

高效液相色谱-串联质谱法测定水果中乙氧基喹啉残留

丁涛¹, 沈崇钰¹, 蒋原¹, 姚义刚², 贾涛²,
赵厚民², 沈伟健¹, 徐锦忠¹, 姚茸茸¹

(1. 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 江苏 南京 210001;

2. 江苏省食品营养成分与有毒有害物质检测中心, 江苏 南京 210042)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱法测定苹果和梨中乙氧基喹啉抗氧化剂残留的方法。正己烷提取碱性样品溶液中的分析残留物,一步萃取,简单快捷。利用 C₁₈ 色谱柱进行分析,流动相中加入适量的甲酸和乙酸铵优化色谱峰形。串联质谱选择 m/z 218.1 母离子和 m/z 147.9 和 m/z 175.9 两个子离子进行定性和定量分析。该方法检测下限可以达到 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,线性范围为 $20 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,3个添加水平回收率为 $86.6\% \sim 91.7\%$,相对标准偏差(RSD)为 $4.8\% \sim 5.3\%$ 。

关键词:高效液相色谱-串联质谱;乙氧基喹啉;水果

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2009)05-0307-04

Determination of Ethoxyquin Residues in Fruits by HPLC-MS/MS

DING Tao¹, SHEN Chong-yu¹, JIANG Yuan¹, YAO Yi-gang², JIA Tao²,
ZHAO Hou-min², SHEN Wei-jian¹, XU Jin-zhong¹, YAO Rong-rong¹

(1. *Animal, Plant and Food Inspection Center (APFIC) of Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China;*

2. *Nutritional, Poisonous and Harmful Compound Detection Center of Jiangsu, Nanjing 210042, China*)

Abstract: A method for analysis of trace ethoxyquin residues in apple and pear was developed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The ethoxyquin residues in alkali sample solution were partitioned into hexane, and C₁₈ reverse phase column was applied as the analytical column. Appropriate formic acid and ammonium acetate were added into mobile phase to optimize the shape of chromatographic peak. One parent ion of m/z 218.1 and two daughter ions of m/z 147.9 and m/z 175.9 were selected as quantitative and qualitative ions. Limit of detection (LOD) is $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and the linear range is $20 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The recoveries in three spiked level are in the range of $86.6\% \sim 91.7\%$, with relative standard deviation (RSD) of $4.8\% \sim 5.3\%$.

Key words: HPLC-MS/MS; ethoxyquin; fruit

收稿日期:2009-01-20;修回日期:2009-05-09

基金项目:公益性行业科研专项“养殖与屠宰环境中污染物检测技术研究”项目基金(No. 200810099),江苏省科技厅“科技基础设施建设计划”项目基金(No. BM2007511)资助

作者简介:丁涛,男(汉族),江苏人,工程师,从事食品安全残留检测研究。E-mail:dingt@jsci.gov.cn

乙氧基喹啉(又名 6-乙氧基-2,2,4-三甲基-1,2-二氢喹啉)是目前国内外广泛使用的高效氧化剂,由于其具有较强的防霉和保鲜作用,常用于苹果、梨等水果的保鲜。中国人民共和国国家标准食品添加剂使用卫生标准 GB 2760—2007 中规定,乙氧基喹啉在经表面处理的水果中可以作为防腐剂使用,其用量按照生产需要适量使用,残留量不得超过 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [1];国际食品法典推荐梨中的残留限量为 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [2];欧盟规定乙氧基喹啉在苹果、梨子中的残留限量为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [3];日本除乙氧基喹啉在苹果、梨中的残留限量为 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 外,其余植物源性食品中残留限量均不得超过 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [4]。



图 1 乙氧基喹啉结构式

Fig. 1 The structure of ethoxyquin

目前,乙氧基喹啉残留的测定方法较少,主要有高效液相色谱配合紫外检测器[5-7],气相色谱法配合氮磷检测器[8]。但近年来,随着液相色谱-质谱联用技术的发展,该技术灵敏度高、定性准确,可简化前处理过程,该方法广泛地应用于各种农药、兽药和食品添加剂残留的分析中。为了满足各国最低残留限量的要求,本工作拟采用高效液相色谱-串联质谱法对水果(苹果和梨)中乙氧基喹啉残留量进行测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Thermo Finnigan TSQ Quantum Access 液相色谱-高分辨串联四极杆质谱联用仪;美国 Thermo 公司产品。

甲醇(色谱纯);德国 Merck 公司产品;醋酸铵(色谱纯);美国 Tedia 公司产品;氢氧化钠和正己烷(分析纯);南京化学试剂厂产品;水为重蒸蒸馏水;乙氧基喹啉(纯度 $\geq 98\%$);Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司产品。

标准工作溶液的配制:将乙氧基喹啉标准液用甲醇配制成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 单标储备液,避光下冷冻保存。按实际检测需求,用流动相起始梯度

配比,将储备液稀释到浓度为 $1.0 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合标准工作溶液。

1.2 液质联用测定条件

1.2.1 色谱条件 Thermo Hypersil Gold 色谱柱($50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 1.9 \mu\text{m}$);流动相:A 为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液和 0.1% 甲酸水溶液,B 为甲醇;梯度洗脱程序: $0 \sim 3.0 \text{ min}$, $65\% \text{ A}$, $3 \sim 4 \text{ min}$, $65\% \sim 10\% \text{ A}$, $4 \sim 6 \text{ min}$, $10\% \text{ A}$, $6 \sim 7 \text{ min}$, $10\% \sim 65\% \text{ A}$, $7 \sim 8.5 \text{ min}$, $65\% \text{ A}$;流速: $0.20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温:室温;进样体积: $25 \mu\text{L}$ 。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子方式检测,源内诱导解离电压(SID) 10 V 。乙氧基喹啉的质谱条件列于表 1。

表 1 乙氧基喹啉的质谱条件

Table 1 ESI-MS/MS conditions of ethoxyquin

化合物	母离子/ (<i>m/z</i>)	子离子/ (<i>m/z</i>)	碰撞能量/ eV	锥孔电压/ V
乙氧基喹啉	218.1	147.9	20	50
		175.9	16	

注:下划线代表定量离子

1.3 样品提取

称取(5.00 ± 0.05)g 样品于具塞锥形瓶中,加入 15 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液和 50 mL 正己烷,振荡提取 20 min 。取全部正己烷提取液至烧瓶中,重复上述提取步骤 1 次,合并正己烷提取液, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴旋转蒸发至干。用流动相($V(5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵): $V(0.1\%$ 甲酸水溶液和甲醇) $=35:65$)定容至 1.0 mL ,过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜至进样瓶中,供液相色谱-质谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 提取溶液的选择

乙氧基喹啉化学结构式中含有喹啉环,其总体极性偏弱,属于弱极性化合物,不溶于水,易溶于有机溶剂,因此本试验采用不同有机溶剂(丙酮、乙腈、甲醇和正己烷)对乙氧基喹啉进行提取。结果发现,无论使用何种有机溶剂进行直接提取,其直接提取效率都不高,乙腈和甲醇提取效率最低,只有 10% 左右,丙酮提取效率略高,约 30% ,使用正己烷提取效率约 40% 。苹果和梨中含有少量的水,因此在使用乙腈和甲醇直接

作为提取溶剂使用后,会导致浓缩有一定的困难,而加入无水硫酸钠或硫酸镁脱水试剂后,回收率仍无显著变化。导致有机溶剂直接提取困难的原因可能是由于喹啉环上的仲胺具有一定的接受质子能力,属于一种弱的有机碱,因此乙氧基喹啉在苹果和梨基质中容易以离子态存在,导致直接使用有机溶剂提取困难,损失较大。有报道^[4]采用加入 5 mL 碳酸钠溶液($100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),再使用正己烷进行提取,其原理就是利用弱碱性溶液抑制乙氧基喹啉结构中仲胺的离子化,然后再使用最常用的正己烷进行液-液萃取,其回收率可以达到 $87.8\% \sim 96.6\%$ 。因此本试验延续使用碱性溶液抑制乙氧基喹啉的离子化,再使用正己烷进行提取。所不同的是,标准中采用高效液相色谱-紫外检测器进行测定,其抗干扰能力较弱,需要通过调节溶液 pH 值来控制乙氧基喹啉在有机相和水相中的溶解度,反复提取,从而达到净化的效果。而高效液相色谱-串联质谱法抗干扰能力强,可以简化前处理过程,因此本研究使用氢氧化钠溶液代替碳酸钠溶液,一步提取即可。

通过实际添加试验(添加浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,添加基质为苹果和梨),加入 4 种不同浓度的氢氧化钠溶液(0.05 、 0.1 、 0.2 和 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),测定正己烷提取时是否会对回收率产生影响,其结果示于图 2。

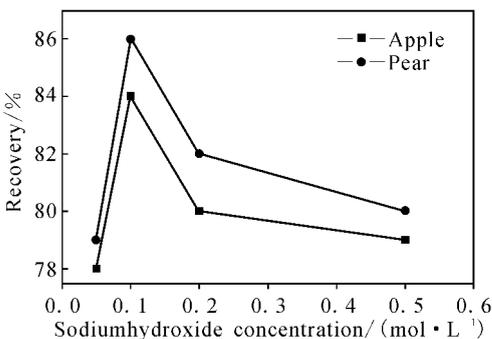


图 2 不同浓度氢氧化钠溶液下的提取效率($n=3$)

Fig. 2 Extraction efficiency of ethoxyquin using different concentration of alkali solution

结果发现,使用不同浓度氢氧化钠对正己烷的提取实际上没有本质区别,在氢氧化钠溶液浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,正己烷提取效率略高,约 85% 左右,最终将氢氧化钠溶液浓度定为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 色谱柱和流动相的影响

本试验使用几种不同的反相色谱柱,结果发现,由于乙氧基喹啉的弱极性导致在常用的 C_{18} 色谱柱上具有很强的保留,需要使用相对较高的有机相比比例,并且配合控制流动相的 pH 值来减少其在色谱柱上的强保留和良好峰形。针对这种情况,使用一般分析比较少用的短柱,即 Thermo Hypersil Gold 色谱柱($50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 1.9 \mu\text{m}$),可以在较短的时间内将分析物从色谱柱上洗脱下来,节省分析时间。

一般色谱分析的有机相均为甲醇和乙腈,实验发现,甲醇作为流动相可以更好的提高检测灵敏度,使用甲醇作为有机相,其灵敏度比使用乙腈高出约 20% 。而在水相中加入酸或者一定量的挥发性电介质,可以改变分析物的保留时间和峰形。在试验中,单独加入浓度为 0.1% 甲酸可以使色谱峰提前,并且可以压缩色谱峰的宽度,提高质谱的响应值,但是容易出现前延峰;而在水相中加入浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵,则峰形相对对称,但是峰形很宽,导致灵敏度比使用甲酸要低很多。因此本试验在水相中同时加入甲酸和醋酸铵,结果发现,峰形对称,没有前延峰的出现,并且灵敏度和单独使用甲酸相比基本没有变化,最终选择了甲醇作为流动相,而在水相中加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵和 0.1% 甲酸。

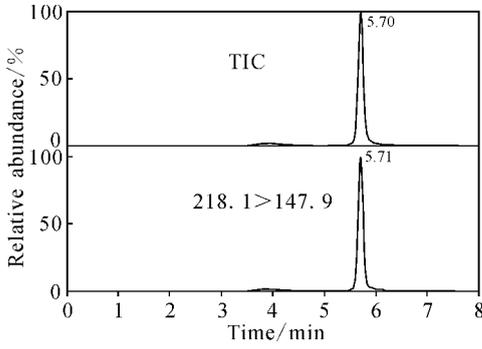
2.3 线性范围、检测限、回收率和精密度

用流动相配制质量浓度为 $1.0 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液,乙氧基喹啉的线性方程相关系数(r)为 0.993 。在阴性苹果和梨基质中添加乙氧基喹啉标准溶液,添加水平为 5 、 10 和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,重复测定 10 次,计算其回收率和精密度,结果列于表 2,色谱图示于图 3,图 4。在 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 添加水平上,其 $S/N > 10$,该方法检测限可达到 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表 2 回收率和精密度实验

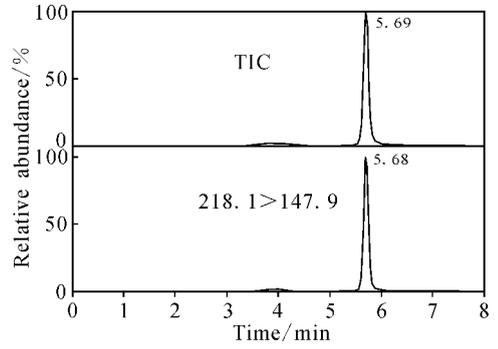
Table 2 Recovery and precision

添加水平	$5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$		$10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$		$20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	
	苹果	梨	苹果	梨	苹果	梨
测定物质	苹果	梨	苹果	梨	苹果	梨
平均测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	4.41	4.33	8.93	8.70	18.33	17.68
平均回收率/%	88.2	86.6	89.3	87.0	91.7	88.4
RSD/%	5.1	5.3	4.9	5.0	4.8	4.9



注:添加水平为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$

图 3 苹果样品加标图谱



注:添加水平为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$

图 4 梨子样品加标图谱

Fig. 3 Chromatograms of ethoxyquin spiked in apple

Fig. 4 Chromatograms of ethoxyquin spiked in pear

3 结论

本工作采用高效液相色谱-串联质谱法测定水果中乙氧基喹啉的残留,利用串联质谱强抗干扰能力,简化前处理过程,提高了检测灵敏度和定性能力。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB2760—2007 中华人民共和国国家标准食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
- [2] Pesticide residues in food[EB/OL]. [2009-05-30]. http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_g-e.jsp.
- [3] Health and safety executive[EB/OL]. <https://secure.pesticides.gov.uk/MRLs/search.asp>.
- [4] Maximum residue limits (MRLs) list of agricultural chemicals in foods[EB/OL]. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>.

m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html.

- [5] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. SN 0287—93 进出口水果中乙氧基残留量检验方法-液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社, 1993.
- [6] HE P, ACKMAN R G. HPLC determination of ethoxyquin and its major oxidation products in fresh and stored fish meals and fish feeds [J]. J Sci Food Agric, 2000, 80(1):10-16.
- [7] HE P, ACKMAN R G. Residues of ethoxyquin and ethoxyquin dimer in ocean-farmed salmonids determined by high-pressure liquid chromatography [J]. Food Chemistry and Toxicology, 2000, 65(8): 1 312-1 314.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB/T 15518—1995 水果中乙氧基喹残留量的检验方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.

=====
(上接第 306 页)

- [9] KAUPPILA T J, KUURANNE T, MEURER E C, et al. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes [J]. Anal Chem, 2002, 74(21): 5 470-5 479.
- [10] JALBERT J, GILBERT R, TETREAULT P. Simultaneous determination of dissolved gases and moisture in mineral insulating oils by static head-space gas chromatography with helium photoionization pulsed discharge detection [J]. Anal

Chem, 2001, 73(14): 3 382-3 391.

- [11] 郑红燕,汪利民,谭皓,等. 大气中 16 种多环芳烃化合物高效液相色谱法测定[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(9): 564-566.
- [12] Product & Technical Literature. Analyze additional compound classes with the photospray atmospheric pressure photoionization source[EB/OL]. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm__marketing/documents/generaldocuments/cms_040031.pdf.