

荔枝中抑霉唑和嘧霉胺残留量的超高效液相色谱 – 串联质谱法同时测定

王玉健, 黄惠玲, 汪春光, 蔡伟凯, 刘红专, 卓海华

(海南出入境检验检疫局技术中心, 海南 海口 570311)

摘要: 建立了超高效液相色谱 – 串联质谱法同时测定荔枝中抑霉唑和嘧霉胺的方法, 对提取试剂、流动相、质谱条件进行了研究, 并对抑霉唑和嘧霉胺可能的断裂机理进行了推测。待测样品直接用乙腈提取, 采用电喷雾离子源 (ESI)、多反应监测正离子模式扫描, 外标法定量。抑霉唑、嘧霉胺的质量浓度在 1.00~20.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内与峰面积呈良好线性, 方法的检出限为 0.005 mg/kg 添加水平为 0.005、0.010、0.020 mg/kg 时抑霉唑和嘧霉胺的平均回收率分别为 91%~96% 和 83%~90%, 相对标准偏差分别为 6.5%~8.4% 和 9.5%~11.1%。该方法快速、简便、准确, 可用于荔枝中抑霉唑和嘧霉胺残留量的定性与定量检测。

关键词: 抑霉唑; 嘧霉胺; 荔枝; 超高效液相色谱 – 串联质谱

中图分类号: O657.63 S767.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)10-1068-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.10.015

Simultaneous Determination of Residues of Imazalil and Pyrimethanil in Litchi by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

WANG Yu-jian HUANG Hui-ling WANG Chun-guang

CAI Wei-kai LIU Hong-zhuan ZHUO Hai-hua

(Technology Center of Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou 570311, China)

Abstract An ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method was established for the simultaneous determination of residues of imazalil and pyrimethanil in litchi sample. The effects of extraction condition, flow phase and tandem mass spectrometric parameters were investigated. The possible fragmentation mechanisms of imazalil and pyrimethanil were discussed. The sample was extracted with acetonitrile. The analysis on analytes was carried out under the multiple reaction monitoring (MRM) mode by employing the external method. The calibration curves of imazalil and pyrimethanil were linear in the range of 1.00-20.0 $\mu\text{g/L}$. The limits of detection (LOD) were both 0.005 mg/kg . The average recoveries of imazalil and pyrimethanil at spiked levels of 0.005, 0.010, 0.020 mg/kg were in the range of 91%~96% and 83%~90%, respectively, and their relative standard deviations (RSDs) were 6.5%~8.4% and 9.5%~11.1%, respectively. The method was fast, convenient, accurate, and could be used as a reliable means for the simultaneous quantitative determination of residues of imazalil and pyrimethanil in litchi sample.

Key words imazalil; pyrimethanil; litchi; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

抑霉唑 [1-(2-(2,4-二氯苯基)-2-(2-烯丙氧基)乙基)-1H-咪唑] 是内吸杀菌剂^[1], 嘧霉胺 [N-(4,6-二甲基嘧啶-2-基)苯胺] 是近年来开发的一种结构新颖、作用机制独特的嘧啶胺类内吸性杀菌剂 (其结构式见图 1)^[2]。二者为常用的广谱高效杀菌剂, 具有强效的抑霉作用, 被广泛用于采收后的各种水果和蔬菜, 以防止果蔬在运输和贮存过程中腐烂变质, 起到防腐保鲜的作用。它们对果蔬中常见的青霉病、绿霉病等有很好的防治作用^[3]。

目前报道的对于抑霉唑、嘧霉胺的检测方法有高效液相色谱法^[1,4-9]、气相色谱法^[2-3,10-16]、气相色谱 – 质谱联用法^[17-20]等, 但这些方法存在前处理步骤繁琐、检测周期长等不足。同时测定抑霉唑和

收稿日期: 2010-06-05 修回日期: 2010-07-30

第一作者: 王玉健 (1979-), 女, 湖北丹江口人, 工程师, 博士, Tel: 0898-68626212, E-mail: wyj_succes@sohu.com

嘧霉胺的报道较少，且均采用气相色谱法^[3 10 13]，尚无超高效液相色谱 – 串联质谱法同时测定抑霉唑和嘧霉胺残留量的报道。本文采用超高效液相色谱 – 串联质谱仪，建立了同时定性、定量测定荔枝中抑霉唑和嘧霉胺残留量的方法，方法前处理简单、快速，适用性强。

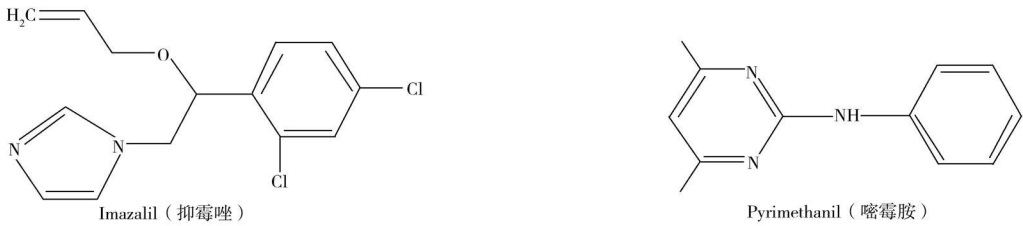


图 1 抑霉唑和嘧霉胺的分子结构式
Fig. 1 Molecular structure of imazalil and pyrimethanil

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200超高效液相色谱仪(美国 Agilent公司)，API 4000Q 四极杆质谱仪(美国 ABI公司)，配有电喷雾离子源；Harvard II 针泵(美国 Varian公司)；MS3 Basic旋涡混匀器(广州 KA 公司)；Centrifuge 5810R 离心机(Eppendorf公司)；G-285电子天平(Mettler公司)；氮吹仪(美国 Caliper公司)。

乙腈、乙酸铵(色谱纯，美国 Ted ia公司)，抑霉唑(纯度 98%)、嘧霉胺(纯度 98.9%)购自德国 Dr Ehrenstorfer公司；其余试剂均为分析纯。标准溶液：用乙腈配制成 100 mg/L的标准储备液，- 18 ℃避光保存。

1.2 样品处理

样品经四分法选取一定量的样本，取可食部分，经粉碎或组织捣碎机匀浆。称取待测样品 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL具塞离心管中，加 10 mL乙腈，涡旋振荡 2 min，加入 4 g无水硫酸镁和 10 g氯化钠，涡旋混合 1 min，以 4 000 r/min离心 5 min，取上清液 0.5 mL于玻璃离心管中，加入 50 mg PSA 吸附剂，混合 30 s后离心 5 min，取上清液，加入 0.5 mL水，涡旋混匀后过 0.2 μm 有机滤膜，待测。

1.3 色谱条件

色谱条件：色谱柱为 Shiseido C₁₈ MG II (100 mm × 2.0 mm i.d., 3.0 μm)；流动相：A 为乙腈，B 为 0.005 mol/L乙酸铵溶液。梯度洗脱程序：0~ 8.0 min 10%~ 90% A；8.0~ 10.0 min 90% A；10.0~ 10.1 min 90%~ 10% A；10.1~ 15.0 min 10% A。流速 0.30 mL/min，进样量为 10 μL。

1.4 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI)；正离子扫描；多反应监测 (MRM)；离子源温度 500 ℃；离子源电压 5 000 V；雾化气、气帘气、辅助气和碰撞气均为高纯氮气。MRM 监测离子对、去簇电压及碰撞电压见表 1。

表 1 抑霉唑与嘧霉胺的质谱优化条件

Table 1 The optimized MS/MS conditions of imazalil and pyrimethanil

Compound	Precursor ion <i>m/z</i>	Product ions <i>m/z</i>		Declustering		Collision	
				potential		energy	
				<i>U</i> / <i>N</i>	<i>U</i> / <i>N</i>		
Imazalil	297. 2	159. 0,	255. 0	75	75	30,	26
Pyrimethanil	200. 1	107. 1,	168. 1	114	114	35,	42

2 结果与讨论

2.1 提取试剂的选择

乙腈作为一种通用的提取溶剂在残留检测方面得到广泛的应用，由于其对糖、蛋白质类化合物较难提取^[21~ 22]，对抑霉唑和嘧霉胺有较高的回收率，因此本文采用乙腈作为提取试剂，以最大限度地提取荔枝中的抑霉唑和嘧霉胺残留，并减少提取液中的干扰物。

2.2 流动相的选择

分别考察了甲醇 – 水、乙腈 – 水、乙腈 – 0.5% 甲酸溶液、乙腈 – 0.005 mol/L 乙酸铵溶液流动相对抑霉唑和嘧霉胺的分离效果。结果表明，以甲醇 – 水和乙腈 – 0.5% 甲酸溶液作流动相时，目标化合物的色谱峰有不同程度的拖尾。而加入乙酸铵有利于目标化合物离子化，提高灵敏度。以乙腈 – 0.005 mol/L 乙酸铵溶

液为流动相时，两种目标化合物的灵敏度较好，分离度较高，峰形较好，因此本文选择乙腈 - 0.005 mol/L 乙酸铵溶液为最佳流动相。

2.3 质谱条件的选择

将抑霉唑、嘧霉胺标准品溶液采用流动注射直接进样，通过全扫描确定化合物母离子，再对母离子进行二级质谱扫描，得到碎片离子，通过优化实验条件，得到二级质谱图。通过多反应离子监测 (MRM) 选择相对丰度较高的离子对，确定为定性定量离子对，并优化去簇电压 (DP)、碰撞电压 (CE) 等参数，优化后的质谱条件见表 1。

2.4 断裂机理推测

抑霉唑分子式为 $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$ ，相对分子质量为 297.2 其可能的断裂方式如图 2A 所示，即分子离子峰 m/z 297 发生重排后，先丢失一分子 H_2O ，然后 C-C 键断裂，丢失一分子 c1ccncc1/C=C/C，得到 m/z 159 的碎片离子峰；而分子离子峰 m/z 297 丢失一分子 C=C，得到 m/z 255 的碎片峰。

嘧霉胺分子式为 $C_{12}H_{13}N_3$ ，相对分子质量为 199.3 图 2B 为其可能的断裂方式。分子离子峰 m/z 200 丢失两分子 CH_4 ，得到 m/z 168 的碎片峰。丢失一分子 Nc1ccccc1，得到 m/z 107 的碎片峰。

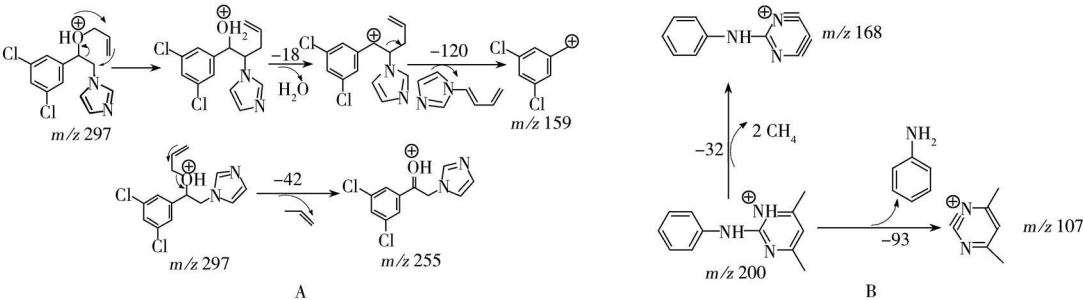


图 2 抑霉唑 (A) 及嘧霉胺 (B) 可能的断裂方式
Fig. 2 Possible fragmentation mechanisms of imazalil (A) and pyrimethil (B)

图 3 为抑霉唑和嘧霉胺的子离子全扫描质谱图。抑霉唑产生的子离子分别为 m/z 159.0、255.0、173.0、176.1、201.0、149.1、141.1、109.1。嘧霉胺产生的子离子分别为 m/z 168.1、143.1、107.1、183.1、159.1、129.1、118.1、142.1。根据子离子的丰度和基质对其的干扰，本文分别选择 m/z 159.0、107.1 作为抑霉唑和嘧霉胺的定量离子。

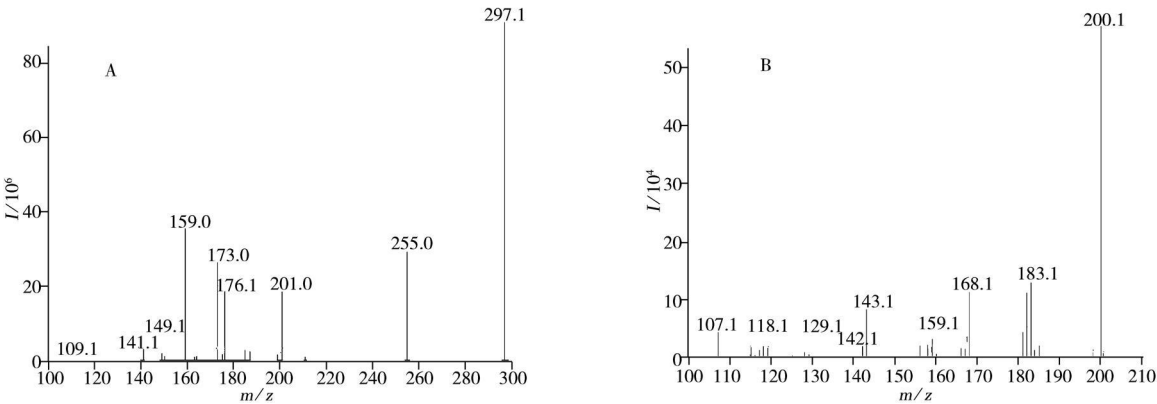


图 3 抑霉唑 (A) 与嘧霉胺 (B) 的全扫描质谱图
Fig. 3 Full scan mass spectra of imazalil (A) and pyrimethil (B)

2.5 方法的线性关系与检出限

以空白样品基质配制一系列不同浓度的混合标准工作溶液 (1.00、1.25、2.50、5.00、10.0、15.0、20.0、40.0 $\mu\text{g/L}$)，并依次进样，分别以抑霉唑和嘧霉胺的峰面积 (Y) 为纵坐标，以相应的质量浓度 (X , $\mu\text{g/L}$) 为横坐标，作标准曲线。结果表明，抑霉唑和嘧霉胺在 1.00~20.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内其质量浓度与峰面积均呈良好的线性关系，相关系数 r 大于 0.999 (见表 2)。

表 2 抑霉唑、嘧霉胺的线性方程、相关系数、平均回收率及相对标准偏差								
Table 2 Linear equations correlation coefficients average spiked recoveries and RSDs of imazalil and pyrimethanil								
Compound	Linear equation	<i>r</i>	Added 0.005 mg/kg		Added 0.010 mg/kg		Added 0.020 mg/kg	
			Average recovery	RSD	Average recovery	RSD	Average recovery	RSD
			$\bar{R}\%$	$s_r\%$	$\bar{R}\%$	$s_r\%$	$\bar{R}\%$	$s_r\%$
Imazalil	$Y=2.74\times10^4X$	0.999 9	91	6.5	92	6.9	96	8.4
Pyrimethanil	$Y=9.97\times10^3X$	0.999 9	83	9.5	86	11.1	90	10.9

为检验方法的稳定性和重复性，对相同浓度的标准溶液进行同日内不同时间段 10 次重复进样，抑霉唑和嘧霉胺峰面积的相对标准偏差分别为 0.80%、1.05%，表明本方法的重复性和稳定性良好。

以实际检测时的信噪比 (R_{SN}) 为 3 计算检出限为 0.005 mg/kg。抑霉唑和嘧霉胺混合标样的 MRM 色谱图见图 4A。

2.6 回收率与精密度实验

采用标准添加法，在 5 g(精确至 0.01 g)阴性荔枝样品中进行 3 水平 (0.005、0.010、0.020 mg/kg)、10 平行的添加回收实验。在优化实验条件下，3 个添加水平下抑霉唑和嘧霉胺的平均回收率为 91%~96% 和 83%~90%，相对标准偏差为 6.5%~8.4% 和 9.5%~11.1% (见表 2)。荔枝阴性样品和标准添加样品的 MRM 色谱图见图 4(B、C)。

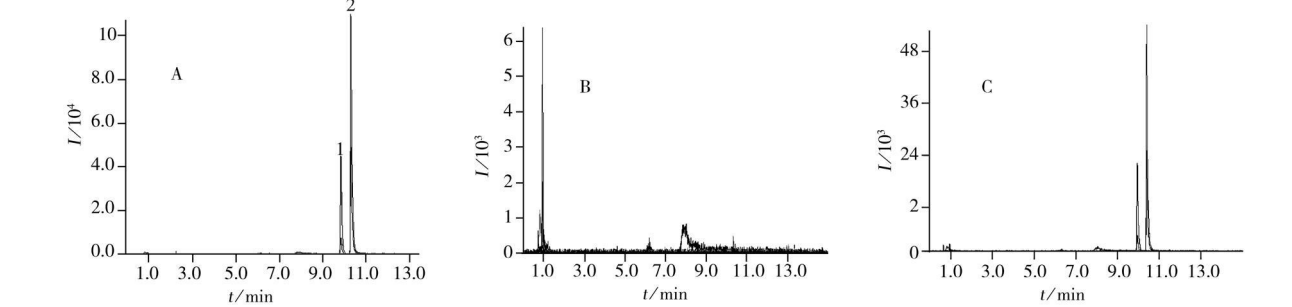


图 4 抑霉唑和嘧霉胺的 MRM 色谱图
Fig. 4 MRM chromatograms of imazalil and pyrimethanil
A. standard solution; B. blank荔枝; C. spiked荔枝 sample; 1. pyrimethanil; 2. imazalil

2.7 实际样品的检测

将本方法用于 10 个市售荔枝样品的分析，其中两个样品中检出抑霉唑，含量分别为 0.009、0.035 mg/kg，未检出嘧霉胺。

3 结 论

本实验采用超高效液相色谱 – 串联质谱法建立了同时测定荔枝中抑霉唑和嘧霉胺残留量的方法，方法前处理简单、快速，操作简便易行，且准确、灵敏度高，重复性好，检出限低，完全可以满足国际上对抑霉唑和嘧霉胺残留限量的检测要求。

参考文献:

[1] 付新梅, 张丽静, 封顺, 王吉德, 张旭龙. 高效液相色谱法同时测定甜瓜样品中的抑霉唑和噻菌灵 [J]. 分析化学, 2004, 32(3): 329–331.

[2] 张心明, 余向阳, 洪晓月, 刘贤进. 固相萃取 – 气相色谱法测定农产品中嘧霉胺的残留量 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 424–427.

[3] 赵其阳, 焦必宁, 王成秋, 付陈梅, 郭东梅, 杨玉柱. 气相色谱法同时测定柑桔中抑霉唑、噻菌灵和嘧霉胺残留 [J]. 现代科学仪器, 2007, (1): 77–79.

[4] 杨涛, 艾尔肯·依不拉音, 靳智, 李明, 张煌涛. 反相高效液相色谱法同时测定果蔬中 6 种防腐杀菌剂 [J]. 食品科技, 2008, (9): 245–247.

[5] 郭治安, 赵景婵, 王耀, 宋俊峰. 杀菌剂中抑霉唑含量的离子对高效液相色谱分析 [J]. 分析化学, 2004, 32(2): 217–220.

[6] 徐浩, 李振. 嘧霉胺在黄瓜及土壤中的残留降解动态 [J]. 浙江农业学报, 2005, 17(6): 380–383.

- [7] 余向阳, 骆爱兰, 储瑞武, 刘天宏, 刘贤进. 高效液相色谱法测定葡萄中嘧霉胺的残留量[J]. 江苏农业学报, 2004 20(4): 268– 270
- [8] 高蓉, 赵人琤, 肖杭. 高效液相色谱法测定黄瓜中吡虫啉和嘧霉胺残留量[J]. 现代农药, 2004 3(6): 21– 23
- [9] ITO Y, KAIT Y, OKA H, HAYAKAWA J, KAGAM IT. Application of ion exchange cartridge clean-up in food analysis I. Simultaneous determination of thiabendazole and imazalil in citrus fruit and banana using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. J Chromatogr A, 1998 81(1/2): 81– 87.
- [10] 潘守奇, 朱莉萍, 孙军, 董静, 刘孟孝. 气相色谱法测定水果和蔬菜中嘧霉胺·氟硅唑·抑霉唑残留量[J]. 安徽农业科学, 2008 36(17): 7238– 7239 7268
- [11] 应兴华, 徐霞, 闵捷, 陈铭学, 吴俐, 韩素芳. 离心破乳 – 气相色谱法测定黑米中残留抑霉唑的研究[J]. 分析试验室, 2009 28(9): 59– 61.
- [12] 徐国锋, 聂继云, 李静, 李海飞, 王孝娣, 毋永龙. 苹果、香蕉和柑橘中腐霉利等 4 种防腐保鲜剂残留分析方法[J]. 农药学学报, 2009 11(3): 351– 356
- [13] 潘守奇, 孙军, 董静, 潘玉香, 刘孟孝. 气相色谱法测定水果和蔬菜中异丙威、嘧霉胺、抑霉唑残留量[J]. 食品科学, 2008 29(12): 516– 518
- [14] 曾士远, 钟立人, 俞宝康. 抑霉唑残留量测定[J]. 中国柑桔, 1986 (4): 10– 11
- [15] 武婷, 刘波, 李楠. 杀菌剂抑霉唑在梨子中残留动态分析[J]. 分析试验室, 2007, 26(9): 81– 83
- [16] 应兴华, 徐霞, 陈铭学, 吴俐, 闵捷, 朱智伟, 韩素芳. 粮谷中抑霉唑残留的气相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2009 28(4): 398– 402
- [17] 靳智, 杨涛, 李明, 张煌涛, 艾尔肯·依不拉音. 气相色谱质谱联用法同时测定果蔬中 5 种防腐杀菌剂[J]. 分析试验室, 2008 27(5): 73– 75.
- [18] 朱涛, 周宏琛, 闫秋成, 王勇, 田晓林. 气相色谱 – 质谱联用法测定大蒜中的嘧霉胺、噻螨酮残留量[J]. 分析试验室, 2007 26(10): 72– 75.
- [19] NAVALÓN A, PRIETO A, ARAUJO L, VILCHEZ J L. Determination of pyrimethanil and kresoxin-methyl in green groceries by headspace solid phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2002 975(2): 355– 360
- [20] CHARLTON A J, JONES A. Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography – mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2007, 1141(1): 117– 122
- [21] MAŠTOVSKÁ K, LEHOTAY S J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues[J]. J Chromatogr A, 2004 1040(2): 259– 272
- [22] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ R M, RIAL-OTERO R, CANCHO-GRANDE B, SMAL- GÁNDARA J. Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography – ion trap mass spectrometry and analyte protectants[J]. J Chromatogr A, 2008 (1196/1197): 100– 109