

实验技术与方法

液相色谱-串联质谱法测定水果中6种植物生长调节剂残留量

王炼, 骆春迎, 张礼春, 余辉菊

(成都市疾病预防控制中心, 四川 成都 610041)

摘要:目的 研究同位素内标-液相色谱-串联质谱测定水果中6种植物生长调节剂的方法。方法 样品经含1%乙酸的乙腈提取,采用Welch Xtimate C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3 μm),乙腈-0.01%氨水(含2 mmol/L乙酸铵)为流动相,梯度洗脱,多反应离子监测(MRM)模式,分段ESI+与ESI-扫描方式检测。结果 0.6、10和50 μg/kg三个浓度的样品加标试验,回收率为80.1%~115.0%,相对标准偏差为4.3%~9.9%,定量限和检出限分别在0.2~4.0和0.06~1.5 μg/kg。结论 建立的分析方法简便、准确、灵敏,满足食品中农药最大残留限量要求。

关键词:液相色谱-串联质谱;水果;植物生长调节剂;农药残留;食品污染物

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)04-0451-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.04.009

Determination of 6 plant growth regulator residues in fruits by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Lian, LUO Chun-ying, ZHANG Li-chun, YU Hui-ju

(Chengdu Centre for Disease Control and Prevention, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination of 6 plant growth regulator residues in fruits by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the isotope internal standard. **Methods** The sample was extracted by acetic acid in acetonitrile and homogenized. After dehydration reagent treatment, the sample was centrifugated and cleaned-up by dispersive solid phase extraction tube. The supernatant was detected by vortex mixing and centrifugation. The conditions of elution for mobile phase and analysis for mass spectrometry were optimized. **Results** The recovery test of the spiked sample was used with 3 concentrations, 0.6, 10 and 50 μg/kg. The spiked sample recoveries were at 80.1% - 115.0% and the relative standard deviations of detection were at 4.3% - 9.9%. The limits of quantification and detection were 0.2-4.0 and 0.06-1.5 μg/kg. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive and it can meet the determination requirements of pesticide residues in foods.

Key words: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; fruit; plant growth regulator; pesticide residue; food contaminants

水果是日常生活必不可少的食物,含丰富的维生素和微量元素。植物生长调节剂是一类具有植物激素活性的人工合成农药,可调节作物的生理和代谢,在水果生产中应用广泛,已成为增加产量和改善品质的重要手段^[1]。但有研究表明,植物生长调节剂的大量使用会对人体的血液、肝脏、肾脏造成危害^[2],因此国际上较多国家都根据其毒性大小对限量做了严格规定^[3-5]。目前,植物生长调节剂的检测方法主要有太赫兹光谱法^[6]、高效液相色谱法^[7]、气相色谱-质谱法^[8]、液相色谱-质谱法^[9-10]。太赫兹光谱法由于仪器普及低,方法不容易推广;色谱法简便、快速,准确

度高,但定性能力相对较弱;质谱法灵敏、定性定量能力强,是目前测定这类化合物普遍采用的方法,比较而言,气相色谱-质谱法需要衍生化反应,相对繁琐,液相色谱-质谱法更便捷。本试验在《2015年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册》^[11]中水果中植物生长调节剂残留量测定的标准操作程序(以下简称手册方法)基础上,加入2种分析物的同位素内标,优化了分析物的色谱和质谱条件,建立了6种植物生长调节剂残留量的检测方法,相对于手册方法,更为灵敏和准确,应用于水果中植物生长调节剂的检测,效果理想。

收稿日期:2016-01-07

基金项目:中国博士后面上项目(2012M521703)

作者简介:王炼 男 副主任技师 研究方向为有机污染物残留分析

E-mail:septwolvesnjwl@163.com

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Ultimate DGP-3600 高效液相色谱-AB Sciex

QTrap3200 串联质谱仪(美国 ThermoFisher-美国 AB Sciex)、全自动均质器、涡旋混匀器、离心机、2 ml 分散固相萃取管(每管含 25 mg C_{18} 和 150 mg 无水硫酸镁,美国 Agilent)。

噻苯隆(CAS: 51707-55-2)、氯吡脞(CAS: 68157-60-8)、多效唑(CAS: 76738-62-0)、2,4-D(CAS:94-75-7)、4-氯苯氧乙酸(CAS:122-88-3)、赤霉素(CAS: 77-06-5)标准品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH, 2,4-D- $^{13}C_6$ (CAS: 150907-52-1, 美国 Cambridge Isotope Laboratories), 氯吡脞- D_5 (CAS: 1398065-87-6, 加拿大 Toronto Research Chemicals); 乙腈为色谱纯, 乙酸铵和氨水($\geq 25\%$)为 HPLC 级, 无水硫酸镁、醋酸钠为分析纯, 所有试验用水为 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》^[12]规定的一级水。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

称取捣碎样品 10.00 g(不去皮)于 50 ml 离心管中,加入 20 μ l 混合内标溶液(含 2 种内标各 1.0 μ g/ml),加入 10 ml 含 1% 乙酸的乙腈溶液,匀浆 2 min,加入 6 g 无水硫酸镁和 1.5 g 醋酸钠脱水,涡旋振荡 1 min,以 10 000 r/min 离心 3 min,取 1.5 ml 上清液于分散固相萃取管(含 25 mg C_{18} 和 150 mg 无水硫酸镁)中,涡旋混匀 1 min 后于 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液经 0.22 μ m 有机滤膜过滤后测定。内标法定量。

1.2.2 标准曲线的制作

6 种分析物和 2 种内标物用乙腈配制成

1.0 mg/ml 的储备液。用流动相作为溶剂配制 5 个点的混合标准应用液,分析物浓度分别为 1、5、10、20 和 50 ng/ml(考虑到灵敏度差异,噻苯隆和氯吡脞浓度分别为 0.1、0.5、1、2 和 5 ng/ml,赤霉素的浓度分别为 10、50、100、200 和 500 ng/ml),以上每个标准应用液中 2 种内标的浓度均为 20 ng/ml。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:采用 Welch Xtimate C_{18} 色谱柱柱(2.1 mm \times 100 mm, 3 μ m);柱温 40 $^{\circ}C$;进样量 20 μ l;流动相:A 为乙腈,B 为 0.01% 氨水(含 2 mmol/L 乙酸铵);流速 300 μ l/min;流动相梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0~1.5	3	97
1.5~1.6	60	40
1.6~5.5	95	5
5.5~5.6	3	97
5.6~8.0	3	97

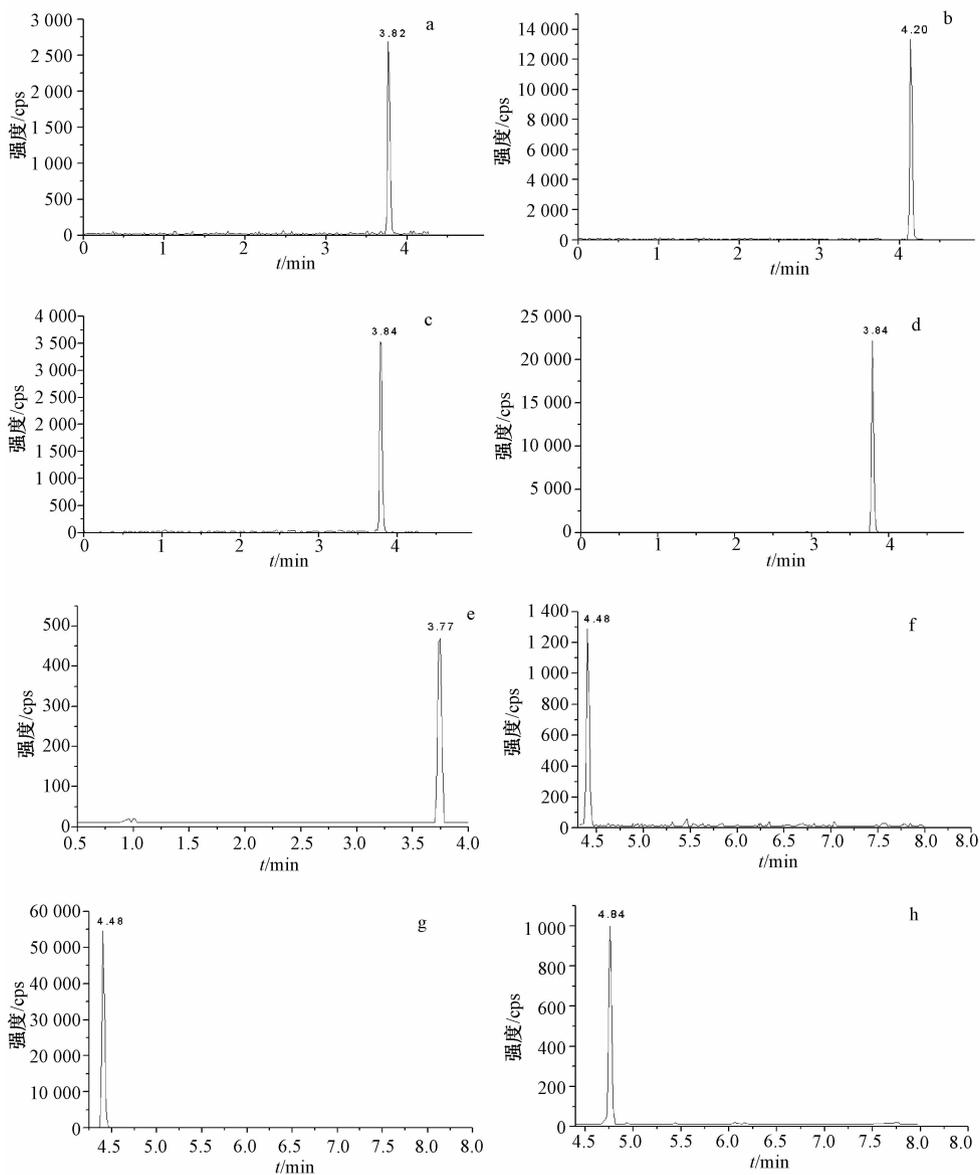
质谱条件:离子源及扫描方式:ESI-(0~4.3 min),ESI+(4.3~8.0 min);气帘气压力(CUR)172.375 kPa;碰撞气压力(CAD)34.475 kPa;离子源电压:5 500 V(ESI+),-4 500 V(ESI-);离子源温度 550 $^{\circ}C$;雾化气压力 344.75 kPa;辅助加热气压力 344.75 kPa;扫描模式:多反应离子监测(MRM),驻留时间 70 ms,MRM 条件见表 2。6 种分析物和 2 种同位素内标的 MRM 图见图 1。

表 2 6 种植物生长调节剂和 2 种内标的 MRM 条件

Table 2 MRM condition of 6 plant growth regulators and 2 internal standards

分析物	电离模式	母离子 /(m/z)	产物离子 /(m/z)	去簇电压 /V	入口电压 /V	碰撞池入口 电压/V	碰撞能量 /eV	碰撞池出口 电压/V
4-氯苯氧乙酸	ESI-	185.0	126.6*	-20	-1.5	-20	-20	-1.5
			140.4	-20	-1.5	-20	-15	-1.5
噻苯隆	ESI-	219.0	99.9*	-30	-1.5	-20	-17	-2.0
			71.8	-30	-1.5	-20	-30	-2.0
赤霉素	ESI-	345.0	220.7*	-35	-5.0	-30	-35	-4.0
			142.4	-35	-5.0	-30	-43	-4.0
2,4-D	ESI-	219.0	160.8*	-20	-3.0	-20	-21	-1.0
			124.8	-18	-2.0	-60	-38	-2.0
氯吡脞	ESI+	248.1	129.0*	30	5.0	15	24	4.0
			155.0	30	5.0	15	20	4.0
多效唑	ESI+	294.1	124.7*	20	3.0	25	48	3.0
			69.3	20	3.0	25	48	3.0
2,4-D- $^{13}C_6$	ESI-	224.8	167.1*	-20	-3.0	-20	-21	-3.0
			131.0	-21	-3.0	-18	-40	-3.0
氯吡脞- D_5	ESI+	253.1	129.0*	40	4.5	10	23	3.0
			155.1	45	4.5	10	21	3.0

注:* 为定量离子



注: a. 4-氯苯氧乙酸; b. 噻苯隆; c. 2,4-D; d. 2,4-D- $^{13}\text{C}_6$; e. 赤霉素; f. 氯吡脞; g. 氯吡脞- D_5 ; h. 多效唑

图1 6种植物生长调节剂和2种内标的MRM图

Figure 1 MRM chromatograms of 6 plant growth regulators and 2 internal standards

2 结果与分析

2.1 样品前处理

文献[9]指出,分散固相萃取技术对于水果中的植物生长调节剂检测的净化快速、高效,并对 $\text{MgSO}_4 + \text{PSA}$ 、 $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18}$ 、 $\text{MgSO}_4 + \text{PSA} + \text{C}_{18}$ 、 $\text{MgSO}_4 + \text{PSA} + \text{GCB}$ 的净化效果进行比较,得出 $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18}$ 净化效果最佳,手册方法^[11]中也采用了 $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18}$ 净化方式。本方法同样采取 $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18}$ 净化方法,图2为使用分散固相萃取管后样品基质的对比情况。

2.2 流动相的选择

手册方法中使用了乙腈-0.01%氨水的流动相,试验中发现2,4-D的峰形不佳,且峰宽达0.8 min,在0.01%氨水中添加2 mmol/L浓度的乙酸铵后,峰形

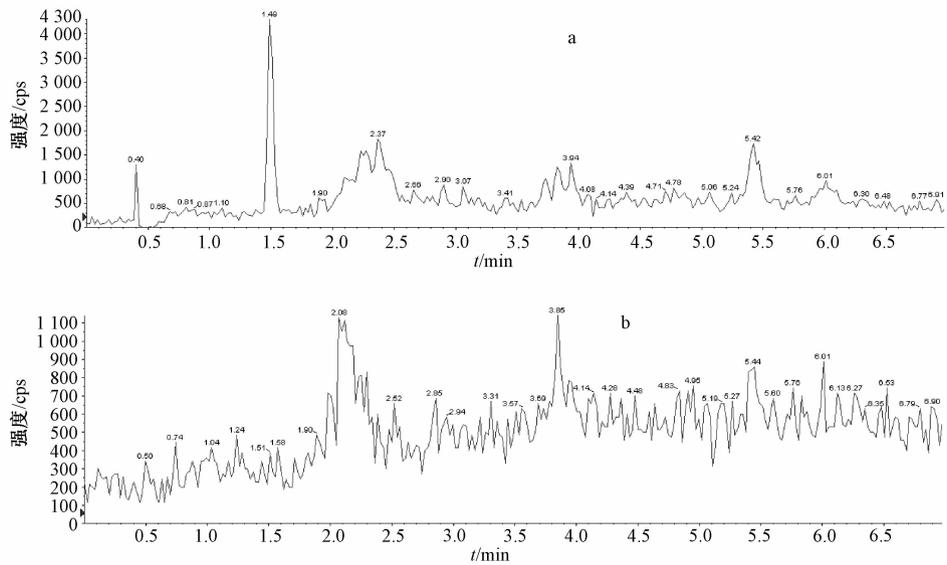
得到明显改善,峰宽仅0.12 min,见图3。试验最终选取乙腈-0.01%氨水(含2 mmol/L)为流动相。

2.3 梯度洗脱条件的优化

由于噻苯隆和氯吡脞在 C_{18} 色谱柱上保留时间接近,且检测时分别采用ESI-和ESI+的电离模式,需要进行电离模式的切换。流动相洗脱条件进行经过反复优化后,确定为8 min的梯度,两种分析物保留时间分别为4.20和4.48 min,可以得到完全分离,ESI-在4.30 min切换为ESI+模式。

2.4 质谱条件的选择

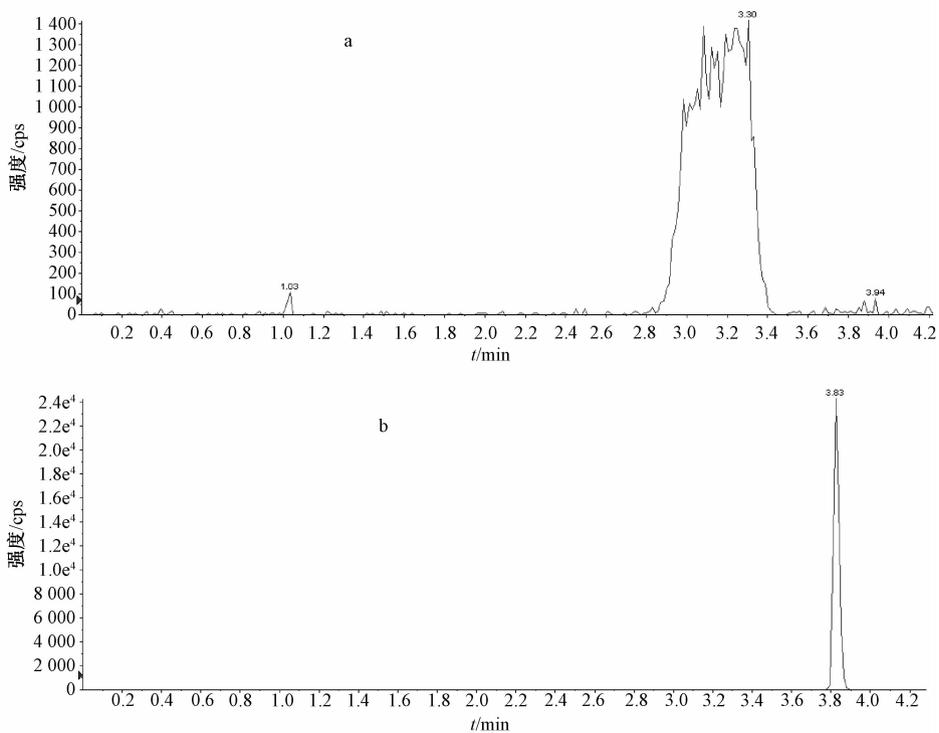
手册方法中氯吡脞采用ESI-电离模式,试验中发现1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液在ESI-模式下, m/z 246.0的前体离子响应值为 2.0×10^5 cps,且只有 m/z 127.0的产物离子响应值相对较高,为



注: a. 未使用分散固相萃取管的基质 MRM 图; b. 使用分散固相萃取管的基质 MRM 图

图2 分散固相萃取管使用前后的基质 MRM 图

Figure 2 MRM chromatograms of the sample matrix before and after the use of dispersive solid phase extraction



注: a. 流动相中无乙酸铵; b. 0.01% 氨水中含 2mmol/L 乙酸铵

图3 乙酸铵对 2,4-D 峰形的影响

Figure 3 Effect of ammonium acetate on the chromatographic peak for 2,4-D

5.0×10^4 cps, 其余产物离子响应值均在 1.0×10^3 cps 以下。当采用 ESI+ 模式时, m/z 为 248.0 的前体离子响应值为 3.0×10^6 cps, 两个相对较高的产物离子 m/z 129.0 和 155.0 的响应值分别为 5.0×10^4 和 2.0×10^4 cps, 经比较, 最终选择 ESI+ 模式检测。此外, 多效唑的产物离子, 经试验发现, m/z 124.7 的离子响应值明显高于 m/z 69.3 的离子, 最终选择前者作为定量离子, 而非手册方法中

的 m/z 69.3 的离子。

2.5 方法有效性

在优化的色谱和质谱条件下, 选择三个浓度水平进行加标回收试验(按 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检验》^[13]), 每个加标水平平行做 6 份, 得到加标回收率为 80.1% ~ 115.0%、相对标准偏差为 4.3% ~ 9.9%, 见表 3。该加标回收率如果用外标法计算, 结果为 30.5% ~

表 3 方法的线性回归方程、相关系数、检出限、定量限、回收率和精密度($n=6$)

Table 3 Regression equations, correlation coefficient, limits of determination, limits of quantification, recoveries of samples and relative standard deviation of the method

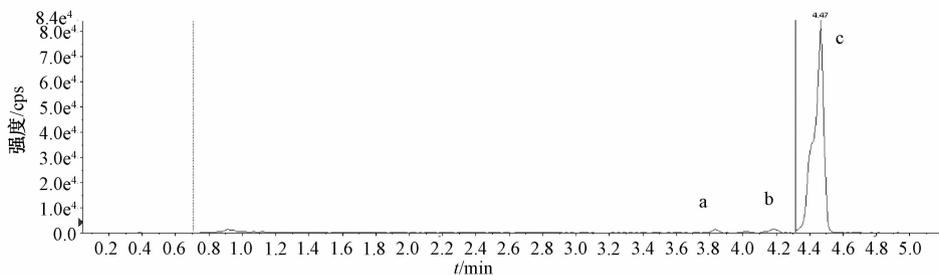
分析物	回归方程	相关系数 r	检出限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/% (RSD/%)		
					0.6/4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ *	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
4-氯苯氧乙酸	$y=0.012x+0.00060$	0.998 2	0.20	0.60	80.1(7.2)	87.3(5.7)	104.0(4.4)
噻苯隆	$y=0.664x+0.061$	0.999 3	0.10	0.30	82.6(8.6)	90.3(7.5)	96.8(6.5)
赤霉素	$y=0.00034x-0.0015$	0.991 4	1.50	4.00	83.1(7.2)	84.5(5.2)	91.9(4.3)
2,4-D	$y=0.050x+0.022$	0.998 4	0.15	0.50	80.4(9.9)	90.9(7.4)	94.6(7.1)
氯吡啶	$y=0.060x+0.00083$	0.999 0	0.06	0.20	96.8(8.6)	108.0(6.8)	110.0(5.5)
多效唑	$y=0.00419x-0.0026$	0.999 4	0.15	0.50	96.1(9.3)	112.5(7.7)	115.0(6.4)

注: * 为赤霉素由于灵敏度较低,选择 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为加标浓度,其余 5 种分析物加标浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$

62.3%。6 种分析物在配置的标准曲线范围内有较好的相关性;用加标回收试验中最低添加浓度的响应值来计算检出限和定量限,以 3 倍信噪比(S/N)所对应的样品中分析物浓度为检出限,以 10 倍信噪比(S/N)所对应的样品中分析物浓度为定量限,得到 6 种分析物检出限在 0.06 ~ 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限在 0.2 ~ 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.6 方法应用

将方法应用于水果中 6 种植物生长调节剂残留量的检测,63 份水果样品(杨梅、草莓、樱桃、葡萄、西瓜、猕猴桃)中有 27 份检出氯吡啶(根据 GB 2763—2014《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[14],1 份葡萄样品超过 0.05 mg/kg 的限量值)、18 份检出 2,4-D、5 份检出噻苯隆,多效唑、4-氯苯氧乙酸和赤霉素未检出。图 4 列举了 1 份样品同时检出了噻苯隆、2,4-D 和氯吡啶。



注: a. 2,4-D; b. 噻苯隆; c. 氯吡啶

图 4 阳性样品的 MRM 图

Figure 4 MRM chromatograms of the positive samples

3 小结

本研究所建立方法在高效液相色谱流动相中加入乙酸铵,与手册方法相比,分析物的峰形得到较大改善;在质谱检测模式方面,采用了分段 ESI+ 与 ESI- 扫描方式,同时,对手册方法的部分监测离子进行了改变,提高了检测灵敏度;此外,采用同位素内标法进行定量,使方法的准确度得到较大提高。方法应用于水果中 6 种常用植物生长调节剂的同时检测,简便、灵敏,满足我国^[14]及国际^[5]对农药残留的检测要求。

参考文献

[1] 史晓梅,金芬,黄玉婷,等. 水果中常用植物生长调节剂的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(4):417-422,426.
 [2] 徐宜宏,蒋施,付海滨,等. 苹果、番茄、玉米中 7 种植物生长调节剂的气相色谱-串联质谱检测方法[J]. 农药,2014,53(2):113-115.
 [3] 于红,鹿毅,王静静,等. HPLC-MS/MS 法测定水果中残留的

多效唑和烯效唑[J]. 新疆农业科学,2011,48(1):187-193.
 [4] 白桦,邱月明,张青. 气相色谱-质谱法测定苹果中多效唑残留量[J]. 分析测试学报,2005,24(4):64-66.
 [5] 金芬,邵华,杨锚. 国内外几种主要植物生长调节剂残留限量标准比较分析[J]. 农业质量标准,2007(6):26-27.
 [6] 张园园,金亮,王果,等. 植物生长调节剂的太赫兹光谱检测与分析[J]. 首都师范大学学报(自然科学版),2014,35(5):23-27.
 [7] 郭红梅,梁唯,吴玖赞,等. 高效液相色谱法测定无核白葡萄赤霉素残留[J]. 中国园艺文摘,2014(11):10-12,17.
 [8] 吴平谷,谭莹,张晶,等. 分级净化结合气相色谱-质谱联用法测定豆芽中 10 种植物生长调节剂[J]. 分析化学,2014,42(6):866-871.
 [9] 黄何何,张缙,徐敦明,等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中 21 种植物生长调节剂残留量[J]. 色谱,2014,32(7):707-716.
 [10] 林涛,邹艳虹,杨旭昆,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄中氯吡啶和噻苯隆残留及消解[J]. 环境化学,2014,33(12):2210-2211.
 [11] 国家食品安全风险评估中心. 2015 年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册[Z]. 北京:国家食品安全风险评估中心,2015.
 [12] 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 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[13] 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 27404—2008 实验室质量控制规范 食

品理化检验[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中华人民共和国农业部. GB 2763—2014 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]. 北京:中国标准出版社,2014.

实验技术与方法

高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中6种抗病毒药物残留量

刘畅, 陈燕, 徐慧, 李晓雯, 迟秋池, 王柯
(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要:目的 建立动物源性食品中金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、奥司他韦、吗啉胍、阿昔洛韦的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测方法。方法 待测样品中的金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、奥司他韦、吗啉胍、阿昔洛韦在醋酸盐缓冲液中经 QuEChERS 提取、净化,采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm),梯度洗脱,在正离子模式下检测。结果 6种抗病毒药物在 0.5~100 μg/kg 范围内线性关系良好,相关系数 $r > 0.992$ 。在猪肉、鸡肉、鱼肉和牛奶中金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚的检出限为 0.1 μg/kg,奥司他韦为 0.3 μg/kg,吗啉胍和阿昔洛韦为 0.5 μg/kg,各化合物的回收率均在 50% 以上,精密度(以相对标准偏差表示)在 0.8%~5.7% 之间($n=6$)。结论 本方法具有前处理简单、快速,灵敏度高优点,可用于畜禽肉中抗病毒类药物残留的定量检测。

关键词: 抗病毒药; 高效液相色谱-串联质谱法; QuEChERS; 动物源性食品; 兽药残留; 违禁药物; 检测

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)04-0456-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.04.010

Determination of 6 antiviral drugs in animal derived food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Chang, CHEN Yan, XU Hui, LI Xiao-wen, CHI Qiu-chi, WANG Ke
(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of amantadine, rimantadine, memantine, oseltamivir, moroxydine and aciclovir in animal derived food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The residues of antiviral drugs in the samples were extracted with buffer (ammonium acetate pH = 4.8). After being cleaned up with QuEChERS, the residues were detected by HPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) via positive ionisation mode. **Results** The limit of detection for amantadine, rimantadine and memantine was 0.1 μg/kg, 0.3 μg/kg for oseltamivir and 0.5 μg/kg for moroxydine and aciclovir. 6 antiviral drugs showed a good linearity over the range of 0.5-100 μg/kg, with $r > 0.992$. The average recoveries at 3 spiked levels were above 50%, while the relative standard deviations (RSDs) were between 0.8%-5.7% ($n=6$). **Conclusion** The method was highly sensitive, accurate and rapid and was suitable for the detection of antiviral drugs in animal derived food.

Key words: Antiviral drugs; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS; animal derived food; veterinary drug residue; illegal drugs; detection

抗病毒药物是一类用于预防和治疗病毒感染的药物。在体外可抑制病毒复制酶,在感染细胞或

动物体内可抑制病毒的复制与繁殖。其中一类抗病毒药物为三环胺类药物,主要包括金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚等^[1-6]。

农业部于 2005 年先后颁布的《兽药地方标准废止目录》(农业部第 560 号)^[7]及《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》(农医发[2005]33 号)^[8]中,均明确规定禁止金刚烷胺、金刚乙胺、利巴韦林等药物的经营和使用。但目前,我国尚无动

收稿日期:2015-10-14

作者简介:刘畅 女 副主任药师 研究方向为食品、药品分析

E-mail: ccchangchang@hotmail.com

通信作者:王柯 男 主任药师 研究方向为食品、药品分析

E-mail: wksifdc@163.com