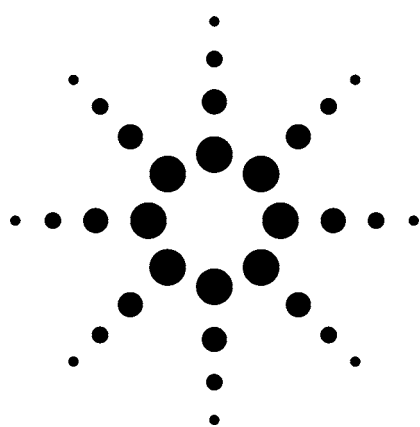




液相飞行时间质谱(LC/MSD TOF)和液相色谱/离子阱质谱(LC/MSD Trap)测定色拉蔬菜中的氯烟碱类杀虫剂

应用报告

食品安全

作者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
Pesticide Residue Research Group
University of Almería
04120 Almería
Spain

Agilent Contact: Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610

摘要

本工作考察了液相色谱/飞行时间质谱检测器(LC/MSD TOF)和液相/离子阱质谱检测器(LC/MSD Trap)联用技术在分析一些氯烟碱类杀虫剂的可行性。杀虫剂包括：啉虫咪(acetamiprid)，吡虫啉(imidacloprid)和噻虫啉(thiacloprid)。色拉蔬菜有四种：番茄、辣椒、莴苣和黄瓜。本文介绍的内容包括三种氯烟碱类杀虫剂的LC/MSD TOF和LC/MSD Trap质谱，TOF经验分子式的确定以及在纯溶剂和所有四种蔬菜基质中氯烟碱类杀虫剂的MS/MS碎片和诊断的离子。同时也将详细介绍样品制备程序以及色拉蔬菜中杀虫剂的回收、最低检测限(MDL)的质谱质量、线性、使用TOF和Trap对纯溶剂和四种蔬菜提取物中杀虫剂的定量分析。给出了来自市场的实际色拉蔬菜样品中杀虫剂的分析结果。

引言

蔬菜中杀虫剂的鉴定和定量分析对于人类和世界各国的卫生组织都极为重要。为了满足人们的健康需求，欧盟(EU)已经制定了蔬菜中低浓度杀虫剂的新法规。比如欧洲的欧盟导则91/414/EEC[1]或美国的食物质量保护法规(Food Quality Protection Act)(FQPA)[2]都增加了有关人类健康、工人以及环境保护的标准。使用年久的农药也要求重新登记。

此外，有些评价项目已经取消了许多目前市场上的农作物保护产品(美国177种化合物，欧洲320种)的认可。而且，还宣布在欧洲总共有110种产品也将在不久的将来取缔[1]。欧洲的评价项目修订版指出，到2008年，现有的450种以上的活性物质将从市场中取消，保留使用的农药大约有400种。

新法规中的质量标准包括蔬菜中最大残留限量(MRL)的重新估值，欧盟导则中对每一类食物中的每一种杀虫剂都有不同的MRL。其特点是，MRL都低于以前的指标。而且，新规范也引导每个欧盟国家制定自己的MRL，这些MRL仍在确定中。欧盟规范规定在新规划中将维护各个国家的MRL。另外，禁用的化合物或没有规定MRL的化合物也有最低的MRL要求，目前规定为0.01 mg/kg(ppm)。



Agilent Technologies

目前, LC/MS在欧盟法规中对许多极性农药的分析应用持上升趋势, 它正在迅速成为一种管理监控农药残留分析的公认技术。LC/MS尤其适合那些具有极性且不稳定的新农药家族。因此, 作为此类应用的首选, LC/MS胜过过去常用的GC/MS方法。LC/MS/MS和LC/MS TOF在环境问题中的应用很重要[3, 4]。最近的一篇关于食品中农药分析的综述[5]表明, 在不到100篇LC/MS应用文章中, 大多数是在过去5年中发表的。因此, LC/MS是食品分析中显现出来的技术。然而有趣的是在大多数最近的综述中, 没有关于使用LC/MS TOF和准确地进行质谱分析食品中农药的报道。

鉴于此, 对于使用LC/MSD TOF分析食物中农药的研究以及方法建立有着迫切需求。本研究考察了新型Agilent LC/MSD TOF仪器在食品中农药的分析应用, 是这类领先研究之一。研究工作涉及一类重要的杀虫剂(氯烟碱类杀虫剂)以及它们在色拉蔬菜中的应用。之所以选择此研究课题, 是因为这些杀虫剂切合实际, 它们常用于番茄、辣椒、莴苣以及黄瓜而且对食品质量具有影响。此外, 实验也将证明LC/MSD Trap和LC/MSD TOF联合, 可以在氯烟碱类杀虫剂分析中为结构确认提供碎片信息[6, 7]。

氯烟碱类杀虫剂是在二十世纪九十年代为防治色拉莴苣中的各种害虫由Bayer公司引入到市场的。此类杀虫剂的结构示于图1。三种化合物都含有氯烟碱类结构, 因此所有三种化合物都有相似的作用模式, 其作用靶标是在昆虫体内的烟碱型乙酰胆碱受体。

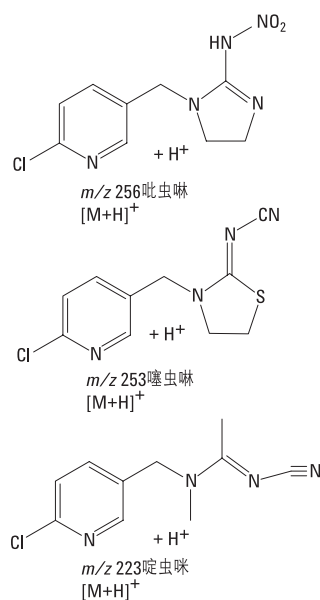


图1. 氯烟碱类杀虫剂的 $[M+H]^+$ ion结构, 啉虫啉(acetamiprid), 吡虫啉(imidacloprid)和噻虫啉(thiacloprid)

实验方法

蔬菜提取方法[6]

1. 番茄、莴苣、辣椒和黄瓜每份2 kg(取自不使用杀虫剂的农场的产品)。在一个认证实验室对样品进行预筛分以保证得到无农药残留的蔬菜样品。采用低速搅拌机将样品混合均匀, 然后取15 g均匀样品放在一个200 mL PTFE离心试管中[6]。
2. 在试管中加入15 mL乙酸乙酯, 在一个Polytron高速捣碎机上(2,000 rpm)匀浆30 秒(图2)。重复此过程2次以上, 乙酸乙酯总量为45 mL。
3. 将混合提取液通过一个20 g的无水 Na_2SO_4 的薄层过滤。固体物用50 mL的乙酸乙酯冲洗, 然后将混合提取液在一个真空旋转蒸发器中于 $45 \pm 5^\circ\text{C}$ 的水浴上蒸发至近干。

- 干燥后的残渣用15 mL甲醇溶解。提取液(每mL含1 g样品)用0.2 μm PTFE过滤器(Millex FG, Millipore)过滤, 滤液用于LC/MS分析。
- 然后向甲醇提取液中加入啉虫咪, 吡虫啉和噻虫啉混合物, 浓度从0.003到1.0 mg/kg, 用于LC/MSD TOF和离子阱分析。
- 实验用两个方法直接测定甲醇提取液。第一个方法是三明治方法: (在任意一侧的20 μL 的流动相中注射20 μL 的甲醇)用注射器先吸取20 μL 流动相, 然后20 μL 甲醇提取液, 最后再20 μL 流动相。第二种方法是用去离子水将甲醇提取液按1:3稀释。本工作全部采用了第二种方法, 因为该方法的色谱结果最好。
- 没有加入杀虫剂的样品的甲醇提取液用去离子水1:3稀释后同上用LC/MSD TOF或LC/MSD离子阱直接分析。

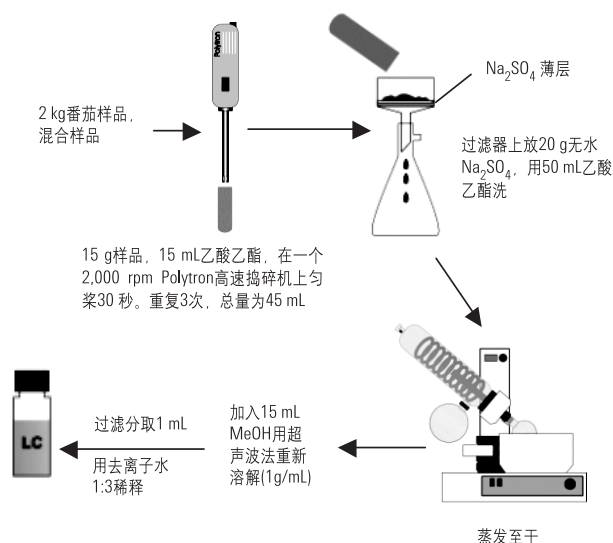


图2. 番茄、茼蒿、黄瓜和辣椒中的氯烟碱类杀虫剂的提取方法

表1. 实验条件

Agilent LC/MSD TOF

LC泵:	Agilent 1100二元泵
自动进样器:	Agilent 1100标准自动进样器
注射体积:	50 μL
色谱柱:	ZORBAX Eclipse XDB C-8, 4.6 mm x 150 mm x 5 μm 部件号993967-906
流动相:	A: 乙腈 B: 0.1%的甲酸水溶液
梯度:	流速0.6 mL/min, 30分钟内将A流动相从15%到100%
电喷雾, 正模式ESI ⁺	
毛细管:	4000 V
雾化器:	40 psig
干燥器:	9 L/min
气体温度:	300 °C.
碰撞诱导解离电压:	190 V
锥孔:	60 V
Oct DC1:	37.5 V
Oct RF:	250 V
参比质量:	m/z 121.0509和922.0098
分辨率:	9500 $\pm$ 500 @ m/z 922.0098
参比喷雾器2在运行期间保持恒流	

Agilent LC/MSD Trap Classic

色谱方法和LC/MS TOF一样, 直接比较色谱峰

Agilent LC/MSD Trap Classic, 正模式ESI⁺

毛细管:	3200 V
雾化器:	40 psig
干燥器:	9 L/min
气体温度:	300 °C
毛细管出口:	70 V
锥孔:	60 V
阱积聚:	50,000 counts
最大收集时间:	200 ms

结果与讨论

碎片化和质量准确度

图3是三种氯烟碱类杀虫剂(啉虫咪, 吡虫啉和噻虫啉)的色谱分离情况。分离采用的是Eclipse C-8柱, 使用乙腈和0.1%甲酸进行梯度洗脱。样品是添加0.5 mg/kg杀虫剂的番茄提取物。图3下边的色谱图是三种化合物的LC/MSD TOF提取离子色谱。该提取窗口的色谱峰很清楚, 表征了准确离子质量提取的特点。提取窗口的宽度可以调窄到(0.02 amu)或大约100 ppm。图3中的提取窗口是0.1 amu。

在浓度低到0.05 mg/kg时, 提取的离子(*m/z* 223, 253和256)仍然能得到一个很清楚的色谱图, 这证明了准确质量的重要性以及在较窄的质量窗口给出清楚的提取离子色谱图的能力。在对每种氯烟碱类杀虫剂中质子化分子的准确质量的测定中也反应出这种准确的质量窗口。表2是测量番茄基质中0.05和0.5 mg/kg两个浓度时每种氯烟碱类杀虫剂的化合物、化合物的元素组成以及碎片离子、理论质量和测量的准确质量以及ppm误差。两个浓度都得到了极好的质量准确度结果, 番茄基体中的质量准确度始终低于3 ppm。此外, 表2也给出了每种杀虫剂中重要的碎片离子的准确质量。这些结果表明, 即使在复杂的蔬菜基质中的农药浓度, 在一个数量级范围内采用连续校准对于获得准确质量是有效的。

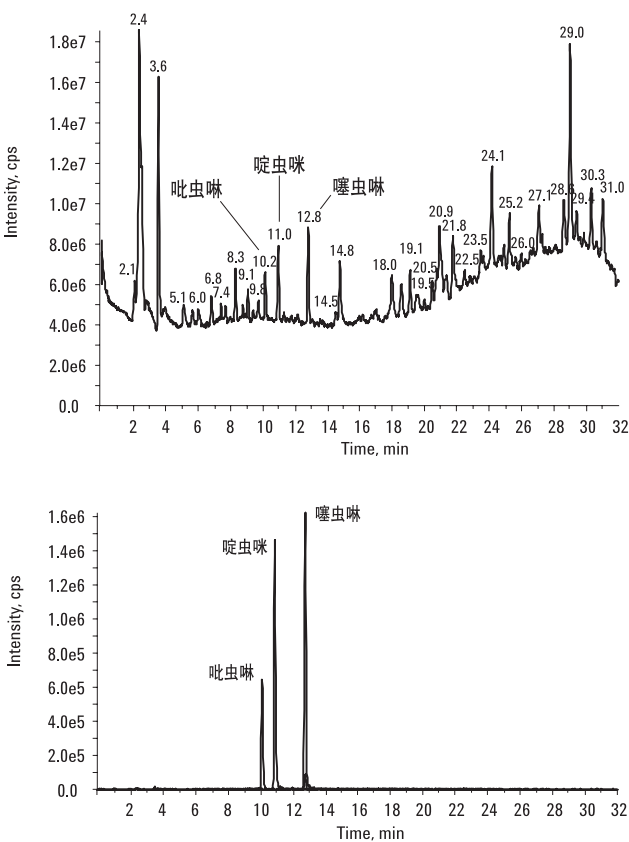


图3 添加0.5 mg/kg三种氯烟碱类杀虫剂于番茄基质中的LC/MSD TOF分析。总离子和提取离子色谱图分别示于上图和下图。

表2. LC/TOF/MS对番茄基质中氯烟碱类杀虫剂的准确质量测量及其碎片

化合物	元素组成	理论质量	浓度 (0.05 mg/kg)		浓度 (0.5 mg/kg)	
			测量质量	误差 (ppm)	测量质量	误差 (ppm)
吡虫啉	C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂ Cl	256.0596	256.0596	0.1	256.0597	0.5
	C ₉ H ₁₁ N ₄ Cl	210.0667	210.0663	-1.8	210.0664	-1.3
	C ₉ H ₁₀ N ₄ Cl	209.0589	209.0587	-0.7	209.0587	-0.7
	C ₉ H ₁₁ N ₄	175.0978	175.0983	2.7	175.0977	-0.7
啉虫咪	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ Cl	223.0745	223.0746	0.5	223.0749	1.8
	C ₆ H ₅ NCI	126.0105	126.0106	0.8	126.0105	0.0
噻虫啉	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ SCl	253.0309	253.0311	0.7	253.0313	1.5
	C ₆ H ₅ NCI	126.0105	126.0107	1.6	126.0103	-1.6

图4a-1, 4a-2, 4a-3以及4b是三种氯烟碱类杀虫剂中的碎片的MS/MS色谱图以及精确质量图。用LC/MSD Trap色谱在同样的色谱条件下用MS²验证了LC/MSD TOF的碎片离子。图4a-1是啉虫咪在 m/z 206, 196, 187, 181和126处的MS²谱图。 m/z 126的主要碎片在TOF谱图中也存在, 精确质量为在 m/z 126.0105(图4b和表2)。 m/z 126离子只在前驱离子(质子化的啉虫咪)

分裂期间形成。这种MS/MS信息证实了在LC/MSD TOF的质谱中出现的 m/z 126离子, 并且说明了离子阱和TOF联用的重要性。离子阱验证了TOF的碎片离子, 而TOF反过来又给出了精确的质量和碎片离子的分子式(m/z 126.0105)以及中性损失碎片的精确质量(96.0640 u对应测量的96.0644 u)以用于质谱解释(图5a)。

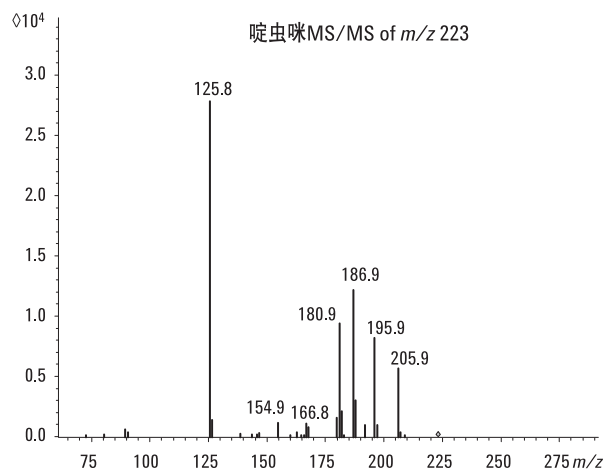


图4a-1. 离子阱得到的啉虫咪(acetamiprid)的MS/MS谱图

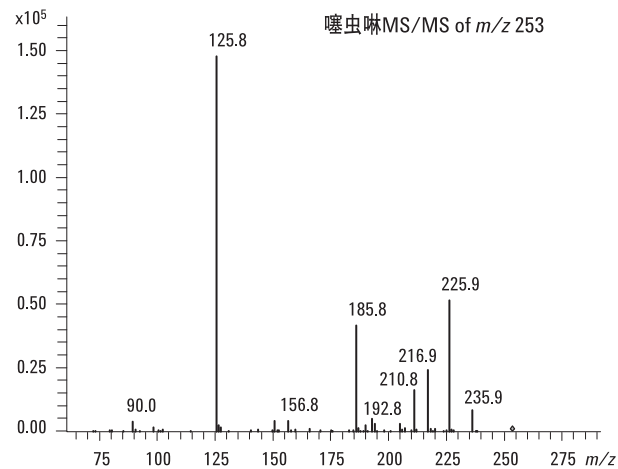


图 4a-3. 离子阱得到的噻虫啉(thiacloprid)的MS/MS谱图

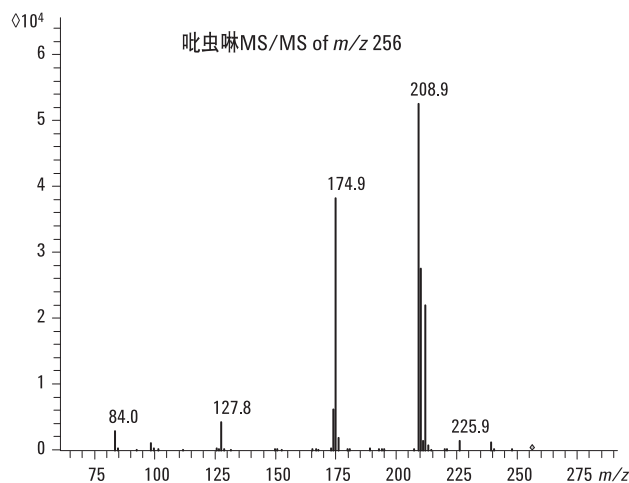


图4a-2. 离子阱得到的吡虫啉(imidacloprid)的MS/MS谱图

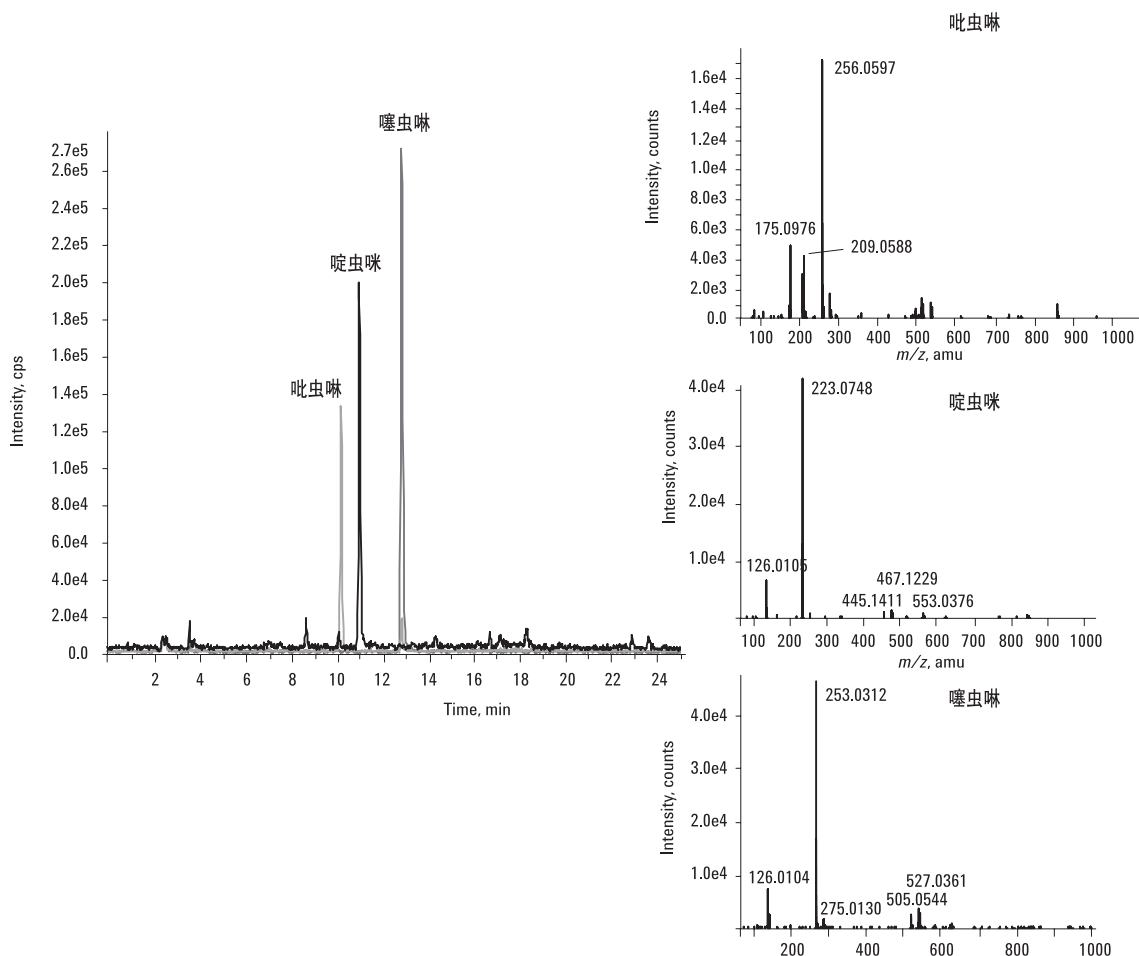


图4b. TOF对于吡虫啉(imidacloprid)，啶虫脒(acetamiprid)和噻虫啉(thiacloprid)的精确质量以及碎片离子

此外，图5a-5c是以(一个甲醇溶液中纯标准)杀虫剂标样甲醇溶液的精确质谱为基础，给出了每一种氯烟碱类(似)杀虫剂的碎片离子及其碎裂途径。

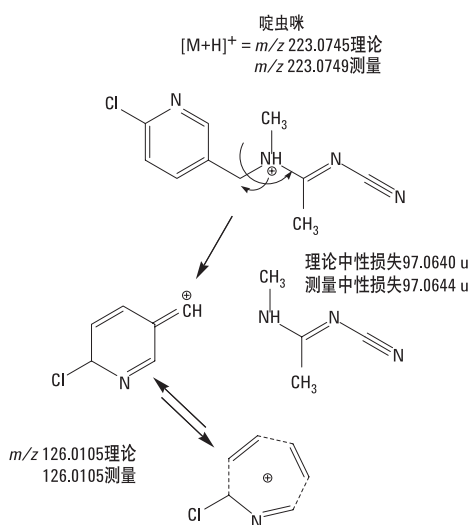


图5a. 采用LC/MSD Trap质谱仪和LC/MSD TOF质谱仪对啶虫脒分析得到的结构和碎裂途径。用LC/MSD TOF只能看到 m/z 126的碎片离子

图5b展示的是吡虫啉的碎裂途径以及N-NO₂键的第一个N上的加和质子。用离子阱通过MS³验证了碎裂途径。*m/z* 175离子的形成是通过NO₂基的失去而形成*m/z* 210奇数电子(OE)离子, 然后再失去Cl, 最终形成了*m/z* 175偶电子离子(EE)。见图5b。

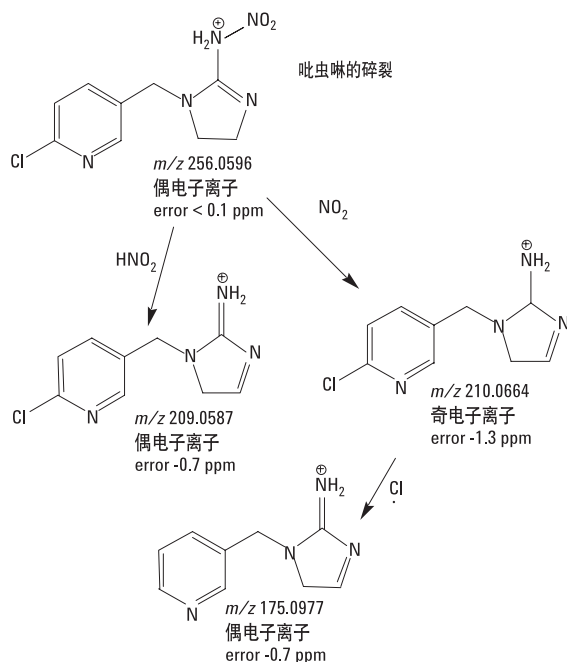


图5b. 采用LC/MSD Trap和LC/MSD TOF分析吡虫啉得到的结构和碎裂途径

LC/MSD TOF给出的*m/z* 209, 210和175离子的精确质量分别为-0.7, -1.3和-0.7 ppm(表2)。因此, 我们能够有信心通过推导其化学结构来指定碎片离子的元素成分。这也显示了离子阱与TOF联用在碎裂研究中的价

值。在用LC/MSD TOF鉴定碎片离子的内含物对于准确可靠鉴定很有价值。尤其是对于那些食品中禁用物质的鉴定很有价值, 这些正确的鉴定需要积累鉴定要点。

图5c展示了噻虫啉的碎裂过程, 和啉虫咪类似, 也给出了在*m/z* 126.0105的诊断离子。因此, 所有的氯烟碱类杀虫剂都生成了质子化了的分子离子以及至少各自有一个碎片离子, 从而得到了很好的LC/MS电喷雾信号。LC/MSD Trap和LC/MSD TOF的结合对于质谱的解释相当有用, 这两种仪器对于这些化合物都很有效, 对于结构和物质鉴定能给出补充信息。

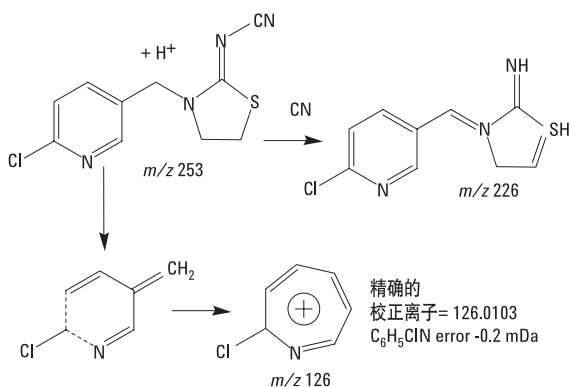


图5c. LC/MSD离子阱和LC/MSD TOF中噻虫啉的碎裂过程

线性和检出限(DLs)

LC/MSD TOF和LC/MSD Trap的校准曲线制定：分别制定了四种蔬菜基质(莴苣、番茄、辣椒和黄瓜)的校准曲线，待测的分析物浓度范围从0.025 mg/kg到1.0 mg/kg(ppm)(甲醇介质)。结果表明，LC/MSD TOF对于给定的不同蔬菜基质(见表3)其标准曲线非常相似。比如，图6展示了吡虫啉的五个标准曲线。图6证明了在LC/MSD TOF系统中对于所有这些蔬菜提取物，其母体离子浓度高到0.5 ppm，不存在基质抑制效应。而浓度从0.5 ppm到1.0 ppm时，黄瓜和辣椒基体的灵敏度稍微偏低一些，与甲醇标准液相比，大约低10%。这可能是由于黄瓜和辣椒与一些高浓度的化合物结合形成了更为复杂的基质的缘故。因此，采用与各个蔬菜基质匹配的校准曲线报出的浓度具有最好的准确度。这就是用于未知的实际蔬菜样品分析的程序。

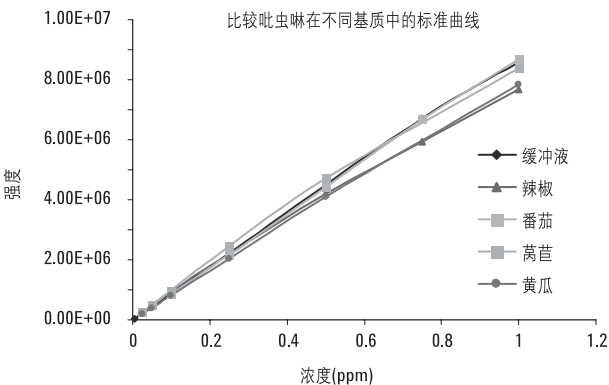


图6. LC/MS TOF对于吡虫啉在五种不同基质的标准曲线

图7的三个曲线是番茄基质中每种杀虫剂的标准曲线。其中噻虫啉灵敏度最高，其次是啉虫啉和吡虫啉。吡虫啉灵敏度最低。吡虫啉较低的灵敏度可能是由于其化学结构造成的，它有一个N-NO₂基。NO₂吸电子的能力大大降低了正离子电喷雾过程中的离子化，这是具有吸电子基团结构物质通常在正离子电喷雾过程中特征。

表3. LC/TOF/MS对于氯烟碱杀虫剂(加入量从0.025到1 mg/kg)在基体匹配的标准溶液的校准数据(采用不同浓度的六个校准数据点)

化合物	基体	校准方程式	R ²	检出限(mg/kg)
吡虫啉	溶剂	$y = 1.0 \times 10^7 + 18867$	0.9993	0.003
	番茄	$y = 1.0 \times 10^7 + 172000$	0.9995	0.010
	辣椒	$y = 8.7 \times 10^6 + 453000$	0.9980	0.010
	莴苣	$y = 9.6 \times 10^6 + 143000$	0.9962	0.010
	黄瓜	$y = 9.0 \times 10^6 + 19100$	0.9996	0.005
啉虫啉	溶剂	$y = 2.0 \times 10^7 + 464616$	0.9974	0.002
	番茄	$y = 2.2 \times 10^7 + 444000$	0.9974	0.003
	辣椒	$y = 1.9 \times 10^7 + 678000$	0.9918	0.004
	莴苣	$y = 2.0 \times 10^7 + 503000$	0.9944	0.002
	黄瓜	$y = 2.0 \times 10^7 + 433000$	0.9958	0.003
噻虫啉	溶剂	$y = 2.0 \times 10^7 + 758528$	0.9953	0.001
	番茄	$y = 2.0 \times 10^7 + 1150000$	0.9936	0.003
	辣椒	$y = 1.9 \times 10^7 + 1040000$	0.9922	0.003
	莴苣	$y = 1.9 \times 10^7 + 858000$	0.9904	0.002
	黄瓜	$y = 1.8 \times 10^7 + 678000$	0.9930	0.002

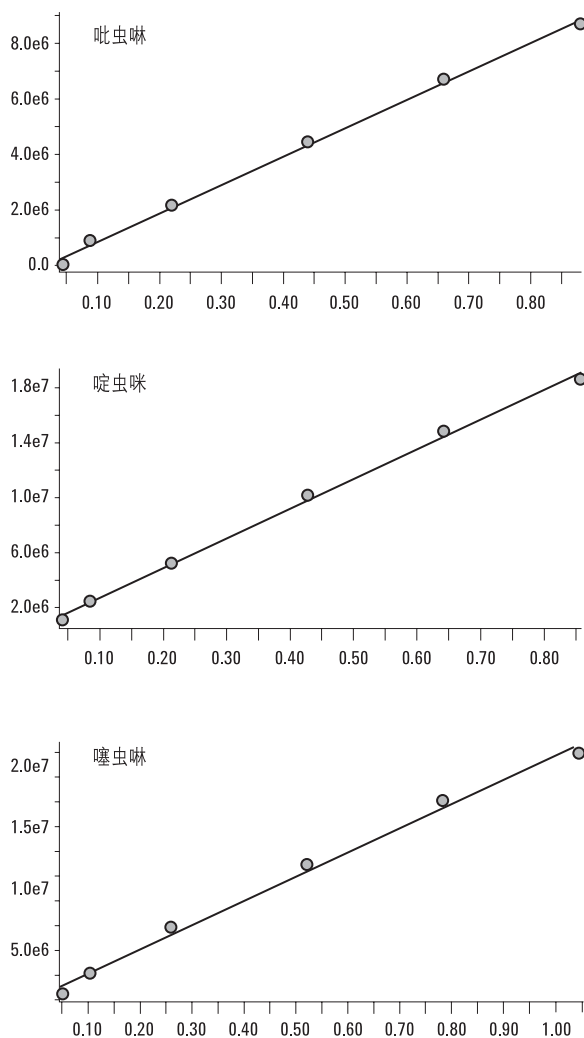


图7. 番茄基(体)质中两个数量级的啶虫咪，吡虫啉和噻虫啉的标准曲线

番茄、莴苣、黄瓜和辣椒基质中啶虫咪和噻虫啉杀虫剂的检出限是0.003 mg/kg(ppm)，吡虫啉检出限是0.01 mg/kg。不同蔬菜基质样本的检出限基本上没有差别。LC/MSD TOF的精确质量能力看来可以检测复杂的蔬菜基质，没有干扰检出限。所有蔬菜基质中的三种杀虫剂的校准曲线都呈线性，其相关系数为0.9926到0.9995。因此，LC/MSD TOF打破了以往关

于TOF仪器线性不好的观念，本工作表明LC/MSD TOF对于0.01到1.0 mg/kg两个数量级范围内具有相当好的定量分析能力。这些检出限可以满足西班牙以及欧盟法定的蔬菜中氯烟碱类杀虫剂的规范限量要求(表4)。比如，番茄中吡虫啉的要求是0.10 mg/kg，噻虫啉是0.50 mg/kg。西班牙没有规定番茄中的啶虫咪要求限。因此，最大残留限自动定为0.01 mg/kg。LC/MSD TOF有能力达到适合于各种蔬菜基体中杀虫剂的检出限要求。表4也注明了欧盟对于番茄中三种氯烟碱类杀虫剂的报出限要求，辣椒、黄瓜和莴苣的报出限正在考虑中。因此，所有的最大残留限量自动定为0.01 mg/kg，这很容易用LC/MSD TOF检测。

表4. 西班牙关于莴苣、番茄、辣椒和黄瓜中三种氯烟碱类杀虫剂的最大残留限量*

基质	啶虫咪 (mg/kg default)	吡虫啉 (mg/kg)	噻虫啉 (mg/kg)
番茄	0.01	0.10	0.50
莴苣	0.01	3.00	0.02
黄瓜	0.01	0.10	0.20
辣椒	0.01	0.50	0.50

* 欧盟的所有最大残留限量都为0.010 mg/kg

参见下列网址

<http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/09-99-2.pdf>并参考
EU Council Directives 76/895/EEC,
86/362/EEC, 86/363/EEC, 及90/642/EEC.

采用LC/MSD TOF对于实际样品中三种氯烟碱类杀虫剂的定量分析结果列于表5。结果与三级串接四极杆以及离子阱的分析结果进行了比较。LC/MSD TOF的结果是在离子阱LC/MSD或三级串接四极杆LC/MSD(在MRM模式操作)的浓度结果的20%范围之内。因此,这些数据表明,LC/MSD TOF有能力根据欧盟的检出限量要求准确测定所研究的四种蔬菜(莴苣、番茄、黄瓜和辣椒)提取物中的氯烟碱类似杀虫剂。而且,LC/MSD TOF的定量分析能力可以与三级串接四极杆质谱环境标准相比。

表5. LC/MSD TOF, LC/MS离子阱, 以及LC三级串接四极杆质谱(MRM)对各种蔬菜样品中氯烟碱类(似)杀虫剂的测量结果比较

样品	化合物	LC/MSD TOF (mg/kg)	LC/MSD 离子阱 (mg/kg)	LC/MS 三级串接四 极杆质谱 (mg/kg)
#2309 (南瓜)	吡虫啉	0.17	0.24	0.16
#2194 (番茄)	噻虫啉	0.09	0.13	0.09
#2354 (黄瓜)	吡虫啉	0.06	0.07	0.06
	啶虫啉	0.02	0.04	0.03

结论

LC/MSD TOF是鉴定蔬菜中农药的强有力的工具,为环境食品化学提供了新的分析技术。LC/MSD TOF可以胜任两个数量级的定量分析,其精确性小于3 ppm(一般小于2 ppm)。

本方法可以进行标准品和碎片离子的元素成分和结构碎片鉴定,尤其是用MS/MS离子阱确认。色拉蔬菜中的氯烟碱类杀虫剂的残留限量是0.003到0.01 µg/g。这些浓度相当或优于欧盟关于蔬菜中控制的杀虫剂指标。

参考文献

1. EU Food Directives, 2002, 91/414/EEC.
2. Food Quality Protection Act, 1998 (FQPA).
3. I. Ferrer and E. M. Thurman, (2003) "Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Analysis of Emerging Contaminants", *Amer. Chem. Soc. Symp.*, **850**.
4. I. Ferrer and E.M Thurman, (2003) "Analysis of Emerging Contaminants by LC/MS TOF", *TrAC* **35**, 304-312.
5. Y. Pico, C. Blasco, and G. Font, (2004), "Environmental and Food Applications of LC-Tandem Mass Spectrometry in Pesticide-Residue Analysis: an Overview", *Mass Spec. Rev.*, **23**, 45-85.
6. I. Ferrer, E.M. Thurman, and A. Fernandez-Alba, (2004) "Quantitation of Pesticides in Vegetables Using Time-of-flight Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, In Review.
7. E. M. Thurman, I. Ferrer; and A. Fernandez-Alba, (2005) "Matching Unknown Empirical Formulas to Chemical Structure Using LC/TOF/MS Accurate Mass, and Database Searching", *J. Chrom.*, In Press.

致谢

我们感谢Almería大学水文地质和分析化学系的Amadeo Fernandez-Alba提供的分析支持;西班牙El Ejido的CO-EXPHAL实验室(Luis Piedra和Mariano Contreras)提供了三级串接四极杆对蔬菜提取物样品的分析比较数据。

如需详细信息

有关我们产品和服务的更多信息请访问我们的网址:
www.agilent.com/chem

安捷伦对本资料中出现的错误,以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明,如有更改,恕不另行通告。

ZORBAX® 是E.I. duPont de Nemours公司的注册商标

© 安捷伦科技公司版权, 2004

中国印刷
2004年11月29日
5989-1842CHCN



Agilent Technologies