

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

【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 C18 固相萃取柱净化, 用 100% 甲醇洗脱浓缩后, 采用 ACQUITY UPLC® BEN C18 色谱柱 (2.1mm*100mm, 1.7 μm) 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 0.0057 μg/kg, 定量限 0.0019 μg/kg, 氟苯尼考胺的检出限 0.022 μg/kg, 定量限 0.0074 μg/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 320 μg/kg 和 120 μg/kg, 均超出限量值 (100 μg/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; 鸡蛋; 鸡肉; 残留

【基金项目】 珠海市医学科研项目 (No.ZH24013310210072PWC)

【收稿日期】 2023 年 10 月 17 日 **【出刊日期】** 2023 年 11 月 22 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijcr.20230350

Simultaneous determination of florfenicol and florfenicol amine in eggs and chicken by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with automatic solid phase extraction

Sudan Liang, Liangjiao Qu, Li Ling*

Zhuhai Center for Disease Control and Prevention, Zhuhai, Guangdong

【Abstract】 Objective To establish a method for the simultaneous determination of florfenicol and florfenicol amine 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 C18 solid phase extraction column, and then eluted with 100% methanol. The target components were separated on a ACQUITY UPLC® Ben C18 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 florfenicol were 0.0057 and 0.0019 μg/kg, The limits of detection and limits of quantification of florfenicol amine were 0.022 and 0.0074 μg/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 florfenicol or florfenicol amine were detected in 14 chicken

samples, they were detected simultaneously in one chicken sample, and the results were $320 \mu\text{g/kg}$ and $120 \mu\text{g/kg}$, which exceeded the limit value of $100 \mu\text{g/kg}$. 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 florfenicol and florfenicol amine residues in chicken and eggs.

【Keywords】 UPLC-MS/MS; Florfenicol; Florfenicol amine; Egg; Chicken; Automated solid phase; Extraction; Residue

GB 31650-2019^[1]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^[2]、气相色谱-质谱联用法^[3]和液相色谱-串联质谱法^[4-5]等。

SN/T 1865-2016^[6]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^[7]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^[8]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 C₁₈ 色谱柱, C₁₈ 固相萃取柱: 500mg/3 mL。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、10.0 $\mu\text{g/mL}$, 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、2.0 $\mu\text{g/mL}$, 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 50 mL 离心管中, 加 50 μL 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℃) 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 C₁₈ 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 1.0mL 10% 乙腈水溶解, 混匀后过 0.22 μm 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、400 μL , 各加混合内标使用液 20 μL , 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 C₁₈ 色谱柱(2.1mm*100mm, 1.7 μm), 流动相: A 为 0.02% 氨水溶液, B 为乙腈, 流速 0.30ml/min, 柱温 40℃, 进样体积 3 μL 。

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℃, 脱溶剂温度 600℃。化合物质谱参数见表 1。

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。

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/(m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能量/eV
氟苯尼考胺	ESI+	1.65	248.00	130.00	20
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	18
氯霉素-d5	ESI-	2.81	326.00	156.90	18

*为定量离子。

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

C₁₈分散剂净化离心后仍有混浊,C₁₈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C₁₈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0.0057 μg/kg,氟苯尼考胺为0.0022 μg/kg;按10倍信噪比计算方法定量限:氟苯尼考为0.019 μg/kg,氟苯尼考胺为0.0074 μg/kg。

分别在2g鸡蛋和鸡肉样品中添加不同量的混合标液,配制成三种加标水平样品,再加50 μL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 μg/kg和120 μg/kg,均超出限量值(100 μg/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.GB 31650-2019,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.

测手册[Z].2021.

- [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/T 20756-2006,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

版权声明: ©2023 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS