

液相色谱 / 离子阱质谱和飞行时间质谱分析 橄榄油中的特丁津除草剂

Imma Ferrer¹ Michael Thuman¹ Jerry Zweigenbaum²

(¹ University of America, 04120 America, Spain; ² Agilent Technologies, Inc., 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808-1610 USA)

摘 要 本文摘要介绍了液相色谱 / 离子阱质谱和液相 / 飞行时间质谱对橄榄油中特丁津的定性定量分析。详细介绍了样品处理，包括液-液萃取和以氨基硅胶为基质分散的固相萃取法。样品的净化采用 Florisil 硅土小柱，用乙腈洗脱溶质。液相色谱 / 离子阱质谱的 MS/MS 模式采集特征离子 m/z 174，而利用液相 / 飞行时间质谱进行精确质量数分析 ($[M+H]^+$, m/z 230)，同时得到碎片的精确质量数和特征同位素分布。对于飞行时间质谱测得的质量精度小于 ppm。此方法具有高灵敏度、线性好及精度高的优点。液相 / 离子阱质谱和飞行时间质谱可以作为橄榄油中特丁津的常规方法。

橄榄油是地中海国家最普遍的食品。由于橄榄油对人的健康有益，所以越来越受到世界的重视。新鲜橄榄油是直接来自橄榄树的果实压榨，中间除了机械和物理加工之外，没有任何的处理以保证橄榄油的质量。在地中海国家（希腊、西班牙和意大利）使用的农药主要是除草剂和杀虫剂。尽管除草剂主要是施于土壤中，一些残留农药存留于植物中，导致橄榄被污染。结果一些农药残留会存在于橄榄油中。欧盟和食品法典以及联合国世界粮农组织都规定了橄榄核、橄榄油中农药残留的最大限量。现在，橄榄核、橄榄油中各种农药残留的法规正在被更新而且比以前更加严格^{〔1〕}。这些法规迫使分析实验室使用灵敏度和选择性更高的技术，以满足食品如食用油的法规要求。

食用油的基质非常复杂，含有大量的脂肪，在分析之前需要经过样品的提取过程。

多残留分析的样品净化依样品的不同而不同，而且也有几种分析方法检测橄榄油中的农药残留。其中常见的方法是气相色谱法，样品前处理一般先用液液萃取或凝胶过滤，将小分子和大分子的脂肪化合物分离，如甘油三酸酯^{〔2-3〕}分离。气相色谱法分析油类样品中的农药残留必须去除大分子量的脂肪化合物，以保证气相色谱的正常运行。最近报道了使用基质分散固相萃取净化，然后用气质联用和离子阱质谱技术检测食品中三嗪和有机磷农药的分析方法^{〔4〕}。本文介绍了液相色谱 / 离子阱质谱和液相 / 飞行时间质谱技术，检测橄榄油中常见的特丁津农药残留。

1 实验方法

1.1 橄榄油的提取

基质固相分散方法用于橄榄油中的特丁津提取。在进行基质固相分散之前，先用液液预提取。

在 100 mL 分液漏斗中，取 5 g 橄榄油（约 5.5 mL）与 15 mL 石油醚混合，用乙腈饱和。采用两步液-液萃取过程。将 25 mL 乙腈饱和和石油醚加入到橄榄油中。剧烈震荡分液漏斗 3 min，乙腈与石油醚分层。另外，将 10 mL 乙腈饱和和石油醚加入到石油醚的提取物中。剧烈震荡分液漏斗 3 min，乙腈与石油醚分层，将乙腈与前一次的乙腈混合。最后，将 7 mL 乙腈提取液转移至 10 mL 的试管中，浓缩至 2 mL。剩下的 2 mL 转移至玻璃研钵中进行基质固相分散净化。

1.2 基质固相分散净化 (MSPD)

将 2 g 氨基 (BondesilNH₂, 粒径 40 μm, Varian) 与上面的 2 mL 乙腈萃取液混匀，直到出现细小的颗粒。混合物转移至装有 2 g Florisil 硅土的小柱上 (12 mL Bond Elute)。小柱连接在真空上，调节流速在 3 mL min⁻¹ 左右。用 5 mL 乙腈洗脱两次。最后将洗脱液吹干。再用 1:1 的乙腈: 水定容。

在进样之前，用 0.45 μm 的 PTFE 膜过滤 (Millex FG, Millipore)，然后进样进行液质分析。

使用基质固相分散净化 (MSPD) 法，特丁津的回收率大于 96%，方法精密度 ($n=5$) 小于 5%。

1.3 安捷伦 1100 液相色谱 / 飞行时间质谱分析条件

(1) 液相条件

液相泵采用 1100 二元泵，1100 标准自动进样器，进样体积 50 μL。色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C8 4.6 mm ×

150mm, 5 μ m (p/n 993967-906); 流动相: A = 乙腈, B = 0.1% 甲酸; 梯度: 10% A, 5min, 在 25min 内, 梯度变为 100% A, 流速 0.6 mL $\cdot$ min⁻¹.

(2) 质谱条件 (MS)

LC/MSD TOF 离子源: ESI 正离子模式; 毛细管电压: 4000V; 雾化器压力: 40 psig 干燥气: 9L $\cdot$ min⁻¹; 干燥气温度: 300 $^{\circ}$ C; 碰撞电压: 190V; 锥孔电压: 60 V; Oct DCI: 37.5 V; Oct RFV: 250 V; 参比离子: m/z 121.0509, 922.0098 分辨率: 9500 $\pm$ 500@ 922.0098 扫描范围: 50—1000 m/z 参比喷雾器 A: 恒流模式.

安捷伦 1100 LC/MSD Trap 条件与 LC/MSD TOF 的条件一致. 液相泵: 1100 进样体积: 50 μ L 色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C8 4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m (p/n 993967-906); 流动相: A = 乙腈, B = 0.1% 甲酸; 梯度: 10% A, 保持 5min, 25min 线性梯度 100% A, 流速 0.6 mL $\cdot$ min⁻¹.

LC/MSD Trap ESI (正模式): 毛细管电压: 3200 V; 雾化器压力: 40 psig 干燥气: 9L $\cdot$ min⁻¹, 温度为 300 $^{\circ}$ C; 毛细管出口电压: 70 V; 雾化器: 60 V; 阱积聚: 5000Q 最大积聚时间 200ms.

2 液相 /离子阱质谱和液相 /飞行时间质谱分析特丁津

由于基质复杂, 橄榄油是最难分析的样品之一, 若使用全扫描模式将会产生很强的干扰峰. 因此, 对于离子阱质谱, 可以采用 MS/MS 模式来提高信噪比. 对于特丁津, 0.8 V 的碰撞电压是最佳的条件, 主要的特征离子是 m/z 174 (丢失 56 amu).

图 1 所示是离子阱液质的 MS/MS 模式分析橄榄油样品 (标样添加浓度是 0.025 mg $\cdot$ kg⁻¹). 特征离子 (m/z 174) 的提取离子流图及质谱图. 解离过程是在特丁津的 C—N 键之间断裂, 产生特征的碎片.

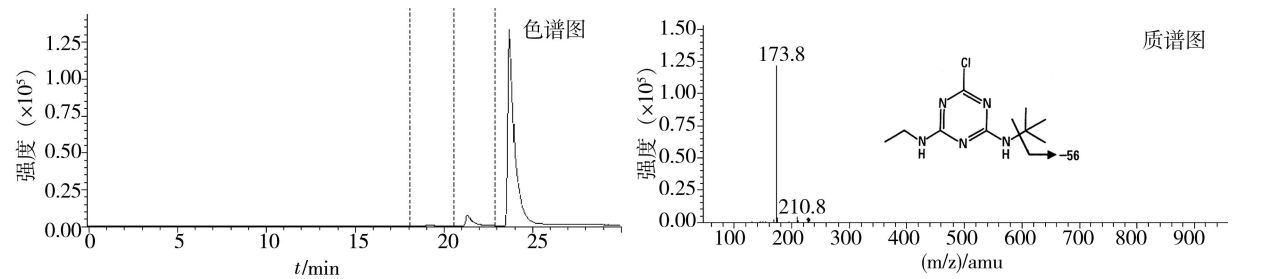


图 1 橄榄油样品添加特丁津 (0.025 mg $\cdot$ kg⁻¹) 特征离子的提取离子流色谱图和质谱图

除了离子阱质谱之外, 也尝试了液相色谱 /飞行时间质谱技术用于橄榄油中特丁津的分析. 采用源内碰撞诱导解离 (In-source CID) 产生碎片. 由于在飞行时间质谱上可以获得精确质量数的分子离子峰和碎片离子, 因此, 更容易进行结构的确认. 在三个碰撞电压, 160 V, 190 V 和 230 V 的条件下, 特丁津的准分子离子峰和特征碎片离子的相对丰度总结在表 1 中.

表 1 碰撞电压对解离效率的影响

m/z 离子	相对丰度			m/z 离子	相对丰度		
	160V	190V	230V		160V	190V	230V
230 [M+H] ⁺	100	100	20	174 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺	5	30	100

为了保证足够的定量灵敏度 (一般是用质子化的分子离子峰) 和定性质谱信息, 最后选择 190 V 的电压. 橄榄油中添加的特丁津的分子离子峰和特征碎片的精确质量数参见表 2. 表 2 为液相 /飞行时间质谱上得到的橄榄油中特丁津分子离子峰及主要碎片的精确质量数. 特丁津的添加水平是 0.025 mg $\cdot$ kg⁻¹, 碰撞电压是 190 V.

表 2 液相 /飞行时间质谱上得到的橄榄油中特丁津分子离子峰及主要碎片的精确质量数

元素组成	离子	理论质量数	测量质量数	误差 mDa mg ⁻¹ L ⁻¹	元素组成	离子	理论质量数	测量质量数	误差 mDa mg ⁻¹ L ⁻¹
C ₉ H ₁₆ N ₅ ³⁵ Cl	[M+H] ⁺	230.1167	230.1168	0.1	C ₅ H ₉ N ₅ ³⁵ Cl	[M+H-C ₄ H ₈] ⁺	174.0541	174.0542	0.1
C ₉ H ₁₆ N ₅ ³⁷ Cl		232.1137	232.1134	-0.3	C ₅ H ₉ N ₅ ³⁷ Cl		176.0511	176.0511	-0.05

在优化的碰撞电压条件下得到的特丁津的分子离子峰和特征碎片离子信息可以用于特丁津的确认, 尤其是含氯原子的同位素分布. 如图 2 所示, 特丁津含有一个氯原子. 保留时间、准确质量数及同位素分布可以确认其结构而且该

分子中只含有一个氯原子。图 2 为添加 $0.025\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 特丁津的橄榄油样品的液相 / 飞行时间质谱的总离子流图、 m/z 230 离子的提取离子流图和其相应的质谱图。

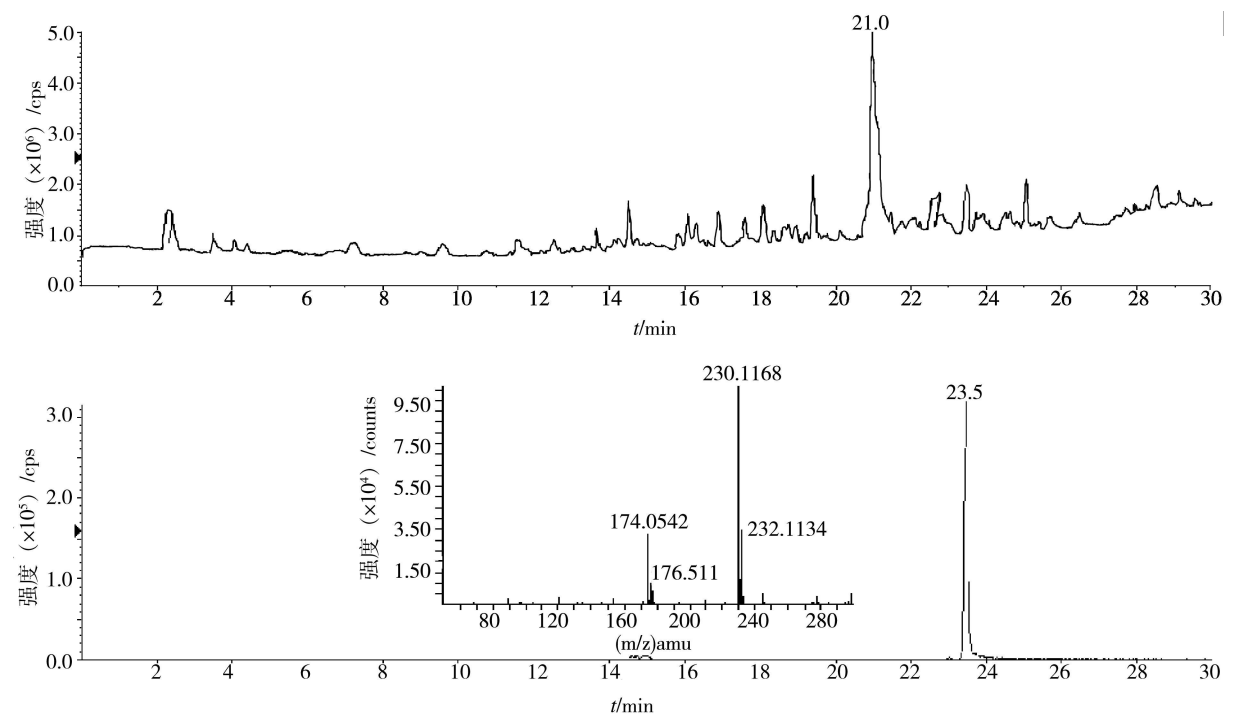


图 2 添加 $0.025\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 特丁津的橄榄油样品的液相 / 飞行时间质谱的总离子流图、 m/z 230 离子的提取离子流图和质谱图

3 分析方法验证

为了使分析方法能用于高油脂基质样品中特丁津的分析，对整个分析方法进行了评价。利用 MSPD 萃取法制备的橄榄油样品为基质制备校正曲线。在 $0.005 - 0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的范围内，进行有基质条件下的七点校正。利用离子阱质谱对 m/z 230 离子进行 MRM 模式的定量分析。对于飞行时间质谱，以分子离子峰（质谱窗口的宽度为 0.1 Da ）为定量离子。图 3 为在飞行质谱上橄榄油基质和标准溶液的校正曲线。检测限的测试条件为：在有基质的条件下，得到信噪比是 3 时的检测限。分析结果如表 3 所示。结果表明，检测限远远低于法规要求的最大残留限量。飞行时间质谱可以使用窄质量窗口用于定量分析，而且可以得到更高的信噪比，最终得到更低的检测限。上述结果显示，采用 MSPD 样品处理方法和液相 / 飞行时间质谱技术适用于含高脂肪基质样品中农药残留的分析。

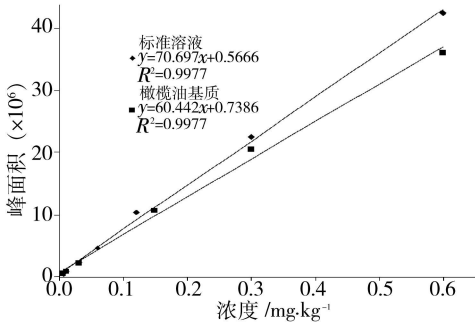


图 3 在液相 / 飞行时间质谱上，橄榄油基质和标准溶液的校正曲线

表 3 离子阱液质和飞行时间质谱技术检测橄榄油中特丁津的条件									
方法	浓度范围 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	R^2	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	RSD % ($n=5$)	方法	浓度范围 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	R^2	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	RSD % ($n=5$)
LC/IMS	0.005—0.5	0.991	0.2	5.5	LC/TOFMS	0.005—0.5	0.995	1	2

4 橄榄油样品的分析

为了验证方法的有效性，将上述方法应用于实际样品，结果如图 4 所示，在橄榄油中发现微量的特丁津在 m/z 230 的提取离子流图。这是一个真实的样品，将液相 / 飞行时间质谱技术用于橄榄油中微量农药残留化合物的分析，选择性可以通过飞行时间质谱的分辨率来提高。图中所示为质量窗口在 0.05 Da 的条件下，信号离子 m/z 230 与类似分子背景的分辦情况。可以使用氯原子的特征同位素分布对特丁津进行定性定量分析。

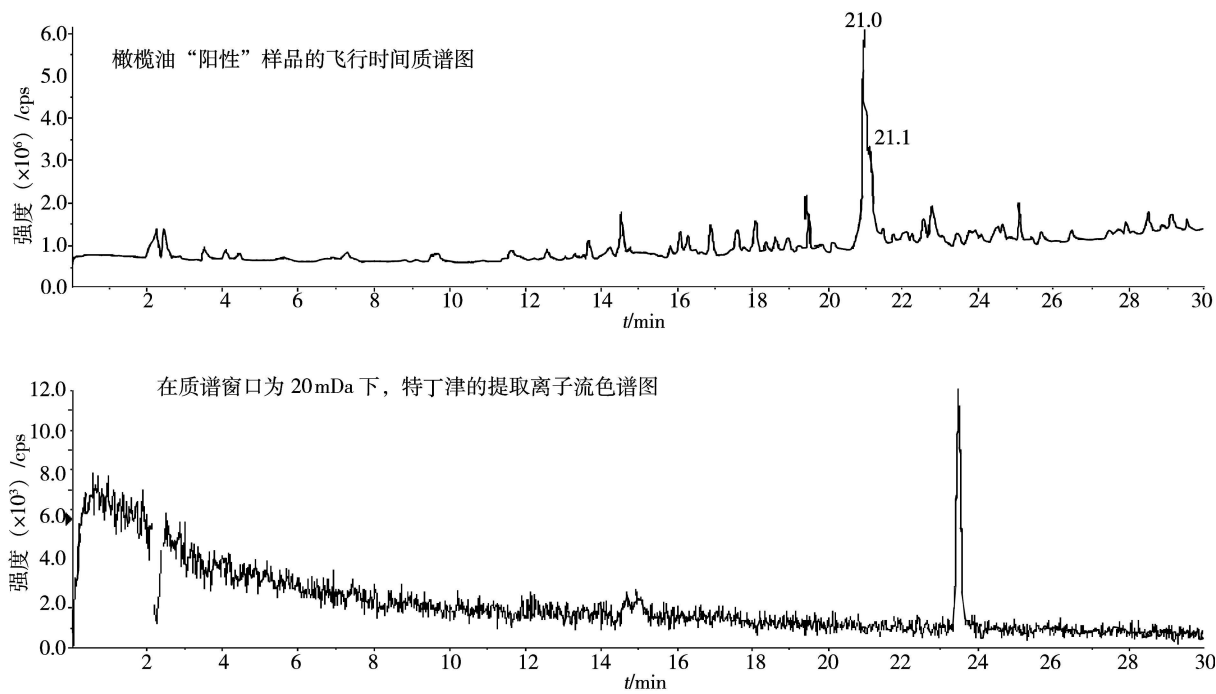


图 4 橄榄油“阳性”样品的飞行时间质谱和质谱窗口为 20 mDa特丁津的提取离子流色谱图

5 结论

液相 /离子阱质谱和液相 /飞行时间质谱用于橄榄油中农药残留的定性和定量分析. 对于离子阱质谱, 采用 MS/MS 模式, 对特征离子 m/z 174 进行定量分析. 对于飞行时间质谱, 可以利用分子离子的准确质量数得到实验分子式和氯原子的特征同位素分布对橄榄油中微量的特丁津进行确认. 质量数精度误差一般小于 ppm. 离子阱液质和飞行时间质谱分析方法的灵敏度、线性相关系数、精密度、基质干扰和检测限适用于橄榄油中特定津的常规检测.

参 考 文 献

[1] Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on Maximum Residue Levels of Pesticides in Products of Plant and Animal Origin COM /2003 /0117 / final— COD2003 /0052
www.europa.eu.int/pol/food/indexes.htm

[2] Lentz-Riós Ch, Avranides E J, Cherasco F, *J. Chromatogr. A*, 2001, **912** 135—142

[3] Vreuls J J, Swen R J J, Goudriaan V P et al., *J. Chromatogr. A*, 1996, **750** 275—286

[4] Ferner C, Gomez M J, Garcia-Reyes J F et al., *J. Chromatogr. A*, 2005, **1069** 183—194