超高效液相色谱串联质谱法测定香蕉中的三唑醇残留

王明月，林靖凌
(中国热带农业科学院分析测试中心，海南 海口 571101)

摘 要：建立超高效液相色谱串联质谱法测定香蕉中的三唑醇残留的方法。样品中三唑醇经乙睛提取，氟罗里硅土小柱净化，以C_{18}反相柱为分析柱，甲醇-0.05%甲酸溶液为流动相，采用超高效液相色谱-串联质谱多反应监测，电喷雾正电离源(ESI^+)，外标法定量。三唑醇在0～0.16mg/L范围内均与峰面积呈良好线性关系，相关系数为0.9991。香蕉中三唑醇的最低检出限为1.0μg/kg，回收率为87.8%～97.8%，相对标准偏差为4.8%～10%。结果表明该方法简便、快速、灵敏，适合香蕉样品中的三唑醇残留分析。

关键词：超高效液相色谱串联质谱法；香蕉；三唑醇

Determination of Triadimenol Resuides in Banana by UPLC-MS/MS

WANG Ming-yue，LIN Jing-ling
(Analysis and Testing Centre, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract：In order to establish a method for determining triadimenol residues in banana by ultra-performance liquid-chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS), the triadimenol residues in samples were extracted with acetonitrile, cleaned up ony Florisil SPE column, separated on C_{18} reverse phase column using methanol-0.05% formic acid as mobile phase, and detected with positive ionization electrospray ionization-mass spectrometry under a multiple reaction monitoring (MRM) mode. An excellent linear relationship between triadimenol concentration in the range of 0 － 0.16 mg/L and peak area was achieved with a relative standard deviation of 4.8% － 10%. The detection limit for triadimenol in banana was 1.0 μg/mL and recovery rate of this method was in the range of 87.8% － 97.8% with a relative standard deviation of 4.8% － 10%. This developed method is simple, rapid, sensitive and can therefore be used for the determination of triadimenol in banana.

Key words：ultra-performance liquid-chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS)；banana；triadimenol
中图分类号：TS207.3 **文献标识码**：A **文章编号**：1002-6630(2011)12-0292-04

三唑醇(triadimenol)，又名百坦(Baytan)、羟锈宁，属于低毒性杀菌剂。大鼠急性口服LD_{50}为700～1200mg/kg，急性经皮LD_{50}＞5000mg/kg，无慢性毒性。具有内吸传导性，具有保护和治疗作用。适用于防治麦类黑穗病、白粉病、锈病以及玉米、高粱等的丝黑穗病[1]。目前三唑醇已经申请在香蕉上登记，用于防治叶斑病。

随着三唑醇的广泛使用和人们对食品安全的重视，三唑醇在食品中的残留受到了高度关注。据有文献报道了其在玉米、谷物中的残留分析方法[2]，但对三唑醇在香蕉中的残留分析方法鲜有报道。目前常用的三唑醇检测方法主要有气相色谱法[3-6]、气质联用法[7-9]、液相色谱法[10-14]等，而超高效液相色谱串联质谱的检测方法尚未见报道。由于超高效液相色谱-串联质谱法(ultra-performance liquid-chromatography-mass spectrometry，UPLC-MS/MS)具有灵敏度高，特异性强，对于色谱分离度要求不高等特点而被广泛用于农药残留的分析。本研究利用乙腈提取，并用氟罗里硅土小柱净化香蕉中的三唑醇，再用超高效液相色谱串联质谱仪分析，旨在为三唑醇检测标准的建立提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

香蕉 市购。乙睛、正己烷、丙酮、氯化钠(均为分析纯) 广州化学试剂厂；甲醇(色谱纯) 美国Fisher Scientific公司；超纯水(电阻率小于18mΩ)；三唑醇标

收稿日期：2010-09-01
作者简介：王明月(1970－)，女，研究员，本科，研究方向为农产品质量安全。E-mail：hkwmy0815@163.com
© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

准溶液(100μg/mL)，中国标准物质中心。

Waters uplc-premierxe 超高效液相色谱-质谱/质谱联用仪(配有 ESI 电离源、三重四极杆质量分析器、Masslynx4.1 色谱工作站) 美国 Waters 公司。FSH-2A 可调高速匀浆机 金坛市医疗仪器厂；BUCHI R-250 旋转蒸发仪 瑞士步琪公司；XW-80A 微型漩涡混合仪 上海沪西分析仪器厂；PL2002/01 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司；Tapid trace 固相萃取仪 美国 Caliper 公司；氟罗里硅土固相萃取小柱(1g，6mL) 德国 CNW 公司。

1.2 色谱条件及质谱条件

色谱柱 Acquity UPLC BEH C_{18}(2.1mm × 50mm，1.7μm)。流动相 A：0.05% 甲酸溶液，流动相 B：甲醇；采用梯度洗脱程序：0～5min，流动相 A 90%～15%；5～5.5min，流动相 A 15%～90%；流速：0.25mL/min；柱温：30℃；进样量：5μL；MS 同时记录总离子流(TIC)色谱图，扫描范围：200～800u；电喷雾离子化(ESI)，采用正离子(ESI^+)模式检测，毛细管电压 3.50kV，锥孔电压 10V，离子源温度 110℃，脱溶剂温度 350℃；脱溶剂气体流量 900L/h。

1.3 标准工作曲线的制作

三唑醇标准中间工作溶液的配制：准确量取适量质量浓度 100μg/mL 三唑醇标准储备液，用甲醇稀释成质量浓度 1.00μg/mL 的三唑醇标准中间工作溶液。

分别取标准中间工作溶液 0、0.10、0.20、0.40、0.80、1.6mL，用香蕉空白样品溶液在 10mL 容量瓶定容，得到质量浓度分别为 0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16μg/mL 的三唑醇标准工作溶液，按上述色谱条件每种质量浓度进样 5.00μL，以峰面积 Y 对标准溶液质量浓度 X 进行线性回归分析。

1.4 样品处理

1.4.1 提取

称取 25g(精确至 0.01g)香蕉样品，100mL 烧杯中，加入 50mL 乙睛匀浆 2min，过滤入预先装有 10～15g 氯化钠的具塞量筒中，振摇 2min，静置 10min，取上层乙腈液 10mL，于旋转蒸发仪 40℃抽真空浓缩至干，用 5mL 正己烷定容。

1.4.2 净化

预淋洗：氟罗里硅土小柱先用 5mL 正己烷:丙酮(9:1，V/V)预洗，再用 5mL 正己烷预洗；上样：待正己烷滴至离填料 1mm 时，上提取液；淋洗：待样品溶液滴至离填料 1mm 时，用 10mL 正己烷:丙酮(9:1，V/V)淋洗，弃去淋洗液；洗脱：待淋洗液滴至离填料 1mm 时，用 10mL 正己烷-丙酮(5:5，V/V)洗脱，旋转蒸发瓶接收洗脱液，于旋转蒸发仪 40℃抽真空浓缩至干，用 5mL 就甲醇定容。摇匀，经 0.45μm 滤膜过滤后供超高效液相色谱质谱联用分析。

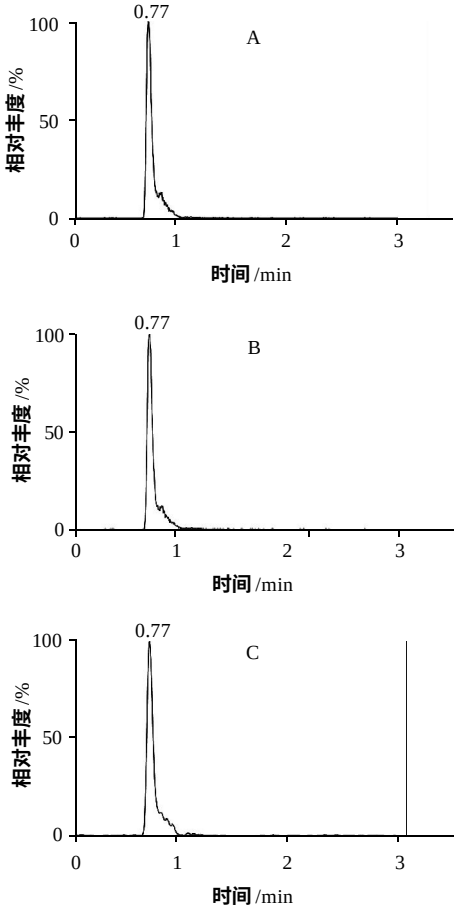
2 结果与分析

2.1 三唑醇特征离子对的确立

三唑醇 m/z295，呈弱碱性，故采用正离子模式。在流动相(甲醇:0.05% 甲酸溶液=1:9)，0.25mL/min 的流速下，取标准工作溶液(1.00μg/mL)经流动注射注入质谱仪中，采用正离子喷雾模式在(296 ± 10)u 范围内做全扫描，毛细管电压为 3.50kV，离子源温度为 110℃，脱溶剂气温度 350℃，去溶剂(N_2)气 900L/h，锥孔气流(N_2) 50L/h，碰撞气(Ar)流 0.20mL/min，调整锥孔电压，使得三唑醇的响应最好。当锥孔电压为 10V 时，得到三唑醇的 m/z 为 296，即母离子 m/z 为 296。

以 m/z 296 为母离子做子离子扫描，锥孔电压为 10V，变换碰撞能直至 10eV 时，其子离子 m/z 69.7 的响应最灵敏；当碰撞能为 14eV 时，另一个子离子 m/z 98.7 的灵敏度最高。结果见图 1。

2.3 提取溶剂的选择



A. 三唑醇总离子流图；B. 三唑醇特征离子对 m/z 296 > 69.7；C.三唑醇特征离子对 m/z 296 > 98.7。

图 1 三唑醇的总离子流和特征离子对图

Fig.1 Total ion current and characteristic ion chromatograms of triadimenol

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

三唑醇易溶于二氯甲烷、乙睛、丙酮、甲苯等有机溶剂，水中的溶解度较小。故可取以上几种有机溶剂做提取试剂，但由于二氯甲烷和甲苯的毒性大，对环境造成的污染严重，而丙酮提取物中有较多量的脂类、色素等杂质。乙睛是较常用的提取剂，对三唑醇的提取效率高，而且相对来说提取出来的杂质较少，再经过盐析和净化，可以除去其中的水溶性和脂溶性杂质，这样可以避免被测物与杂质在液滴表面的ESI电荷存在竞争，大量的杂质会妨碍带电样品离子进入气相状态，增加中和的可能性，而去除它，则可降低分析背景和对分析的干扰，提高分析的准确度，延长仪器寿命。

2.4 流动相和流速的选择

由于三唑醇带有羟基，在甲醇-水或乙腈-水中易产生电离，与固定相产生作用导致拖尾。故常往流动相中加入易挥发的酸或盐，来抑制电离，形成疏水化合物，分离效果和峰形可以得到明显的改善。加入的酸或缓冲溶液，必须是易挥发的，而且酸的体积分数必须小于1%，这是由于不易挥发的缓冲溶液和浓度大的酸会抑制离子源的信号和堵塞喷雾针及污染仪器。加入低浓度的甲酸，可以提高灵敏度和分离度，所以选择甲醇-0.05%甲酸溶液为流动相，流动相得洗脱条件见1.2节。

一般来说，UPLC都用2.1mm内径的柱子做液质分析，流速为0.25mL/min，这样既可以保证分离效率，又不会让大量的溶剂进入质谱仪而导致污染。

2.5 净化方法的选择

分别比较氟罗里硅土小柱和氨基小柱作为固相萃取小柱，二氯甲烷-甲醇、正己烷-丙酮作为淋洗溶液对香蕉中三唑醇残留进行净化，净化效果见表1。

表1 萃取条件对三唑醇回收率的影响

Table 1 Effect of extraction conditions on recovery rate of tradimenol

方法	淋洗液	比例	固相萃取小柱	方法	效果
1	正己烷-丙酮	9:1	氨基小柱	上样后直接洗脱	回收率约为0
2	二氯甲烷-甲醇	95:5	氨基小柱	上样后直接洗脱	有杂质干扰目标物
3	正己烷-丙酮	9:1 5:5	氟罗里硅土小柱	上样后先用9:1的溶液淋洗，弃去，再用5:5溶液洗脱，接收浓缩。	回收率92%～102%，而且样品净化效果很好。

由表1可知，香蕉中三唑醇的净化条件为氟罗里硅土固相萃取小柱，淋洗溶剂为正己烷-丙酮(9:1，*V/V*)，洗脱溶剂为正己烷-丙酮(5:5，*V/V*)。这与三唑醇的极性有关，先用正己烷含量较大的溶剂淋洗去样品中一些脂溶性杂质，再用极性合适的正己烷-丙酮(5:5，*V/V*)溶剂洗脱样品中的三唑醇，这样可以保证较好的回收率和净化效果，色谱的标准谱图和加标(20μg/kg)谱图见图2。

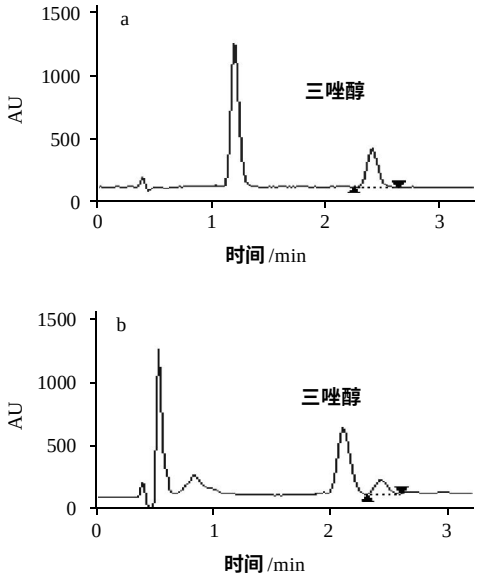


图2 三唑醇标准(a)和香蕉样品加标(b)谱图

Fig.2 Chromatograms of triadimenol standard and spiked banana samples

2.6 线性关系与检出限

根据1.3节制作三唑醇标准工作曲线，得回归方程为Y=321.121X＋1374.33，相关系数为0.9991，即三唑醇在0～0.16mg/L范围内均与峰面积呈良好线性关系。根据IUPAC定义，本方法的检出限为产生响应于3倍背景噪音的标准偏差分析信号的分析物质量浓度值。由此可得，三唑醇的最底检出限为1.0μg/kg。

2.7 方法的精密度和回收率

将三唑醇的标准工作液添加到空白香蕉样品中，测定回收率和精密度。结果见表2。回收率为87.8%～97.8%，相对标准偏差为4.8%～10%。

表2 回收率和精密度的测定结果(n=6)

Table 2 Results of recovery rate and precision experiments (n=6)

样品	样品含量/(μg/kg)	添加量/(μg/kg)	测定值/(μg/kg)						平均回收率/%	相对标准偏差/%
1	0	4.00	3.48	3.76	3.44	3.28	3.44	3.64	87.8	4.8
2	0	20.0	18.8	17.2	21.6	16.8	18.0	20.4	94.0	10
3	0	100	98.0	96.0	105	103	93.6	91.2	97.8	5.5

3 结 论

本研究采用乙腈提取，弗罗里硅土小柱净化，正己烷-丙酮溶液淋洗，超高效液相色谱质谱联用仪检测香蕉中的三唑醇残留，该方法方便、快速、灵敏，适合大批量香蕉样品中三唑醇残留的检测。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献 ：

[1] 甘亚, 吕丁, 刘剑, 等. 三唑醇类化合物的合成及抗真菌活性[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(2): 85-88.

[2] RAGAB M T H, ANDERSON M G, JOHNSTON H W. Residue analysis of t riadimefon, triadimenol, and the BAY KWG 1342 diol and BAY KWG 1323 hydroxylated metabolites in winter wheat[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1990, 44(1): 100-105.

[3] 王军, 边侠玲, 万宇, 等. 麦田环境中三唑醇残留行为及其安全性评价[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(4): 666-669.

[4] SN0644 — 1997 出口粮谷中三唑醇残留量检验方法[S].

[5] 李俊凯, 王勇, 程玲, 等. 气相色谱法测定大豆植株中三唑醇残留量研究[J]. 长江大学学报, 2008, 9(5): 58-60.

[6] 王军, 万宇, 陈枫, 等. 三唑醇在京皖两地小麦和土壤中残留动态研究[J]. 农药科学与管理, 2007, 28(8): 14-17.

[7] 戴博, 金红宇, 田金玫, 等. 三唑酮及其代谢产物在人参中的残留分析方法研究[J]. 中草药, 2009, 1(1): 127-130.

[8] SN/T2232 — 2008 进出口食品中三唑醇残留量的检测方法: 气相色谱质谱法[S].

[9] 张伟国, 陈姗, 高金, 等. 玉米植株中三唑酮、三唑醇-a、三唑醇-b 残留量的测定[J]. 农药, 2005, 44(7): 324-325.

[10] 于建垒, 宋国春, 李瑞娟, 等. 联苯三唑醇在花生和土壤中残留动态[J]. 农药, 2006, 45(8): 554-564.

[11] 党宏斌, 范志全, 艾应伟, 等. 三唑醇的高效液相色谱分析[J]. 现代农药, 2003, 4(2): 21-22.

[12] 李琳, 张玉涛, 张进忠. 三唑醇农药残留分析研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(22): 9704-9707.

[13] 武彤, 李朝阳, 李巧玲, 等. 三唑类手性农药高效液相色谱分离的研究[J]. 河北科技大学学报, 2008, 29(4): 279-282.

[14] 慕卫, 陈召亮, 杨连来, 等. 烯唑醇、三唑醇和睛菌唑的 GC 和 HPLC 分析方法烯唑醇、三唑醇和睛菌唑的 GC 和 HPLC 分析方法[J]. 现代农药, 2005, 4(6): 17-19.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net