

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240319001

柱前衍生-高效液相色谱-串联质谱法测定 鲜茶叶中的春雷霉素

李丽*

(江苏联合职业技术学院镇江分院, 镇江高等职业技术学校机电工程系, 镇江 212000)

摘要: **目的** 建立柱前衍生高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定鲜茶叶中春雷霉素的检测方法。**方法** 样品经甲醇/水溶液提取, MCX SPE 阳离子交换柱(mixed-mode cation exchanger SPE column)净化, 9-氯甲酸芴甲酯[9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) chloride, Fmoc-Cl]衍生后测定, 内标法定量。**结果** 目标化合物在 0.31~20.00 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 线性关系良好, 相关系数大于 0.998 (r^2)。鲜茶叶中春雷霉素的检出限(limit of detection, LOD)、定量限(limit of quantification, LOQ)分别为 2.0 $\mu\text{g/kg}$ 和 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 。在 LOQ、 $2\times\text{LOQ}$ 和 $10\times\text{LOQ}$ 水平上加标, 平均回收率为 95.2%~104.0%, 相对标准偏差为 7.4%~13.3%。**结论** 基于 Fmoc-Cl 衍生化的测定法, 能有效提高检测的灵敏度、降低基质的干扰; 将西马特罗作为内标使用, 可以提供更为准确的检测结果, 该方法满足鲜茶叶中春雷霉素的监测。

关键词: 春雷霉素; 高效液相色谱-串联质谱仪; 鲜茶叶; 衍生化

Determination of kasugamycin in fresh tea using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after pre-column derivation

LI Li*

(Jiangsu Union Technical Institute, Zhenjiang Branch, Mechatronics Engineering Faculty of Zhenjiang Vocational Technical College, Zhenjiang 212000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the determination of kasugamycin in fresh tea. **Methods** After methanol/water extraction and MCX SPE column purification, the kasugamycin-derivant derived with Fmoc-Cl was measured with HPLC-MS/MS aided by internal standard quantification. **Results** The calibration curve showed good linearity in the certain ranges (0.31 ~ 20.00 $\mu\text{g/L}$) with the correlation coefficient greater than 0.998 (r^2). The limit of quantification (LOQ) and detection (LOD) for fresh tea was 5.0 $\mu\text{g/kg}$ and 2.0 $\mu\text{g/kg}$ respectively. The average recoveries varied from 95.2%-104.0% with the relative standard deviations of 7.4%-13.3% at three spiked levels (LOQ, $2\times\text{LOQ}$, and $10\times\text{LOQ}$). **Conclusion** This method depended on derivation with Fmoc-Cl can effectively increase analytical sensitivity and decrease sample matrix interference. Taking cimaterol as internal standard will offer more accuracy determination result. This method is conformity with the monitoring requirement for kasugamycin in fresh tea.

KEY WORDS: kasugamycin; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; fresh tea; derivation

*通信作者: 李丽, 硕士, 副教授, 主要研究方向为化学和仪器分析。E-mail: 25338276@qq.com

*Corresponding author: LI Li, Master, Associate Professor, Mechatronics Engineering Faculty of Zhenjiang Vocational Technical College, Jiangsu Union Technical Institute, Zhenjiang Branch, No.132, Xuefu Road, Zhenjiang 212000, China. E-mail: 25338276@qq.com

0 引 言

春雷霉素(CAS: 6980-18-3, $C_{14}H_{25}N_3O_9$), 属于氨基糖苷类抗生素杀菌剂, 是放线菌产生的代谢产物。作为农用杀菌剂, 具有毒性低、高效和内吸渗透性强等特点, 对水稻稻瘟病、茶叶叶斑病和云纹叶枯病菌等都有很好的防治效果^[1-6](图 1)。

我国是茶叶生产和出口大国, 近年来出口总体呈上升趋势。但我国茶叶出口还存在出口市场过于集中、产品结构单一、遭遇绿色贸易壁垒、农药残留超标等问题^[7-8]。欧盟今年 1~7 月共通报了 7 起从中国(包括港澳地区)进口茶叶农药残留超标或者检出未经授权使用的农药, 其中 4 起被判定有严重风险^[9]。春雷霉素的使用尚在欧盟的风险评估中, 植物产品中禁用^[10]。按照欧盟给出的定义, 禁用物质的最大残留限量(maximum residue level, MRL)为 0.01 mg/kg, 是指在定量限(limit of quantification, LOQ)上的 MRL, 其要求非常苛刻^[11]。因此为了确保出口茶叶符合欧盟的相关要求, 需要建立更灵敏、可靠的检测方法用于春雷霉素残留量的筛查。

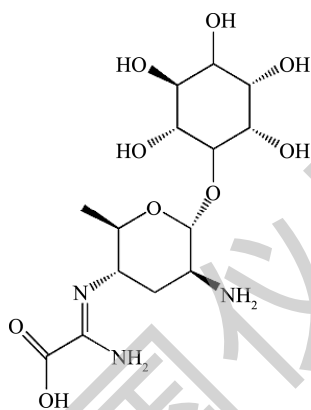


图 1 春雷霉素结构式

Fig.1 Structural formula of kasugamycin

目前检测春雷霉素的方法有液相色谱法^[12-13]、荧光法^[14]、液相色谱-串联质谱法^[15-21]。液相色谱的测定方法主要用于春雷霉素产品主含量的检测, 不适用于残留含量的分析; 荧光法的 LOQ (19.1 mg/L)无法满足禁用物质限量的要求; 液相色谱-串联质谱法涉及的品种主要包括番茄、黄瓜、柑橘等, 未对茶叶的基质进行方法确认。在参考上述液相色谱-串联质谱仪测定春雷霉素的方法时, 发现茶叶的基质复杂, 非生化直接测定的方法, 存在回收率低、基质干扰大、假阳性率偏高的现象。

鉴于春雷霉素回收率偏低以及目前没有其同位素标准品出售, 本研究考察了头孢羟氨苄、诺氟沙星等物质作为内标的可能性, 在国内外首次将西马特罗作为内标使用, 以确保了实验结果的准确性。本研究利用春雷霉素分子结

构上的氨基(-NH₂)建立了 9-氯甲酸苄甲酯[9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) chloride, Fmoc-Cl]衍生后高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定鲜茶叶中春雷霉素的方法。以期种植过程中防止春雷霉素的违规使用提供了技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

用于分析的鲜茶叶样品来源于镇江句容、天目湖、浙江安吉等地区的茶园。称取 100 g 样品于组织捣碎机中切碎、搅拌均匀, 装于自封袋中-20℃保存。

实验用水为 Milli-Q 超纯水(美国 Millipore 公司); 水相膜(0.45 μm、0.22 μm, 聚醚砜材质)、HC-C₁₈柱(500 mg, 6 mL)、MCX SPE 阳离子交换柱(150 mg, 6 mL)、SCX SPE 柱(500 mg, 3 mL)(上海安谱公司); HLB 柱(60 mg, 3 mL 50T)[普瑞邦(北京)科技有限公司]。

春雷霉素(纯度 99.6%, 中国坛墨质检标准物资中心); 西马特罗(100 mg/L 甲醇配制)、克伦特罗-D9 (100 mg/L 甲醇配制)、沙丁胺醇-D3 (100 mg/L 乙腈配制)、诺氟沙星(1000 mg/L 甲醇配制)、孔雀石绿草酸盐(100 mg/L 乙腈配制)、结晶紫盐酸盐(100 mg/L 乙腈配制)(上海安谱公司); 草甘膦同位素标准溶液(1.2-C¹³N¹⁵, 100 μg/mL)、头孢羟氨苄(纯度 98%)、氟尼辛-D3 (纯度 98.9%)(德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 9-氯甲酸苄甲酯(Fmoc-Cl, 纯度 98%)、硼酸钠、氨水(分析纯, 上海国药集团); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司)。

1.2 仪器与设备

Thermo TSQ Quantan Access 液相色谱-串联质谱仪[配电喷雾离子源(electric spray ion source, ESI)和自动进样器, 美国 Finnigen Surveyor 公司]; XE205T 电子天平(感量 0.01 mg, 瑞士梅特勒公司); Allegra X-30R 高速冷冻离心机(德国 Beckman 公司); DS-1 组织捣碎机(上海右一仪器有限公司); Se Quant[®] Zic[®]-Hillic 亲水柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 安捷伦 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)、安捷伦 Eclipse Plus C₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)(德国 Merck 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Fmoc-Cl 溶液的配制

称取 2 g Fmoc-Cl 于 100 mL 容量瓶中加入丙酮溶解并定容至刻度, 质量浓度为 20 g/L, -20℃保存, 使用时平衡至室温^[22]。标准溶液的配制: 称取 5.0 mg 春雷霉素标准品于 10 mL 离心管中, 准确加入 5.0 mL 水/甲醇溶液溶解(水:甲醇=8:2, V/V), 超声 5 min, 涡旋混合均匀后 4℃保存, 质量浓度 1000 mg/L。使用时用水稀释至适当的浓度。西马特罗标准

使用液用甲醇逐级稀释母液(100 mg/L)至所需的浓度。

1.3.2 衍生化测定的样品前处理

(1) 样品提取

称取(2.0±0.02) g 样品于 15 mL 具塞刻度离心管中, 加入 100 μL 2.0 mg/L 的西马特罗标准溶液, 加入甲醇/水溶液(甲醇:水=4:6, V/V, 下同)^[23-25]并准确定容至 10.0 mL。涡旋 2 min, 超声(功率 500 W, 下同)5 min, 6000 r/min 离心 3 min, 取上清液 2 mL 待净化。选择阴性样品时, 不需要加入西马特罗, 以考察样品中有无西马特罗相似物的干扰。

(2) 净化

MCX SPE 阳离子交换柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水进行活化, 保持柱床湿润。加入 2 mL 上清液过柱, 等样液全部流过上筛板后立刻加入 2 mL 乙腈清洗 MCX SPE 阳离子交换柱(不需要吹干柱床)。加入 5 mL 10%氨水甲醇溶液洗脱待测组分, 用 10 mL 具塞刻度离心管收集全部滤液, 45°C 下氮气吹至近干待衍生(大约 30 μL, 确保残液没有氨水残留)。

(3) 衍生化

在上述 10 mL 具塞刻度离心管中加入 500 μL 去离子水, 涡旋 30 s、超声 2 min。加入 130 μL 5%硼酸钠和 200 μL Fmoc-Cl 溶液, 补加去离子水至 1.0 mL 刻度, 混合均匀后在水浴锅上 50°C 衍生 50 min。取出离心管, 8000 r/min 离心 3 min, 取上清液依次过 0.45 μm 和 0.22 μm 水相膜供 HPLC-MS/MS 测定。

(4) 基质匹配标准溶液的配制

称取(2.0±0.02) g 阴性样品于 15 mL 具塞刻度离心管中^[26-31], 共计 7 份。每管中先加入 100 μL 2.0 mg/L 的西马特罗标准溶液; 在前 4 管中再分别加入 100.0 μg/L 的春雷霉素标准溶液 15.6、31.2、62.5、125.0 μL; 后 3 管中分别加入 500.0 μg/L 的春雷霉素标准溶液 50、100、200 μL(相当于最终 1.0 mL 衍生物反应液中含春雷霉素 0.31、0.62、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 μg/L), 加入甲醇/水溶液并准确定容至 10.0 mL 刻度。涡旋 2 min, 超声 5 min, 6000 r/min 离心 3 min, 取上清液 2 mL 净化。后面步骤同上述(2)~(3)进行处理, 按照 1.3.5 和 1.3.6 的条件生成标准曲线。

1.3.3 非衍生化的方法

(1) 样品提取

称取(2.0±0.02) g 样品于 15 mL 具塞刻度离心管中, 加入甲醇/水溶液(甲醇:水=2:8)并准确定容至 10.0 mL 刻度。涡旋 2 min, 超声 5 min, 6000 r/min 离心 3 min, 取上清液 3 mL 过 C₁₈ 柱(C₁₈ 不需要预先活化), 收集滤液待净化。

(2) 净化

参考杨梅^[15]、ZHANG 等^[20]的实验结果, 样品提取液用阳离子交换柱进行净化。MCX SPE 阳离子交换柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 去离子水进行活化, 保持柱床湿润。加入 1 mL 上述滤液过柱, 等样液全部流过上筛板后加入

2 mL 乙腈清洗 MCX SPE 阳离子交换柱(不需要吹干柱床)。加入 5 mL 10%氨水甲醇溶液洗脱待测组分, 用 10 mL 具塞刻度离心管收集全部滤液, 氮气吹至近干(45°C), 加入水复溶至 1.0 mL, 过 0.22 μm 水相膜供 HPLC-MS/MS 测定。

1.3.4 非衍生化测定的色谱条件

(1) 实际样品测定

色谱柱: Merk 公司 Se Quant[®] Zic[®]-Hilic 亲水柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相 C 为乙腈、流动相 D 为乙酸铵/甲酸溶液(15 mmol/L 乙酸铵, 含 0.15%甲酸); 流速: 0.30 mL/min; 柱温: 30°C; 进样体积: 25 μL; 梯度洗脱见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱条件
Table 1 Mobile phase and gradient elution conditions

时间/min	流动相 C/%	流动相 D/%
0.0	100	0
2.0	100	0
2.1	90	10
3.0	90	10
3.1	80	20
4.5	80	20
5.0	50	50
6.0	50	50
6.1	5	95
10.0	5	95
10.1	100	0
14.0	100	0

(2) 洗脱方式

在相同浓度春雷霉素母体和其衍生物比较实验时, 采用等度的洗脱方式: C:D=80:20。

1.3.5 衍生化测定的色谱条件

色谱柱: 安捷伦 Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm); 流速: 0.25 mL/min; 柱温: 30°C; 进样体积: 25 μL; 流动相 A(甲醇); 流动相 C(乙腈); 流动相 D(10 mmol/L 乙酸铵溶液); 流动相及梯度洗脱条件见表 2。

1.3.6 质谱条件

ESI: 正离子模式扫描; 质谱扫描方式: 多反应监控(multiple reaction monitoring, MRM); 喷雾电压 4000 V; 离子源温度 350°C; 辅助气流速 3 mL/min; 鞘气流速 3.8 mL/min; 碰撞气流速 0.45 mL/min。

表 2 流动相及梯度洗脱条件
Table 2 Mobile phase and gradient elution conditions

时间/min	流动相 A/%	流动相 C/%	流动相 D/%
0.0		5	95
2.0		5	95
2.5		15	85
4.5		15	85
5.5		30	70
7.5		30	70
8.0		50	50
9.0		50	50
9.5	100		
15.0	100		
15.5		5	95
18.0		5	95

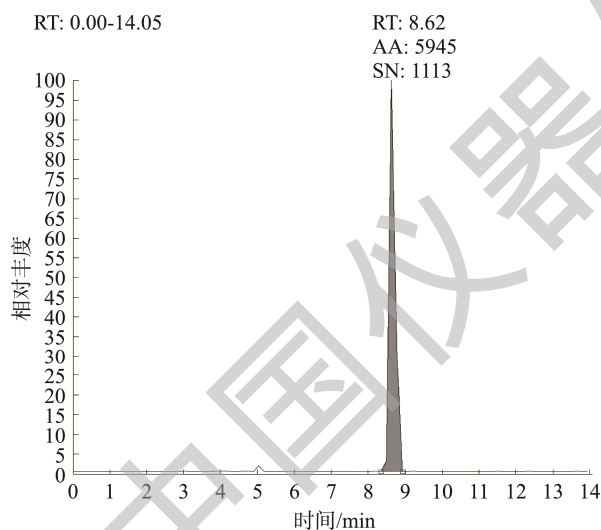
1.4 数据处理

采用高效液相色谱-串联质谱联用仪软件工作站 (Xcalibur) 拟合标准曲线, 以西马特罗作为内标计算出试样中春雷霉素的含量。数据处理采用 Microsoft Office 家庭和 学生版 2016。

2 结果与分析

2.1 测定方式的选择

春雷霉素的定量、定性离子对以及碰撞能量: m/z 379.9/112.2 (定量离子, 19 eV)、 m/z 379.9/70.2 (定性离子, 30 eV)、 m/z 379.9/200.0 (定性离子, 6 eV)、 m/z 379.9/155.9 (定性离子, 22 eV)(图 2); 西马特罗衍生物的定量、定性离子对以及碰撞能量: m/z 202/116.1 (定量离子, 30 eV)、 m/z 202/89.1 (定性离子, 36 eV)、 m/z 202/143.1 (定性离子, 15 eV)、 m/z 202/160 (定性离子, 5 eV)。春雷霉素衍生物的定量、定性离子对以及碰撞能量: m/z 601.9/422.1 (定量离子, 8 eV)、 m/z 601.9/378.1 (定性离子, 5 eV)、 m/z 601.9/244.1 (定性离子, 13 eV)。西马特罗衍生物和春雷霉素衍生物的保留时间分别为 12.6 min、10.1 min。

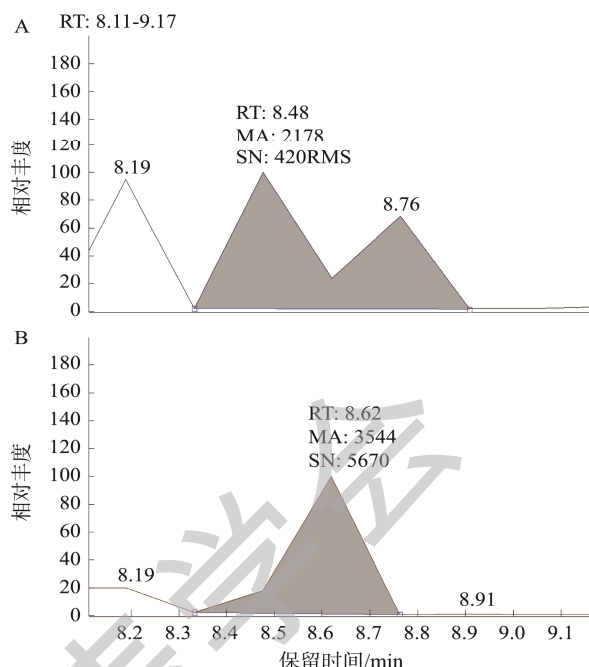


注: RT: 保留时间; AA: 自动积分的峰面积; SN: 信噪比, 下同。

图 2 春雷霉素非衍生化测定的提取离子色谱图

Fig.2 Extracted ion chromatogram of kasugamycin-non-derivation

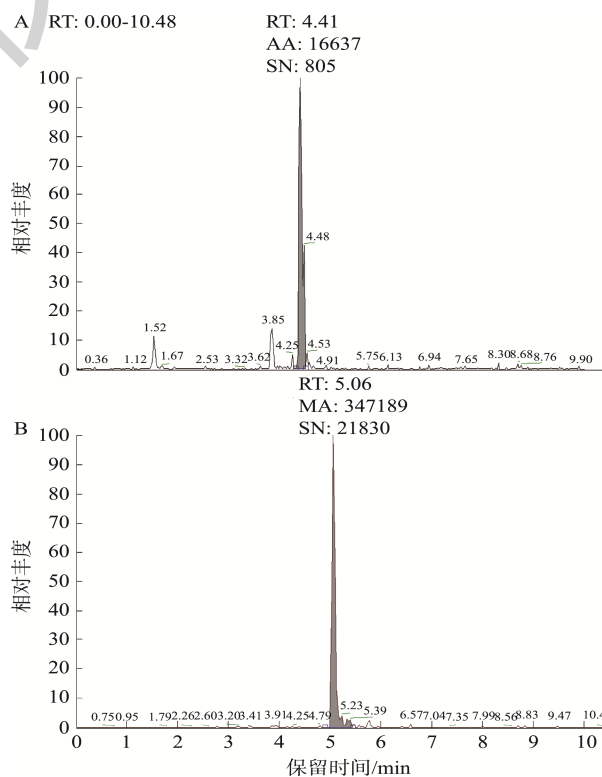
采用直接法检测茶叶样品时, 样品提取液经过 C_{18} 、MCX SPE 阳离子交换柱净化后仍然会产生较强的基质干扰(图 3), 选择不同的碎片离子进行定量, 并不能消除假阳性的结果, 需要更多的步骤进行净化处理, 耗时较长。实验结果显示, 春雷霉素经过 Fmoc-Cl 衍生后响应值要比母体高了将近 21 倍(图 4), 不仅提高了检测的灵敏度, 还可以有效去除样品基质的干扰, 但是回收率偏低, 需要内标进行校准。



注: A. 样品空白; B. 空白样品加标。MA: 手动积分的峰面积, 下同。

图 3 鲜茶叶中春雷霉素非衍生化测定的提取离子色谱图

Fig.3 Extracted ion chromatogram of kasugamycin-non-derivation in fresh tea



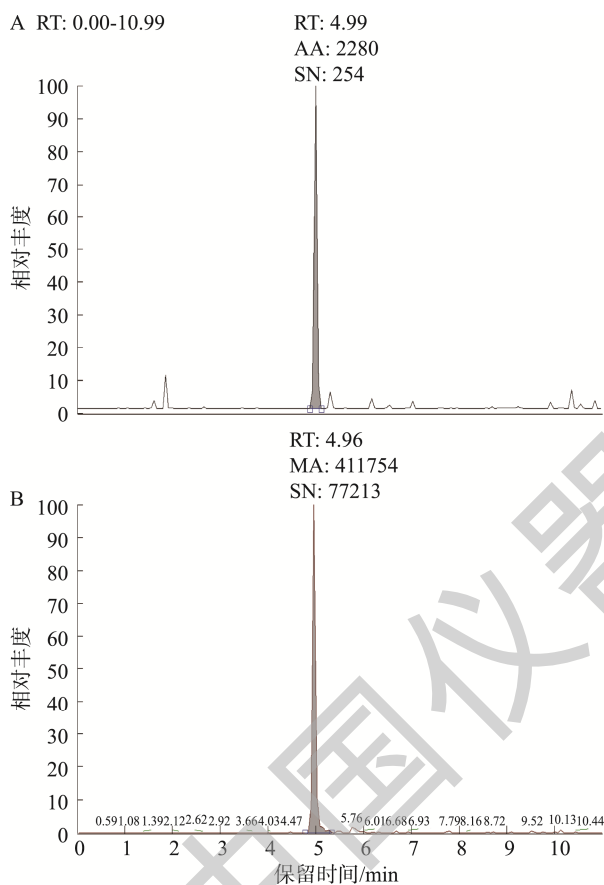
注: A. 春雷霉素标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)直接测定的总离子流图; B. 春雷霉素衍生物标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$)测定的总离子流图。

图 4 相同浓度春雷霉素母体和其衍生物的总离子流图

Fig.4 Total ion chromatograms of kasugamycin and kasugamycin-derivation at the same concentration

2.2 春雷霉素衍生物离子碎片的选择

春雷霉素衍生物分别采用 ESI⁺、ESI⁻ 模式进行了全扫描。在 ESI⁺ 模式下 m/z 601.9 的离子丰度最高, 并可以得到 4 个响应值较高的碎片离子, 分别为 m/z 244.1、 m/z 378.1、 m/z 422.1、 m/z 179.0, 其中 m/z 179.0 碎片离子丰度最高; ESI⁻ 模式下 m/z 600.9 的离子丰度最高, 并能产生 3 个响应值较高的碎片离子: m/z 160.8、 m/z 233.1、 m/z 378.7, 其中 m/z 233.1 碎片离子丰度最高。通过相同浓度衍生物的测定, ESI⁺ 测定的峰面积是 ESI⁻ 的大约 181 倍, 因此选择 ESI⁺ 作为测定模式(图 5)。



注: A. 春雷霉素衍生物标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$) ESI⁺测定的总离子流图; B. 春雷霉素衍生物标准溶液(50 $\mu\text{g/L}$) ESI⁻测定的总离子流图。
图 5 相同浓度春雷霉素衍生物 ESI⁺和 ESI⁻模式下的总离子流图

Fig.5 Total ion chromatogram kasugamycin-derivation under ESI⁺ and ESI⁻ module at the same concentration

虽然在 ESI⁺ 测定模式中 m/z 179.0 碎片离子的丰度最高, 但是通过对克伦特罗-D9、沙丁胺醇-D3、头孢羟氨苄衍生物的观察, 尽管这 3 种化学物质的结构式不同, 其衍生物均能产生 m/z 179 的碎片, 由此可以判定 m/z 179.0 是 Fmoc-Cl 的碎片离子而非待测组分的特征离子(图 6), 在生成标准曲线和样品测定时, m/z 179.0 离子需要舍去, 选择 m/z 422.1 作为定量离子。

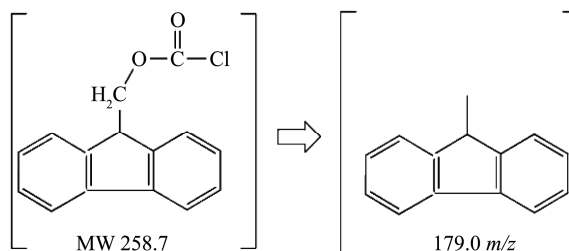


图 6 m/z 179.0 碎片离子的解析图

Fig.6 Analytical diagram of m/z 179.0 production ion

2.3 内标的选择

2.3.1 选择合适的内标

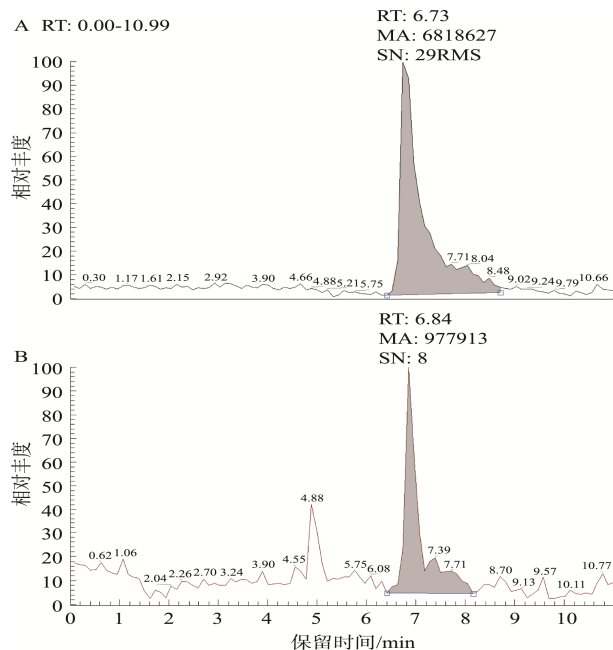
在纯水中加入春雷霉素的标准溶液进行提取、净化、衍生化实验发现待测组分会损失一部分, 造成春雷霉素的回收率偏低需要内标校准, 但是目前国内外均无春雷霉素的同位素内标可售, 因此需要寻找合适的化合物作为内标。在前期的条件实验中发现利用春雷霉素分子结构上的 -COOH 基团进行固相萃取, 其效果没有 -NH₂ 好, 主要原因是杂质多、基质干扰大、回收率低, 因此内标的选择考虑以下因素: (1)能在同一种固相萃取柱上保留、洗脱; (2)自然界不存在或者茶叶的病虫害防治不会用到; (3)在硼酸钠的碱性环境中加热, 其结构相对稳定、不会降解; (4)最好能参与衍生化反应, 实施全过程的校准。实验中选择了分子结构上具备 -NH₂、-NH 或者季胺基团的草甘膦(1,2-C¹³N¹⁵)、克伦特罗-D9、沙丁胺醇-D3、头孢羟氨苄、诺氟沙星、氟尼辛-D3、孔雀石绿、结晶紫、西马特罗作为内标的选项进行了考察。实验结果显示, 草甘膦(1,2-C¹³N¹⁵)衍生化的效果较好, 在 ESI⁺ 模式下可以得到丰度较高的离子碎片, 但是不能被 MCX SPE 阳离子交换柱吸附保留, 无法实现全过程的校准; 头孢羟氨苄、沙丁胺醇-D3、氟尼辛-D3、诺氟沙星衍生物的碎片离子响应值都不高, 不适合作为内标使用; 孔雀石绿、结晶紫有严重的柱残留; 在 50°C 衍生 50 min 的条件下, 克伦特罗-D9 衍生物虽然具有较高的响应值, 但是其衍生过程不够完全, 衍生液中残留了 14.3% 的母体(图 7)。

经综合评价, 选择了西马特罗作为内标, 原因包括: (1)西马特罗属于肾上腺素受体激动剂(β -兴奋剂), 是国家明令禁止被检出的物质, 茶叶的病虫害防治上不会使用; (2)没有样品基质的干扰; (3)能被 MCX SPE 阳离子交换柱吸附和洗脱; (4)能参与全部的检测过程, 衍生反应相对完全。采用西马特罗及其衍生物共有的碎片离子 m/z 202 作为母离子进行全扫描, 衍生物中检测不到母体的存在(图 8)。

2.3.2 西马特罗衍生物碎片离子的确定

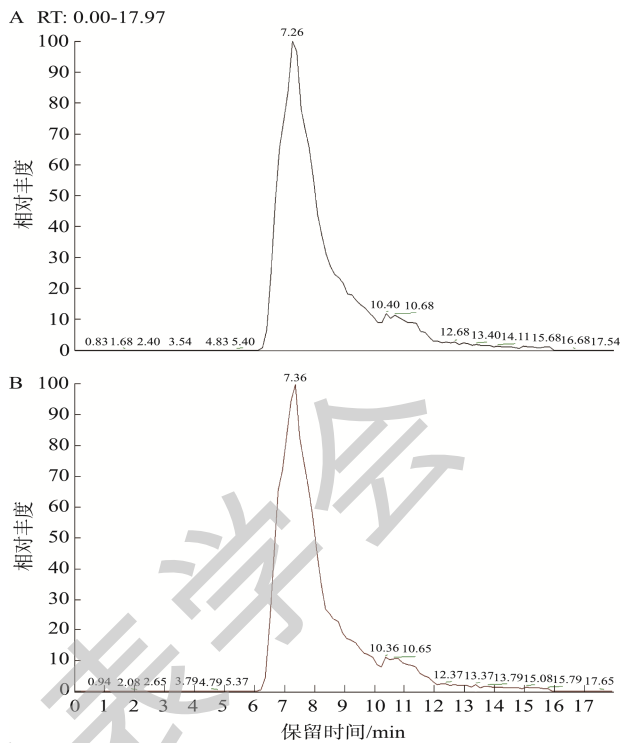
西马特罗在 ESI⁺ 模式下能得到 m/z 220 的母离子, 并同时产生源内裂解, 去掉 -OH 基形成 m/z 202 的碎片离子(图 9), 其中 m/z 220 母离子的丰度最大。西马特罗 Fmoc-Cl 衍生物并不能找到大约 m/z 441 左右的母离子, 而是出现了 m/z 220 和 m/z 202 离子, 其中 m/z 202 碎片离子的丰度

最高(图 10)。经过二级质谱的确定, m/z 202 离子可以形成 4 个丰度较大的碎片离子 m/z 116.1、 m/z 89.1、 m/z 143.1、 m/z 160, 其中选择了 m/z 116.1 作为定量离子。



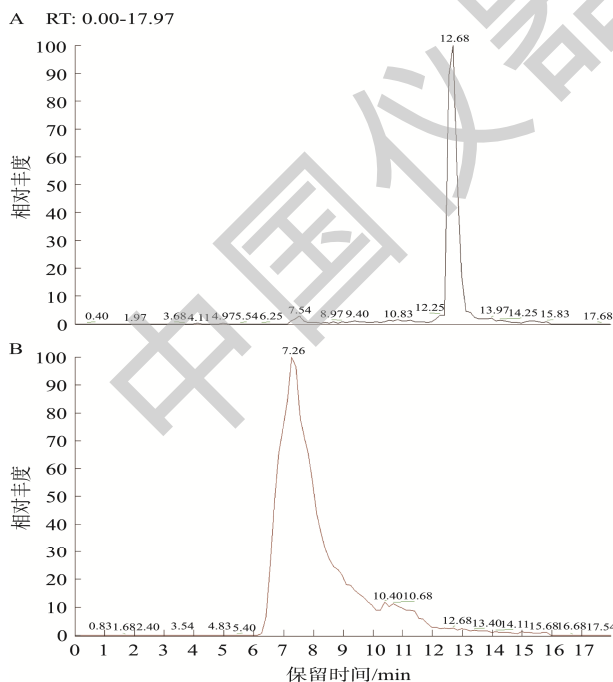
注: A. 克伦特罗-D9 (10 µg/L)测定的总离子流图; B. 克伦特罗-D9 (10 µg/L)衍生物中测定的克伦特罗-D9 总离子流图。

图 7 克伦特罗-D9 衍生物以及衍生物中残留母体的总离子流图
Fig.7 Total ion chromatograms of clenbuterol and clenbuterol's residue in derivation solution



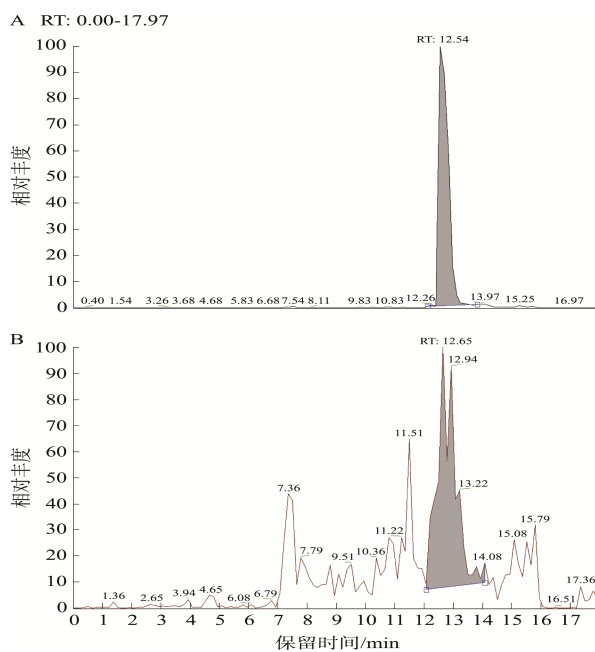
注: A. 相同浓度西马特罗碎片离子的总离子流图 (m/z 202/7.26 min); B. 相同浓度西马特罗母体的总离子流图(m/z 220/7.36 min)。

图 9 相同浓度西马特罗母体和碎片离子的总离子流图
Fig.9 Total ion chromatogram of Cimaterol parent with the same concentration



注: A. 西马特罗衍生物的总离子流图(12.68 min); B. 西马特罗标准溶液的总离子流图(7.26 min)。

图 8 西马特罗(7.26 min)和其衍生物标准溶液(12.68 min)的总离子流图。
Fig.8 Total ion chromatograms of cimaterol and its derivation standard solution at 7.26 min and 12.68 min



注: A. 相同浓度西马特罗衍生物碎片离子(m/z 202/12.54 min)的总离子流图; B. 相同浓度西马特罗衍生物母体(m/z 220/12.65 min)的总离子流图。

图 10 相同浓度西马特罗衍生物母体和碎片离子总离子流图
Fig.10 Total ion chromatogram of cimaterol_derivant parent and its product with the same concentration

2.4 衍生化条件优化

衍生温度的确定。分别采取隔夜室温衍生 8 h (25°C)(SN/T1923—2007《进出口食品中草甘膦的检测方法液相色谱-质谱/质谱法》); 40、50、60、70、80°C各衍生 1 h 来评估衍生的效果。在同等浓度情况下高温衍生要比室温衍生的效果好,但是过高的衍生温度会造成春雷霉素的降解。衍生温度超过 50°C,随着温度的增加,春雷霉素衍生物的峰面积变小直至完全消失。采用 50°C衍生 1 h,春雷霉素的峰面积达到最大值(图 11)。

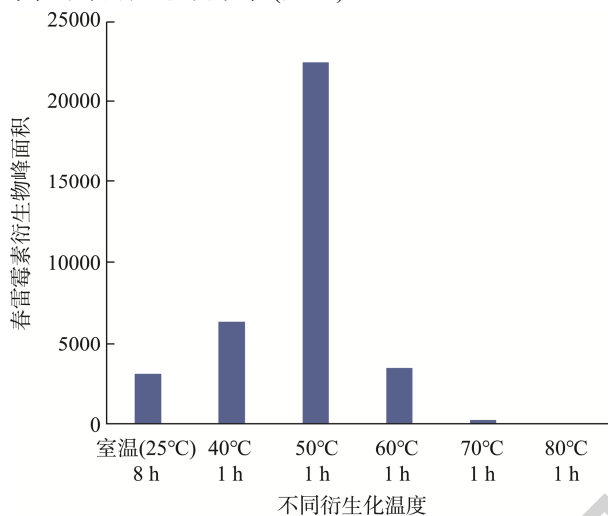


图 11 不同衍生温度春雷霉素衍生物的峰面积比较图

Fig.11 Total ion chromatogram of kasugamycin-derivat at different temperatures derivation

衍生时间的确定。在 50°C的条件下,以相同的浓度分别衍生 0.5、1、2、3 h,结果显示,春雷霉素衍生 0.5 h、1 h 峰面积相近;从 1~3 h 峰面积呈下降趋势。实际样品测定时 50°C衍生 50 min,待测组分的响应值要比 1h 的要高一点,因此确定衍生化的最佳条件设定为 50°C/50 min(图 12)。

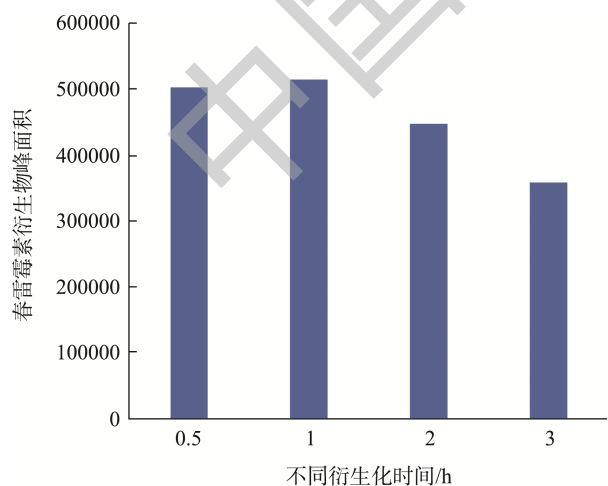
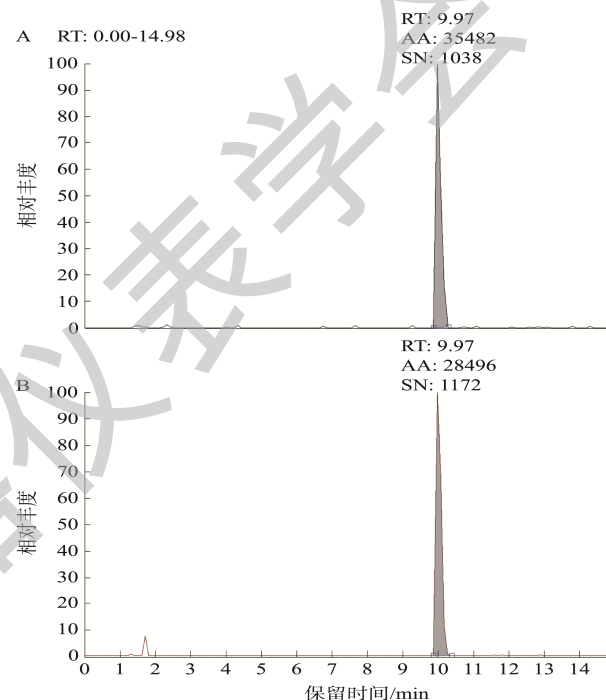


图 12 50°C环境下不同衍生时间春雷霉素衍生物的峰面积比较图

Fig.12 Peak area comparison of kasugamycin-derivat with different derivation times at 50°C

2.5 样品提取净化条件的优化

春雷霉素具有一定的极性,能在水、甲醇、乙腈等溶剂中溶解。因此实验中主要考察了甲醇/水体系提取后,HLB、SCX、MCX SPE 阳离子交换柱固相萃取柱的使用效果。HLB 柱对春雷霉素没有保留;SCX 吸附强,能保留色素和杂质,洗脱液清澈,但实际回收率只有 11%。MCX SPE 阳离子交换柱可以保留绝大多数的待测组分并且能被洗脱,洗脱液呈淡的黄绿色但是没有明显的基质干扰。条件实验结果显示,10 μg/L 标准溶液在过 MCX SPE 阳离子交换柱再衍生后测定,回收率达到 80.4%(图 13),辅以内标的校准可以满足相应技术规范的需求。



注: A. 春雷霉素(10 μg/L)直接衍生测定的总离子流图; B. 春雷霉素(10 μg/L)采用 MCX SPE 阳离子交换柱净化后衍生测定的总离子流图。

图 13 春雷霉素使用 MCX SPE 阳离子交换柱净化和不净化的衍生物总离子流图

Fig.13 Total ion chromatograms of kasugamycin-derivat after MCX SPE purification and non-purification

2.6 色谱条件的优化

实验中采用了安捷伦 Eclipse Plus C₁₈ 和 Eclipse Plus C₈ 柱,对洗脱条件和待测组分的分离效果进行了考察。在采用等度洗脱的条件下(10 mmol/L 乙酸铵溶液:乙腈=3:7, V:V),C₁₈ 柱和 C₈ 柱对待测组分的保留时间短,不能有效分离春雷霉素和西马特罗衍生物,产生了基质干扰。采用梯度洗脱时,C₈ 柱的分离效果没有明显改进,C₁₈ 柱能有效分离这两种衍生物,但是西马特罗衍生物的峰型不佳呈拖尾状。在洗脱时间 9.5 min 后采用纯甲醇洗脱,春雷霉素和西马特罗衍生物均能与基质有效分离,峰型呈锐峰。

2.7 方法确认

实验所得曲线方程为 $Y=0.00119296+0.0156736X$, 相关系数 $r^2=0.999$ (图 14)。在阴性样品中加入适量的春雷霉素标准溶液, 按照本研究方法给定的测定程序, 以 S/N 约等于 3 为方法的检出限(limit of detection, LOD); 以 S/N 约等于 10 为方法的 LOQ, 获得的 LOQ 和 LOD 分别为 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

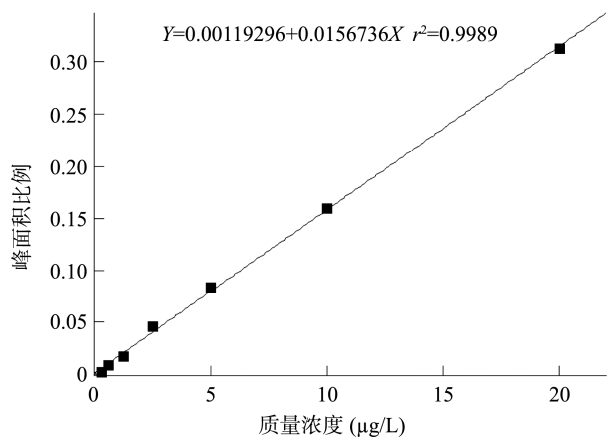
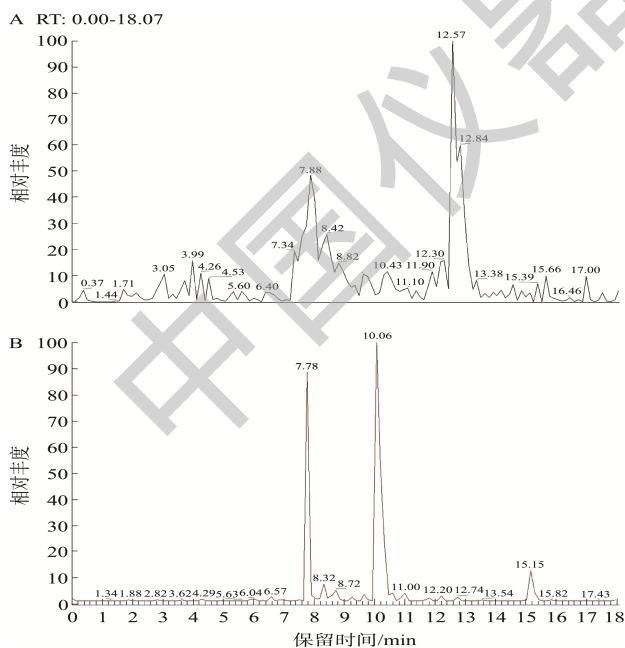


图 14 春雷霉素衍生物的工作曲线

Fig.14 Standard working curve of kasugamycin-derivant

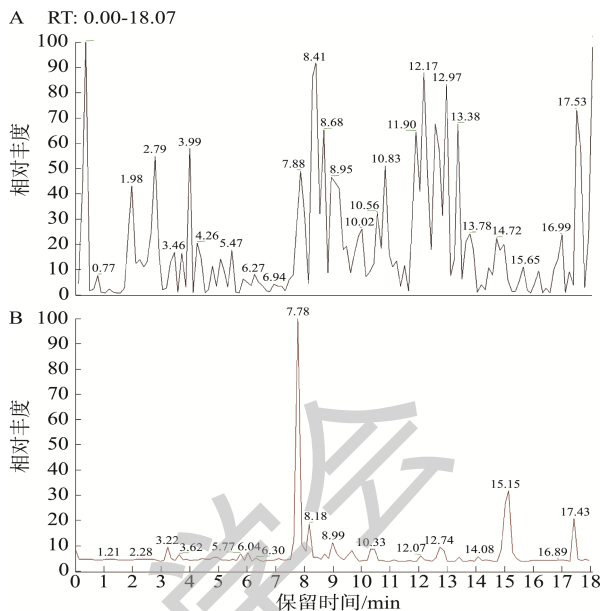
在 LOQ、 $2\times\text{LOQ}$ 、 $10\times\text{LOQ}$ 的水平上进行加标回收测试, 每个加标浓度共计测定 6 次, 结果显示加标回收率 $95.2\%\sim 104.0\%$, 相对标准偏差 $7.4\%\sim 13.3\%$ (表 3、图 15~17)。



注: A. 西马特罗衍生物标准溶液总离子流图; B. 春雷霉素衍生物标准溶液总离子流图。

图 15 春雷霉素衍生物标准溶液(10.06 min)和西马特罗衍生物标准溶液(12.57 min)总离子流图

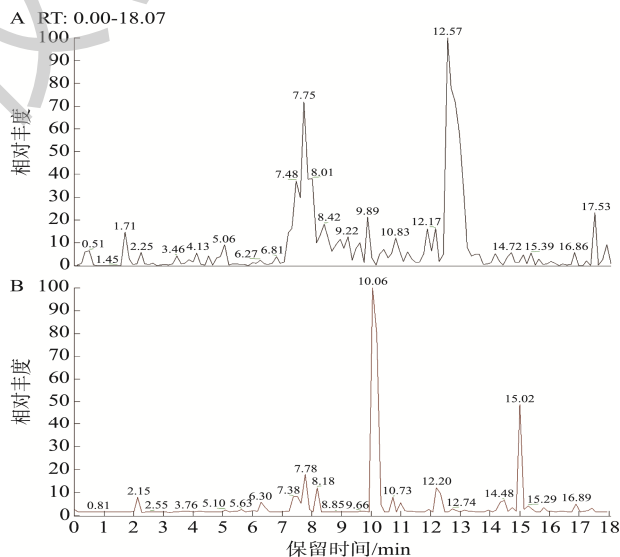
Fig.15 Total ion chromatogram of kasugamycin-derivant (10.06 min) and Cimaterol-derivant standard solution (12.57 min)



注: A. 阴性样品中西马特罗衍生物总离子流图; B. 阴性样品中春雷霉素衍生物总离子流图。

图 16 阴性样品中西马特罗和春雷霉素衍生物总离子流图

Fig.16 Total ion chromatogram of kasugamycin-derivant and Cimaterol -derivant in negative-sample



注: A. 阴性加标样品中西马特罗衍生物总离子流图; B. 阴性加标样品中春雷霉素衍生物总离子流图。

图 17 阴性加标样品中春雷霉素(10.06 min)和西马特罗衍生物(12.57 min)的总离子流图

Fig.17 Total ion chromatograms of kasugamycin-derivant (10.06 min) and cimaterol -derivant (12.57 min) in negative-sample-spiked

表 3 阴性样品的加标回收率、精密度($n=6$)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of negative sample-spiked ($n=6$)

加标量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	检出值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	相对标准偏差/%
5.0 (LOQ)	5.2	104.0	13.3
10.0 ($2\times\text{LOQ}$)	9.7	97.0	10.2
50.0 ($10\times\text{LOQ}$)	47.6	95.2	7.4

2.8 实际样品分析

来自镇江句容、天目湖、浙江安吉等地区的 34 份样品中春雷霉素的测定结果均小于 LOD。

3 结 论

本研究在比较了相关 HPLC-MS/MS 直接测定春雷霉素的基础上, 采用衍生化的技术, 分析了草甘膦(1,2-C¹³N¹⁵)、克伦特罗-D9、沙丁胺醇-D3、头孢羟氨苄、诺氟沙星、氟尼辛-D3、孔雀石绿等物质作为内标的可行性, 选择了西马特罗作为内标并建立了鲜茶叶中春雷霉素 FMO-C1 衍生化的测定方法。优化了色谱、质谱、样品前处理的条件、考察了衍生化反应所需的温度、时间, 对直接测定法和衍生化测定法的结果进行了比较。鲜茶叶中春雷霉素的 LOD、LOQ 分别为 2.0 μg/kg 和 5.0 μg/kg。实际加标回收率 95.2%~104.0%, 相对标准偏差 7.4%~13.3%。该方法灵敏、准确, 为确保茶叶的质量提供了有效的监测手段。

参考文献

- 董照峰, 熊潇垚, 陈光华. 不同浓度杀菌剂对茶云纹叶枯病菌抑制作用[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2019, 40(1): 6-10.
DONG ZF, XIONG XY, CHEN GH. Inhibition of different concentrations of fungicides against *Colletotrichum camelliaemassee* in vitro [J]. J Inn Mong Agric Univ (Nat Sci Ed), 2019, 40(1): 6-10.
- 董照峰. 茶轮斑病体外抑制试验及大田防治效果[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2019, 39(1): 13-20.
DONG ZF. In vitro inhibition test and field control effect of tea grey blight [J]. J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed), 2019, 39(1): 13-20.
- 丁亦男, 董小麟, 赖国银, 等. 国内外茶叶农药残留限量标准与出口茶叶安全研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 8140-8145.
DING YN, TONG XL, NAI GY, et al. Study on the limit standard of pesticide residue of tea and the safety of exported tea at home and abroad [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(23): 8140-8145.
- 卢超, 唐旭兵, 裴卫华, 等. 10 种杀菌剂对雪茄烟软腐病室内生物活性测定及田间防效评价[J]. 农药, 2024, 63(2): 132-137.
LU C, TANG XB, PEI WH, et al. Bioactivity in laboratory and field efficacy of 10 kinds of bactericides against cigar soft rot [J]. Agrochem, 2024, 63(2): 132-137.
- 辛恬, 胡道贵, 罗贵斌. 不同药剂对大樱桃流胶病的防效研究[J]. 现代农业科技, 2023, 21: 87-92.
XING T, HU DG, LUO GB. Control effects of different fungicides against sweet cherry gummosis [J]. Mod Agric Sci Technol, 2023, 21: 87-92.
- 马红明, 杨制业, 何开彩, 等. 多粘芽孢杆菌 WP 防治油菜细菌性叶斑病药效试验[J]. 云南农业, 2024, 2: 79-91.
MA HM, YANG WY, HE KC, et al. Efficacy of bacillus polymyxus WP to control bacterial leaf spot of romaine lettuce [J]. Yunnan Agric, 2024, 2: 79-91.
- 查传丽. 当前我国茶叶出口面临的问题分析及改善对策[J]. 现代商贸工业, 2022, 20: 51-52.
- ZHA CL. Analysis of the current problems faced by China's tea export and countermeasures for improvement [J]. Mod Bus Trade Ind, 2022, 20: 51-52.
- 廖良美, 陆天润, 舒佳怡. 中国茶叶出口质量测度及影响因素实证分析[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(19): 51-55.
LIAO LM, LU TR, SHU JY. An empirical analysis on influencing factors and the measurement of tea export quality in China [J]. Hubei Agric Sci, 2020, 59(19): 51-55.
- 欧盟进口食品快速预警机制[EB/OL]. [2023-07-30]. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen>. [2023-12-01].
Rapid Alert System For Food [EB/OL]. [2023-07-30]. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen>. [2023-12-01].
- 欧盟农药数据库[EB/OL]. [2005-03-03]. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>. [2024-02-05].
EU Pesticides Database [EB/OL]. [2005-03-03]. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>. [2024-02-05].
- 欧盟农药残留限量数据库[EB/OL]. [2005-03-03]. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>. [2024-02-05].
Maximum Residue Levels [EB/OL]. [2018-01-01]. https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/maximum-residue-levels/how-are-eu-mrls-set_en. [2023-08-05].
- 张家庆, 杨闻翰, 张丹, 等. 柱前衍生化反向高效液相色谱法测定春雷霉素[J]. 现代农业, 2022, 21(3): 41-45.
ZHANG JQ, YANG WH, ZHANG D, et al. Determination of kasugamycin by RP-HPLC with precolumn derivatization [J]. Mod Agric, 2022, 21(3): 41-45.
- 包娜, 杨昌彪, 马凯, 等. HPLC 法分析 8%春雷霉素噻霉酮悬浮液[J]. 广州化工, 2022, 50(19): 124-126.
BAO N, YANG CB, MA K, et al. Analysis of kasugamycin and benziothiazolinone 8% SC by HPLC [J]. Guangzhou Chem Ind, 2022, 50(19): 124-126.
- 王晓燕, 蒋喆臻, 冯小涛, 等. 基于同步荧光与支持向量回归的典型蔬菜农药残留快速检测[J]. 分析实验室, 2023, 42(12): 1571-1575.
WANG XY, JIANG ZZ, et al. Rapid detection of pesticide residues in typical vegetable based on synchronous fluorescence and support vector regression [J]. Chin J Anal Lab, 2023, 42(12): 1571-1575.
- 杨梅. 固相萃取-液相色谱串联质谱法测定番茄中春雷霉素的残留量[J]. 现代农业, 2020, 19(5): 36-38.
YANG M. Determination of kasugamycin in tomato by SPE-LC-MS/MS [J]. Mod Agric, 2020, 19(5): 36-38.
- 戚燕, 贾曼婷, 石梦琪, 等. 固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法测定黄瓜及土壤中的春雷霉素残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(8): 992-997.
QI Y, WANG MT, SHI MQ, et al. Determination of kasugamycin residues in cucumber and soil by solid phase extraction/high performance liquid chromatography -tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(8): 992-997.
- 张贵群, 郭素静, 梁贵平, 等. 固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法测定烟叶中春雷霉素残留量[J]. 精细化工中间体, 2020, 50(3): 73-76.
ZHANG GQ, GUO SJ, LIANG GP, et al. Determination of kasugamycin residues in fresh and cured tobacco leaves by solid phase extraction/high

- performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Fine Chem Intermed*, 2020, 50(3): 73–76.
- [18] 安姣, 康霞丽, 杨秦. 分散固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定柑橘中春雷霉素与噻霉酮残留[J]. *分析测试学报*, 2020, 39(3): 358–364.
- AN J, KANG XL, YANG Q. Simultaneous determination of kasugamycin and benziothiazolinone residues in citrus by ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry with dispersive solid phase extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2020, 39(3): 358–364.
- [19] 刘炜, 刘行, 杨晓凤, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定桃中春雷霉素残留量[J]. *山西农业科学*, 2020, 48(8): 1224–1226, 1320.
- LIU W, LIU X, YANG XF, *et al.* Determination of kasugamycin residues in peach by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Shanxi Agric Sci*, 2020, 48(8): 1224–1226, 1320.
- [20] ZHANG H, WANG C, LI H, *et al.* Simultaneous determination of kasugamycin and validamycin-A residues in cereals by consecutive solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018, 35(3): 487–497.
- [21] LI WX, DAI XF. HLB-MCX-based solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of four agricultural antibiotics (lasugamycin, validamycin A, ningnanmycin, and polyoxin B) residues in plant-origin foods [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(47): 14025–14037.
- [22] QU MY, MA SS, HUANG YJ, *et al.* LC-MS/MS-based non-isotopically paired labeling (NIPL) strategy for the qualification and quantification of monosaccharides [J]. *Talanta*, 2021, 231(122336): 1–8.
- [23] 食品中高极性农药的快速分析方法: 酸化甲醇萃取和 LC-或 IC-MS/MS 测定(欧盟参考实验室)[EB/OL]. [2021-07-22]. https://eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_PO_V12.pdf. [2024-01-10]. Quick method for the analysis of highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-or IC-MS/MS measurement [EB/OL]. [2021-07-22]. https://eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_PO_V12.pdf. [2024-01-10].
- [24] 谭建林, 白祥, 彭珍华, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定咖啡豆中草甘膦、氨基磷和草铵膦残留量[J]. *食品安全质量学报*, 2020, 11(15): 5062–5067.
- TAN JL, BAI X, PENG ZH, *et al.* Determination of glyphosate, aminomethyl phosphoric acid and glufosinate residue in coffee bean by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(15): 5062–5067.
- [25] 王亚青, 陈欢, 滕建文, 等. 两种同时检测茶叶中赭曲霉毒素 A 与桔霉素方法的比对[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(21): 71–80.
- WANG YQ, CHEN H, TENG JW *et al.* Comparison of 2 methods for the simultaneous detection of ochratoxin A and citrinin in tea [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(21): 71–80.
- [26] 刘方征, 任雨鑫, 张丽萍, 等. 饱和盐辅助-分散液液微萃取-气相色谱-串联质谱法快速筛查啤酒中氨基甲酸乙酯与 9 种挥发性亚硝胺[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(12): 3945–3952.
- LIU FZ, REN LX, ZHANG LP, *et al.* Rapid determination of ethyl carbamate and 9 kinds of volatile nitrosamines in beer by gas chromatography-tandem mass spectrometry with saturation salt assisted-dispersible liquid-liquid microextraction [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(12): 3945–3952.
- [27] 韩璿焯, 宋敏, 罗芸, 等. 改良 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定减肥食品中 19 种违禁药物[J]. *食品安全质量学报*, 2022, 13(13): 4302–4309.
- HAN JX, SONG M, LUO Y, *et al.* Rapid determination of 19 kinds of prohibit drugs in diet foods by improved QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(13): 4302–4309.
- [28] 郭嘉, 曹立民, 韩香凝, 等. 气相色谱法测定水产品中蜡酯[J]. *食品安全质量学报*, 2022, 13(23): 7590–7597.
- GUO J, CAO LM, HAN XN, *et al.* Determination of wax esters in seafoods by gas chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(23): 7590–7597.
- [29] 冯婷婷, 魏旭东, 郑仕剑, 等. 基于复合萃取技术-超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法同时测定谷物及其制品中 10 种真菌毒素[J]. *食品安全质量学报*, 2023, 14(16): 196–204.
- FENG TT, WEI XD, ZHENG SJ, *et al.* Simultaneous determination of 10 kinds of mycotoxins in grain and grain products based on composite extraction technology coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(16): 196–204.
- [30] 黄丁宁, 缪丹旎, 赵巧灵, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中 12 种新烟碱类农药残留[J]. *食品安全质量学报*, 2023, 14(9): 186–194.
- HUANG DN, MIAO DN, ZHAO QL, *et al.* Determination of glyphosate, aminomethyl phosphoric acid and glufosinate residue in coffee bean by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(9): 186–194.
- [31] 鞠香, 陈克云, 李海霞, 等. 同位素稀释-气相色谱-串联质谱法同时测定肉制品中 16 种欧盟优控多环芳烃[J]. *食品安全质量学报*, 2023, 14(23): 179–187.
- JU X, CHEN KY, LI HX, *et al.* Simultaneous determination of 16 kinds of European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by isotope dilution-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(23): 179–187.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)

作者简介



李 丽, 硕士, 副教授, 主要研究方向为化学和仪器分析。
E-mail: 25338276@qq.com