

超低温冷冻-QuEChERS-气相色谱-负化学源-质谱联用法测定糟蛋中氟虫腈及其代谢物

厉晨皓, 沈 玮, 钱梦逸, 徐秋生, 朱 倩, 张孝艳*

(平湖市食品药品检测中心, 嘉兴 314200)

摘要: 目的 建立气相色谱-负化学源-质谱联用法检测平湖糟蛋中氟虫腈及其代谢物的分析方法。**方法** 样品经乙腈提取后, 利用超低温冷冻去脂和 QuEChERS 分散固相萃取净化。采用负化学源(negative chemical ionization, NCI), 以选择离子监测(selected ion monitoring, SIM)模式对氟虫腈及其代谢物的定量离子和定性离子进行监测, 基质匹配标准曲线法定量。**结果** 氟虫腈及其代谢物在 0.5~10 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 线性相关系数均大于 0.999, 检出限在 0.050~0.102 $\mu\text{g/kg}$ 范围内。样品添加浓度在 2~10 $\mu\text{g/kg}$ 范围时, 其回收率为 94.5%~117.9%, 相对标准偏差为 2.05%~5.30%($n=6$)。**结论** 本方法快速、简便、灵敏, 测定结果准确可靠, 满足糟蛋中氟虫腈及其代谢物残留量的测定。

关键词: 氟虫腈及其代谢物; 超低温冷冻; 糟蛋; QuEChERS; 负化学源; 气相色谱-质谱联用法

Determination of fipronil and its metabolites in wine cued egg by ultra-low temperature cryo-QuEChERS combined with gas chromatography-negative chemical source-mass spectrometry

LI Chen-Hao, SHEN Wei, QIAN Meng-Yi, XU Qiu-Sheng, ZHU Qian, ZHANG Xiao-Yan*

(Pinghu Food and Drug Inspection Center, Jiaxing 314200, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of fipronil and its metabolites in Pinghu wine cued egg by gas chromatography-negative chemical source-mass spectrometry. **Methods** After extracted by acetonitrile, the samples were purified by ultra-low temperature freezing degreasing and QuEChERS dispersive solid phase extraction. The quantitative and qualitative ions of fipronil and its metabolites were monitored by negative chemical ionization (NCI) and selected ion monitoring (SIM), and quantified by matrix matching standard curve method. **Results** Fipronil and its metabolites showed a good linear relationship in the range of 0.5–10 $\mu\text{g/L}$, the linear correlation coefficients were all greater than 0.999, and the detection limits were in the range of 0.050–0.102 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries were 94.5%–117.9%, and the relative standard deviations were 2.05%–5.30% ($n=6$) in the range of 2–10 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** This method is rapid, simple, sensitive, accurate and reliable for the determination of fipronil and its metabolites in wine cued egg.

KEY WORDS: fipronil and its metabolites; ultra-low temperature freezing; wine cued egg; QuEChERS; negative chemical source; gas chromatography-mass spectrometry

*通信作者: 张孝艳, 工程师, 主要研究方向为食品、农产品质量安全检测。E-mail: 1948178203@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Xiao-Yan, Engineer, Pinghu Food and Drug Inspection Center, No. 216, Ring Road North Two, Jiaxing 314200, Zhejiang Province, China. E-mail: 1948178203@qq.com

0 引言

氟虫腈(fipronil)又名锐劲特,是一种苯基吡啶类广谱杀虫剂,用于灭杀蚤、虱、蜱、螨、蟑螂等昆虫,人类若大剂量食用会导致肝、肾、甲状腺功能受损,因此被世界卫生组织列为对人类有中度毒性的化学品^[1]。氟虫腈的化学性质较活泼,施用后经水解、光解等作用,会生成氟甲腈、氟虫腈砒、氟虫腈亚砒 3 种代谢物。对氟虫腈代谢物毒性的研究表明,其毒性要超过氟虫腈原药^[2-3]。2017 年 6 月,波及欧洲多个国家的“毒鸡蛋”事件发生后,对于氟虫腈的使用和检测也引起了广泛关注。

平湖糟蛋(以下简称糟蛋)是浙江名特产品,距今已有 270 多年的历史,是由新鲜鸭蛋经优质糯米和酒糟糟浸而成的蛋制品^[4-5]。在 GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[6]中明确了蛋制品中氟虫腈含量限量要求,不得超过 0.02 mg/kg。

目前文献中对氟虫腈及其代谢物的检测方法主要有气相色谱法^[7-8]、气相色谱-质谱法^[9-10]、气相色谱-串联质谱法^[11-12]、液相色谱法^[13-14]和液相色谱-串联质谱法^[15-16]。由于氟虫腈及其代谢物的分子结构中均含有 6 个氟原子、2 个氯原子和 1 个氰基基团,电负性极强,在离子源内易形成负离子,利用负化学源(negative chemical ionization, NCI)技术进行测定是最好的选择,其对电负性基团有特异响应,背景噪声极低^[17]。

糟蛋中含有较多的脂肪和蛋白质,需要在预处理过程中将其除去。QuEChERS 法是一种快速、简便、有效的前处理净化方法,是近年来兴起的研究热点。冷冻除脂是一种分离脂肪和蛋白质的有效手段,超低温冷冻则可以缩短冷冻时间,提升净化效果,而相关的研究却较为稀少。并且未见同时采用超低温冷冻和 QuEChERS 相结合的净化法测定蛋及蛋制品中氟虫腈及其代谢物的报道。本研究采用超低温冷冻去脂和 QuEChERS 法进行前处理,建立了气相色谱-负化学源-质谱法测定糟蛋中氟虫腈及其代谢物含量的方法,操作简便、灵敏度高,以期对糟蛋等蛋制品中氟虫腈及其代谢物含量的日常检测提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

7890A/5975C 气质联用仪(配 NCI 源,美国 Agilent 公司); FP3010 多功能样品粉碎机(德国博朗公司); PL602-L 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; Milli-Q 超纯水仪(美国 Merck-Millipore 公司); H2050R-1 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); DW-86L388 超低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司)。

氟虫腈、氟虫腈砒、氟虫腈亚砒标准储备液(100 mg/L,

介质乙腈)、氟甲腈(10 mg/L, 介质乙腈)(德国 Dr.E 公司); 乙腈、正己烷(色谱纯, 西班牙 Scharlau 公司); 无水硫酸镁、氯化钠(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); WondaPak QuEChERS SPE 净化管[岛津(上海)实验器材有限公司]; 0.22 μm 滤膜(美国 Pall 公司); 糟蛋(平湖市龙牌糟蛋有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

吸取适量各标准品溶液于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释成质量浓度为 1 mg/L 的混合标准工作液,4 °C 避光储存备用。吸取上述适量混合标准工作液,用制备好的空白基质溶液逐级稀释成质量浓度为 0.5、1、2、5 和 10 μg/L 的基质混合标准工作溶液。

1.2.2 样品前处理

将糟蛋洗净,划破蛋膜后挖取蛋白和蛋黄,用粉碎机充分混匀,制得的糟蛋样品呈黏稠的半固态。称取 5 g(精确至 0.01 g)样品,置于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 水,涡旋 1 min,使样品充分稀释。再加入 10 mL 乙腈、2 g 无水硫酸镁和 0.5 g 氯化钠,剧烈振摇 1 min,以 6000 r/min 离心 3 min,于 -80 °C 超低温冷冻冰箱中放置 20 min,取出后立即在 0 °C 下 6000 r/min 离心 30 s,吸取上清液 1.5 mL 于 QuEChERS SPE 净化管,装有 C₁₈ 吸附剂 50 mg、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)吸附剂 50 mg 和无水硫酸镁 150 mg,涡旋 30 s 混匀,12000 r/min 离心 3 min,过 0.22 μm 微孔有机滤膜后上机检测。

1.2.3 气相色谱-质谱条件

(1) 色谱条件

色谱柱: HP-5MS 柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 程序升温: 初始温度 70 °C,保持 1 min,以 15 °C/min 升至 220 °C,保持 5 min,再以 50 °C/min 升至 270 °C,保持 2 min; 进样口温度: 250 °C; 进样方式: 不分流进样; 进样量: 1 μL; 载气: 氦气(纯度≥99.999%),流速 1.0 mL/min。

(2) 质谱条件

电离模式: 负化学电离(NCI); 反应气: 甲烷(纯度≥99.99%); 电离能量 70 eV; 离子源温度: 230 °C; 传输线温度: 280 °C; 选择离子监测模式,详细参数见表 1。

表 1 氟虫腈及其代谢物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of fipronil and its metabolites

化合物	保留时间 /min	定量离子	定性离子 1	定性离子 2
氟甲腈	12.080	352	354	353
氟虫腈亚砒	13.647	384	386	385
氟虫腈	13.849	366	368	333
氟虫腈砒	15.822	416	383	347

2 结果与分析

2.1 前处理条件优化

糟蛋中的蛋白质由于醇和有机酸的长期作用而逐渐变性、凝固,直接用乙腈提取不能充分渗透,加水 5 mL 后样品被稀释,此时再用乙腈提取较为充分。

由于蛋制品中脂肪含量较高,可以采用冷冻的方式去脂。盐析离心后的样品分为 3 层,上层是乙腈溶液,中间是脂肪和蛋白质,下层是水溶液。经过实验,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中无论放置多久,上层乙腈中不再析出脂肪絮状物;在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冷冻冰箱中放置 5 min 时不会析出,放置 10 min 时少量析出,放置 15 min 以上时基本完全析出。为了确保下步离心时析出的物质不再重新溶解,选择 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 20 min,且将随后的离心时间控制在 30 s。实验表明,经超低温冷冻离心后的上层提取液较未经这一操作步骤的提取液颜色更浅,除脂效果良好。

分散固相萃取常用的净化剂有无水硫酸镁、PSA 和 C_{18} 等。无水硫酸镁可用于除水,PSA 可去除有机酸、色素、脂肪等干扰, C_{18} 可去除脂肪等非极性干扰^[18]。本研究采用 QuEChERS SPE 净化管(150 mg 无水硫酸镁、50 mg PSA 和 50 mg C_{18})对加标糟蛋样品提取液进行净化,回收率及净化效果均较为理想。

2.2 色谱条件优化

为了使氟虫腈及其代谢物得到较好地分离,同时缩短检测时间,对升温程序进行了优化。配制 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ 的基质混合标准溶液,在 1.2.3 条件下,氟虫腈及其代谢物的分离效果较好,其谱图如图 1 所示。4 个峰从左到右依次为:氟甲腈、氟虫腈亚砷、氟虫腈、氟虫腈砷。

2.3 监测离子选择

用氟甲腈及其代谢物的高浓度标准溶液分别进行全扫描,得到各个物质丰度较高的碎片离子。分别配制乙腈和空白基质标准混合溶液进行选择离子测定,剔除受基质

效应影响大、重复性不佳的特征离子。氟虫腈及其代谢物的质谱参数结果见表 1。

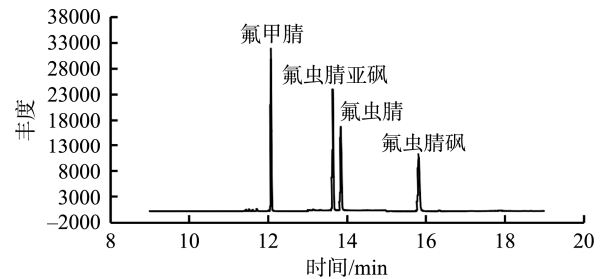


图 1 氟虫腈及其代谢物的总离子流图

Fig.1 Total ion current diagrams of fipronil and its metabolites

2.4 线性方程和检出限

利用制备好的空白基质溶液配制含有氟虫腈及其代谢物的系列基质标准工作溶液: 0.5 、 1 、 2 、 5 和 $10\text{ }\mu\text{g/L}$,在仪器工作条件下进行测定,以氟虫腈及其代谢物的定量离子峰面积为纵坐标 Y ,质量浓度为横坐标 X ,绘制标准工作曲线。结果表明,在 $0.5\sim 10\text{ }\mu\text{g/L}$ 的质量浓度范围内,氟虫腈及其代谢物具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.999 。以 3 倍信噪比($S/N=3$)确定方法的检出限(limit of detection, LOD),氟虫腈及其代谢物的检出限范围在 $0.050\sim 0.102\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。线性方程、相关系数及检出限见表 2。

2.5 回收率和精密度

称取 5 g 糟蛋基质空白样品(精确至 0.01 g),分别按 2 、 5 、 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 进行 3 水平加标实验,每个加标水平平行测定 6 次,具体测定结果见表 3。结果表明,氟虫腈及其代谢物在样品中的回收率在 $94.5\%\sim 117.9\%$,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 $2.05\%\sim 5.30\%$ 之间。该方法的准确度与精密度均满足定量分析要求。

表 2 氟虫腈及其代谢物的线性方程、相关系数和检出限

Table 2 Linear equation, correlation coefficient and detection limit of fipronil and its metabolites

化合物	线性方程	线性范围/ $(\mu\text{g/L})$	相关系数 r^2	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$
氟甲腈	$Y=3252X+259.7$	$0.5\sim 10$	0.999782	0.078
氟虫腈亚砷	$Y=3160X+328.1$	$0.5\sim 10$	0.999769	0.050
氟虫腈	$Y=1396X+173.0$	$0.5\sim 10$	0.999797	0.099
氟虫腈砷	$Y=1454X+117.8$	$0.5\sim 10$	0.999791	0.102

表3 氟虫腈及其代谢物的回收率和精密度
Table 3 Recoveries and precisions of fipronil and its metabolites

化合物	添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
氟甲腈	2	2.287	114.4	3.98
	5	5.896	117.9	4.56
	10	11.764	117.6	4.70
氟虫腈亚砷	2	2.175	108.8	5.29
	5	5.710	114.2	2.61
	10	11.637	116.4	2.79
氟虫腈	2	1.889	94.5	5.30
	5	5.257	105.1	2.57
	10	11.210	112.1	3.04
氟虫腈砷	2	2.203	110.2	2.33
	5	5.718	114.4	2.05
	10	11.584	115.8	2.13

2.6 基质效应

为研究糟蛋基质对氟虫腈及其代谢物的回收率实验的影响,本研究分别使用乙腈和糟蛋空白基质溶液配制标准工作液,同时进仪器分析,绘制标准曲线。根据基质效应(matrix effect, ME)判断公式 $ME\%=(B-A)/B\times 100\%$ 计算,其中 B 为溶剂标准曲线的斜率, A 为基质标准曲线的斜率,具体测定结果见表4。当 $ME\%<0$ 时,为基质的增强效应,当 $ME\%>0$ 时,为基质的抑制效应^[19]。实际测得 $ME\%$ 为 $-18\%\sim-233\%$,表明糟蛋基质对氟虫腈及其代谢物均有基质增强效应,且较为明显,应使用空白基质配制标准溶液。

表4 基质效应对氟虫腈及其代谢物信号的影响
Table 4 Effect of matrix on the signal of fipronil and its metabolites

化合物	溶剂标准曲线的斜率 B	基质标准曲线的斜率 A	$ME\%$
氟甲腈	976	3252	-233
氟虫腈亚砷	2676	3160	-18
氟虫腈	537	1396	-160
氟虫腈砷	637	1454	-128

3 结论

本研究建立了糟蛋中氟虫腈及其代谢物氟甲腈、氟虫腈砷、氟虫腈亚砷的气相色谱-负化学源-质谱联用测定方法。采用乙腈提取,超低温冷冻去脂和 QuEChERS 净化处理,回收率为 $94.5\%\sim 117.9\%$,相对标准偏差为

$2.05\%\sim 5.30\%$,检出限在 $0.050\sim 0.102 \mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内。本方法操作简便快速、测定结果准确可靠,满足糟蛋中氟虫腈及其代谢物残留量的测定。

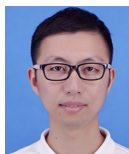
参考文献

- [1] 张芳芳,洪雅青,张幸. 氟虫腈的毒理学研究进展[J]. 职业与健康, 2008, 24(20): 2211-2213.
ZHANG FF, HONG YQ, ZHANG X. Advance in toxicological study on fipronil [J]. Occup Health, 2008, 24(20): 2211-2213.
- [2] 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): 1-5, 11.
XU GC, GU ZY, YANG YQ, et al. Progress in research on risks of pesticide fipronil and its application [J]. Mod Agrochem, 2008, 7(2): 1-5, 11.
- [3] 柏再苏. 锐劲特及其代谢和光降解产物的毒性综述[J]. 现代农药, 2003, 2(3): 1-3.
BO ZS. Review on toxicity of reagent and its metabolites and photodegradation products [J]. Mod Agrochem, 2003, 2(3): 1-3.
- [4] 孟岳成,徐侃,陈杰. 平湖糟蛋的理化特性及微生物安全性初探[J]. 中国家禽, 2010, 32(8): 36-39.
MENG YC, XU K, CHEN J. Preliminary study on physicochemical properties and microbial safety of Pinghu zao-egg [J]. China Poul, 2010, 32(8): 36-39.
- [5] 饶遵全,张卿,顾长乐,等. 我国禽蛋制品的发展现状综述[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(10): 4, 52.
RAO ZQ, ZHANG Q, GU CL, et al. Review on the development of egg products in China [J]. Anhui Agri Sci Bull, 2012, 18(10): 4, 52.
- [6] GB 2763—2019 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763—2019 National food safety standard-Maximum residue limits for pesticides in food [S].
- [7] 付晓芳,林雁飞,李晶,等. 茶叶中氟虫腈残留量的检测[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 279-282.

- FU XF, LIN YF, LI J, *et al.* Gas Chromatographic determination of fipronil residue in tea [J]. *Food Sci*, 2010, 31(10): 279–282.
- [8] 王洁莲, 阎会平. 气相色谱法检测橙子中氟虫腈农药残留分析[J]. *农学报*, 2016, 6(1): 83–87.
- WANG JL, YAN HP. Determination of fipronil pesticide residues in orange by gas chromatographic method [J]. *J Agric*, 2016, 6(1): 83–87.
- [9] 廖燕芝, 邓鸣, 陈同强, 等. 气相色谱-质谱法测定鲜蛋中氟虫腈及其代谢物[J]. *化学分析计量*, 2018, 27(4): 81–84.
- LIAO YZ, DENG M, CHEN TQ, *et al.* Determination of fipronil and its metabolites in fresh eggs by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chem Anal Meter*, 2018, 27(4): 81–84.
- [10] 丁立平, 刘微, 方光伟, 等. 改进 QuChERS-气质联用法测定蔬菜中氟虫腈和丁烯氟虫腈残留量[J]. *分析实验室*, 2013, 32(8): 117–120.
- DING LP, LIU W, FANG GW, *et al.* Determination of fipronil and butene fipronil residues in vegetables by improved quchers GC-MS [J]. *Chin J Anal Lab*, 2013, 32(8): 117–120.
- [11] 陈沙, 朱作为, 黄宗兰, 等. 气相色谱-三重四极杆串联质谱法测定鸡蛋和鸡肉中氟虫腈及其代谢物残留量的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(6): 1284–1289.
- CHEN S, ZHU ZW, HUANG ZL, *et al.* Determination of residues of fipronil and its metabolite in eggs and chicken by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(6): 1284–1289.
- [12] 邓宝剑, 吴卫东, 赵旭, 等. 气相色谱-三重四极杆质谱法快速检测鸡蛋中氟虫腈及其代谢物[J]. *色谱*, 2018, 36(6): 547–551.
- DENG WJ, WU WD, ZHAO X, *et al.* Quick determination of fipronil and its metabolites in eggs by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(6): 547–551.
- [13] 白宝清, 李美萍, 张生万. 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 BQ, LI MP, ZHANG SW. Determination of chlorfenapyr and fipronil residues in vegetables by QuEChERS combined with dispersive liquid-liquid microextraction and high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2014, 35(24): 254–258.
- [14] 龚震, 张瑞琪, 王铁峰, 等. 固相萃取-高效液相色谱检测鸡蛋中氟虫腈及其代谢物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(6): 1709–1714.
- GONG Z, ZHANG RQ, WANG TF, *et al.* Determination of fipronil and its main metabolites in eggs by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(6): 1709–1714.
- [15] 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 JL, YANG DS, *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]. *J Instr Anal*, 2015, 34(12): 1360–1365.
- [16] 郝杰, 邵瑞婷, 姜洁, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋、鸡肉中氟虫腈及其代谢物残留[J]. *食品科学*, 2019, 40(2): 318–323.
- HAO J, SHAO RT, JIANG J, *et al.* Determination of fipronil and its metabolites residues in chicken meat and eggs by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2019, 40(2): 318–323.
- [17] 沈伟健, 柳蕊, 张睿, 等. 气相色谱-负化学源质谱法测定禽蛋及蛋制品中氟虫腈及其代谢物[J]. *色谱*, 2017, 35(12): 1224–1228.
- SHEN WJ, LIU H, ZHANG R, *et al.* Determination of fipronil and its metabolites in eggs and egg products with gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(12): 1224–1228.
- [18] 张煜卓, 于湛, 王妍, 等. 应用 QuEChERS 技术与气相色谱-串联质谱法同时检测榛子中 70 种农药残留[J]. *环境化学*, 2018, 37(12): 2827–2831.
- ZHANG YZ, YU Z, WANG Y, *et al.* Simultaneous determination of 70 pesticide residues in hazelnuts by QuEChERS combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2018, 37(12): 2827–2831.
- [19] 冯程程, 刘新刚, 董丰收, 等. 5 种动物源食品中的氟虫腈及其 3 个代谢物残留量检测[J]. *植物保护*, 2019, 45(5): 207–213.
- FENG CC, LIU XG, DONG FS, *et al.* Determination of fipronil and its three metabolites residues in five foods of animal origin [J]. *Plant Prot*, 2019, 45(5): 207–213.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



厉晨皓, 助理工程师, 主要研究方向为食品、农产品质量安全检测。
E-mail: 472734169@qq.com



张孝艳, 工程师, 主要研究方向为食品、农产品质量安全检测。
E-mail: 1948178203@qq.com