

高效液相色谱质谱法测定动物源食品中咪唑菌酮及其代谢物的残留量

黄秀丽, 宁焕焱, 黄飞, 陈嘉聪, 梁绍成, 胡昆, 奉夏平
(广东省惠州市质量计量监督检测所, 广东惠州 516003)

摘要: 建立了采用高效液相色谱串联质谱仪测定动物源食品中咪唑菌酮及其代谢物 5-甲基-5-苯基-2,4-咪唑烷二酮(MPID)残留量的分析方法。样品经乙腈提取, 固相萃取苯乙烯二乙烯苯共聚物小柱、活性炭柱净化, C_{18} 色谱柱分离, 以乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵甲醇水 (V:V=40:60) 溶液为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾正离子 (ESI⁺) 模式电离, 多反应选择离子 (MRM) 检测。结果表明: 咪唑菌酮在 0.05~0.8 $\mu\text{g/mL}$, MPID 在 0.5~8.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈现良好的线性关系, 相关系数 (r^2) 均大于 0.999。在此范围内两者的加标回收率为 82.09~109.16%, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.46~7.89%, 咪唑菌酮检测限为 2.0 $\mu\text{g/kg}$, MPID 检测限为 20.0 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法简便快捷, 且能消除样品中色素等杂质的干扰, 具有较高的准确度和精密度, 适用于动物源食品中咪唑菌酮及其代谢物 MPID 残留量的测定。

关键词: 高效液相色谱串联质谱; 动物源食品; 咪唑菌酮; 残留量

文章编号: 1673-9078(2013)11-2767-2771

Determination of the Residues of Fenamidone and MPID in Animal Source Foods by HPLC-MS

HUANG Xiu-li, NING Huan-yan, HUANG Fei, CHEN Jia-cong, LIANG Shao-cheng, HU Kun, FENG Xia-ping
(Huizhou Quality and Measuring Supervision Testing Institute, Huizhou 516003, China)

Abstract: The samples were extracted with acetonitrile, purified by activated PS-DVB and carbon column, and analyzed on C_{18} column by using a gradient elution using acetonitrile (A)- 5 mmol/L ammonium acetate methanol aqueous solution (B) (V:V=40:60) as mobile phase. The calibration curve presented a good linear relationship between the peak areas and concentrations in the range of 0.05~0.8 $\mu\text{g/mL}$ fenamidone and 0.5~8.0 $\mu\text{g/mL}$ MPID, with correlation coefficients more than 0.999. The average recoveries of standard addition at this concentration level ranged from 82.09% to 109.16%, and the relative standard deviation (RSD) was in the range of 2.46% to 7.89%. The limits of quantification of fenamidone and MPID in animal source foods were 2.0 $\mu\text{g/kg}$ and 20.0 $\mu\text{g/kg}$. It was suitable for determination of fenamidone and MPID residues in animal source foods with high sensitivity and selectivity.

Key words: high performance liquid chromatography-mass spectrometry; animal source foods; fenamidone; residues

咪唑菌酮是一种新型咪唑酮类农药, 被广泛应用于各种农作物霜霉病、疫病和梨黑痂病等病害及虫害的控制^[1-3]。禽畜摄入被该农药污染的饲料, 会在其体内蓄积, 并有可能部分转化为其代谢物 MPID(5-甲基-5-苯基-2,4-咪唑烷二酮), 尤其是在动物的脂肪、肝、肾等组织中残留量较高, 进而对人体造成危害。日本“肯定列表制度”中规定禽畜产品包括牛、羊肉、脂肪、肝脏、肾脏等的最大残留限量为 0.1 mg/kg 。目前,

收稿日期: 2013-06-19

基金项目: 广东省惠州市质量技术监督局科技立项项目 (HZJZ2012010)

作者简介: 黄秀丽 (1978), 女, 博士, 工程师, 研究方向: 食品检测技术研究与开发

通讯作者: 奉夏平 (1975), 男, 工程师, 研究方向: 食品分析与检测

国内尚无动物源食品中咪唑菌酮最高允许残留限量的规定, 更无相应的检测标准出台。

咪唑菌酮在国外市场的使用较多, 已在世界上许多国家登记, 预计在我国使用范围也会逐步扩大。随着该农药使用量及范围的加大, 其在动物源食品中的残留以及对人类健康带来的危害也越来越为人们所关注^[4-10]。为了对动物源食品中咪唑菌酮残留量进行监测, 以确保产品的质量安全, 建立一种简便、准确、高灵敏度分析动物源食品中咪唑菌酮残留量的检测方法具有非常重要的意义。

日本肯定列表 JAP-101 中规定了采用气相色谱-质谱法对禽畜产品中的咪唑菌酮及其代谢物 MPID 进行测定的方法, 可以在 13 min 内完成分析^[11]。本研究

对动物源性食品中咪唑菌酮及其代谢物 MPID 的提取与净化方法进行了系统研究, 并对高效液相色谱与质谱条件进行了选择及优化, 建立了一种快速、高灵敏度、可广泛应用于动物源性食品中咪唑菌酮及其代谢物 MPID 残留量测定的液相色谱-质谱联用方法体系。该方法不仅前处理方法简便, 而且 7 min 内便可完成咪唑菌酮及 MPID 的测定, 大大的提高了检测效率。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

丙酮、正己烷、乙酸乙酯均为分析纯, 无水硫酸钠, 购于广州化学试剂厂; 活性炭小柱 (SupelcleanTM ENVITM-Carb SPE Tubes, 3 mL, 0.25 g), 苯乙烯二乙烯苯共聚物小柱 (PS 聚苯乙稀二乙烯基苯柱, 6 mL, 0.5 g), 购于广州市华馨科学仪器有限公司。咪唑菌酮标准品含咪唑菌酮 99% 以上 (熔点为 137 °C), MPID 标准品含 MPID 99% 以上, 购于德国 Dr Ehrenstorser GmbH 公司; 用乙腈将咪唑菌酮、MPID 分别配制成浓度为 100 mg/L 标准储备液。根据需要, 移取一定量标准储备液配制成系列标准工作液。

液相色谱仪: 岛津 LC-30 系列, 日本岛津公司; 质谱仪: API 4000 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Analyst 1.6 数据处理系统, 美国应用生物系统公司 (ABI); 平行蒸发仪: 瑞士 BUCHI; 超纯水仪: 美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

取肌肉、脂肪、肝脏、肾脏和其他可食部分搅碎、混合均匀后备用。牛奶样品加入三氯乙酸溶液后超声 10 min 过滤去除蛋白质。

1.2.2 样品制备

称取搅碎或混合均匀后的样品 5.0 g (精确至 0.001 g), 加 50 mL 乙腈、50 mL 乙腈饱和正己烷和 10 g 无水硫酸钠, 均质 3 min 后, 以 4000 r/min 离心分离 5 min, 收集乙腈层。按上述方法用乙腈重复提取两次, 合并乙腈层。40 °C 以下浓缩, 除去溶剂, 残留物中加入 5 mL 甲醇溶解。

1.2.3 样品净化

苯乙烯二乙烯苯共聚物小柱 (500 mg) 用 5 mL 甲醇和 5 mL 去离子水淋洗柱子, 舍弃淋洗液。注入 1.2.2 提取后的溶液, 用 15 mL 甲醇淋洗柱子, 收集全部流出液。活性炭小柱用 5 mL 甲醇淋洗, 舍弃淋洗液。注入苯乙烯二乙烯苯共聚物小柱流出液, 用 15 mL 甲醇

淋洗柱子, 收集全部流出液。40 °C 以下浓缩至近干, 用丙酮溶解残留物, 准确定容至 1 mL, 过 0.45 μm 有机滤膜作为待测溶液。

1.2.4 色谱、质谱条件

1.2.4.1 液相色谱条件

色谱柱: ZORBAX Extend C₁₈ 柱 (4.6×150 mm×5 μm); 流动相: 乙腈 (A) -5mmol/L 乙酸铵甲醇水 (V:V=40:60) 溶液, 梯度洗脱 (程序见表 1); 柱温为 35 °C; 进样量为 4 μL。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0.0	0.4	20	80
1.5	0.4	80	20
3.0	0.4	40	60
7.0	0.4	40	60

1.2.4.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI+); 检测方式: 多反应选择离子检测; 碰撞气 (CAD) 为 6 psi; 气帘气 (CUR) 为 24 psi; 雾化气 (GS1) 为 60 psi; 辅助加热器 (GS2) 为 60 psi; 喷雾电压 (IS) 为 5500 V; 离子源温度 (TEM) 为 500 °C。多反应监测各离子对及各优化参数见表 2。

表 2 咪唑菌酮和 MPID 的多反应监测质谱参数

化合物	母离子	子离子	锥孔电压/V	碰撞电压/V
咪唑菌酮	312	236.10*	60	25
		211.1	60	20
MPID	282	120.00*	75	25
		92	75	35

注: “*” 为定量离子 (Quantitative ion)。

2 结果与讨论

2.1 提取与净化条件的优化

咪唑菌酮和 MPID 在水中的溶解度很低, 可溶于乙腈、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等有机溶剂。对于动物源性样品, 丙酮、乙酸乙酯会提取较多的脂肪, 加大了后期的净化难度。乙腈比丙酮容易浓缩、转溶。综合考虑, 用乙腈提取是较佳的选择。提取液中还加入正己烷以去除样品中脂肪类基质的干扰。

此外, 还应用固相萃取技术对提取液进行净化, 以去除样品中的色素、蛋白质及其他动物性杂质。苯乙烯二乙烯苯共聚物小柱可有效去除样品中蛋白质类基质的干扰, 活性炭小柱可有效去除样品中色素等杂

质的干扰。提取液经两次过柱净化后,可满足 HPLC-MS/MS 的分析要求,且两者对咪唑菌酮和 MPID 的吸附少、容易洗脱,回收率高。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

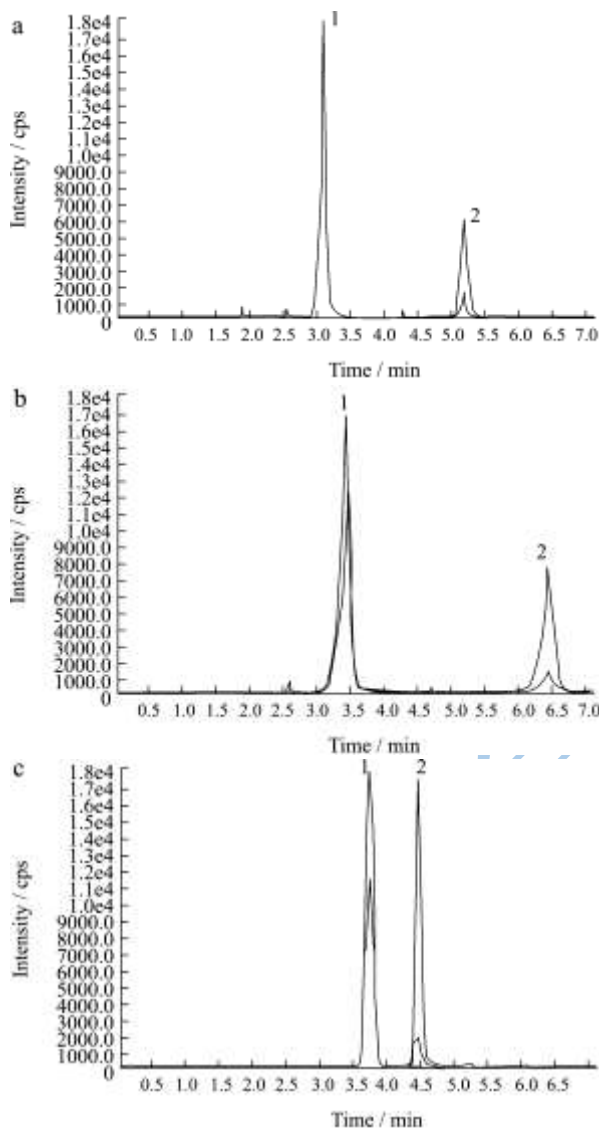


图1 色谱柱的选择

Fig.1 The selection of chromatography column

注: a: Thermo HYPERSIL BDS-2 Column, b: Thermo HYPERSIL ODS-2 Column, c: Agilent ZORBAX Extend Column.

本实验比较了 Thermo HYPERSIL BDS-2 Column (2.1×100 mm×5 μm); Thermo HYPERSIL ODS-2 Column(4.6×150 mm×5 μm); Agilent ZORBAX Extend Column(4.6×150 mm×5 μm) 三种柱子,见图1。发现以 Agilent ZORBAX Extend 柱对咪唑菌酮、MPID 的保留性、灵敏度和峰型表现出明显的优势。最终选

择以 Agilent ZORBAX Extend 色谱柱为分离柱。

2.2.2 流动相的选择

比较了甲醇-水、乙腈-水、以及乙腈-5 mmol/L 乙酸铵甲醇水 (V:V=40:60) 溶液作为流动相系统的洗脱效果,发现甲醇-水对咪唑菌酮的洗脱效果不佳,而乙腈-水对 MPID 的洗脱效果不佳,故最终采用乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵甲醇水 (V:V=40:60) 溶液为流动相进行梯度洗脱,咪唑菌酮及 MPID 峰型尖锐对称,7 min 内就能完成检测,大大提高了检测效率,且目标峰没有基质干扰,如图2所示。

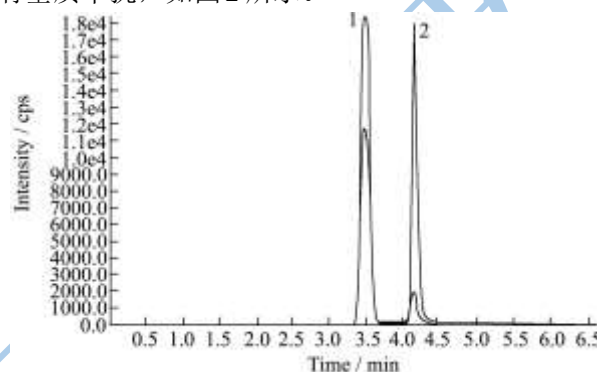


图2 咪唑菌酮 (0.8 μg/mL)、MPID (8.0 μg/mL) 的 LC-MS/MS 图谱

Fig.2 Chromatogram and spectra of 0.8 μg/mL fenamidone and 0.8 μg/mL MPI

注: 1: MPID; 2: 咪唑菌酮。

2.3 质谱条件的优化

本实验首先采用采用 0.8 μg/mL 咪唑菌酮和 8.0 μg/mL MPID 的混合标准溶液,以蠕动泵样方式在电喷雾正离子模式下进行母离子全扫描,找出准确的分子离子作为母离子,然后以分子离子为母离子对其子离子进行全扫描,最后选取丰度较强的 2 个子离子,优化其锥孔电压、碰撞能量等质谱参数。选取丰度较大并且响应稳定的来做定量离子。

2.4 标准曲线、线性范围及检出限

在确定的色谱条件下对质量浓度为 0.0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2 μg/mL 的咪唑菌酮和 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0 μg/mL MPID 混合标准品分别进行测定,以标准物质的峰面积 (Y) 对其质量浓度 (X, μg/mL) 进行线性回归,绘制标准曲线,如图3所示。结果表明,咪唑菌酮在 0.05~0.8 μg/mL, MPID 在 0.5~8.0 μg/mL 范围内呈良好线性关系,相关系数可达到 0.999。以信噪比 S/N=3 计算咪唑菌酮和 MPID 的检测限,得其结果为咪唑菌酮检测限 2.0 μg/kg, MPID 检测限 20.0 μg/kg。

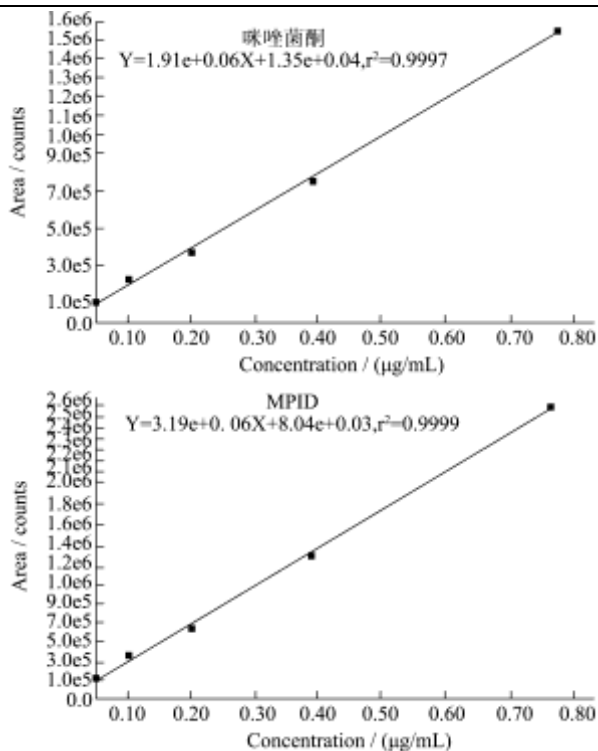


图3 咪唑菌酮、MPID的标准曲线

Fig.3 Calibration curves of fenamidone and MPID

2.5 回收率及精密度分析

在蜂蜜、猪肝、鸡肉、牛肉、鱼肉、虾、牛奶样品中分别添加 0.2、0.4、0.8 µg/mL 的咪唑菌酮和 2.0、4.0、8.0 µg/mL MPID 标液，经上述方法提取、净化处理后进行 HPLC-MS/MS 测定，7 种动物源样品中咪唑

表3 咪唑菌酮在7种动物源食品中的加标回收率及精密度分析 (n=5)

Table 3 Addition recovery and RSD of fenamidone in seven animal source foods (n=5)

Food	Standard concentration of fenamidone / (µg/mL)					
	0.2		0.4		0.8	
	Recovery R/%	RSD Sr/%	Recovery R/%	RSD Sr/%	Recovery R/%	RSD Sr/%
Honey	92.18~109.08	7.20	83.69~100.11	7.89	98.32~107.23	3.29
Pork liver	93.79~103.27	3.76	94.67~108.19	6.36	98.16~105.64	2.70
Chicken	90.33~102.19	5.26	93.21~103.14	3.98	87.67~96.49	3.76
Beef	92.66~109.17	7.02	93.97~100.36	2.46	98.91~107.58	3.23
Fish	93.48~103.59	3.94	94.55~108.84	6.44	98.65~105.47	2.58
Shrimp	90.56~99.85	4.07	93.48~103.27	4.18	87.28~96.55	3.96
Milk	91.24~100.73	4.10	96.97~103.48	2.75	87.59~96.36	3.77

本研究按测量值和真实值计算回收率，5 次重复计算变异系数，咪唑菌酮和 MPID 加标回收率及精密度结果分别见表 3、表 4。咪唑菌酮和 MPID 的平均回收率在 82.09~109.16%，相对标准偏差(RSD)为 2.46~7.89%，符合残留检测方法对回收率与精密度的要求。

菌酮和 MPID 的本底值均为 0 mg/kg。猪肝的空白和样品加标的高效液相谱图和质谱图如图 4 所示，结果表明：在此色谱条件下咪唑菌酮与 MPID 峰形对称，能够很好的与杂质分离。

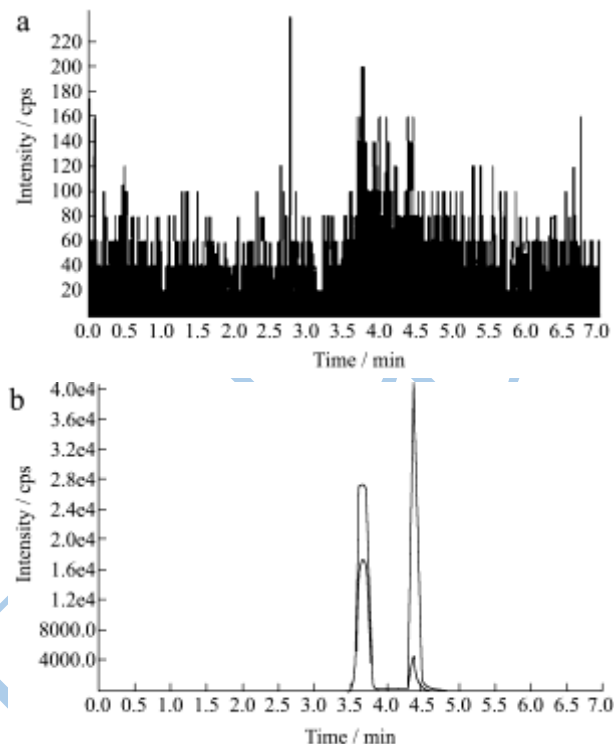


图4 猪肝及猪肝加标的 LC-MS/MS 图谱

Fig.4 Chromatogram and spectra of pork liver standard addition recovery

注：a：猪肝；b：猪肝加标。

2.6 实际样品测试

为了验证本方法的可行性，分别从批发市场、超市和商店购买了不同品牌的蜂蜜、牛奶，以及鱼肉、牛肉、猪肉、鸡肉、鸭肉和虾 8 种共 36 个样品。运用本文建立的 HPLC-MS/MS 分析方法，对样品进行处

理并测定其中咪唑菌酮和 MPID 的含量。结果表明， 所测样品中均未检出该两种物质。

表 4 MPID 在 7 种动物源食品中的加标回收率及精密度分析 (n=5)

Table 4 Addition recovery and RSD of MPID in seven animal source foods (n=5)

Food	Standards concentration of MPID / (μg/mL)					
	2.0		4.0		8.0	
	Recovery R/%	RSD Sr/%	Recovery R/%	RSD Sr/%	Recovery R/%	RSD Sr/%
Honey	83.81~98.65	7.20	83.69~100.11	7.89	98.32~107.23	3.29
Pork liver	86.17~98.58	3.76	94.67~108.19	6.36	98.16~105.64	2.70
Chicken	82.68~99.46	5.26	93.21~103.14	3.98	87.67~96.49	3.76
Beef	83.98~98.19	7.02	93.97~100.36	2.46	98.91~107.58	3.23
Fish	86.30~98.27	3.94	94.55~108.84	6.44	98.65~105.47	2.58
Shrimp	86.74~99.68	4.07	93.48~103.27	4.18	87.28~96.55	3.96
Milk	89.38~99.95	4.10	96.97~103.48	2.75	87.59~96.36	3.77

3 结论

通过对样品前处理条件的优化，建立了对动物源食品中咪唑菌酮及其代谢物 MPID 残留量检测的 HPLC-MS/MS 方法。该方法线性范围宽，灵敏度高，检测结果准确，咪唑菌酮检测限可达到 2.0 μg/kg，MPID 检测限可达到 20.0 μg/kg，能满足动物源食品中咪唑菌酮和 MPID 定性、定量检测要求。

参考文献

[1] 赵卫光,刘桂龙,王素化,等.新型稻田杀菌剂咪唑菌酮[J].农药,2003,42(10):47-48
Zhao W G, Liu G L, Wang S H, et al. New rice paddies fungicide fenamidone [J]. Pesticide, 2003, 42(10): 47-48

[2] 朱保昆,廖予琦,蒋举兴,等.烟草中“噁唑菌酮”和“咪唑菌酮”的残留分析[J].烟草科技,2012,297:56-59,66
Zhu B K, Liao Y Q, Jiang J X, et al. Famoxadone and fenamidone residual analysis in tobacco [J]. Tobacco science and technology, 2012, 297:56-59,66

[3] 郝征红,邓立刚,赵平娟.反相高效液相色谱法测定土壤中的咪唑菌酮及其残留[J].农药,2007,46(6):261-262, 268
He Z H, Deng L G, Zhao P J, et al. Determination of fenamidone in the soil by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Pesticide, 2007,46(6): 261-262, 268

[4] Alberto A, Luciano P, and Fabrizio D. Determination of famoxadone, fenamidone, fenhexamid and iprodione residues in greenhouse tomatoes [J]. Pest Management Science, 2012, 68: 543-547

[5] Rosa M, González R, Beatriz C G, 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

[6] Kaushik B, Dasharath P O, Soma D, et al. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of chromatography A, 2007, 1173: 98-109

[7] Bernhard M H. Method development for the determination of 52 pesticides in tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216: 8953-8959

[8] 黄江锐,孔祥虹,姚秉华,等.气相色谱-三重四级杆串联质谱法测定蔓越橘提取物中的 88 种农药残留[J].色谱,2011, 29:974-982
Huang J R, Kong X H, Yao B H, et al. Determination of the 88 kinds pesticide residues of of cranberry extraction by GC-MS/MS [J]. Chin. J. Chromatogr., 2011, 29: 974-982

[9] 成云峰,编译.温室番茄中噁唑菌酮、咪唑菌酮、环酰菌胺及异菌脲残留的检测[J].世界农药,2013,35(1):40-43
Cheng Y F compile. Determination of famoxadone, fenamidone ,ring acyl amine and the urea residue in greenhouse tomatoes [J]. Pesticides of the world, 2013, 35(1): 40-43

[10] Abreu SDM, Herbert P, Caboni P, et al. Validation and global uncertainty of a gas chromatographic with mass spectrometry method for fenamidone analysis in grapes and wines [J]. Journal of Environment Science and Health Part B, 2007, 42(7): 817-822

[11] <http://down.foodmate.net/standard/sort/13/10324.html>. JAP-101 咪唑菌酮检测方法(畜产品)

<http://down.foodmate.net/standard/sort/13/10324.html>. JAP-101 Determination of fenamidone (Animal source products)

现代食品科技