

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240621002

超高效液相色谱-串联质谱法测定植物源食品中 多抗霉素 B、四霉素 A 和申嗪霉素残留量

罗耀¹, 黄科¹, 赵凤娟¹, 张建莹^{1*}, 赵旭¹, 吴凤琪¹, 张毅², 黄刚³

(1. 深圳海关食品检验检疫技术中心, 深圳 518045;
2. 深圳职业技术大学材料与环境工程学院, 深圳 518055; 3. 惠州海关综合技术中心, 惠州 516006)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定植物源性食品中的多抗霉素 B、四霉素 A 和申嗪霉素残留量的分析方法。**方法** 样品采用乙腈提取, 经 HLB 固相萃取柱净化, Waters BEH HILIC 色谱柱分离, 超高效液相色谱-串联质谱仪检测, 基质匹配标准曲线外标法定量。**结果** 多抗霉素 B、四霉素 A 和申嗪霉素在 5.0~200.0 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内线性关系良好($r^2>0.995$)。蔬菜、水果中多抗霉素 B、四霉素 A 的定量限均为 0.050 mg/kg, 申嗪霉素的定量限为 0.010 mg/kg。谷物中多抗霉素 B、四霉素 A 的定量限为 0.100 mg/kg, 申嗪霉素的定量限为 0.025 mg/kg。多抗霉素 B 在 0.050~10.000 mg/kg 添加水平回收率为 80.5%~101.3%, 相对标准偏差为 0.72%~9.22%, 申嗪霉素在 0.010~10.000 mg/kg 添加水平回收率为 70.3%~108.2%, 相对标准偏差为 1.52%~9.80%, 四霉素 A 在 0.050~1.000 mg/kg 添加水平回收率为 80.4%~107.1%, 相对标准偏差为 1.45%~9.29%。**结论** 本方法操作简单, 准确性好, 灵敏度高, 可用于植物源性食品中多抗霉素 B、四霉素 A 和申嗪霉素残留量的测定。

关键词: 植物源; 多抗霉素 B; 四霉素 A; 申嗪霉素; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of residual levels of polyoxin B, tetramycin A and phenazine-1-carboxylic acid in foods of plant origin by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LUO Yao¹, HUANG Ke¹, ZHAO Feng-Juan¹, ZHANG Jian-Ying^{1*}, ZHAO Xu¹,
WU Feng-Qi¹, ZHANG Yi², HUANG Gang³

(1. Food Inspection & Quarantine Center, Shenzhen Customs, Shenzhen 518045, China;
2. School of Materials and Environmental Engineering, Shenzhen Polytechnic University,
Shenzhen 518055, China; 3. Comprehensive Technology Center of Huizhou Customs, Huizhou 516006, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of polyoxin B, tetramycin A and phenazine-1-carboxylic acid residues in foods of plant origin by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile, purified by Oasis PRiME HLB solid phase extraction column, separated by Waters BEH HILIC column, detected by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer, and quantified by matrix matching standard curve external standard method.

*通信作者: 张建莹, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品中残留和污染物检测。E-mail: zhangjianying1001@163.com

*Corresponding author: ZHANG Jian-Ying, Master, Professor, Food Inspection & Quarantine Center of Shenzhen Customs, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: zhangjianying1001@163.com

Results The linear relationships of polyoxin B, tetramycin A and phenazine-1-carboxylic acid were good in the mass concentration range of 5.0–200.0 $\mu\text{g/L}$ ($r^2 > 0.995$). The limits of quantification of polyoxin B and tetramycin A in vegetables and fruits were 0.05 mg/kg, and those of phenazine-1-carboxylic acid were 0.010 mg/kg. The limits of quantification of polyoxin B and tetramycin A in cereals were 0.10 mg/kg, and those of phenazine-1-carboxylic acid were 0.025 mg/kg. The recoveries of polyoxin B supplemented with 0.050–10.000 mg/kg were 80.5%–101.3%, the relative standard deviations were 0.72%–9.22%, and the recoveries of phenazine-1-carboxylic acid supplemented with 0.010–10.000 mg/kg were 70.3%–108.2%, the relative standard deviations were 1.52%–9.80%. The recoveries of tetramycin A supplemented with 0.050–1.000 mg/kg were 80.4%–107.1% and the relative standard deviations were 1.45%–9.29%. **Conclusion** The method has the advantages of simple operation, good accuracy and high sensitivity, and can be used for the determination of polyoxin B, tetramycin A and phenazine-1-carboxylic acid residues in foods of plant origin.

KEY WORDS: foods of plant origin; polyoxin B; tetramycin A; phenazine-1-carboxylic acid; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

多抗霉素又称多氧霉素, 主要由多抗霉素 A 和多抗霉素 B 组成, 其中多抗霉素 B 的活性最高。多抗霉素是一种嘧啶核苷酸广谱性生物杀菌剂, 具有较好的内吸性传导作用, 作用机制为干扰病原菌细胞壁几丁质的生物合成导致菌体死亡^[1], 主要用于苹果斑点落叶病、梨黑星病、葡萄灰霉病、黄瓜霜霉病等多种真菌病害^[2-3]。申嗪霉素是一种新型微生物源农药, 有效成分为吩嗪-1-羧酸, 用于防治甜瓜蔓枯病、油菜菌核病、茄子黄萎病等病害^[4-7]。四霉素别名梧宁霉素, 真菌生长过程中产生的代谢产物, 包括四霉素 A、四霉素 B、四霉素 C, 其中四霉素 A 活性最高, 主要用于防治水稻稻瘟病、小麦白粉病、玉米丝黑穗病、花生根腐病、黄瓜细菌性角斑病等病害^[8-12]。

GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》规定了黄瓜、马铃薯、苹果中多抗霉素 B 的最大残留量为 0.5 mg/kg, 梨和猕猴桃的最大残留量为 0.1 mg/kg, 黄瓜、西瓜、小麦中申嗪霉素最大残留量分别为 0.3、0.02、0.05 mg/kg, 苹果中四霉素的最高残留量为 0.5 mg/kg。

目前关于多抗霉素 B 检测的报道较多, 申嗪霉素和四霉素 A 的报道较少。常见的多抗霉素 B 的检测方法包括毛细管电泳-电化学发光法^[13-14]、微生物分析方法^[15]、液相色谱法^[16]、液相色谱-串联质谱法^[17-23], 但现有毛细管电泳-电化学发光法、微生物分析方法、液相色谱法存在方法易受基质干扰, 定性能力较差等缺点; 现有液相色谱-串联质谱法存在前处理复杂、测试基质单一、方法线性范围窄, 灵敏度低等缺点。申嗪霉素的常见检测方法包括高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法^[24-27], 液相色谱法方法定性能力差、灵敏度低; 液相色谱-串联质

谱法主要用于土壤、人参、小麦的检测, 不能检测水果、蔬菜等基质。四霉素 A 的检测方法鲜有报道, 有研究建立利用高效液相色谱仪测定土壤中四霉素残留量的方法, 用于土壤的测定, 但不能检测食品基质, 方法定性能力差、灵敏度低^[28-30]。

鉴于此, 本研究建立植物源食品中多抗霉素 B、四霉素 A 和申嗪霉素残留量的高通量快速分析方法, 能够同时检测蔬菜、水果、谷物中抗霉素 B、四霉素 A 和申嗪霉素等 3 种生物农药, 该方法高效, 准确性好, 精密度高, 为植物源性食品中 3 种生物农药残留量无满足法规要求的痕量检测方法问题提供解决方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所用水果、蔬菜、谷物样品均采购于超市和农贸市场。

乙腈、甲酸、乙酸铵(色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 多抗霉素 B、四霉素 A、申嗪霉素(纯度 $\geq 98\%$, 天津阿尔塔科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

AB 5500 超高效液相色谱-质谱/质谱仪(美国 AB Sciex 公司); Waters BEH HILIC 柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)、PRiME HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL)(美国 Waters 公司); EOFO-945066 多管式涡旋混合器(美国 Talboys 公司); Hei-VAP Precision ML 旋转蒸发器(德国 Heidolph 公司); 4-16KS 冷冻离心机(德国 Sigma 公司); AL204 精密电子天平(精密度: 0.1 mg, 瑞士梅特勒-托利多公司); 有机微孔滤膜(13 mm/0.22 μm , 上海安谱实验科技股份有限公司); 玻璃纤维滤纸(110 mm/1.5 μm , 深圳粤试化科技有限公司)。

1.3 样品前处理

1.3.1 样品提取

谷物称取 2.5 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 水浸润;水果、蔬菜称取 10 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中。往上述试样中加入 15 mL 乙腈,振荡提取 5 min,以 9500 r/min 离心 5 min,用玻璃纤维滤纸滤至烧杯中,将滤液转移至 25 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀,待净化。

1.3.2 净化

依次用 5 mL 乙腈和 5 mL 60% (V/V)乙腈水溶液活化固相萃取柱,吸取 5 mL 待净化液以 2~3 s/滴的流速加载到固相萃取柱上,再加入 1 mL 乙腈洗脱,流速低于 2~3 s/滴,收集全部滤液和洗脱液,40 °C 水浴旋转蒸发至近干,加入 2 mL 60%乙腈溶液溶解残渣,经 0.22 μm 有机滤膜过滤后,供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

1.4 仪器条件

色谱柱: Waters BEH HILIC 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL; 流动相 A: 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸); 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 95.0%~50.0% B; 2.0~6.0 min, 50.0% B; 6.0~6.01 min, 50.00%~95.0% B; 6.01~8.0 min, 95.0% B。

电离方式: 电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)。扫描方式: 正离子和负离子同时扫描。电喷雾电压: 正离子 4500 V, 负离子-4500 V。离子源温度: 300 °C。气帘气压力: 0.241 MPa。雾化器压力: 0.345 MPa。辅助气压力: 0.345 MPa。多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 其他质谱条件参见表 1。

1.5 数据处理

质谱数据、方法学考察数据处理采用 SCIEX OS 2.0.1 软件分析, 样品含量计算采用 Microsoft Excel 2017, 绘图采用 Origin 2022。

表 1 3 种化合物的质谱条件

Table 1 Mass parameters of 3 kinds of compounds

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞气能量 /eV	去簇电压 /V
多抗霉素 B	506.4	141.0*	-30	-140
		217.0	-44	-140
四霉素 A	696.4	515.2*	20	116
		497.2	25	116
申嗪霉素	225.1	207.0*	22	74
		179.2	37	74

注: *为定量离子。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的确立

配制 3 种农药的标准溶液, Q1 MS 全扫描分别扫描多抗霉素 B(负离子模式)、申嗪霉素(正离子模式)、四霉素 A(正离子模式)的母离子, 分别为 *m/z* 506.4、*m/z* 225.1、*m/z* 696.4, Q2 Product Ion Scan (MS2) 分别找到子离子, 通过调节碰撞能量和解簇电压值, 达到最佳质谱条件。最终选择 506.4/141.0 和 506.4/217.0 作为多抗霉素 B 的 MRM 离子对, 225.1/207.0 和 225.1/179.2 作为申嗪霉素的 MRM 离子对, 696.4/515.2 和 696.4/497.2 作为四霉素 A 的 MRM 离子对。多抗霉素 B、四霉素 A、申嗪霉素的 MRM 图见图 1, 选取的离子对响应高, 干扰小, 适用于定性和定量分析。

2.2 色谱条件的优化

考察了常用的 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)、Waters BEH HILIC 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、Bridge Amide AMIDE 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) 和 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) 4 种色谱柱, 结果显示目标物在几款色谱柱上均有保留, 但在 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱上, 多抗霉素 B 保留时间在 1.2 min 左右, Bridge Amide AMIDE 柱申嗪霉素保留时间在 1.8 min 左右, 目标物的流出时间太靠

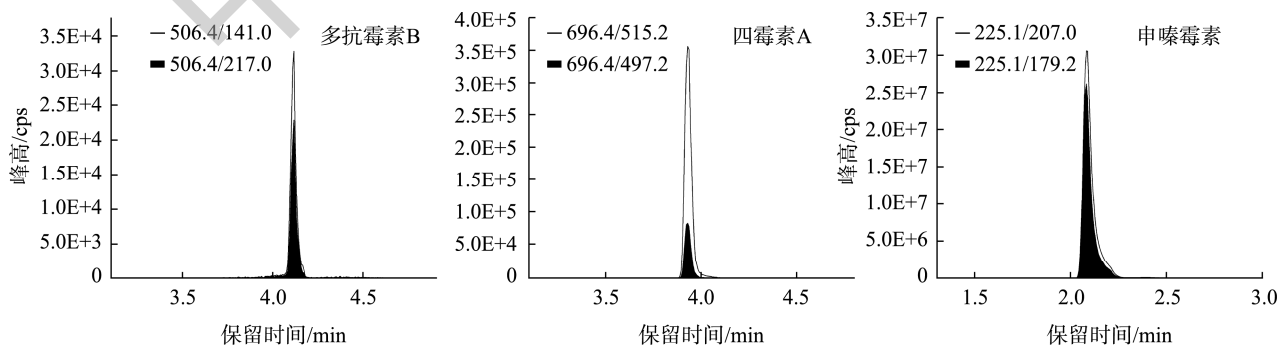


图1 多抗霉素B、四霉素A和申嗪霉素的MRM色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of polyoxin B, tetramycin A and phenazine-1-carboxylic acid

前; 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱, 多抗霉素 B 色谱保留时间在 2 min 左右, 且质谱响应强度较低。综合考虑, 选择 Waters BEH HILIC 柱, 极性较大的多抗霉素 B 色谱保留时间有较大改善, 四霉素 A 和申嗪霉素也有较好的保留。

使用 Waters BEH HILIC 柱时, 有机溶剂选择非质子溶剂, 故选择乙腈-水体系, 一般缓冲盐体系的浓度 1~10 mmol/L。本研究比较了 4 种常用流动相 5 mmol/L 甲酸铵(0.1%甲酸)-乙腈、5 mmol/L 甲酸铵(0.2%甲酸)-乙腈、5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)-乙腈、5 mmol/L 乙酸铵(0.2%甲酸)-乙腈, 发现使用 5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)-乙腈的流动相, 各化合物的峰形较好且响应值高, 故选择 5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)-乙腈为流动相。

2.3 样品前处理优化

2.3.1 提取溶剂的优化

多抗霉素 B 易溶于水, 不溶于甲醇、丙酮等有机溶剂, 四霉素 A 微溶于水, 易溶于有机溶剂; 申嗪霉素较易溶于有机溶剂。抗霉素 B 多采用甲酸水、甲醇水、乙腈等作为提取溶液, 申嗪霉素多采用乙腈、酸性乙腈提取。本研究考察了 0.1%甲酸水、50%乙腈、75%乙腈、乙腈 4 种提取溶液对添加 0.10 mg/kg 浓度水平试样的目标化合物提取效率。4 种提取溶液对苹果基质中目标物回收率影响见图 2, 结果表明, 乙腈对目标化合物的提取效率最高。

对于水果、蔬菜等含水量较大的样品, 用乙腈提取回收率高且提取液较澄清, 因此选择乙腈作为提取液。谷物含水量较少, 乙腈不能将多抗霉素 B 充分提取, 加入 10 mL 水浸润后使用乙腈提取, 3 种药物的回收率为 71.7%~103.2%。综上所述, 对于含水量较大的基质样品可采用乙腈直接提取; 对于谷物类等含水量较小的基质样品, 先加入 10 mL 水浸润, 再采用乙腈提取。

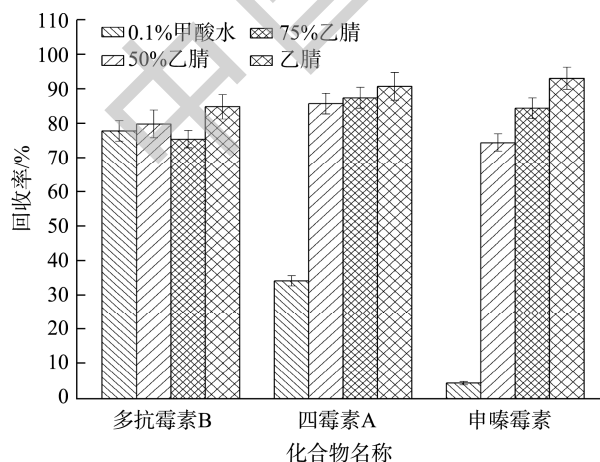


图2 不同提取溶剂对目标物回收率的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of different extraction solvents on the recoveries of target substance ($n=3$)

2.3.2 净化材料的选择

多抗霉素 B 多采用 MCX^[16,21]、HLB^[20-21]、QuEChERS^[23]等进行净化, 申嗪霉素多采用 QuEChERS 等净化^[24-27]。申嗪霉素的 pKa 约为 2.15, MCX 强阳离子交换固相萃取柱 pH 耐受范围为 1~14, 不宜采用离子型固相萃取柱, 因此考虑采用 QuEChERS 和 HLB 净化方式。QuEChERS 方法常用的分散固相萃取剂有 N-丙基乙二胺(N-propyl ethylenediamine, PSA)、十八烷基键合硅胶(C₁₈)、石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)^[31]。60%乙腈水中添加浓度 0.10 mg/kg 的目标物, 分别采用 100 mg PSA、100 mg GCB、100 mg C₁₈净化 5 mL 添加浓度为 0.10 mg/kg 的 60%乙腈溶液, 各化合物回收率情况如图 3。结果表明, PSA、GCB 净化时对 3 种目标物化合物都有很大的吸附作用, 故排除 PSA、GCB 的使用, 采用 100 mg C₁₈净化, 回收率相对较高。但在实际基质样品检测过程, 即使采用 150 mg C₁₈净化粉末, 四霉素 A、多抗霉素 B 仍存在较大干扰峰, 说明 C₁₈净化效果未能达到要求。

本研究考察① 5 mL 提取液过 HLB 柱(2 mL 乙腈活化后使用), 无洗脱, 接全部滤液; ② 5 mL 提取液过 HLB 柱(2 mL 乙腈活化后使用)后用 1 mL 乙腈洗脱, 接全部滤液; ③ 5 mL 提取液过 HLB 柱(2 mL 乙腈活化后使用)后用 2 mL 乙腈洗脱, 接全部滤液。不同洗脱方式下目标物的回收率情况如图 4。由于申嗪霉素的非极性最强, HLB 对其有较强保留, 穿过提取液后大部分被 HLB 柱保留, 需用洗脱能力更强的乙腈洗脱, 保证其回收率达到满意, 经对比后发现 1 mL 和 2 mL 乙腈的洗脱满足要求, 较少的洗脱体积能保证杂质更少进入滤液, 故选择 1 mL 乙腈洗脱。

综合考虑, 最终采用通用性更好的 HLB 柱, 并采用 1 mL 乙腈洗脱, 收集所有流出液。

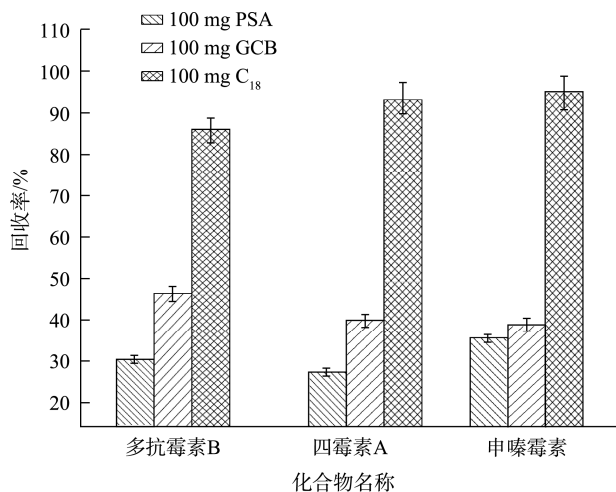
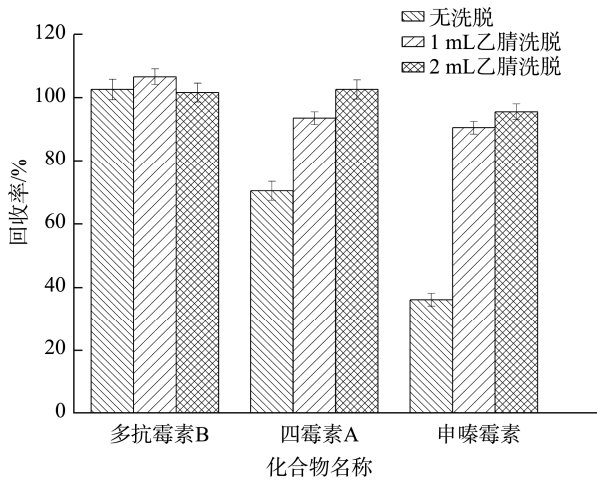


图3 不同分散固相萃取剂对目标物回收率的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of different dispersions of solid phase extractants on recoveries of target substance ($n=3$)

图4 不同过柱方式对目标物回收率的影响($n=3$)Fig.4 Effects of different column passing methods on recoveries of target substance ($n=3$)

2.4 方法验证

2.4.1 基质效应评价

由于采用 HLB 正相法净化, 滤液中可能含有部分极性杂质, 故有必要重点考察基质效应(matrix effects, ME)对

试验的影响。ME 还与分析物的特性、色谱分离条件、不同仪器离子源设计等有关, 可按公式对 ME 进行量化评估: $ME/\%=[(基质匹配校准曲线斜率/纯溶剂标准曲线斜率)-1]\times 100\%$ 。 $|ME|<20\%$ 为弱 ME, 可忽略而无需采取补偿措施; $20\%\leq|ME|\leq 50\%$ 为中等程度 ME, $|ME|>50\%$ 为强 ME, 须采取措施补偿 ME。考察本方法的 ME, 结果见表 2。结果表明, $|ME|$ 均大于 20%, 考察的基质存在不同程度的中等或强 ME, 故本方法在定量分析中采用基质匹配的标准曲线。

2.4.2 方法线性范围、定量限

用空白基质溶液配制质量浓度为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液。以峰面积(Y)为纵坐标, 相应质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)为横坐标, 绘制标准校正曲线, 得到线性回归方程和相关系数, 详见表 3。经软件分析可知, 在 5.0~200.0 $\mu\text{g/L}$ 线性范围内 3 种待测物呈现良好的线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.995。蔬菜、水果中四霉素 A、多抗霉素 B 的定量限($S/N>10$)均为 0.050 mg/kg, 申嗪霉素的定量限为 0.010 mg/kg, 谷物中四霉素 A、多抗霉素 B 的定量限($S/N>10$)均为 0.10 mg/kg, 申嗪霉素的定量限为 0.025 mg/kg。该检测方法灵敏度较高, 能满足 GB 2763—2021 对农药限量检测的相关要求。

表 2 多抗霉素 B、四霉素 A、申嗪霉素在 10 种基质中的 MEs (%)

Table 2 MEs of polyoxin B, tetramycin A and phenazine-1-carboxylic acid in 10 kinds of substrates (%)

化合物	小麦	黄瓜	马铃薯	辣椒	苹果	西瓜	葡萄	梨	草莓	稻谷
多抗霉素 B	43	47	67	58	37	46	39	37	36	43
四霉素 A	65	45	58	54	32	43	41	32	32	56
申嗪霉素	49	44	44	48	35	50	46	35	35	42

表 3 多抗霉素 B、四霉素 A、申嗪霉素在 10 种基质中的的线性关系和相关系数

Table 3 Linear relationship and correlation coefficients of polyoxin B, tetramycin A and phenazine-1-carboxylic acid in 10 kinds of substrates

项目名称	多抗霉素 B		四霉素 A		申嗪霉素	
	线性方程	r^2	线性方程	r^2	线性方程	r^2
小麦	$Y=376.84916X-371.37143$	0.9980	$Y=3202.43878X-5820.43909$	0.9999	$Y=5.39709e5X+1.09353e6$	0.9980
黄瓜	$Y=208.78342X-415.51778$	0.9984	$Y=3661.10759X-2616.39554$	0.9997	$Y=4.65720e5X+1.30244e6$	0.9976
马铃薯	$Y=217.51240X-811.99119$	0.9996	$Y=3867.60361X-1915.08891$	0.9999	$Y=5.98441e5X+1.21855e6$	0.9973
辣椒	$Y=277.77581X-284.31184$	0.9987	$Y=4205.81288X-1202.40142$	0.9998	$Y=5.49249e5X+9.20360e5$	0.9987
苹果	$Y=411.57668X-988.52785$	0.9999	$Y=6190.46351X-1663.23021$	0.9995	$Y=6.86671e5X+2.26944e6$	0.9967
西瓜	$Y=353.01567X-4.82007$	0.9993	$Y=5228.63769X-2041.08688$	0.9999	$Y=5.36317e5X+1.19761e6$	0.9983
葡萄	$Y=399.67531X-226.99309$	0.9999	$Y=5439.98917X-3036.83995$	0.9998	$Y=5.74220e5X+1.11607e6$	0.9977
梨	$Y=384.98774X-416.27034$	0.9999	$Y=6051.64609X-3526.80268$	0.9996	$Y=6.70240e5X+3.06765e6$	0.9965
草莓	$Y=370.20758X-310.05940$	0.9999	$Y=6051.64609X-3526.80268$	0.9996	$Y=5.60208e5X+2.15068e6$	0.9985
稻谷	$Y=390.10957X-204.28056$	0.9990	$Y=3610.03212X-3051.50891$	0.9998	$Y=5.60153e5X+1.30102e6$	0.9990

2.4.3 准确度和精密度

取代表性样品基质小麦、黄瓜、马铃薯、辣椒、苹果、西瓜、葡萄、梨、草莓、稻谷, 添加定量限、最大允许限量(无限量时为 2 倍定量限)、1/2 最大允许限量(无限量时为 10 倍定量限)3 个浓度水平, 平行测定 6 次。添加浓度、测定结果、平均回收率、相对标准偏差详见表 4。

多抗霉素 B 总体平均回收率范围为 80.5%~101.3%, 相对标准偏差为 0.72%~9.22%; 四霉素 A 平均回收率范围为 80.4%~107.1%, 相对标准偏差为 1.45%~9.29%; 申嗉霉素总体

平均回收率范围为 70.3%~108.2%, 相对标准偏差为 1.52%~9.80%。10 种基质中 3 种农药组分的回收率和精密度均符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中的要求, 该研究中所述检测方法的准确度高、精密度良好。

2.5 实际样品检测

应用本研究方法对市场采购的 20 批次样品(苹果、葡萄、黄瓜、小麦各 5 批次)进行检测, 从 1 批次小麦中检出多抗霉素 B, 含量水平低于方法定量限。

表 4 目标物的回收率和精密度($n=6$)
Table 4 Recoveries and precision of target substance ($n=6$)

基质	多抗霉素 B			申嗉霉素			四霉素 A		
	添加浓度 /(mg/kg)	平均回收率 /%	相对标准偏差 /%	添加浓度 /(mg/kg)	平均回收率 /%	相对标准偏差 /%	添加浓度 /(mg/kg)	平均回收率 /%	相对标准偏差 /%
小麦	0.100	90.6	7.10	0.025	71.7	4.76	0.100	103.2	5.01
	0.250	92.0	4.06	0.050	93.8	4.29	0.200	101.8	3.27
	0.500	98.5	5.17	0.250	95.0	4.55	1.000	100.6	6.06
黄瓜	0.050	94.5	3.69	0.010	85.0	6.22	0.050	89.3	6.48
	0.250	82.0	6.49	0.250	96.8	1.52	0.100	107.1	7.36
	0.500	94.5	3.78	0.500	96.3	9.28	0.500	103.2	4.66
马铃薯	0.050	94.5	6.06	0.010	89.1	8.06	0.050	89.3	6.07
	0.250	84.5	5.97	0.250	98.8	4.31	0.100	105.3	9.29
	0.500	94.5	6.93	0.500	105.7	2.83	0.500	102.8	8.58
辣椒	0.050	89.9	8.15	0.010	92.2	4.45	0.050	86.6	6.06
	0.100	83.7	8.65	0.050	95.3	5.80	0.100	102.6	5.59
	0.500	91.4	7.01	0.100	97.0	9.18	0.500	105.2	2.16
苹果	0.050	86.8	9.22	0.010	75.0	6.39	0.050	93.8	5.53
	0.250	80.5	5.82	0.020	96.0	9.40	0.250	93.8	6.21
	0.500	86.0	3.17	0.100	105.1	4.82	0.500	96.0	2.44
西瓜	0.050	90.6	3.55	0.010	85.9	5.51	0.050	88.1	7.76
	0.100	88.8	4.96	0.020	108.2	6.87	0.100	101.3	4.08
	0.500	91.4	4.36	0.100	105.8	3.39	0.500	100.9	4.59
葡萄	0.050	93.0	3.02	0.010	90.6	3.55	0.050	82.5	3.10
	5.000	96.1	6.28	5.000	90.6	6.33	0.100	100.3	4.56
	10.000	101.3	4.66	10.000	100.7	7.84	0.500	93.2	6.23
梨	0.050	80.5	2.08	0.010	70.3	4.83	0.050	82.5	3.35
	0.100	89.4	0.72	0.025	76.8	9.80	0.100	80.4	7.33
	0.500	82.9	7.38	0.050	90.6	9.07	0.500	93.0	3.62
草莓	0.050	84.6	4.31	0.010	74.5	3.70	0.050	85.6	8.54
	0.250	82.0	6.40	0.020	90.5	2.15	0.100	97.8	2.64
	0.500	91.7	6.15	0.100	99.4	3.85	0.500	99.2	1.65
稻谷	0.100	83.1	2.66	0.025	72.3	2.20	0.100	98.3	1.45
	0.200	95.3	2.56	0.050	92.5	4.46	0.200	98.7	2.04
	1.000	97.2	1.13	0.100	93.2	3.56	1.000	98.7	2.84

3 结 论

本研究通过对小麦、黄瓜、苹果等 10 种基质中 3 种生物农药残留的定量限、标准曲线相关性的验证实验,建立了超高效液相色谱-串联质谱法检测水果、蔬菜、谷物类基质中多抗霉素 B、四霉素 A 和申嗪霉素 3 种生物农药残留量的检测方法。该方法线性范围为 5.0~200.0 $\mu\text{g/L}$, 蔬菜、水果中四霉素 A、多抗霉素 B 的定量限为 0.050 mg/kg, 申嗪霉素的定量限为 0.010 mg/kg, 谷物中四霉素 A、多抗霉素 B 的定量限为 0.100 mg/kg, 申嗪霉素的定量限为 0.025 mg/kg。加标回收实验表明,本方法的准确度、精密度均可以达到实验室要求,符合 GB/T 27404—2008 的规定,可以满足水果、蔬菜、谷物中多抗霉素 B、四霉素 A 和申嗪霉素残留量检测要求,为有效服务监管提供技术支撑。

参考文献

- [1] KIMIE K, MASAKAZU U, MASAHIRO N, *et al.* Neopolyoxins A, B, and C, new chitin synthetase inhibitors [J]. *Agric Biol Chem*, 2014, 44(7): 1709–1711
- [2] TORU A. Synergistic effect of a fungicide containing polyoxin B with insect growth regulators (IGRs) in the killing of common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Appl Entomol Zool*, 2008, 43(2): 167–171.
- [3] ZHUO J, MA B, XU J, *et al.* Reconstruction of a hybrid nucleoside antibiotic gene cluster based on scarless modification of large DNA fragments [J]. *Sci China (Life Sci)*, 2017, 60(9): 968–979.
- [4] 张金影. 申嗪霉素氨基酸耦合物在植物体内的穿透性研究[D]. 荆州: 长江大学, 2023.
ZHANG JY. Study on the penetration of phenazine-1-carboxylic acid amino acid coupling in plants [D]. Jingzhou: Yangtze University, 2023.
- [5] 何亚文, 张红艳. 代谢产物农药申嗪霉素系列产品研发与应用进展[C]. 病虫害防护与生物安全——中国植物保护学会 2021 年学术年会论文集, 2021.
HE YW, ZHANG HY. Development and application of metabolite pesticide phenazine-1-carboxylic acid series products [C]. *Disease and Insect Protection and Biosecurity-Proceedings of the 2021 Annual Conference of the Chinese Plant Protection Society*, 2021.
- [6] ZHU X, YU L, ZHANG M, *et al.* Design, synthesis and biological activity of hydroxybenzoic acid ester conjugates of phenazine-1-carboxylic acid [Z]. 2018.
- [7] 徐志红, 李俊凯, 黄迪. 申嗪霉素的氨基酸衍生物及其杀菌用途: 中国, CN201810159227.9[P]. 2022-03-25.
XU ZH, LI JK, HUANG D. Amino acid derivatives of phenazine-1-carboxylic acid and its bactericidal use: China, CN201810159227.9 [P]. 2022-03-25.
- [8] LI W, LONG Y, YIN X, *et al.* Antifungal activity and mechanism of tetramycin against *Alternaria alternata*, the soft rot causing fungi in kiwifruit [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2023, 192: 105409.
- [9] ZHANG C, LI HT, WU XM, *et al.* Co-application of tetramycin and chitosan in controlling leaf spot disease of kiwifruit and enhancing its resistance, photosynthesis, quality and amino acids [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(4): 500–500.
- [10] 陈佳. 四霉素·戊唑醇涂抹剂的制备及应用[D]. 贵州: 贵州大学, 2023.
CHEN J. Preparation and application of tetramycin and tebuconazole [D]. Guizhou: Guizhou University, 2023.
- [11] HE YL, DING Y, WU QP, *et al.* Identification of the potential biological preservative tetramycin A-producing strain and enhancing its production [Z]. 2020.
- [12] 田秀, 周连柱, 黄晓庆, 等. 我国葡萄灰霉病菌对四霉素和啶酰菌胺的敏感性测定[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(4): 868–873.
TIAN X, ZHOU LZ, HUANG XQ, *et al.* Determination of the susceptibility of botrytis cinerea in China to tetramycin and boscalid [J]. *Chin J Biol Control*, 2022, 38(4): 868–873.
- [13] 赵艳霞, 王大红. 毛细管电泳-电化学发光法检测蔬菜中多抗霉素和丙草胺残留[J]. *中国酿造*, 2021, 40(2): 184–187.
ZHAO HY, WANG DH. Determination of polyoxin and pretilachlor residues in vegetables by capillary electrophoresis with electrochemical luminescence [J]. *J Chin Soc Ferment*, 2021, 40(2): 184–187.
- [14] 胡月芳. 淮山中丙草胺和多抗霉素 B 的 CE-ECL 法同时检测[J]. *分子科学学报*, 2014, 30(6): 504–508.
HU YF. Simultaneous determination of pretilachlor and polyoxin B by CE-ECL method [J]. *J Mol Sci*, 2014, 30(6): 504–508.
- [15] SUN L, CHEN W, DENG Z, *et al.* Microbiological assay for quantitative determination of polyoxin B [J]. *Process Biochem*, 2009, 44(3): 361–364.
- [16] 孙忠松, 刘钢. 用液相色谱二极阵列检测器测定多氧霉素 B[J]. *化学分析计量*, 1999, 8(3): 2.
SUN ZS, LIU G. Determination of polyoxin B by liquid chromatography with diode array detector [J]. *Chem Anal Meter*, 1999, 8(3): 2.
- [17] 张丽, 祝伟霞, 李继利, 等. 超高效液相色谱串联质谱测定水果蔬菜中多抗霉素 B 的残留[J]. *现代食品*, 2018(12): 138–140.
ZHANG L, ZHU WX, LI JL, *et al.* Determination of polyoxin B residues in fruits and vegetables by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food*, 2018(12): 138–140.
- [18] LACSON MLB, ARBOTANTE CA, MAGDAYAO MJTE, *et al.* Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem high-resolution elevated mass spectrometry profiling of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* metabolites from the endophytic bacteria collected from the weeds of a previous dumpsite [J]. *J Chromatogr A*, 2023, 1706: 464228.
- [19] 郭长英, 陈子雷, 丁蕊艳, 等. 多抗霉素 B 的 HPLC-MS/MS 分析方法[J]. *农药*, 2020, 59(1): 34–36.
GUO CY, CHEN ZL, DING RY, *et al.* Determination of polyoxin B by HPLC-MS/MS [J]. *Agrochemicals*, 2020, 59(1): 34–36.
- [20] 张楠, 高波, 潘忠成, 等. 多抗霉素 B 组分的高效液相与质谱联用的检测方法[J]. *农业与技术*, 2020, 40(16): 7–10.
ZHANG N, GAO B, PAN ZC, *et al.* Determination of polyoxin B by high performance liquid and mass spectrometry [J]. *Agric Technol*, 2020, 40(16): 7–10.
- [21] 张红梅. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水果及谷物中多抗霉素 B 残留量[J]. *食品安全导刊*, 2023(14): 58–62.
ZHANG HM. Determination of polyoxin B residues in fruits and cereals by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *China Food Saf Magaz*, 2023(14): 58–62.
- [22] 张艳, 陈子雷, 李慧冬, 等. SPE-HPLC-MS/MS 测定梨中多抗霉素 B 和

- 宁南霉素残留[J]. 农药, 2021, 60(6): 436-439.
- ZHANG Y, CHEN ZL, LI HD, *et al.* Determination of polyoxin B and ningnanamycin residues in pears by SPE-HPLC-MS/MS [J]. *Agrochemicals*, 2021, 60(6): 436-439.
- [23] 王晶, 于卓然, 张鑫鑫, 等. 改进 QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 法测定梨和黄瓜中多抗霉素残留量[J]. 中国口岸科学技术, 2020(11): 67-72.
- WANG J, YU ZR, ZHANG XX, *et al.* Determination of polyoxin residues in pear and cucumber by improved QuEChERS combined with UPLC-MS/MS method [J]. *China Port Sci Technol*, 2020(11): 67-72.
- [24] 唐伟, 陈建波, 马琳, 等. 高效液相色谱法快速测定黄瓜和土壤中申嗪霉素的残留[J]. 农药科学与管理, 2014, 35(8): 29-32.
- TANG W, CHEN JB, MA L, *et al.* Rapid determination of phenazine-1-carboxylic acid residues in cucumber and soil by high performance liquid chromatography [J]. *Pestic Sci Admin*, 2014, 35(8): 29-32.
- [25] 刘钰, 冯立志, 刘伟. HPLC-DAD 和 HPLC-ESI-MS/MS 检测小麦及土壤中申嗪霉素残留方法比较[J]. 农药, 2013, 52(1): 37-40.
- LIU Y, FENG YZ, LIU W. Comparison of HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for detection of phenazine-1-carboxylic acid residues in wheat and soil [J]. *Agrochemicals*, 2013, 52(1): 37-40.
- [26] 付馨慰, 黄超群, 蒋沁婷, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人参中申嗪霉素的残留[J]. 分析测试学报, 2014, 33(10): 1204-1208.
- FU XW, HUANG CQ, JIANG QT, *et al.* Determination of phenazine-1-carboxylic acid residue in ginseng by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2014, 33(10): 1204-1208.
- [27] 方明, 邹吉伟, 吴加伦, 等. 高效液相色谱法检测申嗪霉素在人参及其土壤中的残留[J]. 农药学报, 2016, 18(3): 358-366.
- FANG M, ZOU JW, WU JL, *et al.* Determination of phenazine-1-carboxylic acid residues in ginseng and its soil by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2016, 18(3): 358-366.
- [28] 杨丽华, 蒋方舟, 陈恒辉, 等. 一种利用高效液相色谱仪测定土壤中四霉素残留量的方法: 中国, CN201811252504.7[P]. 2024-05-19.
- YANG LH, JIANG FZ, CHEN HH, *et al.* A method for the determination of tetramycin residues in soil by high performance liquid chromatograph: China, CN201811252504.7 [P]. 2024-05-19.
- [29] 邓娜, 倪永年. 动力学分光法测定金霉素、四霉素和土环素[C]. 第十届中国化学会分析化学年会暨第十届全国原子光谱学术会议论文摘要集, 2009.
- DENG N, NI YN. Determination of chlortetracycline, tetramycin and oxytetracycline by kinetic spectrophotometry [C]. *Abstracts of the 10th Annual Meeting of Analytical Chemistry of the Chinese Chemical Society and the 10th National Conference on Atomic Spectroscopy*, 2009.
- [30] FEI C, WU HY, HU MH, *et al.* Determination of resistance gene cloning and biological activity of tetramycin [J]. *J Microbiol*, 2012, 32(1): 17-22.
- [31] 韩飞, 袁园. 超高效液相色谱-串联质谱法测定生菜中氟吡菌酰胺及其代谢物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(12): 193-198.
- HAN F, YUAN Y. Determination of fluopyram and its metabolite residues in lactuca sativa by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(12): 193-198.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



罗 耀, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 395280803@qq.com

张建莹, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品中残留和污染物检测。

E-mail: zhangjianying1001@163.com