

液-质联用法同时检测植物源性食品中 4 种鼠药残留

LC/MS-MS for simultaneous determination of 4 kinds of
rodenticide residues in plant-origin food

陈 华¹ 徐文泐¹ 王云昊² 邹 桥¹ 李 涛¹

CHEN Hua¹ XU Wen-yang¹ WANG Yun-hao² ZOU Qiao¹ LI Tao¹

(1. 湖南省食品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410017; 2. 湖南农业大学资源环境学院, 湖南 长沙 410012)

(1. Human Research Institute of Food Quality Supervision and Inspection, Changsha, Hunan 410017, China; 2. The College of Resources and Environmental Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410012, China)

摘要:建立液相色谱-质谱联用仪测定植物源性食品中 4 种鼠药残留的方法。考察不同的流动相及净化方式对检测结果的影响。粮谷类试样经乙腈超声提取上机, 果蔬类以乙腈提取后采用 PSA+GCB 管进行净化, LC/MS-MS 进行检测。添标水平为 0.002~0.050 mg/kg 时的回收率均达到 70% 以上, 相对标准偏差为 4.1%~9.5%, 杀鼠醚和杀鼠灵的方法检出限为 0.001 mg/kg, 其它 2 种鼠药的检出限为 0.005 mg/kg。该方法快速、简单、灵敏度高, 符合 GB/T 27404—2008 对方法确认技术参数的要求。

关键词:液相色谱-质谱联用法; 鼠药残留; 植物源性食品; 检测

Abstract: To establish a LC/MS-MS method for determination of 4 kinds of rodenticide residues in plant-origin food, the effects of different mobile phase and purification on the recovery was studied. The grain samples were extracted by acetonitrile and then determined by LC/MS-MS, while the samples with fruit or vegetable matrix were purified with PSA+GCB after the extraction. LC/MS-MS was used for determination. The recoveries were all above 70% at spiked levels of 0.002~0.050 mg/kg, and the relative standard deviation of the methods were 4.1%~9.5%. The LOD of warfarin and coumatetralyl were 0.001 mg/kg while the other two reach 0.005 mg/kg which was in accordance with the requirement of technical parameters for analysis, with fast and simple determination and high sensitivity.

Keywords: GC-MS; rodenticide residues; plant-origin food; determination

基金项目:湖南省食品药品安全科技项目(编号:湘食药科 R201608)
作者简介:陈华(1977—), 女, 湖南省食品质量监督检验研究院工程师, 硕士。E-mail: 53069419@qq.com

收稿日期:2017-08-07

近年来, 因鼠药造成的误食、投毒、自杀事件屡有发生, 使用鼠药非法盗猎以牟取利益的事件也时有报道。随着此类案件的不断出现, 为公安等执法部门提供相关的检验技术支撑已成为顺畅“行刑衔接”、维护食药安全的强烈需求。类似食品安全事故存在突发性、隐匿性等特点, 实现及时有效处置此类食品安全事故面临较大挑战。由于鼠药种类繁多, 而且目前尚未有任何成熟的检测方法对食品中的鼠药进行分析, 中国政府也未发布食品中鼠药残留的检测方法标准, 检测存在盲区和死角, 因此有必要研发针对此类食品危害的检测技术, 为及时有效地预防、预警、应对和处置此类事故提供必要的技术支持。

现在使用的鼠药一般分为两种, 即具有 4-羟基香豆素结构和茚满二酮类结构的化合物^[1]。茚满二酮的代表有敌鼠钠、杀鼠酮和氯鼠酮; 4-羟基香豆素有杀鼠灵、克鼠灵、氯杀鼠灵、杀鼠醚、鼠得克、溴鼠灵、噻鼠酮、氟鼠灵和溴敌隆等。这种鼠药的特点是毒性小, 效果较好, 人类误食后服用维生素 K₁ 能达到解毒效果^[2]。此类鼠药的已有检测方法有分光光度法^[3]、气相色谱及气相色谱质谱联用法^[4-7]、液相色谱及液相色谱质谱联用法^[8-11]。其中 Hernández A M 等^[12]采用 LC-DAD-FLD-MS 法对动物组织中的氯鼠酮、溴敌隆、溴鼠灵、鼠得克进行了检测, 前处理样品用甲醇提取, 方法简单, 回收率可达到 82%~103%。Zhu 等^[13]采用液液试剂法分别提取毛发中的溴敌隆和溴鼠灵, 以乙酸铵和甲醇作为流动相, 回收率可达 90.3%~109.3%, 但检出限较高, 分别为 0.010, 0.025 mg/kg。食品中鼠药的检测方法研究并不多, 麦沛明等^[14]采用分散液液微试剂提取了大米中的溴鼠灵和溴敌隆, GC-MS 上机, 检出限达 0.2 μg/kg。这种方法的特点是在样品中加入既能和水相样品相溶又能和萃取剂相溶的试

剂,将萃取剂快速注入水相样品溶液,在分散剂-水相间形成纳米级微珠,每一个微珠都可看成萃取器,使得接触面积无限大,提高了萃取效率和富集倍数,常用于粮谷类样品中农药残留的检测。在调味品方面,朱峰等^[15]建立了酱油、醋中杀鼠灵、杀鼠醚、敌鼠、氯敌鼠、溴敌隆、大隆、杀他丈、鼠得克、克灭鼠、氯杀鼠灵 10 种鼠药残留的检测方法,经由 UPLC-MS/MS 检测并探讨了电离模式对结果的影响,回收率达 74.8%~112%,其中在酱油中的检出限达到了 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$,这种高检出限使得在实际检测过程中可能出现假阴性的结果而影响样品的真实判定。

本研究拟扩大食品基质范围,并建立一种操作简单、灵敏度较高的液相色谱-质谱法。由于植物源性食品和动物源性食品的基质相差较大,前者含色素、碳水化合物较多,后者常含蛋白质和脂肪,因此一般需要采用不同的前处理方法。本试验拟研究植物源食品中的鼠药残留检测,为后续的动物源食品中的鼠药残留检测提供研究思路。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

杀鼠灵、溴敌隆、溴鼠灵、杀鼠醚:99%,德国 DrEhrenstorfer 公司;

乙腈、甲醇:色谱纯,德国 Merck 公司;

乙酸铵:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

PSA:分析纯,上海迪马科技有限公司;

PSA 试剂管 A(50 mg PSA + 50 mg GCB + 150 mg MgSO_4)、PSA 试剂管 B(50 mg PSA + 50 mg GCB + 150 mg MgSO_4 + 50 mg C_{18})、PSA 试剂管 C(50 mg PSA + 200 mg Na_2SO_4 + 50 mg C_{18}):2 mL,美国安捷伦科技有限公司;

植物源性食品:市售。

1.2 仪器与设备

液相色谱-质谱联用仪:AB SCIEXQTRAP 4500 型,美国应用生物系统公司;

离心机:Centrifuge 5804R 型,德国 Eppendorf 公司;

分析天平:BS224s 型,北京赛多利斯仪器系统有限公司;

涡混振荡仪:CM-1000 型,东京理化器械株式会社。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX SB-C18 column (150 mm \times 4.6 mm \times 5 mm);流动相 A:乙酸铵水溶液 (20 mmol/L),流动相 B:乙腈;流速:0.2 mL/min。进样量:5 μL ,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 The gradient elution condition

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.1~4.0	70	30
4.0~9.0	10	90
9.1~16.0	70	30

1.3.2 质谱条件 电喷雾电离源,负离子模式。离子源温度为 450 $^{\circ}\text{C}$,气帘气 25 mL/min,辅助气 40 mL/min。分别采用 full-scan 模式和 tandem 模式,在整个确认试验中,4 种鼠药的特征离子和碰撞能见表 2。

表 2 4 种抗凝血类鼠药的母离子、子离子及碰撞能
Table 2 Detection ions and collision energy of 4 kinds of rodenticide residues

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能/eV
杀鼠灵	307.1	117.0	42
	307.1	161.1	22
溴敌隆	524.9	218.9	47
	524.9	250.0	37
杀鼠醚	290.9	141.0	28
	290.9	247.0	21
溴鼠灵	526.0	160.9	32
	526.0	360.0	21

1.3.3 标准溶液的配制 分别准确称取 4 种标样 (0.100 0 g)于 100 mL 容量瓶中,以丙酮稀释至刻度,此为母液。工作液现配现用。

1.3.4 样品前处理

(1) 粮谷类食品:将样品匀质粉碎后,准确称取 1 g(精确至 0.000 1 g),以 10 mL 乙腈提取,涡混 4 min 后以不小于 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液上机检测。

(2) 水果与蔬菜:将粉碎后的样品准确称取 1 g(精确至 0.000 1 g),以 10 mL 乙腈提取,涡混 2 min 后以不小于 4 000 r/min 离心 5 min,提取上清液,并重复 1 次,合并上清液后,过萃取小柱,并取净化液上机检测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

考察了不同流动相如甲醇-水(体积比 70:30)、甲醇-乙酸铵(体积比 70:30)、乙腈-乙酸铵(体积比 70:30)对质谱图的影响(梯度洗脱条件见表 1)。由图 1 可知,当流动相为乙腈和乙酸铵时的色谱图峰形较好,分离度高。故以其为本次试验的流动相。4 种鼠药浓度在 64~200 ng/mL 时均呈现良好的线性关系,线性相关系数均 >0.99 。分别用提取试剂和空白基质配制相同系列的标准溶液上机分析,考察信号值的差别。结果表明,相同浓度空白基质配制溶液信号值与溶液配制标准溶液信号值有一定的差别,应用空白基质溶液配制。但在实际工作中,做到每一种基质均用基质空白溶液配制过于理想化,因此,以 10 倍信噪比(S/N)作为定量检出限,并再提高 2~3 倍,得到实际检出限见表 3。由表 3 可知,溴敌隆和溴鼠灵这 2 种分子量较高的化合物检出限相应较高,但已低于文献^[15]的检出限。

2.2 质谱条件的优化

选用 ESI 正离子模式对母离子进行全扫,结果可得负离子模式下的离子响应值更高。以一级质谱扫描对各分子离

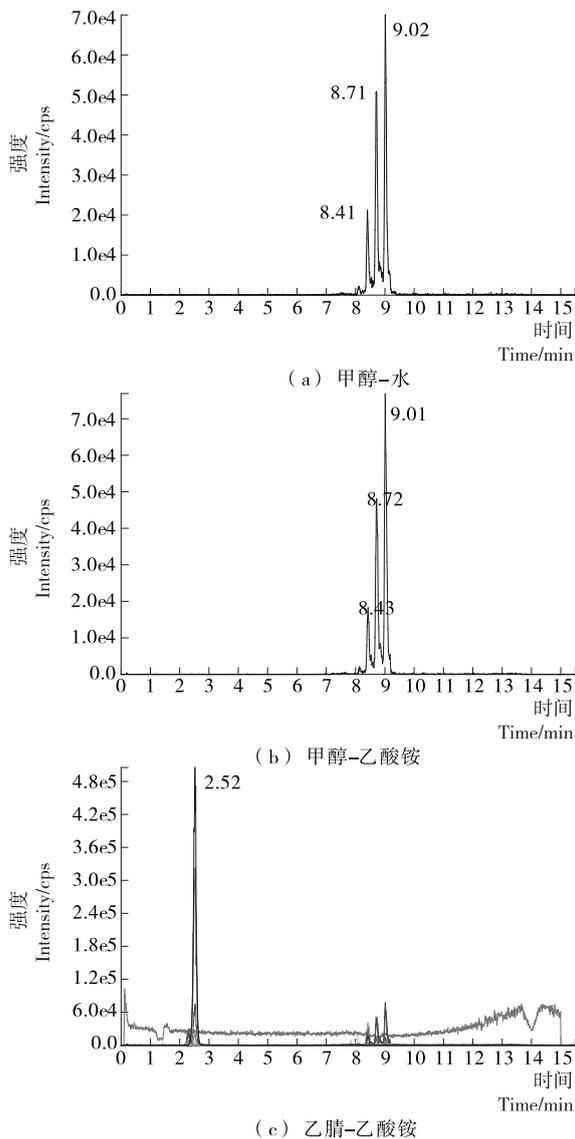


图 1 不同流动相的标样多反应色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of standard samples with different mobile phases

表 3 4 种鼠药的回归方程、相关系数、线性范围及检出限

Table 3 Linear equation, correlation coefficients, linearity range and LOD of 4 kinds of rodenticide residues

名称	回归方程	相关系数	线性范围/ (ng · mL ⁻¹)	检出限/ (mg · kg ⁻¹)
杀鼠灵	$y=6.5 \times 10^4 x + 1.34 \times 10^6$	0.999 9	64~200	0.001
溴敌隆	$y=4.8 \times 10^3 x + 4.7 \times 10^4$	0.998 5	64~200	0.005
溴鼠灵	$y=1.6 \times 10^3 x - 1.2 \times 10^4$	0.998 8	64~200	0.005
杀鼠醚	$y=4.7 \times 10^3 x - 2.5 \times 10^4$	0.999 4	64~200	0.001

子进行确认,发现母离子加合方式为 $[M+H]^+$ 。对碰撞能量以及源内碎裂电压进行优化,并在最优电压下选择子离子扫描,筛选出丰度最强的离子为定量离子,次强的碎片离子为定性离子。具体参数见表 2。

2.3 前处理条件的优化

粮谷类食品基质较为简单,由于流动相为乙腈,因此采

用乙腈作为提取溶剂后离心上机。在淀粉制品类添加检出限附近 1 倍浓度、2 倍浓度以及 10 倍浓度的鼠药残留,考察回收率及相对标准偏差后发现这种前处理可满足技术参数的要求。

对于水果和蔬菜这类有糖分和色素类的食品基质,通过简单的提取离心无法有效地净化。因此选取了内含 PSA 的萃取柱来进行进一步的净化。2003 年美国农业部将该法用于水果蔬菜中农药多残留快速检测分析。它是固相试剂和基质固相分散技术的衍生和进一步发展,其特点是溶剂用量小,操作简便、快速^[16-17]。由于水果、蔬菜类食品基质含有水分较多,在前处理过程中应注意水分的去除。先采用氯化钠脱水并促使液液分层。在净化阶段,在萃取管中加入 MgSO₄ 以确保水分的完全去除。试验选取了几种内含不同吸附剂的试剂进行优化。分别为 PSA、PSA+C₁₈、PSA+GCB、PSA+GCB+C₁₈,一般来说,GCB 常用于去除色素、甾醇类和非极性干扰物,C₁₈ 是除去试样中的脂肪和酯类等杂质,PSA 主要去除碳水化合物、脂肪酸、有机酸、酚类和色素。不同配比的试剂对 4 种鼠药检测回收率结果见表 4。由表 4 可知,PSA+GCB 的组合平均回收率最高,净化液较为澄清,净化效果较好。

表 4 不同配比的试剂对 4 种鼠药检测回收率的影响

Table 4 The effects of different adsorbant on the recoveries of 4 rodenticide residues %

试剂管	杀鼠灵	溴敌隆	溴鼠灵	杀鼠醚
PSA	77	72	75	72
PSA 试剂管 A	81	81	80	83
PSA 试剂管 B	76	77	75	78
PSA 试剂管 C	85	84	74	77

2.4 回收率和精密度

为了验证本方法的准确度和精密度,选取了 3 个有代表性的浓度做加标试验,进行 6 次平行样测试,方法的回收率和精密度见表 5。由表 5 可知,RSD 均 $<10\%$,在 3 个浓度下的加标回收率均满足 GB/T 27404—2008 对方法确认技术参数的要求。文献[15]中的样品基质仅限于调味品和面粉,其中 10 种鼠药残留在面粉的回收率为 72.6%~120%,本试验中 4 种鼠药在植物源性食品的回收率为 71.4%~95.2%,回收率的相对标准偏差较小。

2.5 专属性

将不含标样的空白样品以相同净化方法处理后上机,所得的空白样品无阳性结果检出。

3 结论

本试验建立了液相色谱-质谱联用法同时测定植物源性食品中溴鼠灵、杀鼠醚、溴敌隆以及杀鼠灵 4 种鼠药残留的方法。粮谷类制品直接以乙腈提取后上机,水果、蔬菜以乙腈提取后用 PSA+GCB 小柱净化即可。该方法对植物源性食品的鼠药残留检测展开了研究,在添加量为 0.002~0.050 mg/kg 的情况下,杀鼠灵在植物源性食品中的平均回

表5 4种鼠药在植物源性食品中的加标回收率及精密密度一览表

Table 5 The recoveries and RSD of 4 rodenticide residues in plant-origin food

鼠药残留	加入量/ (mg · kg ⁻¹)	回收率/(mg · kg ⁻¹)			相对标准偏差/%		
		大米	包菜	苹果汁	大米	包菜	苹果汁
杀鼠灵	0.002	86.5	88.4	80.5	6.1	5.2	8.9
	0.010	91.2	81.0	82.6	7.2	6.1	9.1
	0.020	93.0	82.2	88.1	5.9	5.7	8.1
溴敌隆	0.010	89.3	81.3	77.3	8.1	5.1	6.1
	0.020	88.8	78.8	74.8	7.2	8.2	9.5
	0.050	91.4	71.4	71.4	7.1	4.1	4.7
溴鼠灵	0.010	85.1	75.1	81.5	4.6	6.6	5.8
	0.020	86.9	73.9	85.2	8.2	7.2	4.7
	0.050	88.3	89.4	80.3	7.7	7.9	9.4
杀鼠醚	0.002	102.1	101.0	95.2	5.0	6.0	4.9
	0.010	88.8	80.4	89.8	7.2	5.9	8.2
	0.020	108.2	82.4	82.1	7.0	3.2	7.7

收率为86%，溴敌隆在植物源性食品中的平均回收率为81%，溴鼠灵在植物源性食品中的平均回收率为83%，杀鼠醚在植物源性食品中的平均回收率为92%，相对标准偏差均<10%，已满足GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》附录F技术参数的要求。该方法适用食品范围广，基质干扰小，操作简便，从样品处理到结果分析不超过3 h，本研究仅针对植物源性食品进行了研究，可在后续研究中动物源性食品中鼠药残留开展检测工作，进一步完善食品基质范围。

参考文献

- [1] 唐玲玲, 徐酉华. 抗凝血灭鼠药中毒的研究现状[J]. 儿科药理学杂志, 2012, 18(1): 56-59.
- [2] 广跃乾, 王琼, 刘厚鹏, 等. 大剂量维生素K₁救治抗凝血灭鼠药中毒19例治疗体会[J]. 北方药学, 2012, 9(6): 110-110.
- [3] 谷日旭, 王彩云, 米尔芳. 紫外分光光度法测定中毒样品中敌鼠含量[J]. 实用医技杂志, 2010, 17(4): 338-338.
- [4] 麦沛明, 余胜兵, 吴西梅, 等. 分散液-液微试剂-气相色谱-质谱法同时测定中毒样品中有毒生物碱和鼠药[J]. 分析化学, 2015(2): 282-287.
- [5] 李文海, 朱鲁生. 固相萃取 GC/MS 分析血中 10 种常见农药和杀鼠药[J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(4): 269-271.
- [6] 王洪宗, 冯辉, 胡开发, 等. GC/ECD 法测定生物检材中溴敌隆和大隆[J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(6): 405-406.
- [7] 贺燕, 徐文洪, 孙桂芳, 等. 气相色谱-质谱法检测肉制品中的杀鼠酮[J]. 食品与机械, 2017, 33(5): 99-102.
- [8] 陈晓红, 蔡美强, 金米聪. 高效液相色谱/离子阱质谱快速鉴定茚满二酮类鼠药[J]. 卫生研究, 2010, 39(5): 586-590.
- [9] MIDDLEBERG R A, HOMAN J. Qualitative identification of rodenticide anticoagulants by LC-MS/MS[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 902: 139-148.
- [10] 孟庆玉, 黎源倩, 邹晓莉, 等. 浊点试剂-高效液相色谱法同时测定人尿中的 4 种抗凝血鼠药[J]. 分析化学, 2008, 36(6):

760-764.

- [11] 陈晓红, 金米聪. 采用液相色谱-串联质谱法检测血清中痕量异杀鼠酮[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(11): 1 060-1 062.
- [12] HERNÁNDEZ A M, BERNAL J, BERNAL J L, et al. Analysis of anticoagulant rodenticide residues in *Microtus arvalis* tissues by liquid chromatography with diode array, fluorescence and mass spectrometry detection [J]. Journal of Chromatography B, 2013, 925: 76-85.
- [13] ZHU Lin, YAN Hui, SHEN Bao-hua, et al. Determination of bromadiolone and brodifacoum in human hair by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its application to poisoning cases[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2013, 27(4): 513-520.
- [14] 麦沛明, 余胜兵, 吴西梅, 等. 分散液-液微试剂-气相色谱-质谱法同时测定中毒样品中有毒生物碱和鼠药[J]. 分析化学, 2015(2): 282-287.
- [15] 朱峰, 刘华良, 陈蓓, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时快速筛查检测食品中的 10 种抗凝血类鼠药[J]. 色谱, 2013(5): 473-476.
- [16] 董静, 潘玉香, 朱莉萍, 等. 果蔬中 54 种农药残留的 QuEChERS/GC-MS 快速分析[J]. 分析测试学报, 2008, 27(1): 66-69.
- [17] KOMASAWA N, UEKI R, KAMINOH Y, et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1 217(16): 2 548-2 560.