

超高效液相色谱 - 质谱法测定水产品中敌百虫的含量

查玉兵, 杨春亮*, 林玲, 李涛, 程盛华

(中国热带农业科学院农产品加工研究所, 广东湛江 524001)

摘要: 建立敌百虫在水产品中残留量的超高效液相色谱-电喷雾质谱(UPLC-MS/MS)测定方法。用乙酸乙酯提取样品中的敌百虫, 提取液经酸性氧化铝柱净化, 经超高效液相色谱分离, 用串联质谱测定, 正离子多反应监测(MRM)模式检测, 外标法定量。在0.02~0.8 ng/mL范围内, 敌百虫标准工作溶液的色谱峰面积与质量浓度成良好的线性关系, 相关系数 $r=0.9992$; 水产品中敌百虫的添加回收率在89.0%~93.8%, 相对标准偏差为2.1%~5.4%, 检出限为1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。方法简便、快速、准确, 保留时间为1.5 min。

关键词: 液相色谱-质谱/质谱联用; 敌百虫; 水产品; 残留

Determination of Trichlorphon Residues in Aquatic Products Using UPLC-MS/MS

ZHA Yu-bing, YANG Chun-liang*, LIN Ling, LI Tao, CHENG Sheng-hua

(1. Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: A UPLC-MS/MS method was developed to determine trichlorphon residues in aquatic products. Trichlorphon residues in samples were extracted into ethyl acetate, defatted on an acidic alumina solid phase extraction column, separated by UPLC, measured by MS/MS in positive ion multiple reaction monitoring mode, and quantified by external standard method. Over the range of 0.02 to 0.8 ng/mL, an excellent linear relationship ($r = 0.9992$) between trichlorphon concentration and peak area was observed for the standard working solution of trichlorphon. The average spike recoveries for trichlorphon in blank samples ranged from 89.0 % to 93.8 %, with a RSD between 2.1% and 5.4%. The detection limit for trichlorphon was 1 $\mu\text{g/kg}$. This method proved simple, rapid and accurate.

Key words: UPLC-MS/MS; trichlorfon; aquatic products; residues

中图分类号: TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0278-03

敌百虫属有机磷酯类化合物, 是一种低毒的广谱杀虫剂。敌百虫在水产养殖中多用于防治鱼体内、外的寄生虫病以及清除水中有害生物^[1-3]。过量使用敌百虫会造成残留药物污染, 对人畜安全造成一定影响。最近的研究发现, 敌百虫作为胆碱能抑制剂除了具有急性毒性外, 还可引发迟发性神经毒性及导致其他慢性毒性症状。动物试验显示, 敌百虫可引起脑皮层神经细胞凋亡, 但发生机制并不清楚^[4]。

敌百虫残留分析方法已有许多报道, 主要为气相色谱法^[5-7]和气质联用法^[8-11], 但由于敌百虫热稳定性差, 在气相色谱分析过程中很容易发生分解, 影响敌百虫的定量分析。很少有用液质联用法分析敌百虫残留量^[12-13],

特别是水产品中的敌百虫残留分析还未见报道。本实验用液质联用分析水产品中的敌百虫残留量, 分析步骤简单, 灵敏度高, 可完全满足欧盟、美国FDA和日本等发达国家的限量要求。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

鳊鱼 送检样品。

甲醇(色谱纯)、乙腈(分析纯)、丙酮(分析纯)、二氯甲烷(分析纯)、甲酸(色谱纯)、乙酸乙酯(分析纯); 水为二次蒸馏水; 酸性氧化铝固相萃取柱(1000mg/6mL); 敌百虫标准品(95.0%)。

收稿日期: 2010-07-01

作者简介: 查玉兵(1977—), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为农药残留分析。E-mail: zhayubing2008@126.com

*通信作者: 杨春亮(1964—), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为食品安全。E-mail: zjyangcl@yahoo.com.cn

敌百虫标准品溶液的配制：称取 10mg 的敌百虫标准品，用甲醇溶解于 100mL 容量瓶中，配成 100 μ g/mL 的标准储备液，使用时根据需要以流动相稀释成标准工作液。

ACQUITY UPLC™-TQD MS/MS 系统 美国 Waters 公司；R205 旋转蒸发器 瑞士 Büchi 公司；E120H 超声波清洗器 德国 ELMA 公司；MS3 涡旋混合器 德国 IKA 公司；Milli-Q 纯水系统 美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 提取

称取 2g(精确到 0.01g)试样于 50mL 具塞塑料离心管中，加乙酸乙酯 15mL，再加入 1g 无水硫酸钠，在混匀器上充分混匀 2min，5000r/min 离心 5min，将上层乙酸乙酯溶液移至 50mL 浓缩瓶中，残渣加乙酸乙酯 15mL，重复上述操作，合并两次提取液，在 40℃ 水浴减压浓缩至约 5mL，待净化。

1.2.2 净化

将酸性氧化铝柱用 5mL 酸化乙酸乙酯活化，弃去流出液。将提取液过柱，用 10mL 试管收集，待样液完全流出后，再向小柱中加入 5mL 乙酸乙酯淋洗，净化液于 40℃ 水浴减压浓缩至干，加入 1mL 流动相溶解，混匀，过 0.2 μ m 滤膜，供 UPLC-MS/MS 测定。

1.2.3 色谱质谱条件

色谱柱：UPLC ACQUITY BEH (50mm $\times$ 2.1mm, 1.7 μ m)；流动相：甲醇-0.1% 甲酸溶液(35:65, V/V)；流速：0.2mL/min；柱温：40℃；进样量：5 μ L；离子源：ESI，正离子模式；毛细管电压：4.0kV；离子源温度：105℃；脱溶剂气温度 350℃；脱溶剂气流量：600L/hr；锥孔反吹气流量 50L/h；锥孔电压：40V；扫描方式：多反应监测(MRM)；离子对： m/z 259.4/109.1(定性离子对)， m/z 259.4/221.1(定量离子对)。

2 结果与分析

2.1 提取试剂的选择

农药残留分析中对使用的溶剂要求是非常高的，即要求提取回收率高、杂质干扰小、经济、环境友好等。提取溶剂的选择直接影响到提取效果的好坏，有机磷农药是亲酯性化合物，易溶于有机溶剂。水产品中的敌百虫主要用二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、乙腈等极性较大的溶剂进行提取^[14-17]，本实验选择并比较丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙腈作为提取溶剂时的提取效率。结果表明：用乙酸乙酯和乙腈作为提取溶剂均能获得较高的添加回收率。乙腈的提取效率高，杂质干扰小，但是考虑到乙腈的毒性较大，对环境不友好，所以最终确定乙酸乙酯作为水产品中敌百虫残留分析的提取溶剂。

2.2 净化条件的选择

考虑到用乙酸乙酯提取水产品中残留的敌百虫时会将水产品中的脂肪一并提取出来。所以提取后必须选择一种合适的净化方法将提取液中的脂肪除去。经过比较，最终确定酸性氧化铝固相萃取小柱(1000mg/6mL)能够很好地除去样品中的脂肪。

2.3 标准曲线及线性范围

使用基质匹配标准溶液建立标准曲线对样品进行定量，可以消除基质中其他组分对目标分析物的干扰^[18]。用流动相准确配制 5、10、50、100、200ng/mL 标准工作溶液。在仪器测定条件下进行分析，以被测组分峰面积(Y)对其质量浓度(X)作工作曲线。结果表明，在 0.02~0.8ng/mL 范围内，敌百虫标准工作溶液的色谱峰面积与质量浓度成良好的线性关系，其线性方程为 $Y = 2230X + 2790$ ($r=0.9992$)。该测定条件下敌百虫标准溶液保留时间约为 1.5min，以 3 倍信噪比计，最低检出限为 1.0 μ g/kg，标准溶液离子流图见图 1。

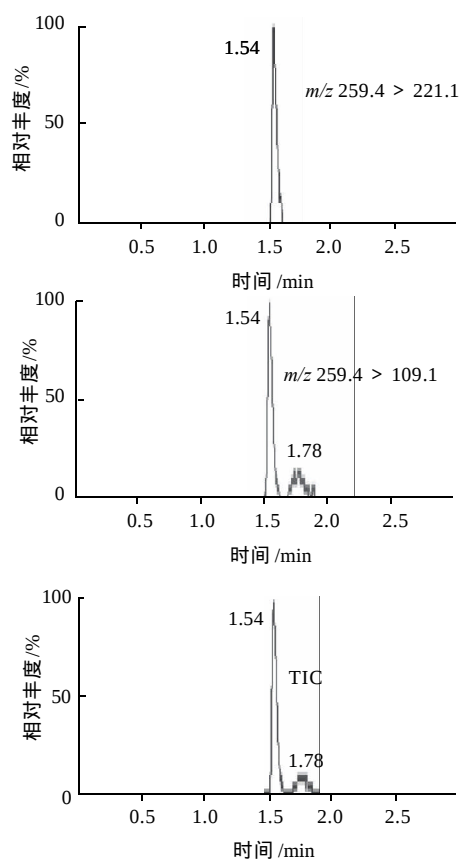


图 1 敌百虫标准溶液的离子流图

Fig.1 Selected ion chromatogram of trichlorophosphon standard

2.4 方法的准确度和精密度实验

以不含敌百虫的水产品样品为本底，分别添加系列浓度的待测药物标准溶液(添加水平分别为 4、20、100 μ g/kg，进行添加回收实验，重复测定 5 次，添加回收实验结果

见表1。结果表明,平均添加回收率为89.0%~93.8%, RSD为2.1%~5.4%。

表1 水产品中敌百虫添加回收率和精密度($n=5$)

Table1 Recoveries and precisions of trichlorophon from fortified blank aquatic samples ($n=5$)

添加质量浓度/($\mu\text{g/kg}$)	测得值/($\mu\text{g/kg}$)					平均回收率/%	RSD/%
4	3.71	3.74	3.79	3.65	3.86	93.8	2.1
20	18.2	17.4	18.9	18.5	17.7	89.7	5.4
100	86.3	92.1	89.4	90.4	86.8	89.0	2.7

3 结 论

本实验建立的UPLC-MS/MS方法适用于鱼、虾、贝类等水产品中敌百虫的残留分析,具有简便快捷、灵敏度高等特点,添加回收率以及精密度均满足残留分析的要求^[19-20]。

参 考 文 献 :

- [1] 刘永, 杨长志, 康庆贺, 等. 热裂解气相色谱法测定动物源性食品中敌百虫残留量[J]. 分析实验室, 2008, 27(2): 119-122.
- [2] 金天明, 孙晓辉. 敌百虫对鲤鱼的毒性与pH值的关系初探[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2002, 17(5): 420-422.
- [3] 周炯林, 徐培渝. 有机磷农药遗传毒性研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2007, 34(6): 339-344.
- [4] LIU Chengyun, CHANG Ping'an, WU Yijun. Trichlorfon induces apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells via the endoplasmic reticulum [J]. Chem-Biol Interact, 2009, 181(1): 37-44.
- [5] 席绍峰. 荔枝中敌百虫的气相色谱分析[J]. 轻工标准与质量, 2002 (5): 50.
- [6] 杨昀, 刘玉林. 气相色谱法同时测定敌百虫和毒死蜱的含量[J]. 云南化工, 2004, 31(5): 41-42.
- [7] 朱青青, 谢文, 丁慧瑛. 蜂蜜中多种有机磷农药残留量的气相色谱测定[J]. 理化检验: 化学分册, 2005, 41(7): 482-483.
- [8] 于慧娟, 蔡友琼, 李庆, 等. 气相色谱-质谱法研究敌百虫在气相色谱分析过程中产生的分解产物[J]. 色谱, 2006, 24(1): 23-25.
- [9] FILLION J, SAUVE F, SELWYN J. Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography/ mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of AOAC International, 2000, 83(3): 698-713.
- [10] 胡小钟, 储晓刚, 余建新, 等. 气相色谱-质谱法快速筛选测定浓缩苹果汁中105种农药残留量[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6): 26-28.
- [11] 吕进锋. GC/MS外标法检测蔬菜中农药多残留的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2006(8): 937-939.
- [12] 刘琪, 孙雷, 张疆. 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肝中有机磷农药残留量的研究[J]. 分析测试学报, 2010, 29(7): 747-750.
- [13] 黄捷, 白桂昌, 吕轶峰. 快速高分离液相色谱-串联质谱法测定水产品中敌百虫残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(7): 1666-1669.
- [14] GB/T5009.161—2003 动物性食品中有机磷农药多组分残留量的测定[S].
- [15] 张莹, 黄志强, 李拥军. 气相色谱法测定茶叶中多种有机磷农药残留量[J]. 色谱, 2001, 19(3): 273-275.
- [16] 郑军红, 庞国芳, 范春林, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中128种药物残留[J]. 色谱, 2009, 27(3): 254-263.
- [17] 刘莹雯, 丁时超, 杜文, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定烟草中有机磷农药的残留量[J]. 色谱, 2006, 24(2): 174-176.
- [18] 张乔. 农药污染物残留分析方法汇编[M]. 北京: 化学工业出版社, 1990: 131-133.
- [19] POUCKE C V, PETEGH EM C V. Development and validation of a multianalyte method for the detection of anabolic steroids in bovine urine with liquid chromatography- tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr: B, 2002, 772(2): 211-217.
- [20] CAI J, HENION J. Quantitative multi residue determination of agonists in bovine urine using on-line immunoaffinity extraction coupled column packed capillary liquid chromatography- tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr: B, 1997, 691(2): 357-370.