

液相色谱-质谱法测定蘑菇中咪鲜安残留

柳训才^{1,2}, 陈平², 沈菁², 程运斌², 陈浩^{*1}

(1. 华中农业大学理学院, 武汉 430070; 2. 湖北省农科院测试中心, 武汉 430064)

摘要:建立了以固相萃取-液相色谱-电喷雾质谱(SPE-LC-ESI/MS)法检测蘑菇中咪鲜安残留量的方法。蘑菇样品加入乙腈萃取,离心分离,取上清液加入 NaCl 和 MgSO₄ 进行盐析,有机相浓缩后加入键合丙基乙二胺(PSA)净化,上清液以 0.45 μm 针头过滤器过滤后进样。色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18(150 × 2.1 mm, 3.5 μm)柱,柱温 40℃;流动相为 0.1%乙酸水溶液-乙腈(30+70, V/V),流速 0.20 mL/min。质谱采用选择离子监控模式,检测离子的质荷比(*m/z*)分别为 380、378、376、312、310 和 308。咪鲜安在样品中的加标回收率为 95.00%~100.07%,变异系数在 1.72%~8.71%之间,检出限(*S/N* > 10)为 2.86 μg/L。此方法简单、准确,将其应用于蘑菇中咪鲜安的消解动态研究,取得了比较理想的效果。

关键词:液相色谱-质谱;咪鲜安;蘑菇;残留检测

中图分类号:O657.63

文献标识码:A

咪鲜安(Prochloraz)是 Boots 公司于 1977 年首先合成的一种广谱高效的咪唑类杀菌剂,具有向顶性传导活性。其作用机理主要是通过抑制麦角甾醇的生物合成,使菌体细胞膜功能受破坏而起作用,广泛用于防治由尾孢属、核腔菌属、喙孢属、核盘菌属、镰孢属及白粉菌、炭疽菌等^[1]致病菌所引起的油料作物、谷类、热带和亚热带水果、观赏植物、蔬菜及各种经济作物的病害,也用于种籽、苗木处理及防治收获后水果贮存期的病害。已有自咪鲜安开发应用以来,就其残留代谢与环境毒理方面一些报道^[2,3]。研究表明,尽管咪鲜安属于低毒杀菌剂,但是其最终代谢产物 2,4,6-三氯苯酚却是环境中的重要污染物之一。因此有必要对造成污染的潜在因素进行研究。

目前,对咪鲜安残留物的检测主要采用色谱法。以气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)为分析手段的文献不断见诸报道^[4-7]。而近年来,液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术已发展成为一种高度自动化、常规化的分析手段,在各个领域得到了广泛应用。本研究建立了蘑菇中咪鲜安残留的固相萃取-液相色谱-电喷雾质谱(SPE-LC-ESI/MS)的检测方法,此方法简单、准确,将其应用于蘑菇中咪鲜安的消解动态研究,取得了比较理想的效果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-MS 2010 EV 高效液相色谱-质谱联用系统(日本, Shimadzu); T25 分散器(德国, IKA); OA-SYS 氮吹仪(美国, OA)。

咪鲜安(Prochloraz, 99.0%)标准品由国家农药质检中心提供;乙腈(色谱纯, TEDIA, 美国);乙酸(色谱纯, DIMA, 美国);键合丙基乙二胺(PSA, Agela, 美国);氯化钠、硫酸镁(分析纯, 沪试)。所有实验用水均为超纯水。

收稿日期: 2006-11-27

修回日期: 2006-12-26

通讯联系人: 陈浩, 男, 教授, 研究方向: 食品安全与分析。

1.2 色谱-质谱分析条件

色谱条件:ZORBAX Eclipse XDB-C18(150 ×2.1 mm,3.5 μm) 色谱柱;流动相 A:0.1 %乙酸水溶液, B:乙腈, A + B = 30 + 70;流速:0.20 mL/min;柱温:40 ;进样量:5 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI 源),正离子模式;选择监控离子 m/z :380、378、376、312、310、308;毛细管电喷雾电压:4.0 kV;雾化气(N₂):8 kPa;干燥气(N₂):流速 1.5 L/min,温度 200 。

1.3 样品前处理

取 500 g 蘑菇样品于组织捣碎机中充分捣碎,混匀,准确称取 10.0 g 于 100 mL 离心管中,加入乙腈 20.0 mL,用分散器高速匀浆 2 min,离心,将上清液转入 50 mL 离心管中,加入氯化钠 3.0 g、硫酸镁 1.0 g,剧烈振摇 2 min,离心,取上清液 5.0 mL 于氮吹仪上浓缩至 2.5 mL,加入 PSA 300 mg,再振摇 2 min,静置,取上清液以 0.45 μm 针头过滤器过滤,供 LC-MS 检测。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的优化

为了分离出蘑菇萃取液中的有机相(乙腈),在实验中使用了向提取液中加入 NaCl 进行盐析的方法。结果表明,单纯使用 NaCl 可完全达到目的,但是在使用 NaCl 的同时加入适量 MgSO₄ 后这种情况则有显著的改善,对加入 MgSO₄ 的量进一步实验后发现,在每毫升饱和氯化钠水溶液中,只需加入 0.1 g 的 MgSO₄ 即可使乙腈从水相中完全析出。因此本方法在以 NaCl 进行盐析时加入 1.0 g 的 MgSO₄。

为了对乙腈萃取液进行净化,使用了对色素和糖吸附强度以及吸附量都非常大的 PSA。结果表明,在使用 PSA 时如加入适量的无水 MgSO₄,会有助于加强 PSA 的净化效果。但是,加入无水 MgSO₄ 后咪鲜安的添加回收率则会急剧降低,这可能是由 MgSO₄ 对咪鲜安的吸附所造成的。故实验在使用 PSA 时未使用无水 MgSO₄。

2.2 流动相的选择

本文在对流动相进行优化时比较了甲醇-水和乙腈-水两种体系。实验表明,在具有相同的分离效率时,乙腈-水体系比甲醇-水体系具有更高的灵敏度,且在恒流模式下流动相的柱前压会显著降低。此外,当水相中含有 0.1 %乙酸时有利于提高质谱的灵敏度,但对咪鲜安的峰形略有不利影响,因此采用含 0.1 %乙酸的乙腈-水体系作为流动相。

2.3 监控离子的选择

根据咪鲜安在 MS 中的裂解机理(见图 1),可知咪鲜安(C₁₅H₁₇N₃O₂Cl₃)的一级质谱图中主要存在两个峰,即分子离子峰[M + H]⁺和[M - C₃H₄N₂ + H]⁺,但是由于 Cl 元素有³⁵Cl 和³⁷Cl 两种同位素,所以有:含 3 个³⁵Cl 原子: m/z 376 为[M + H]⁺, m/z 308 为[M - C₃H₄N₂ + H]⁺;含 1 个³⁷Cl 原子: m/z 378 为[M + H]⁺, m/z 310 为[M - C₃H₄N₂ + H]⁺;含 2 个³⁷Cl 原子: m/z 380 为[M + H]⁺, m/z 312 为[M - C₃H₄N₂ + H]⁺。

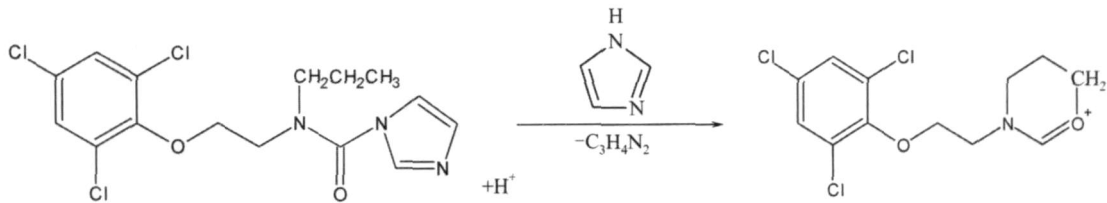


Fig. 1 Fragmentation mechanism of [M + H]⁺ ions for prochloraz

即咪鲜安的一级质谱图中有 m/z 分别为 380、378、376、312、310、308 的 6 个峰,见图 2。以 m/z 376 为基准峰时, m/z 378 的丰度约为其 95 %, m/z 380 的丰度约为其 1/3, m/z 308 和 m/z 310 的丰度则是在其 1/3 ~ 1/4 之间。鉴于这 6 个峰的强度均比较高,因此本文在监控时同时选用。此外, m/z 378 比 m/z 376 具有更低的背景噪音和更高的信噪比,且无杂质峰干扰。在选定的色谱-质谱条件下,蘑菇样品中咪鲜安(m/z 378)的质量色谱图见图 3。由图 3 可知,被选择的离子在 4 ~ 5 min 之间出峰。结果表明:前处理的净化效果较好,定量离子选择正确,样品中杂质对咪鲜安的定量无干扰。

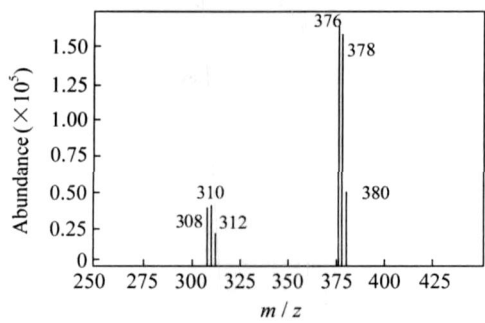


Fig. 2 Mass spectra of prochloraz

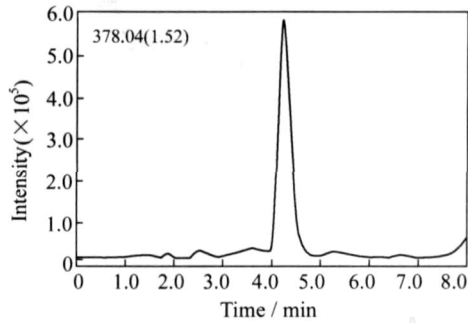


Fig. 3 Selected ion chromatogram of prochloraz

2.4 线性关系及检出限

精确称取适量咪鲜安标准品,以乙腈配制成浓度为 10 mg/L 的标准储备液,再依次将其稀释成 1 000、500、200、100、50、25、10、5 μg/L 的标准工作液。取以上标准系列溶液各 5 μL 进样分析,以标准液峰面积对质量浓度进行线性回归,得到其回归方程为 $Y = 304.6179 X + 204.8870$ (r^2 为 0.9998),咪鲜安浓度在 5 ~ 1 000 μg/L 的范围内呈良好的线性关系。其检出限($S/N > 10$)为 2.86 μg/L。

2.5 回收率与精密度

在蘑菇空白样品中添加咪鲜安标准溶液,分别设 50、200、800 μg/kg 3 个添加水平,平衡 30 min 后,分别按上述方法进行前处理和检测。检测结果列于表 1。咪鲜安的添加回收率为 95.00 % ~ 100.07 %,变异系数(CV)在 1.72 % ~ 8.71 %之间,可满足农药残留分析的要求。

Table 1 The recoveries and precision of the method

Added (μg/kg)		Found (μg/kg)			Recovery (%)	CV (%)
50.0	55.6	45.0	49.4	49.8	99.89	8.71
200.0	205.2	193.5	203.8	198.0	100.07	2.70
800.0	753.1	747.9	777.9	761.2	95.00	1.72

2.6 方法应用

将上述方法应用于 50 %咪鲜安锰盐可湿性粉剂在蘑菇上的残留试验。待试验用蘑菇长至钮扣大小时,以 50 %咪鲜安锰盐可湿性粉剂按 2.4 g/m² 的剂量兑水喷雾,施药后 2 h、1 d、3 d、5 d、7 d 和 14 d 取鲜蘑菇样 1 kg 切碎,打成匀浆后留取 250 g, - 20 冷冻保存备测。待样品采集后,依 1.3 方法处理,同时在样品分析中加入 50、200、800 μg/kg 3 个添加水平的质控样品。以取样时间(T/day)为横轴,样品中咪鲜安的残留量(μg/kg)为纵轴绘制咪鲜安在蘑菇中的消解曲线,见图 4。结果表明:经 50 %咪鲜安锰盐可湿性粉剂喷雾后,咪鲜安在蘑菇中的消解较快,半衰期约为 2 d。这一结果与期望值 2 ~ 4 d 相符。

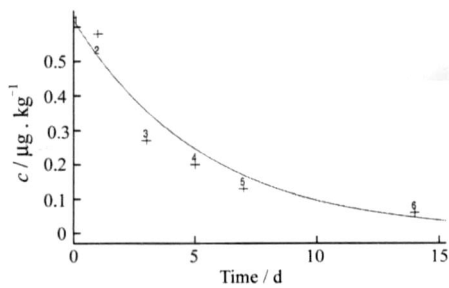


Fig. 4 The curve of residue dynamic of prochloraz in mushroom

3 结论

本文建立的 SPE-LC-ESI/MS 方法,对于蘑菇样品中咪鲜安的残留分析,是一种简便快捷、灵敏度高、线性范围宽,添加回收率以及精密度均满足农药残留分析的方法,将其应用于实际样品的分析也取得了比较理想的效果。在蘑菇样品不浓缩的情况下,可达到的检出限($S/N > 10$)为 2.86 μg/L,而且检出限还可以通过加大处理蘑菇的量以及减小最终定容体积继续降低。

参考文献:

[1] Copping L G,Birchmore R J,Wright K and Gpdson D H. Pestic Sci. [J],1984,15:280.

- [2] Hollrigl-Rosta Andreas ,Kreuzig Robert and Bahadir Mufit. Pestic Sci. [J] ,1999 ,55:531.
- [3] Michael Thurman E ,Ferrer Imma ,Zweigenbaum Jerry A ,et al. Journal of Chromatography A[J] ,2005 ,1082:1.
- [4] De Paoli M ,Taccheo Barbina M ,Damiano V ,Fabbro D ,Bruno R. Journal of Chromatography A[J] ,1997 ,765:127.
- [5] Lafuente M T ,Tadeo J L. Environ. Anal. Chem. [J] ,1985 ,22:99.
- [6] HAN Li-jun(韩丽君) ,QIAN Chuan-fan(钱传范) ,JIANG Cai-xin(江才鑫) ,WANG Wu-jie(王武杰). Chinese Journal of Pesticide Science(农药学学报)[J] ,2005 ,7(1):54.
- [7] LIU Xun-cai(柳训才) ,CHEN Pin(陈平) ,CHENG Yun-bin(程运斌) ,LI Sheng-qing(李胜清) ,CHEN Hao(陈浩) ,WU Mou-cheng(吴谋成). Chinese Journal of Crop Science(中国油料作物学报)[J] ,2006 ,28(3):354.

Analysis of Prochloraz Residue in Mushroom with Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry

LIU Xun-cai^{1,2} , CHEN Ping² , SHEN Jing² , CHENG Yun-bin² , CHEN Hao^{*1}

(1. College of Science , Huazhong Agriculture University , Wuhan 430070;

2. Testing Center , Hubei Academy of Agriculture Science , Wuhan 430064)

Abstract: In this paper , solid-phase extraction (SPE) combined with high performance liquid chromatography (LC)/ electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS) was used to detect the residue of prochloraz , an ergosterol biosynthesis inhibiting fungicide , in mushroom. Samples were extracted from mushroom with acetonitrile , then the extracts were salted out with NaCl and MgSO₄. Supernatant was concentrated with gas and cleaning-up with SPE. After filtrating with 0.45 μm millipore filter , the solution was detected by LC-MS. Optimized conditions involved separation on a ZORBAX Eclipse XDB-C18 column(150 ×2.1 mm ,3.5 μm) at 40 °C , acetonitrile and 0.1 % acetic acid (70 + 30 , V/V) at 0.2 mL/min as mobile phase. The analysis was performed in the selected ion monitoring(SIM) mode with *m/z* 380 , 378 , 376 , 312 , 310 and 308. The fortified recovery of prochloraz ranged from 95.0 % to 100.1 % , with coefficient of variance(CV) in the region of 1.72 % ~ 8.71 % . The limit of detection was 2.86 μg/L (S/N > 10) . The developed method is accurate and has been applied to the investigation of the degradation of prochloraz 50 % WP in mushroom with satisfactory results.

Keywords: Liquid chromatography / electrospray ionization mass spectrometry ; Prochloraz ; Mushroom ; Residue detection