

液相色谱-串联质谱法测定果蔬中 4 种新型卵菌纲杀菌剂残留

崔淑华^{1,2} 许美玲² 钱家亮² 段浩² 刘金峰² 林黎明³ 王开运^{*1}

¹(山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018) ²(临沂出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 临沂 276034)

³(山东省检验检疫局科学技术研究院, 青岛 266555)

摘要 建立了蔬菜和水果中噻唑菌胺、苯噻菌胺、氟啶酰菌胺和双炔酰菌胺 4 种新型卵菌纲杀菌剂的分散固相萃取-液相色谱-串联质谱检测方法。样品经乙腈均质提取,混合使用乙二胺-*N*-丙基硅烷(PSA)和 ODS C₁₈-N 两种基质分散净化剂净化,采用液相色谱-三重四级杆串联质谱(LC/MS/MS)检测。实验通过空白基质溶液稀释标准建立校正的标准曲线,以消除基质效应。结果表明,噻唑菌胺和氟啶酰菌胺在 1~100 μg/L,苯噻菌胺和双炔酰菌胺在 0.5~50 μg/L 线性范围内具有良好的线性关系,相关系数为 0.9994~0.9999;4 种卵菌纲杀菌剂添加回收率在 80.9%~101.3% 之间;相对标准偏差(RSD)均小于 6.3%。定量限在 0.53~1.3 μg/kg 之间,检出限为 0.16~0.40 μg/kg。

关键词 液相色谱串联质谱;果蔬;QuEChERS 方法;噻唑菌胺;苯噻菌胺;氟啶酰菌胺;双炔酰菌胺

1 引言

卵菌纲真菌是一种破坏性强、危害性大的植物病原菌,可引发瓜果腐烂病、马铃薯、番茄晚疫病、葡萄、瓜类霜霉病及十字花科白锈病等多种蔬菜和水果病害,对其产量和质量造成严重影响^[1]。甲霜灵、苯霜灵、乙磷铝、霜脲氰等杀菌剂是国内现在使用较多的卵菌纲病原菌杀菌剂,多年连续使用,产生的抗性已相当严重,应用受到了很大的限制。近几年,国外很多农药公司成功开发了一些酰胺类杀菌剂新品种,主要包括噻唑菌胺、苯噻菌胺、氟啶酰菌胺和双炔酰菌胺。这些新型杀菌剂均具有独特的作用方式,与甲霜灵及其它杀菌剂无交互抗性,而且具有很好的持效活性,安全性高,有良好的应用前景^[2~7]。

随着这些新型酰胺类杀菌剂的登记、推广和使用,作为我国蔬菜和水果主要出口市场的日本、美国和欧盟等国均对其制定了或拟制定残留限量标准。但上述 4 种新型杀菌剂残留分析方法的报道较少^[8~11]。本研究参照 QuEChERS 前处理的分散固相萃取技术^[12],同时采用 PSA 和 ODS C₁₈-N 的混合吸附剂对样品提取液进行净化,ODS C₁₈-N 弥补了 PSA 不吸附油脂、色素等弱极性杂质的缺点,使净化更为充分。将此前处理方法结合 HPLC/MS/MS 应用于蔬菜和水果中噻唑菌胺、苯噻菌胺、氟啶酰菌胺和双炔酰菌胺的同时定性确证和定量检测,取得了满意的结果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1200 快速液相色谱仪、6410 Triple Quad 质谱仪(美国 Agilent 公司);5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);ULTRA-TURRAX T-18 basic 型均质器、MS 3 基本型旋涡混合器(德国 IKA 公司);MilliQ 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

氟啶酰菌胺(纯度≥99.0%)、苯噻菌胺(100 mg/L)、双炔酰菌胺(100 mg/L)和噻唑菌胺(10 mg/L)标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司);乙腈(色谱纯,TEDIA 公司);甲酸(色谱纯,Riedel-de Haën 公司);HCl(优级纯,莱阳经济技术开发区精细化工厂);NaCl、无水 MgSO₄(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),用前在 450 °C 烘干 5 h,200 °C 时取出冷却备用;十八烷基键合相硅胶(ODS C₁₈-N)净化剂、乙二胺-*N*-丙基硅烷(PSA)净化剂(Agela Technologies 公司)。

2010-12-22 收稿;2011-05-04 接受

本文系国家质检公益性行业科研专项(No. 200910145-2)资助

* E-mail: kywang@sdau.edu.cn

2.2 样品处理

取试样可食用部分,粉碎并混合均匀,准确称取 10 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,准确加入 10 mL 乙腈溶液,3.0 g 无水 $MgSO_4$, 2.0 g NaCl,均质提取。以 5000 r/min 离心 5 min。吸取 2.0 mL 上层有机相转移至装有 100 mg ODS C_{18} -N、100 mg PSA 粉末的离心管中,涡旋 2 min,以 5000 r/min 离心 5 min。取 0.5 mL 上清液于进样小瓶中,然后准确加入 0.5 mL 0.1% 甲酸溶液,涡旋,溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后待测。取空白样品,按上述提取和净化过程进行处理,得到空白基质提取净化液。用此基质溶液和 0.1% 甲酸稀释标准中间液,配制成适当浓度的标准工作液。

2.3 色谱-质谱条件

Agilent ZORBAX SB- C_{18} 柱(100 mm \times 2.1 mm \times 1.8 μm); Agilent RRLC 在线过滤器(2.1 mm \times 0.2 μm); 流动相: A 液为乙腈溶液, B 液为 0.1% 甲酸溶液,以体积比 50: 50 等梯度洗脱; 柱温: 30 $^{\circ}C$; 进样量: 5 μL 。

ESI 源,正离子扫描; 雾化器压力: 275.8 kPa; 干燥气温度: 350 $^{\circ}C$; 干燥气流速: 9.0 mL/min; 毛细管电压: 3.5 kV; 多反应监测; 监测离子对、毛细管出口电压/碎裂电压和碰撞能量等质谱采集参数见表 1。

表 1 噻唑菌胺、苯噻菌胺、氟啶酰菌胺和双炔酰菌胺质谱采集参数

Table 1 Parametres for MS-MS detection of ethaboxam, benthiavalicarb-isopropyl, fluopicolide and mandipropamid

农药名称 Name of pesticide	保留时间 Retention time (min)	毛细管出口电压 V_{cap} fragmentor (V)	监测离子对 Fragment ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)
噻唑菌胺 Ethaboxam	1.83	140	321.1/183.0*	20
			321.1/200.0	22
苯噻菌胺 Benthiavalicarb-isopropyl	3.52	120	382.1/116.0*	17
			382.1/180.0	30
氟啶酰菌胺 Fluopicolide	5.30	100	383.1/173.0*	20
			384.9/173.0	20
双炔酰菌胺 Mandipropamid	5.92	110	412.1/328.0*	8
			412.1/125.0	35

*: 定量离子(Quantitative ion)。

3 结果与讨论

3.1 流动相的选择

研究发现,苯噻菌胺、氟啶酰菌胺和双炔酰菌胺在 SB- C_{18} 柱保留较强,以甲醇+0.1%甲酸、甲醇+5 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相,等度和梯度洗脱均不能实现上述 3 种化合物的分离,保留时间也较长。以乙腈+0.1%甲酸溶液为流动相,采用体积比 50: 50 等梯度洗脱时,可实现本研究中的 4 种酰胺类农药的快速分析,每种化合物色谱峰对称尖锐,分离效果较好。因此,选择使用乙腈+0.1%甲酸溶液作为流动相,体积比 50: 50 等梯度洗脱。

3.2 母离子和子离子的选择

采用 1 mg/L 待测化合物的标准溶液,分别以流动注射的方式进行母离子全扫描,确定每种农药的母离子质量数。采用 0.1 mg/L 待测化合物的标准溶液,分别对毛细管出口电压进行优化,从中选出丰度最高的毛细管出口电压作为最佳毛细管出口电压。然后分别对子离子及碰撞能力进行优化,从中选出丰度最高的碰撞能量作为最佳碰撞能量,选择两个丰度比较高的子离子作为定性和定量离子,建立多离子反应监测(MRM)模式,4 种卵菌纲杀菌剂的质谱采集参数见表 2(氟啶酰菌胺选择了 2 个母离子),多反应监测(MRM)色谱图见图 1。

3.3 样品基质效应的消除

ESI 源容易受样品基质的影响。样品基质对离子化有抑制作用,不同农药受同一样品基质影响不同,不同样品基质对同一农药离子化的抑制情况也存在差异。噻唑菌胺和苯噻菌胺的离子化效率受样品基质影响较小; 氟啶酰菌胺和双炔酰菌胺离子化效率受样品基质抑制较强。草莓和葡萄对农药离子化影响较弱,黄瓜和大葱对农药离子化影响较强。为消除样品基质效应,以空白样品提取液为标准溶液的稀释溶液,可使标样和样品溶液具有同样的离子化条件,从而消除样品基质效应。

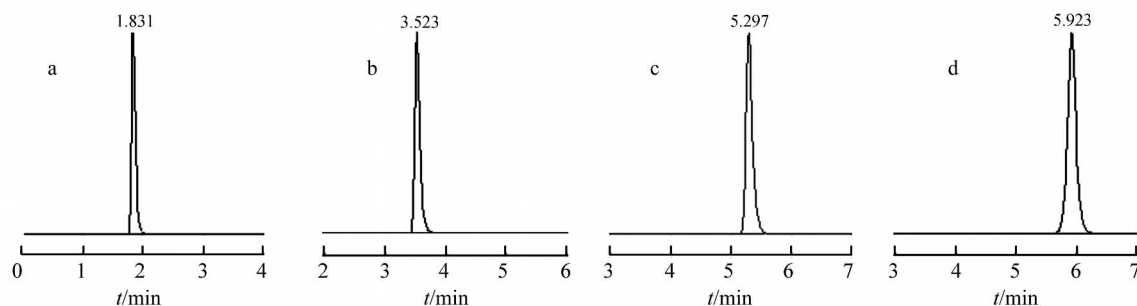


图 1 4 种卵菌纲杀菌剂多反应监测(MRM) 色谱图

Fig. 1 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of 4 bactericides used for control of oomycete diseases

a. 噻唑菌胺(Ethaboxam); b. 苯噻菌胺(Benthiaivalicarb); c. 双炔酰菌胺(Mandipropamid); d. 氟啶酰菌胺(Fluopicolide)。

3.4 提取条件的选择

选择提取剂的实验发现,以乙酸乙酯提取,会提取出更多的色素,对化合物离子化抑制更强;以乙腈提取,再利用盐析效应去除水分,无需加入大量无水 $MgSO_4$,因此选择使用乙腈作为提取剂。

本研究比较了使用 10 mL 乙腈对 10 g 样品进行均质提取时,分别加入不同量的无水 $MgSO_4$ 、NaCl,无水 $MgSO_4$ + NaCl 对乙腈提取剂体积的影响。实验表明,分别加入 3、5 和 7 g NaCl 均质提取时,乙腈提取液体积均接近 7.0 mL。分别加入 3 和 5 g 无水 $MgSO_4$ 提取时,乙腈提取液体积约为 10 mL。加入 5 g 无水 $MgSO_4$ + 2 g NaCl、3 g 无水 $MgSO_4$ + 2 g NaCl 均质提取时,乙腈提取液体积为 8.0 mL。加入 NaCl 均质提取的样品液中不含有水分;而仅加入无水 NaCl 提取时,提取液中含有一定量的水。考虑到无水 NaCl 的去水放热反应可以加速相之间的分离^[13,14]。确定乙腈均质提取时加入 3 g 无水 $MgSO_4$ + 2 g NaCl。

研究表明,10 和 20 mL 乙腈对 4 种卵菌纲杀菌剂的提取回收率无任何差异。但使用乙腈-0.1% 甲酸,即采用流动相定容时,色谱峰峰型更尖锐对称。因此确定使用 10 mL 乙腈提取样品残留的农药,净化后,取 0.5 mL 提取净化液,加入 0.5 mL 0.1% 甲酸溶液定容后上机测定。

3.5 净化条件的选择

基质分散净化常用的净化剂有乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)粉、十八烷基键合相硅胶(ODS C_{18} -N)粉、石墨炭黑(CARB)粉和氨基(NH_2)粉。PSA 去除脂肪酸效果较好,在去除色素、甾醇和维生素方面效果一般,而 ODS C_{18} -N 和石墨炭黑除维生素、色素、甾醇的能力较好;氨基粉与 PSA 粉净化范围一致,但离子交换能力较 PSA 弱。

上述净化剂在去除杂质的同时也可能对目标化合物产生吸附,4 种卵菌纲杀菌剂混和标准溶液分别经 4 种吸附剂处理后的回收率见表 2。

表 2 4 种卵菌纲杀菌剂混合标准溶液经吸附剂处理后的回收率

Table 2 Recoveries of 4 bactericides used for control of oomycete diseases residues after adsorbed by ODS C_{18} -N, PSA, NH_2 and CARB, respectively

农药 Pesticide	吸附剂处理后的回收率 Recoveries of pesticide after adsorbed(%)			
	十八烷基键合相硅胶 ODS C_{18} -N	乙二胺-N-丙基硅烷 PSA	氨基 NH_2	石墨炭黑 CARB
噻唑菌胺 Ethaboxam	101.2	94.7	98.0	76.0
苯噻菌胺 Benthiaivalicarb-isopropyl	100.5	101.0	100.2	80.8
氟啶酰菌胺 Fluopicolide	99.2	99.8	101.1	89.4
双炔酰菌胺 Mandipropamid	100.9	100.9	101.7	69.5

PSA: Primary secondary amine; CARB: Graphitized carbon black.

从表 2 可见,ODS C_{18} -N 粉、PSA 粉、 NH_2 粉对 4 种农药几乎无吸附。CARB 粉对 4 种农药均有一定程度的吸附作用。综合净化剂去杂特性和对目标化合物的吸附情况,选择 100 mg ODS C_{18} -N 粉和 100 mg PSA 粉对其进行净化。

3.6 方法的线性范围和检出限

将空白样品按上述提取和净化过程进行处理,得到空白基质提取净化液。用此基质溶液和 0.1% 甲酸将标准液稀释成浓度为 1 ~ 100 μg/L 和 0.5 ~ 50 μg/L 的系列标准工作液,LC/MS/MS 进样分析后,计算得到标准曲线及相关参数见表 3。

以空白样品基质稀释标准曲线上的最低浓度出峰时,取信噪比 $S/N = 3$ 和样品处理过程的稀释倍数计算得出方法检出限(LOD)。以空白样品基质稀释标准曲线上的最低浓度出峰时,取信噪比 $S/N = 10$ 和样品处理过程的稀释倍数计算得出定量限(LOQ)。4 种卵菌纲杀菌剂在黄瓜基质中的方法检出限见表 3。

表 3 4 种酰胺类农药在黄瓜基质中的方法检出限

Table 3 LOD of 4 bactericides used for control of oomycete diseases residues in cucumber

农药 Pesticides	回归方程 Calibration equation	相关系数 Correlation coefficient (r^2)	线性范围 Linearity range (μg/L)	检出限 LOD (μg/kg)
噻唑菌胺 Ethaboxam	$y = 1308.14x - 16.18$	0.9999	1 ~ 100	0.37
氟啶酰菌胺 Fluopicolide	$y = 1263.74x - 218.03$	0.9997	1 ~ 100	0.40
双炔酰菌胺 Mandipropamid	$y = 1987.60x - 496.50$	0.9994	0.5 ~ 50	0.17
苯噻菌胺 Benthiavalicarb-isopropyl	$y = 2516.40x - 184.41$	0.9998	0.5 ~ 50	0.16

3.7 方法的回收率和精密度

在阴性草莓、黄瓜、大葱和葡萄样品中添加 3 个浓度水平的混合标准液,按上述前处理方法进行处理,做回收实验,每个水平重复 6 次,精密度结果见表 4。4 种卵菌纲杀菌剂在黄瓜、草莓、大葱和葡萄中添加回收率在 80.9% ~ 101.3% 之间,相对标准偏差(RSD)均小于 6.3%。

表 4 样品中 4 种卵菌纲杀菌剂残留量回收率和精密度实验结果

Table 4 Mean recoveries and precisions of 4 bactericides used for control of oomycete diseases residues in sample at 3 different levels

样品 Sample	农药 Pesticide	添加量 Fortified level (μg/kg)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准 偏差 RSD (% $n = 6$)	样品 Sample	农药 Pesticide	添加量 Fortified level (μg/kg)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准 偏差 RSD (% $n = 6$)
草莓 Strawberry	噻唑菌胺 Ethaboxam	5	88.3	4.4	黄瓜 Cucumber	噻唑菌胺 Ethaboxam	5	86.2	6.2
		10	92.0	4.9			10	89.2	5.5
		50	96.2	2.1			50	94.0	3.2
	苯噻菌胺 Benthiavalicarb- isopropyl	2.5	98.4	4.7		苯噻菌胺 Benthiavalicarb- isopropyl	2.5	99.6	4.1
		5	97.2	4.0			5	94.6	3.6
		25	95.9	5.9			25	101.3	3.4
	氟啶酰菌胺 Fluopicolide	5	89.8	4.3		氟啶酰菌胺 Fluopicolide	5	91.6	3.9
		10	86.4	4.1			10	96.4	2.9
		50	91.2	3.0			50	93.5	4.1
	双炔酰菌胺 Mandipropamid	2.5	90.8	4.6		双炔酰菌胺 Mandipropamid	2.5	98.4	4.1
		5	100.8	3.7			5	93.2	3.2
		25	97.4	3.9			25	99.9	5.4
噻唑菌胺 Ethaboxam	5	87.5	3.5	噻唑菌胺 Ethaboxam	5	87.2	2.8		
	10	81.8	3.7		10	80.9	3.3		
	50	86.7	3.0		50	83.4	3.7		
苯噻菌胺 Benthiavalicarb- isopropyl	2.5	87.6	4.7	苯噻菌胺 Benthiavalicarb- isopropyl	2.5	93.6	3.2		
	5	90.6	4.0		5	96.6	3.6		
	25	84.8	5.9		25	90.4	2.5		
大葱 Scallion	氟啶酰菌胺 Fluopicolide	5	82.6	4.6	氟啶酰菌胺 Fluopicolide	5	91.6	5.1	
		10	85.1	3.8		10	90.5	2.7	
		50	84.8	2.6		50	88.7	3.1	
双炔酰菌胺 Mandipropamid	2.5	95.6	6.3	双炔酰菌胺 Mandipropamid	2.5	94.8	3.3		
	5	96.6	4.9		5	96.6	4.9		
	25	98.5	3.0		25	97.6	2.9		

3.8 实际样品检测

采用本方法对购自当地超市的黄瓜、番茄、葡萄样品和日常检测的大葱及草莓样品进行测定,共检

测样品 30 批 其中黄瓜阳性样品 2 批 ,分别为 19.9 和 13.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

References

- 1 LIU Chang-Ling(刘长令). *Pesticides*(农药), **2000**, 39(8): 1~3
- 2 ZHU Wei-Qing(朱伟清). *World Pesticides*(世界农药), **2003**, 25(3): 45~47
- 3 FENG Hua-Cheng(冯化成). *World Pesticides*(世界农药), **2008**, 30(3): 51~52
- 4 CHEN Qi-Hui(陈启辉). *Pesticides*(农药), **2004**, 43(11): 515~517
- 5 LIU Li-Li, ZHANG Li-Juan, JIANG Xuan-Li, WANG Hong-Mei, LI Hong-Mei(刘利利,张丽娟,蒋选利,王宏梅,李红玫). *Journal of Mountain Agriculture and Biology*(山地农业生物学报), **2009**, 28(2): 185~188
- 6 LI Miao, LI Yang, YANG Hao, LIU Chang-Ling(李淼,李洋,杨浩,刘长令). *Agrochemicals*(农药), **2006**, 45(8): 556~558
- 7 CHI Hui-Wei, DIAO Jie, NIE Kai-Sheng, LIU Chang-Ling(迟会伟,刁杰,聂开晟,刘长令). *Agrochemicals*(农药), **2007**, 46(1): 52~54
- 8 Kaushik B, Dasharath P O, Shubhangi B P, Manjusha R J, Soma D, Sangram H P, Sunita B, Pandurang G A. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57(10): 4068-4078
- 9 Soma D, Kaushik B, Kondiba N D, Pandurang G A. *J. AOAC Int.*, **2011**, 94(1): 273~285
- 10 González-Rodríguez R M, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. *Food Chem.*, **2011**, 125(2): 549~560
- 11 Soudamini M, Ahuja A K, Deepa M, Jagdish G K, Rashmi N, Sampath K, Prakash G S. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2011**, 86(2): 238~241
- 12 Anastassiades M, Lehotay S J, Štajnbaher D, Schenck F J. *J. AOAC Int.*, **2003**, 86(2): 1~8
- 13 ZHAO Xiang-Mei, DONG Ying, WANG He-Sheng(赵祥梅,董英,王和生). *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*(中国卫生检验杂志), **2008**, 18(5): 952~954
- 14 Rosa M G R, Raquel R O, Beatriz C G, Jesús S G. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1196-1197: 100~109

Determination of New Type of 4 Bactericides Used for Control of Oomycete Diseases Residues in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

CUI Shu-Hua^{1,2}, XU Mei-Ling², QIAN Jia-Liang², DUAN Hao²,
LIU Jing-Feng², LIN Li-Ming³, WANG Kai-Yun^{*1}

¹(College of Plant Protection, Shandong Agriculture University, Taian 271018)

²(Inspection and Quarantine Technology Center of Linyi Exit/Entry Inspection and Quarantine Bureau, Linyi 276034)

³(Shandong Inspection Quarantine and Science Technology Academy, Qingdao 266002)

Abstract A method was developed for the determination of ethaboxam, benthivalicarb-isopropyl, fluopicolide and mandipropamid in fruits and vegetables. The analytes were extracted from the samples by acetonitrile, and purified by dispersion solid phase extraction using ODS C₁₈-N and PSA as solidphase, and then analyzed by LC/MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM). The interference of matrix was reduced by the matrix-matched calibration standards curve. The linear range was from 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ to 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ for ethaboxam, fluopicolide, from 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ to 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ for benthivalicarb-isopropyl, mandipropamid ($r \geq 0.9994$). The fortified recoveries were from 80.9% to 101.3% with relative standard deviations (RSD) less than 6.3%. The limits of quantification were 0.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limit of detection were 0.16 to 0.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Keywords Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Fruits and vegetables; Ethaboxam; Fluopicolide; Benthivalicarb-isopropyl; Mandipropamid

(Received 22 December 2010; accepted 4 May 2011)