

多种提取手段联合液相色谱串联质谱法 快速测定食品中苯霜灵残留量

祝伟霞¹, 袁萍¹, 杨冀州¹, 王彩娟², 孙转莲¹, 张巨洲¹

(1. 河南出入境检验检疫局, 河南郑州 450003) (2 郑州大学化学系, 河南郑州 450042)

摘要: 建立了高效液相色谱-电喷雾四极杆质谱技术测定 13 种食品中苯霜灵的确证方法。根据每种基质的特性, 动物源性食品采用丙酮-正己烷提取, 植物源性食品用乙酸乙酯提取, 经石墨化碳与氨基 (Carbon NH₂) 混合固相萃取柱净化, 以乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相, 改性 Shiseido MG II C18 色谱柱中分离, 电喷雾正离子多反应监测模式下监测。方法定量限 (LOQ, S/N≥10) 为 5 μg/kg, 在 2~100 μg/L 范围内呈良好的线性关系; 13 种食品基质添加三个浓度水平进行实验, 加标平均回收率在 66.0~104.2% 之间, 相对标准偏差为 4.4%~12.3%。经验证本方法准确、快速, 适合多种食品中苯霜灵残留的确证分析。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 苯霜灵; 食品; 残留测定

文章编号: 1673-9078(2012)7-867-870

Quick Determination of Benalaxyl Residues in Foodstuffs by Multi-extraction Mode Combined HPLC-MS/MS

ZHU Wei-xia¹, YUAN Ping¹, YANG Ji-zhou, WANG Cai-juan², SUN Zhuan-lian¹, ZHANG Ju-zhou¹

(1. Henan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhengzhou 450003, China)

(2. Department of Chemistry of Zhengzhou University, Zhengzhou 450042, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrum (LC-MS/MS) method was developed for confirmatively determining of benalaxyl residues in 13 foodstuffs. The benalaxyl was extracted with acetone-hexane in animal-origin foods and ethyl acetate in plant derived food. The purification was used with Carbon-NH₂ solid-phase extraction (SPE) column. A mixture of acetonitrile and 0.1% formic acid was selected as the mobile phase and the separation was carried out on Shiseido MG II C18 column. The compound was analyzed quantitatively by mass spectrometry under positive electrospray ionization (ESI⁺) multiple reaction monitoring (MRM) mode. The linear range of analyte was from 2 μg/L to 100 μg/L and the limit of quantification (LOQ S/N≥10) was 5 μg/kg. Spiked with three concentration levels in 13 matrices, the method recoveries were between 66.0% and 104.2% with relative standard deviations 4.4% to 12.3%. The validated method was accurate, rapid and suitable for qualitatively determining benalaxyl residues in many foodstuffs.

Key words: LC-MS/MS; benalaxyl; foodstuffs; residue determination

手性农药苯霜灵(Benalaxyl)属 N-酰基丙氨酸类内吸杀菌剂, 在农业生产过程中, 苯霜灵主要用于防治晚疫菌、单轴霉菌、霜霉菌和假霜霉菌引起的农作物病虫害, 作为一种有毒化学品残留于食品和环境, 易导致人类致细胞突变、致畸和致癌等健康危害。目前世界各国包括欧盟、日本、韩国、澳大利亚、食品法典委员会和台湾均制定食品中苯霜灵的最大残留限量值 (MRLs), 其中涉及 40 种水果中限量为 0.05~0.5

收稿日期: 2012-03-29

基金项目: 河南省科技攻关项目 (122102110167); 国家质检总局科研项目 (20071K162)

作者简介: 祝伟霞 (1979-), 女, 硕士, 工程师, 主要从事食品安全研究工作

mg/kg、10 种坚果类限量为 0.05~0.5 mg/kg、83 种蔬菜类限量为 0.05~0.5 mg/kg、14 种粮谷限量 0.05 mg/kg、39 种动物源性食品限量 0.05 mg/kg^[1]。为了提高我国农产品中苯霜灵的检验水平, 建立一种多种食品中苯霜灵残留的分析方法势在必行。

目前, 食品中苯霜灵残留检测的报道主要是采用气相色谱氮磷检测法^[2]、气相色谱质谱法^[3-4]、液相色谱法^[5]、液相色谱-质谱/质谱^[6-7]和液相色谱-飞行时间质谱^[8]等方法, 这些方法均应用于多种农药残留的同时检测。王鹏等^[4]采用液相色谱 206 nm 紫外波长检测了土壤、水、葡萄中苯霜灵残留, 样品净化采用二氯甲烷液液萃取法。本研究在农药多残留检测报道的基础上, 首次建立了 LC-ESI/MRM-MS/MS 测定多种食品中

苯霜灵残留的快速确证方法,增加了食品中苯霜灵净化方法的选择性与回收率,同时提高了其检测灵敏度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

API 4000 液相色谱-串联质谱仪(美国 AB 生物公司),配 Agilent1200 液相色谱仪和电喷雾离子源; BRANSON 5210 超声波清洗仪(美国 BRANSON 公司); IKA T18 涡旋混匀器(德国 IKA 公司); N-EVAP 氮气浓缩仪(美国 Organomation 公司); 石墨化碳与氨基混合固相萃取柱(1 g/6 mL, 美国 Waters 公司); 苯霜灵标准品(纯度>99%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸(含量为 96%, 色谱纯, 美国 Tedia 公司), 其他试剂均为市售分析纯(分析纯, 天津化学试剂二厂); 实验用水为 Millipore 纯水系统制得的高纯水(电阻率 $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$);

1.2 实验步骤

1.2.1 提取

动物源性食品(除动物脂肪):取 2 g 试样于 50 mL 离心管中,加 2 mL 水(牛奶不需加水),混匀后加入 20 mL 丙酮-正己烷(1+2, V/V),涡旋混匀 3 min,超声提取 10 min,4000 r/min 离心 5 min,取 5 mL 上清液待净化。

动物脂肪:取 2 g 试样于 50 mL 离心管中,置于 50 °C 水浴中温热融化后,加入 20 mL 丙酮-正己烷溶液(1+2, V/V),涡旋混匀 1 min,超声提取 5 min,用丙酮-正己烷溶液(1/2, V/V)定容至 25 mL,涡旋混匀,4000 r/min 离心 5 min,移取 6.25 mL 上清液待净化。

水果、蔬菜和粮谷类:取 2 g 试样于 50 mL 离心管中,加入 2 g 无水硫酸钠、2 g 氯化钠、20 mL 乙酸乙酯,混匀 3 min,超声提取 10 min,4000 r/min 离心 5 min,取 5 mL 上清液于 50 °C 水浴中氮吹浓缩至干,5 mL 丙酮-正己烷(1+2, V/V)溶解残渣,待净化。

1.2.2 净化

5 mL 丙酮-正己烷用活化 Carbon NH₂ 柱,样液以小于 1 mL/min 的流速通过,3 mL 丙酮-正己烷(1+2, V/V)淋洗,收集全部流出液,流出液于 50 °C 水浴中氮吹浓缩至干,1 mL 流动相溶解残渣(对于脂肪含量高的样品,加入 1 mL 乙腈饱和的正己烷除脂),过滤后测定。

1.3 LC-MS/MS 分析条件

色谱柱为 Shiseido MG II C18 150×2.1 mm, 5 μm ; 流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液,(60+40, V/V); 流速为 0.3 mL/min; 进样量为 10 mL; 在 ESI⁺ MRM 电离模式

下检测;喷雾电压为 4000 V;离子化温度为 650 °C;雾化气为 30 psi;气帘气为 10 psi;碰撞气为 9 psi;所用气体均为氮气,其它质谱参数见表 1。增效醚总离子流图见图 1。

表1 苯霜灵的参考质谱参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时 间/s	碰撞室出 口电压/V	射入电 压/V	去簇电 压/V	碰撞能 量/eV
苯霜灵	326.1	294.1	100	18.8	4	50	15
		148.3	100	8.6	8.9	50	28

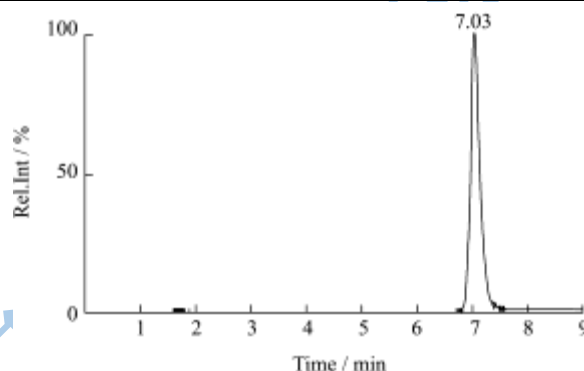


图1 增效醚标准溶液多反应监测总离子流图(10 ng/mL)

Fig.1 Total ion chromatography of ether standard solution

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

采用丙酮-正己烷混合溶剂提取动物源性食品中苯霜灵回收率 $\geq 86\%$ 。该混合溶剂用于植物源性食品的提取时回收率 $\leq 60\%$,样品中加入氯化钠,同时丙酮与样品中水分互溶后,样液分为两层,定量准确性差。实验比较了甲醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯作提取溶剂时的回收率,乙酸乙酯既能完全提取样品中残留的苯霜灵,又利于样品浓缩,因此乙酸乙酯作为植物性食品的提取剂。在提取植物样品时加入氯化钠和无水硫酸钠,可以达到盐析和除水的作用。

2.2 固相萃取条件的优化

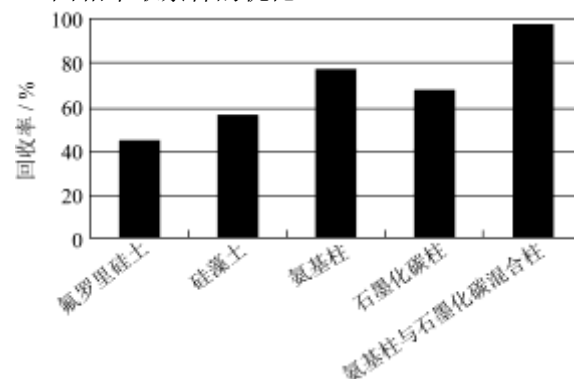


图2 不同固相萃取柱的回收率

Fig.2 Recovery of benalaxyl extracted by different columns

苯霜灵结构中含有酯基、酰基、芳香环等基团，因此实验考察了正相吸附型填料（氟罗里硅土、硅藻土、氨基柱、石墨化碳黑柱、氨基柱与石墨化碳黑混合柱）的净化效果，以弱极性丙酮-正己烷（1+2，V/V）提取液过柱，极性干扰物吸附于柱体内，低极性化合物苯霜灵在极性固相萃柱中不保留，氨基柱-石墨化碳黑柱混合柱回收率>95%（见图2）。

2.3 基质效应

液相色谱电喷雾质谱易产生离子抑制现象，为了考查本方法的基质效应，实验选用柑桔、花生、大蒜、土豆、菠菜、芹菜、小麦、猪肉、鸡肝、牛肾、牛脂肪、鸡蛋、蜂蜜等十三种空白样品的提取溶液，分别配制成浓度为5 ng/mL、50 ng/mL的基质工作溶液，该

溶液与乙腈配制的工作液进行色谱响应比较，结果表明两种工作溶液响应值偏差不超过15%（见表2），因此本方法没有基质抑制现象，无需使用基质校正曲线弥补回收率。

2.4 线性关系和测定低限

在本检验方法所确定的实验条件下，取一系列标准溶液（2.00、5.00、10.0、20.0、50.0、100 μg/L），以峰面积对苯霜灵浓度作图，结果表明，苯霜灵浓度与对应的峰面积呈现良好的线性关系（ $Y=2e+005X$ ， $R=0.9993$ ）。以 $S/N \geq 10$ 和各国残留限量最低值的0.5倍（0.5MRL）、日本一律标准^[9]为依据确定方法定量检出限(LOQ)为5 μg/kg。

表2 不同食品基质效应（以偏差值计）（%）

Table 2 Matrix effects of different food samples

样品	5 ng/mL	50 ng/mL	样品	5ng/mL	50 ng/mL	样品	5ng/mL	50 ng/mL
柑桔	9.4	6.5	芹菜	8.9	8.4	猪肉	9.5	8.4
花生	11.2	8.4	小麦	7.6	6.5	鸡肝	13.8	11.2
大蒜	14.1	10.5	鸡蛋	10.9	9.7	牛肾	12.6	10.5
土豆	8.6	7.2	蜂蜜	12.4	9.5	牛脂肪	14.3	13.6
菠菜	9.3	8.6						

2.5 方法回收率和精密度

选用柑桔、牛脂肪、猪肉、蜂蜜等13种空白样品添加3个浓度水平（LOQ、最低MRL和最高MRL）的

标准溶液，每一浓度水平重复操作10次，添加回收色谱图见图3，测得苯霜灵的回收率范围为66.0-104.2%，相对标准偏差在4.4%~12.3%之间，见表3。

表3 13种食品中添加回收率与相对标准偏差

Table 3 Fortified recovery and RSD of benalaxyl in 13 food samples

样品	添加水平 (μg/kg)	回收率/%	RSD/%	样品	添加水平 (μg/kg)	回收率/%	RSD/%	样品	添加水平 (μg/kg)	回收率/%	RSD/%
	5	76.0~102.0	10.4		5	66.0~94.0	11.1		5	74.0~104.0	10.2
柑桔	50	78.4~96.6	6.5	芹菜	50	84.0~99.2	5.9	牛肾	50	71.6~93.0	7.4
	200	85.0~97.2	4.7		100	83.2~100.8	5.5		500	84.7~99.4	5.1
花生	5	76.0~92.0	6.5	小麦	5	70.0~92.0	7.9	牛脂肪	5	68.0~92.0	10.7
	20	76.5~92.0	6.6		20	72.5~91.0	7.8		50	67.2~87.2	8.0
	50	82.6~94.4	4.4		50	75.8~91.4	6.5		500	77.9~94.0	5.2
大蒜	5	72.0~96.0	12.3	猪肉	5	70.0~90.0	8.5	鸡蛋	5	72.0~96.0	9.3
	50	73.4~100.2	9.4		50	77.8~94.4	7.0		50	80.6~96.6	7.2
	80	79.0~96.1	6.7		500	87.4~103.4	5.9		500	87.8~102.7	5.0
土豆	5	70.0~98.0	12.0	鸡肝	5	72.0~90.0	7.0	蜂蜜	5	66.0~96.0	12.0
	10	76.0~93.0	6.0		50	77.4~96.6	7.0		10	74.0~92.0	7.6
	50	84.2~97.4	4.4		500	84.0~104.2	6.5		20	79.5~96.0	6.0
菠菜	5	70.0~90.0	9.6								
	50	81.2~100.4	7.4								
	100	82.7~100.5	5.1								

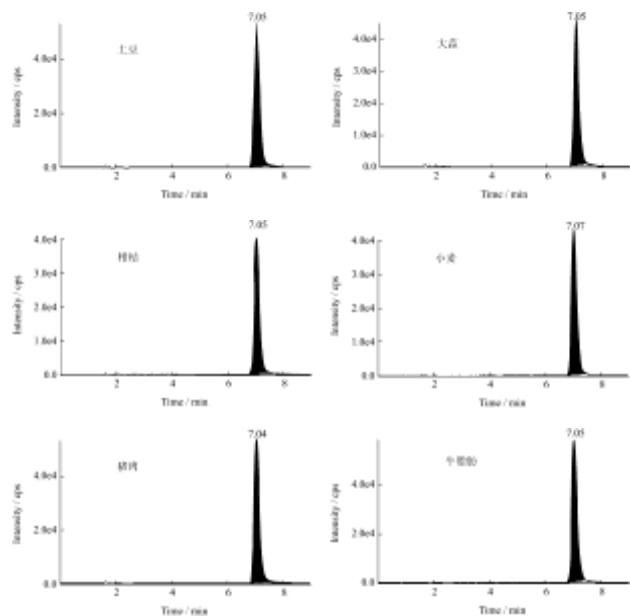


图3 6种食品中添加5 g/kg苯霜灵的加标多反应选择离子流图

Fig.3 Ion chromatography of benalaxyl (5 g/kg) standard reaction of 6 food samples

3 结论

对于不同的样品分别采用了多种提取方案联合固相萃取的净化方式,采用LC-MS/MS技术建立了13种食品基质中苯霜灵残留量的快速分析方法,本方法已成功用于送检的38批次食品中苯霜灵测定,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度时批间平均回收率为92.4%,变异系数为10.5%。该方法可以同时满足欧盟、美国、日本、中国、台湾地区关于食品中苯霜灵残留的限量要求。

参考文献

[1] <http://www.fsr.org.cn/index.asp>

- [2] G Gambacorta, M Faccia, C Lamacchia, et al. Pesticides residues in tomato grown in open field [J]. Food Control, 2005, 16: 629-632
- [3] Rosa M, G Rodríguez, B Cancho-Grande, et al. Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216: 6033-6042
- [4] 王鹏,刘东晖,王玉红,等.高效液相色谱法拆分苯霜灵对映体 [J].分析化学,2006,34(11):1524-1528
- [5] D Liu, P Wang, W F Zhou, et al. Direct chiral resolution and its application to the determination of fungicide benalaxyl in soil and water by high-performance liquid chromatography [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 555: 210-216
- [6] B Mayer-Helm, L Hofbauer, J Müller. Method development for the determination of selected pesticides on tobacco by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. Talanta 2008, 74: 1184-1190
- [7] 食安発第 1003002 号 LCMS による農薬等の一斉試験法 (畜水産物) [S]
- [8] B Gilbert-López, J F García-Reyes, M Mezcua, et al. Multi-residue determination of pesticides in fruit-based soft drinks by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry Original Research Article [J], Talanta, 2010, 81: 1310-1321
- [9] 周宏琛,朱涛,王勇,等.“日本肯定列表制度”农药残留新标准对我国农产品出口的影响[J].现代食品科技,2006,22(4): 197-200