

超高效液相色谱—串联质谱法测定蔬菜水果中亚胺唑残留量

Determination of imibenconazole in fruits and vegetables by ultra high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry

陈景春 陈 盛 何亚斌 郑小平

CHEN Jing-chun CHEN Sheng HE Ya-bin ZHENG Xiao-ping

(上海德诺产品检测有限公司, 上海 200436)

(Shanghai Deno Products Testing Service Co., LTD, Shanghai 200436, China)

摘要:采用固相萃取柱对样品中亚胺唑进行净化,建立一种灵敏测定蔬菜水果中亚胺唑残留量的超高效液相色谱—串联质谱法。考察不同固相萃取柱对亚胺唑测定的影响。结果表明:采用 Florisil 固相萃取柱进行净化,亚胺唑在 1.0~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内与其响应值呈良好的线性关系(0.998 7~0.999 6),检出限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法分析速度快,灵敏度高,重复性好,适用于蔬菜、水果中亚胺唑残留量的测定。

关键词:亚胺唑;超高效液相色谱—串联质谱法;蔬菜;水果

Abstract: The sample was purified by solid phase extraction column. A simple, fast, accurate method for determination of Imibenconazole in fruits and vegetables was developed by ultra high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS-MS). The linear range of the method is from 1.0 $\mu\text{g/L}$ to 100 $\mu\text{g/L}$, and the correlation coefficients were 0.998 7~0.999 6, and the detection limit is 1.0 $\mu\text{g/kg}$. The proposed method has high sensitivity and good reproducibility for determining Imibenconazole.

Keywords: imibenconazole; UPLC-MS/MS; vegetables; fruits

亚胺唑(imibenconazole),是一种新三唑类杀菌剂,能有效防治子囊菌、担子菌和半知菌所致的柑橘疮痂病、葡萄黑痘病、梨黑星病等^[1]。亚胺唑喷到作物上后能快速渗透到植物体内,耐雨水冲刷,在推荐剂量下使用,对环境、作物安全,在蔬菜、果树、禾谷类等作物的种植生产中被广泛应用。亚胺唑在弱碱性条件下稳定,在酸性和强碱性条件下不稳定,对光稳定。在雨水冲刷,土壤转运的过程中,易污染地表水及水生动植物。人摄入后,可能导致神经性,甚至遗传性中

毒。亚胺唑原药急性口服毒性:大鼠 LD_{50} 为 0.80 g/kg,小鼠的 LD_{50} 大于 5.00 g/kg^[2]。GB/T 2763—2014《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中规定了:柑橘和苹果的限量为 1 mg/kg,青梅和葡萄中限量为 3 mg/kg,但是无任何推荐使用的检测标准。

目前,用于测定亚胺唑的方法主要有气相色谱法^[2-5]和高效液相色谱法^[6-8]。但是由于气相色谱及液相色谱都是通过目标物在分析中的保留时间来定性,并不能准确地区分干扰物及目标物。UPLC-MS/MS 结合了 LC 的强大的分离分析能力和 MS 灵敏的鉴定及结构解析能力,提供了可靠、精确的相对分子质量及结构信息,简化了试验步骤,同时节省了样品准备时间和分析时间,GB/T 20769—2008《水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱—串联质谱法》中就利用 UPLC-MS/MS 的这一优势,同时对 450 种农药进行了分析。为了更高效地测定蔬菜水果中亚胺唑残留量,本研究拟通过固相萃取进行净化,采用高效液相色谱—串联质谱法(UPLC-MS/MS)旨在为检测亚胺唑含量提供更高的选择性和灵敏度^[9,10]。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

乙腈、正己烷、甲醇、丙酮:色谱纯,美国西格玛公司;

氯化钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

试验用水为去离子水;

亚胺唑标准物质:德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

佛罗里硅土(Florisil)固相萃取柱:500 mg/6 mL,美国沃特世公司。

作者简介:陈景春(1987—),男,上海德诺产品检测有限公司助理工程师。E-mail: haru0329@163.com

收稿日期:2014-12-02

1.2 仪器设备

超高效液相色谱—串联质谱联用仪: Waters ACQUITY UPLC/Xevo TQ 型, 美国沃特世公司;
分析天平: ML104 型, 瑞士梅特勒—托利多公司;
高速冷冻离心机: HeraeusMultifuge X1R 型, 美国热电公司;
漩涡振荡器: TALBOYS 型, 上海安谱科学仪器有限公司;
氮吹仪: DSY-III 型, 北京东方精华苑科技有限公司。

1.3 标准溶液配制

储备液的配制: 准确称取 5.00 mg 的标准品至 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液配制成 0.1 mg/mL 的标准储备溶液, 于 4 °C 冰箱中保存。

1.4 样品制备

准确称取 10.00 g 样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈, 均质 1 min, 加入 5~8 g 氯化钠, 盖紧瓶盖于漩涡振荡器上混匀, 于 4 °C, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上层有机相于 100 mL 梨形瓶中; 于残渣中再加入 20 mL 乙腈, 混匀后于 4 °C, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上层有机相合并入 100 mL 梨形瓶中, 40 °C 水浴旋转蒸发至近干, 加入 5 mL 正己烷—丙酮溶液(4 : 6, V/V) 溶解残渣, 待净化用。

将 Florisil 固相萃取小柱用 10 mL 正己烷—丙酮溶液(4 : 6, V/V) 预淋洗活化, 加入上述待净化溶液, 用 50 mL 梨形瓶接收洗脱液, 加入 25 mL 正己烷—丙酮溶液(4 : 6, V/V) 冲洗 100 mL 梨形瓶后淋洗 Florisil 固相萃取小柱, 收集洗脱液, 40 °C 旋转蒸发至近干。用 1 mL 甲醇—水(5 : 5, V/V) 溶液溶解, 经 0.22 μm 的有机相滤膜过滤, 待上机分析。

1.5 色谱条件和质谱条件

色谱柱: ACQUITY BEH C18(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈(梯度条件见表 1); 流速为 0.3 mL/min; 进样体积: 5 μL; 柱温: 40 °C。

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子模式; 检测方式: 多反应监测(MRM); 电喷雾电压: 1.0 kV; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂流量: 800 L/h; 脱溶剂温度: 400 °C; 定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 The elution conditions of mobile phase

时间/min	A/%	B/%
0.00	30.0	70.0
0.50	30.0	70.0
1.00	5.0	95.0
3.50	5.0	95.0
3.51	30.0	70.0
5.00	30.0	70.0

表 2 测定亚胺唑的质谱参数

Table 2 The MS parameters for detecting Imibenconazole

定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔 电压/V	碰撞 能量/eV
413.0/125.1			26
413.0/171.0	413.0/125.1	28	18
413.0/343.9			18

2 结果与讨论

2.1 净化方法的确定

根据化学性质, 亚胺唑易溶于甲醇、乙腈、苯、二甲苯、丙酮中, 在水中的溶解度较低。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, 由于其与蛋白质、脂肪类化合物难溶, 对绝大多数农药有较高的回收率, 本试验结果表明乙腈适合作为蔬菜水果中亚胺唑的提取试剂。在提取液中加入氯化钠, 增加水的比重与保证乙腈分层, 再经固相萃取净化, 可以得到满足净化要求的样品。选用 C₁₈ 固相萃取柱和 Florisil 固相萃取柱以及石墨碳黑固相萃取柱进行净化比较, 结果表明, 亚胺唑在 C₁₈ 固相萃取柱和石墨碳黑固相萃取柱中有吸附, 虽然选用石墨碳黑固相萃取柱能更有效地去除样品中的色素, 但目标物也会同时被吸附, 柱效回收率在 60% 左右。选择 Florisil 固相萃取柱进行浓缩净化后, 干扰较低, 回收率高。因此, 本试验选择 Florisil 固相萃取柱进行净化。

2.2 仪器条件的确定

亚胺唑标准品图谱见图 1。本试验采用乙腈水溶液

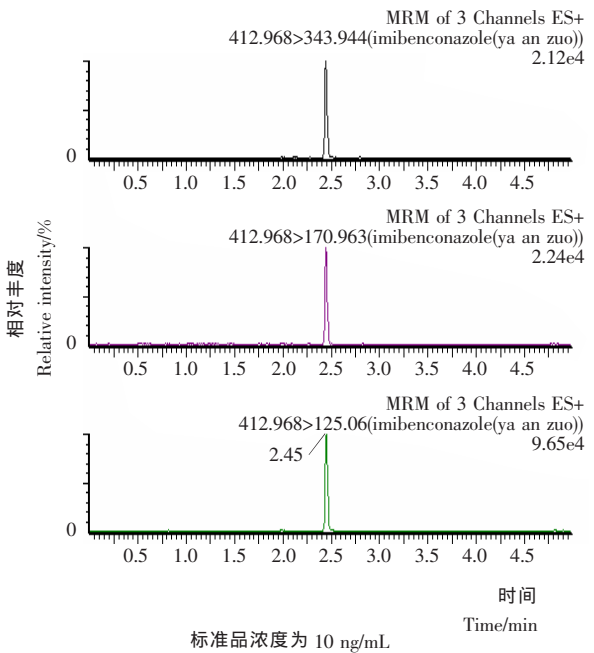


图 1 亚胺唑标准品图谱

Figure 1 The UPLC—MS/MS of Imibenconazole

(0.1%甲酸)作为流动相;流动相中加入 0.1%甲酸,增加了目标化合物在喷雾之前的离子化程度,提高了检测的灵敏度;由于亚胺唑极性较小,在流动相梯度上选择较高比例的有机相来保证目标化合物的完全洗脱。

2.3 线性关系及检出限

准确移取亚胺唑储备液适量,用不同基质稀释成一系列的标准工作液,其浓度分别为 1.0、10.0、20.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ 。以标准溶液中被测组分峰面积为纵坐标,以浓度为横坐标,绘制标准曲线,结果表明(见表 3):亚胺唑在这些基质中在 1.0~100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内其浓度与峰面积呈良好的线性关系,相关系数 r 大于 0.998。当亚胺唑添加浓度为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 时,测得质谱峰信噪比 $S/N>3$,亚胺唑添加浓度为 3.0 $\mu\text{g/kg}$ 时,测得质谱峰信噪比 $S/N>10$,则该方法检出限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 3.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.4 方法的准确度和精密度

本试验选择了青菜、苹果、生菜、草莓、芹菜和梨等 6 种

表 3 亚胺唑标准曲线
Table 3 The standard curve of Imibenconazole

基质	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	线性方程	相关系数 (r)
青菜	1.0~100.0	$y=406.9x+246.9$	0.998 7
苹果	1.0~100.0	$y=435.2x+198.3$	0.999 3
生菜	1.0~100.0	$y=399.9x+244.2$	0.999 6
草莓	1.0~100.0	$y=418.8x+213.4$	0.999 1
芹菜	1.0~100.0	$y=426.3x-11.2$	0.998 9
梨	1.0~100.0	$y=491x-231.6$	0.999 4

不同种类的蔬菜水果阴性样品,进行 3 个不同水平(1.0、5.0、20.0 $\mu\text{g/kg}$)的添加回收试验,测定后得到亚胺唑在不同基质的回收率和相对标准偏差(RSD)见表 4。由表 4 可知:符合农药残留分析检测的要求^[11]。

表 4 亚胺唑加标回收率及精密度测定结果
Table 4 The recovery rate of Imibenconazole in samples

添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	青菜		生菜		芹菜		苹果		草莓		梨	
	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %
1.0	80.3	3.6	84.1	5.5	83.8	6.3	86.5	4.2	82.8	1.9	83.9	7.8
5.0	85.5	1.6	87.6	4.3	89.6	2.8	88.5	4.9	84.6	4.6	86.6	5.6
20.0	92.5	3.5	88.9	1.3	93.6	2.9	92.4	3.8	90.9	2.3	94.7	5.8

3 结束语

本试验建立了蔬菜与水果中亚胺唑残留量的超高效液相色谱—串联质谱(UPLC—MS—MS)检测方法。与文献[2]和[4]中采用的气相及液相方法相比较,本试验在定性上更加准确,检出限能达到 1.0 $\mu\text{g/kg}$,灵敏度有了很大的提高。采用 Florisil 固相萃取柱净化,消除了样品中的蛋白、脂类等干扰物质。但 Florisil 固相萃取柱吸附色素的能力有限,检测色素含量较高的样品时不能完全吸附色素,对试验会产生干扰。通过使用 GPC 进行净化可能会得到更好的净化效果。

参考文献

1 毕强,余鲸年. Imibenconazole——一种新的杀菌剂[J]. 农药译丛,1996, 18(4): 63~64.
2 李薇,赵文芳,冷欣夫. 梨果及土壤中亚胺唑及其代谢物的气相色谱分析[J]. 色谱, 1998, 16(6): 508~509.
3 熊芳,戴华,黄志强. 气相色谱法测定葡萄中烯唑醇农药的残留量[J]. 色谱, 2002, 20(4): 383~384.
4 周芳梅,蔡双福,文灿,等. 亚胺唑在土壤生态系统中的检测方

法及持久性研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1): 234~237.
5 黄士忠,王继军,黄永春,等. 酰胺唑及其代谢物在柑橘和土壤中的残留动态研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(1): 181~185.
6 Akiko Kaihara, Kimihiko Yoshii, Yukari Tsumura, et al. Multi-residue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables by supercritical fluid Extraction and HPLC[J]. Journal of Health Science, 2000, 46(5): 336~342.
7 熊芳,戴华,李拥军,等. 高效液相色谱法测定葡萄中烯唑醇农药残留量[J]. 农药, 2002, 43(8): 22~23.
8 全国农药残留实验研究协作组编. 农药残留量实用检测方法手册(第二卷)[S]. 北京:化学工业出版社,2001:428~437
9 王岩松,张春晖,张春野,等. 高效液相色谱—串联质谱法测定蔬菜和水果中氟吗啉的残留量[J]. 分析化学研究报告, 2012, 40(2): 286~291.
10 刘长令. 世界农药大全 杀菌剂卷[M]. 北京:化学工业出版社, 2006: 80~82.
11 农业部农药检定所,山西省农药重点实验室. NY/T 788—2004 农药残留试验准则[S]. 北京:中国农业出版社,2004.