

保健食品原料中多残留农药基质净化技术研究

马永龙¹, 周勇², 虞苗³, 吴纤慷², 郑国平², 邓尚贵¹

1. 浙江海洋大学(舟山 316022); 2. 舟山市食品药品检测检验研究院(舟山 316021);
3. 浙江省农药检定管理所(杭州 310021)

摘要 建立了95种农药化合物准确性、定量的MRM数据库;在此基础上,比较了QuEChERS法和FaPEX法对保健食品原料中多残留农药检测结果的影响。结果表明,不同的样品前处理方式会造成待测液中基质的差异,从而产生不同的基质效应,影响结果的准确性。FaPEX法在保证较好检测结果准确度的前提下,可有效去除杂质,减少对仪器的污染程度,延长仪器使用寿命;同时,该方法大大缩短了前处理时间,减少了有机溶剂的使用量,对保健食品原料中多农药残留检测提供了一定的参考意义。

关键词 QuEChERS; FaPEX; 保健食品原料; 多残留农药; 基质效应

Study on Matrix Purification Technology of Multi-residue Pesticides in Health Food Raw Materials

Ma Yong-long¹, Zhou Yong², Yu Miao³, Wu Xian-su², Zheng Guo-ping², Deng Shang-gui¹

1. Food and Medical School of Zhejiang Ocean University (Zhoushan 316022);
2. Zhoushan Institute for Food and Drug Control (Zhoushan 316021);
3. Zhejiang Province Pesticide Verification Management Office (Hangzhou 310021)

Abstract The high throughput MRM database of 95 kinds of pesticide compounds was established; On this basis, the effects of QuEChERS and FaPEX methods on the detection results of pesticide residues in health food raw materials were also compared. The results in our study showed that the difference in sample pretreatment could induce the difference of the matrix in the liquid, thus result in different matrix effects, and affect the accuracy of the results. Ensuring the accuracy of detection results, FaPEX method could remove impurities more effectively, reduce the pollution degrees and extend the using life of the instrument; In addition, FaPEX could greatly shorten the pre-treatment time and reduce the usage amount of organic solvents, which provided a reference for the detection of pesticide residues in health food raw materials.

Keywords QuEChERS; FaPEX; health food raw materials; multi-residue pesticides; matrix effect

目前,随着新型农药的不断出现,实验室面临的问题在于,能否通过单次分析复杂样品基质,实现 10^{-9} 浓度水平多残留农药的检出限;同时,样品前处理应当简化,这也是影响保健食品原料的质量安全性的关键因素^[1]。

QuEChERS方法是目前国内外普遍使用的农药残留的检测手段,但其步骤相对较为复杂,且其放热现象导致低沸点目标物降解;石墨化碳黑的加入,使得平面环状的农药在分散基质萃取中被强烈吸附,这些因素都影响到结果的准确与否。此外,基质效应的存在是农残检测一直面临的一个问题。罗俊霞等^[2]研究表明,基质效应在有机磷农药残留时普遍存在,且含P=O键的化合物比含P=S键的化合物的基质效应明显;王连珠等^[3]也证明了多残留农药分析中采用基质匹配标准溶液外标法进行校准定量能较好地补偿基质效应。对于保健食品原料而言,基质的复杂多样性(脂肪、色素、糖类以及一些不溶性杂质等),且化合物挥发性、极性强弱均存在差异,因此样品前处理

的选择不但关系到分析结果的准确性,而且关系到对仪器本身造成的损害程度。

试验在2015版《中国药典》通则的基础上,将规定的QuEChERS法前处理结合气相色谱质谱法测定药材、饮片及制剂中76种农药残留量的检测种类增加到95种。通过对GC/MS/MS条件的优化,建立了95种农药化合物高分辨的MRM数据库;在此基础上,比较了QuEChERS法与FaPEX法对3种保健食品原料中农药残留的影响。相比前者, FaPEX法不但缩短了样品前处理时间,提高了工作效率,而且节省了有机溶剂的使用量,减少了环境污染,同时具有较好的基质净化效果,减少了对仪器的污染,提高了仪器的使用寿命,为目前保健食品原料中农药残留的检测研究及安全性评价提供一定的数据资料及信息支持。

1 试验部分

1.1 仪器和试剂

Agilent GCQQQ 7890B/7000C: 美国安捷伦公司,

美国; HITACHI CD6D离心机: 日本HITACHI公司, 日本; E812氮气浓缩仪: 北京帅恩科技公司; MS 3涡旋混匀器: 德国ICK公司, 德国; Milli-Q超纯水器: 美国Millipore公司, 美国; FaPEX快速萃取净化柱: 巨研科技有限公司(台湾); QuEChERS试剂盒: 美国安捷伦公司; 95种农药对照品: 购自北京坛墨质检科技有限公司、天津农业部和NEOCHEMA; 丙酮、乙腈、甲苯: 均为色谱纯, 德国Merck公司; 冰乙酸: 农残级试剂, Dikma。

试验材料: 姬松茸多糖、铁皮石斛、香加皮、葡萄籽提取物, 样品均为市售。

1.2 样品前处理

1.2.1 QuEChERS法

称取约3 g样品, 置于50 mL塑料离心管中, 加入1%冰醋酸溶液15 mL溶解, 放置30 min, 加入15 mL醋酸乙腈, 涡旋混合, 加入萃取用粉剂(含无水硫酸镁及醋酸钠)及陶瓷均质子, 立即加盖, 人工激烈震荡1 min, 于冰浴中冷却10 min, 15 °C下以4 000 r/min离心5 min, 取上清液9 mL置于净化用离心管(无水硫酸镁、PSA、C₁₈ ec和GCB), 并振荡或漩涡混合5 min, 再次置于15 °C下以4 000 r/min离心5 min, 取上清液6 mL, 氮吹至近干, 以丙酮定容至1 mL。供GC-MS/MS分析。

1.2.2 FaPEX法

称取约1 g均质后样品, 添加5 mL的1%醋酸乙腈溶液, 剧烈震荡30 s, 静置1 min, 倒入FaPEX萃取柱, 以每秒1滴流速加压(约30秒), 取1 mL氮吹至近干, 用丙酮定容至1 mL, 供GC-MS/MS分析。

1.2.3 标准曲线的绘制

分别精确吸取100 μg/mL, 1 000 μg/mL的标准母液适量并加样品空白基质提取液定容至10 mL, 混匀, 配制1 μg/mL的混标母液, 用样品空白基质提取液将混标母液分别稀释成5, 10, 20, 50, 100, 200, 400和500 ng/mL基质混合标准工作溶液, 用于绘制标准工作曲线(基质混合标准工作溶液使用前配制)。

1.2.4 气相色谱条件和质谱条件参数

气相色谱条件: HP-5MS UI (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 衬管: Agilent 5190-2293 (去活性, 900 μL, 不分流); 进样口温度: 280 °C; 隔垫吹扫流量: 3 mL/min; 柱温箱升温程序: 60 °C (1 min) 以40 °C/min升温至120 °C, 再以5 °C/min升温至310 °C; 载气: 氦气(纯度>99.999 5%), 恒压模式: 7.9 psi; 进样量: 1 μL; 进样方式: 不分流进样, 1 min后打开分流阀。后运行5 min, 柱温箱温度: 310 °C。

质谱条件: 电子轰击电离源(EI) 70 eV; 离子源温度280 °C; 传输线温度280 °C; 质谱扫描范围35-400 amu; 溶剂延迟时间3 min。

2 结果与讨论

2.1 GC/MS/MS条件的优化

2.1.1 GC条件的优化

多残留农药的检测作为痕量分析, 多选择不分流进样模式。同时, 设置合适的柱温升温程序不但有利于改善峰形, 而且对不同熔沸点化合物的分离具有很重要的意义。试验中, 通过比较各个化合物的自身及溶剂的性质, 设置初始柱温为60 °C, 保持1 min。通过多次进样, 根据各个化合物保留时间及峰形最终确定升温程序。另外, 样品中一些高沸点的基质成分会在进样结束后残留于造成对仪器及检测结果产生影响, 试验设置310 °C, 5 min的后运行时间, 可以解决上述顾虑。

另外, 随着色谱柱的使用, 其分离效果会逐渐降低, 造成化合物的定性定量不准确。因此, 该试验在恒压模式下, 通过对甲基毒死蜱进行保留时间锁定。保留时间锁定后, 在色谱柱及仪器条件发生改变时通过校正保留时间, EPC控制压力来调节载气流量, 使得保留时间恢复到预设状态, 这样便会使结果有较好的重现性, 在同一线性曲线下达到准确定性定量的目的。图1为甲基毒死蜱压力-流量曲线, 通过对甲基毒死蜱RTlock校正, 最终将其锁定在18.11 min。

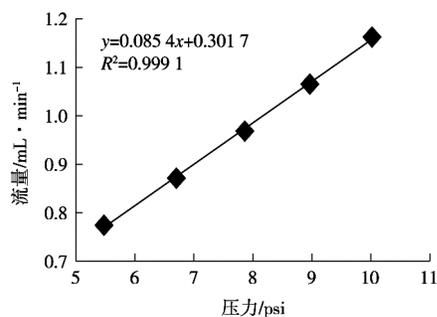


图1 甲基毒死蜱RTlock压力-流量曲线

2.1.2 分段采集建立MRM方法

在开发MRM方法时, 由于母离子的丰度在一定程度上决定着检出限的高低, 因此选择质量数及丰度较高的离子作为母离子。驻留时间对峰形有着绝对的影响, 试验根据95种农药化合物的实际情况, 建立了8个时间段, 每个时间段根据化合物的性质, 调整驻留时间, 选择丰度高、不被干扰的离子作为子离子; 使用QQQ优化助手, 创建碰撞能量为5, 10, 15, 20, 25, 30, 35和40 eV的序列方法, 找到最佳碰撞能量, 最终建立准确性、定量的MRM方法。图2为姬松茸空白基质样品TIC图, 图3为最佳MS/MS条件含姬松茸空白基质的95种农药化合物(500 ng/mL)混合标准工作溶液TIC图。

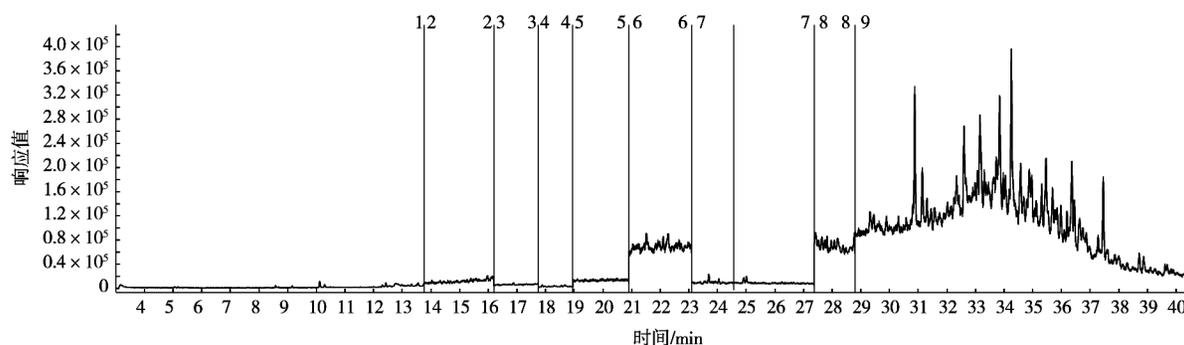


图2 姬松茸空白基质样品TIC图

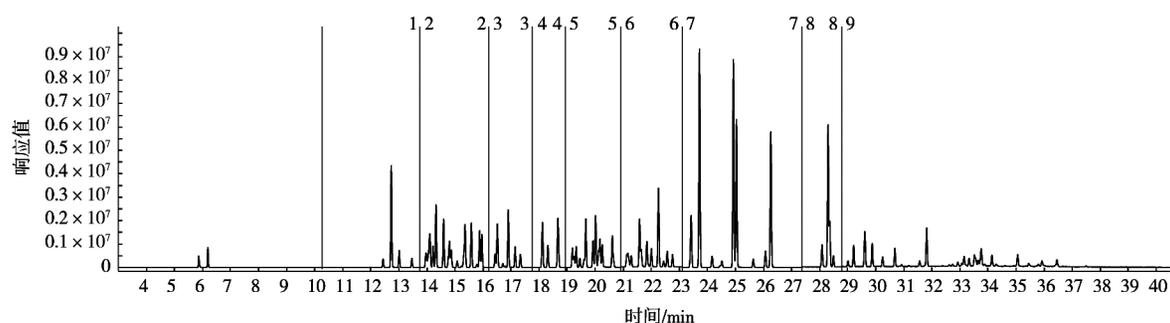


图3 含姬松茸空白基质的混合标准工作溶液TIC图 (500 ng/mL)

2.2 样品前处理条件的选择及优化

2.2.1 混合标准溶液溶剂的选择

由于不同农药本身的极性存在差异,在溶剂中的溶解度直接影响到在仪器上的响应值,最终决定其检出限。在农药分析中应用最广的溶剂为丙酮、乙腈、甲苯等,通过试验结果显示,使用丙酮相比其他两种溶剂,各个化合物的响应值高,因此以丙酮作为溶剂。

2.2.2 QuEChERS法和FaPEX法对样品净化效果的考察

采用QuEChERS法和FaPEX法分别对铁皮石斛、香加皮和葡萄籽提取物三种保健食品原料照1.2.1和1.2.2方法处理后上机分析。结果发现,同一基质样品在两种前处理方式下,其色谱图存在差异,说明这两种方法对同一基质样品净化效果有所不同。通过定量分析表明,对于同一基质样品,两种处理方式下检测结果存在较大的差异。采用QuEChERS法处理后检出铁皮石斛中DDT-p, p', 葡萄籽提取物中特丁硫磷分别高达0.15 mg/kg, 0.14 mg/kg, 而FaPEX法处理后未检出;但是后者处理下检出铁皮石斛中啶草丹、腐霉利、香加皮中氯唑磷以及葡萄籽提取物中啶草丹残留量分别高达0.226, 2.01, 0.166和0.385 mg/kg。由此推断,样品前处理方式对保健食品中多残留农药的检测有较大的影响;同时,这一检测结果也为我们敲响了警钟。具体影响效果我们做了进一步的探究。

2.2.3 QuEChERS法和FaPEX法对95种农药的吸附性的考察

精密吸取质量浓度为500 ng/mL的溶剂混合标准

工作溶液100 μ L,分别照1.2.1和1.2.2方法处理后上机分析,两种方法各做3组平行处理。试验结果发现,采用FaPEX法前处理后,有75种农药化合物回收率在60%~130%之间;而QuEChERS法前处理后,仅有21种农药化合物回收率在60%~130%之间,48种农药化合物回收率大于150%,除草醚、苯醚甲环唑回收率分别高达275.6%, 265.9%;从整体而言, FaPEX法相比QuEChERS法处理下,各个农药化合物表现为较好的试验结果。但众所周知, QuEChERS法作为现今农药残留分析技术中最广为接受的一种前处理方法,其回收率表现为较好的结果,但试验结果却与文献报道有一定的差别,为此,对此疑问,做了以下进一步的研究。

另外,百菌清、敌敌畏、久效磷、特丁硫磷、磷胺、异稻瘟净和三唑磷等农药化合物回收率低于50%。李学德等^[4]通过比较光源种类、溶液pH、水温和表面活性剂对百菌清光解的影响结果表明,百菌清的稳定性与这些条件有很大的关系,试验由于周期较长,随温度及光照等条件的变化,百菌清降解较快,导致结果的偏差。另外,磷胺、异稻瘟净和三唑磷均属于有机磷类农药,在自然环境中稳定性较差,因此降解较快,影响到回收率。

2.2.4 基质效应考察

在用气相和液相色谱法对食品、药品及烟草等进行多种农药残留检测时,如果用纯溶剂配制标准溶液来定量分析目标物,最后结果会比实际值偏高或者偏低,基质效应是造成这种现象的直接原因。由此,也

不难推测,在2.2.2中造成检测结果差异的原因是由于不同前处理方式造成待测液中基质的差异,进而影响到检测结果。理想状态下,对某一样品的定量时,采用该空白基质样品进行配置标准溶液,可以消除基质效应的影响,使得检测结果准确性和重复性达到要求^[5]。张丽莉等^[6]在检测茶叶中的有机磷时,发现有机磷农药在不同种类的茶叶基质中产生的基质效应存在差异。JIMENEZ J. J等^[7]通过研究蜂蜜提取液中有机溶剂的比例对甲拌磷等9种农药回收率的影响,表明了基质效应的存在对检测结果有着很大的影响。

试验将95种农药化合物分别用纯丙酮和用FaPaX处理获得的姬松茸空白基质样品配制质量浓度为10, 100和200 ng/mL的混标溶液,通过测定目标物在纯丙酮中的平均响应值(A, n=3)和在基质匹配标准溶液的平均响应值(B, n=3),得到基质效应(Matrix Effect, ME) = B/A。

试验数据表明,不同浓度的同一农药化合物以及同一浓度的不同农药化合物,其基质效应都存在差异;但对于绝大部分农药化合物而言,浓度与其基质效应呈正相关,对于绝大多数农药化合物,基质的加入会增强甚至较大程度地增强目标化合物在仪器上的响应值。由于此次试验的标准曲线是FaPEX法处理后的空白基质配制标准工作溶液所做,因此对同一种农药化合物的基质效应存在差异性。这就从一方面解释了上文中QuEChERS法和FaPEX法处理下回收率不同的结果,具体两种方式处理下对各个农药化合物的基质效应有待进一步验证。

2.2.5 QuEChERS法和FaPEX法对95种农药化合物的加标回收率比较

为进一步探究QuEChERS法和FaPEX法两种前处理方法对基质中95种农药化合物净化效果的影响,对样品基质做了加标回收试验。精密吸取质量浓度为1 μg/mL的丙酮溶剂混合标准工作溶液100 μL分别照1.2.1和1.2.2方法处理后上机分析,两种方法各做3组平行处理。

试验结果表明样品中加标20 ng/mL基质标准工作溶液后同2.2.3项下两种处理方式对农药化合物的吸附性几乎呈正相关,且加标回收率均有了明显改善,也说明了基质效应的存在对检测结果有着较为重要的影响。

在用气相色谱法测定样品时,样品中基质成分在进样口气化过程中减少了热不稳定化合物的分解,屏蔽了进样口的活性位点,从而使得目标化合物与活性位点的结合机会大大减少,增加了待测组分进入色谱柱中的传输量,使得目标化合物的响应值不同。该试验中采用QuEChERS法比FaPEX法后回收率明显高近1倍,推测可能是由于前者处理方式下比后者保留了较多的基质,从而使得在进样口屏蔽了更多的活性

位点,导致待测组分响应值较FaPEX法处理下高。而用FaPEX法处理下的基质标准工作溶液作为标准曲线时,其响应值相对较低,这就使得批处理后QuEChERS法结果偏高,导致回收率相对较高。基质效应不仅影响到农药残留测定的准确与否,还关系到仪器设备的使用寿命。FaPEX法相比QuEChERS法更能有效去除杂质,减少了对仪器的污染程度,加标回收率及RSD值也表明,除过个别农药化合物,FaPEX法能够满足农药残留分析要求。

另外,在对同一样品多次测定后发现,后一针较前一针响应值高,有文献也报道此类现象的发生可能是由于随着进样次数的不断增加,一些难挥发物或基质组分热分解产物沉积于进样口和色谱柱中,但沉淀物增加到一定量时,会造成色谱柱的堵塞等反而会降低目标物响应值^[8]。

3 结论

试验参考2015版《中国药典》通则规定的气相色谱质谱法测定药材、饮片及制剂中农药残留的检测方法,通过对气相色谱及质谱条件优化,建立了95种农药化合物准确性、定量的MRM数据库;在此基础上,分别比较了QuEChERS法和FaPEX法对保健食品原料中多残留农药检测结果的影响,同时考察了对基质效应的影响。结果表明,不同的样品前处理方式会造成待测液中基质的差异,从而产生不同的基质效应。基质的存在,会影响到目标化合物的响应值,从而直接影响检测结果的准确性。FaPEX法相比QuEChERS法,在保证较好的准确度的前提下,更能有效去除杂质,减少了对仪器的污染程度,延长仪器使用寿命;同时,相对简易的前处理步骤显著提高了检测效率、减低了对人体健康和环境污染的危害。该研究结果对保健食品原料中农药残留检测标准的完善提供了一定的参考意义,但是对于结果偏差较大的个别农药化合物,其检测方法还有待后续进一步的研究。

参考文献:

- [1] 杨崇仁. 中药农药现状与对策[J]. 中国现代中药, 2013, 15(8): 633-637.
- [2] 罗俊霞, 符建伟, 李德瑜, 等. 14种有机磷农药在9种蔬菜中的基质效应研究[J]. 湖北农业科学, 2013(23): 5858-5862.
- [3] 王连珠, 周昱, 陈泳, 等. QuEChERS样品前处理-液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中66种有机磷农药残留量方法评估[J]. 色谱, 2012, 30(2): 146-152.
- [4] 李学德, 花日茂, 岳永德, 等. 百菌清(Chlorothalonil)在水中的光化学降解[J]. 应用生态学报, 2006(06): 1091-1094.
- [5] 于建华, 朱梅华, 吉绍长, 等. 色谱法测定多种农药残留的基质效应研究进展[J]. 广东化工, 2017(03): 101-104, 100.
- [6] 张丽莉. 茶叶有机磷农药残留检测技术的改进以及基质效应的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.

基于UPLC-MS-MS技术定量确证小麦中10种真菌毒素

孟繁磊, 牛红红, 何智勇, 张振都, 蔡红梅, 宋志峰*

吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(长春 130033)

摘要 建立了小麦中黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素B₂、黄曲霉毒素G₁、黄曲霉毒素G₂、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮等10种真菌毒素的超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法检测的方法。小麦样品经乙腈-水-乙酸溶液震荡超声提取后, 采用多功能净化柱净化。待测物经Kinetex SB-C₁₈色谱柱分离, 甲醇-0.1%甲酸为流动相, 梯度洗脱, 正负模式同时扫描, 三重串联四级杆质谱多反应离子监测(MRM)方式检测, 基质标准校正, 外标法定量。结果表明, 在一定的浓度范围内, 10种真菌毒素线性关系良好, 相关系数均大于0.999, 方法的检出限为0.015~1 μg/kg, 空白样品中添加高中低不同浓度的真菌毒素的回收率为65.12%~89.16%, RSD%(n=6)在4.26%~9.46%之间。该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高, 适合小麦中多种真菌毒素的高灵敏度快速测定。

关键词 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法; 小麦; 真菌毒素

Quantitative Determination of 10 Kinds of Mycotoxins in Wheat by UPLC-MS-MS

Meng Fan-lei, Niu Hong-hong, He Zhi-yong, Zhang Zhen-du, Cai Hong-mei, Song Zhi-feng*

Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products (Changchun), Ministry of Agriculture (Changchun 130033)

Abstract A method for the quantitative determination of 10 mycotoxins, such as aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂, deoxynivalenol, 3-deoxynivalenol, 3-acetyl deoxynivalenol, 15-acetyl deoxynivalenol and zearalenone in wheat by ultra-high liquid chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry was developed. Wheat samples were extracted by ultrasonic with acetonitrile-water-acetic acid solution, and purified by multi-functional purification column. Chromatographic analysis was carried out in a Kinetex SB-C₁₈ column, the binary mobile phase consisted of methanol and 0.1% formic acid, and the system was run with a gradient program. Mass spectrometric detection was carried out on Xevo TQ mass spectrometer with negative and positive ionization mode. Quantification analysis was performed in multiple reaction monitoring (MRM), matrix standard calibration, and external standard method quantitative. The results demonstrated that the 10 mycotoxins had good linear relationship and the correlation coefficients were more than 0.999. The detection limit (LOD) of the method was 0.015-1 μg/kg, the average recoveries in the blank matrix ranged from 65.12% to 89.16% with relative standard deviation (RSD, n=6) of 4.26%-9.46%. The method in this study was fast analysis, good reproducibility and high sensitivity, it is suitable for rapid determination of various fungal toxins in wheat.

Keywords UPLC-MS-MS; wheat; mycotoxin

真菌毒素又称霉菌毒素, 是真菌在适宜的环境条件下产生的次级有毒代谢产物。真菌易寄居在状况不佳的储藏粮谷上和正在生长的植物组织中, 并产生真菌毒素。所以, 粮食在田间和储藏过程中会受到不同种类真菌的污染, 而且许多真菌能同时产生几种真菌毒素。小麦赤霉病是由多种镰刀菌(*Fusarium* spp.)引起的一种世界性真菌病害, 不但使小麦产量和品质降低, 而且在麦粒中存留有由镰刀菌代谢产生的真菌

毒素, 如脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮和雪腐镰刀菌烯醇等, 可以引起人和动物消化、神经、免疫以及生殖系统异常, 有的还具有致癌作用^[1-2]。因此, 开发多组分真菌毒素同时检测技术, 对于全面了解小麦中真菌毒素的污染状况和污染水平具有十分重要的意义。

各国对真菌毒素的强制限量规定和各项监控措施有力推动了真菌毒素检测方法的发展。经典的检测方

[7] JIMENEZ J J, BERNAL J L, NOZAL M J D, et al. Gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a florisisil column influence of the honey matrix on the quantitative results[J]. J Chromatogr A, 1998, 823(1+2): 381-387.

[8] ERNEY D R, GILLESPIE A M, GILVYDIS D M, et al. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection[J]. J Chromatogr, 1993, 638(1): 57-63.