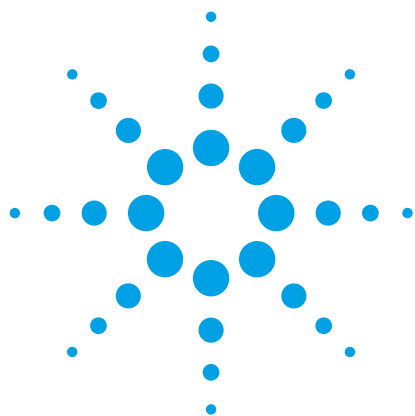




采用安捷伦 Bond Elut Plexa 萃取柱和 Poroshell 120 色谱柱结合 LC/MS/MS 分析橙汁中的杀菌剂及其代谢物

应用简报

食品测试和农业

作者

Irina Dioumaeva
安捷伦科技有限公司

摘要

2012 年 1 月，美国食品药品监督管理局（FDA）宣称将对进口橙汁产品进行抽检，并禁止进口检出多菌灵的产品。本应用介绍了一种简单的样品制备方法并结合 LC/MS/MS 对橙汁中的多菌灵和其他 3 种杀菌剂进行了分析。除了 3 种最重要的内吸性杀菌剂（多菌灵、噻菌灵和抑霉唑）及其代谢物，本方法可以扩展应用于其他农药种类的分析。该方法简单快速，提取物干净，且无需预浓缩就可使待测物的检出限达到 2 ppb 以下。实验采用磷酸三苯酯作为内标进行定量分析。待测物在 3 个浓度水平（10 ppb、50 ppb 和 250 ppb）下均显示良好的准确度（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代谢物的总和。



Agilent Technologies

苯并咪唑类杀菌剂广泛应用于作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，多菌灵的使用是合法的。另外，多菌灵是甲基硫菌灵（TM）的代谢物或降解物，后者可用于美国的农作物和草坪，这无形中增加了人们接触到多菌灵残留的潜在风险。噻菌灵和抑霉唑在美国常登记使用于水果，如柑橘的采后处理，如储藏和运输。

本文建立的提取方法，操作简便，重现性好，回收率高，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。由于 Bond Elut Plexa 中的填料粒径较小，分析样品时不会引起堵塞，且流速快、重现性好，对于范围广泛的分析物也具有优越的保留性能。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。

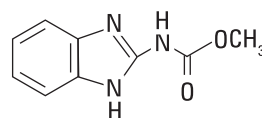
填充 2.7 μm 表面多孔填料的安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 柱与亚 2 微米 UHPLC 柱具有相似的柱效，但背压降低了 40%。液相色谱系统分析时的实际压力不会超过 400 bar。

配备 AJST 电喷雾离子源的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统具有较高的灵敏度和优异的检测性能，4 个目标物的检出限均达到了 2 ppb。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与灵敏度较低的老型号质谱仪联用，如 Agilent 6410 三重四极杆液质联用仪。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。

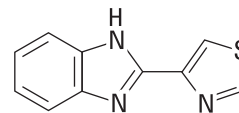
之前，安捷伦曾采用 Agilent Accubond C-18 SPE 小柱和 Agilent ZORBAX Eclipse XD-C8, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 μm 色谱柱结合 Agilent 1100 离子阱液质联用技术，建立了橙汁中抑霉唑和噻菌灵的分析方法[2]。

实验部分

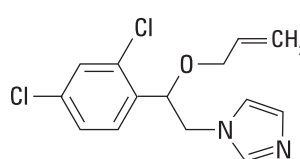
待测物



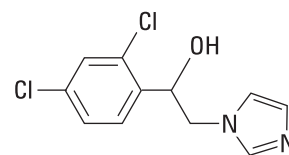
多菌灵 $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$
m.w. 191.19
pKa 4.5 LogP 1.5



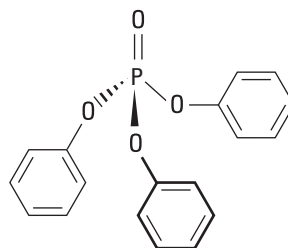
噻菌灵 $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$
m.w. 201.25
pKa 4.7 LogP 2.4



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: Agilent Bond Elut Plexa 小柱 30 mg, 3 mL
(部件号 12109303)

Agilent VacElut 20 固相萃取装置
(部件号 12234100)

活塞阀 (部件号 12234520)

硅烷化自动进样小瓶, 2 mL (部件号 5183-2072)

自动进样小瓶的螺纹口盖 (部件号 5182-0717)

LC: Agilent 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, 低死
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 的橙汁中添加 TPP (内标) 使浓度为 50 ppb, 建议使用 12 x 75 mm 玻璃试管。用色谱纯的水按 1:3 稀释, 涡旋,
6000 rpm 下离心 15~20 min。

提取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa 小柱 (先浸泡再滴放)
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 氮气流下吹干
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	时间 (min)	% B
	0.0	10
	0.5	10
	2.0	50
	3.0	95
	7.0	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) 冲洗端口 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 1 个内标 (TPP) 在 Bond Elut Plexa 小柱上均能得到有效的保留。Bond Elut Plexa 小柱是一种极性增强的苯乙烯-二乙烯苯中性聚合物吸附剂。这种吸附剂是萃取非离子型物质的最佳选择，可广泛适用于酸性、中性和碱性物质。本文建立了一种非常简单的萃取方法，前处理只需用水稀释橙汁。如果上样和淋洗步骤靠重力自然流出，建议先对大多数的橙汁样品进行离心。离心过的样品，只需在洗脱前加真空干燥萃取柱，以及在洗脱完成后加真空，尽量增加回收率。上样于 Bond Elut Plexa 萃取柱时，只靠液体重力自然流出，流速通常比加真空的流速慢，因此样品能有更多的时间与吸附剂作用。样品如未离心，则需在萃取的每个步骤都加真空，包括上样、淋洗和洗脱。若要使流速达到 1~2 mL/min，可持续缓慢地加压。

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，同时可以提高较早流出化合物的灵敏度：多菌灵提高 20%、噻菌灵提高 60%、抑霉唑代谢物提高 5~7%。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 离子对参数，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 个杀菌剂和内标的分离。图 2 是橙汁中添加 4 种杀菌剂 (2 ppb) 和内标 (50 ppb) 的 MRM 谱图。3 个主要杀菌剂峰的信噪比均大于 150:1，抑霉唑代谢物峰的信噪比为 49:1。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	2.1	2	正
多菌灵	☐	192.1	Unit	132.1	Wide	95	35	2.1	2	正
噻菌灵	☐	202	Unit	175	Wide	110	27	2.4	2	正
噻菌灵	☐	202	Unit	131.1	Wide	110	35	2.4	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

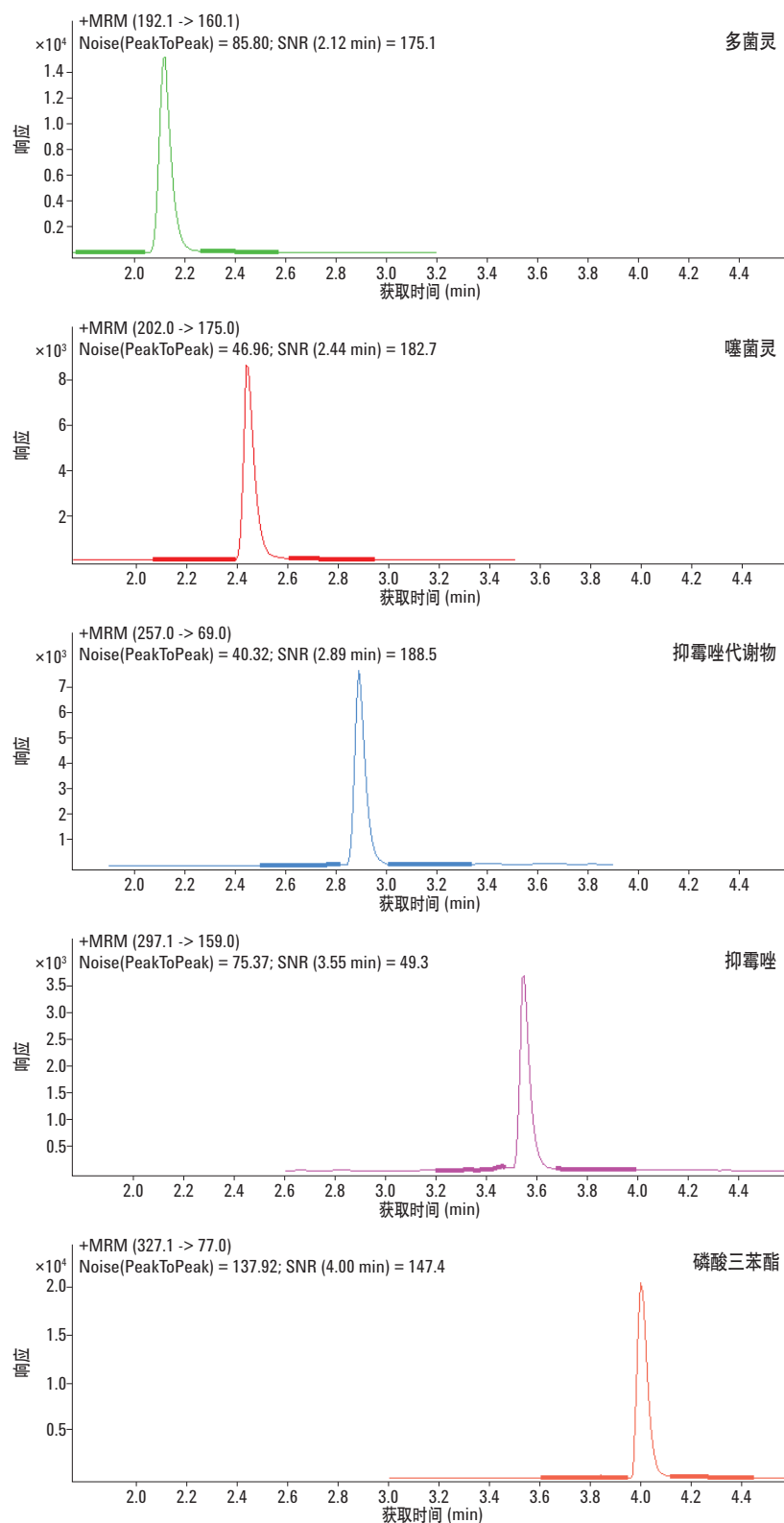


图 2. 橙汁萃取液中 4 种杀菌剂 (2 ppb) 和 TPP (50 ppb) 的 MRM 提取离子色谱图
Agilent Poroshell 120 EC-C18, $2.1 \times 50 \text{ mm } 2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱。粗线所示为噪音区域

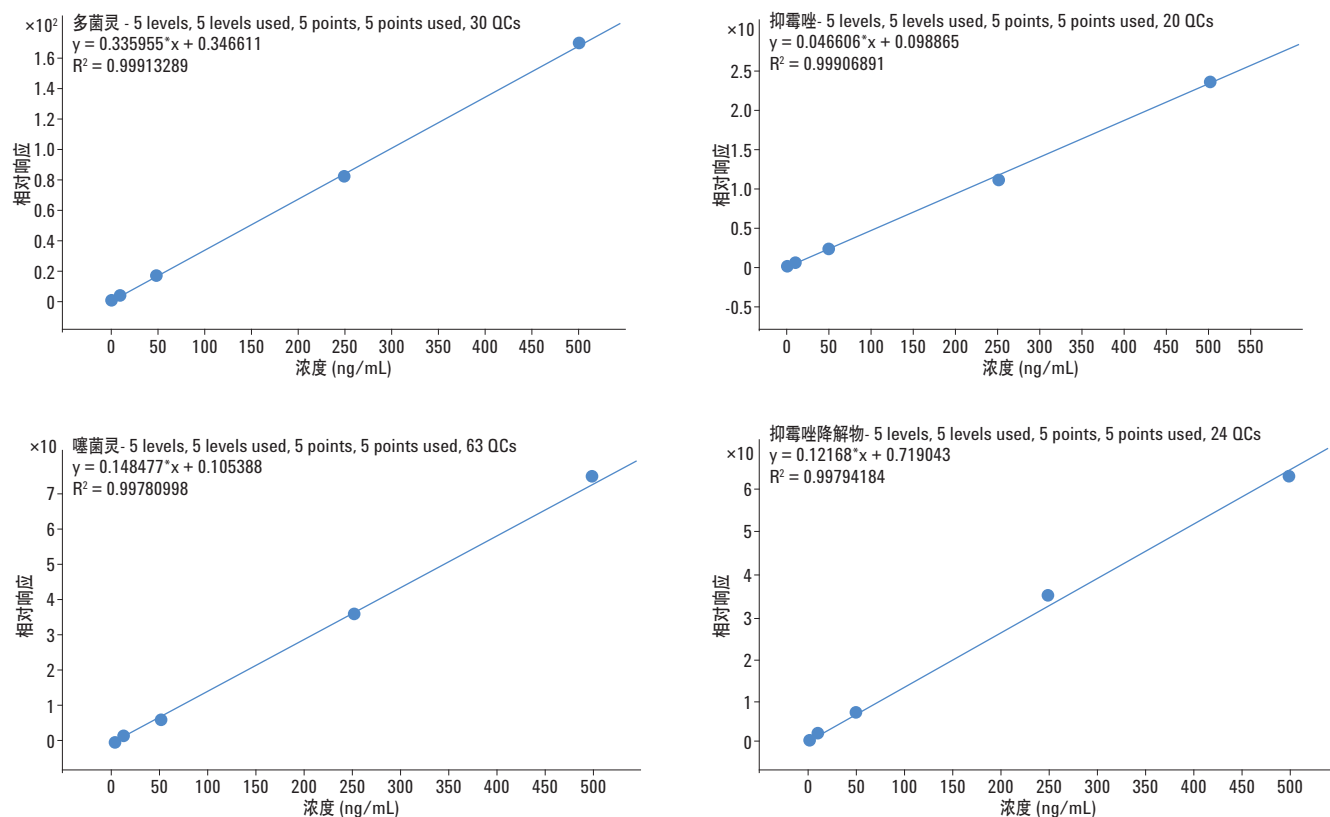


图 3. 橙汁萃取液中 4 种杀菌剂的校正曲线。线性范围为 2.0~500 ppb。所有的拟合方程线性良好， $R^2 \geq 0.998$

表 2. 橙汁中杀菌剂测定方法的验证， $n = 5$

化合物名称	R^2	回收率 (%)	10 ppb	回收率 (%)	50 ppb	回收率 (%)	250 ppb
			变异系数 (%)		变异系数 (%)		变异系数 (%)
多菌灵	0.999	103.5	1.7	100.1	0.7	99	2.5
噻菌灵	0.998	101.2	1.4	96.3	3.2	99.9	2.9
抑霉唑	0.999	105.3	1.3	100.2	0.9	101.2	1.8
抑霉唑降解物	0.998	101.7	3.5	103.3	2.8	101.6	3.1

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、重现性好的简单有效方法。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 MS 离子源的参数经过优化后，可用于其他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/chem/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
5991-0051CHCN



Agilent Technologies