

液相色谱-串联质谱法快速测定植物源性食品中的百草枯

薄海波*

(河北出入境检验检疫局, 河北 石家庄 050051)

摘要:建立了水果、蔬菜、豆类和粮谷中百草枯残留的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)分析方法。用水提取样品中的百草枯,弱阳离子交换(WCX)固相萃取柱(SPE)净化。采用CAPCELL PAK ST色谱柱(150 mm × 2.0 mm),乙腈-10 mmol/L乙酸铵水溶液(用甲酸调至pH 4.0)为流动相,以电喷雾离子源正离子模式多反应监测(MRM)定性、定量测定百草枯。百草枯在0.01 ~ 0.1 mg/L范围内峰面积与质量浓度呈线性关系,相关系数为0.993。在空白样品中添加百草枯,测得方法的回收率为84.0% ~ 106.0%,相对标准偏差(RSD)为7.8% ~ 18.8%。果蔬和粮谷样品中百草枯的定量限分别为0.01 mg/kg和0.05 mg/kg,满足各国残留限量要求。

关键词:弱阳离子交换;高效液相色谱-串联质谱;百草枯;残留;植物源性食品

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2011)02-0180-04

Determination of paraquat residue in plant-derived foodstuffs by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

BO Haibo*

(Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: A sensitive and selective method is presented for the determination of paraquat residue in fruits, vegetables, beans and grain by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Paraquat in samples was extracted with water and cleaned-up with a weak cation exchange (WCX) column to obtain an extract suitable for analysis using HPLC-MS/MS. The paraquat was separated by a CAPCELL PAK ST column (150 mm × 2.0 mm) and with acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (adjusted to pH 4.0 by formic acid) as the mobile phase, and multiple reaction monitoring (MRM) was used with electrospray ionization in the positive ion mode. The calibration curve was linear between the peak area and the mass concentration of paraquat from 0.01 to 0.1 mg/L with the correlation coefficient of 0.993. Recoveries of paraquat spiked in samples at three levels ranged from 84.0% to 106.0% with the relative standard deviations of 7.8% - 18.8%. The limits of detection (LODs) of paraquat were 0.01 mg/kg in fruits and vegetables and 0.05 mg/kg in beans and grain. The LODs can meet the requirements of international maximum residue limit.

Key words: weak cation exchange; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); paraquat; residue; plant-derived foodstuffs

百草枯,英文名 paraquat,化学名 1,1-二甲基-4,4'-联吡啶阳离子,是有机杂环类季铵盐除草剂,商品多为其硫酸盐或氯化物形式。由于其具有优良的除草效果,在世界上 120 多个国家广泛使用。百草枯对人、畜有较强的毒性作用,且一旦中毒无药可

解。百草枯的结构稳定,半衰期长,容易在环境和食物中形成残留累积,对人类健康和自然环境构成潜在危害。因此,国际农残法典委员会(CAC)、欧盟和美国等都规定了水果、蔬菜、粮食和肉类中百草枯残留物的限量标准。“中国技术性贸易措施网”收

* 通讯联系人:薄海波,高级工程师,博士,从事食品安全与质量分析研究。Tel: (0311) 85980504, E-mail: bohbl212@163.com.

收稿日期:2010-10-23

录的CAC和一些国家及地区的百草枯残留限量标准多达391条,其中水果和蔬菜中百草枯残留限量多为0.05 mg/kg;我国GB 16333中规定菜籽油、成品粮、柑橘、苹果和梨中百草枯的最大允许残留量分别为0.05、0.5、0.2、0.05和0.05 mg/kg。因此,研究食品中百草枯残留测定方法十分必要。

由于百草枯结构特殊,国内外多残留分析方法标准或相关研究中均不包括百草枯的测定。百草枯的测定方法有紫外分光光度法、气相色谱法和液相色谱法等。现行检验检疫行业标准^[1]采用紫外分光光度法测定百草枯,方法首先对百草枯阳离子进行还原反应,操作费时、繁琐,回收率和灵敏度低。气相色谱法测定百草枯^[2]也需要衍生化,应用较少。目前测定百草枯的主流方法是液相色谱法^[3-7]。百草枯为碱性的强极性有机化合物,在水中完全溶解并电离为阳离子,反相液相色谱法分析百草枯存在以下三方面的问题:一是百草枯提取困难。现有的标准方法如美国环保局EPA 549.2^[3]和美国分析化学家学会AOAC 992.17标准^[4]等^[5,6]文献中,提取方法十分复杂,需要在9 mol/L硫酸中回流5 h以上。二是色谱条件特殊。百草枯几乎不能被憎水性的反相色谱柱保留,以反相高效液相色谱法分析,均需在流动相中添加离子对试剂来解决柱保留问题^[3-7];三是检测背景干扰严重。目前百草枯的高效液相色谱分析方法采用紫外检测器检测,测定波长为257 nm。植物源性食品中有很多种物质在该波段有较强的紫外吸收,对百草枯的测定产生干扰。

近年来,液相色谱-质谱联用法(LC-MS)在百草枯残留分析中已有少量应用:Young等^[8]采用Atlantis HILIC色谱柱LC-MS法分析了河水中的百草枯,王朝虹等^[9]以相同的色谱条件采用LC-MS/MS法分析了生物检材中的百草枯,二者均取得了满意的结果。但文献[8]所用流动相中缓冲盐浓度高达250 mmol/L,笔者依据此条件进行实验,发现在质谱仪中有大量固体析出,极易导致离子源锥孔堵塞,方法的应用受到局限。

本文将CAPCELL PAK ST色谱柱、低缓冲盐含量流动相用于百草枯残留分析,解决了上述方法中流动相与质谱仪的兼容性问题。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 6460 高效液相色谱-串联质谱联用仪(HPLC-MS/MS)配有电喷雾离子源(ESI源);Wa-

ters WCX 固相萃取柱(50 mg, 3 mL),使用前依次用3 mL甲醇和3 mL水活化WCX小柱,保持柱体湿润;德国IKA T25型高速匀浆机。百草枯标准品:纯度 $\geq 98\%$ (德国Ehrenstorfer Quality)。标准储备液:准确称取10 mg标准品,用少量0.1 mol/L盐酸溶解,转移至10 mL容量瓶中,加水定容至刻度。该溶液质量浓度为1.0 g/L,0~4℃保存;实验中按需要稀释为标准溶液,现用现配。甲醇和乙腈为农残级;三氟乙酸和甲酸为优级纯;水为自制超纯水。

1.2 分析条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱:资生堂CAPCELL PAK ST柱(150 mm \times 2.0 mm);柱温:40℃;流动相为乙腈-10 mmol/L乙酸铵水溶液(用甲酸调至pH 4.0);梯度洗脱程序:乙腈的起始比例为70%,1 min时达到10%,保持至6 min,然后恢复为70%,保持至10 min。流速0.4 mL/min,进样量:5.0 μ L。

1.2.2 质谱条件

电离模式:ESI⁺;检测方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:2.0 kV;锥孔电压:40 V;碎裂电压:100 V;四极杆温度:100℃;去溶剂气温度:325℃;去溶剂气(氮气)流量:6 L/h;锥孔气(氮气)压力:310 kPa(45 psi);碰撞气(氩气)流量:0.1 L/h;碰撞能量为38 V;定量离子对: m/z 186.1 > 171.1,定性离子对: m/z 186.1 > 155.2和 m/z 186.1 > 77.1。

1.3 实验方法

1.3.1 样品溶液的制备

称取果蔬样品10.0 g,粮谷样品2.0 g(均精确至0.01 g)于50 mL聚丙烯离心管中,加水至40 mL,均质1 min,以5 000 r/min离心10 min。准确分取上清液20 mL,待净化。

1.3.2 固相萃取净化

将提取液20 mL上样至活化的WCX小柱,用3 mL甲醇-水(体积比为1:1)淋洗,2 mL三氟乙酸-乙腈-水(体积比为2:84:14)洗脱,用氮吹仪在45℃将洗脱液吹干,用流动相定容至1 mL,0.22 μ m有机膜过滤。在上述分析条件下进样测定。

1.3.3 固相萃取净化

依上法制备空白基质溶液。

2 结果与讨论

2.1 分析条件优化

参照文献[8,9]方法,实验采用标准溶液对比了Merck HILIC色谱柱和CAPCELL PAK ST色谱柱

的分离效果。结果显示,前者在流动相中缓冲盐浓度高达 250 mmol/L 时,百草枯才能在 10 min 内被洗脱。在此条件下,离子源锥孔有大量结晶的缓冲盐析出。故 HILIC 色谱柱不适于百草枯的常规分析。使用 CAPCELL PAK ST 色谱柱,在流动相中加入 10 mmol/L 乙酸铵,即可使百草枯得到有效分离,保留时间仅为 5 min。因此选择 CAPCELL PAK ST 色谱柱作为百草枯的分析柱。

在 ESI⁺ 电离模式下,调节毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、去溶剂气温度和流量及锥孔气流量等参数,使母离子 (m/z 186.1) 的丰度最大;通过子离子扫描,找到 3 个主要二级碎片离子: m/z 186.1 > 171.1、 m/z 186.1 > 155.2 和 m/z 186.1 > 77.1。选择相对丰度最大的离子 m/z 171.1 作为定量离子,再进行二级质谱分析条件优化,确定碰撞能量、碰撞气流量和碎裂电压等参数,得到较高灵敏度。

百草枯的 HPLC-MS/MS 总离子流图和 MRM 谱图见图 1。

2.2 净化方法的选择与优化

实验对比了用 Oasis 混合型阳离子交换柱 (MCX) 和弱阳离子交换固相萃取柱 (WCX) 的净化效果。结果显示,MCX 对百草枯的作用力很弱,在上样阶段的流出液中有百草枯检出,平均回收率仅为 45%。而 WCX 固相萃取柱去除干扰效果好。实验测试了苹果、甘蓝、豌豆和大米 4 种基质的空白样品和 LOD 水平的添加样品(添加回收率数据见表 1) 结果表明 4 种基质净化后的总离子流图非常相似,图中均无明显杂质峰。空白苹果样品及其添加水平为 10 $\mu\text{g/L}$ 的百草枯苹果样品的 HPLC-MS/MS 总离子流图和 MRM 谱图见图 2。因此选择 WCX 作为本方法的净化柱。

表 1 4 种空白样品中添加百草枯的回收率和精密度 ($n=6$)

Table 1 Recoveries and precisions of paraquat spiked in four samples ($n=6$)

Matrix	Added/ (mg/kg)	Found/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %
Apple	0.01	0.0092	90.2	18.8
	0.05	0.042	84.0	11.3
	0.1	0.089	89.0	7.9
Cabbage	0.01	0.010	100.0	10.7
	0.05	0.046	92.0	12.2
	0.1	0.088	88.4	8.9
Pea (dried)	0.01	0.0086	86.0	11.9
	0.05	0.053	106.0	17.0
	0.1	0.092	92.0	12.3
Rice	0.01	0.0086	86.0	14.0
	0.05	0.047	94.0	11.5
	0.1	0.091	91.0	7.8

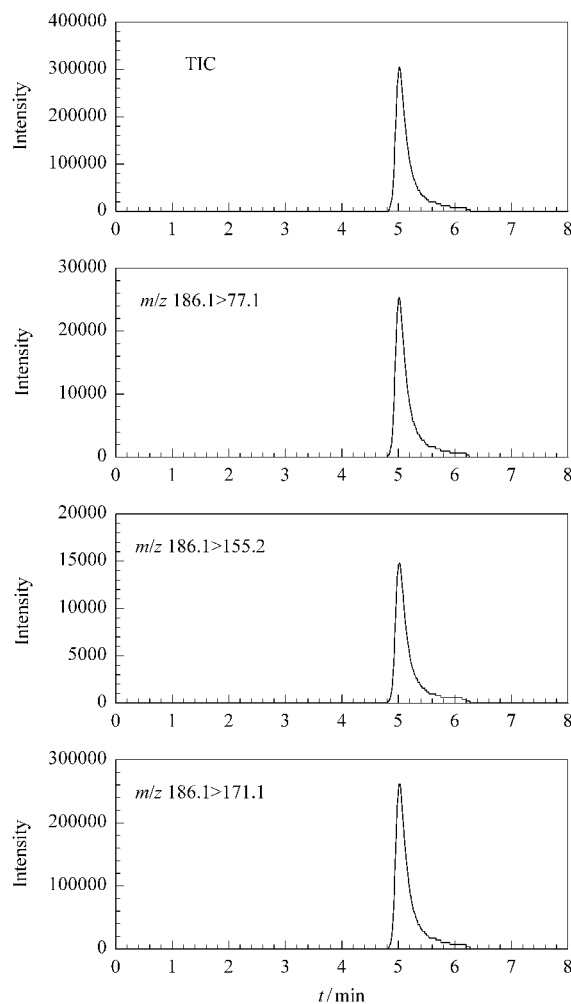


图 1 10 $\mu\text{g/L}$ 百草枯标准溶液的 HPLC-MS/MS 图

Fig. 1 HPLC-MS/MS chromatograms of 10 $\mu\text{g/L}$ paraquat standard solution

2.3 线性关系及检出限

准确吸取百草枯标准储备液适量,用空白基质溶液稀释为 0.01、0.02、0.05 和 0.1 mg/L 的系列标准溶液。在上述分析条件下进样测定。以定量离子峰面积对百草枯质量浓度进行线性回归。在质谱分析中发现,百草枯溶液出现较强的离子抑制现象,因此方法的线性范围较窄,仅为 0.01 ~ 0.1 mg/L,回归方程为 $y = 20\,300x + 3\,180$,相关系数为 0.993。按 10 倍信噪比得出百草枯在果蔬样品中的定量限为 0.01 mg/kg,粮谷样品中的定量限为 0.05 mg/kg。

2.4 回收率和精密度

采用标准添加法,在 4 种空白样品中添加 3 个浓度水平的百草枯标准品溶液,每个添加水平平行测定 6 次,测定结果见表 1。实验数据表明,方法的回收率为 84.0% ~ 106.0%,精密度(以相对标准偏差(RSD)计)为 7.8% ~ 18.8%。

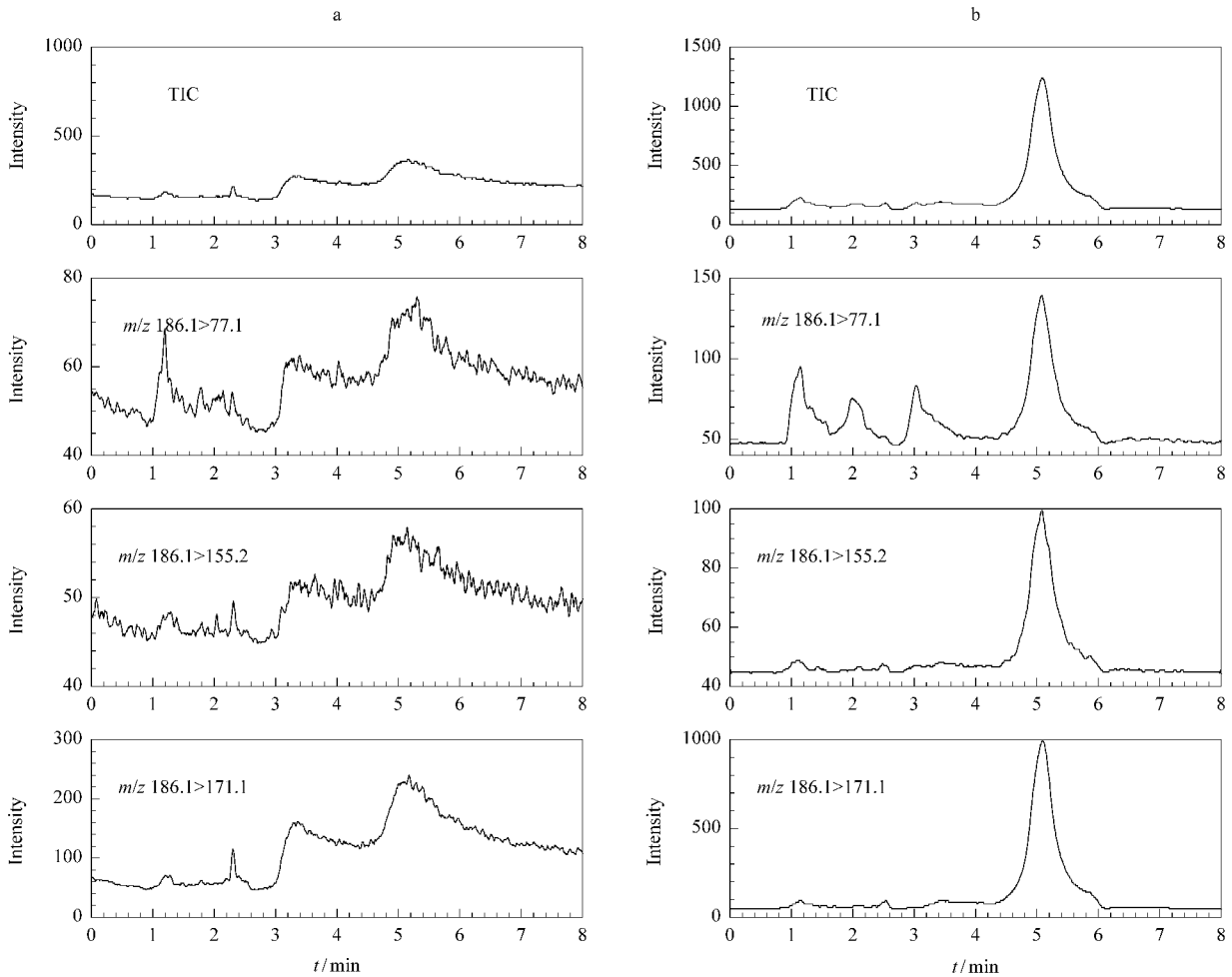


图2 (a)空白样品及(b)空白添加样品的HPLC-MS/MS图

Fig. 2 HPLC-MS/MS chromatograms of (a) a blank sample and (b) a spiked sample

3 结论

本文建立了简便、快速、准确测定植物源性食品中百草枯残留的分析方法。实验采用纯水提取,WCX交换柱净化,以CAPCELL PAK ST色谱柱为分离柱,乙腈-10 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相,采用串联质谱仪测定了粮谷和蔬菜中的百草枯,解决了液相色谱测定百草枯方法中的3个主要难题:一是简化了提取方法,不需要长时间回流提取;二是在弱阳离子交换柱上同时实现了对样品提取液中百草枯的净化和富集;三是用CAPCELL PAK ST色谱柱、常规的乙腈-水体系(含低浓度缓冲盐)为流动相,实现百草枯与杂质的有效分离。该流动相与质谱仪有很好的兼容性,从而避免了使用高盐体系或离子对试剂对质谱仪的危害。本方法灵敏度高,并可定性确证,为百草枯残留的准确测定提供了一条切实可行的新途径。

参考文献:

- [1] SN 0340-95
- [2] Zhang T, Tan J Y, Qi B K, et al. Chinese Journal of Forensic Medicine (张婷, 谭家镒, 齐宝坤, 等. 中国法医学杂志), 2009, 24(3): 161
- [3] US EPA National Environmental Methods 549.2 (Revision 1.0, June 1997)
- [4] AOAC Official Method 992.17
- [5] Wang R H, Su S M, Qin G M, et al. Journal of Forensic Medicine (王瑞花, 苏少明, 秦光明, 等. 法医学杂志), 2005, 21(2): 121
- [6] Wang A Y, Zhai Z L. Journal of Environment and Health (王爱月, 翟志雷. 环境与健康杂志), 2010, 27(3): 261
- [7] Li H M, Sun S W, Shi X F. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李红梅, 孙守威, 史谢飞. 分析化学), 2007, 35(10): 1499
- [8] Young M S, Jenkins K M. Environmental Chemistry (环境化学), 2004, 23(6): 722
- [9] Wang Z H, Wang Z, Liu X J, et al. Chinese Journal of Forensic Medicine (王朝虹, 王忠, 刘学俊, 等. 中国法医学杂志), 2008, 23(2): 114