

# 全自动固相萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定鸡蛋和鸡肉中的氟苯尼考和氟苯尼考胺残留

梁素丹 曲良娇 凌莉\*

珠海市疾病预防控制中心 广东 珠海 519000

**【摘要】**目的: 建立全自动固相萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定鸡蛋和鸡肉中的氟苯尼考与氟苯尼考胺残留的检测方法。方法: 样品以水稀释后, 以氨水 - 乙酸乙酯 (3:100) 溶液提取, 经 C<sub>18</sub> 固相萃取柱净化, 用 100% 甲醇洗脱浓缩后, 采用 ACQUITY UPLC® BEN C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1mm\*100mm, 1.7μm) 分离, 以 0.02% 氨水 - 乙腈为流动相, 用正负离子多反应监测模式, 内标法定量。结果: 目标化合物得到有效分离, 方法的线性关系良好 ( $r^2 > 0.999$ ), 氟苯尼考的检出限 0.0057μg/kg, 定量限 0.0019μg/kg, 氟苯尼考胺的检出限 0.022μg/kg, 定量限 0.0074μg/kg。高中低三种添加水平的加标回收试验: 鸡蛋的加标回收率为 91.9% ~ 108.6%, 相对标准偏差为 7.1% ~ 14.2%, 鸡肉的加标回收率为 94.2% ~ 117.2%, 相对标准偏差为 1.4% ~ 7.6%。应用该方法对广东省的鸡蛋和鸡肉样品各 60 份进行检测, 结果在 14 份鸡肉中有检出氟苯尼考或氟苯尼考胺, 其中在 1 份鸡肉样品中同时检出氟苯尼考和氟苯尼考胺, 结果分别为 320μg/kg 和 120μg/kg, 均超出限量值 (100μg/kg)。而鸡蛋样品均未检出。结论: 本方法准确、灵敏, 为鸡肉和鸡蛋中氟苯尼考、氟苯尼考胺残留同时检测和监测提供更可靠的分析手段。

**【关键词】**超高效液相色谱 - 串联质谱法; 氟苯尼考; 氟苯尼考胺; 全自动固相萃取; 残留

## Study on Three Extraction Methods for Simultaneous Determination of Flufenicol and Flufenicomide Residues in Eggs and Chicken

Sudan Liang, Liangjiao Qu, Ling Li\*

Zhuhai Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhuhai 519000

**Abstract:** Objective: To establish the three methods for the simultaneous determination of flufenicol and flufenicomide residues in eggs and chicken by UPLC-MS/MS with automatic solid phase extraction. Methods: The samples were diluted with water, extracted with ammonia-ethyl acetate (3:100), and the resulting extracts were clean-up on C<sub>18</sub> solid phase extraction column, and then eluted with 100% methanol. The target components were separated on a ACQUITY UPLC® Ben C<sub>18</sub> column (2.1mm\*100mm, 1.7μm), with 0.02% ammonia water and acetonitrile as mobile phase. Multiple reaction monitoring in positive and negative mode were used, and it quantified by the internal standard calibration curves. Results: The target components could be well separated, with coefficients of determination higher than 0.999. The limits of detection and limits of quantification of flufenicol were 0.0057 and 0.0019μg/kg, The limits of detection and quantification of flufenicomide were 0.022 and 0.0074μg/kg. The recovery tests at high, medium, and low spiked levels: the recoveries were 91.9%-108.6%, and relative standard deviation (RSDs) were 7.1%-14.2% in eggs; the recoveries were 94.2%-117.2%, and RSDs were 1.4%-7.6% in chicken. The method was used to detect 60 eggs and 60 chicken samples from Guangdong Province, and the result showed that flufenicol or flufenicomide were detected in 14 chicken samples, they were detected simultaneously in one chicken sample, and the results were 320 μg/kg and 120μg/kg, which exceeded the limit value of 100μg/kg. It was not detected in egg samples. Conclusion: The method was accurate and sensitive, and provides a more reliable analytical method for the simultaneous detection and monitoring of flufenicol and flufenicomide residues in chicken and eggs.

**Keywords:** automatic solid-phase extraction method, HPLC-MS/MS, tandem mass spectrometry, flufenicol, flufenicomide residues

GB 31650—2019<sup>[1]</sup> 明确指出氟苯尼考的最大残留限量标记化合物是以氟苯尼考与氟苯尼考胺之和计。国内外文献报道中对 FF 及 FFA 的检测方法有高效液相色谱法<sup>[2]</sup>、气相色谱 - 质谱联用法<sup>[3]</sup> 和液相色谱 - 串联质谱法<sup>[4-5]</sup> 等。SN/T 1865-2016<sup>[6]</sup> 用 50mL 氨化乙酸乙酯分次提取猪肉、鸡肉、鱼虾等基质, 没有包含鸡蛋基质。GB/T 20756-2006<sup>[7]</sup> 研究对象有鸡蛋, 但目标物没有氟苯尼考胺。国家食品污染物监测手册<sup>[8]</sup> 中用乙腈提取鸡蛋和牛奶中氟苯尼考和氟

苯尼考胺, 但前期实验发现乙腈并不能有效提取氟苯尼考胺。

本实验在以上方法的基础上对提取试剂种类选择、净化方式进行比较以及仪器条件优化等。实验表示氨化乙酸乙酯作提取剂可有效提取两目标物。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 试验材料

鸡蛋和鸡肉样品从市场或超市购买, 鸡蛋打碎搅拌均匀, 鸡去掉骨头取可食用部分捣碎均匀。用聚乙烯瓶保存备用。

### 1.1.2 主要仪器与试剂

超高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪、ACQUITY UPLC® BEN C<sub>18</sub> 色谱柱, C<sub>18</sub> 固相萃取柱: 500mg/3mL。全自动固相萃取仪, OA-Heat™ 氮吹仪, 低温高速离心机, 旋涡混合器, Milli-Q 超纯水系统, 超声波清洗器。

乙酸乙酯、甲醇、乙腈均为色谱纯, 氨水(纯度为32%)。无水硫酸钠, 分析纯。

氟苯尼考标准品(纯度99.90%)、氟苯尼考胺标准品(纯度99.3%)。用甲醇配成1000mg/L单标储备液, 再用甲醇逐级稀释配制混合储备液, 浓度分别为2.0、10.0μg/mL, 再稀释成混合标准使用液, 浓度分别为20、100ng/mL。

氟苯尼考胺-d3 标准品: 纯度98%; 氯霉素-d5: 100.1mg/L。取氟苯尼考胺-d3 用甲醇配成100mg/L 储备液。用甲醇逐级稀释氯霉素-d5 和氟苯尼考胺-d3 内标储备液浓度分别为0.8、2.0μg/mL, 稀释成混合内标使用液, 浓度分别为80、200ng/mL。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品前处理

准确称取2.0g样品于50mL离心管中, 加50μL混合内标使用液和1mL纯水, 充分混匀, 加入0.30mL氨水和

10mL乙酸乙酯, 旋涡1min, 超声提取10min, 然后加入3g无水硫酸钠旋涡1min, 以10000r/min离心(低于5°C)5min, 准确吸取5mL上清液氮吹浓缩至近干, 用5mL纯水溶解残渣后待净化。

设置好全自动固相萃取装置参数, 分别用3mL甲醇活化、3mL水平衡C<sub>18</sub>固相萃取柱, 4mL复溶液以3mL/min的速度过柱, 弃去滤液, 用3mL水淋洗杂质, 排干柱内液体后, 再用5mL甲醇洗脱, 收集洗脱液浓缩至近干, 用1.0mL10%乙腈水溶解, 混匀后过0.22μm滤膜后待UPLC-MS/MS分析。

### 1.2.2 标准曲线绘制

分别吸取混合标准使用液5、10、20、50、100、200、400μL, 各加混合内标使用液20μL, 用10%乙腈水定容至1.0mL, 配成混合标准系列, 均含氯霉素-d5和氟苯尼考胺-d3浓度分别为1.6、4.0ng/mL。

### 1.2.3 仪器条件

色谱条件: ACQUITY UPLC® BEN C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1mm\*100mm, 1.7μm), 流动相: A为0.02%氨水溶液, B为乙腈, 流速0.30ml/min, 柱温40°C, 进样体积3μL。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正、负离子模式分段采集(0~2.0minESI+, 2.30~4.50minESI-), 多反应监测模式(MRM)检测。毛细管电压2.5kV, 锥孔电压25V, 离子源温度150°C, 脱溶剂温度600°C。化合物质谱参数见表1。

表1 目标化合物的质谱参数

化合物	电离模式	保留时间 /min	母离子 / <i>m/z</i>	子离子 / <i>m/z</i>	碰撞能量 / eV
氟苯尼考胺	ESI+	1.65	248.00	130.00 230.00*	20 10
氟苯尼考胺-d3	ESI+	1.64	250.90	233.00	10
氟苯尼考	ESI-	2.63	355.90	184.90 335.90*	18 10
氯霉素-d5	ESI-	2.81	326.00	156.90	18

\* 为定量离子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 仪器条件选择

#### 2.1.1 色谱条件的选择

本试验用0.02%氨水和乙腈做流动相, 其保留时间可以延长到1.64min, 出峰稳定, 所有目标峰的分离度和峰形效果更佳。

#### 2.1.2 质谱条件的选择

在ESI+和ESI-同时采集模式下对目标化合物的质谱参数进行优化, 先以一级质谱扫描选择最优的锥孔电压和毛细管电压, 确定分子离子, 再以分子离子作为母离子进行二级质谱分析, 选择最佳的碰撞能量, 丰度较高的两个离子分别作为定量离子和定性离子。

2.2 本实验用内标法定量, 由于氟苯尼考和氯霉素结构相似, 采用氯霉素-d5作为FF内标物。

#### 2.3 提取试剂的比较

试验表明乙酸乙酯和乙腈只能有效萃取氟苯尼考, 对氟苯尼考胺的萃取效果很差, 后者回收率低于20%。以氨水-乙腈提取样品, 结果不稳定、回收率从60%~90%之间, 重复性差; 用氨水-乙酸乙酯提取均可达到稳定结果

(RSD<15%), 且氨水-乙酸乙酯比例在3:100, 回收率≥90%。

#### 2.4 净化方式的比较

C<sub>18</sub>分散剂净化离心后仍有混浊, C<sub>18</sub>固相萃取柱可去除磷脂等脂类共提取物, 回收率均大于90%, 重复性比C<sub>18</sub>分散剂好, RSD<15%。

#### 2.5 方法的线性方程、检出限、定量限、回收率和精密度

本文用内标法定量, 结果中两种化合物的线性关系较好, 相关系数均>0.999。用最低浓度点按3倍信噪比计算方法检出限: 氟苯尼考为0.0057μg/kg, 氟苯尼考胺为0.0022μg/kg; 按10倍信噪比计算方法定量限: 氟苯尼考为0.019μg/kg, 氟苯尼考胺为0.0074μg/kg。

分别在2g鸡蛋和鸡肉样品中添加不同量的混合标液, 配制三种加标水平样品, 再加50μL混合内标, 按1.2.1进行前处理后测定, 做回收率试验。鸡蛋的加标回收率为91.9%~108.6%, 相对标准偏差为7.1%~14.2%, 鸡肉的加标回收率为94.2%~117.2%, 相对标准偏差为1.4%~7.6%, 结果均符合要求。

## 2.6 方法应用

应用该方法对 2021 年广东省五个城市采集的鸡蛋和鸡肉各 60 份进行检测, 结果在 14 份鸡肉中有检出氟苯尼考或氟苯尼考胺, 其中在 1 份鸡肉样品中同时检出氟苯尼考和氟苯尼考胺, 分别为 320 $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均超出限量值 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。而鸡蛋样品检测结果均小于方法检出限。

## 3 结论

本实验建立了全自动固相萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定鸡蛋和鸡肉中的氟苯尼考和氟苯尼考胺残留的分析方法, 该方法准确、重现性好, 方法检出限低, 更利于残留量甚微的鸡蛋样品的检测。

## 参考文献:

[1] 中华人民共和国农业农村部, 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局 .GB31650-2019: 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留含量 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.

[2] 赵营, 卢光菊. 高效液相色谱法测定牛奶中甲砒霉素和氟苯尼考残留 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, 10: 216-217.

[3] 乔青青、郝莉花、巩凡, 等. 气相色谱质谱法检测鸡蛋中氟苯尼考及氟苯尼考胺 [J]. 食品工业, 2021, 42(01): 324-327.

[4] 朱红. UPLC-MS/MS 法测定禽蛋中氟苯尼考及氟苯尼考胺 [J]. 食品工业, 2021, 42(02): 315-319.

[5] 何国成, 贾晓菲, 周婉仪, 等. 液相色谱—串联质谱法测定禽肉、禽蛋中氟苯尼考胺残留量 [J]. 安徽化工, 2021, 47(3): 113-119.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 .SN/T 1865-2016, 出口动物源食品中甲砒霉素、氟甲砒霉素和氟苯尼考胺残留量的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会 .GB/T20756-2006, 可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.

[8] 国家食品安全风险评估中心 .2021 年国家食品污染物监测手册 [Z]. 2021.

基金项目: 珠海市医学科研基金项目 (No.ZH24013310210072PWC)

作者简介: 梁素丹 (1978-), 女, 本科, 主任技师, 研究方向: 食品违禁药物及环境污染物分析。

通讯作者: 凌莉, E-mail: lingligs@163.com