

## 实验技术与方法

## 固相萃取-气相色谱-质谱联用法测定蔬菜和小麦粉的恶霉灵

蔡柳燕,梁春实,魏树龙,臧金海,马继军

(锦筑(烟台)食品研究开发有限公司,山东烟台 264006)

**摘要:**目的 建立一种应用气相色谱-质谱联用法测定蔬菜、小麦粉、糙米和西瓜中恶霉灵残留量。方法 前处理用乙腈提取,提取液使用固相萃取柱(2 g/10 ml)净化,最终提取液用硅烷化试剂(BSTFA)进行衍生化。气相方法以DB-5ms毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm)处理,质谱选择离子监测模式(SIM)测定。结果 小麦粉和多种蔬菜的恶霉灵在0.010和0.100 mg/kg两个浓度水平的加标回收率范围为63%~101%,不同样品回收率RSD<10%,方法检出限为0.003 mg/kg,定量限为0.005 mg/kg。结论 该方法灵敏度高,重现性好,适用于快速检测蔬菜和um小麦粉的恶霉灵残留量。

**关键词:**恶霉灵;固相萃取;气相色谱-质谱联用法;蔬菜;小麦粉;糙米;西瓜;衍生化;农药残留

中图分类号:R155;O657.63 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)06-0643-03

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.06.009

**Determination of hymexazol residues in vegetables and wheat flour  
by solid phase extraction-gas chromatography tandem-mass spectrometry**

CAI Liu-yan, LIANG Chun-shi, WEI Shu-long, ZANG Jin-hai, MA Ji-jun

(Jinzu (Yantai) Food Research and Development Co. Ltd., Shandong Yantai 264006, China)

**Abstract: Objective** A method for determination of hymexazol in vegetables and wheat flour by SPE-GC-MS was investigated. **Methods** Hymexazol was extracted with acetonitrile. The extracts were purified by SPE (2 g/10 ml) and derivatized with BSTFA. The residues of hymexazol were estimated on a DB-5ms capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) by GC/MS under selected ion monitoring mode. **Results** This method was validated at two different levels of 0.010 and 0.100 mg/kg. Average recoveries obtained from vegetables, wheat flour, brown rice and watermelon samples at two fortified levels were 63%-101% with relative standard deviations (RSD) of less than 10%. Limit of quantitation (LOQ) in these samples were 0.005 mg/kg. **Conclusion** The method was successfully applied to determine hymexazol in vegetable, wheat flour, brown rice and watermelon.

**Key words:** Hymexazol; solid phase extraction; gas chromatography tandem-mass spectrometry; vegetables; wheat flour; brown rice; watermelon; derivatize; pesticide residue

恶霉灵是一种内吸性杀菌剂和植物生长调节剂,1970年因日本三共公司提出作为农药而广泛使用<sup>[1-2]</sup>。恶霉灵熔点为86~87℃,闪点为(202±2)℃,25℃时蒸气压 $182 \times 10^{-3}$  Pa,20℃时在水中溶解度为65.1 g/L;溶于大多数有机溶剂。在酸、碱溶液中均稳定,无腐蚀性<sup>[3]</sup>。恶霉灵对各种植物真菌病害有防治效果,并且低毒,因此在我国被广泛应用<sup>[4]</sup>。GB 2763—2012《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》<sup>[5]</sup>中规定了糙米、黄瓜、西瓜、甜菜中恶霉灵的残留限量分别为0.1、0.5、0.5、0.1 mg/kg,欧盟指令规定大多数蔬菜中该农药残留限量为

0.05 mg/kg,日本厚生省肯定列表规定恶霉灵粮谷类残留限量为0.02 mg/kg,多数蔬菜为0.5 mg/kg,对于未制定残留限量标准的农产品,其含量不得超过厚生劳动省确定的标准(0.01 mg/kg)。目前我国制定了恶霉灵的残留限量标准,但没有相应的检测方法标准,国内外目前公开发表的适用于检测恶霉灵残留量的方法比较鲜见,且仅限于气相色谱方法,检出限比较高<sup>[6-8]</sup>。本文参考日本岛根县环境保健公社提出的对恶霉灵进行衍生化的原理,建立了一种灵敏度较高的气相色谱-质谱联用分析法(GC-MS)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

试验所用的菠菜、芋头、小麦粉、糙米、西瓜均

收稿日期:2014-10-17

作者简介:蔡柳燕 女 工程师 研究方向为食品安全与分析

E-mail:cailiuyan@jinzu-foods.com.cn

购自烟台市开发区某农贸市场。样品每袋湿重 300 g, 粉碎后充分混匀, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

### 1.1.2 主要仪器与试剂

气相色谱-质谱联用仪(日本岛津)、固相萃取  $\text{C}_{18}$  小柱(2 g/10 ml, 北京博纳艾杰尔)、SPE 固相萃取装置(美国 Supelco)、20 ml 保持用多孔性硅藻土柱(美国 Agilent)、高速样品均质器、恒温减压浓缩装置、高频数控超声波清洗器、振荡器。

恶霉灵标准品购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH (纯度 99.0%, 称取适量粉状原体, 用丙酮在容量瓶中调制成为 2 000 mg/L 的标准储备液, 溶液避光  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 使用时用乙酸乙酯逐级稀释); 衍生化试剂: N, O-双三甲基硅烷基三氟乙酰胺 (BSTFA)、三甲基氯硅烷 (TMCS) 均购自美国 Sigma; 乙腈、正己烷、乙酸乙酯、氯化钠、无水硫酸钠均为色谱级, 盐酸为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 仪器条件

气相色谱条件: 色谱柱: DB-5ms 毛细管柱 (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ), 进样温度  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进样模式为不分流进样, 进样量 2  $\mu\text{l}$ , 进样时间 1 min, 载气为氦气, 氦气压力 53.6 kPa, 总流速 14 ml/min, 柱流速 1 ml/min, 线速度 36.3 cm/s, Purge 流速 3.0 ml/min; 升温程序条件: 起始温度  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 以  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速度升温到  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保持 12 min。

质谱条件: 扫描方式为离子监测扫描 (SIM), 离子源为 EI 源, 源温度  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 接口温度  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 溶剂延迟 3.85 min; 定量离子 156  $m/z$ , 定性离子 171、128  $m/z$ 。

### 1.2.2 样品前处理

#### 1.2.2.1 提取

蔬菜: 称样 20.0 g, 加入 50 ml 乙腈均质 3 min, 硅藻土减压过滤, 残渣用 20 ml 乙腈均质后一并过滤, 放置 20 min 恢复到室温, 用乙腈定容到 100 ml, 用量筒准确量取 20 ml 加入事先放入 10.0 g 氯化钠的分液漏斗, 使用 15 ml 0.01 mol/L 盐酸溶液清洗量筒后, 将盐酸加入分液漏斗, 震荡 10 min, 静置 10 min。

小麦粉: 称样 10.0 g, 加入 20 ml 水混匀, 放置 2 h。加入 50 ml 乙腈均质 3 min, 硅藻土减压过滤, 残渣用 20 ml 乙腈均质后一并过滤, 放置 20 min 恢复到室温, 用乙腈定容到 100 ml, 用量筒准确量取 20 ml 乙腈加入分液漏斗, 再加入 30 ml 正己烷震荡 10 min, 静置 10 min 进行液-液分离, 下层放入蒸馏烧瓶, 将 30 ml 正己烷饱和的乙腈分 3 次加入正己烷层震荡, 液-液分离, 乙腈层合并入蒸馏烧瓶,

$40\text{ }^{\circ}\text{C}$  浓缩至 20 ml。浓缩液加入事先放入 10.0 g 氯化钠的分液漏斗, 使用 15 ml 0.01 mol/L 盐酸溶液清洗蒸馏烧瓶后, 将盐酸加入分液漏斗, 震荡 10 min 进行液-液分离, 静置 10 min。

#### 1.2.2.2 净化

经液-液分离后得到的水层加入 20 ml 保持用多孔性硅藻土柱, 保持 20 min 后用 100 ml 乙酸乙酯洗脱, 用蒸馏烧瓶收集洗脱液; 用 10 ml 乙腈淋洗  $\text{C}_{18}$  (2 g/10 ml) 固相萃取小柱。分离得到的乙腈层放入烧杯, 经 5.0 g 无水硫酸钠除水后过  $\text{C}_{18}$  柱, 用 20 ml 乙腈分 3 次清洗烧杯后过柱, 用蒸馏烧瓶收集全部过柱溶液; 将样品  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  浓缩到不少于 2 ml, 氮气吹干, 用 2 ml 乙酸乙酯超声溶解; 取浓缩液 0.5 ml, 加入 50  $\mu\text{l}$  硅烷化试剂 (BSTFA + TMCS) 混合均匀, 放置 30 min, 进行 GC-MS 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 前处理衍生化选择

恶霉灵易被 GC-MS 衬管吸附, 造成峰形拖尾, 分析灵敏度、重现性不理想的现象。为了解决这个问题, 将恶霉灵与 N, O-双三甲基硅基三氟乙酰胺 (BSTFA) 在三甲基氯硅烷 (TMCS) 催化, 室温常压下进行衍生化反应。衍生化过程中, BSTFA 上的三甲基硅烷基和恶霉灵上的羧基发生氢交换, 生成三甲基硅烷化恶霉灵。通过谱库检索发现恶霉灵与 BSTFA 的衍生化物与 NIST 库 (美国国家科学技术研究院出版的 GC-MS 质谱数据库) 中的三甲基硅烷化恶霉灵相似度极高, 而且峰形拖尾、灵敏度不好、重现性不佳的问题没有在三甲基硅烷化恶霉灵分析过程中出现。因此将恶霉灵进行衍生化后再进行 GC-MS 分析。

### 2.2 方法选择性

对菠菜、绿花菜、芋头、小麦粉、糙米、西瓜进行测试; 以上样品在恶霉灵标准溶液衍生化物的保留时间处无明显色谱峰, 所以该方法选择性良好, 不会对以上种类农产品的检测造成假阳性误判。

### 2.3 线性范围及定量限

使用浓度为 10.000 mg/L 的标准溶液在 0 ~ 1.000 mg/L 浓度范围内调制 5 个浓度点进行 GC-MS 分析, 以峰面积绘制标准曲线, 由标准曲线得到回归方程为  $y = 1653.012x - 5359.991$ , 线性相关系数  $r^2 = 0.9999$ 。以信噪比  $S/N = 3$  时的添加浓度 0.003 mg/kg 作为本方法的检出限, 以信噪比  $S/N = 10$  时的添加浓度 0.005 mg/kg 作为本方法的定量限。西瓜 0.005 mg/kg 添加回收萃取液中目标峰见图 1。

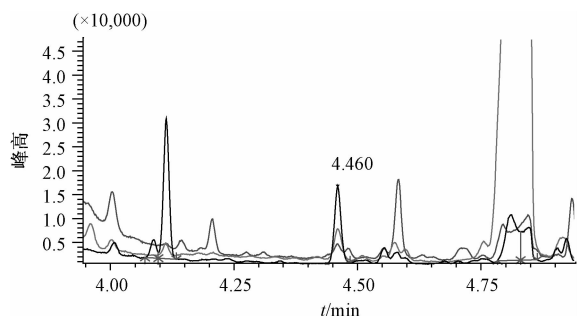


图1 添加水平为0.005 mg/kg西瓜样品回收萃取液中目标峰

Figure 1 SIM chromatogram of 0.005 mg/kg hymexazol in the watermelon recovery test

## 2.4 回收率与精密度

分别在菠菜、芋头、绿花菜、小麦粉、糙米、西瓜样品中加入0.010、0.100 mg/kg两个水平的恶霉灵标准溶液。菠菜、芋头、绿花菜、小麦粉每个添加水平进行了5次前处理,每次前处理的萃取液进样1次;糙米、西瓜每个添加水平进行了3次前处理,每次前处理的萃取液进样3次。除绿花菜0.100 mg/kg添加水平平均回收率为63%外,样品回收率在71%~101%之间,两种不同添加水平所对应的RSD分别为1%~9%和4%~7%,详细结果见表1。

表1 恶霉灵回收率与精密度表(%)

Table 1 Spiked-recoveries and relative standard deviations (RSD) of hymexazol

样品	添加水平为0.010 mg/kg		添加水平为0.100 mg/kg	
	回收率	RSD	回收率	RSD
菠菜	83	9	93	7
绿花菜	71	5	63	6
芋头	95	1	86	6
小麦粉	97	6	94	4
糙米	99	3	101	5
西瓜	92	7	96	4

## 3 小结

本研究采用固相萃取-气相色谱-质谱联用法测定蔬菜、小麦粉、糙米和西瓜中的恶霉灵残留量,定量限为0.005 mg/kg,回收率基本都在63%~101%之间,方法精度及方法选择性良好,为农产品进出口、国内食品安全提供一种恶霉灵残留检测的高灵敏度、重现性好的方法。

## 参考文献

- [1] 徐怀友,马友德.恶霉灵对人参立枯病的防治研究[J].人参研究,2006,14(1):41-42.
- [2] 朱卫刚,胡伟群,陈杰.精甲霜灵和恶霉灵复配对辣椒猝倒病的联合毒力[J].农药,2010,49(12):920-921.
- [3] CDS Tomlin. The Pesticide Manual [M]. Hampshire: BCPC Publications, 2003:547-548.
- [4] 张会春.无公害农药恶霉灵的应用[J].云南农业科技,2006(1):45.
- [5] 中华人民共和国卫生部,中华人民共和国农业部. GB 2763—2012 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,2012.
- [6] 谭智勇,郭正元.稻谷中恶霉灵残留气相色谱检测方法研究[J].农药科学与管理,2011,32(4):29-31.
- [7] 蔡可兵,杨文斌,彭晓春,等.恶霉灵在西瓜和土壤中的残留和消解动态研究[J].安徽农业科学,2011,39(34):21069-21071.
- [8] Tamura Y, Takano I. Determination of hymexazol in agricultural products by GC-NPD [J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2008, 49(3):223-227.

## · 资讯 ·

### 欧盟批准赤藓糖醇用于低能或无糖调味饮料

据欧盟网站消息,2016年10月13日欧盟发布委员会实施条例(EU)2015/1832,修订了(EC)No1333/2008号食品添加剂法规附录2,批准赤藓糖醇(Erythritol)作为风味增强剂用于低能或无添加糖调味饮料。

2003年欧盟食品科技委员会(SCF)认为,赤藓糖醇用于食品是安全的。然而出于低龄消费者可能会过量摄取赤藓糖醇导致腹泻的风险,欧盟未批准其用于饮料。

之后欧盟食品安全局于2015年2月12日发布意见指出,按照1.6%的添加水平将赤藓糖醇用于非酒精饮料不会产生腹泻风险。

本法规自发布后第20天起生效。

(相关链接:<http://www.chinabeverage.org/news.php?id=7058>)