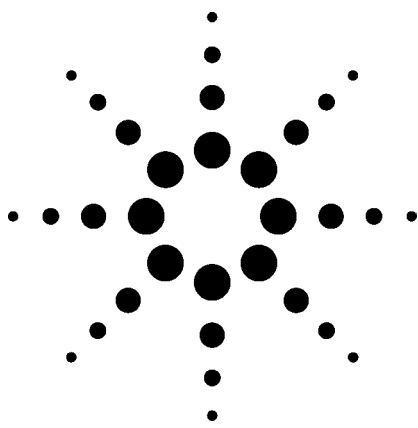


LC/MS 飞行时间质谱和 LC/MS 离子阱测定 水果和蔬菜中的杀真菌剂 应用



食品安全

作者

Imma Ferrer 和 E. Michael Thurman
西班牙, Almeria, Almeria 大学, 04120
农药残留研究小组

摘要

本应用探讨了新电喷雾仪器与液相色谱/飞行时间质谱 (LC/TOFMS) 和液相色谱/离子阱质谱 (LC/ITMS) 用于分析水果(苹果, 柠檬, 瓜和桔子)提取物和沙拉蔬菜(西红柿, 菜花和柿子椒)中的五种主要杀真菌剂的可能性。包括不同水果和蔬菜基质中五种主要杀真菌剂(多菌灵、噻苯咪唑、氧化偶氮毒杀芬、烯酰码啉、氟菌唑)的 LC/TOFMS 及 LC/ITMS MS/MS 谱图, TOF 实验分子式, MS/MS 碎片及确认离子。给出了水果及蔬菜中杀真菌剂的样品快速前处理及萃取方法的详细说明书的同时提供使用 TOF 和离子阱分析纯溶剂和水果及蔬菜提取物中杀真菌剂的检出限 (LOD)、线性及定量的谱图。最后是市售的实际样品水果及蔬菜: 苹果, 桔子, 柠檬和瓜中杀真菌剂的分析结果。

介绍

本文描述了鉴别和定量分析水果及蔬菜中杀真菌剂的重要性 [1, 2]。欧盟指南中愈来愈多地使用 LC/MS 分析许多常见的杀真菌剂, 很快成为了法规监测承认的农药残留分析方法。LC/MS 尤其适用于极性和不稳定的各种杀真菌剂的分析。因此, LC/MS 方法比传统的 GC/MS 方法更加适合使用。比如, Pico 等人对 MS 和 MS/MS 在食品中农药(包括杀真菌剂)分析的应用进行了综述 [3], 目前大致有 100 篇文章涉及食品中农药分析的内容, 其中大约 25 篇左右是使用 LC/MS 的, 多数文章在 2000 年初发表。因此, LC/MS 是食品分析的新兴技术。然而, 很有意思的是, 许多最近的文章中, 没有一篇使用 LC/TOFMS 和精确质量数分析食品中杀真菌剂。

所以, 开发研究 LC/TOFMS 方法, 以精确质量数分析食品中的农药显得十分重要 [1, 2]。我们目前的研究报告是最先使用最新的安捷伦 LC/MSD TOF 分析食品中杀真菌剂的方法之一。选择本主题的原因在于这些杀真菌剂在苹果, 桔子, 柠檬, 瓜, 西红柿, 菜花和柿子椒中的大量使用。并且, LC/ITMS 也将作为 LC/TOFMS 的比较方法用于分析水果及蔬菜中的杀真菌剂。如何同时使用 LC/ITMS 方法细节也有描述 [2]。



Agilent Technologies

本研究的常见杀真菌剂的分子结构见图 1。

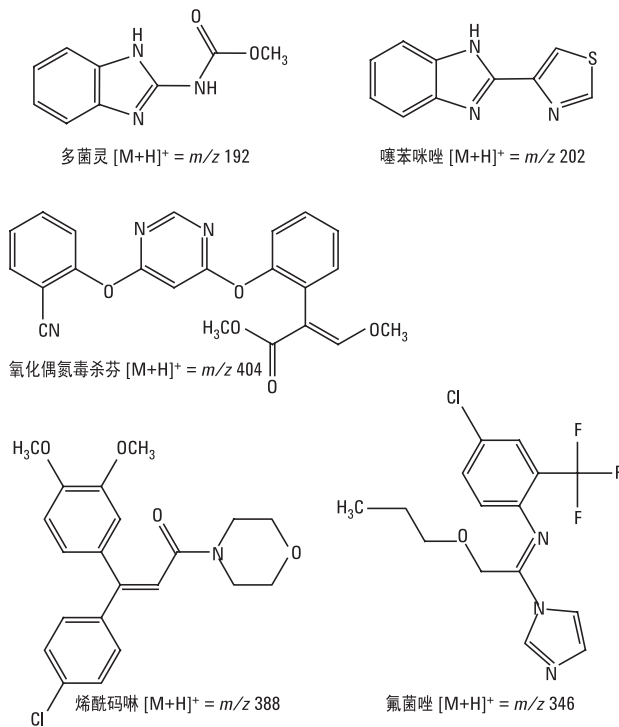


图 1. 水果和蔬菜中的主要杀真菌剂的结构以及相应的 [M+H]⁺ 离子。

实验方法

水果和蔬菜的提取 (QuEChERS)

QuEChERS 是一种提取方法的缩写，字母分别代表快速，简便，经济，有效，持久和安全。该方法在食品中农药分析的快速提取方面得到广泛的认可。是一种提取方法的缩写，字母分别代表快速，简便，经济，有效，持久和安全。该方法在食品中农药分析的快速提取方面得到广泛的认可。

1. 称取 15 g 预先混匀的样品于 40 mL 特氟龙离心管中。加入 15 mL 乙腈 (含 1% 乙酸)，6 g 无水硫酸镁和 2.5 g 三水乙酸钠，用旋涡振荡器在最大速度或手动振荡样品 1 min。然后，于 3700 rpm 离心 3 min。
2. 取 5 mL 上层清液于 15-mL 试管中，加入 250 mg PSA 吸附剂及 750 mg 硫酸镁，旋涡振荡 20 s。然后，于 3700 rpm 再次离心 3 min。将 1.0 mL 离心液转入自动进样瓶。然后将水果及蔬菜的提取液残留物蒸发至干并用 8/92% 的甲醇/水溶解。

加入 0.01 至 0.5 mg/kg 浓度的五种农药制成标准物，用于安捷伦 LC/MSD TOF 和安捷伦 1100 系列 LC/MSD 离子阱分析。

未加标的样品使用 LC/MSD TOF 或 LC/MSD 离子阱进行直接测定，进样 50 μ L。

图 2 概括了提取方法。

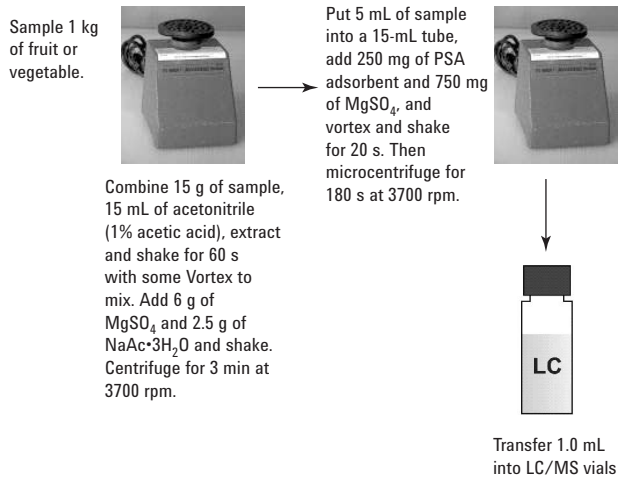


图 2. 用 QuEChERS 提取水果和蔬菜中杀真菌剂的方法。

安捷伦 LC/MSD TOF 方法

- LC 泵为安捷伦 1100 二元泵，使用标准安捷伦 1100 自动进样器，进样体积 50 μ L。
- 色谱柱：ZORBAX® Eclipse XDB-C8, 4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m, 部件号 993967-906
- 流动相 A：乙腈；流动相 B：0.1% 甲酸水溶液，梯度：15% A 0-5 min, 100% A, 25 min, 0.6 mL/min 流速
- 安捷伦电喷雾源 – LC/MSD TOF
- 正模式 ESI, 毛细管电压 4000 V
- 雾化器 40 psig, 干燥气 9 L/min, 气体温度 300 °C
- 裂解电压 190 V, 撇除器电压 60 V, 八级杆直流电压 37.5 V, 八级杆 RF 电压 250 V
- 参考质量：m/z 121.0509 和 922.0098, 分辨率：在 m/z 922.0098 处为 9500 \pm 500, 分析时在喷雾器 2 连续恒流使用参比 A

安捷伦 1100 系列 LC/MSD 离子阱方法

- 为便于直接比较色谱峰，使用与安捷伦 LC/MSD TOF 一致的色谱方法
- LC 泵为安捷伦 1100，进样体积 50 μ L
- 色谱柱：ZORBAX Eclipse XDB-C8，4.6 mm \times 150 mm，5 μ m，部件号 993967-906
- 流动相 A：乙腈；流动相 B：0.1% 甲酸水溶液，梯度：15% A 0-5 min，100% A 25 min，0.6 mL/min 流速
- 安捷伦 1100 系列 LC/MSD 离子阱
- 正模式电喷雾离子源 (ESI) 毛细管电压 3200 V
- 雾化器 40 psig，干燥气 9 L/min，气体温度 300 $^{\circ}$ C
- 毛细管出口电压 70 V
- 离子滞留，计数 50,000 次

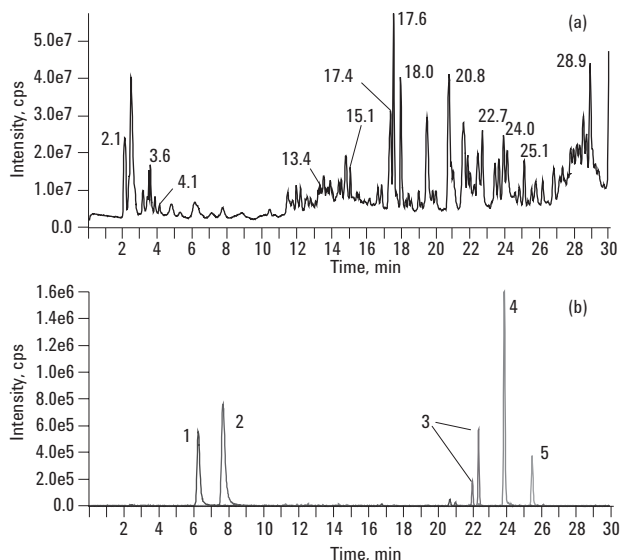


图 3. (a) 柠檬标准物溶液 (0.125 ppm) 总离子流色谱图
(b) 提取离子色谱图：多菌灵 (1)，噻苯咪唑 (2)，烯酰码啉 (3)，氧化偶氮毒杀芬 (4)，氟菌唑 (5)

结果与讨论

裂解及质量精度

图 3 显示了五种杀真菌剂的 LC 分离情况。样品含加入柠檬提取物的 0.125 mg/kg (ppm) 杀真菌剂。图 3b 显示了各个化合物的提取离子色谱图。提取物窗口很干净，说明提取离子的质量精度很高，提取离子窗口宽度可窄至 (0.02 amu) 100 ppm。图 3 提取离子的窗口为 0.1 amu。

当浓度低至 0.05 mg/kg 时，提取离子 (m/z 192, 202, 346, 388 和 404) 的色谱图仍然很干净，表明精确质量数的重要性及其在很窄的窗口提供干净色谱图的能力。在测定每个杀真菌剂的分子离子精确质量时显示精确质量的窗口。表 1 显示了每个杀真菌剂在 0.50 mg/kg 浓度时的检测结果，包括元素组成，精确质量及误差，分别以 mDa 和 ppm 表示。除烯酰码啉外，在所有水果和蔬菜介质样品的分析中均获得了高于 2 ppm 的质量精度。

表 1. 柠檬基质中五种杀真菌剂的精确质量和元素组成，浓度为 0.50 mg/kg

化合物	分子式	选择离子	$m/z_{测定}$	$m/z_{计算}$	偏差 mDa	偏差 ppm
多菌灵	$C_9H_9N_3O_2$	$[M + H]^+$	192.0767	192.07675	-0.05	0.27
噻苯咪唑	$C_{10}H_7N_3S$	$[M + H]^+$	202.0430	202.04334	-0.34	1.7
烯酰码啉	$C_{21}H_{22}NO_4Cl$	$[M + H]^+$	388.1321	388.13101	+1.1	2.5
氧化偶氮毒杀芬	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	$[M + H]^+$	404.1243	404.1242	0.20	0.50
氟菌唑	$C_{15}H_{15}N_3OF_3Cl$	$[M + H]^+$	346.0925	346.09285	-0.35	1.0

这些结果表明使用连续校正可以在分析测定复杂基质如水果和蔬菜时，在一个数量级范围内获得精确质量数。

根据纯标样在甲醇溶液中精确质量图谱，图 4a-4e 给出了每种杀真菌剂的裂解途径。即使使用相同的色谱条件，LC/MSD TOF 的碎片离子以 LC/MSD 离子阱的二级质谱图进行检验。图 4a 为多菌灵，其二级质谱图显示失去了一个甲醇 (32 Da) 而给出 m/z 160 的碎片峰。该碎片离子 m/z 160 在 LC/MSD TOF 谱图上也可以看到。

图 4b 为噻苯咪唑的裂解途径，其分子离子峰 m/z 202 中性丢失一分子的 HCN m/z 27 Da，产生了 m/z 175。

图 4c 为氧化偶氮毒杀芬的裂解途径，其分子离子峰 m/z 404，在二级质谱中失去一分子甲醇 (m/z 32 Da) 而生产 m/z 372，在三级质谱中产生的 m/z 342 的。

图 4d 为烯酰码啉的裂解途径，分子离子峰 m/z 388，二级质谱产生 m/z 301，三级质谱产生 m/z 165。

图 4e 为氟菌唑的裂解途径，分子离子峰 m/z 346，二级质谱产生 m/z 278。三级质谱产生 m/z 250。将 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 结合使用的好处在于两种仪器均适合于这些化合物的分析，它们的谱图能给出互补的结构信息及鉴定功能。

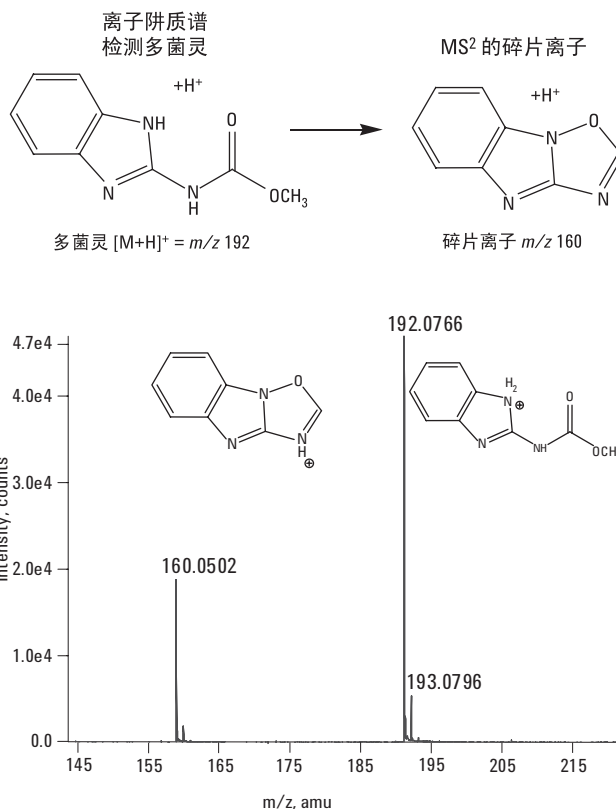


图 4a. 多菌灵的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图。

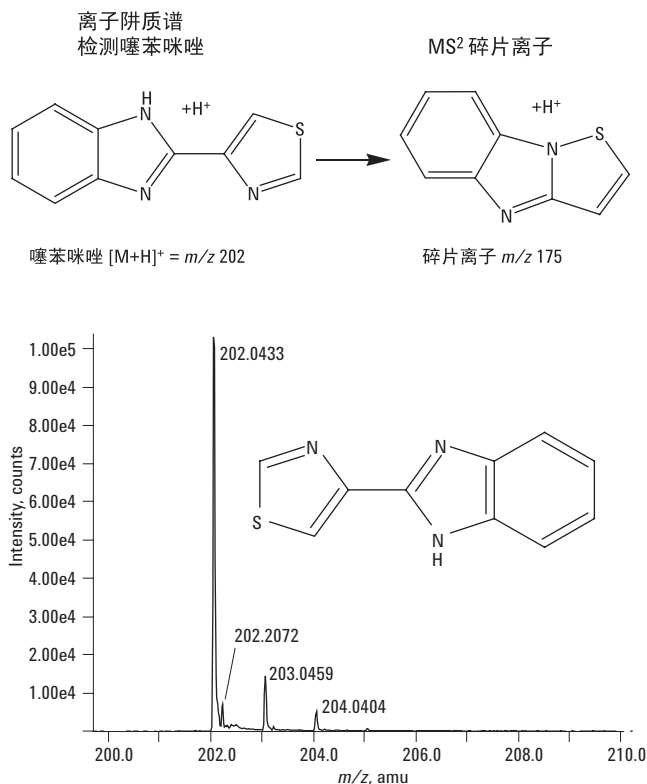


图 4b. 噻苯咪唑的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图。

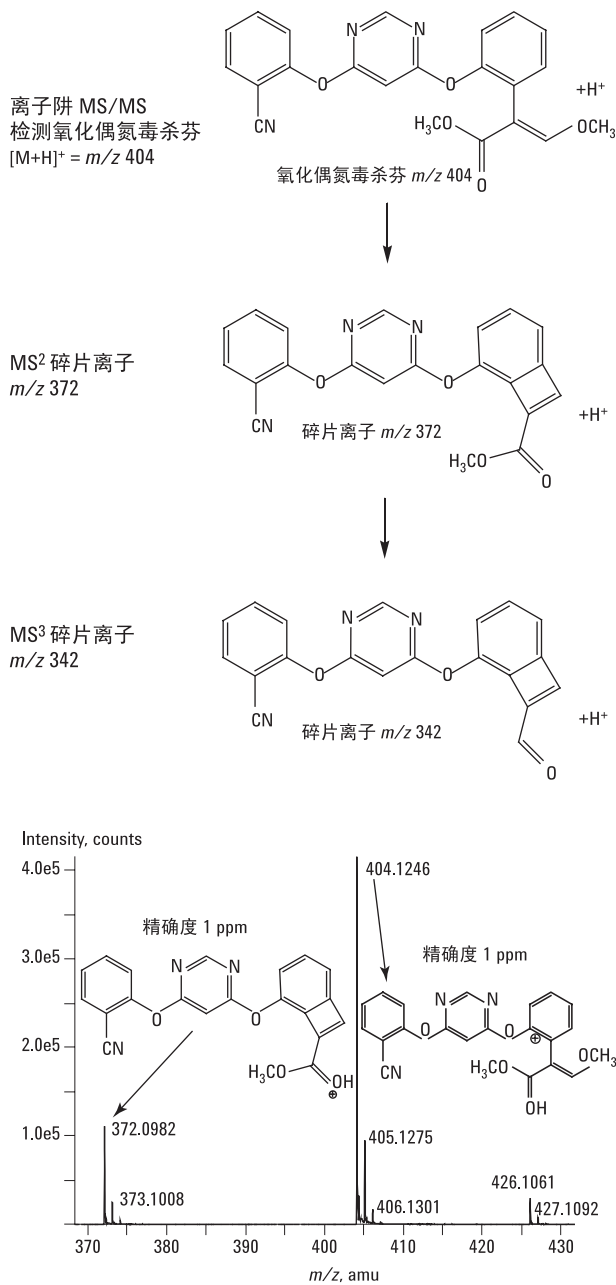


图 4c. 氧化偶氮毒杀芬的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图。

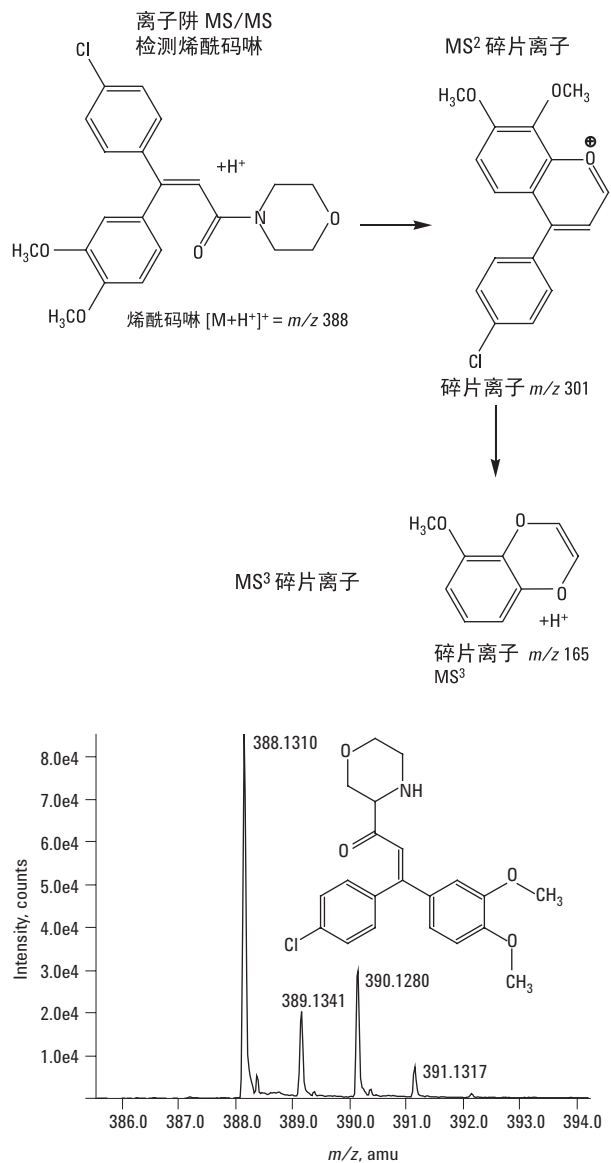


图 4d. 烯酰吗啉的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图。

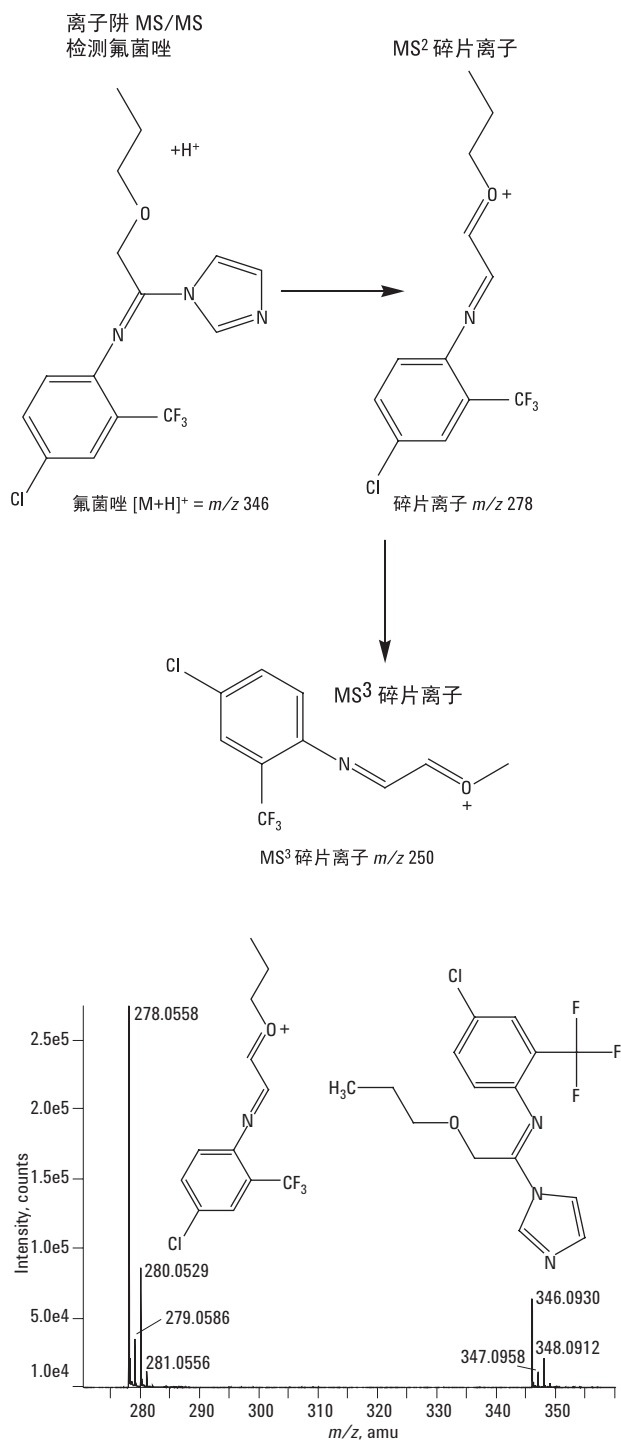


图 4e. 氟菌唑的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图。

线性和检出限

对每种水果和蔬菜基质 (桔子, 柠檬, 瓜, 菜花和柿子椒) 中待测化合物浓度从 0.01 mg/kg 至 0.5 mg/kg (ppm) 的范围内, 建立 LC/MSD TOF 和 LC/MSD 离子阱的五种杀真菌剂的校准曲线。结果显示了 LC/MSD TOF 与 LC/MSD 离子阱测定不同水果与蔬菜基质样品的相似性。比如, 图 5a-5b 显示了多菌灵和氧化偶氮毒杀芬的标准曲线。这些图表证实, 对于浓度至 0.5 ppm 的氧化偶氮毒杀芬, 噻苯咪唑, 和氧化偶氮毒杀芬的水果提取物, LC/MSD TOF 系统没有或有非常小的基质抑制效应。然而, 噻苯咪唑和烯酰码琳显示了既增加又抑制的信号 (数据没在这里显示)。信号增加的情况出现在水果如瓜, 桔子和柠檬的提取物测定中。蔬菜青椒的提取物测定无信号增加, 而菜花提取物信号受到了抑制。解释这一现象的一种可能性在于, 当流动相是大约 80% 的乙腈时, 噻苯咪唑出现的保留时间较后 (大约 26 min)。在如此高浓度的有机溶剂中 ESI 信号可能受到基质的抑制, 所以在分析未知食品样品时需要选用适当的与基质匹配的标准样。因此, 报告最准确的样品浓度的关键在于针对每种水果和蔬菜的基质配置相应的标准曲线。测定实际水果和蔬菜中未知样品时使用的就是这一方法。

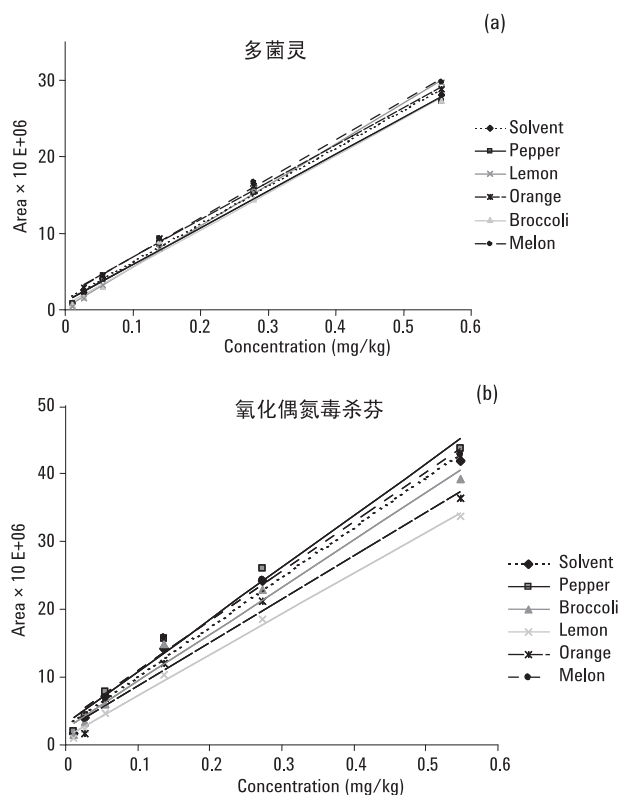


图 5. 多菌灵 (5a) 和氧化偶氮毒杀芬 (5b) LC/MSD TOF 标准曲线的重叠图。

此外，图 5a-b 表明，所有基质的样品中四种杀真菌剂在测定浓度范围内线性良好，相关系数在 0.990 – 0.999 之间。使用 LC/MSD 离子阱测定是获得了类似结果，相关系数一般在 0.990±0.001 之间。

表 2. 典型水果基质中各种杀真菌剂的标准曲线的相关系数

化合物	桔子	瓜	柠檬
多菌灵	0.998	0.997	0.999
噻苯咪唑	0.999	0.999	0.999
氧化偶氮毒杀芬	0.990	0.990	0.997
氟菌唑	0.996	0.999	0.996

表 3 列出了不同基质样品中杀真菌剂的检出限 (LODs)。表 3 的数值通常在 0.001 ppm – 0.010 ppm 之间浮动。欧洲对于无法规标准的农药设定在 0.010 ppm。所以，LC/MSD TOF 具有足够的灵敏度，可以应用于所有基质化合物的测定分析。使用 LC/MSD 离子阱也获得了近似结果的 LOD (表 4)。水果和蔬菜中各种杀真菌剂的 LOD 结果足以满足欧盟和西班牙的法规限制要求。

表 3. 三种基质中 LC/MSD TOF 分析杀真菌剂的 LOD (mg/kg)

化合物	桔子	瓜	柠檬
多菌灵	0.004	0.005	0.008
噻苯咪唑	0.005	0.010	0.005
烯酰码啉	0.005	0.002	0.008
氧化偶氮毒杀芬	0.001	0.001	0.001
氟菌唑	0.001	0.001	0.001

比如，在西班牙，多菌灵在西红柿中的限量是 0.10mg/kg，噻苯咪唑在西红柿中限量为 0.50 mg/kg，而氧化偶氮毒杀芬没有限量要求。所以，最大残留限量自动设为 0.01 mg/kg。LC/MSD TOF 对于分析测定不同水果和蔬菜中每种杀真菌剂的检出限均能满足要求。

通过 LC/MSD TOF 分析，LC/MSD 离子阱确认测定食品店中实际水果提取物中杀真菌剂的定量结果显示在表 5 中。所以，这些数据表明，LC/MSD TOF 能够测定水果及蔬菜提取物中杀真菌剂的精确质量数，并能达到 EU 监测所需检出限。

表 4. 三种基质中 LC/MSD 离子阱全扫描模式下杀真菌剂的 LOD (mg/kg)

化合物	桔子	瓜	柠檬
多菌灵	0.005	0.005	0.010
噻苯咪唑	0.005	0.010	0.005
烯酰码啉	0.005	0.003	0.010
氧化偶氮毒杀芬	0.002	0.005	0.010
氟菌唑	0.002	0.002	0.005

表 5. 通过 LC/MSD TOF 和 LC/MSD 离子阱鉴定食品店中的水果中杀真菌剂的浓度 (mg/kg)

化合物	桔子	瓜	苹果	柠檬
多菌灵	0.03	<LOD	0.1	0.5
噻苯咪唑	<LOD	0	0	0.1
烯酰码啉	0	0	0	0
氧化偶氮毒杀芬	0	0	0	0
氟菌唑	0	0	0	0

结论

- LC/MSD TOF 是鉴别水果及蔬菜中杀真菌剂的强大工具，也是环境食品化学研究的新型手段。
- 在两个数量级以上范围内轻松实现精确定量，优于 3 ppm，一般少于 2 ppm，而在我们的应用研究中对于多数化合物在正模式 ESI 下达到了令人惊奇的结果 – 1ppm!
- 杀真菌剂的元素组成和碎片离子信息可以通过 LC/MSD TOF 获得，并且可以应用 LC/MSD 离子阱进行确认。
- 水果和蔬菜中五种杀真菌剂的检出限在 0.001 – 0.010 $\mu\text{g/g}$ 。这些检出限数值与欧盟指南在水果与蔬菜中所控制的杀真菌剂限量标准相当或更好。

参考文献

1. Imma Ferrer and E. Michael Thurman, (2004) "Determination of chloronicotinyl insecticides in salad vegetables by LC/MSD TOF and LC/MSD ion trap", Agilent Technologies, publication 5989-1842EN www.agilent.com/chem
2. E. Michael Thurman and Imma Ferrer, (2005) "Identification of unknown pesticides in food using both LC/MSD TOF and Ion Trap MS", Agilent Technologies, publication 5989-1924EN www.agilent.com/chem
3. Y. Pico, C. Blasco, and G. Font, (2004) *Mass Spectrometry Reviews*, **23**, 45-85.
4. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F.J. Schenck, (2003) *Journal of AOAC International*, **86**: 412-431.
5. E.M. Thurman, I. Ferrer, and A.R. Fernández-Alba, Chapter 8: "LC/MS I. Basic Principles and Technical Aspects of LC/MS for Pesticide Analysis", in *Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*, Ed. A.R. Fernández-Alba, Elsevier, Amsterdam, 2005.

致谢

感谢 Amadeo Fernández-Alba, Almería 大学水文地质和分析化学部门提供分析支持。

更多信息

有关我们产品与服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦联系人：Jerry Zweigenbaum

ZORBAX® 是 E.I. duPont de Nemours Co. Inc. 的注册商标

安捷伦科技公司对本材料中可能有的错误或装置、性能及材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本文的信息、说明和技术指标若有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2005

中国印刷
2005 年 3 月
5989-2209CHCN

