

超高效液相色谱 - 质谱法测定蔬菜水果中 茚虫威的残留量

江滨伟

(福建华日食品安全检测有限公司, 福建 福州 350015)

摘 要: 建立蔬菜、水果中的茚虫威残留的超高效液相色谱 - 质谱法(UPLC-MS/MS)检测方法。样品经乙腈提取, 旋转蒸发仪浓缩, SEP-PAK C₁₈ 固体萃取小柱分离净化; 采用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱为分离柱, 以乙腈 -20mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸)为流动相, 在正离子模式下以电喷雾电离串联质谱仪进行测定。分别加标 1.0 μg/kg 和 5 μg/kg 进行回收实验, 平均回收率达 90% 以上, 平行测试 6 次相对标准偏差 RSD<5.0%, 方法的检出限(S/N=3)为 0.05 μg/L。

关键词: 茚虫威; 超高效液相色谱 - 质谱法; 固相萃取; 蔬菜; 水果

Determination of Indoxacarb Residues in Vegetables and Fruits by Ultra-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS)

JIANG Bin-wei

(Fujian Fairreach Food Safety Testing Co. Ltd., Fuzhou 350015, China)

Abstract: A new method was developed with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to determine indoxacarb pesticide residue in vegetables and fruits. Samples were extracted by acetonitrile and cleaned up on a solid-phase extraction (SPE)-PAK C₁₈ cartridge column. The reconstituted sample solution was analyzed by UPLC-MS/MS under positive ion mode. Waters BEH C₁₈ was taken as the analytical column, and 20 mmol/L ammonium acetate aqueous solution containing 0.1% formic acid-acetonitrile containing 0.1% formic acid was taken as the mobile phase. When fresh cabbage was the matrix, the spike recoveries of indoxacarb were 89.5% to 101.2% (n = 6), and the average recovery was 93.45%. When freeze-dried cabbage was the matrix, the spike recoveries of indoxacarb were 82.4% to 105.3% (n = 6), and the average recovery was 90.6%. Both the within-day and inter-day RSDs (n = 6) were less than 5.0%. The detection limit of indoxacarb by this method was 0.05 μg/L (S/N = 3).

Key words: indoxacarb; ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS); SPE; vegetables; fruits

中图分类号: O657; TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0176-03

茚虫威(indoxacarb), 又名恶二唑虫、安打(avatar), 化学名称: 7-氯-2,5-二氢-2-[N-(甲氧基甲酰基)-4-(三氟甲氧基)苯胺甲酰基]茚并[1,2-e][1,3,4]噁二嗪-4a(3H)-甲酸甲酯, 结构式见图 1。属于低毒低残留的农药, 它通过阻断昆虫神经细胞内的钠离子通道, 使神经细胞丧失功能, 达到杀虫的目的。它对害虫有很强的毒力, 但是对哺乳动物、家畜低毒, 同时对环境中的非靶生物等有益昆虫非常安全。在作物中残留低, 用药后第 2d 即可采收, 尤其是对多次采收的作物如蔬菜类也很适合。

其杀虫机理独特, 与其他杀虫剂不存在交互抗性。可用于害虫的综合防治和抗性治理^[1-4]。

由于国外贸易保护主义的抬头, 欧盟和其他发达国家利用技术性贸易壁垒越来越频繁, 手段日渐翻新, 使我国的食物出口受到很大程度的影响。国外许多国家对蔬菜水果中的茚虫威残留实施了严格的监控, 是目前欧盟、北美等国家蔬菜水果进口中检测的项目之一。尤其是日本的“肯定列表制度”对食品中农药残留制定了非常严苛的标准。在国内, 茚虫威的检测主要是气

收稿日期: 2008-07-01

作者简介: 江滨伟(1982-), 男, 助理工程师, 硕士研究生, 主要从事农药、兽药残留检测方法研究。

E-mail: jiangbinwei@163.com

相色谱法^[5],也有研究利用液相色谱法^[6],但缺点是检测限比较高,方法烦琐,时间长,定性不够准确。我国发布的农药残留液质初筛国家标准中收录了茚虫威^[7-9],但是方法可操作性不强,也没有详细对茚虫威进行分析。本实验拟采用超高效液相色谱-质谱法检测,以期实现对茚虫威的快速、准确检测,并为出口农产品检测提供方法参考。

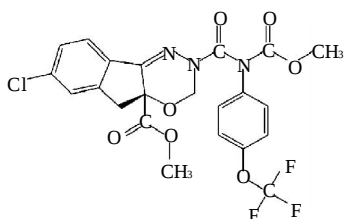


图1 茚虫威化学结构式

Fig.1 Chemical structure of indoxacarb

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

茚虫威标准品 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司;所用溶剂中除甲酸、甲醇、乙腈是色谱纯外,其余均为分析纯;水为超纯水。

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪、Quattro Premier 四极杆串联质谱仪[配有电喷雾离子源(ESI)]、SEP-PAK C₁₈ 固体萃取柱(6ml, 500mg) 美国 Waters 公司;Millipore-Q 超纯水仪 美国 Millipore 公司;酶标振荡仪、T-18 basic 均质器 德国 IKA 公司;低速离心机(4000r/min) 德国 Sigma 公司;旋转蒸发器 德国 Heidolph 公司;DC-12 氮吹仪 上海安谱公司;固相萃取装置 Supelco 公司;XW-80A 型涡旋混匀器 上海医大仪器厂。

1.2 样品前处理

1.2.1 样品的提取

新鲜蔬菜、水果:称取 5g 均质后的样品,置于 50ml 离心管中,加入 20ml 乙腈,在酶标振荡仪高速振荡混合 5min;加入 3g NaCl,再置于酶标振荡仪高速振荡混合 1min。以 3500r/min 离心 5min,上清液移入鸡心瓶中;残留液再加入 10ml 乙腈重复提取一次,合并上清液。37 水浴减压旋转蒸发至近干。用 5ml 乙腈溶解残渣,待净化。

冻干蔬菜、干果:称取 1g 均质或碾碎后的样品,置于 50ml 离心管中,加入 5ml 水在酶标振荡仪高速振荡混合 1min 后,静置涨发 2h,加入 20ml 乙腈,在酶标振荡仪高速振荡混合 5min;加入 3g NaCl,再置于酶标振荡仪高速振荡混合 1min。以 3500r/min 离心 5min,上清液移入鸡心瓶中;残留液再加入 10ml 乙腈重复提取一次,合并上清液。37 水浴减压旋转蒸发至近干。用

5ml 乙腈溶解残渣,待净化。

1.2.2 样品净化

SEP-PAK C₁₈ 固体萃取柱用 10ml 乙腈淋洗,抽干。将 1.2.1 的待净化液以 6ml/min 的流速通过萃取柱,收集流出液,之后再用 2ml 乙腈洗 C₁₈ 柱合并流出液,用氮吹仪在 35℃ 下吹干,2ml 30% 乙腈水溶液定容,供 UPLC-MS/MS 测试。

1.3 上机条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1mm × 100mm, 1.7μm);流动相 A:20mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸);B:乙腈(含 0.1% 甲酸)。线性梯度洗脱:在 0 ~ 1.5min 内,B 由 30% 增为 50%,到 2.5min 增为 90%,并维持 1min 后恢复到初始状态(30% B);流速 0.3ml/min;柱温 30℃;进样量:5μl。

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源正离子扫描模式;多反应离子监测,定性离子对:母离子 m/z 528.00,子离子 m/z 219.00,碰撞能量为 19V;定量离子对:母离子 m/z 528.00,子离子 m/z 249.00,碰撞能量为 17V;毛细管电压 3.5kV;锥孔电压 34V;离子源温度 110℃;雾化气流速 700L/h;反吹气流速 50L/h。

2 结果与分析

2.1 前处理方法的优化

2.1.1 提取剂的选择

25℃ 下茚虫威在各种溶剂中的溶解度为:水 0.2mg/ml,甲醇 3mg/ml,正庚烷 1.72mg/ml,正辛醇 14.5mg/ml,二甲苯 117mg/ml,乙腈 139mg/ml,乙酸乙酯 160mg/ml,丙酮、二甲基甲酰胺>250mg/ml。选用实验室常用的提取剂乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷和丙酮做平行性实验比较,结果如表 1。乙酸乙酯和二氯甲烷由于不溶于水,在提取过程中样品不易被浸润,提取效果比较差,回收率很低;乙腈和丙酮回收率较高,但相比之下,丙酮提取的溶液颜色较深,色素被较多的提取出来,在过柱分离时效果也比较差,基质效应较强,所以回收率也比乙腈稍低,因此本实验选择乙腈作为提取剂。

2.1.2 净化处理方法的选择

表 1 不同提取液提取的效果比较

Table 1 Comparison among extraction effects of indoxacarb with different solvents

提取剂	乙腈	乙酸乙酯	二氯甲烷	丙酮
平均回收率(%)	93.5	63.4	58.6	83.2
提取液颜色	深绿色	墨绿色	墨绿色	墨绿色

蔬菜水果中含有大量的色素,如何去除色素和杂质

是本实验的一个重要环节。实验开始选择活性炭柱来吸附色素^[8-9], 去除色素的效果不错, 但是回收率只有20%~30%, 说明活性炭在吸附色素的同时也吸附了大部分的目标物。后改用 Waters SEP-PAK C₁₈ 小柱, 利用乙腈作为洗脱液, 使色素和目标物在不同时间内被洗脱出来。大量实验表明在选取6ml、500mg 规格的小柱时, 通过5ml的1.2.1提取的样液后再用2ml乙腈洗脱, 回收率在82.4%~105.3%之间, 而且不使色素被洗脱出来, 保持样液澄清。

2.2 色谱质谱条件的优化

在等度洗脱条件下, 茚虫威出峰有稍微的前拖尾, 后选用1.3.1梯度洗脱色谱条件, 3.08min出峰, 峰形很好且稳定, 总离子流色谱图如图2。

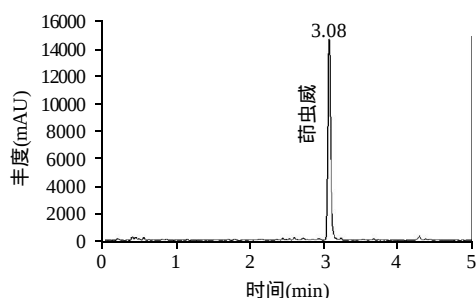


图2 2.0 μg/L 茚虫威的总离子流色谱图

Fig.2 Total ion current chromatogram of 2.0 μg/L indoxacarb solution

从图1结构上分析可以看出, 茚虫威是个强极性物质, 在酸性条件下极易发生质子化, 所以实验中选择电喷雾源和弱酸性流动相, 采用反相色谱柱在正离子模式使用多反应监测模式检测。

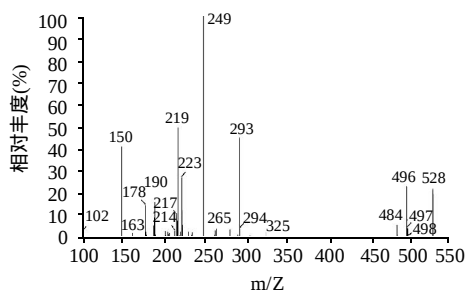


图3 茚虫威在17V碰撞电压时的二级质谱图

Fig.3 MS/MS spectrum of indoxacarb at the collision pressure of 17 V

在优化MS/MS条件下, 对茚虫威二级质谱进行分析。通过全扫描, 找出分子离子峰 $[M+H]^+$ (m/z 528.0), 并选择合适的碰撞电压对母离子进行轰击, 以获得其碎片离子信息, 进行准确定性。 $[M+H]^+$ (m/z 528.0)母离子经过碰撞断裂主要得到4个较强的碎片离子: m/z 150、 m/z 219、 m/z 249和 m/z 293, 其中子离子 m/z 249强度最强(100%), 其他3个碎片离子相对强度都在50%左右, 图3为碰撞电压为17V时的二级质谱。在16~20V的碰撞电压范围内, 发现碎片离子 m/z 219和 m/z 249的强

度变化不大, 其中 m/z 249的强度一直最强, 因此选用 m/z 249作为定量离子, m/z 219作为辅助定性离子, 和国标GB/T20769—2006所选取的离子对一样^[8]。

2.3 线性范围及检出限

配制质量浓度为0.1、0.5、1、5、10 μg/L的系列标准溶液, 按照上述条件测定, 以峰面积为纵坐标Y, 以质量浓度为横坐标X(μg/L)进行线性回归, 得到回归方程 $Y=2854.7X+64.3$ ($R^2=0.9997$)。同时, 还测定了空白样品加标回收曲线实验, 以新鲜甘蓝菜和冻干甘蓝菜为基质, 分别添加水平为0.1、0.5、1、5、10 μg/kg茚虫威和0.5、2.5、5、25、50 μg/kg茚虫威, 以峰面积(Y)为纵坐标, 茚虫威质量浓度(X)为横坐标, 得到回归方程分别为 $Y=2535.3X+103.2$ ($R^2=0.9994$)和 $Y=2374.6X+67.6$ ($R^2=0.9992$)。由此表明茚虫威在0.1~10 μg/L的范围内具有较好的线性关系。以信噪比为3确定茚虫威的检测限为0.05 μg/L, 以信噪比为10确定茚虫威的检测定量限为0.1 μg/L。

2.4 方法的精密度和回收率

在上述条件下, 取新鲜甘蓝和冻干甘蓝菜作为基质, 分别加标1.0 μg/kg和5.0 μg/kg, 进行回收实验。6次重复加标回收实验, 新鲜甘蓝菜回收率在89.5%~101.2%之间, 平均回收率93.4%; 冻干甘蓝菜回收率在82.4%~105.3%之间, 平均回收率90.6%。并取加标量1.0 μg/kg的样品溶液进行稳定性实验, 测得日内RSD(n=6)为4.2%, 日间RSD(n=6)为4.7%, 均小于5.0%, 说明方法的稳定性良好。

3 结 论

本实验建立的超高效液相色谱-质谱法对蔬菜水果中茚虫威残留的检测方法简便快速, 灵敏度高, 检测定量限远远低于国际上进口国的限量值, 回收率高, 精密度好, 完全满足日本“肯定列表制度”的要求, 可为我国蔬菜水果出口检测提供参考。

参考文献:

- [1] 刘永春, 付波, 王传土, 等. 安打防治甜菜夜蛾田间药效试验[J]. 农药, 2002, 12(41): 27.
- [2] 刘长令. 新型高效杀虫剂茚虫威[J]. 农药, 2003, 42(2): 42-44.
- [3] HILEMAN B. 2003 ACS national award winners [J]. Chemical and Engineering News, 2003, 81(3): 46-52.
- [4] ZHAO X, NAGATA K, MARSZALEC W, et al. Effects of the oxadiazine insecticide indoxacarb, DPX-MP062, on neuronal nicotinic acetylcholine receptors in mammalian neurons[J]. Neuro Toxicology, 1999, 20: 561-570.
- [5] 陆松茂, 汪学才, 张峻涛, 等. 气相色谱法测定蔬菜水果中茚虫威残留含量[J]. 现代农药, 2007, 6(5): 30-31.
- [6] 赵平娟, 李增梅, 邓立刚, 等. 茚虫威的高效液相色谱分析方法[J]. 农药, 2006, 45(11): 758-759.
- [7] GB/T 20769—2006 水果和蔬菜中405种农药及其相关化学品残留量的测定. 液相色谱-串联质谱法[S].
- [8] GB/T 20771—2006 蜂蜜、果汁和果酒中420种农药及其相关化学品残留量的测定. 液相色谱-串联质谱法[S].
- [9] GB/T 20770—2006 粮谷中372种农药及其相关化学品残留量的测定. 液相色谱-串联质谱法[S].