

用液相色谱/飞行时间质谱和液相色谱/离子阱质谱分析柑橘和橙汁中采后杀菌剂及其代谢物应用

食品安全

作者

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

Michael Woodman and Jerry Zweigenbaum*
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA
*Agilent contact

摘要

本应用报告报导了用液相色谱/飞行时间质谱和液相色谱/离子阱质谱技术 (LC/TOFMS 和 LC/ITMS)，测定橙子及橙汁中两种重要的采后杀菌剂 (抑霉唑和噻菌灵) 以及抑霉唑的一种代谢产物。包括橙子样品快速制备的详细过程，以及从橙汁中分离杀菌剂和代谢物的固相萃取方法。通过用 LC/ITMS 对元素组成和碎片的精确质量数进行测定，有助于解析降解途径，对这些杀菌剂和代谢物进行鉴定。本报告还包括对来自市场的橙子和橙汁真实样品的分析结果。

前言

噻菌灵和抑霉唑广泛应用于橙子的采后处理 (图 1)，其目的是在以后几天或几周的时间内的运输过程中起到保护水果的作用。杀菌剂只对果皮表面进行处理。在欧洲和美国，水果上市之前需要对抑霉唑和噻菌灵的最大残留限 (MRL) 进行监测 [1, 2]。由于这些化合物无所不在，也经常在进口水果中被检测到 [3]。因此，要确保食品安全，就必须对许多市场样品进行检测。此外，抑霉唑很容易代谢成 1-(2,4-二氯苯)-2-(1H-咪唑-1-基) 乙醇，有时可以在橙子中检测到 [4]。在美国，要求控制抑霉唑及其代谢物的总和，因此，测定母化合物的方法还应当包括对其代谢产物的测定 [5]。

有一些文献报道了抑霉唑和噻菌灵的 LC/MS 分析方法，但涉及抑霉唑代谢产物的较少，用 LC/MS 精确质量分析的方法未见报道 [6]。本应用报告介绍了用电喷雾液相色谱/飞行时间质谱和液相色谱/离子阱质谱 (LC/TOFMS 和 LC/ITMS) 快速、同时测定水果中这两种重要的采后杀菌剂的方法。还可参考较早的一篇关于分析水果和蔬菜中多菌灵和噻菌灵的应用报告 [7]。



Agilent Technologies

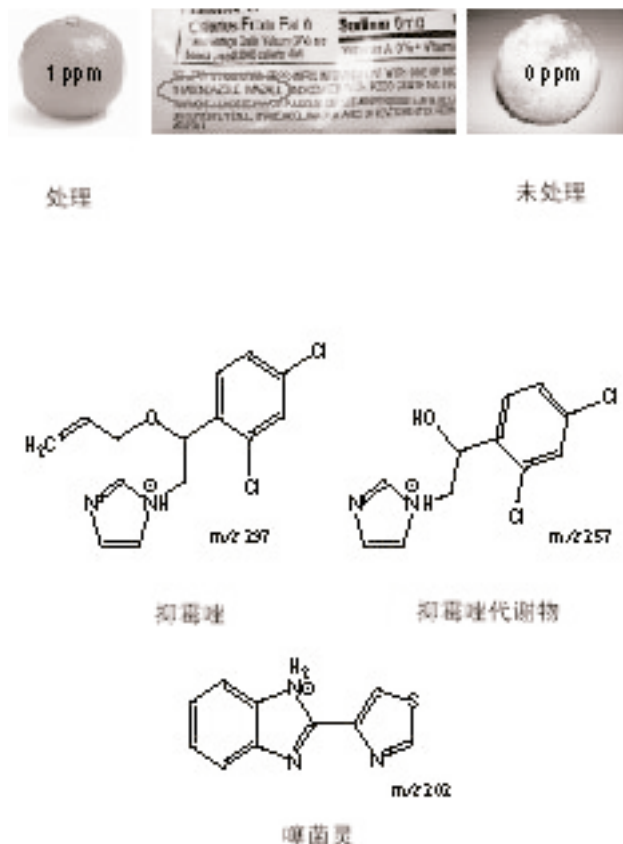


图 1. 抑霉唑、噻菌灵和抑霉唑代谢产物的结构，这些都是柑橘类（橙子和柠檬）所用的采后杀菌剂，所列为 $[M+H]^+$ 离子。上图比较了处理与未处理的橙子

实验方法

水果提取: QuEChERS

QuEChERS（快速、简便、经济、有效、耐用而安全）是从被广泛采用的食品中快速提取杀虫剂的方法 [8]。

1. 称取 15 g 匀浆样品，置 40-mL 聚四氟乙烯离心管中。
2. 加入 15 mL 乙腈（含 1% 醋酸）。
3. 加 6 g 无水 $MgSO_4$ 。
4. 加入 2.5 g $NaAc \cdot 3H_2O$ （醋酸钠，三个结晶水）。
5. 用涡旋混合器最高速或手动强烈振摇样品 1 分钟。

6. 于 3700 rpm 离心 3 分钟。
7. 取 5 mL 上清液加入 15-mL 试管中。
8. 加入 250 mg PSA 吸附剂和 750 mg 硫酸镁。
9. 涡旋混合振摇 20 秒。
10. 于 3700 rpm 再次离心 3 分钟。
11. 将 1.0 mL 上清液转移到 LC/MS 样品管中。
12. 将 1.0 mL 上清液蒸干，复溶于 8%/92% 甲醇/水中进行液相色谱/飞行时间质谱分析和液相色谱/离子阱质谱分析。

进样 50 μ L 进行水果和蔬菜提取物的 LC/TOFMS 分析。未富集样品在同一点同时直接进行 LC/TOFMS 或 LC/ITMS 分析。

果汁提取

用固相萃取 (SPE) 从果汁和果汁型汽水中提取采后杀菌剂。选择 Accubond C-18 SPE 柱芯作为填料（部件号 188-1356）。

1. 5 mL SPE 填料的处理，用 5 mL 甲醇润湿填料，然后用 5 mL 去离子水将甲醇置换出来，以确保杀菌剂的回收率。
2. 将果汁置于室温下平衡，进行 SPE 前先脱气，特别是当气泡存在时。
3. 取 5 mL 果汁离心并过滤（0.2 微米 TYPE 滤膜，去除剩余固体物质），用 5 mL 去离子水稀释。
4. 果汁过固相萃取柱，用 2 mL 去离子水冲洗。
5. 用 5 mL 甲醇洗脱。
6. 用氮气将甲醇吹至 200 μ L。
7. LC/TOFMS 或 LC/ITMS 进样前用去离子水 1:3 稀释。

LC/TOFMS 方法

LC 泵	安捷伦 1100 二元泵, 进样量 50 μ L (用 Agilent 1100 标准自动液体进样器进样)
色谱柱	ZORBAX® Eclipse XDB-C8, 4.6 mm x 150 mm, 5 μ m, 产品号 993967-906
流动相	A = 乙腈, B = 0.1% 甲酸水溶液
梯度	10% A 5 分钟等强度洗脱, 然后经 30 分钟线性梯度洗脱至 100% A, 流速 0.6 mL/min
仪器	安捷伦 LC/MSD TOF 飞行时间质谱仪, 带双电喷雾离子源, 正离子 ESI, 毛细管 4000 V
雾化器	40 psig
干燥气体	9 L/min 300 °C
电压	裂解器 190 V, 锥孔 60 V, Oct DC1 37.5 V, OCT RF V 250 V
参考质量	m/z 121.0509 和 922.0098
分辨率	9500 \pm 500 @ m/z 922.0098
质量范围	50–1000 m/z
流速	在分析过程中参考 A 喷雾器 2 为恒定流速

LC/ITMS 方法

色谱	与 LC/MSD TOF 方法一致, 进行色谱峰的比较
LC 泵	Agilent 1100, 进样量 50 μ L
色谱柱	ZORBAX Eclipse XDB-C8, 4.6 mm x 150 mm, 5 μ m, 产品号 993967-906
流动相	A = 乙腈, B = 0.1% 甲酸水溶液
梯度	10% A 5 分钟等强度洗脱, 然后经 30 分钟线性梯度洗脱至 100% A, 流速 0.6 mL/min
仪器	Agilent LC/MSD 离子阱, 正离子 ESI, 毛细管 3200 V, 雾化器 40 psig, 干燥气体 9 L/min, 气体温度 300 °C, 毛细管出口 70 V, 锥孔 60 V
检测	离子阱捕获, 最长捕获时间 200 ms, 50,000 次

结果和讨论

橙子中的抑霉唑

图 1 中有两个橙子, 一个用采后杀菌剂 (抑霉唑和噻菌灵) 进行了处理, 另一个没有处理。请注意, 没有用采后杀菌剂处理的橙子上长了很多霉菌。用采后杀菌剂处理的目的是要防止水果在运输和销售过程中出现霉变。这种处理是直接撒在果皮上, 而不是对整个水果进行处理, 因此对消费者危害较小。

图 2 显示了对橘皮提取物的色谱分离, 有两个大峰, 很可能是采后杀菌剂, 抑霉唑和噻菌灵。用下列技术对其进行了鉴定。得到了每个峰的精确质谱图, 测定了 A+2 同位素峰 (图 2 和图 3)。例如, 根据质谱图怀疑 17.9 分钟的峰含氯 (图 3)。实际上, 从 $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ 信号的相对强度以及两个质量之间的精确质量差, 就可以很容易地计算出化合物中的氯原子数。如图 3 所示, m/z 297 峰是 297.0556, ^{37}Cl 同位素信号为 299.0527, 相对强度为主峰的三分之二。两个信号间的质量差为 1.9971 与 ^{35}Cl (34.9689) 和 ^{37}Cl (36.9659) (1.9970) 之间的质量差非常接近。结合峰面积的证据表明, 未知化合物中肯定含氯原子。

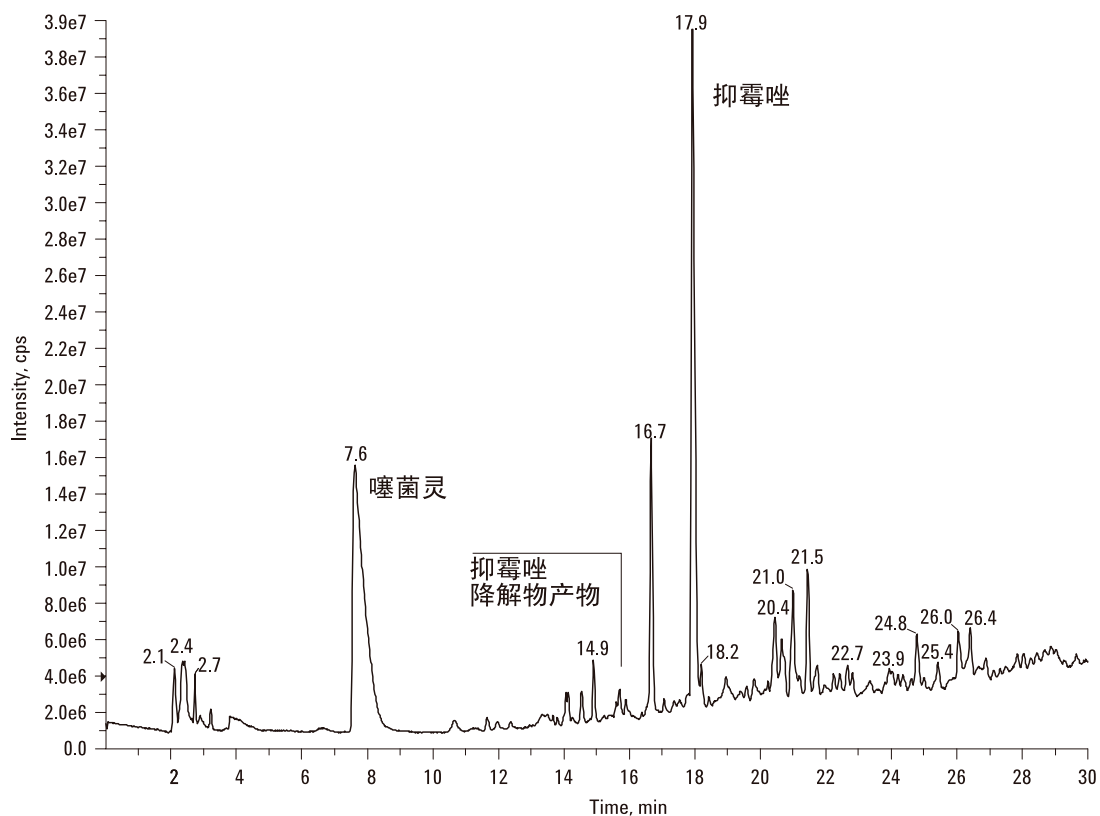


图 2. 橘皮的 LC/MSD TOF 总离子流图 (TIC)，注意，色谱图中的两个大峰是抑霉唑和噻菌灵

此外，同位素信号的相对丰度说明，氯有两个同位素原子 (^{35}Cl : ^{37}Cl 的天然分布差不多是 3:1 (75.77% ^{35}Cl ; 24.23 % ^{37}Cl))，两个氯原子的特征图谱见图 3。由此可见，对怀疑样品元素组成的认定非常容易。用 TOF 软件的计算器，作为一个严格的标准，我们设定氯原子数为 2。采用精确误差阈值 3 ppm (LC/MSD TOF 的最大误差)，只搜索到了一个结构式

($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{OC}_{12}$, 0.3 ppm 偏差)。这个结构式是在“Merck 索引”数据库中找到。Merck 索引的使用在另一篇应用报告中介绍 [9]。可以认为在测定的离子中还有一个氢原子，因为在结构式输入数据库时，正离子电离模式必须从计算器提供的元素组成中扣除。Merck 索引给出了抑霉唑唯一的结构式。

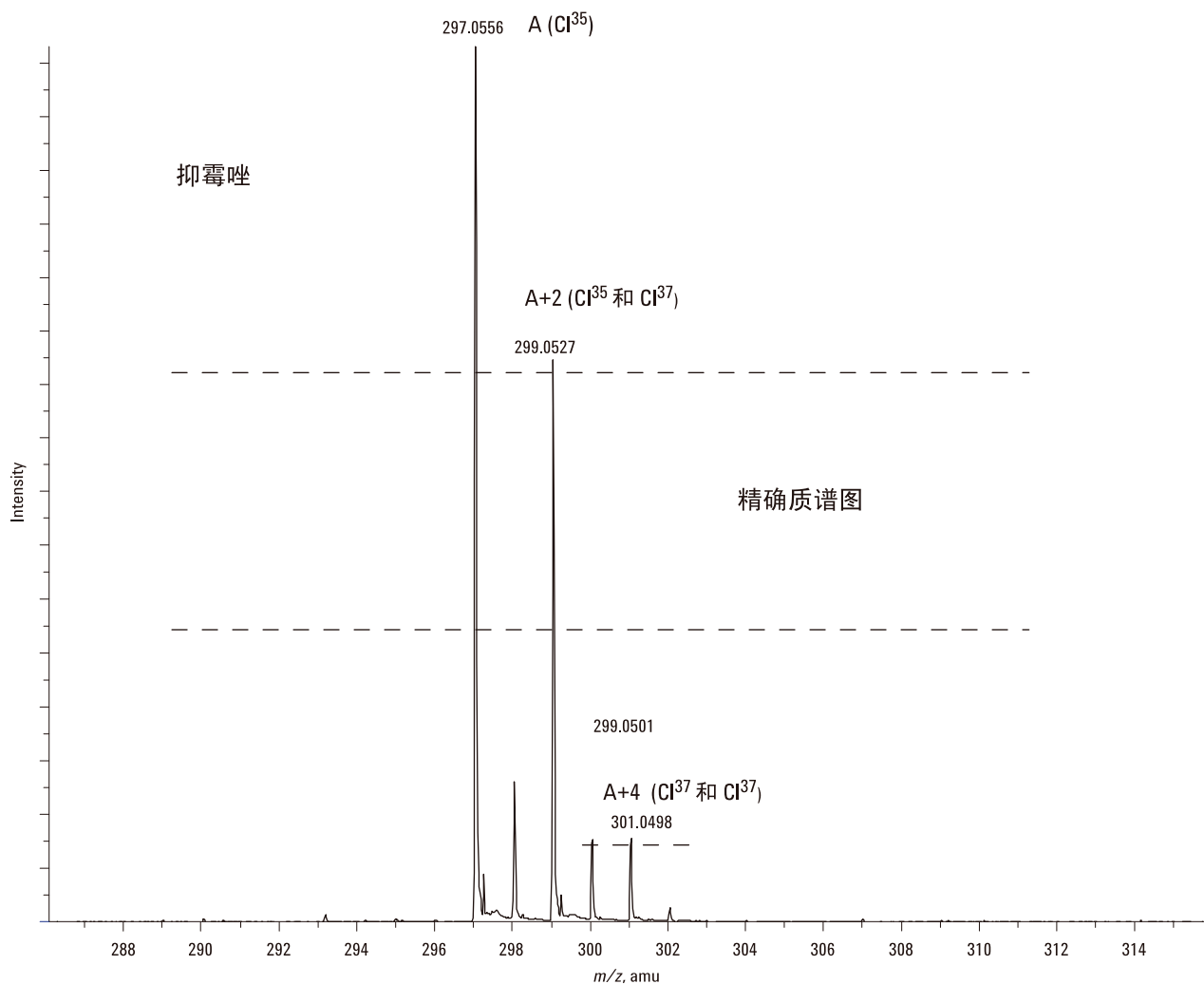


图 3. 橘皮中抑霉唑的检测，测定的精确质量数为 $m/z = 297.0556$ ，理论质量数为 297.0556 ，精确度 0.3 ppm ，结构式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{OCl}_2$

同样，7.6 分钟的质谱图见图 2，和图 4， m/z 202.0434。同位素信号的相对丰度说明，可能有一个原子的硫。A+2 峰的相对强度是 4.2%， ^{32}S (31.9721) 和 ^{34}S (33.9679) 之间差 1.996 道尔顿。图 4 中显示的质谱图质量差为 1.997，峰高为 4.7%，与预测值相当接近。

因此，这些数据表明有 1 个硫原子。输入质量数 m/z 202.0434，得到唯一的结构式 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_3\text{S}$ ，这是噻菌灵质子化的结构式（根据 Merck 索引）。下一步是用 LC/MS 离子阱检测分子裂解的碎片，以进一步确证结构。

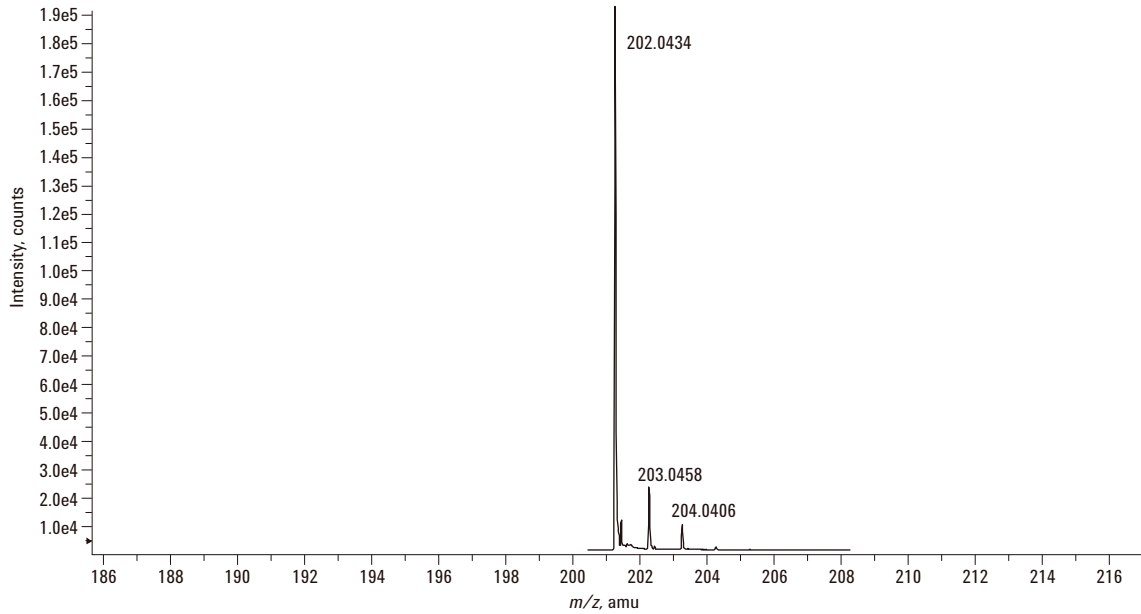


图 4. 噻菌灵的 LC/MSD TOF 质谱图

抑霉唑的裂解

下一步的研究工作是对杀虫剂的特殊碎片离子进行鉴定，以确认抑霉唑的鉴定。用 LC/ITMS 三级 MS 对 17.9 分钟大峰的裂解途径进行了测定。通过裂解途径验证 LC/TOFMS 检测得出的抑霉唑结构是否合理。图 5 显示了未知峰裂解离子的结构。 m/z 255 离子为丢失 42 的结果。 m/z 255 的 MS/MS 得到 m/z 187 和 159 离子，建议的结构见图 5。 m/z 159 可能为双氯离子。所有结构都符合抑霉唑的推论。

接下来要用 LC/TOFMS 测定精确质谱图。在这里，质子化分子有两个相对丰度分别为 5% 和 10% 的碎片离子。碎片 1 的精确质量为 255.0084 (表 1)，和 m/z 257.0055 的 ^{37}Cl 信号 (未显示数据)。从这两个信号的相对强度和质差来看，抑霉唑的两个氯在这个碎片中。

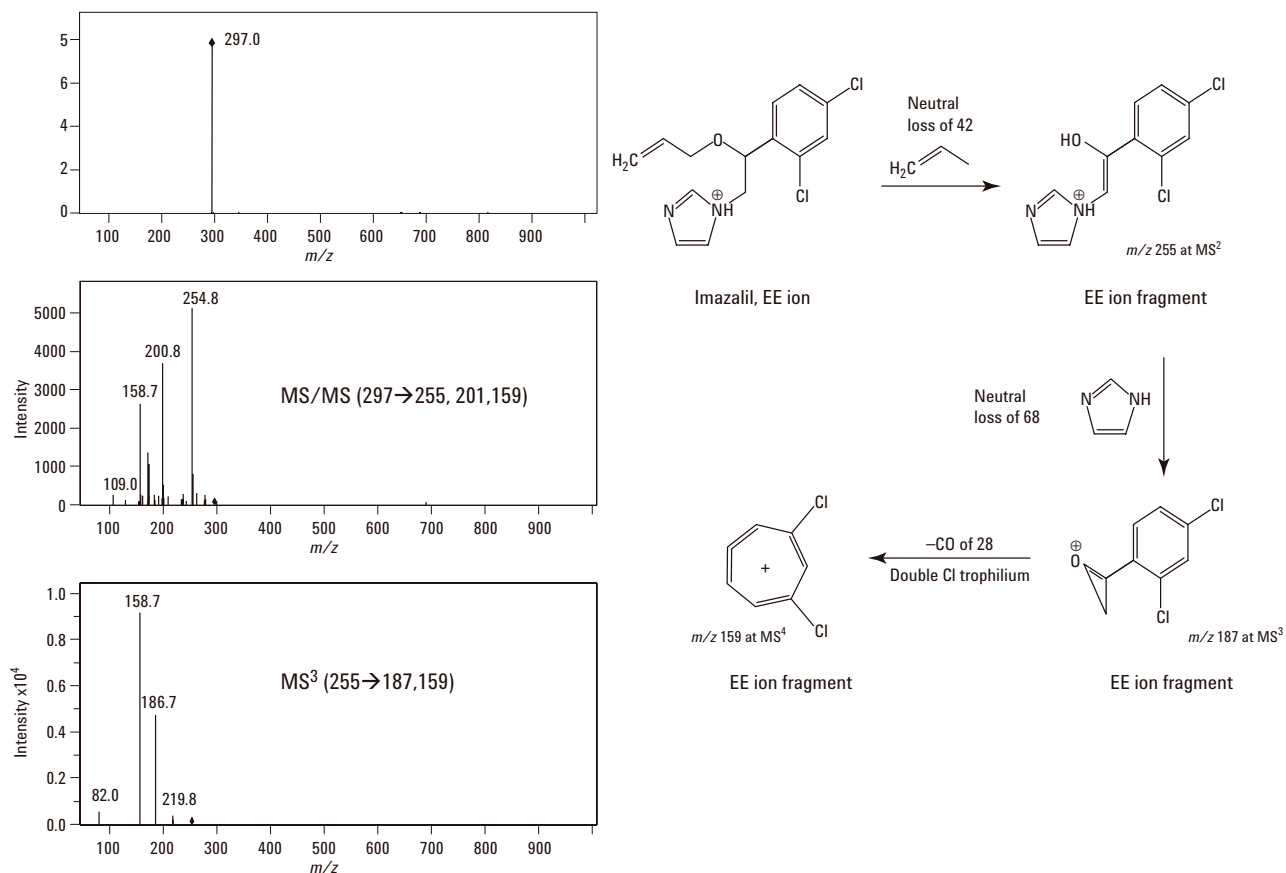


图 5. 二级质谱和三级质谱显示了抑霉唑的裂解途径

从表 1 中可见，这些碎片的精确质量数在计算工具中也给出了三种可能的元素组成。第一种结构式 ($C_{11}H_9N_2OC_{12}$) (-0.8 ppm 偏差) 符合建议的结构，包括丢失与母离子相关的 C_3H_6 (精确质量数丢失为 42.0469 对 42.0465 u)。此外，精确质谱图 (相对强度和质荷比) 证明在碎片 2 中有两个氯原子。测出的质量数 (m/z 158.9762) 给出了一个唯一的元素组成 ($C_7H_5Cl_2$)，与双氯化卓_碎片离子的结构式相当。在此，我们把从 LC/MSD 得到的裂解信息，抑霉唑的建议结构如图 5 所示，和精确质量信息结合起来，对抑霉唑就有了一个完整的匹配鉴定。

来自两方面的证据 (LC/TOFMS 和 LC/ITMS) 提供了碎片离子和信息，不需要使用对照品，就将根据母离子结构的裂解确证抑霉唑的鉴定。同样，用离子阱检测噻菌灵，得到 m/z 175 碎片离子，符合噻菌灵的结构。这里没有列出数据，但对噻菌灵的鉴定可参见以前的应用报告 [9]。然后，我们在用对照品进行最后的确证。

表 1. 抑霉唑的 LC/MSD TOF 碎片离子

<i>m/z</i> 实验	元素 组成	<i>m/z</i> 计算	偏差 ppm	备注
297.0556	C₁₄H₁₅N₂OCl₂	297.0556	<0.1	抑霉唑
	C ₃ H ₁₅ N ₈ O ₄ Cl ₂	297.0588	-8.3	-
	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ OSCl ₂	297.0590	-9.0	-
255.0084	C₁₁H₉N₂OCl₂	255.0086	-0.8	碎片 1
	C ₉ H ₇ N ₅ Cl ₂	255.0073	4.3	-
	C ₈ H ₁₁ NO ₄ Cl ₂	255.0060	9.4	-
158.9762	C₇H₅Cl₂	158.9763	-0.6	碎片 2

抑霉唑的代谢物

在橙子提取物中，我们发现有一个峰（保留时间 14.9 分钟，见图 2），与抑霉唑（两个氯原子）的同位素丰度相同。认为它有同样的氯原子数，在抑霉唑之前出峰，我们认为它可能与抑霉唑相关，也许是其代谢产物。该离子的精确质量数是 257.0245，³⁷Cl 信号 259.0216（见图 6）。在计算工具中给出了唯一的元素组成：C₁₁H₁₀N₂OCl₂（0.8 ppm 偏差，见表 2）。为了进行确证，我们检索了其他的碎片，但没有找到 TOF 和 LC/TOFMS 的特征碎片离子。然后检索两个数据库（Merck 索引和 ChemIndex）寻找元素组成，没有结果。我们再在 Sigma-Aldrich 商业电子目录中检索元素组成，发现了唯一的匹配：1-（2，4-二氯-苯基）-2-咪唑基-乙醇。这个化合物的结构见图 1，符合抑霉唑的降解（见图 6 *m/z* 255 离子）。提示，这个降解产物是“中性”物质，相对于抑霉唑在同一位点断裂，产生 *m/z* 255 碎片。

对抑霉唑降解产物所得数据和报告的文献检索与我们的结果一致（抑霉唑代谢物，R14832）[4]。实际上，在美国，控制的是抑霉唑和抑霉唑代谢物的总和，所以也需要对抑霉唑代谢物残留进行检测 [4]。最后，我们用标准对照降解产物进行了确证。

表 2. 橘皮甲醇提取物中抑霉唑、抑霉唑降解产物和噻菌灵的精确质量数和元素组成

化合物	结构式	选择 离子	实验 <i>m/z</i>	计算 <i>m/z</i>	偏差	
					mDa	ppm
抑霉唑	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	297.0556	297.0556	+0.1	0.3
抑霉唑降解产物	C ₁₁ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	257.0245	257.0243	+0.2	0.8
噻菌灵	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	[M+H] ⁺	202.0434	202.0434	+0.2	<0.1

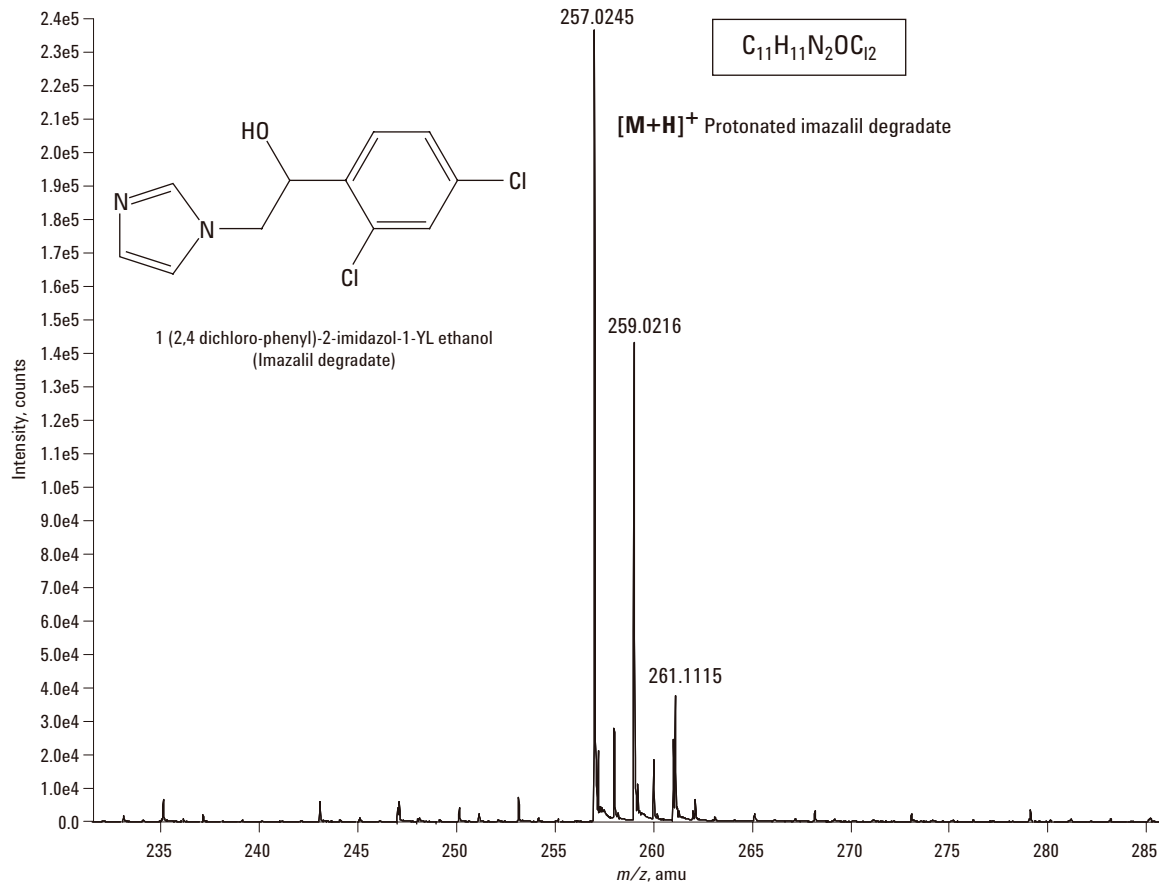


图 6. 抑霉唑降解产物的 LC/MSD TOF 图谱

橙汁中抑霉唑的鉴定

图 7 和图 8 显示了橙汁中 LC/TOFMS 色谱图（见 18.0 分钟的色谱峰）和抑霉唑的鉴定 (m/z 297.0556)。分析了几个样品，只有这个样品中含抑霉唑。这可能是因为在橙汁的制作中通常不会压榨果皮。但是，有些“榨汁机”压榨的是整个橙子，不去皮。在这个例子中，也存在橙汁中包含杀菌剂的可能性。请注意，不管橙汁提取物的基质和色谱图多么复杂，LC/TOFMS 分析都能得到良好的结果。

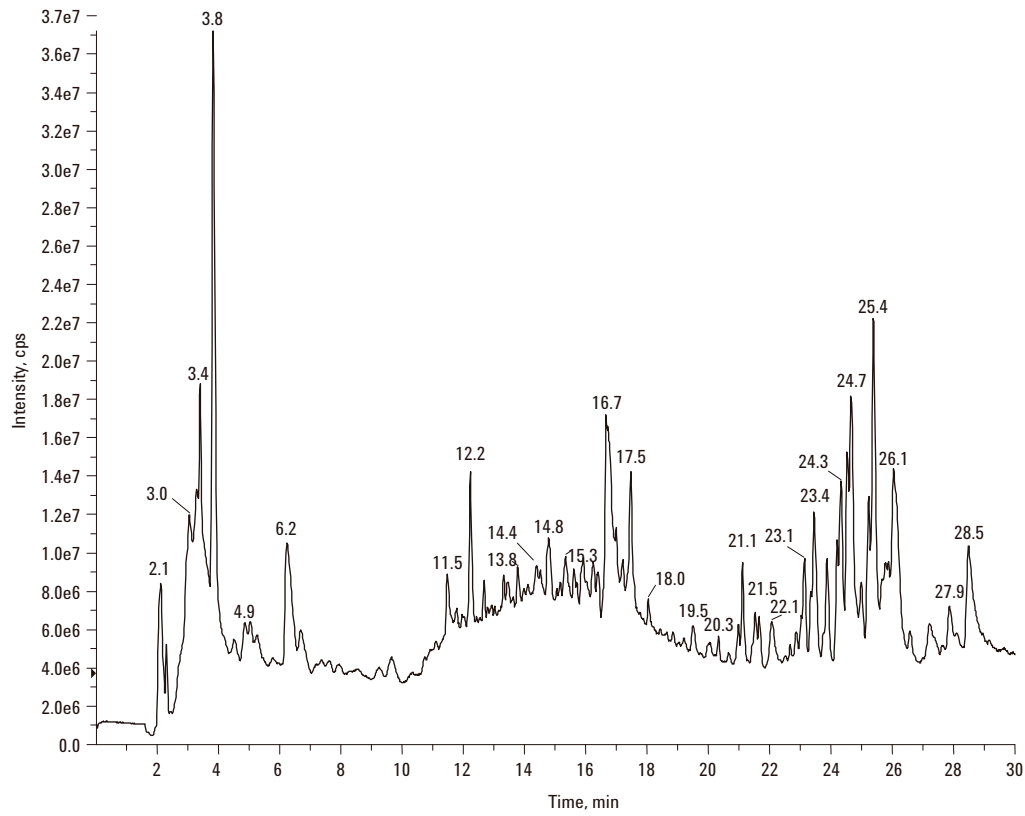


图 7. 橙汁提取物的 LC/MSD TOF 总离子流图

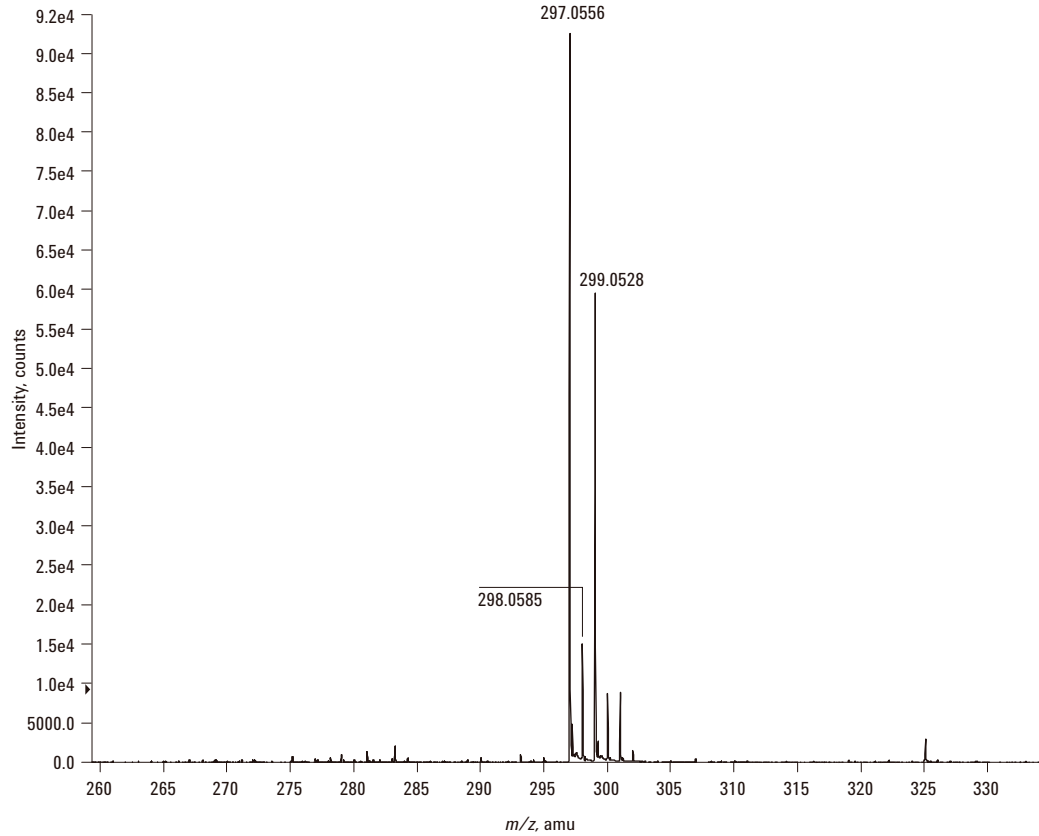


图 8. 由果皮制成的橙汁的 LC/MSD TOF 质谱图

结论

- LC/TOFMS 分析是水果和果汁中杀菌剂及其代谢物的有力分析工具，是环境食品化学的新工具。
- 标准和碎片离子的元素组成和结构碎片可以用离子阱 MS/MS 确证。
- 在抑霉唑这个例子中，使用 LC/TOFMS 和 LC/ITMS，可以不用标样而进行代谢物的鉴定。浓度与对水果和果汁中杀菌剂控制的 EU 指令性标准相当或更低。

参考文献

1. EU Food Directives 2002, 91/414/EEC.
2. Food Quality Protection Act, 1998 (FQPA).
3. M. Fernandez, R. Rodriguez, Y. Pico, J. Manes, (2001) *J. Chromatogr. A* **912**, 301–310.
4. N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi, (2004) *J. Chromatogr. A*, **1022**, 145–150.
5. <http://www.epa.gov/pesticides/registration/imazalil/ImazProductChem.pdf>.
6. E. M. Thurman, Imma Ferrer, Jerry A. Zweigenbaum, Juan F. García-Reyes, Michael Woodman, and Amadeo R. Fernández-Alba, (2005) Discovering Metabolites of Post-Harvest Fungicides in Citrus with LC/MS TOF and Ion Trap MS/MS, *J. Chromatogr.*, in press.
7. Determination of Fungicides in Fruits and Vegetables by LC/MS/ESI/TOF and LC/MS Ion Trap, Agilent Technologies, publication 5989-2209EN www.agilent.com/chem
8. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F.J. Schenck, (2003) *J. AOAC Internat.*, **86**, 412–431.
9. Identification of Unknown Pesticides in Food Using Both LC/MSD TOF and Ion Trap MSⁿ, Agilent Technologies, publication 5989-1924EN www.agilent.com/chem

了解更多信息

要了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

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，恕不另行通知。

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

© 安捷伦科技公司版权所有 2005

中国印刷
2005 年 4 月 9 日
5989-2728 CHCN

