉末（200 目），去离子水（电阻率≥18 MΩ · cm）。

1.3　色谱条件　色谱柱：反相分析柱（Waters T3 C18 100×2.1 mm，1.8 μm），柱温：30 ℃，流速：0.3 mL/min，进样量：5 μL，流动相：A 为乙腈，B 为 0.1% 甲酸，A∶B＝75∶25 等度洗脱，所得色谱质谱图如图 2 所示。

1.4　质谱条件　使用 ThermoScientific 公司的 Q Exactive 静电轨道阱质谱带 ESI 电离喷雾源，条件如下：ESI－模式，源电压 3300 V，鞘气压力 330 kPa，辅助气流速 4.5 L/min，吹扫气流速 0.25 L/min，离子传输管温度 350 ℃，雾化器温度 350 ℃，检测模式为全扫描模式，扫描范围 256～276 Da，分辨率设为 70000，透镜电压 105 V，质量数提取窗口宽度 MEW 设为 5 ppm。

1.5　前处理条件　同批次样品分别取 5 个鸡蛋、鸭蛋和鸽蛋，分别去壳匀浆后准确称取 2.00 g 样品置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 乙腈，充分震摇 3 min，8500 r/min 高速离心 3 min 后，精密量取 1.00 mL 上清液至试管中，加入 1.00 mL 0.1% 甲酸溶液，加 0.2 g 酸性氧化铝粉末，涡旋混匀后 10000 r/min 离心，上清液过 0.22 μm 尼龙滤膜后装入棕色进样瓶待测。

1.6　方法灵敏度实验　分别称取分别称取（2.00±0.02）g 禽蛋空白样品去壳后匀浆，各取 40 份于具塞离心管中，其中 20 份作为空白基质，另外 20 份依次加入已知浓度的标准工作液，制成含 PCP 药浓度为 0.2 μg/kg 的添加样品。按照 1.5 项前处理方法处理后，按 1.3 与 1.4 项仪器条件进样分析。

1.7　基质效应实验　称取（2.00±0.02）g 三种禽蛋空白样品各 5 份，按 1.5 项方法处理后获得相应组织空白基质溶液。另精密称定标准品 10±0.5 mg，用甲醇溶解并定容至 100 mL，得 100 μg/mL 的标准品贮备液。取标准品贮备液用 0.1% 甲酸甲醇稀释至 100 ng/mL 的标准品工作溶液。取适量标准品工作溶液用 0.1% 甲酸溶液稀释至 1 ng/mL 溶剂标准品溶液，另取适量标准品工作溶液用空白基质溶液稀释至 1 ng/mL 基质标准品溶液。将 1 ng/mL的溶剂标准品溶液基质标准品溶液按 1.3 与1.4项的仪器条件进样测试。

1.8　线性定量范围　将 100 μg/mL 的 PCP 标准品贮备液用 0.1% 甲酸甲醇溶液稀释至 1 μg/mL 的标准中间溶液，再以禽蛋样品按 1.5 项前处理方法处理所得的空白基质溶液稀释标准中间溶液获得 0.5、1.0、2.5、5.0、10、25、100 μg/kg 系列基质标准工作曲线溶液，按 1.3、1.4 项仪器条件进样检测。

1.9　方法准确度与精密度　分别取 3 批空白鸡蛋、鸭蛋和鸽蛋中添加定量限（LOQ）0.5 μg/kg，半最大残留限量 25 μg/kg，最大残留限量 50 μg/kg 和 2 倍最大残留限量（2MRL）100 μg/kg 含量水平的 PCP，进行添加回收率测定实验。对每种禽蛋的同一批次样品，取 5 枚去壳后匀浆，分别进行上述 4 个添加量的添加回收实验，在一天内不同时间用同一标准曲线和一周内不同天不同标准曲线重复测定 6 次，取平均值，分别计算日内和日间精密度（*CV%*）；对 3 个不同批次同一添加量下的 15 份样品的回收率测得结果统计其相对标准偏差作为批间精密度指标（批间 *RSD%*）。

2　结果与分析

2.1　提取液提取效率研究　在 4 种基质中尝试了多种提取液，包括纯异辛烷、正己烷、酸化乙腈（含

1% 甲酸, V/V)、50% 酸化乙腈(含 1% 甲酸, V/V)、1% 甲酸水溶液提取。2 g 空白试样中加入1 μg/mL 的标准中间溶液 100 μL 分别加入上述提取液进行振荡提取,之后采用 1.5 项中前处理条件进行净化,测得结果如表 1。测试结果表明,五氯苯酚(pKa = 4.80, logP = 4.74)在酸性环境下属于极性中强的化合物,在 1% 甲酸水溶液中的提取效率几乎为 0,而在酸化乙腈溶液中的提取效率超过 80%,在正己烷或异辛烷这类极性小的溶剂中提取效率也低于 20%。使用酸化乙腈作为提取剂还可沉淀除去样品中的大部分蛋白质和少部分磷脂,既获得了较高的提取效率,也能去除一部分杂质,因此选择其作为提取剂。

表 1　禽蛋中五氯苯酚提取效率研究(%)

Tab 1　Research on extraction rate of pentachlorophenol added in eggs (%)

样品	异辛烷	正己烷	酸化乙腈	50% 酸化乙腈	1% 甲酸
鸡蛋	8.8	16.3	88.2	43.5	0
鸭蛋	8.1	17.4	89.7	46.9	0
鸽蛋	9.2	15.1	86.6	47.8	0

2.2　分散相基质的选择　禽蛋中的干扰杂质主要以蛋白质和卵磷脂为主,主要通过无水硫酸镁和氯化钠进行盐析,其对基质中的蛋白质和磷脂类的生物杂质也有一定的破坏和沉降能力。乙腈在提取的同时也通过改变等电点破坏杂质蛋白质结构造成其沉淀。经过酸化乙腈提取,无水硫酸镁和氯化钠进行盐析后离心所得的提取液颜色偏黄,在使用 0.1% 甲酸稀释后会出现浑浊现象,表明禽蛋中还含有一定量的核黄素等极性杂质会干扰后续的检测,实验过程中尝试使用 PSA 粉末、C18 粉末吸附,结果发现在吸附杂质的同时会造成提取效率的大幅下降,推测是 PSA 粉末或 C18 粉末对目标化合物也有较强的吸附能力,因此,采用酸性氧化铝对其进行吸附,发现其可获得较高的回收率,其比较结果见表 2。最后,将经过处理的提取液通过高速离心可以将蛋白、磷脂、核黄素等沉降至下层,取上层清液即可获得澄明清澈,杂质含量较少,适合上机分析的样品溶液。

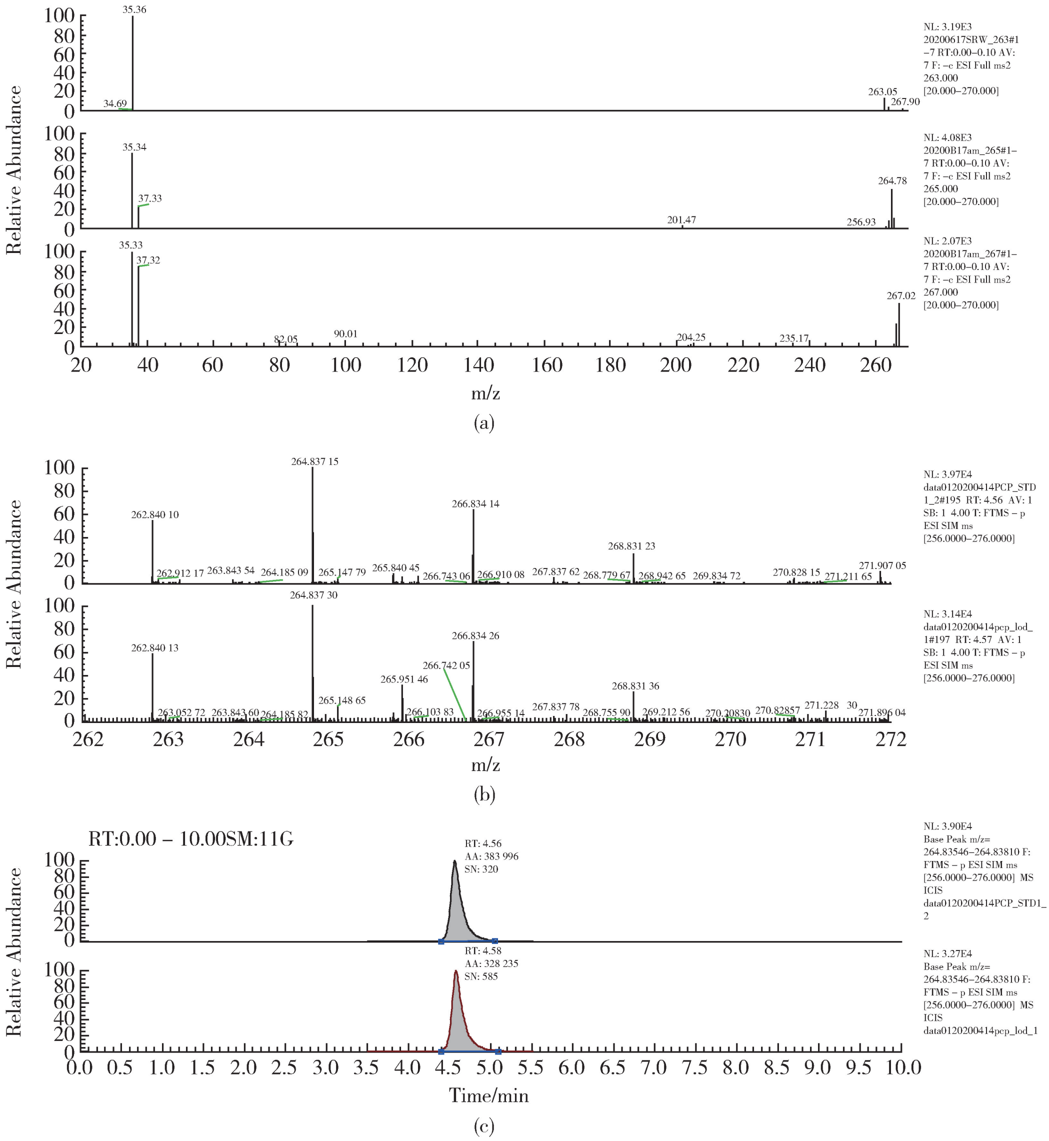
表 2　禽蛋中五氯苯酚分散固相净化效率研究(%)

Tab 2　Research on dispersive solid phasepurify effect of pentachlorophenol added in eggs (%)

样品	C18 粉末	PSA 粉末	酸性氧化铝粉末
鸡蛋	31.1	50.8	90.5
鸭蛋	29.8	49.4	91.2
鸽蛋	29.4	47.8	93.7

2.3　质谱条件的选择　在尝试使用静电轨道阱质谱前本实验室也尝试使用串联四级杆质谱对禽蛋中的 PCP 残留量进行检测,与本方法使用相同的前处理条件,仪器选用 Thermo 的 TSQ Quantivia, ESI - 模式,源电压 3200 V,鞘气压力 340 kPa,辅助气流速 6 L/min,吹扫气流速 0.4 L/min,离子传输管温度 340 ℃,雾化器温度340 ℃,检测模式为选择反应监控模式(SRM),一级母离子半峰宽设为 0.4 Da,二级子离子半峰宽设为 0.7 Da。串联质谱法所得质谱图如图 2(a)所示。其检测限可达 2.5 μg/kg,定量限可达 5 μg/kg,在 5 ~ 250 μg/kg范围内线性关系良好。而本方法使用的 Thermo Q Exactive 为高分辨质谱,其可以通过提取精确质荷比来获得特异性良好的色谱质谱图,采用 1.4 项中仪器条件,可获得对照品和样品的精确质量数质谱图如图 2(b),以 5 ppm 的 MEW 提取 Full Scan 所得到的数据获得的 EIC 图如图 2(c)。

2.4　灵敏度实验结果　按 1.6 项相应步骤进行实验,方法检测限含量添加所得特征离子质量色谱如图 3 所示,结果 20 个空白禽蛋样品均未检出阳性结果,20 个 LOD 含量添加样品均检出阳性,该结果表明方法的检出限可在 95% 置信区间内达到 0.2 μg/kg,其 $S/N > 3$;另根据信噪比 $S/N > 10$ 得出定量限可达 0.5 μg/kg。目前,我国和欧盟对 PCP 的限量标准比较严格,德国政府规定产品含有 PCP 的成份不得高于 5 mg/kg,这条例应用于各种曾受 PCP 及 PCP 化合物处理过的产品,所有出口到德国



（a）PCP 选择反应监控质谱图；（b）含 PCP 0.1 ng/mL 标准品（上）与鸡蛋添加 0.2 μg/kg（下）中全扫描质谱图；（c）含 PCP 0.1 ng/mL 标准品（上）与鸡蛋添加 0.2 μg/kg（下）提取离子色谱图

图 2　五氯苯酚质谱图

Fig 2　Mass spectrometry of pentachlorophenol

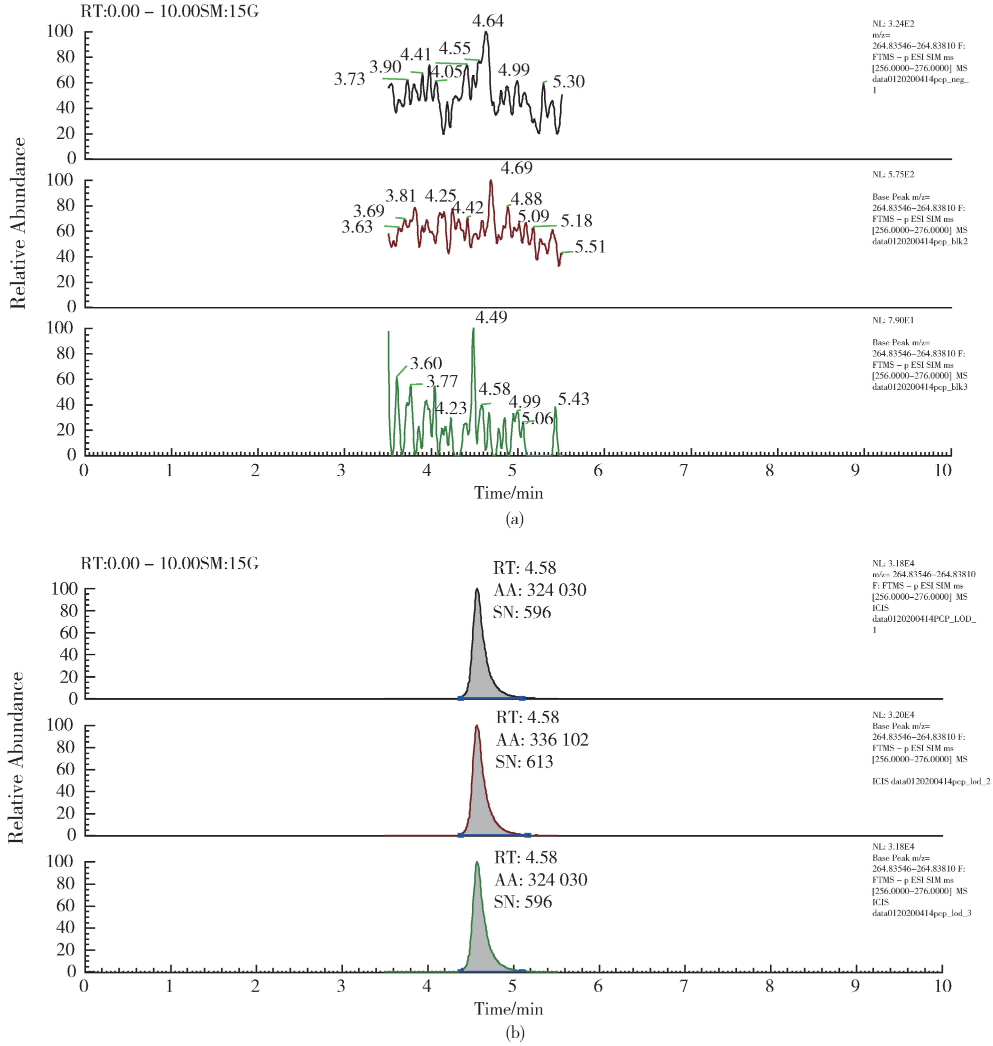
市场出售的产品，必须通过以上测试。而我国相应规定 PCP 残留量不得超过 0.5 mg/kg（婴幼儿用品不得超过 0.05 mg/kg）的限量，本方法灵敏度均能满足两者要求。

2.5　基质效应实验结果　实验所得面积均值和相对标准偏差如表 3 所示。实验结果表明，鸡蛋、鸭蛋和鸽蛋的基质标准品溶液与溶剂标准品相比都有不同程度的基质抑制作用，因此，后续实验均采用基质标准曲线进行定量校正。

表 3　禽蛋中检测五氯苯酚的基质效应研究

Tab 3　Study of matrix effect in determination of PCPin eggs

样品	浓度/($ng \cdot mL^{-1}$)	面积均值($n=5$)	$RSD/\%$
溶剂标准品	0.5	722898	1.2
鸡蛋基质标准品	0.5	711026	2.1
鸭蛋基质标准品	0.5	698951	2.5
鸽蛋基质标准品	0.5	710102	3.8



(a)鸡蛋(上)、鸭蛋(中)、鸽蛋(下)空白样品;(b)鸡蛋(上)、鸭蛋(中)、鸽蛋(下)添加 0.2 μg/kg

图 3　禽蛋中五氯苯酚检测限含量添加特征离子质量色谱图

Fig 3　EIC of pentachlorophenol LOD added in eggs

2.6　线性定量范围　将所得定量通道色谱图积分后面积以 Y 表示,进样浓度以 X 表示,所得回归曲线结果如表 4 所示,其线性相关系数 $r \geq 0.995$。实验表明,该方法检测 PCP 在 3 种禽蛋中 0.5 ~ 100 μg/kg 添加含量范围内线性良好。

2.7　准确度与精密度　按 1.9 项进行实验,所得实验结果如表 5 所示。结果表明,添加回收率在 74.43% ~96.85% 范围内,批(日)内与批(日)间变异系数 $CV\%$ <10%,表明该方法具有较好的准确度与精密度。

表 4　禽蛋中添加 PCP 的标准曲线

Tab 4　Standard curve of PCP added in eggs

组织	进样浓度范围/($ng \cdot mL^{-1}$)	含量范围/($\mu g \cdot kg^{-1}$)	线性回归方程	r
鸡蛋			$Y = 720428X + 132051$	0.9999
鸭蛋	0.25 ~50	0.5 ~100	$Y = 717682\ X + 121710$	0.9998
鸽蛋			$Y = 719545\ X + 125482$	0.9999

表 5　方法准确度与精密度

Tab 5　Accuracy and precision of the method

样品	添加量/(μg·kg^{-1})	批次	回收率/%						均值/%	批(日)内 CV/%	批(日)间 CV/%
鸡蛋	0.5	Ⅰ	81.44	75.42	84.46	76.02	79.71	76.29	79.4	4.8	4.5
		Ⅱ	80.19	75.52	80.20	83.08	76.04	80.37	79.0	4.0	
		Ⅲ	82.29	86.56	82.87	81.14	80.75	77.38	82.7	2.8	
		Ⅳ	86.20	85.44	82.98	83.05	86.12	81.42	84.8	1.9	
		Ⅴ	76.17	86.13	83.64	75.69	82.50	81.74	80.8	5.8	
		Ⅵ	76.64	85.76	83.51	86.61	82.13	77.62	82.9	4.8	
	25	Ⅰ	83.54	89.81	80.32	89.81	89.64	82.38	86.6	5.1	3.7
		Ⅱ	80.83	86.72	87.01	79.69	80.88	89.83	83.0	4.3	
		Ⅲ	85.78	87.10	86.95	86.76	84.47	89.78	86.2	1.3	
		Ⅳ	84.22	81.90	85.74	79.86	79.99	84.63	82.3	3.2	
		Ⅴ	86.34	79.96	84.36	89.09	84.39	83.40	84.8	3.9	
		Ⅵ	84.33	84.74	82.99	83.14	83.36	86.92	83.7	0.9	
	50	Ⅰ	85.19	86.05	90.07	92.09	84.69	87.16	87.6	3.7	3.2
		Ⅱ	89.98	84.06	83.44	87.11	85.14	89.52	85.9	3.1	
		Ⅲ	91.59	86.93	89.03	83.73	92.64	87.25	88.8	4.1	
		Ⅳ	90.95	86.82	90.82	92.74	85.17	87.36	89.3	3.5	
		Ⅴ	91.32	92.91	86.40	84.93	91.00	88.94	89.3	3.9	
		Ⅵ	91.94	88.99	86.93	87.16	86.25	87.87	88.3	2.6	
	100	Ⅰ	93.16	94.30	94.19	94.56	95.59	94.97	94.4	0.9	1.9
		Ⅱ	94.78	96.31	91.57	92.05	96.82	96.23	94.3	2.6	
		Ⅲ	95.89	93.99	95.05	92.20	96.53	96.68	94.7	1.8	
		Ⅳ	91.89	95.38	91.47	92.41	94.03	96.46	93.0	1.8	
		Ⅴ	96.01	96.68	95.62	93.26	94.57	96.80	95.2	1.4	
		Ⅵ	92.67	91.45	91.49	95.92	92.55	92.88	92.8	2.0	
鸭蛋	0.5	Ⅰ	75.78	85.17	81.21	74.81	82.70	76.04	79.9	5.6	4.5
		Ⅱ	77.85	84.62	76.85	81.00	78.70	75.00	79.8	3.9	
		Ⅲ	75.96	77.81	78.51	78.28	86.17	81.91	79.3	5.0	
		Ⅳ	76.31	77.22	86.03	83.20	83.74	82.52	81.3	5.3	
		Ⅴ	82.59	77.12	84.47	76.08	75.20	77.18	79.1	5.3	
		Ⅵ	78.22	85.15	78.94	84.87	78.72	81.14	81.2	4.3	
	25	Ⅰ	86.02	86.40	81.53	80.96	79.70	88.09	82.9	3.7	3.4
		Ⅱ	84.95	88.20	81.04	85.55	80.40	84.25	84.0	3.9	
		Ⅲ	88.75	84.19	87.44	88.79	82.74	87.85	86.4	3.2	
		Ⅳ	85.44	86.42	88.26	86.25	81.21	87.28	85.5	3.1	
		Ⅴ	89.03	85.09	88.94	81.66	82.23	85.65	85.4	4.1	
		Ⅵ	89.35	81.80	83.14	87.08	81.62	83.85	84.6	4.1	
	50	Ⅰ	88.38	91.89	86.93	85.02	83.73	87.15	87.2	3.6	3.0
		Ⅱ	91.42	90.51	85.91	92.50	85.88	91.61	89.2	3.5	
		Ⅲ	83.80	85.19	89.92	86.11	84.33	87.65	85.9	2.8	
		Ⅳ	90.50	87.67	90.20	88.76	88.60	87.57	89.1	1.3	
		Ⅴ	87.40	86.76	86.45	84.98	84.58	90.37	86.0	1.4	
		Ⅵ	85.31	84.56	88.84	89.95	83.69	90.94	86.5	3.2	
	100	Ⅰ	94.82	95.11	95.07	93.13	93.10	94.66	94.2	1.1	1.9
		Ⅱ	91.46	92.91	94.60	95.81	94.39	91.51	93.8	1.8	
		Ⅲ	96.85	94.42	92.56	91.95	96.01	92.23	94.4	2.2	
		Ⅳ	93.63	96.49	92.87	96.36	96.56	95.97	95.2	1.9	
		Ⅴ	91.42	93.04	95.34	96.74	92.80	96.82	93.9	2.3	
		Ⅵ	96.05	92.61	94.44	92.11	92.81	91.75	93.6	1.7	

样品	添加量/(μg·kg⁻¹)	批次	回收率/%						均值/%	批(日)内 CV/%	批(日)间 CV/%
鹅蛋	0.5	Ⅰ	85.96	84.19	80.59	84.06	76.93	83.40	82.3	4.4	4.5
		Ⅱ	80.20	85.05	79.45	79.16	76.20	76.98	80.0	4.0	
		Ⅲ	78.05	86.72	74.89	79.61	82.64	80.54	80.4	5.6	
		Ⅳ	84.42	82.70	84.22	77.22	76.92	74.94	81.1	4.6	
		Ⅴ	83.96	75.44	79.26	84.73	85.39	81.92	81.8	5.2	
		Ⅵ	77.43	74.79	78.94	81.80	76.76	77.35	77.9	3.4	
	25	Ⅰ	79.58	81.80	88.14	86.41	88.90	79.71	85.0	4.8	3.8
		Ⅱ	81.34	81.01	89.83	86.45	89.01	84.05	85.5	4.9	
		Ⅲ	79.61	88.70	84.77	87.86	82.16	83.48	84.6	4.5	
		Ⅳ	81.44	83.96	82.76	84.67	84.11	84.29	83.4	1.5	
		Ⅴ	79.61	86.74	84.27	83.45	84.05	89.17	83.6	3.1	
		Ⅵ	79.58	80.95	89.08	84.41	80.51	84.15	82.9	4.7	
	50	Ⅰ	83.65	89.04	85.77	90.19	84.93	92.82	86.7	3.2	3.5
		Ⅱ	91.90	91.44	85.66	91.05	87.10	84.30	89.4	3.2	
		Ⅲ	86.94	90.49	91.66	92.93	92.16	86.84	90.8	2.6	
		Ⅳ	92.91	90.68	87.79	90.89	88.42	85.94	90.1	2.3	
		Ⅴ	83.44	91.62	92.78	88.46	87.09	84.78	88.7	4.2	
		Ⅵ	92.90	84.77	84.80	90.21	86.13	91.26	87.8	4.1	
	100	Ⅰ	94.21	93.25	96.76	94.53	91.58	96.21	94.1	2.0	1.5
		Ⅱ	93.04	92.93	93.96	96.48	93.43	95.53	94.0	1.6	
		Ⅲ	94.75	93.07	93.23	95.04	94.52	92.22	94.1	1.0	
		Ⅳ	92.96	96.11	93.85	93.87	96.39	95.58	94.6	1.6	
		Ⅴ	93.08	94.75	94.71	93.10	93.20	92.37	93.8	0.9	
		Ⅵ	92.89	92.67	93.19	91.83	93.07	91.90	92.7	0.6	
鸽蛋	0.5	Ⅰ	85.08	79.49	76.99	84.10	83.63	82.80	81.9	4.2	4.0
		Ⅱ	84.04	83.75	81.34	82.97	76.39	74.69	81.7	3.9	
		Ⅲ	81.43	78.76	78.30	83.91	86.95	84.03	81.9	4.4	
		Ⅳ	79.30	80.14	76.84	81.58	83.95	82.87	80.4	3.3	
		Ⅴ	85.65	77.13	74.43	81.04	81.71	86.30	80.0	5.4	
		Ⅵ	82.62	77.51	79.41	81.37	85.41	82.54	81.3	3.7	
	25	Ⅰ	88.73	88.71	81.14	82.23	88.38	89.74	85.8	4.4	4.4
		Ⅱ	82.69	89.73	87.20	89.02	79.74	89.75	85.7	5.0	
		Ⅲ	84.05	83.26	79.51	88.35	81.26	88.65	83.3	4.0	
		Ⅳ	80.50	81.35	82.12	87.11	89.78	88.47	84.2	4.8	
		Ⅴ	87.44	79.62	81.53	84.71	81.67	84.23	83.0	3.7	
		Ⅵ	83.33	79.39	80.58	89.57	86.14	88.94	83.8	4.9	
	50	Ⅰ	90.92	89.59	84.79	88.58	91.32	92.82	89.0	2.9	2.9
		Ⅱ	83.89	92.52	91.54	89.39	89.03	85.48	89.3	3.7	
		Ⅲ	86.57	86.53	90.94	86.71	91.48	90.37	88.4	2.9	
		Ⅳ	90.88	85.86	88.19	88.03	84.01	90.57	87.4	3.0	
		Ⅴ	84.78	88.47	88.03	89.47	91.06	86.53	88.4	2.6	
		Ⅵ	89.31	87.63	87.14	89.70	85.40	92.54	87.8	2.0	
	100	Ⅰ	93.34	95.44	91.46	94.62	95.66	92.73	94.1	1.8	1.7
		Ⅱ	96.05	91.59	92.31	94.62	94.97	93.56	93.9	2.0	
		Ⅲ	94.65	93.88	96.37	95.90	94.95	93.31	95.2	1.0	
		Ⅳ	94.65	91.73	95.26	95.27	93.55	96.37	94.1	1.6	
		Ⅴ	95.66	92.00	93.61	92.75	91.74	91.47	93.2	1.7	
		Ⅵ	94.72	95.59	92.97	95.62	94.80	96.18	94.7	1.1	

3　讨论与结论

3.1　高分辨质谱检测禽蛋中PCP残留量的特点与优势

由于五氯苯酚的结构稳定，在使用ESI源进行电离，氩气进行碰撞碎裂时，其无法在质谱中获

得除氯离子以外的碎片,因此,其单个母离子只能获得一个氯离子的特征离子碎片。如果单独选取这对离子对进行分析,其特征性肯定不佳容易受到其他分子量接近的含氯化合物干扰,这也不符合欧盟 EC 657/2002 中对于串联四级杆质谱进行化合物定性分析的相应鉴别点数最低要求的,其要求串联四级杆质谱定性化合物时必须满足拥有一个母离子和至少两对离子对。在特征碎片离子不易获取的条件下一般有两种思路:一是改用其他电离源如 EI 源,化学电离源等,但这些源常见于气相质谱,其方法灵敏度难以达到禽蛋中的 PCP 残留检测的要求[8-9];二是改用 HRMS,通过获得精确质量数的分子离子峰来精准识别和准确定量。本方法选用静电轨道阱质谱进行分析,其在 m/z 接近 200 处分辨率可达到 70000,可以精确识别 PCP 的多个同位素组成的离子簇。通过精确质量数提取 m/z =264.83678 获得响应最高,特异性最好的选择离子流色谱图 EIC,其加合物母离子的同位素峰有多个与基峰响应接近的峰,分别选取其与对照品相应离子进行质量精度比较均小于 1 ppm。参照欧盟 EC 657/2002 中使用高分辨质谱(HRMS)定性的判定要求,每个 HRMS 获取的离子可获得 2.5IPs,须 2 对以上符合质量精度要求的即可符合 IPs 不小于 4 的相应要求,本方法在难以获取具有特异性的碎片子离子时采用了该判断依据。因此,本方法在分析禽蛋中的 PCP 时相比传统的液相色谱 - 串联质谱法具有更高的定性准确性与定量灵敏度。

3.2　静电轨道阱质谱与串联四级杆质谱在禽蛋中检测 PCP 含量的比较　本实验室同时也开发了使用串联四级杆质谱对禽蛋中 PCP 进行检测的方法,该方法采用相同的前处理流程,使用 PCP 的 3 对同位素加合物离子作为母离子,经过碰撞碎裂后获得的氯离子作为子离子,以其中相对丰度比最高的 265 > 35.5 作为定量离子,同时满足了定性与定量要求。两法相比,静电场轨道阱质谱由于是高分辨质谱,因此拥有更高的质量精度,在使用一级母离子的精确质荷比定量时相比使用单位分辨质谱的离子对更有优势,其具有更高的灵敏度和特异性。由于 PCP 分子结构中只有一个苯环为母体,外接 5 个氯离子和一个羟基,其结构导致很难获取除氯离子外的稳定碎片离子,因此串联四级杆质谱在定性准确性上很容易受到质量数接近的含氯化合物干扰特异性较差,与之相比静电轨道阱质谱在分析禽蛋中的 PCP 残留时通过提取精确质量数来获得干扰更小,信噪比更高的选择离子流 EIC 图,使其相比串联四级杆质谱具有更高的灵敏度,和同级别的串联四级杆质谱相比其检测限提高了近 10 倍左右。

本研究建立了检测鸡蛋、鸭蛋和鸽蛋中五氯苯酚残留量的超高效液相色谱 - 静电轨道阱质谱检测方法。前处理使用分散固相萃取法,液相部分使用超高效反相色谱柱进行分离,静电轨道阱质谱进行定性定量分析。实验结果表明,方法的检测限为 0.2 μg/kg,定量限为 0.5 μg/kg,在 0.5 ~100 μg/kg 范围内线性关系良好(r > 0.995),添加回收率在 74.43% ~96.85%,批(日)内与批(日)间变异系数 *CV%* <10%,表明该方法具有较好的灵敏度、准确度与精密度。

参考文献:

[1]　李 娟,甘居利. 几种有机氯杀虫剂对鱼的毒性和残留效应[J]. 环境化学,2011,30(7):1241 -1246.
Li J, Gan JL. Accumulation and toxic effect of organochlorine in insecticides in fish [J]. Environmental Chemistry, 2011, 30(7):1241 -1246.

[2]　张彤晴,蒋丽娟,葛家春,等. 五氯苯酚对渔业环境的危害与对策研究进展[J]. 江苏农业科学,2007,(4):256 -259.
Zhang T J, Jiang L J, Ge J C, *et al*. Researchprogress on the harm of pentachlorophenol to fishery environment and countermeasures [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2007, (4): 256 -259.

[3]　张 兵,郑明辉,刘芃岩,等. 五氯酚在洞庭湖环境介质中的分布[J]. 中国环境科学,2001,(2):70 -72.
Zhang B, Zheng MH, Liu FY, *et al*. Distribution of pentachlorophenol in Dongting Lake environmental medium[J]. 2001,(2): 70 -72.

[4]　丁先锋,方丰平,石文超,等. 木材中五氯苯酚的检测方法研究进展[J]. 化学分析计量,2020,29(1):128 -131.

Ding X F, Fang F P, Shi W C, *et al*. Research progress of the detection of pentachlorophenol in wood products. Chemical Analysis and Meterage, 2020,29(1):128 - 131.

[5] 洪爱华,尹平河,梁志红. 高效液相色谱 - 质谱联用法测定饮用水中的五氯苯酚[J]. 生态环境学报,2010,19(1):69 - 71.
Hong A H, Yin P H, Liang Z H. Determination of pentachlorophenol in the tap water by liquidchromatography - tandem mass spectrometry[J]. Ecology and Environmental Sciences,2010,19(1):69 - 71.

[6] 余健铭,胡伟杰,欧阳国基,等. 气相色谱法测定木家具中五氯苯酚的含量[J]. 广东化工,2016,43(8):169 - 182.
Yu J M, Hu W J, Ou Yang G J, *et al*. Quantitativedetermination of pentachlorophenol in wood - based furniture by gas chromatography[J]. Guangdong Chemical Industry, 2016, 43 (8): 169 - 182.

[7] 李 彬,黄略略,宋保靓. 气相色谱 - 二级质谱法测定木竹藤草制品中五氯苯酚[J]. 深圳职业技术学院学报,2019,18(3):58 - 62.
Li B, Huang L L, Song B Q. Determination of Pentachlorophenol in Wood, Bamboo,Cane and Grass Product by GC - NCI - MS/MS[J]. Journal of Shenzhen Polytechnic,2019,18(3):58 - 62.

[8] 石文超,陈 峰,丁先锋,等. 气相色谱 - 质谱法测定木材中的五氯苯酚[J]. 化学分析计量,2019,28(5):49 - 52.
Shi W C, Cheng F, Ding X F, *et al*. Determination of pentachlorophenol in wood by gas chromatography - mass spectrometry [J]. Chemical Analysis and Meterage,2019,28(5):49 - 52.

[9] 朱晓华,梁 倩,王 凯,等. 气相色谱 - 负化学源质谱法测定河蟹中五氯苯酚及其钠盐的残留量[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(9):3650 - 3655.
Zhu X H, Liang Q, Wang K, *et al*. Determination of the residue amount of pentachlorophenol and its sodium salt in *Eriocheirsinensis* by gas chromatography - negative chemical ionization/mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(9):3650 - 3655.

[10] 姜苏杰,赵国徽,张文军,等. 基于液相色谱法测定皮革中五氯苯酚含量提取条件研究[J]. 皮革科学与工程,2016,26(4):51 - 57.
Jiang S J, Zhao G H, Zhang W J, *et al*. Theresearch about the extraction conditions that determination of pentachlorophenol in leather with liquid chromatography[J]. Leather Science and Engineering,2016,26(4):51 - 57.

[11] 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,2015,27(1):19 - 21.
Shi Y K, Yang M J, Yang Q H, *et al*. Rapid determination of pentachlorophenol aquatic products by GC - MS[J]. Chinese Journal of Food Hygiene,2015,27(1):19 - 21.

[12] 金米聪,陈晓红,李小平,等. 高效液相色谱 - 电喷雾电离质谱联用法测定水中痕量五氯酚研究[J]. 中国卫生检验杂志,2005,(3):280 - 286.
Jing M C, Cheng X H, Li X P, *et al*. Determination of trace pentachlorophenol in water by liquid chromatography electrosprayionizationmass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology,2005,(3):280 - 286.

[13] 万译文,黄向荣,伍远安,等. 高效液相色谱串联质谱法测定渔业水体及渔业饲料中的五氯苯酚[J]. 中国饲料,2019,(5):78 - 81.
Wan YW, Huang X R, Wu Y A, *et al*. Simultaneous determination of pentachlorophenol in aquaculture water and fishery feed by liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. China Feed,2019,(5):78 - 81.

[14] 吴剑平,周悦榕,张 婧,等. 超高效液相色谱 - 静电轨道阱质谱同时筛查定量饲料中的 31 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 分析测试学报,2017,36(11):1363 - 1369.
Wu J P, Zhou Y R, Zhang J, *et al*. Simultaneous Screening and quantitation of 31 carbamate pesticide residues in feed by ultra performanceliquidchromatography - Orbitrap Mass Spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36 (11): 1363 - 1369.

[15] 吴剑平,张 婧,贡松松,等. 分散固相萃取结合液相色谱串联质谱法检测牛可食性组织中吡喹酮残留量[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(11):3379 - 3389.
Wu J P, Zhang J, Gong S S, *et al*. Determination of praziquantel in edible bovine tissues by dispersive solidphase extraction combined with liquid hromatography - tandemmass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality,2019,10(11):3379 - 3389.

(编 辑:侯向辉)