

超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中烯肟菌酯残留量

吴洁珊, 陈亮, 冯家望, 任永霞, 蔡勤仁

(珠海出入境检验检疫局, 珠海 519015)

摘要: 提出了用超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中烯肟菌酯残留量的方法。样品经乙腈提取后,以伯仲胺、 C_{18} 和无水硫酸镁为萃取剂用基质分散固相萃取净化,净化液经Eclipse Plus C_{18} 色谱柱($50\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}, 1.8\text{ }\mu\text{m}$)分离,用乙腈与 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(75+25)的混合液洗脱,采用正离子模式监测。烯肟菌酯的质量浓度在 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内与峰面积呈线性关系,检出限($3S/N$)为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,以空白样品为基体进行加标回收试验,所得回收率在76.7%~89.6%之间,相对标准偏差($n=10$)在4.2%~11%之间。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 烯肟菌酯; 食品

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2013)08-0953-04

UHPLC-MS/MS Determination of Residual Amount of Enostrobin in Food

WU Jie-shan, CHEN Liang, FENG Jia-wang, REN Yong-xia, CAI Qin-ren

(Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract: UHPLC-MS/MS was applied to determination of residual amount of enostrobin in food. The sample was extracted with acetonitrile and purified by dispersive solid phase extraction with primary secondary amine, C_{18} and anhydrous MgSO_4 as extractants. The eluate obtained were used for UHPLC-MS/MS determination, in which Eclipse Plus C_{18} column ($50\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}, 1.8\text{ }\mu\text{m}$) was used as stationary phase, and a mixture of acetonitrile and $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ammonium acetate (75 + 25) was used as mobile phase; positive electrospray ionization was used in the detection. Linear relationship between values of peak area and mass concentration of enostrobin was kept in the range within $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, with detection limit ($3S/N$) of $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. On the base of blank sample, test for recovery was made by standard addition method; values of average recovery found were in the range of 76.7%—89.6%, with RSD's ($n=10$) in the range of 4.2%—11%.

Keywords: UHPLC-MS/MS; Enostrobin; Food

烯肟菌酯是一种新型广谱的甲氧基丙烯酸酯杀菌剂,为国内开发的第一个甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂,具有杀菌谱广、活性高、毒性低,与环境相容性好等特点,并已大面积推广应用于水稻、小麦、黄瓜、番茄和马铃薯等作物中^[1-2]。随着烯肟菌酯的大量使用,加强农产品中烯肟菌酯的检测,对保障食品安全

意义重大。

目前,测定甲氧基丙烯酸酯杀菌剂的方法有气相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-串联质谱法^[3-6]等,而已报道的测定烯肟菌酯的方法只有气相色谱法^[7-8]。采用气相色谱法测定,样品需要进行复杂的浓缩和净化,测定时间较长。

本工作采用超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)测定食品中烯肟菌酯的残留量,测定时间短,样品采用分散固相萃取净化技术,具有快速、简便、安全等优点。

收稿日期: 2012-06-11

基金项目: 国家认监委项目(2010B287K)

作者简介: 吴洁珊(1977-),女,广东揭阳人,工程师,研究方向为食品农药残留检测。E-mail: wujieshan@sina.cn

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1290-6460 型超高效液相色谱-串联质谱仪;IKA KS501 型漩涡振荡器;IKA A11basic 型组织捣碎机;Turbovap II 型氮气浓缩仪。

烯酞菌酯标准储备溶液:100 mg · L⁻¹,甲醇为介质。

烯酞菌酯标准溶液:1.0 mg · L⁻¹,用乙腈-0.1%(体积分数,下同)甲酸溶液(1+1)混合溶液稀释配制。

烯酞菌酯标准物质(纯度 90%);甲醇、甲酸、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯;试验用水为超纯水(电阻率 18.2 MΩ · cm)。

1.2 仪器工作条件

色谱条件:Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),柱温为室温;流动相为乙腈与 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液以体积比 75 比 25 组成的混合溶液,流量 0.30 mL · min⁻¹;进样量 2.0 μL。

质谱条件:电喷雾离子源正离子扫描模式(ESI⁺);多反应监测(MRM)模式;毛细管电压 4 kV;雾化器压力 345 kPa;干燥气体温度 325 °C;干燥气体流量 7 L · min⁻¹;源内裂解电压 50 V;定量离子为 *m/z* 178.0。其他质谱参数见表 1。

表 1 串联质谱的参数
Tab. 1 Parameters of MS/MS

| 质荷比 <i>m/z</i> | | 采集时间 | 碰撞能量 |
|----------------|-------|------|------|
| 母离子 | 子离子 | /ms | /V |
| 400.1 | 178.0 | 200 | 10 |
| 400.1 | 145.1 | 200 | 22 |
| 400.1 | 137.0 | 200 | 26 |

1.3 样品的提取和净化

称取捣碎后的试样 5.00 g(茶叶 2.00 g)于 50 mL 离心管中,加入水 5~10 mL,乙腈 25 mL,均质 1 min,加入氯化钠 5 g,振摇提取 30 min,以 4 000 r · min⁻¹ 转速离心 3 min,取上清液 1.0 mL,加入分散固相萃取剂无水硫酸镁 0.2 g、PSA 0.1 g、C₁₈ 0.1 g 进行净化,剧烈振摇 1 min,以 4 000 r · min⁻¹ 转速离心 3 min,取上清液用 0.2 μm 滤膜过滤,按仪器工作条件进行测定。

2 结果与讨论

2.1 监测离子对的选择

根据烯酞菌酯的性质和分子结构,在电喷雾离

子源中选择正离子扫描模式,将 1 mg · L⁻¹ 烯酞菌酯标准溶液注入串联质谱中,通过全扫描方式,得到较高丰度的 [M+H]⁺ 分子离子 *m/z* 400.1。选择 *m/z* 400.1 作为母离子,采用子离子扫描模式进行二级质谱分析,试验选取 *m/z* 400.1/137.0, 400.1/145.1, 400.1/178.0 为监测离子对,通过对毛细管电压、雾化器压力、干燥气体温度、干燥气体流量、源内裂解电压、碰撞能量等条件进行优化,使灵敏度达到最佳化。标准溶液 MRM 色谱图见图 1。

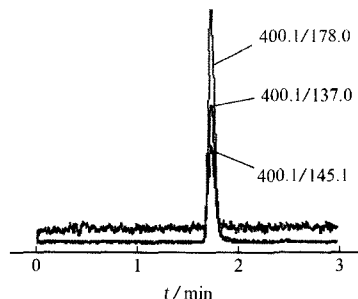


图 1 0.2 μg · L⁻¹ 烯酞菌酯标准溶液多反应监测色谱图
Fig. 1 MRM chromatograms of 0.2 μg · L⁻¹ enostrobilurin standard solution

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 色谱柱

试验考察了 Eclipse Plus C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、ZORBAX SB-C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)、Eclipse Plus C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 和 CAPCELL PAK C₁₈ MG II (100 mm × 2.0 mm, 3 μm) 4 种色谱柱的分离效果,结果表明:烯酞菌酯在这 4 种色谱柱上均有较强的保留。Eclipse Plus C₁₈ 与 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱相对较短,可以大大缩短分析时间。Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱填料粒径小,分离效率高,色谱峰宽较窄,峰形尖锐对称,烯酞菌酯的响应值较高,灵敏度较好,因此,试验选择 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 为分离柱。

2.2.2 流动相

试验考察了甲醇-0.1% 甲酸溶液、乙腈-0.1% 甲酸溶液、甲醇-5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液、乙腈-5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液等作为流动相的洗脱效果,结果表明:使用甲醇-0.1% 甲酸溶液作为流动相时,色谱柱压力相对较高,而且甲醇的洗脱能力较弱;乙腈-5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液作为流动相时,色谱柱压力相对较低,洗脱能力较强,试验选择乙腈-5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液作为流动相。

采用梯度洗脱时,提高初始时间的乙酸铵溶液比例,可以提高烯酞菌酯的响应,但分析前后需对色谱柱进行平衡;采用等度洗脱时,目标化合物与样品杂质分离良好,因此,试验选择等度洗脱。试验结果表明:提高乙腈比例,可以缩短烯酞菌酯在色谱柱中的保留时间,色谱峰宽变窄,响应值相对增大,提高了检测灵敏度,乙腈与乙酸铵的比例为 75 比 25 时可以达到最佳的效果。

2.3 提取液的选择

试验考察了丙酮-正己烷、乙酸乙酯-环己烷-丙酮、乙腈 3 种不同的溶剂对样品的提取效果,结果表明:3 种溶剂提取都能达到良好的效果,丙酮、乙酸乙酯提取时色素较重,而乙腈提取时回收率高,共提杂质较少。乙腈用量为 10~25 mL 时的提取回收率都能达到 60% 以上,考虑到食品样品成分复杂,试验选择乙腈作为提取液,用量为 25 mL。

2.4 固相萃取剂的选择

分散固相萃取净化方法主要采用 PSA、C₁₈ 和石墨化碳黑分散萃取剂进行净化。PSA 吸附剂能有效去除样品中的脂肪酸、糖类物质等极性基质杂质;C₁₈ 吸附剂能去除部分非极性脂肪和脂溶性杂质;石墨化碳黑能去除色素和固醇类杂质^[9-10]。结果表明:石墨化碳黑对烯酞菌酯具有吸附作用,试验选择 PSA 0.1 g、C₁₈ 0.1 g 和无水硫酸镁作为固相萃取剂,对菜心、黄瓜、西红柿、葡萄、柑橘、大米、玉米、大豆、虾、猪肉、蜂蜜、茶叶等 12 种样品进行前处理,可达到理想的净化效果。

空白茶叶样品及其加标样品(添加浓度为 10 μg·kg⁻¹)的色谱图见图 2。

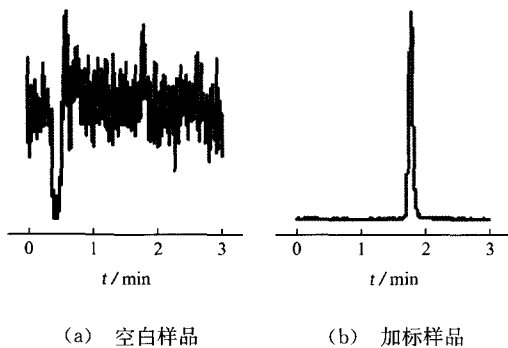


图 2 空白茶叶和加标茶叶样品的多反应监测色谱图
Fig. 2 MRM Chromatograms of samples of blank tea and the same sample with addition of standard

2.5 样品基质干扰的消除

食品样品基质复杂,目标化合物的响应值会受

到样品中共提物的影响,不同样品基质对目标化合物会产生不同的基质效应。根据欧盟残留分析结果质量控制的有关要求^[11],采用基质空白提取液(不同基质的阴性样品按样品提取与净化处理后得到的溶液)配制标准溶液系列,使标准溶液系列和样品溶液具有同样的离子化条件,又能减少基质对测定结果的影响。

2.6 标准曲线和检出限

使用基质空白提取溶液配制 0, 0.2, 2, 10, 20, 40, 50 μg·L⁻¹ 含基质的烯酞菌酯标准溶液。

按试验方法对烯酞菌酯标准溶液系列进行测定,以烯酞菌酯的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,烯酞菌酯的质量浓度在 50 μg·L⁻¹ 以内呈线性。烯酞菌酯在不同基质中的线性回归方程和相关系数见表 2。

表 2 烯酞菌酯在不同基质中的线性回归方程和相关系数

Tab. 2 Linear regression equations and correlation coefficients of enostrobilurin in different matrixes

| 基质 | 线性回归方程 | 相关系数 |
|-----|------------------------|---------|
| 水溶液 | $y=2\ 476.1\ x+1\ 045$ | 0.999 7 |
| 菜心 | $y=2\ 172.8\ x+1\ 762$ | 0.999 6 |
| 黄瓜 | $y=2\ 150.0\ x+1\ 016$ | 0.999 0 |
| 西红柿 | $y=2\ 185.6\ x+1\ 661$ | 0.999 4 |
| 葡萄 | $y=2\ 127.4\ x+2\ 034$ | 0.999 1 |
| 柑橘 | $y=2\ 211.1\ x+1\ 322$ | 0.999 6 |
| 大米 | $y=2\ 065.9\ x+1\ 794$ | 0.999 5 |
| 玉米 | $y=1\ 607.6\ x+1\ 661$ | 0.999 7 |
| 大豆 | $y=2\ 177.1\ x+1\ 454$ | 0.999 5 |
| 虾 | $y=2\ 104.6\ x+1\ 999$ | 0.999 0 |
| 猪肉 | $y=2\ 254.8\ x+1\ 921$ | 0.999 5 |
| 蜂蜜 | $y=2\ 081.3\ x+2\ 263$ | 0.999 0 |
| 茶叶 | $y=2\ 080.4\ x+956$ | 0.999 9 |

按试验方法对 5 g 空白样品平行测定 20 次,以 3 倍信噪比计算方法的检出限(3S/N)为 1 μg·kg⁻¹。

2.7 样品分析

按试验方法测定菜心、黄瓜、大米、蜂蜜、茶叶等 12 种不同基质的样品共 24 个,结果均未检出含有烯酞菌酯。

在菜心、黄瓜、西红柿、葡萄、柑橘等 12 种不同基质空白样品中分别添加浓度水平为 10, 50, 100 μg·kg⁻¹ 的烯酞菌酯标准溶液,在仪器工作条件下测定 10 个平行样,结果见表 3。

表 3 精密度和回收试验结果 (n=10)

Tab. 3 Results of tests for precision and recovery

| 样品 | 10 μg · kg ⁻¹ | | 50 μg · kg ⁻¹ | | 100 μg · kg ⁻¹ | |
|-----|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | 回收率 /% | RSD /% | 回收率 /% | RSD /% | 回收率 /% | RSD /% |
| 菜心 | 83.1 | 9.8 | 84.9 | 8.2 | 85.3 | 6.4 |
| 黄瓜 | 84.0 | 5.9 | 85.6 | 7.6 | 86.4 | 9.4 |
| 西红柿 | 83.0 | 7.0 | 85.1 | 6.1 | 83.7 | 4.6 |
| 葡萄 | 84.1 | 8.9 | 84.0 | 11 | 86.9 | 5.4 |
| 柑橘 | 84.8 | 7.2 | 86.5 | 11 | 85.6 | 7.7 |
| 大米 | 84.7 | 4.9 | 84.7 | 6.2 | 86.5 | 7.2 |
| 玉米 | 83.9 | 6.6 | 82.9 | 6.7 | 85.4 | 4.5 |
| 大豆 | 85.0 | 6.8 | 83.7 | 6.6 | 86.8 | 9.2 |
| 虾 | 84.1 | 6.3 | 89.6 | 6.0 | 85.5 | 8.3 |
| 猪肉 | 84.3 | 6.4 | 84.9 | 7.7 | 83.3 | 7.8 |
| 蜂蜜 | 86.2 | 4.2 | 87.1 | 8.1 | 85.7 | 9.6 |
| 茶叶 | 76.7 | 8.6 | 85.7 | 8.6 | 89.4 | 6.4 |

由表 3 可知:方法的回收率在 76.7%~89.6% 之间,相对标准偏差(RSD)在 4.2%~11%之间,符合农药残留分析的要求^[12-13]。

本工作采用超高效液相色谱-串联质谱法对食品中烯炔菌酯的残留量进行测定,方法简单、快速、灵敏度高,并具有良好的精密度与准确度,能满足农药残留测定的要求。

参考文献:

[1] 张国生. 甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的应用、开发现状及展望[J]. 农药科学与管理, 2003,24(12):30-34.
 [2] 王丽,石延霞,李宝聚,等. 甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂研究进展[J]. 农药科学与管理, 2008,29(9):25-27.
 [3] 薄海波,王金花,郭春海,等. 气相色谱/质谱法测定食品中甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂残留[J]. 分析化学, 2008,36(11):1471-1475.
 [4] VIÑAS P, CAMPILLO N, MARTÍNEZ-CASTILLO N, et al, Method development and validation for stro-

bilurin fungicides in baby foods by solid-phase micro-extraction gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009,1216:140-146.
 [5] LIKAS D T, TSIROPOULOS N G, MILIADIS G E. Rapid gas chromatographic method for the determination of famoxadone, trifloxystrobin and fenhexamid residues in tomato, grape and wine samples[J]. Journal of Chromatography A, 2007,1150:208-214.
 [6] SANNINO A, BOLZONI L, BANDINI M. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables [J]. Journal of Chromatography A, 2004,1036:161-169.
 [7] 秦冬梅,徐应明,黄永春,等. 烯炔菌酯在苹果及土壤中的残留动态研究[J]. 环境化学, 2007,26(6):753-756.
 [8] 吴洁珊,冯家望,任永霞,等. 气相色谱测定柑橘中多种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的残留量[J]. 农药, 2011, 50(10):754-755.
 [9] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, ŠTAJNBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce[J]. J AOAC Int, 2003, 86:412-431.
 [10] WILKOWSKA A, BIZIUK M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology[J]. Food Chemistry, 2011, 125: 803-812.
 [11] Document No. SANCO/12495/2011 Commission of the European Union, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed[S].
 [12] SN/T 0001-1995 出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定[S].
 [13] CAC/GL 40-1993 Guidelines on good laboratory practice In pesticide residue analysis[S].

(上接第 952 页)

[9] ALLEN M J, TUNG V C, KANER R B. Honeycomb carbon: a review of graphene[J]. Chemical Reviews, 2010,110(1):132-145.
 [10] GEOFFEY C B, CATHERINE L, DAVID T T. Catalysis by gold[J]. Catalytic Science Series, 2006,6 (3):100-104.
 [11] COMOTTI M, LI W C, SPLIETHOFF B. Support

effect in high activity gold catalysts for CO oxidation [J]. Journal of American Chemical Society, 2006,128 (3):917-922.
 [12] 孙桂进,王国强,徐建军. 液相色谱-二极管阵列检测法同时测定血液中 6 种毒品及其代谢物[J]. 淮海工学院学报:自然科学版, 2012,21(3):33-36.