doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.10.05

液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱测定鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其代谢物残留的研究

刘善菁,刘雨昕,陆桂萍,曲　斌,耿士伟

(江苏省畜产品质量检验测试中心,南京 210036)

[收稿日期] 2017-08-24　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280 (2017) 10-0029-10　[中图分类号]S859.84

[摘　要]　建立了一种测定鸡蛋与鸡肉中氟虫腈及其 3 种代谢物(氟甲腈、氟虫腈硫醚及氟虫腈砜)的液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱方法。样品经提取和盐析后,PRiME HLB 净化柱快速净化,液相色谱分离后,四极杆/静电场轨道阱质谱准确定性并定量,平行反应监测模式检测。4 种待测组分均获得足够的色谱保留和分离,各药物在 0.1~5.0 μg/kg 范围内呈现良好的线性关系,日内日间精密度小于 20 %,方法回收率在 75%~115 %之间,方法的定量限为 0.1 μg/kg。此方法快速、准确且灵敏度高,为目前国际上爆发的"毒鸡蛋"事件提供了准确有效的技术手段。

[关键词]　氟虫腈及其代谢物;鸡蛋;鸡肉;液相色谱-高分辨质谱

Determination of Fipronil and Its Metabolites Residues in Chicken Egg and Muscle by Liquid Chromatography Quadrupole-orbitrap-high Resolution Mass Spectrometry

LIU Shan-jing, LIU Yu-xin, LU Gui-ping, QU Bin, GENG Shi-wei

(*Jiangsu Quality Inspection and Testing Center for Animal Products*, *Nanjing* 210036, *China*)

Abstract: A method was established for the determination of fipronil and its metabolites (fipronil-desulfiny, fipronil sulfide and fipronil sulfone) residues in chicken egg and muscle by LC-quadrupole-Orbitrap MS. Chicken egg and muscle samples was exacted with acetonitrile, salted out by sodium chloride and anhydrous magnesium sulfate. Then the supernatant was quickly purified by PRiME HLB solid phase extraction prior to analysis by LC-HRMS. The matrix-matched calibration curve showed a good linear within the concentration range from 0.1 to 5.0 μg/kg. The average recoveries of fipronil and its metabolites at 3 levels of 0.1, 0.2 and 1.0 μg/kg ranged from 75% to 115%, and the relative standard deviations were less than 20%. The method was rapid and high sensitive, which provided an accurate and effective solution for the international incident of "poisonous eggs".

Key words: fipronil and its metabolites; chicken egg; chicken muscle; LC-quadrupole-Orbitrap MS

作者简介:刘善菁,理学硕士,从事兽药饲料畜产品质量安全检验检测新技术新方法的研究。E-mail: liushanjing_1990@163.com

氟虫腈(Fipronil,商品名:锐劲特;又名:芬普尼)是一种苯基吡唑类的广谱杀虫剂[1],由法国罗纳-普朗克公司研发[2],作用于昆虫的 γ-氨基丁酸受体,干扰昆虫中枢神经,引起昆虫神经和肌肉过度兴奋直至死亡,从而起到杀虫作用。1994 年,氟虫腈进入中国市场[3]。研究表明,氟虫腈对甲壳类水生生物和蜜蜂风险极高[3];在对人体毒性方面,温州某医院曾有过 2 例关于氟虫腈急性中毒的病患报道,患者出现四肢抽搐、精神异常、胡言乱语、狂躁等中枢神经系统兴奋症状[4]。近日,欧洲各国出现被氟虫腈污染的"毒鸡蛋"新闻又一次把它推上了风口浪尖。欧盟 395/2005 号法规[5]以及 1127/2014 补充条例[6]中,明确规定了各种农作物、畜禽产品及其制品(包括肉、蛋、奶、蜂蜜等)中氟虫腈的最大残留限量,其中鸡蛋的限量为 0.005 mg/kg。日本的肯定列表也对此有明确规定。我国于 2009 年发布农业部 1157 号公告[7]:除卫生用、部分旱田种子包衣剂外,在中国境内停止销售和使用用于其他方面的含氟虫腈成分的农药制剂。食品安全国家标准 GB2763-2016[8]对谷物、油料和油脂、蔬菜、水果、糖料和食用菌 6 项农作物中氟虫腈的残留量进行了规定,最大残留限量为 0.02 mg/kg。对畜禽产品中的氟虫腈最大残留限量没有明确规定;亦没有涉及畜禽产品中氟虫腈残留检测方法的国家标准。我国虽已严格禁用氟虫腈,但在相关限量规定及检测标准的跟进上有一定滞后。氟虫腈在动物、植物、环境中会代谢生成与氟虫腈相当或毒性更高的砜化物或亚砜化合物[1],根据 GB2763-2016 和欧盟法规中规定,食品中氟虫腈的残留量以氟虫腈及其 3 种代谢物(氟甲腈(MB46513)、氟虫腈硫醚(MB45950)、氟虫腈砜(MB46136))之和计算。

目前,关于氟虫腈及其代谢物的检测方法主要有气相色谱-质谱法[9-11]、液相色谱法[12]和液相色谱-质谱法[13-14],但是,这些方法主要针对的是蔬菜水果或者环境水体中的氟虫腈及其代谢物残留检测,Meiyu Zhang 等于 2016 年针对鸡蛋和鸡肉中的氟虫腈残留建立了 LC-MS/MS 分析方法,但仅涉及氟虫腈原形药物,未涉及其代谢物的分析。本研究建立了一种高效简便的分析鸡蛋与鸡肉中氟虫腈及其代谢物残留的液质联用方法,前处理简单快速、方法灵敏度高,适合高通量样品的检测分析。

1 材料与方法

1.1 仪器 Thermo Q-Extractive™液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪,含高压二元泵、自动进样器、柱温箱、四极杆-静电场轨道阱质量分析器、Xcalibur 3.1 数据分析系统;Sigma 3K30 冷冻离心机,Sartorius 公司;Heraeus Multifuge X1R 离心机,Thermo 公司;MS3 basic 涡旋仪,IKA 公司;KS501 振荡器,IKA 公司;N-EVAP™112 氮吹仪,Organomation 公司;LINK BLOW 氮气发生器,金浪科技有限公司。

1.2 试剂与材料 甲醇、乙腈,色谱纯,Merck 公司;乙腈,分析纯,南京化学试剂有限公司;甲酸,LC-MS级,Fisher 公司;纯净水,自制。固相萃取净化柱(PRiME HLB,60mg/3mL),Waters 公司。

标准品纯度及来源:氟虫腈(Fipronil,99.2%,Dr. Ehrenstorfer)、氟甲腈(Fipronil - desulfinyl,101 μg/mL(±3%),北京曼哈格生物科技有限公司)、氟虫腈硫醚(Fipronil-sulfide,99.0%,Dr.Ehrenstorfer)、氟虫腈砜(Fipronil - sulfone,98.2%,Dr. Ehrenstorfer)。

1.3 标准溶液的配制 取氟虫腈、氟虫腈硫醚、氟虫腈砜标准品各适量,精密称定,用乙腈溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,制成 100 μg/mL 的标准储备液;精密量取氟甲腈标准品 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,配置成 1 μg/mL 的标准储备液,4 ℃冷藏保存。临用前用定容溶液逐级稀释成标准工作溶液。

1.4 样品前处理 称取 2 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 10 mL 乙腈,涡旋使之充分混合,振荡提取 30 min,4 ℃下 10000 r/min 离心 5 min。将上清液转移至含有 1 g NaCl 和 2 g

无水硫酸镁的 15 mL 离心管中，摇匀，4 ℃下 5000 r/min离心 3 min。移取约 5 mL 上清液，备用固相萃取净化。

PRiME HLB 固相萃取柱净化：取 5 mL 上清液上样，弃去初始约 1 mL 初滤液，收集续滤液，精密移取 2.5 mL 续滤液于氮吹管中，50 ℃水浴下氮气流吹干，用 1 mL 乙腈：0.1%甲酸(50∶50，*V/V*)溶液复溶溶解残渣，超声 15 min，涡旋 1 min，过 0.22 μm微孔滤膜，待测。

1.5　液相色谱-质谱条件

1.5.1　色谱条件　色谱柱：Waters BEH C18 柱(2.1×100 mm，1.7 μm)。流动相 A：0.1%甲酸，流动相 B：乙腈(含 0.1 %甲酸，*V/V*)，梯度洗脱条件见表 1。流速 0.3 mL/min，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。

1.5.2　质谱条件　质谱分析采用 PRM(平行反应监测模式，parallel reaction monitoring，PRM)模式。测试前使用 Thermo Pierce 负离子校正液在 *m/z* 为 265.14790、514.28440、1279.99721、1379.99083、1479.98444、1579.97805、1679.97166、1779.96528 处校正，校正有效期维持在 3 d 内。质谱参数：喷雾电压：-4500 V，雾化气：40 L/h，辅助气：15 L/h，离子传输温度：350 ℃，辅助加热温度：400 ℃。分辨率：17500 FMWH @ *m/z* 200，AGC target：5×10^4，C-trap最大注入时间：50 ms。目标物及其定量子离子的精确质量数见表 2。

表 1　梯度洗脱条件

Tab 1　Procedure of gradient elution

洗脱时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	50	50
7	5	95
7.2	50	50
10	50	50

表 2　氟虫腈及其 3 种代谢物定性及定量离子信息

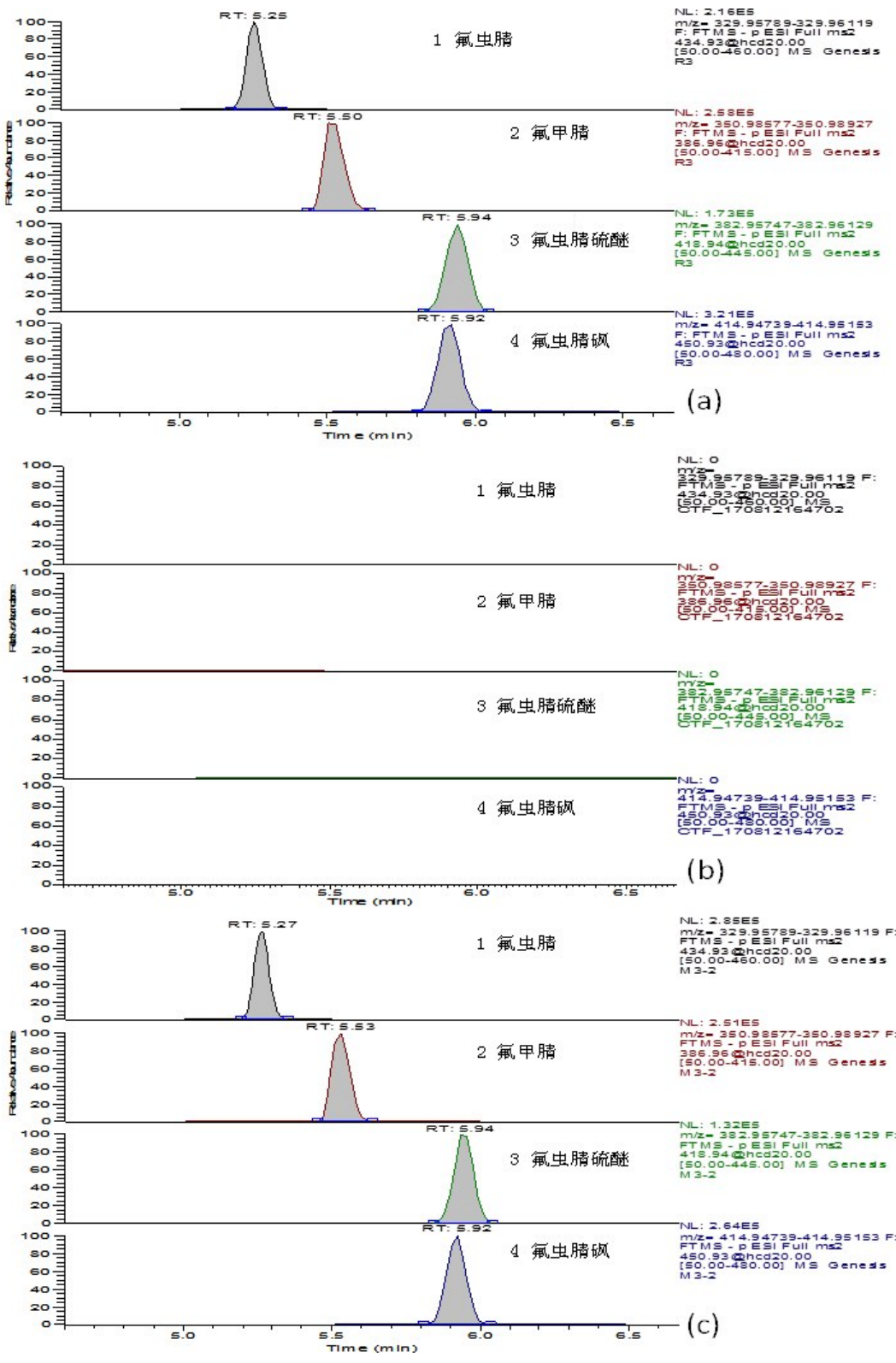
Tab 2　Qualitative and quantitative information of fipronil and its metabolites

目标化合物	母离子		子离子	保留时间/min	碰撞能量/eV
	组成	质荷比(*m/z*)	精确质量数		
氟虫腈	$[M-H]^-$	434.93143	329.95953	5.25	20
氟甲腈	$[M-H]^-$	386.96444	350.98715	5.50	20
氟虫腈硫醚	$[M-H]^-$	418.93651	382.95929	5.94	20
氟虫腈砜	$[M-H]^-$	450.92634	414.94913	5.92	20

2　结果与分析

2.1　方法专属性　空白鸡蛋及鸡肉、阳性添加的空白鸡蛋及鸡肉样品用于评价方法的专属性。结果表明，空白鸡蛋及鸡肉样品中不含干扰测定的物质；而在阳性添加样品中，4 种目标化合物保留时间在 5.0~6.0 min 之间，且峰形良好。标准溶液、空白鸡蛋及鸡蛋中阳性添加(添加量为 1 μg /kg)色谱图见图 1。同时获得了氟虫腈及其 3 种代谢物的子离子扫描图(图 2)，在定量测定的同时，可以和标准品图谱比对，进行定性判定。

2.2　基质效应　质谱分析过程中，样品基质中的干扰组分会对目标待测物产生影响，从而产生基质增强或基质抑制效应。本研究中评价基质效应的方法是：基质效应 = 空白基质配制标准响应值/溶剂配制标准响应值×100%。当基质效应在 80%~120%之间时，可用标准曲线定量，当基质效应<80%，为基质抑制效应，当基质效应>120%时，为基质增强效应，此时可考虑用基质标准曲线定量。



(a) 标准溶液(1ng /mL), standard solution (1ng /mL); (b)空白鸡蛋, blank chicken egg;

(c) 鸡蛋中阳性添加(1 μg /kg), 1 μg /kg in blank chicken egg

图 1　方法专属性色谱图(标准溶液、阴性空白鸡蛋样品、阳性加标鸡蛋样品)

Fig 1　Chromatograms of method specificity (standard solution, blank chicken egg and spiked blank chicken eggs)

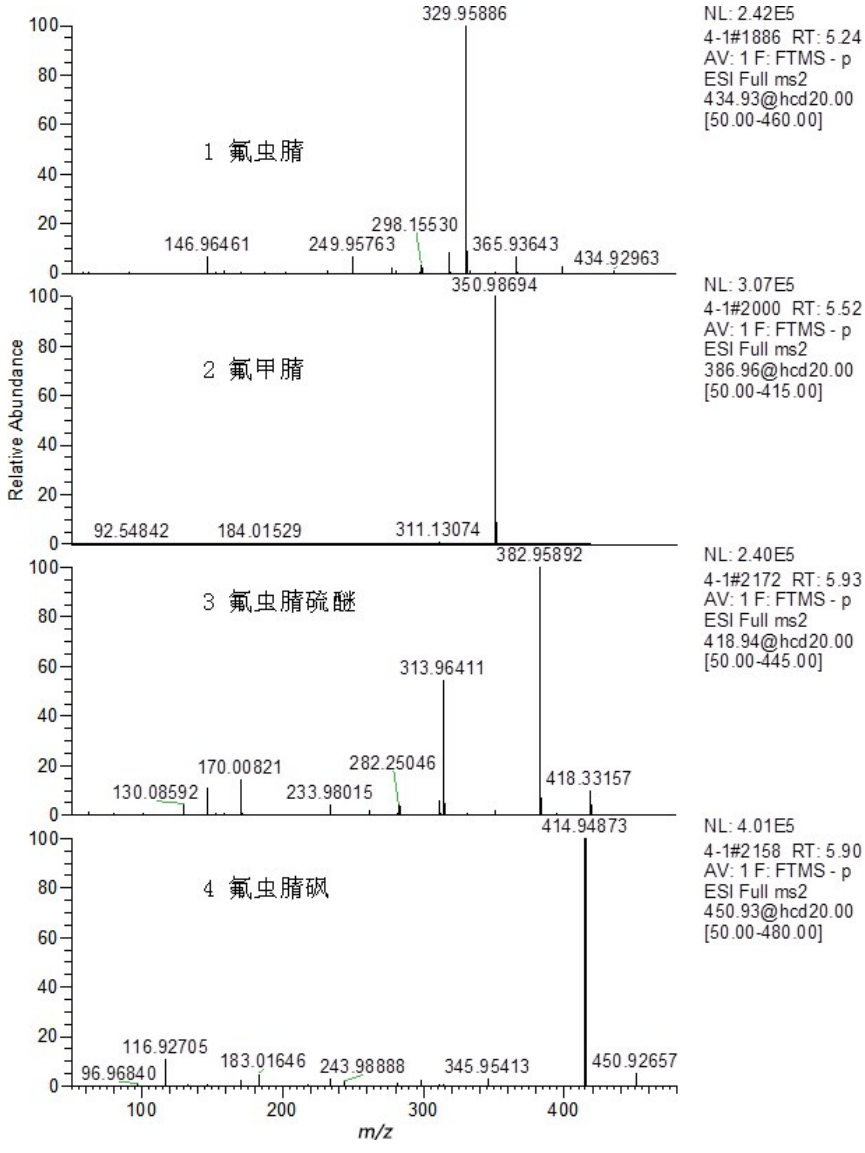


图 2　同时获得的氟虫腈及其 3 种代谢物的子离子扫描图

Fig 2　Spectrum of product ion of fipronil and its metabolites

本研究在 0.1 μg/kg(LOQ)、0.2 μg/kg(2LOQ)和 1.0 μg/kg(10LOQ)3 个加标水平上分别考察了鸡蛋和鸡肉中氟虫腈及其 3 种代谢物的基质效应。结果如表 3 所示。表中数据表明,氟虫腈和氟虫腈砜受基质干扰较弱,而氟甲腈和氟虫腈硫醚受到的基质干扰作用较强;氟虫腈的基质效应在 80%～120%之间,而它的 3 种代谢物在 1 个或多个水平上基质效应<80%,因此,为了更为准确的定量,本研究中分别采用空白鸡蛋和空白鸡肉的基质标准曲线进行定量。

2.3　标准曲线及线性范围　准确称取空白鸡蛋及鸡肉样品各 2 g,分别置于 50 mL 聚丙烯塑料离心管中,按样品前处理步骤处理得到空白基质液,分别加入混合标准溶液适量,制成一系列的基质标准曲线,进行 LC-HRMS 测定。以试样的药物添加浓度为横坐标,以目标化合物峰面积为纵坐标,进行标准曲线的绘制。按信噪比(S/N)为 3 确定检测限(LOD),按 S/N 为 10 确定定量限(LOQ)。鸡蛋及鸡肉中各化合物的线性范围、回归方程、相关系数以及方法灵敏度参数见表 4。

表 3　氟虫腈及其 3 种代谢物在鸡蛋与鸡肉基质中的基质效应

Tab 3　The matrix effect of fipronil and its metabolites in chicken egg and muscle

加标水平/(μg·kg^{-1})	鸡蛋/%				鸡肉/%			
	氟虫腈	氟甲腈	氟虫腈硫醚	氟虫腈砜	氟虫腈	氟甲腈	氟虫腈硫醚	氟虫腈砜
0.1	113.4	77.2	54.2	110.5	105.3	72.3	68.6	73.0
0.2	99.3	60.8	48.5	79.4	100.6	67.4	55.5	86.8
1.0	96.4	74.0	69.5	85.0	93.9	69.1	59.5	81.1

表 4　鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其 3 种代谢物基质标准曲线

Tab 4　The matrix calibration curve of fipronil and its metabolites in chicken egg and muscle

基质	目标化合物	线性范围/(μg·kg^{-1})	标准曲线回归方程	相关系数 R	定量限(LOQ)/(μg·kg^{-1})	检测限(LOD)/(μg·kg^{-1})
鸡蛋	氟虫腈	0.1-5.0	Y=99842+1293719x	0.9992	0.1	0.05
	氟甲腈	0.1-5.0	Y=-29489+960421x	0.9995	0.1	0.05
	氟虫腈硫醚	0.1-5.0	Y=9652+671667x	0.9998	0.1	0.05
	氟虫腈砜	0.1-5.0	Y=-30261+916149x	0.9995	0.1	0.05
鸡肉	氟虫腈	0.1-5.0	Y=20217+867038x	0.9998	0.1	0.05
	氟甲腈	0.1-5.0	Y=10261+987952x	0.9999	0.1	0.05
	氟虫腈硫醚	0.1-5.0	Y=1912+607826x	0.9997	0.1	0.05
	氟虫腈砜	0.1-5.0	Y=101237+1088490x	0.9998	0.1	0.05

2.4　精密度与回收率　分别称量鸡蛋及鸡肉的空白样品,进行氟虫腈及其 3 种代谢物的 1 倍 LOQ、2 倍LOQ 和 10 倍 LOQ 这三个浓度的加标回收实验,并且在每个浓度水平进行 5 次平行实验,分别考察 3 d,根据检测结果计算回收率,并用相对标准偏差值(relative standard deviation,*RSD*,%)评价日内和日间精密度,鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其代谢物检测结果见表 5。

表 5　鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其代谢物检测的回收率和精密度

Tab 5　Recovery and precision of fipronil and its metabolites in chicken egg and muscle

基质	目标化合物	0.1 μg/kg				0.2 μg/kg				1.0 μg/kg			
		日内		日间		日内		日间		日内		日间	
		回收率/%	*RSD*/%	回收率/%	*RSD*/%	回收率/%	*RSD*/%	回收率/%	*RSD*/%	回收率/%	*RSD*/%	回收率/%	*RSD*/%
鸡蛋	氟虫腈	92.3	6.6	85.0	8.6	99.0	3.0	94.8	9.6	102.0	5.0	95.5	7.2
	氟甲腈	89.1	7.0	91.3	8.4	94.0	5.9	102.3	7.4	92.7	2.3	94.5	6.0
	氟虫腈硫醚	86.7	8.9	79.4	17.9	104.1	8.4	107.1	10.1	88.0	6.2	91.3	4.0
	氟虫腈砜	104.5	10.1	102.3	11.6	110.7	6.0	109.1	3.9	97.7	4.2	90.1	3.8
鸡肉	氟虫腈	86.7	8.4	80.1	7.7	93.0	5.7	82.0	8.9	94.3	8.3	102.9	5.4
	氟甲腈	76.9	11.1	86.0	8.0	91.8	8.0	90.7	5.6	83.4	5.8	90.9	7.3
	氟虫腈硫醚	78.6	9.0	86.4	9.3	81.6	9.3	92.7	14.2	91.0	6.2	92.3	8.0
	氟虫腈砜	83.9	6.7	90.3	15.4	99.2	8.7	95.8	4.8	88.5	4.2	87.3	6.6

从表 5 可以发现,在低、中、高 3 个浓度,鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其 3 种代谢物的回收率均在 75%~115%之间,日内、日间精密度均小于 20%。

3　讨论与小结

3.1　液相色谱柱与流动相的选择和优化　根据氟虫腈及其 3 种代谢物的化学结构,采用常规的 C18 柱即可有效分离,本研究中采用 1.7 μm 粒径 C18 柱,柱效高,分离速度快;流动相体系采用乙腈-0.1%甲酸水溶液,乙腈黏度较小,可以有效降低色谱体系压力,对设备起到一定的保护作用,实际分析过程中发现,4 种待测物极性较小,保留较强,需要较高比例的有机相才能洗脱,在初始流动相设置为 50%时,4 种待测物在 5~6 min 内逐步洗脱,并且均获得良好的峰形。本研究中采用乙腈和低浓度甲酸水溶液作为流动相,检测灵敏度可以达到 0.1 μg/kg,在保证灵敏度的前提下获得很好的色谱保留和分离效果。

3.2　平行反应监测模式的选择　本研究选用近年推出的具有快速二级质谱功能的高分辨质谱:四极杆-静电场轨道阱质谱(quadrupole-Orbitrap,Q-Orbitrap)作为检测器,选择其中的 PRM 模式(平行反应监测模式)进行定性定量,PRM 是相对于传统的 MRM(多反应监测模式)建立起来的高分辨子离子监测技术,属于靶向 MS/MS 分析,和 MRM 只监测目标离子对的模式不同,PRM 在整个液相分离过程中会在给定电压下不断地对每一个目标母离子的全部碎片离子图谱进行记录,而且是全部高分辨/高质量精度子离子。和经典的 MRM 方法相比,PRM 提供更高的专属性,因为它在高分辨的模式下监测子离子,很少受到干扰离子的影响,因而,PRM 具有方法开发的潜在优势。

根据欧盟 2002/657/EC[15]规定,当使用低分辨质谱进行残留分析时,要求 LC-MS/MS 在定性上提供一个母离子和两个子离子,才能满足法规中的“4 分要求”;但是,部分化合物在复杂基质中不易同时产生两个子离子碎片,而使用高分辨质谱对化合物进行定性确证时,一个母离子 2 分,一个子离子 2.5 分,本研究在 PRM 模式下选择一个母离子和一个子离子进行定性和定量分析,超过欧盟的 4 分规定,并且方法抗干扰能力强,定性定量结果准确可靠。

3.3　离子检测参数的选择及定量子离子的确定　氟虫腈及其 3 种代谢物化学结构中均含有-NH_2 等电负性较强的基团,因此在负离子模式下易失去 H 得到[M-H]$^-$峰,在本研究中,采用蠕动注射泵将 100 ng/mL 的标准溶液注射入离子源,在负离子模式下分别进行了一级全扫描和二级质谱扫描,通过手动调节碰撞能量,获得不同碰撞能量下的子离子扫描图,选择母离子的丰度比约为 5%时的碰撞能量作为实际测试用碰撞能量,选择此碰撞能量下丰度最大的子离子作为定量子离子,本研究中的 4 种目标化合物,均在 HCD 电压为 20 eV 时获得较为理想的子离子信息。

3.4　样品前处理方法的选择和优化

3.4.1　盐的选择　本研究中考察了不同用量的氯化钠和无水硫酸镁对提取效果的影响。分别取阴性鸡蛋和鸡肉样品,在加标水平为 1.0 μg/kg 考察。结果表明,不加盐时,氟虫腈及其 3 种代谢物的回收率在 25%~40%之间。而分别加入氯化钠和无水硫酸镁时,待测组分的回收率有了明显提高,结果如图 3、图 4 所示。图表数据表明氯化钠和无水硫酸镁可以有效改变提取液中离子强度并起到除杂作用,提高 4 种待测物回收率,其中氯化钠提高效率略明显一些;但只加氯化钠时,提取液中残余的水分会延长氮吹时间,因此,考察氯化钠和无水硫酸镁作为复合盐析试剂时的回收率情况,结果见表 6。结果表明,氯化钠的加入量对目标化合物的回收率影响不大,而当氯化钠的量恒定时,无水硫酸镁加入量由 1.0 g 增加到 2.0 g 时,4 种化合物的回收率均有一定提高,说明此时无水硫酸镁可起到除杂净化的作用,减弱基质抑制;但当无水硫酸镁的量继续增加至 3.0 g,部分目标化合物的回收率有所下

降,说明此时在复合盐析试剂的共同作用下,吸附作用开始逐渐占优。综合考虑实验成本和回收率因素,最终选择 1.0 g 氯化钠和 2.0 g 无水硫酸钠对样品进行进化。

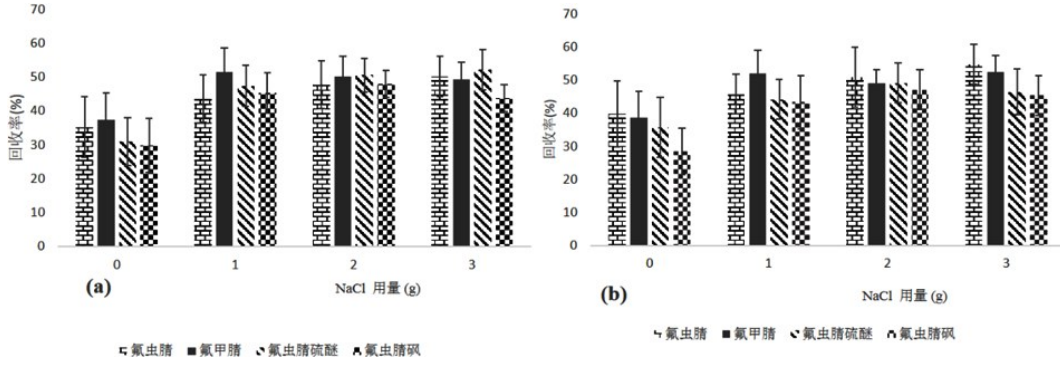


图 3　不同用量的氯化钠对回收率影响(a:鸡蛋;b:鸡肉)

Fig 3　Influence of different amount of sodium chloride for recovery

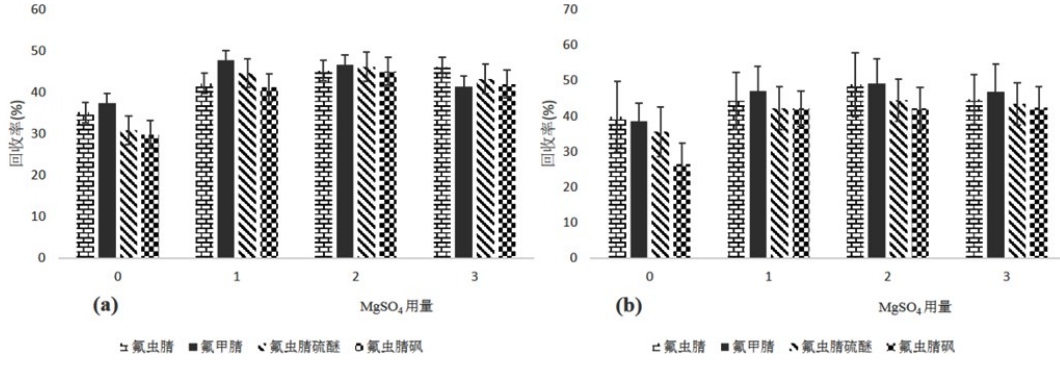


图 4　不同用量的无水硫酸镁对回收率影响(a:鸡蛋;b:鸡肉)

Fig 4　Influence of different amount of anhydrous magnesium sulfate for recovery

表 6　复合盐析试剂(氯化钠和无水硫酸镁)对回收率的影响

Tab 6　Influence of different amount of salting out reagent (sodium chloride&anhydrous magnesium sulfate) for recovery

氟虫腈	氯化钠/g	无水硫酸镁/g	Recovery/% 鸡蛋/鸡肉	氟甲腈	氯化钠/g	无水硫酸镁/g	Recovery/% 鸡蛋/鸡肉
1	1.0	1.0	50.2/52.8	1	1.0	1.0	54.1/56.9
2	1.0	2.0	53.3/56.5	2	1.0	2.0	59.8/65.1
3	1.0	3.0	48.2/51.2	3	1.0	3.0	55.6/59.4
4	2.0	1.0	50.9/48.9	4	2.0	1.0	52.7/58.1
5	2.0	2.0	56.1/54.2	5	2.0	2.0	60.1/57.5
6	2.0	3.0	53.8/57.1	6	2.0	3.0	54.8/59.2
7	3.0	1.0	52.7/56.1	7	3.0	1.0	52.5/57.1
8	3.0	2.0	51.8/56.8	8	3.0	2.0	57.2/55.2
9	3.0	3.0	48.1/50.1	9	3.0	3.0	55.4/51.4

续表

氟虫腈硫醚	氯化钠/g	无水硫酸镁/g	Recovery/%	氟虫腈砜	氯化钠/g	无水硫酸镁/g	Recovery/%
1	1.0	1.0	52.4/55.1	1	1.0	1.0	48.3/50.1
2	1.0	2.0	56.7/54.8	2	1.0	2.0	52.8/54.5
3	1.0	3.0	55.1/62.3	3	1.0	3.0	47.6/50.3
4	2.0	1.0	51.8/57.1	4	2.0	1.0	46.8/58.4
5	2.0	2.0	55.1/55.8	5	2.0	2.0	51.3/56.6
6	2.0	3.0	51.4/52.4	6	2.0	3.0	49.5/52.3
7	3.0	1.0	54.8/58.1	7	3.0	1.0	50.5/60.4
8	3.0	2.0	54.2/61.8	8	3.0	2.0	54.8/62.3
9	3.0	3.0	51.7/52.3	9	3.0	3.0	51.3/57.8

3.4.2　固相萃取方法的选择与比较　本研究中涉及的鸡蛋和鸡肉两种基质,其中脂肪和蛋白含量较高,仅用乙腈提取和盐析方法净化样品,对样品的净化程度不够,不仅会对目标物产生干扰,同时也对色谱及质谱系统有一定损伤。常用的固相萃取方法一般需经过活化、上样、洗脱 3 个步骤,整个流程时间较长,对于脂肪含量较高的基质更是容易产生柱孔隙堵塞的现象。

本研究比较了不经固相萃取、经 HLB 柱净化和 PRiME HLB 柱净化 3 种方式的净化效果。具体操作过程如下:分别取阴性鸡蛋和鸡肉样品,在 1.0 μg/kg 水平下进行回收率考察。①不经固相萃取:按样品前处理项中乙腈提取,盐析步骤操作后,精密移取 2.5 mL 上清液,50 ℃水浴下氮气流吹干,1 mL 复溶液溶解复溶,过膜进样;②HLB 柱净化:按样品前处理项中乙腈提取、盐析、离心后,精密移取 2.5 mL 上清液,加入 8 mL 水,混匀,作为固相萃取备用液。HLB 小柱分别用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化后上样,3 mL 水淋洗,5 mL 甲醇洗脱并收集,50 ℃水浴下氮气流吹干,1 mL 复溶液溶解复溶,过膜进样;③PRiME HLB 柱净化:按样品前处理项下操作。具体结果见图 5、图 6 所示。

结果表明,经固相萃取方法净化的样品回收率明显优于不经固相萃取方法净化的样品,并且方法的平行性及精密度较盐析方法有较明显的提高;而经 PRiME HLB 小柱进化的样品,4 种待测物回收率较 HLB 小柱净化的更高,这与净化过程的方式有关,PRiME 柱的净化方式在快速净化的同时尽可能避免了损失,这种前处理方式无需活化和洗脱过程,上样量小,速度快,整个净化过程仅需 5 min 完成,能够有效除去样品中超过 90%的磷脂和脂肪组分,最终回收率理想,基质干扰在可以接受的范围

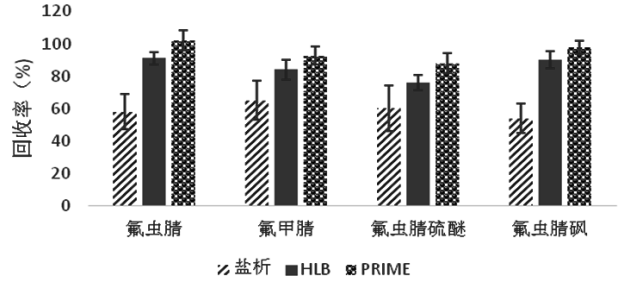


图 5　3 种不同前处理方法比较(鸡蛋)

Fig 5　Comparison of 3 different sample preparation (chicken egg)

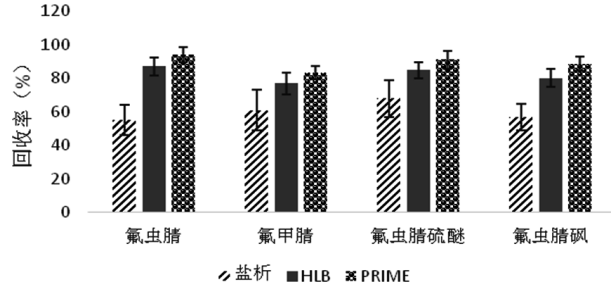


图 6　3 种不同前处理方法比较(鸡肉)

Fig 6　Comparison of 3 different sample preparation (chicken muscle)

内,大大缩短了前处理时间,适合大批量样品的筛查工作。

本研究建立了鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其代谢物(氟甲腈、氟虫腈硫醚和氟虫腈砜)LC-HRMS 检测方法,样品经提取、盐析、PRiME HLB 柱固相萃取净化,LC-Q-Orbitrap MS 测定,PRM 模式检测,本方法灵敏度高、专属性强,简便、高效,适用于鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其代谢物的快速筛查、定性筛选和定量测定。

参考文献:

[1] 徐广春, 顾中言, 杨玉清, 等. 氟虫腈的应用和风险研究进展[J]. 现代农药, 2008, 7(2): 1-11.
Xu G C, Gu Z Y, Yang Y Q, *et al*. Progress in research on risks of pesticide fipronil and its application[J]. Modern Agrochemicals, 2008, 7(2): 1-11.

[2] 林 涛, 樊建麟, 杨东顺, 等. 低温液液萃取/超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鲜枣中氟虫腈及代谢物[J]. 分析测试学报, 2015, 34(12): 1360-1365.
Lin T, Fan J L, Yang D S, *et al*. Determination of fipronil and its metabolites in fresh jujube by low temperature liquid-liquid extraction/ultra high liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015, 34(12): 1360-1365.

[3] 吴长兴. 毒死蜱和氟虫腈的环境毒理与风险[D]. 杭州:浙江大学, 2010.
Wu C X. The Environment toxicity and risk of chlorpyrufos and fipronil [D].Hangzhou:Zhe Jiang University, 2010.

[4] 卢中秋, 杜园园. 新型吡唑类杀虫剂-锐劲特急性中毒 2 例报告[J]. 中国急救医学, 2002, 22(3): 175.
Lu Z Q, Du Y Y. Two acute poisoning report of new pyrazoles pesticide of "Regent"[J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine, 2002, 22(3): 175.

[5] Commission regulations (EC) No 396/2005 of the European parliament and of the council[S].

[6] Commission regulations (EU) No 1127/2014 of 20 October 2014, amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for amitrole, dinocap, fipronil, flufenacet, pendimethalin, propyzamide, and pyridate in or on certain products[S].

[7] 中华人民共和国农业部 中华人民共和国工业和信息化部 中华人民共和国环境保护部: 公告第 1157 号[S].
Ministry of Agriculture of the PRC, Ministry of Industry and Information Technology, Ministry of Environmental Protection: Announcement No. 1157[S].

[8] GB 2763-2016. 食品中农药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准[S].
GB 2763-2016. Maximum residue limits for pesticides in food. National Standards of the People's Republic of China[S].

[9] 周 昱, 徐敦明, 陈达捷, 等. 固相微萃取-气相色谱法和气相色谱-质谱法测定茶叶中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 色谱, 2011, 29(7): 656-661.
Zhou L, Xu D M, Chen D J, *et al*. Determination of fipronil and its metabolites in tea by solid phase micro-extraction coupled with gas chromatography and gas chromatography spectrometry[J]. Chinese Journal of chromatography, 2011, 29(7): 656-661.

[10] 荣杰峰, 韦 航, 许美珠, 等. 气相色谱-电子轰击源质谱法测定茶叶中氟虫腈残留量[J]. 分析试验室, 2014, 33(1): 69-72.
Rong J F, Wei H, Xu M Z, *et al*. Determination of fipronil residues in tea by GC-EIMS[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2014, 33(1): 69-72.

[11] Thirumalaiandi Ramasubramanian, Mariappan Paramasivam, Ramabhadran Jayanthi, *et al*. A simple and sensitive single-step method for gas chromatography-mass spectrometric determination of fipronil and its metabolites in sugarcane juice, jaggery and sugar[J]. Food chemistry, 2014, 150(1): 408-413.

[12] 白宝清, 李美萍, 张生万, 等. QuEChERS-DLLME-高效液相色谱法测定蔬菜中溴虫腈和氟虫腈残留[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 254-258.
Bai B Q, Li M P, Zhang S W, *et al*. Determination of Chlorfenapyr and Fipronil Residues in Vegetables by QuEChERS Combined with Dispersive Liquid-liquid Microextraction and High Performance Liquid Chromatography[J]. Food Science, 2014, 35(24): 254-258.

[13] Sandip Hingmire, Dasharath P.Oulkar, Sagar C.Utture, *et al*. Residue analysis of fipronil and difenoconazole in okra by liquid chromatography tandem mass spectrometry and their food safety evaluation[J]. Food chemistry, 2015, 176 (1): 145-151.

[14] Meiyu Zhang, Kui Bian, Tong Zhou, *et al*. Determination of residue fipronil in chicken egg and muscle by LC-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1014(1): 31-36.

[15] European Community (EC) No 657/2002: Commission Decision of Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results [S].

(编 辑:侯向辉)