

QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定乳及乳制品中活化酯及其代谢物阿拉酸式苯含量

汪春明¹, 霍江莲², 陈冬东^{3*}, 彭涛³, 余丽波^{1,4}, 贾景建¹

(1. 中检科(北京)测试认证有限公司, 北京 100176)(2. 中国合格评定国家认可中心, 北京 100062)
(3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)(4. 检科院(北京)科学技术有限公司, 北京 100176)

摘要: 该文研究了高效液相色谱-三重四级杆质谱法(HPLC-MS/MS)测定乳及乳制品中活化酯和阿拉酸式苯的测试方法。样品经甲酸乙腈(含1%甲酸(V/V))涡旋提取,分析液经QuEChERSdSPE EMR-Lipid除脂专用管净化,离心后过膜上机检测。测试方法以甲醇-0.1%甲酸水(V/V)为流动相,流速设置为0.2 mL/min,应用梯度洗脱程序,采用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱进行分离,电喷雾正、负离子模式(活化酯为ESI⁻、阿拉酸式苯为ESI⁺),多反应离子监测模式(MRM)检测,基质匹配外标法进行定量。对于乳及乳制品基质,活化酯和阿拉酸式苯在1~30 ng/mL的质量浓度与其相对应的峰面积之间线性关系良好, R^2 均大于0.996,在0.01、0.02和0.1 mg/kg 3种不同浓度添加水平下,活化酯和阿拉酸式苯的平均回收率在91.8%~109.6%之间,相对标准偏差在1.3%~11.5%之间。该方法可满足残留检测的准确度、精密度和灵敏度的要求。

关键词: 活化酯; 阿拉酸式苯; 乳及乳制品; 液相色谱-串联质谱法

文章编号: 1673-9078(2024)10-362-369

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.0848

Determination of Acibenzolar-S-methyl and Their Metabolite Acibenzolar Acid in Milk and Dairy Products by QuEChERS- Liquid Performance Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WANG Chunming¹, HUO Jianglian², CHEN Dongdong^{3*}, PENG Tao³, YU Libo^{1,4}, JIA Jingjian¹

(1. CAIQ (Beijing) Testing and Certification Co. Ltd., Beijing 100176, China)(2. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China)(3. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)(4. CAIQ (Beijing) Science and Technology Co. Ltd., Beijing 100176, China)

Abstract: This study explored a test method for the determination of acibenzolar-S-methyl and acibenzolar acid in milk and dairy products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The

引文格式:

汪春明,霍江莲,陈冬东,等.QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定乳及乳制品中活化酯及其代谢物阿拉酸式苯含量[J].现代食品科技,2024,40(10):362-369.

WANG Chunming, HUO Jianglian, CHEN Dongdong, et al. Determination of acibenzolar-S-methyl and their metabolite acibenzolar acid in milk and dairy products by QuEChERS- liquid performance chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 362-369.

收稿日期: 2023-07-13

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100804)

作者简介: 汪春明(1986-),男,硕士研究生,中级工程师,研究方向:食品安全, E-mail: 598898364@qq.com

通讯作者: 陈冬东(1975-),女,研究员,研究方向:食品安全, E-mail: chendd@acas.com.cn

samples were subjected to vortex extraction with formic acid-acetonitrile (containing 1% (*V/V*) formic acid), and purified by QuEChERSdSPE EMR-Lipid tubes, centrifuged then filtered before detection. The test method used gradient elution using methanol-0.1% (*V/V*) formic acid as the mobile phase, a flow rate of 0.2 mL/min and ACQUITY UPLC HSS T3 column for separation. Electrospray positive and negative ion modes (ESI+ for acibenzolar-S-methyl and ESI- for acibenzolar) and multiple reaction monitoring (MRM) were used for detection, and the matrix-matched external standard method was used for quantification. For milk and dairy products, good linearity between the mass concentrations of acibenzolar-S-methyl and acibenzolar acid, and their corresponding peak areas, in the concentration range of 1~30 ng/mL, with the correlation coefficients R^2 higher than 0.996. The mean recoveries of acibenzolar-S-methyl and acibenzolar acid were 91.8%~109.6% and the corresponding relative deviation (RSD) values were 1.3%~11.5% at three spiking levels (0.01, 0.02 and 0.1 mg/kg). This method can meet the requirements of accuracy, precision, and sensitivity for residue detection.

Key words: acibenzolar-S-methyl; acibenzolar acid; milk and dairy product; performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

活化酯, 英文通用名: Acibenzolar-S-methyl, CAS.: 135158-54-2, 中文化学名: 苯并[1,2,3]噻二唑-7-硫代羧酸-S-甲酯, 英文化学名: S-methyl benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioate, 化学结构式如图1所示, 活化酯纯品为白色至米色粉状固体, 有类似烧焦的气味, 主要降解产物为阿拉酸式苯^[1-3]。阿拉酸式苯, 英文通用名: Acibenzolar acid, CAS.: 35272-27-6, 中文化学名: 苯并[D][1,2,3]噻二唑-7-羧酸, 英文化学名: benzo[d][1,2,3]thiadiazole-7-carboxylic acid, 化学结构式如图1所示^[4,5]。活化酯是一种植物诱抗剂。其自身对病原菌无杀灭活性和治疗效果, 但其被植物吸收以后, 能够诱导激活植物自身对病原菌广谱而持久的防卫抗性。对果蔬、粮食和烟草等作物的白粉病、霜霉病、锈病等有较好的防治作用。它的使用剂量很小, 但是防治效果非常好, 并且能够保持 14 d 的时间^[6,7]。将活化酯与其他活性成分药剂结合使用, 不但可以使活化酯的防控效果得到提升, 而且还能拓宽防治范围^[8,9]。活化酯的过量或不合理使用, 会随着饲料进入乳牛体内, 在乳牛体内积累, 并可被水解为阿拉酸式苯进入乳汁中, 随着乳汁被加工成成品而残留其中。

目前对乳及乳制品中活化酯及其代谢物阿拉酸式苯的研究较少^[10,11], 为了更加快速高效的检测乳及乳制品中活化酯及其代谢残留物阿拉酸式苯, 本文利用快速检测方法 QuEChERS, 结合液相色谱-串联四级杆质谱仪, 建立了活化酯及其代谢残留物阿拉酸式苯的分析方法。本方法快速、简单、高效, 回收率和精密度都比较好, 适用于对乳及乳制品中的活化酯和阿拉酸式苯进行定性、定量分析。

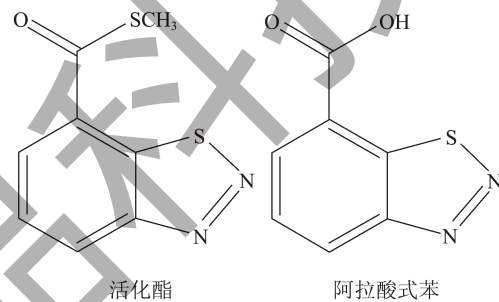


图1 活化酯和阿拉酸式苯的化学结构式

Fig.1 Chemical structural formula of Acibenzolar-S-methyl and Acibenzolar acid

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-20AD-LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪, 日本 Shimadzu 公司; STV-100 多管涡旋混合仪, 中国茂丰公司; 加样移液枪, 美国 Thermo 公司; VORTEX GENIE 2 可调速涡旋混匀器, 美国 Scientific Industries 公司; LG-25M 离心机, 中国蜀科公司; EFAA-DC24-RT 氮吹仪, 上海安谱公司; XS105&PL303 分析天平, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司; 默克 Milli-Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司。

标准品: 活化酯 (100 $\mu\text{g/mL}$)、阿拉酸式苯 (100 $\mu\text{g/mL}$) 采购于天津阿尔塔。

乙腈、丙酮、甲醇 (色谱纯), 美国 Fisher 公司; 甲酸 (色谱纯), 上海安谱; 氯化钠 (分析纯), 国药集团; 十八烷基硅烷键合硅胶 (C18)、QuEChERSdSPE EMR-Lipid、N-丙基乙二胺 (PSA), 美国 Agilent 科技有限公司; HMR-Lipid, 北京纳鸥公司; 硅胶 (Si), 美国 Supelco 公司;

CleanertLipoNo、中性氧化铝 (BONDESIL-AL-N), 天津 Bonna-Agela 公司; 0.22 μm 尼龙滤膜 (Nylon)、0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜 (PTFE)、0.22 μm 聚醚砜滤膜 (PES), 天津津滕公司; 0.2 μm 亲水性聚丙烯滤膜 (GHP), 美国 Waters 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液配制

活化酯、阿拉酸式苯标准储备液: 分别移取活化酯 (100 $\mu\text{g/mL}$)、阿拉酸式苯 (100 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈将它们分别定容至刻度, 即分别得到 10 $\mu\text{g/mL}$ 的活化酯、阿拉酸式苯标准储备液。

标准中间液的配制: 分别移取 1 mL 上述标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈将其定容至刻度, 即得 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 活化酯和阿拉酸式苯混合标准中间溶液。

工作曲线的配制: 分别移取 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的活化酯和阿拉酸式苯混合标准中间溶液 10、20、50、100、200、300 μL 于六个 10 mL 容量瓶, 分别由乙腈定容至刻度得到中间工作溶液; 分别取六个 1 mL 空白基质溶液, 用氮气吹干, 分别移取 1 mL 上述中间工作溶液复溶, 即得 1、2、5、10、20、30 ng/mL 基质匹配系列标准工作溶液。

1.2.2 样品前处理

1.2.2.1 提取

将 2.0 g 的样品 (准确到 0.01 g) 置于 50 mL 的具塞离心管中, 加入 5 mL 的水使样品保持静止 30 分钟, 之后加入 10 mL 1% (V/V) 甲酸乙腈, 2 500 r/min 涡旋混合 20 min, 再加入 2.0 g NaCl 振荡混合 30 s, 20 000 r/min 离心 3 min, 移取上清液待净化。

1.2.2.2 净化

取 4 mL 提取液到 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 的 15 mL 净化管中 (事先加 2 mL 一级水涡旋混匀), 涡旋混合 5 min 使其净化充分, 之后 8 000 r/min 高速离心 3 min, 取净化液到内含 1 g 氯化钠的 15 mL 离心管中, 涡旋混匀 30 s, 8 000 r/min 离心 3 min, 移取 1 mL 净化液过 0.22 μm PTFE 膜装瓶, 待 LC-MS/MS 测定。

1.2.3 液相色谱-串联质谱条件

1.2.3.1 液相色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温箱温度为 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为

5.0 μL 。流动相 A 路为甲醇, B 路为 0.1% 甲酸水溶液, 流量设置为 0.2 mL/min; 梯度洗脱程序为: 0~0.10 min, 45% B 相; 0.1~2 min, 45%~5% B 相; 2~4.0 min, 5% B 相; 4.0~4.5 min, 5%~45% B 相; 4.5~6.0 min, 45% B 相; 6.5 min stop。

1.2.3.2 质谱条件

电喷雾离子化模式; 多反应离子监测模式 (MRM) 检测; 加热气流量 (F): 10 L/min; 接口温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 雾化器流量 (N): 3 L/min; 加热块温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; DL 温度 (D): 250 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流量: 8 L/min。

2 结果与讨论

2.1 检测对象的确定

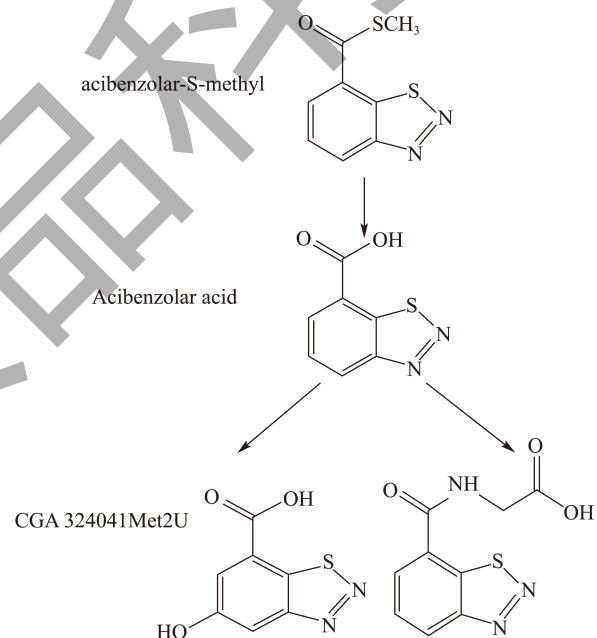


图 2 活化酯在泌乳山羊组织和乳汁中的代谢特征

Fig.2 Metabolites of acibenzolar-S-methyl identified in tissues and milk of lactating goats

研究农药母体的同时, 其代谢、降解产物也越来越受到人们的重视。在对山羊体内活化酯残留物进行评估中发现, 活化酯被水解为阿拉酸式苯 (CGA210007), 它是排泄物、乳汁和组织中的主要代谢物。阿拉酸式苯与甘氨酸结合生成[(苯并[1,1,3,]噻二唑-7-羧基)-氨基]乙酸 (MET 2U), MET 2U 主要存在于乳汁中, 在组织中的量较少。阿拉酸式苯也部分存在于肝脏和肌肉中^[12,13]。活化酯在泌乳山羊组织和乳汁中的代谢特征见图 2。鉴于此, 本研究的对象为活化酯及其代谢物阿拉酸式苯。

2.2 仪器条件的优化

分别准确配制 1.0 μg/mL 的活化酯、阿拉酸式苯溶剂标液, 并利用电喷雾电离正离子模式 (ESI⁺) 和负离子模式 (ESI⁻) 对目标物进行 scan 扫描。结果表明, 活化酯较适合于 ESI⁺, 其准分子离子峰 [M+H]⁺ 为 *m/z* 211; 阿拉酸式苯较适合于 ESI⁻, 其离子峰 [M-H]⁻ 为 *m/z* 179, 获得活化酯和阿拉酸式苯 scan 质谱图见图 3。在此基础上, 对子离子、碰撞能量 (CE)、Q1&Q3 Pre 偏差等参数进一步优化。根据国际食品法典委员会 CAC/GL 90-2017^[14] 质谱分析方法, 要满足 4 点鉴定法, 识别点数必须有一个母离子和两个子离子。在本研究中, 选取了离子丰度最高、基体干扰最小的两个离子对, 并将它们作为表征化合物的特征离子对, 其中, 选取了信号强度更大的离子对作为定量离子。活化酯和阿拉酸式苯的质谱特征离子对、Q1&Q3 Pre 偏差和碰撞能量等参数见表 1。

当使用电喷雾离子化模式进行样本分析时, 在流动相中添加适当的酸 (甲酸、乙酸等), 可使目标化合物形成 [M+H]⁺ 离子, 加入适量的碱 (甲酸铵、乙酸铵或氨水) 可以减少 [M+Na]⁺、[M+K]⁺ 的形成, 促进目标物形成 [M-H]⁻, 从而提高目标离子的灵敏度。本文分别由乙腈和甲醇构成有机相 (A 相); 由乙酸铵-水、一级水、甲酸-乙酸铵-水、甲酸-水构成无机相 (B 相)。通过 A、B 两项不同的组合比较分析发现, A 相是甲醇, B 相为 0.1% 甲酸时,

活化酯和阿拉酸式苯的离子化效率最佳, 且峰形尖锐。

进一步比较 C18 和 T3 色谱柱对活化酯和阿拉酸式苯的色谱响应, 发现活化酯和阿拉酸式苯在 T3 色谱柱的峰形优于 C18。故本研究选择 T3 色谱柱。

2.3 前处理条件优化

2.3.1 净化填料的优化

近年来, 药物残留检测愈发向更高效、更快速的方向发展。QuEChERS 由于具有简便、经济、效率高、环保等特点, 目前已广泛应用于药物残留、添加剂、生物毒素等检测中。QuEChERS 方法通常使用的净化填料为 *N*-丙基乙二胺 (PSA)、硅胶键合碳十八 (C18)、石墨化炭黑 (GCB)。其中 PSA 用于净化基质中的有机酸、金属离子以及一些糖类和酚类; C18 去除脂类等非极性干扰物; GCB 去除色素、甾醇类等平面结构的非极性干扰物。作者之前研究不同种类规格固相萃取柱的除油效果时, 发现中性氧化铝 (AL-N) 的除油效果较好, 考虑到研究基质富含油脂较多, 于是加入 AL-N 作为待考察净化填料。另一个待考察无机氧化物净化材料为活性硅土 (Si)。新型脂质净化材料, 如 EMR 等可以高效且选择性地去除样本中的脂质杂质, 而不会导致分析物的损失, 于是作者同时选择 QuEChERSdSPE EMR-Lipid、HMR-Lipid、CleanertLipoNo 作为新型待考察净化材料。

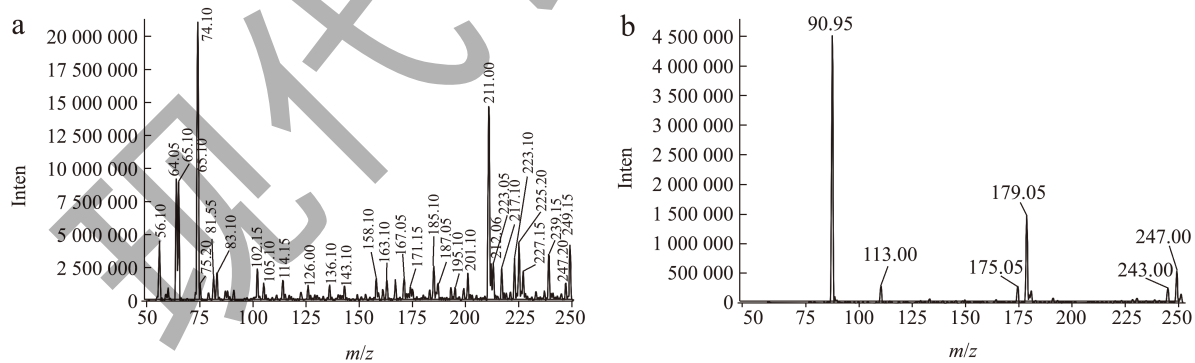


图 3 活化酯和阿拉酸式苯的 scan 扫描质谱图

Fig.3 Chromatogram of product ion scan Acibenzolar-S-methyl and Acibenzolar acid

表 1 定量定性离子对、驻留时间及碰撞能量

Table 1 Quantitative and qualitative ion pairs, residence time, and collision energy

名称	保留时间/min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	驻留时间/ms	Q1Pre 偏差/V	CE	Q3Pre 偏差/V
阿拉酸式苯	3.483	179.15	107.1*	100	19.0	21.0	20.0
			135.15	100	19.0	13.0	26.0
活化酯	4.275	211.3	136.0*	100	-11.0	-29.0	-23.0
			90.95	100	-11.0	-21.0	-16.0

注: 带 “*” 的离子为定量离子。

分别准确称取 500 mg PSA、500 mg C18、500 mg Si、500 mg AL-N、500 mg EMR-Lipid、500 mg HMR-Lipid、500 mg CleanertLipoNo 到 5 mL 聚乙烯离心管中, 分别加入 2 mL 50 ng/mL 活化酯和阿拉酸式苯混合标准溶液, 2 500 r/min 涡旋混匀 10 min, 10 000 r/min 高速离心 3 min, 分别取 1 mL 上机测定, 将上机测定的浓度进行记录, 并对其进行计算, 用以评估不同净化材料对活化酯和阿拉酸式苯产生的吸附或干扰。回收率详见图 4。

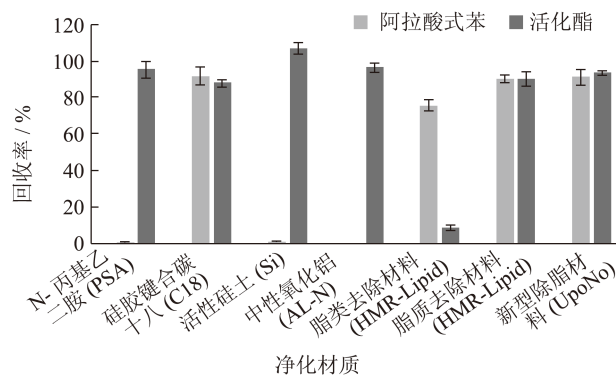


图 4 净化材料对活化酯和阿拉酸式苯的吸附效果

Fig.4 Extraction efficiencies of Acibenzolar-S-methyl and Acibenzolar acid in different treatment materials (n=3 at 50 ng/mL)

传统净化材料: (1) 过 PSA、Si 和 AL-N 净化填料后, 阿拉酸式苯几乎没有回收。PSA 可以与含有酸性基团的靶物质结合, 如苯氧羧酸类除草剂, PSA 也是一种碱性吸附剂, 在碱性环境下可以降低像灭菌丹、克菌丹、敌菌丹等不稳定的靶物质^[15]。作者推测阿拉酸式苯在 PSA 净化材料中无回收, 可能是因为 PSA 的两个胺基离子吸附了阿拉酸式苯的羧基, 致使其在色谱上无响应。非键合的活性硅土 (Si) 是极性吸附剂, 呈弱酸性, 分析认为阿拉酸式苯被 Si 吸附是其回收低的主要原因。氧化铝的铝金属中心可与化合物羟基上的氢形成氢键, 从而吸附化合物, 或通过铝原子中心与带负电荷的杂原子 (杂环化合物) 相互作用, 如: N、P、O、S, 也可与富电的芳香族化合物作用, 由此推测, 阿拉酸式苯被 AL-N 吸附是其回收率低的主要原因。(2) PSA、C18、Si 和 AL-N 对活化酯没有影响。

有机聚合物: 用 HMR-Lipid 净化后, 活化酯回收率只有 8% 左右, 且出现分裂峰, 见图 5, 分析原因可能是使用 HMR-Lipid 材料净化后产生了明显的基质效应; 使用 EMR-Lipid、CleanertLipoNo 净化材料后都能满足方法学要求, 其中 CleanertLipoNo

会使阿拉酸式苯定性离子峰展宽。

经过全面的考量, 选用了 EMR-Lipid 作为本次试验的净化材料。

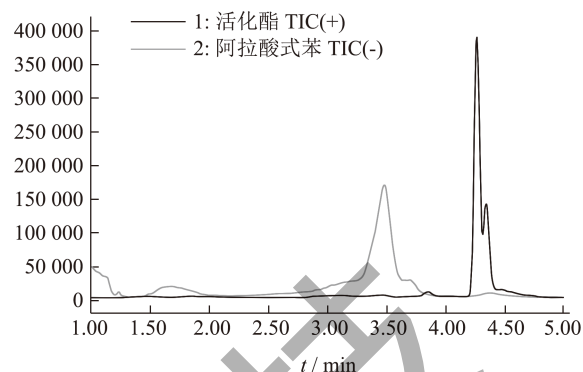


图 5 HMR-Lipid 净化后的色谱图

Fig.5 Chromatogram after HMR-Lipid purification

2.3.2 滤膜的筛选

合适的滤膜对实验结果的影响至关重要, 滤膜的选择主要取决于滤膜与所过滤样液之间的化学兼容性。尼龙膜 (Nylon) 和聚四氟乙烯膜 (PTFE) 可用于水性和有机溶液的过滤, 化学兼容性广泛。聚醚砜膜 (PES) 具有低蛋白吸附特性, 用于蛋白溶液的过滤, 也可用于温和有机溶液的过滤。聚丙烯膜 (GHP) 用于水和腐蚀性有机溶液的过滤, 其低蛋白结合的特性可保证蛋白样品的高回收。分别移取 1 mL 50 ng/mL 活化酯和阿拉酸式苯混合标准溶液加入 Nylon、PTFE、PES、GHP 滤膜过滤后上机检测, 计算回收率, 结果见图 6。由图 6 可知: Nylon 对阿拉酸式苯具有强烈的吸附作用; GHP 对活化酯和阿拉酸式苯有较为微弱的吸附作用; 使用 PES 和 PTFE 过滤, 都能满足方法验证学的要求, 考虑到研究基质和提取溶液含酸的特性, 作者选择 PTFE 作为过滤的材质。

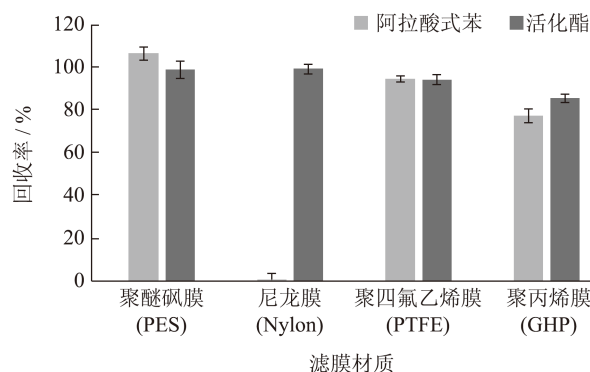


图 6 不同滤膜对活化酯和阿拉酸式苯的过滤效果

Fig.6 Filtration effect of different membranes on Acibenzolar-S-methyl and Acibenzolar acid (n=3 at 50 ng/mL)

2.3.3 提取溶剂的选择

在对农残进行检测时，经常会使用到以下几种萃取溶剂：乙腈、正己烷、酸化乙腈、乙酸乙酯、甲醇、丙酮以及它们的不同比例的混合萃取液。正己烷和乙酸乙酯在萃取含油量高的样本时，由于混合液中含有较高的油脂，从而加大了后续纯化的难度，且EMR-Lipid净化材料适合水溶性提取溶剂的净化，因而除去。作者在前面研究基础上，比较酸化乙腈、乙腈、丙酮、甲醇作为提取溶剂来考察提取效率。按1.2.2和1.2.3节处理样品并上机检测计算回收率。回收率见图7。

从图7可以看出，以丙酮、甲醇作为提取溶剂时，其回收率小于30%；乙腈、酸化乙腈作为提取溶剂都能使活化酯的回收率达到80%以上，且随着酸的加入，回收率增加到92%以上；随着乙腈提取溶液中甲酸体积的增加，阿拉酸式苯的回收率显著

增加，至甲酸体积达到1%之后，即使再增加甲酸的体积，阿拉酸式苯的回收率也不再增加，综合考虑，选择1%甲酸乙腈作为提取溶剂。

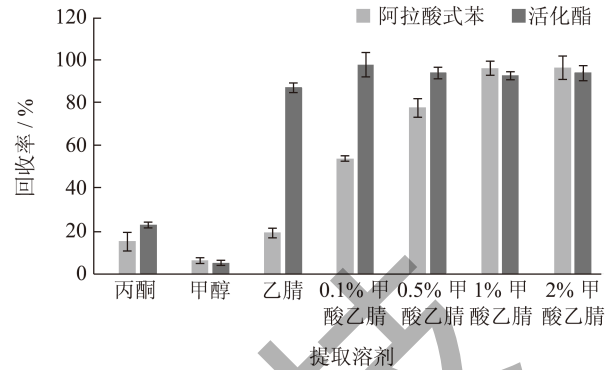


图7 不同提取溶剂对活化酯和阿拉酸式苯的提取效率

Fig.7 Extraction efficiencies of Acibenzolar-S-methyl and Acibenzolar acid in different extraction solvents

表2 活化酯和阿拉酸式苯的线性方程、相关系数、基质效应、平均回收率和相对标准偏差

Table 2 Calibration curve, correlation coefficient, matrix effects, recoveries and relative standard deviations (RSDs) of Acibenzolar-S-methyl and Acibenzolar acid (n=6)

基质	化合物	线性方程	R ²	基质效应/%	0.01 mg/kg		0.02 mg/kg		0.1 mg/kg	
					回收率 Rec/%	RSD/%	回收率 Rec/%	RSD/%	回收率 Rec/%	RSD/%
奶粉	阿拉酸式苯	y=16 873x-7 196	0.999	15.4	102.3	3.5	98.2	4.1	104.3	4.7
	活化酯	y=4667x+7 010	0.998	56.8	109.6	5.4	107.3	6.5	105.1	3.9
酸奶	阿拉酸式苯	y=8 726x+6 514	0.997	40.3	91.8	6.9	102.6	3.9	98.3	6.9
	活化酯	y=12 562x-452	0.998	16.4	97.5	5.8	96.8	9.2	95.4	7.5
纯奶	阿拉酸式苯	y=9 354x-3 571	0.996	36.0	100.2	11.5	93.7	6.4	103.7	4.8
	活化酯	y=7 835x+639	0.997	27.4	96.3	3.9	92.4	7.5	106.8	6.3
果奶	阿拉酸式苯	y=8 859x+12 930	0.999	39.4	92.7	7.3	105.8	1.3	100.4	5.8
	活化酯	y=12 856x-6 853	0.997	19.1	99.1	2.4	99.7	6.9	93.6	3.2
奶酪	阿拉酸式苯	y=7 962x+4 123	0.998	45.5	105.7	7.3	104.6	7.3	97.1	1.4
	活化酯	y=9 847x+624	0.999	8.7	106.5	5.2	107.3	4.8	96.3	6.1

2.4 基质效应、标准曲线和定量限

基质效应 (Matrix Effect, ME) 是指由于样本基质与被测物质进行了共同洗脱，从而导致了分析信号的改变。基质效应的主要原因是样品提取物中存在基质或其他干扰，这些杂质通过与目标分析物共洗脱，影响质谱的电离效率^[16,17]。基质的存在会对检测方法的准确性产生极大的影响，ME是由不同的基质组成引起的，并对复杂基质中目标物的检测和定量构成障碍，强烈的基质效应可能导致显著的定量失真^[18,19]。此外，即使样品中没有共洗脱物质，流动相中存在的微量杂质也可以显著改变分析物的

峰值。基质效应不能完全消除，但可通过解决校准技术来最小化基质效应^[20]。配制溶剂标准溶液和与之相同浓度的基质标准溶液，一同进行上机检测，并利用线性拟合计算出斜率，以此来评估方法的基质影响，用η表示基质效应系数： $\eta = (\text{基质匹配标准曲线的斜率} - \text{溶剂标准曲线的斜率}) / \text{溶剂标准曲线的斜率} \times 100\%$ 。当 $|\eta| < 10\%$ ，基质效应不显著；相反，会产生显著的基质加强或削弱效应^[21]。按1.2节处理空白试样 ($S/N < 3$) 获得空白基体萃取液，按1.2节分别配制溶剂标准溶液和与之浓度相同的基质匹配标准溶液，以质量浓度 (x , ng/mL) 为横

坐标, 以对应的峰面积为纵坐标 (y), 绘制校准曲线。由表 2 可知: 活化酯和阿拉酸式苯的基质效应明显, 且差异巨大, 整体表现为基质减弱效应, 其中阿拉酸式苯的基质减弱效应可达 45.5%; 活化酯的基质减弱效应可达到 56.8%。鉴于此, 本实验采用基质匹配校准曲线。

以奶粉、酸奶、纯奶、果奶、奶酪空白样品添加目标物色谱相应值为 $S/N \geq 3$ 的添加浓度为方法检出限 (LOD), 目标物色谱相应值 $S/N \geq 10$ 的添加浓度为方法定量限 (LOQ)。结果表明, 目标物在 1~30 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数均 > 0.996, 本方法的 LOD 均为 0.003 mg/kg, LOQ 均为 0.01 mg/kg。

2.5 回收率及精密度实验

依 1.2.2 和 1.2.3 节, 对乳及乳制品样品进行前处理及上机检测, 选择 $S/N < 3$, 且不含活化酯和阿拉酸式苯的样品作为空白, 以 0.01、0.02 和 0.1 mg/kg 为加标水平, 进行添加回收。所有样品添加活化酯和阿拉酸式苯标准溶液后, 静置 30 min, 待样品充分吸收药物后, 同样按照 1.2.2 和 1.2.3 节条件对样品进行处理和测定, 每个水平重复 6 次。由表 2 可知: 阿拉酸式苯的平均回收率为 91.8%~107.3%, 相对标准偏差为 1.3%~9.2%; 活化酯的平均回收率为 92.4%~109.6%, 相对标准偏差为 1.4%~11.5%。

2.6 质控及实际样品测定

采用本方法对乳及乳制品中活化酯和阿拉酸式苯质控样品进行检测, 通过测定具有特性值和不确定度的质控样品, 来对检测方法进行验证。所用质控样品活化酯特性值及不确定度分别为 (0.563 ± 0.045) mg/kg, 能力评定标准差为 0.073 2 mg/kg; 阿拉酸式苯特性值及不确定度分别为 (0.835 ± 0.075) mg/kg, 能力评定标准差为 0.117 mg/kg。质控样品平行测定 3 次, 取平均值得: 活化酯 0.541 mg/kg, 阿拉酸式苯 0.821 mg/kg, 采用稳健统计方法计算的 z 值分别为 0.3 和 -0.1。所得 $|z| < 2$, 说明检测结果为满意, 证明本方法能够准确检测乳及乳制品中的活化酯和阿拉酸式苯。采用本方法对市售的 10 种乳及乳制品共计 30 份样品进行活化酯和阿拉酸式苯含量检测。结果显示, 所测样品均未检出活化酯和阿拉酸式苯。为了更好的监控乳制品质量安全, 需要持续检测乳及乳制品中的活化酯和阿拉酸式苯含量。

3 结论

本研究以酸性乙腈为萃取溶剂, 通过 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 对样品进行纯化, 并对液质联用技术进行优化, 实现了对乳及乳制品中活化酯和阿拉酸式苯两种不同类型药物含量的高效液相色谱-三重四级杆质谱分析方法检测。方法灵敏度高、普适性强, 为乳及乳制品风险的有效预防提供了一种有效、可靠的分析检测手段。

参考文献

- [1] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 86412, Acibenzolar-S-Methyl [EB/OL]. (2005-08-08)[2023-02-11]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acibenzolar-S-Methyl>.
- [2] 化源网.阿拉酸式苯-S-甲基(活化酯)[EB/OL].(2023-01-01) [2023-02-11].https://www.chemsrc.com/cas/135158-54-2_122330.html.
- [3] docbook-pesticides, Acibenzolar-s-methyl[EB/OL]. (2021-05-02) [2023-02-11]. http://www.9ele.com/pesticides_cn/Acibenzolar-s_methyl.html.
- [4] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 10921109, 1,2,3-Benzothiadiazole-7-carboxylic acid [EB/OL]. (2006-10-26) [2023-02-11]. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2_3-Benzothiadiazole-7-carboxylic-acid.
- [5] Chemical Book(2023).CAS数据库列表,阿拉酸式苯[EB/OL]. (2022-11-08) [2023-02-11]. https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_CN_CB0413318.htm.
- [6] 鲁伶兰,马颖,赵春江,等.植物生长调节剂活化酯的合成[J].天津化工,2010,24(3):34-37.
- [7] 翟智卫.植物诱抗剂活化酯的研究[J].洛阳理工学院学报(自然科学版),2012,22(3):10-15.
- [8] 崔淑华.一种含吡唑磺菌胺与活化酯的杀菌组合物及应用:中国,CN104365619A[P].2015-02-25.
- [9] 陈龙弟.活化酯和苯氧喹啉复配杀虫悬浮剂:中国,CN103734149A[P].2014-04-23.
- [10] GB 23200.8-2016,食品安全国家标准水果和蔬菜中500种农药及相关化学品残留量的测定气相色谱-质谱法[S].
- [11] GB 23200.13-2016,食品安全国家标准茶叶中448种农药及相关化学品残留量的测定液相色谱-质谱法[S].
- [12] Food and Agriculture Organization of the United Nations. List of Pesticides evaluated by JMPR and JMPS [EB/OL]. [2023-01-22]. https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report2016/ACIBENZOLAR-S-METHYL.pdf.

- [13] Food and Agriculture Organization of the United Nations. List of Pesticides evaluated by JMPR and JMPS [EB/OL]. [2023-01-14]. https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation2016/ACIBENZOLAR-S-METHYL.pdf.
- [14] CAC/GL 90-2017, Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed [S]. FAO/WHO Codex Alimentarius International Food Standards, Accessed on June 27, 2018.
- [15] 王东斌,汪春明.QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定粮谷中啶磺草胺的残留[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(9):3799-3806.
- [16] KIM S H, LEE Y H, JEONG M J, et al. LC-MS/MS method minimizing matrix effect for the analysis of bifenthrin and butachlor in Chinese chives and its application for residual study [J]. Foods, 2023, 12(8): 1683.
- [17] CHOI S, SHIM W S, YOON J, et al. Method development and validation for the simultaneous quantitation of pentoxifylline, its pharmacologically active metabolites, and donepezil using LC-MS/MS in rat plasma: its application to a pharmacokinetic study [J]. Separations, 2023, 10(5): 276.
- [18] DAMALE R D, DUTTA A, SHAIKH N, et al. Multiresidue analysis of pesticides in four different pomegranate cultivars: Investigating matrix effect variability by GC-MS/MS and LC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2023, 407: 135179.
- [19] TSANTAS P, BEMPELOU E, DOULA M, et al. Validation and simultaneous monitoring of 311 pesticide residues in loamy sand agricultural soils by LC-MS/MS and GC-MS/MS, combined with QuEChERS-based extraction [J]. Molecules, 2023, 28(11): 4268.
- [20] KANRAR B, GHOSH P, KHAN P, et al. Alternative strategies for the calibration and elimination of matrix effects in LC-MS/MS multiresidue analysis of tea matrix [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2022, 77(2): 224-234.
- [21] ZHU Y L, LIU X G, XU J, et al. Simultaneous determination of spirotetramat and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography. A, 2013, 1299: 71-77.