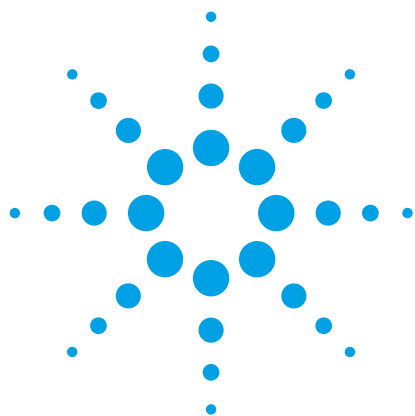




采用安捷伦 Bond Elut Plexa 萃取柱和 Poroshell 120 色谱柱结合 LC/MS/MS 分析苹果汁中的杀菌剂及其代谢物

应用简报

食品检测和农业

作者

Irina Dioumaeva
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用报告介绍了一种简单的样品制备方法结合 LC/MS/MS 对苹果汁中的杀菌剂残留进行分析。建立了一种能够同时检测 3 种重要内吸性杀菌剂——多菌灵、噻菌灵、抑霉唑及其代谢物的分析方法，且此方法可以扩展应用到范围更广的农药中去。这是一种无需任何预浓缩即可得到干净提取液的简便快速方法，且该方法检出限可达 2 ppb 以下。采用磷酸三苯酯作为内标进行定量分析。每个被测物在 3 个浓度水平（10 ppb、50 ppb 和 250 ppb）下均有极好的准确度（回收率%）和精度（变异系数 CV %）。

引言

杀菌剂是一类用于抑制真菌生长的农药。由于食品中的杀菌剂残留引起人们对健康问题的广泛关注，因此欧洲、美国和其他许多国家都对其残留进行监管。多菌灵和噻菌灵属于苯并咪唑类杀菌剂，而抑霉唑属于咪唑类农药。鉴于抑霉唑很容易代谢成 α - (2,4-二氯苯基) -1H-咪唑-1-乙醇，在抑霉唑的监管上，美国要求监测其母体及其代谢物的总和。



Agilent Technologies

苯并咪唑类杀菌剂广泛应用于农业中的植物疾病控制和水果的采后处理。在美国，多菌灵（MBC）并没有登记使用，但在很多出口水果和果汁到美国的国家中多菌灵的使用却是合法的。另外，多菌灵是甲基硫菌灵（TM）的代谢物或降解物，后者被允许用于美国的许多农作物和草坪，这增加了人们接触到多菌灵残留的潜在风险。噻菌灵和抑霉唑最常用于包括苹果在内的水果的采后处理如储藏和运输，且这两种化合物在美国是允许使用的。

本文建立的简单提取程序可为目标被测物提供可重现的高回收率，这归功于安捷伦 Bond Elut Plexa 的优越性能，这是一种为提高分析性能和易用性而设计的聚合物吸附剂。该吸附剂对于很多分析物均具有优越的保留性能，此外，由于小粒径的 Bond Elut Plexa 填料不易引起堵塞，所以它能为小柱提供快速而可重现的流速。Bond Elut Plexa 提取物的洁净度降低了离子抑制效应，延长了 HPLC 色谱柱的寿命并使质谱仪器免受污染。

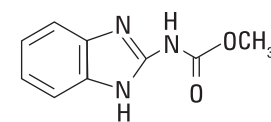
填充 2.7 μm 表面微粒多孔填料的安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱与亚 2 微米 UHPLC 色谱柱具有相似的柱效，但背压降低了 40%。液相色谱系统分析时的实际压力不会超过 400 bar。

高灵敏度的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统搭配 AJST 电喷雾离子源能为 4 个目标被测物提供低至 2 ppb 的优异检测性能。由于它大大低于任何现有的测试要求，我们的提取方法可以用灵敏度较低的老型号质谱仪检测，如 Agilent 6410 三重四极杆液质联用系统。使用灵敏度比 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统低的质谱检测器时，可以考虑在萃取过程中复溶这一步对样品进行预浓缩。

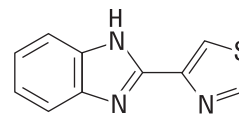
之前安捷伦已经建立了苹果汁中多菌灵与噻菌灵的检测方法 [1]，该方法使用 Agilent Bond Elut SCX SPE 小柱净化，采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.5 μm 色谱柱结合带有可变波长检测器的 Agilent 1200 系列液相色谱系统进行检测。

实验部分

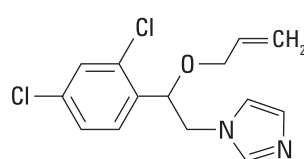
被测物



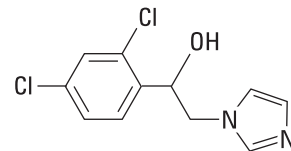
多菌灵 $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2$
m.w. 191.19
pKa 4.5 LogP 1.5



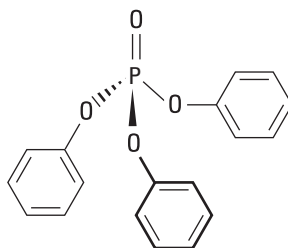
噻菌灵 $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$
m.w. 201.25
pKa 4.7 LogP 2.4



抑霉唑 $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$
m.w. 297.18
pKa 6.5 LogP 3.8



抑霉唑代谢物 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$
m.w. 257.12
LogP 2.6



磷酸三苯酯 $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$
m.w. 326.28
LogP 4.7

图 1. 被测物的结构和基本信息

农药标准品购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。内标（磷酸三苯酯）由安捷伦科技公司 (Wilmington, DE, USA) 提供。用甲醇配制成储备液（多菌灵的浓度为 0.25 mg/mL，其他 3 个被测物和内标的浓度为 1 mg/mL），并保存于 -20°C 。

材料与仪器

SPE: 安捷伦 Bond Elut Plexa 小柱 30 mg, 3 mL
(部件号 12109303)

安捷伦 VacElut 20 固相萃取装置 (部件号 12234100)

安捷伦活塞阀 (部件号 12234520)

安捷伦硅烷化自动进样小瓶, 2 mL (部件号 5183-2072)

安捷伦自动进样小瓶的螺纹口盖 (部件号 5182-0717)

LC: 安捷伦 Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 50 mm, 2.7 μ m 色谱柱 (部件号 699775-902)

Agilent 1260 Infinity LC 系统 (G1379B 微脱气机, 低延迟体积配置的 1312B 二元泵, G1367E 自动进样器, G1330B 恒温器)

MS: 配置 AJST 电喷雾离子源的 Agilent 6460A 三重四极杆液质联用仪

样品制备

前处理

向 0.5 mL 的苹果汁中添加 TPP (内标) 使浓度为 50 ppb, 建议使用 12 x 75 mm 的玻璃试管。用色谱纯的水按 1:3 稀释, 涡旋, 如浑浊需离心。澄清的苹果汁无需离心。

提取

1. 用 0.5 mL 甲醇对 Bond Elut Plexa 小柱进行活化 (先浸透再滴放)
2. 直接上样或者上清液上样
3. 淋洗 1:1 mL 水
4. 淋洗 2:1 mL 30:70 的甲醇水溶液
5. 真空干燥 5~10 min (10~15 in Hg)
6. 用 1 mL 乙酸乙酯/异丙醇 (80:20) 进行洗脱。先浸泡, 再将洗脱液滴至收集瓶中。待洗脱液完全流出后, 于柱上加低真空 (2~3 in Hg)
7. 洗脱液在 55 °C 条件下用氮气流吹干
8. 用 0.5 mL 初始流动相复溶 (10% 甲醇、90% 水、0.1% 甲酸)

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A:	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B:	0.1% 甲酸甲醇溶液
进样量:	5 μ L
流速:	0.5 mL/min
梯度洗脱	时间 (min) % B
	0.0 10
	0.5 10
	2.0 50
	3.0 95
	7.5 95
	7.1 10

停针时间: 7.2 min

平衡时间: 2.5 min

最大泵压力: 400 bar

洗针: 甲醇/水 (75:25) 洗针时间 10 s

禁止重叠进样

无自动降低延迟体积功能

MS 条件

ES 离子源参数

离子模式:	正离子
毛细管电压:	2800 V
干燥气流速:	12 L/min
干燥气温度:	350 °C
雾化气压力:	40 psi
鞘气流速:	12 L/min
鞘气温度:	300 °C
喷嘴电压:	0 V

MS 参数

扫描模式： 动态 MRM

预运行脚本： SCP_MS DiverterValveToWaste()
{MH_Acq_Scripts.exe}

时间段#1:1.5 min 后切入 MS

电子倍增管电压： (+) 400 V

结果与讨论

4 种目标杀菌剂和内标 (TPP) 在 Bond Elut Plexa 小柱上均能得到有效的保留。Bond Elut Plexa 小柱中的吸附材料是极性增强的中性聚苯乙烯-二乙烯苯。这种吸附剂广泛适用于非离子型酸性、中性与碱性物质的提取。我们建立了一种非常简单的萃取方法，其中唯一的前处理是用水稀释苹果汁。如果苹果汁中有大量的果肉还需要进行离心，但大多数的苹果汁无需这一步骤。上样和淋洗步骤靠重力流动完成。只需在洗脱前加真空干燥 SPE 柱，洗脱后加真空使洗脱步骤回收率最大化。

本文建议将第二次淋洗时的甲醇浓度由 5% (通用方法) 增加到 30%，会显著减少基质干扰。这使较早流出的多菌灵和噻菌灵的 LC/MS/MS 灵敏度提高 30%，抑霉唑代谢物灵敏度提高 20%。抑霉唑峰面积保持不变。与 100% 甲醇相比，组合洗脱液 (乙酸乙酯/异丙醇 (80:20)) 对 4 个目标化合物的回收率略微有所提高，而疏水性强的内标 (TPP) 的回收率大约提高了 2 倍。

表 1 列出了 4 种杀菌剂和内标的动态 MRM 转换参数，依次为定量转变通道和定性转变通道。

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱在 5 分钟内实现对 4 种杀菌剂和内标的分离。图 2 是苹果汁中添加 4 种杀菌剂 (2 ppb) 和内标 (50 ppb) 的 MRM 谱图。所有峰的信噪比均大于 100:1。显然，每个被测物的检测限均能达到 ppt 水平。每个样品前 1.5 分钟的流出液切入废液以使离子源的污染最小。

表 1. 动态 MRM transitions

化合物名称	是否内标?	母离子	MS1 分辨率	子离子	MS2 分辨率	裂解电压 (V)	碰撞能量 (V)	保留时间	保留时间窗口	极性
多菌灵	☐	192.1	Unit	160.1	Wide	95	15	2.2	2	正
多菌灵	☐	192.1	Unit	132.1	Wide	95	35	2.2	2	正
噻菌灵	☐	202	Unit	175	Wide	110	27	2.5	2	正
噻菌灵	☐	202	Unit	131.1	Wide	110	35	2.5	2	正
抑霉唑代谢物	☐	257	Unit	125	Wide	110	32	2.9	2	正
抑霉唑代谢物	☐	257	Unit	69	Wide	110	22	2.9	2	正
抑霉唑	☐	297.1	Unit	159	Wide	130	23	3.6	2	正
抑霉唑	☐	297.1	Unit	69	Wide	130	22	3.6	2	正
磷酸三苯酯	☒	327.1	Unit	77	Wide	170	40	4	2	正
磷酸三苯酯	☒	327.1	Unit	152	Wide	170	45	4	2	正

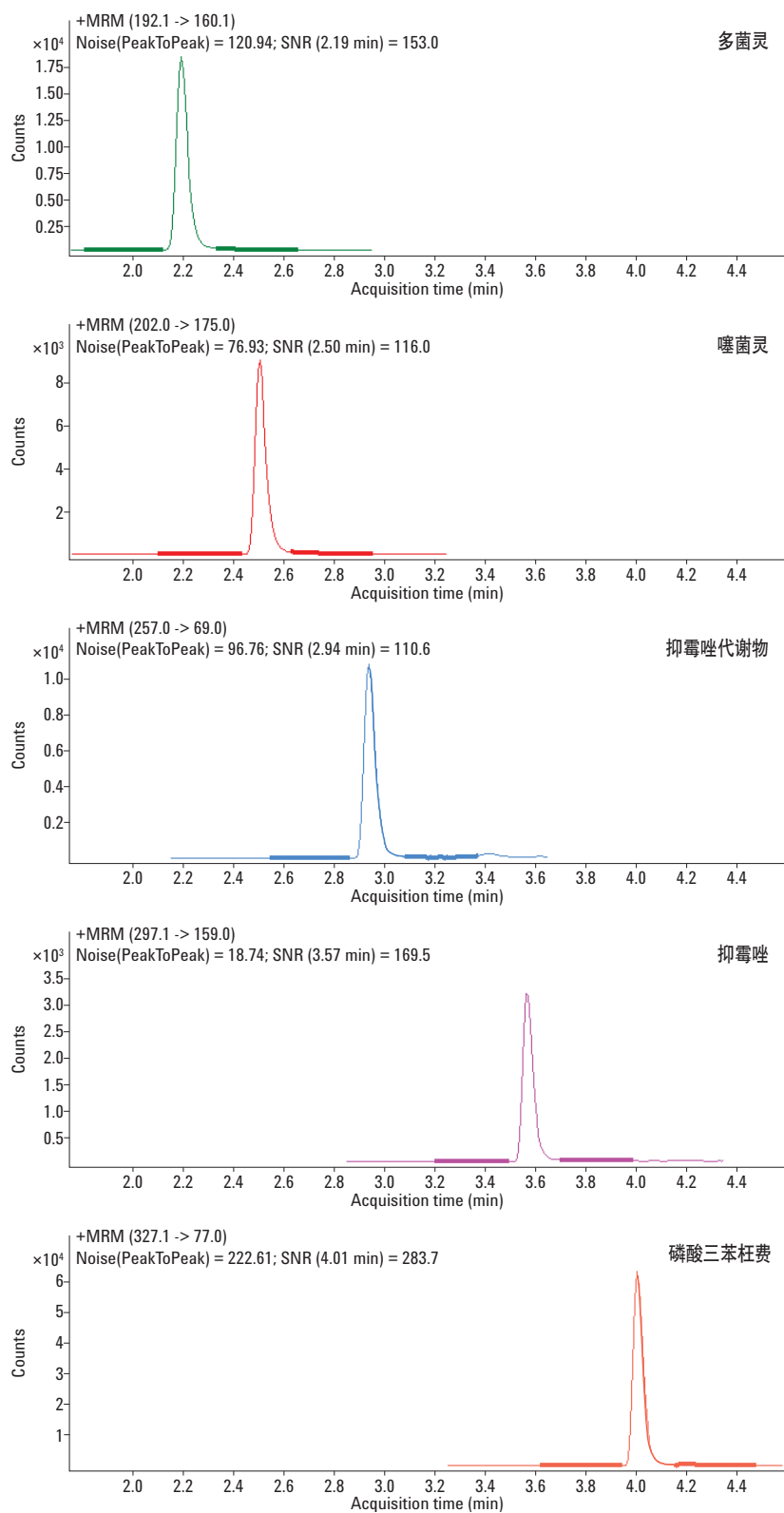


图 2. 苹果汁萃取液中 4 种杀菌剂 (2 ppb) 和 TPP (50 ppb) 的 MRM 提取离子色谱图
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm 2.7 μm 色谱柱。粗线所示为噪音区域

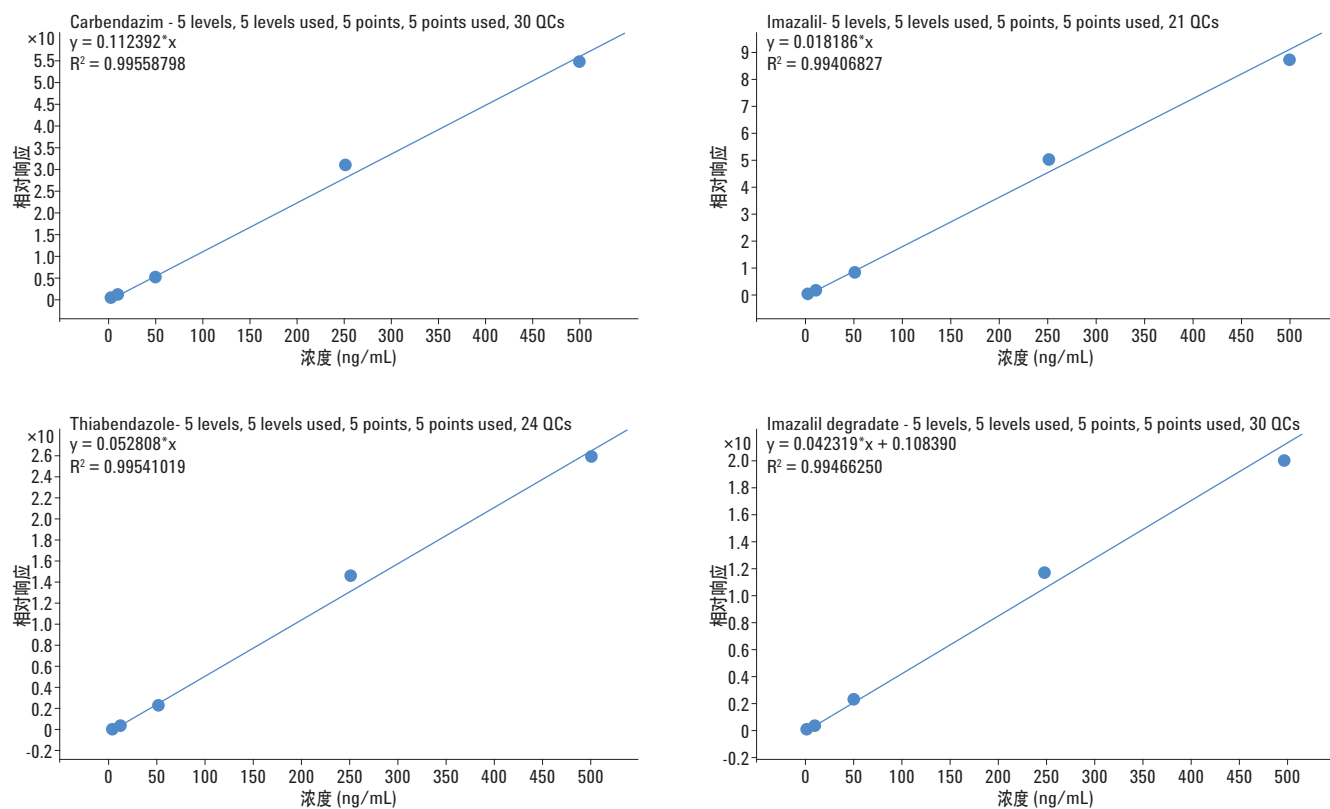


图 3. 苹果汁萃取液中 4 种杀菌剂的校正曲线。线性范围为 2.0~500 ppb。所有的拟合方程线性良好， $R^2 \geq 0.994$

表 2. 苹果汁中杀菌剂测定方法的验证， $n = 5$

化合物名称	R^2	10 ppb		50 ppb		250 ppb	
		回收率 (%)	变异系数 (%)	回收率 (%)	CV (%)	回收率 (%)	变异系数 (%)
多菌灵	0.996	95.7	1.1	94.1	0.4	107.3	1.2
噻菌灵	0.995	94.7	1.7	93.6	1	104.8	0.9
抑霉唑	0.994	95.7	0.4	98.5	1.3	108	0.9
抑霉唑降解物	0.995	94.1	2.1	100.2	0.8	106.7	1.4

结论

本文采用固相萃取的前处理方法，结合 LC/MS/MS 检测技术，建立了一种准确性高，重现性好的方法，该方法简单有效。Bond Elut Plexa 吸附剂的独特性质使得该方法可以扩展应用于农药多残留检测。该方法中目标被测物 5 分钟内可以完全分离，且在大多数安捷伦液相系统上都可以实现。

该方法建立的 Agilent 6460 三重四极杆质谱优化参数可以被简单的修改后用于其他的安捷伦三重四极杆液质联用系统。当采用灵敏度较低的检测器时可以在萃取方法中的复溶步骤进行预浓缩。

参考文献

1. C. Zhai, Y. Zou, C. Ball. *Bond Elut Polymer SCX 固相萃取结合高效液相色谱测定苹果汁中苯并咪唑抗真菌剂*。应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-3235CHCN (2008)
2. E. M. Thurman, I. Ferrer, M. Woodman, J. Zweigenbaum. *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*。应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5989-2728CHCN (2005)
3. Zhai. *应用安捷伦 Bond Elut QuEChERS AOAC 试剂盒和 LC-MS/MS 进行大米农药残留分析*。应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-8034CHCN (2011)
4. Pesticide MRL Database
<http://www.mrlatabase.com/?selectvetdrug=0>

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com.cn。

www.agilent.com.cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标等如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012年4月11日，中国印刷

5991-0050CHCN



Agilent Technologies