

【化学测定方法】

高效液相色谱 - 串联质谱法测定植物源性食品中 4 种噻唑类杀菌剂

陈波, 谢丽琪, 郭艳峰, 靳保辉

(深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 广东深圳 518067)

[摘要] 目的: 建立一种应用高效液相色谱 - 串联质谱(HPLC - MS/MS)同时测定植物源性食品中 4 种噻唑类杀菌剂的新检测方法。方法: 采用乙腈提取试样中的噻唑类杀菌剂残留, 提取液经浓缩, Sep - pack Vac 复合固相萃取小柱净化, 用 HPLC - MS/MS 进行定量分析。结果: 4 种噻唑类杀菌剂得到良好分离, 方法的线性范围为 20 $\mu\text{g/L}$ ~ 100 $\mu\text{g/L}$, 检出限均为 10 $\mu\text{g/kg}$, 回收率为 64% ~ 115%, 相对标准偏差(RSD)为 2.8% ~ 12.5%。结论: 实验结果表明, 该方法简便、快速、灵敏、准确, 各项技术指标满足检测植物源性食品中 4 种噻唑类杀菌剂的监测需求。

[关键词] 液质联用; 噻唑类杀菌剂; 残留; 固相萃取

[中图分类号] O657.63

[文献标识码] A

[文章编号] 1004 - 8685(2011)10 - 2418 - 03

Determination of thiazole fungicide residues in plant - based foods by HPLC - MS/MS

CHEN Bo, XIE Li - qi, Guo Yan - feng, JIN Bao - hui

(Food Inspection Center of Shenzhen Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518067, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of four thiazole fungicides in food of plant origin by HPLC - MS/MS. **Methods:** The thiazole fungicide residues in samples were extracted by acetonitrile. After concentration, the extract was cleaned up by passing through a Sep - pack Vac SPE cartridge, and then analysed by HPLC - MS/MS. **Results:** Four thiazole fungicides were well separated. The linear range of the calibration curve was 20 $\mu\text{g/L}$ ~ 100 $\mu\text{g/L}$, the detection limits of 4 thiazole fungicides were 10 $\mu\text{g/kg}$, the recovery range was 64% ~ 115%, and the RSD range was 2.8% ~ 12.5%. **Conclusion:** The method is simple, rapid, sensitive and accurate. The technical specifications are suitable for the detection of four thiazole fungicides in food of plant origin.

[Key words] HPLC - MS/MS; Thiazole fungicide; Residue; Solid phase extraction

噻唑类杀菌剂(thiazole fungicide)是一类含有噻唑杂环结构的农药,包括噻唑菌胺(ethaboxam)、土菌灵(etridiazole)、辛噻酮(octhilinone)及苯噻硫氰(benthiazole)等。噻唑菌胺的防治对象是由卵菌纲病原菌引起的各类病害^[1]。苯噻硫氰是一种广谱的种子保护剂,对由土壤和种子传播的真菌或细菌性病害具有显著防效^[2]。土菌灵是一种用于土壤处理的有机杀菌剂,对病原真菌、细菌、病毒及类菌体都有良好的杀灭效果^[3]。杀菌剂的使用虽能给农业生产带来方便,但若使用不当,会在植物源性食品中残留,对人体造成危害。因此,世界各国对噻唑类杀菌剂的残留量都十分重视,分别制定了各自的残留限量标准。如日本规定谷物、蔬菜中苯噻硫氰的最大残留限量为 0.1 mg/kg;美国规定谷物中苯噻硫氰的最大残留限量为 0.1 mg/kg,葡萄中噻唑菌胺的最大残留限量为 6 mg/kg。因此,建立此类农药的高通量快速检测方法十分有必要。

目前国内外对噻唑类杀菌剂测定的文献报道不多,吴爱娟等采用气相色谱测定土菌灵^[3]; Yi He 等连续流微萃取与液相色谱结合应用于水中包括土菌灵在内的 5 种农药的测

定^[4]; Heinz Singer 等将在线固相萃取与液质联用技术相结合应用于水中辛噻酮的测定^[5]; Byoung - Hyoun Kim 等采用液相色谱测定土壤及农作物中的噻唑菌胺杀菌剂^[6]。此外,现存有多部标准检测方法有针对苯噻硫氰或土菌灵^[7-9]。现有噻唑类杀菌剂检测方法主要使用液相色谱、气质联用和液质联用等技术,均为目前农残领域常用的分析设备。然而,目前国内外均未见有报道将液质联用应用于多种噻唑类杀菌剂的研究报道,本文使用液相色谱 - 质谱联用技术同时快速检测植物源性食品中 4 种噻唑类杀菌剂。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

API4000 液质联用仪(AB Sciex 质谱系统公司)配 ESI 离子源; Agilent 1200 型高效液相色谱仪(配 Agilent 色谱工作站、真空脱气机、自动进样器、二元泵); Millipore 纯水处理系统(Bedford 公司);离心机;旋涡混合器;氮吹浓缩仪;固相萃取装置;均质器;旋转蒸发器。乙腈、甲醇、甲酸、甲苯,色谱纯;氯化钠(分析纯); Sep - pack Vac 复合固相萃取小柱: 6 ml。噻唑类杀菌剂标准品(Sigma 公司): 土菌灵、辛噻酮和苯噻硫氰纯度均大于 99%; 噻唑菌胺为液体标准,浓度为 10 mg/L。

[作者简介] 陈波(1981 -)男,硕士,工程师,主要从事食品安全检测工作。

1.2 标准溶液的配制

准确称取适量的土菌灵、辛噻酮和苯噻硫氰, 分别用乙腈溶解并定容至容量瓶中, 浓度为 500 mg/L。取适量以上单标与适量噻唑菌胺混合, 用乙腈配制成 5 mg/L 混标, 于 -18℃ 冰箱保存。标准工作溶液由基质空白于使用前配制。

1.3 液相色谱与质谱条件

色谱柱: CAPCELL PAK C18 MG II (100 × 2.0 mm (i. d.), 3 μm); 柱温: 30℃; 流速: 0.30 ml/min; 进样量: 20 μl; 梯度洗脱: A 为 5 mM 乙酸铵 (含 0.5% 甲酸); B 甲醇 (含 1% 甲酸), 梯度洗脱条件为: 0 min ~ 3.0 min 60% B; 3.0 min ~ 5.0 min, 60% B ~ 95% B; 5.0 min ~ 9.0 min 95% B; 9.0 min ~ 9.1 min, 95% B ~ 60% B; 9.1 min ~ 17.0 min 60% B。

离子化模式: ESI +; 毛细管电压: 5.5 kV; 源温度: 60℃; GS1: 40 psi; GS2: 70 psi;

监测方式: 多反应监测 (MRM), 设定条件见表 1。

表 1 噻唑类杀菌剂质谱分析主要质谱参数

保留时间 t/min	化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 ms	碰撞电压 eV	去簇电压 eV	射入电压 eV	碰撞室射出 电压 eV
2.9	噻唑菌胺	322.1	183.1*	100	30	60	14	10
		200.2	100	30	60	14	10	
5.5	苯噻硫氰	239.1	180.0*	100	9	20	10	10
		212.0	100	11	20	10	10	
7.9	辛噻酮	214.1	71.1*	100	15	60	10	9
		101.9	100	10	60	10	15	
8.3	土菌灵	246.9	218.9*	100	16	30	10	10
		183.0	100	26	30	10	10	

注: * 为定量离子

1.4 样品处理方法

1.4.1 试样制备 取样品约 500 g, 经充分粉碎混匀。试样均

分为二份, 装入洁净容器, 密封, 并标明标记。茶叶和小麦样品常温下保存。水果蔬菜样品于 -18℃ 以下冷冻存放。

1.4.2 提取 称取干基质样品约 1 g ~ 5 g (精确至 0.01 g) 于 50 ml 具塞离心管中, 加入 5 ml 水, 充分浸润, 再加入 15 ml 乙腈溶液高速均质提取 3 min, 于 5000 r/min 离心 5 min, 将乙腈层转移至另一 50 ml 具塞离心管。残渣再用 10 ml 乙腈溶液重复提取一次, 合并提取液, 加入 2 g 氯化钠, 混匀后离心。将上清液转移入 100 ml 鸡心瓶中, 40℃ 旋转蒸发至约 2 ml, 待净化。称取蔬菜、水果样品约 2 g ~ 10 g (精确至 0.01 g) 于 50 ml 具塞离心管中, 加入 20 ml 乙腈, 涡旋混匀后, 振荡提取 10 min, 于 5000 r/min 离心 5 min, 加入 3 g 氯化钠, 涡旋混匀后离心。转移乙腈层 10 ml 至 15 ml 离心管, 45℃ 吹氮至约 2 ml, 待净化。

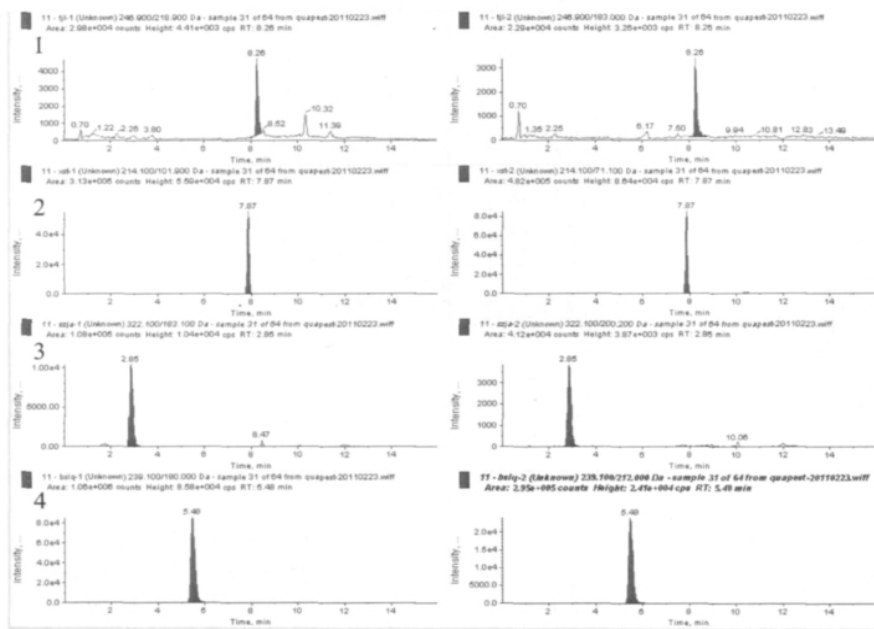
1.4.3 净化 将 2 ml 提取液转入 Sep-packVac 复合固相萃取小柱, 以约 1.5 ml/min 的流速使样液全部通过固相萃取柱, 再用 5 ml 乙腈-甲苯溶液 (3 + 1, V/V) 淋洗并抽干固相萃取柱, 收集全部流出液于 100 ml 鸡心瓶中, 40℃ 旋转蒸发至干, 用 2 ml 乙腈 + 水溶液 (3 + 2, V/V) 溶解, 过 0.22 μm 微孔滤膜供 HPLC-MS/MS 测定, 必要时可稀释进样。

2 结果与讨论

2.1 仪器条件的优化

对比了甲醇 + 0.05% 甲酸 - 5 mmol/L 乙酸铵 - 水溶液、0.1% 甲酸甲醇 + 0.05% 甲酸 - 5 mmol/L 乙酸铵 - 水溶液、乙腈 + 0.05% 甲酸 - 5 mmol/L 乙酸铵 - 水溶液做流动相的色谱效果。实验表明 0.1% 甲酸甲醇 + 0.05% 甲酸 - 5 mmol/L 乙酸铵 - 水溶液做为流动相并采用梯度洗脱时 4 种噻唑类杀菌剂的分离度和灵敏度较高。

在优化仪器条件下杀菌剂混合标准的多反应监测色谱图见图 1。



1. 土菌灵; 2. 辛噻酮; 3. 噻唑菌胺; 4. 苯噻硫氰
图 1 4 种噻唑类杀菌剂标准多反应监测色谱图

2.2 精密度、回收率及检测限

选择小麦、葡萄、西瓜、菜心、茶叶和洋葱等 6 种基质,采用标准添加 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5.0 mg/kg 和 10.0 mg/kg 3 个水平的噻唑类杀菌剂混合标准溶液,每加标水平测定 6 次,回收率在 64%~115% 之间,方法的相对标准偏差小于 12.5%。在本实验条件下,取一系列标准溶液(0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{L}$),以峰面积对相应的噻唑类杀菌剂的质量浓度作图,结果表明 4 种噻唑类杀菌剂质量浓度与对应的峰面积呈良好的线性关系(见表 2)。本文所定的检测限为通过加标验证实验的最低点确定,在该检测限条件下本方法已能满足对国内外法规对噻唑类杀菌剂检测灵敏度需求。

表 2 4 种噻唑类杀菌剂线性范围、相关系数和检测限

化合物	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{l}$)	相关系数 (r)	检测限($\mu\text{g}/\text{kg}$)
噻唑菌胺	20~100.0	>0.995	10
苯噻硫氰	20~100.0	>0.995	10
辛噻酮	20~100.0	>0.995	10
土菌灵	20~100.0	>0.995	10

3 小结

本文采用液质联用测定植物源性食品中噻唑菌胺、土菌灵、辛噻酮及苯噻硫氰,通过验证实验表明,该方法具有简便、快速、灵敏、回收率高等特点,能够满足我国对该类杀菌剂的监管检测需求。

[参考文献]

- [1] 夏禹. 噻唑菌胺的合成及对卵菌病原菌的杀菌活性[J]. 世界农药, 2005, 27(3): 13-21.
- [2] 李付刚, 白雪松. 苯噻硫氰[J]. 精细与专用化学品, 2007, 15(17): 9-10.
- [3] 吴爱娟, 李碧澄. 35% 土菌灵可湿性粉剂的气相色谱分析[J]. 世界农药, 2011, 33(1): 43-44.
- [4] Yi He, Hian Kee Lee. Continuous flow microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of pesticides in natural waters[J]. J. Chromatogr A, 2006, 1112(1-2): 7-12.
- [5] Heinz Singer, Sylvia Jaus, Irene Hanke, et al. Determination of bio-cides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water[J]. Environ Pollut, 2010, 158(10): 3054-3064.
- [6] Byoung-Hyoun Kim; Jong Hoa Ok. Liquid Chromatographic Determination of Novel Aminithiazolecarboxamide Fungicide Residues in Soil and Crops Using Online Solid-Phase Extraction[J]. J Chromatogr Sci, 2004, 42(7): 366-370.
- [7] GB/T 19426-2006. 蜂蜜、果汁和果酒中 497 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法[S].
- [8] GB/T 19648-2006. 水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留的测定 气相色谱-质谱法[S].
- [9] JAP-178, GC/MS. 农药等同时检测方法(农产品)[S].

(收稿日期: 2011-07-04)

(上接第 2417 页)

表 3 番茄中添加 10 种农残回收率结果 ($n=6$)

名称	加标 0.05 mg/kg		加标 0.25 mg/kg		加标 0.5 mg/kg	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
1. 氟乐灵	111.20	7.35	108.89	8.79	91.67	10.35
2. 乙草胺	101.67	6.91	104.40	9.36	97.85	3.79
3. 异丙甲草胺	91.27	5.72	109.16	8.47	96.04	8.49
4. 二甲戊灵	104.81	10.01	101.68	9.83	99.61	11.31
5. 反式氯丹	106.67	7.66	102.00	5.90	88.83	4.85
6. 乙氧氟草醚	106.75	6.53	95.62	4.86	88.83	9.92
7. 氟硅唑	118.33	10.97	111.04	6.17	98.10	3.17
8. 戊唑醇	79.77	11.01	109.12	6.02	100.77	10.05
9. 咪唑菌酮	109.31	6.91	113.33	4.09	102.84	4.07
10. 啞螨灵	111.67	11.35	108.89	8.42	95.50	8.60

3 结论

本文建立的固相萃取—气相质谱联用法快速测定果蔬中 10 种农残的方法,对标准 GB/T 19648-2006 净化步骤进行改进,采用活性炭-氨基混合柱净化,减少了原方法净化柱的使用数量、洗脱溶剂用量和净化用时。应用较简单的色谱分

析条件对 10 种农残进行分析,有效地缩短了样品检测时间。实验结果表明,该方法快速、可操作性强、定量准确,适用于水果和蔬菜中多农残的分析,在蔬菜水果实际检测中应用良好。

[参考文献]

- [1] 洪萍, 徐陆妹, 楼冰冰, 等. QuEChERS 方法及其在农药残留分析中的应用进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(4): 756-758.
- [2] NY/T761-2008. 蔬菜水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定[S].
- [3] 苗水, 王柯, 季申, 等. 新型混合型固相萃取小柱气相色谱-质谱法测定蔬菜水果中 92 种农药残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(12): 3106-3114.
- [4] NY/T 1380-2007. 蔬菜水果中 51 种农药多残留的测定气相色谱-质谱法[S].
- [5] GB/T 19648-2006. 水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留量的测定[S].
- [6] 李锋格, 全晓盾, 龚辉, 等. 气相色谱-质谱法测定番茄酱中甲霜灵、苯霜灵、恶霜灵的残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 388-398.
- [7] 全自动固相萃取/气相色谱质谱法快速测定蔬果中农药残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(4): 810-811.

(收稿日期: 2011-06-17)