

超高效液相色谱串联质谱法快速检测鸡蛋和鸡肉中的非泼罗尼及其代谢物的残留量

尹伶灵¹, 陈燕², 杨修镇¹, 刘少宁¹, 牛华星¹, 张呈军¹, 陈玲^{1*}

(1. 山东省兽药质量检验所, 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 济南 250022;

2. 山东农业工程学院环境科学与工程学院, 济南 250100)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测鸡蛋和鸡肉中非泼罗尼及其代谢物(氟甲腈、非泼罗尼硫醚和非泼罗尼砒)残留量的分析方法。**方法** 鸡蛋和鸡肉中的非泼罗尼及其代谢物经乙腈提取后, 加入盐析剂进行分层, 经 Oasis PRiME HLB 固相萃取净化后, UPLC-MS/MS 法检测, 基质匹配标准曲线法定量。**结果** 该方法具有良好的准确度和精密度, 在鸡蛋和鸡肉中添加回收率范围分别为 79.2%~103.1% 和 83.5%~101.4%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)低于 8.1%。方法的检出限和最低定量限分别为 0.5 µg/kg 和 1.0 µg/kg。**结论** 该方法具有分析时间短、样品处理简单、溶剂用量少等优点, 适用于鸡蛋和鸡肉中非泼罗尼及其代谢物残留量的常规检测。

关键词: 非泼罗尼; 代谢物; 鸡蛋; 鸡肉; 残留; 超高效液相色谱串联质谱法

Rapid determination of fipronil and its metabolite residues in eggs and chicken by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

YIN Ling-Ling¹, CHEN Yan², YANG Xiu-Zhen¹, LIU Shao-Ning¹, NIU Hua-Xing¹,
ZHANG Cheng-Jun¹, CHEN Ling^{1*}

(1. Shandong Provincial Veterinary Medicine Supervision Institute, Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Shandong Agriculture And Engineering University, Jinan 250100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of fipronil and its metabolite (fipronil-desulfinyl, fipronil-sulfide and fipronil-sulfone) residues in eggs and chicken by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS). **Methods** The fipronil and metabolites in chicken and eggs were extracted by acetonitrile, and samples were layered by joining the salting-out agent. The extracts were purified by the Oasis PRiME HLB solid phase extraction, then analyzed by UPLC-MS/MS, and the matrix-matching standard curve method was used to quantify. **Results** The method had good accuracy and precision, and the recovery range of egg and chicken was 79.2%~103.1% and 83.5%~101.4%, respectively, with the relative standard deviation (RSD) of lower than 8.1%. The limit of detection was 0.5 µg/kg and the limit of quantitation was 1.0 µg/kg.

*通讯作者: 陈玲, 研究员, 主要研究方向为兽药及畜禽产品质量监督检验及科研工作。E-mail: 1969chenling@163.com

*Corresponding author: CHEN Ling, Professor, Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China. E-mail: 1969chenling@163.com

Conclusion This method is time-saving, simple and less solvent consumption, which is suitable for detection of fipronil and its metabolites residues in eggs and chicken.

KEY WORDS: fipronil; metabolites; egg; chicken; residue; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

1 引言

非泼罗尼(fipronil)又名氟虫腈, 商品名为锐劲特(regent), 是法国罗纳普朗克公司 1987 年开发研制的苯吡唑类杀虫剂, 具有触杀、胃毒及内吸作用, 是一种广谱长效高活性的新型农药^[1,2], 国内于 2002 年开始由拜耳杭州作物科学有限公司生产。2017 年 8 月初, 荷兰被爆出“毒鸡蛋”事件, 并迅速波及欧洲多个国家, 引起了人们的广泛关注。欧洲多国通过欧盟食品饲料类快速预警系统通报鸡蛋中检出非泼罗尼问题。中华人民共和国农业部公告第 2583 号规定禁止非泼罗尼及相关制剂用于食品动物。欧盟 395/2005 号法规^[3]以及 1127/2014 补充条例^[4]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。GB2763-2016^[5]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。非泼罗尼在正常使用条件下, 其代谢产物氟甲腈、非泼罗尼硫醚和非泼罗尼砒都有毒性, 有的毒性甚至远高于非泼罗尼^[6-8], 因此从安全的角度考虑, 分析非泼罗尼及其代谢产物的残留更有意义^[9-11]。目前, 关于鸡肉和鸡蛋中非泼罗尼的检测方法^[12,13]均仅限于非泼罗尼药物原型, 对于鸡肉和鸡蛋中非泼罗尼代谢物的检测还未见报道。考虑到非泼罗尼及其代谢产物间的相互转化, 增加对代谢产物的监测能够更好的提高残留检测的准确性。因此, 开发一种鸡蛋和鸡肉中非泼罗尼及其代谢物的残留检测方法是很有必要的。本研究建立了超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测鸡蛋和鸡肉中非泼罗尼及其代谢物(氟甲腈、非泼罗尼硫醚和非泼罗尼砒)残留量的分析方法, 以期为鸡蛋和鸡肉中非泼罗尼及其代谢物残留量的快速检测提供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters Xevo TQ-S 高效液相-串联质谱仪(美国 Waters 公司); BT125D 电子天平(感量 0.01、0.00001 g, 德国赛多利斯公司); Allegra64R 台式高速冷冻离心机(美国贝克曼公司); XW-80A 涡旋混合器(上海精科实业有限公司); HY-4 调速多用振荡器(北京踏锦科技有限公司); MilliPAK 纯水

器(Millipore 公司); Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(美国 Waters 公司)。

非泼罗尼对照品(批号 20170328, 含量 98.5%, 国家标准物质中心); 非泼罗尼砒对照品溶液、非泼罗尼硫醚对照品溶液和氟甲腈对照品溶液(批号均为 201708, 含量 100 μg/mL, 农业部环境保护科研监测所); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 水为超纯水(自制); 氯化钠(分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司)。

2.2 标准溶液配制

标准储备液: 非泼罗尼用乙腈配制成标准储备液(100 mg/L), 3 种代谢物溶液分别用乙腈配制成标准储备液(10 mg/L), 储存于冰箱中(-20 ℃)中备用。使用时用乙腈将 4 种标准储备液配制成 1 mg/L 的混合标准工作液。

2.3 样品前处理

(1) 提取

称取均质后的试料各(2±0.05) g, 置于 50 mL 离心管内, 加入水 10 mL, 涡旋 1 min。再加入乙腈 10 mL, 振荡 10 min。然后加入氯化钠 4 g, 剧烈振荡 1 min, 4000 r/min 离心 5 min。

(2) 净化

取上清液 0.5 mL 淋洗 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱, 流出液弃去。再加入上清液 1.5 mL, 过 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱, 并收集流出液备用。精密量取上述流出液 0.5 mL 加水 0.5 mL 稀释后, 0.22 μm 滤膜过滤, 供超高效液相色谱-串联质谱测定。

2.4 液相色谱条件

色谱柱为 C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水; 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 2 μL; 柱温: 35 ℃。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序
Table 1 HPLC gradient elution program

时间(min)	A%	B%	曲线
0	20	80	初始条件
2.0	70	30	6
3.5	90	10	6
4.5	20	80	6
6	20	80	1

2.5 质谱条件

电喷雾离子源；负离子扫描 (ESI⁻)；多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)；离子源温度：150 ℃；脱溶剂温度：400 ℃；脱溶剂氮气流速：900 L/h；毛细管电压：3 kV；测试药物定性、定量离子对，对应的锥孔电压和碰撞能量经调谐确定，具体见表 2。

3 结果与分析

3.1 样品前处理方法的优化

据文献^[1]，非泼罗尼较易溶于乙腈、丙酮、二氯甲烷，几乎不溶于水，而鸡蛋和鸡肉又是基质极为复杂的样品，内含大量的蛋白质、磷脂、矿物质及维生素。为了最大限度提取非泼罗尼并减少基质的干扰，分别采用丙酮、乙腈、二氯甲烷作为提取溶剂进行考察。实验证明，乙腈的提取回收率和沉淀蛋白的效果好，且重复性较好，因而选用乙腈作为提取溶剂。此外，实验还考察了分散介质(水和无水硫酸钠)对提取效果的影响，比较发现，不加任何分散介质而直接提取样品的回收率最低，在提取前，加入适量的无水硫酸钠搅拌分散样品，其提取回收率低于以水作为

分散介质。这表明，加入分散介质有助于提取溶剂渗入样品发生作用，在以水为分散介质时，因乙腈可溶于水，能更充分地与样品接触，可以提高其回收率。样品提取后，为将目标化合物转入到有机溶剂(乙腈)层，参考文献^[14,15]方法选择氯化钠作为盐析剂，以有利于水相和有机相的分层。样品净化采用了 Waters 公司的 Oasis PRiME HLB 固相萃取小柱，与文献^[12]中采用的 C₁₈ 固相萃取小柱相比，Oasis PRiME HLB 固相萃取小柱无需活化，直接上样，简化了实验步骤，减少了有机溶剂的使用量，有效去除了样品中的蛋白、磷脂、维生素和矿物质等基质干扰物。

3.2 方法的线性范围、回收率、精密度、检出限和定量限

为降低基质效应，采用空白基质匹配标准溶液进行校正，将待测样品相匹配的空白基质提取液作为溶剂，绘制标准曲线。将鸡蛋和鸡肉的提取液作为基质本底液，用 2 种本底液分别制备成系列浓度为：0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL 的标准工作液，以待测物的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线，其线性相关系数均大于 0.996。标准溶液质量色谱图见图 1~图 4。

表 2 非泼罗尼及其代谢物的 UPLC-MS/MS MRM 离子测定参数表
Table 2 Table of UPLC-MS/MS MRM ion monitor parameters of fipronil and its metabolite

药 物	定性离子对 (<i>m/z</i>).	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
非泼罗尼	435.1 > 329.9	435.1 > 329.9	8	18
	435.1 > 249.9			26
非泼罗尼砒	451 > 281.7	451 > 281.7	26	32
	451 > 415			24
非泼罗尼硫醚	419.1 > 262	419.1 > 262	8	34
	419.1 > 383.1			16
氟甲腈	387 > 281.9	387 > 350.9	20	48
	387 > 350.9			14

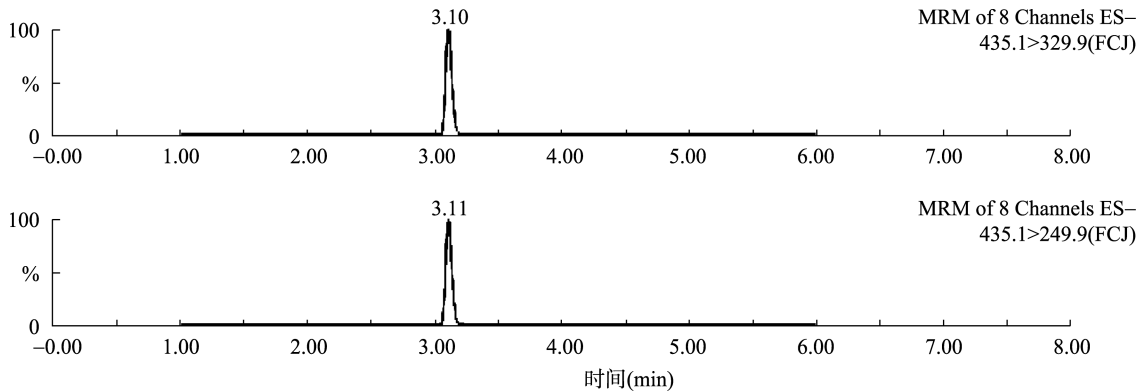


图 1 非泼罗尼定量(上)定性(下)质量色谱图
Fig. 1 Qualitative (on) and qualitative (bottom) mass chromatogram of fipronil

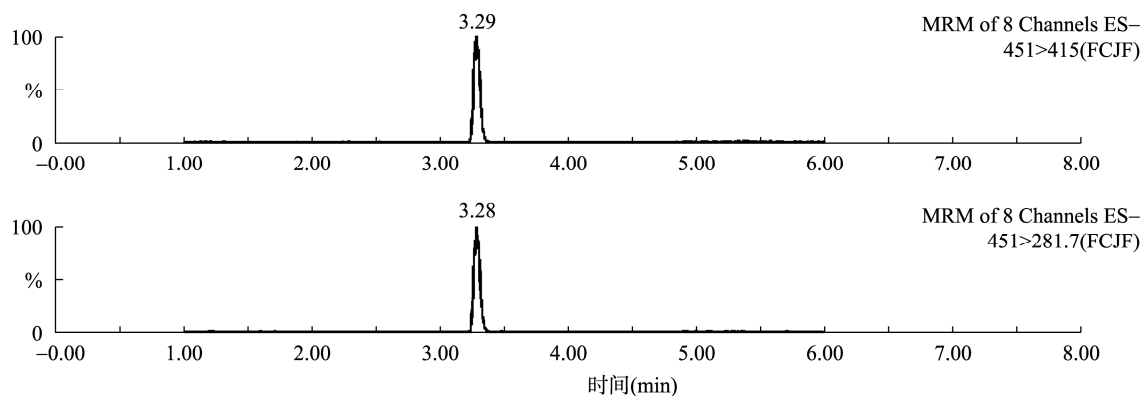


图 2 非泼罗尼磺定量(下)定性(上)质量色谱图
Fig. 2 Qualitative (bottom) and qualitative (on) mass chromatogram of fipronil-sulfone

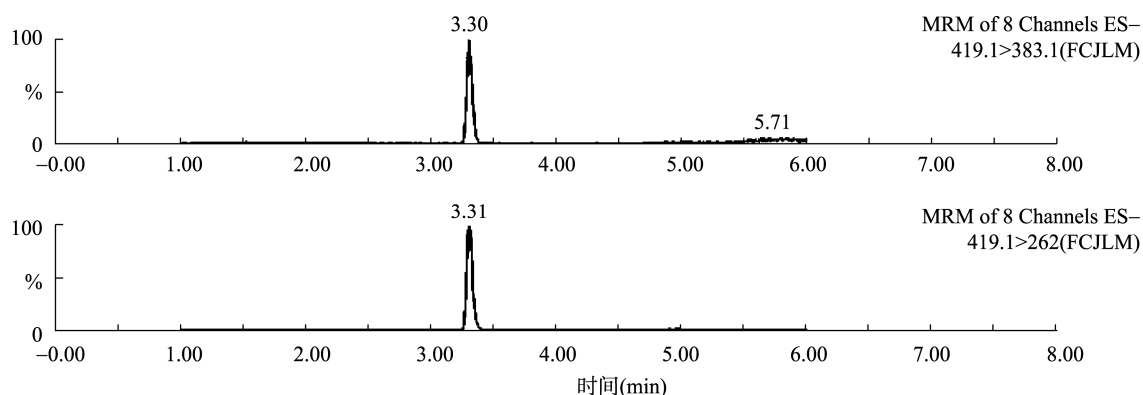


图 3 非泼罗尼硫醚定量(下)定性(上)质量色谱图
Fig. 3 Qualitative (bottom) and qualitative (on) mass chromatogram of fipronil-sulfide

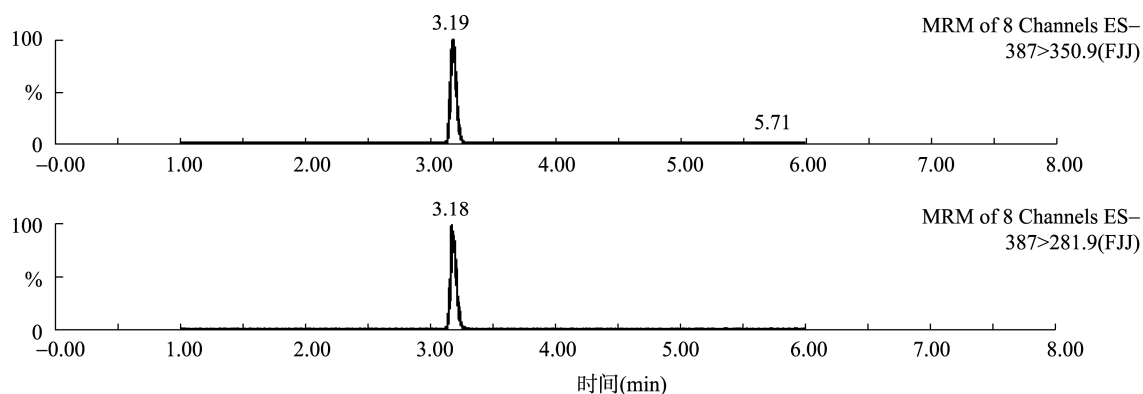


图 4 氟甲腈定量(上)定性(下)质量色谱图
Fig. 4 Qualitative (on) and qualitative (bottom) mass chromatogram of fipronil-desulfinyl

在上述确定的优化条件下, 在鸡蛋和鸡肉样品中分别准确加入 4 种标准混合溶液, 采用相对应的基质配制标样进行定量, 考察方法回收率、相对标准偏差等。按照检出限(信噪比 $S/N=3$)和定量限(信噪比 $S/N=10$)计算出检出限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 。在鸡蛋样品中加入浓度为 1.0 、 2.0 、 $4.0 \mu\text{g/kg}$ 的 3 个浓度的标准品, 按上述方法对样品进行检测, 每

个浓度做 6 个平行样品, 4 种目标分析物的各效能指标验证结果如表 3 所示。从表 3 可以看出, 4 种待测物的加标回收率为 $76.5\%\sim 103.1\%$, 方法的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 $2.0\%\sim 8.1\%$ 。4 种待测物在鸡肉样品中的回收率为 $83.5\%\sim 98.7\%$, RSD 为 $2.3\%\sim 6.5\%$ 。可见, 该方法精密度良好, 检出限和回收率均能够满足多残留样品检测的相关要求。

表 3 鸡蛋和鸡肉中非泼罗尼及其代谢物的回收率测定结果(*n*=6)
Table 3 Recovery of fipronil and its metabolite in eggs and chicken (*n*=6)

组织	目标待测物	添加浓度(μg /kg)	实测平均值(μg /kg)	平均回收率(%)	RSD(%)
鸡蛋	非泼罗尼	1.0	1.031	103.1	8.1
		2.0	1.584	79.2	3.4
		4.0	346.8	86.7	2.0
	非泼罗尼砒	1.0	0.923	92.3	6.9
		2.0	1.832	91.7	3.6
		4.0	3.824	95.6	4.5
	非泼罗尼硫醚	1.0	0.887	88.7	5.7
		2.0	1.852	92.9	4.6
		4.0	3.348	83.7	2.8
	氟甲腈	1.0	0.765	76.5	3.2
		2.0	1.658	82.9	5.3
		4.0	3.428	85.7	3.6
鸡肉	非泼罗尼	1.0	0.804	80.4	5.7
		2.0	1.862	93.1	4.3
		4.0	3.588	89.7	4.6
	非泼罗尼砒	1.0	0.897	89.7	6.1
		2.0	1.936	96.8	3.5
		4.0	4.056	101.4	4.2
	非泼罗尼硫醚	1.0	0.875	87.5	6.1
		2.0	1.842	92.1	2.4
		4.0	3.544	88.6	3.5
	氟甲腈	1.0	0.987	98.7	6.5
		2.0	176.2	88.1	3.6
		4.0	334	83.5	2.3

4 结 论

本研究建立了 UPLC-MS/MS 法测定鸡蛋和鸡肉中非泼罗尼及其代谢物的残留量的分析方法,鸡蛋和鸡肉中的非泼罗尼及其代谢物经乙腈提取后,加入盐析剂进行分层,经 Oasis PRiME HLB 固相萃取净化后,UPLC-MS/MS 法检测,基质匹配标准曲线法定量。该方法样品前处理简单、耗时短(不到 20 min)、溶剂用量少(仅用 10 mL 乙腈),而且测试数据重复性好,回收率高,精密度和准确度均能满足食品理化分析的要求,适用于鸡蛋和鸡肉中非泼罗尼及其代谢产物的日常检测。

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): 1-5.

Xu GC, Gu ZY, Yang YQ, *et al.* Progress in research on risks of pesticide fipronil and its application [J]. Mod Pest, 2008, 7(2): 1-5.

[2] 胡国新,陈晓宇,周红宇,等. 氟虫腈及其砒化物在兔体内的毒物代谢动力学[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 20(4): 356-360

Hu GX, Chen XY, Zhou HY, *et al.* Toxicokinetics of fipronil and fipronil sulfone in rabbits [J]. Chin J Pharm Toxicol, 2006, 20(4): 356-360.

[3] (EC) No 396/2005 European parliament and of the council [Z].

[4] (EU) No 1127/2014 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, flufenac-et, pendimethalin, propyzamide, and pyridate in or on certain products [Z].

[5] GB 2763-2016 食品中农药最大残留限量.[S].

GB 2763-2016 Maximum residue limits for pesticides in food[S].

[6] 崔新仪,储晓刚,王大宁. 氟虫腈及其代谢物的研究进展[J]. 农药,

- 2008, 4(2): 87–89.
- Cui XY, Chu XG, Wang DN. Research development of fipronil and its metabolites [J]. *Agrochemicals*, 2008, 4(2): 87–89.
- [7] Chaton P, Ravanel P, Tissut M. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna as sociated with subalpinemosquito breeding sites [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2002, 52(1): 8–12.
- [8] Schlenk D, Huggett D, Allgood J, *et al.* Toxicity of fipronil and its degradation products to *procambarus* sp.: Field and laboratory studies [J]. *Environ Contaminat Toxicol*, 2001, 41(3): 325–332.
- [9] 殷雪琰, 蒋治国, 堵燕钰, 等. 在线凝胶色谱-气相色谱-串联质谱法测定水果中甲拌磷和氟虫腈及其代谢产物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(12): 2009–2016.
- Yin XY, Jiang ZG, Du YY, *et al.* Determination of phorate, fipronil and their metabolites residues in fruit by online gel permeation chromatography-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(12): 2009–2016.
- [10] 吴 成, 任海雷, 赵志强, 等. 液相色谱-串联质谱法检测芹菜中氟虫腈及其代谢物残留[J]. *福建分析测试*, 2016, 5: 37–41.
- Wu C, Ren HL, Zhao ZQ, *et al.* Determination of the fipronil and its metabolites residues in celery by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Fujian Anal Test*, 2016, 5: 37–41.
- [11] 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 Y, Xu DM, Chen DJ, *et al.* Determination of fipronil and its metabolites in tea by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(7): 656–661.
- [12] Zhang MY, Bian K, Zhou T, *et al.* Determination of residual fipronil in chicken egg and muscle by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1014: 31–36.
- [13] SN/T 1982-2007 进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法[S].
- SN/T 1982-2007 Determination of fluonitrile residues in food for import and export-GC-MS method [S].
- [14] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, *et al.* Evaluation of analyze protestants to improve gas chromatographic analysis of pesticides [J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(2): 412–439.
- [15] 陈溪, 董振霖, 孙玉玉, 等. 气相色谱-串联质谱法检测大米中 20 种农药残留[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(4): 394–399.
- Chen X, Dong ZL, Sun YY, *et al.* Determination of 20 kinds of pesticide residues in rice by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2016, 35(4): 394–399.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



尹伶灵, 兽医师, 主要研究方向为畜禽产品质量监督检验及科研工作。
E-mail: 873069848@qq.com



陈 玲, 研究员, 主要研究方向为兽药及畜禽产品质量监督检验及科研工作。
E-mail: 1969chenling@163.com