

# 液相色谱—串联质谱法测定番茄和黄瓜中敌菌灵残留量

## Determination of anilazine in tomatoes and cucumbers by LC-MS/MS

陈景春

CHEN Jing-chun

(上海必诺检测技术服务有限公司, 上海 201114)

(Shanghai Bino Testing Service Co., Ltd., Shanghai 201114, China)

**摘要:**样品采用固相萃取小柱净化,以  $C_{18}$  色谱柱为分离柱,以甲酸水—乙腈为流动相进行梯度洗脱,经 LC-MS/MS 检测,以多反应监测模式检测目标化合物的特征离子进行定性定量分析。结果表明:该方法线性范围为  $0.1 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ ,线性相关系数  $>0.999 0$ ,方法的检出限为  $0.01 \text{ mg/kg}$ ,定量限为  $0.03 \text{ mg/kg}$ 。在加标水平为  $0.03, 0.10, 0.50 \text{ mg/kg}$  时,方法的回收率为  $88.3\% \sim 95.2\%$ ,RSD 在  $4.5\% \sim 8.8\%$ 。该方法前处理方式简便、有机溶剂用量少、分析时间短、选择性好且灵敏度高,适用于番茄和黄瓜中敌菌灵的检测。

**关键词:**高效液相色谱—串联质谱法;敌菌灵;番茄;黄瓜;残留量

**Abstract:** Purified by solid phase extraction column, using  $C_{18}$  column as separation column and formic water-acetonitrile as flow phase for gradient elution, qualitative and quantitative analysis of characteristic ions of target compounds were detected by LC-MS/MS in MRM mode. Results, this method was in the linear range of  $0.1 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ , linear correlation coefficient of  $>0.999 0$ , the detection limit of the method was  $0.01 \text{ mg/kg}$ , and the quantitative limit was  $0.03 \text{ mg/kg}$ . At the spiking levels of  $0.03, 0.10$ , and  $0.50 \text{ mg/kg}$ , the recovery rate of the method was  $88.3\% \sim 95.0\%$ , with RSD was  $5.2\% \sim 8.8\%$ . The method has the advantages of simple pretreatment, low amount of organic solvent, short analysis time, good selectivity and high sensitivity. The method is suitable for the detection of anilazine in tomatoes and cucumbers.

**Keywords:** LC-MS/MS; anilazine; tomato; cucumber; residual amount

敌菌灵化工产品学名 2,4-二氯-6-(邻氯代胺基)均三

氮苯,由三聚氰酰胺与邻氯苯胺在脱酸剂存在下作用而得到的一种杀菌剂,外观为白色至黄色结晶,熔点  $159 \sim 160^\circ\text{C}$ ,能溶于链烃类和其他多数有机试剂,如甲苯、二甲苯、丙酮等(在碱性介质中  $30^\circ\text{C}$  以下即可分解)<sup>[1-2]</sup>。敌菌灵具有低毒、内吸性和杀菌谱较广等特点<sup>[3]</sup>,主要用于防治瓜类中常见的黑星病、炭疽病、霜霉病,水稻中的稻瘟病、胡麻叶斑病、烟草赤星病,番茄斑枯病以及各种农作物中常见的灰霉病等。

农药在农业生产过程中无可避免地被使用,对环境和生物链均有极大的破坏性,而水果、蔬菜上的农药残留问题也是由来已久的,已经对人体健康和生命安全造成了严重的威胁<sup>[4]</sup>。随着人类对农药残留问题的日益重视,日本、美国及欧盟国家都制定了相关标准,规定了在水果、蔬菜和粮食中的最大残留限量值,并对其残留量进行监测。日本农药注册保留标准规定果品(草莓除外)、蔬菜、甜菜等敌菌灵最大残留量(MRL)值为  $10 \text{ mg/kg}$ 、草莓为  $20 \text{ mg/kg}$ ,中国在 GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中规定了敌菌灵在黄瓜和番茄中的最大残留量(MRL)值为  $10 \text{ mg/kg}$ 。

农药残留分析的样品种类繁多,化学组成复杂,要使分析仪器能检测到痕量的残留农药,需对样品进行必要的提取、浓缩和净化处理<sup>[5-6]</sup>。固相萃取是近年发展起来的一种样品预处理技术,由液固萃取和液相色谱柱技术相结合发展而来,能有效地将分析物与干扰组分分离,减少样品预处理过程,操作简单、省时、省力,现已广泛应用于农药残留的分析中<sup>[7]</sup>。目前,测定蔬菜、水果中敌菌灵农药残留量的检测文献和标准方法主要集中在高效液相色谱法<sup>[8-10]</sup>和气质联用法<sup>[11-12]</sup>等,但液相色谱及气质联用法在实际使用中,存在灵敏度较低,选择性较差、分子离子峰难以识别、不能准确区分干扰物及目标物等缺点,文献[12]使用液相色谱—质谱联用法检测敌菌灵但并未对样品进行净化及浓缩。

**作者简介:**陈景春(1987—),男,上海必诺检测技术服务有限公司工程师,在读研究生。E-mail: haru0329@163.com

**收稿日期:**2019-05-16

试验拟通过固相萃取进行净化,结合高效液相色谱—串联质谱高选择性、高灵敏性的优势,对组分复杂的样品进行实时分析,以期能够提供精准的目标物结构信息、相对分子质量等信息,为判定目标物提供依据。

1 试验部分

1.1 试验设备

电子分析天平:BP211D 型,德国 Sartorius 公司;  
高效液相色谱—质谱联用仪:Agilent 1290 + 6470 型,美国安捷伦公司;  
高速冷冻离心机:Sovall ST16R 型,美国赛默飞世尔公司;  
漩涡振荡器:Basic Vortex Mixer 型,美国 Talboys 公司;  
氮吹仪:DC-24 型,上海安谱实验室科技股份有限公司。

1.2 材料与试剂

番茄、黄瓜:购自上海大润发超市;  
乙腈、正己烷、甲醇、丙酮、甲酸:色谱纯,美国 Sigma 公司;  
氯化钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;  
敌菌灵标准物质:(99.0 ± 1.0)%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;  
弗罗里硅土(Florisil)固相萃取柱:500 mg/6 mL,美国 Waters 公司。

1.3 样品提取及净化

准确称取粉碎均匀的样品 10 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,准确加入 20 mL 乙腈溶液,用高速匀浆机均质 1 min,加入 3~5 g 氯化钠于离心管中,盖上瓶盖,于涡旋振荡器上剧烈振荡 5 min。在 4 ℃ 条件下,以 8 000 r/min 离心 10 min,移取乙腈层至圆底烧瓶中,残渣用 20 mL 乙腈反复提取 1 次,合并乙腈层,于 40 ℃ 旋转蒸发至近干,加入 3.0 mL 正己烷振荡溶解,待净化。

依次使用 3 mL 正己烷—丙酮溶液(体积比 85:15)和正己烷分别预淋洗弗罗里硅土固相萃取柱,待正己烷接近流尽时,加入待净化液,用 50 mL 梨形瓶接收洗脱液,用 15 mL 正己烷—丙酮溶液(体积比 85:15)分 3 次冲洗圆底烧瓶后过弗罗里硅土固相萃取柱,收集洗脱液,在 40 ℃ 条件下旋转蒸发至近干。用 1 mL 甲醇溶液溶解,经 0.22 μm 有机相滤膜过滤,待上质谱分析。

1.4 液相及质谱分析条件

1.4.1 液相部分 色谱柱:Infinitylab Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub>(2.7 μm,3.0 mm × 100 mm);流动相:A 为甲醇,B 为 0.1%甲酸水溶液(流动相梯度洗脱条件具体见表 1);流动相流速:0.4 mL/min;进样量:5 μL;色谱柱温:40 ℃。  
1.4.2 质谱部分 离子源类型:电喷雾离子源(ESI);离子源温度:150 ℃;电喷雾电压:1.2 kV;毛细管电压:3 500 V;

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 The gradient elution conditions of mobile phase

| 时间/min | A/% | B/% | 时间/min | A/% | B/% |
|--------|-----|-----|--------|-----|-----|
| 0.0    | 70  | 30  | 4.0    | 95  | 5   |
| 1.0    | 70  | 30  | 4.1    | 70  | 30  |
| 1.1    | 95  | 5   | 5.0    | 70  | 30  |

扫描方式及监测方式分别为正离子扫描及多反应监测(MRM);干燥气温度:350 ℃,干燥气流量:11 L/min;去溶剂气流量:11 L/min;去溶剂气温度:350 ℃;雾化气压力:172 kPa;在正离子扫描模式下,直接进样敌菌灵标准溶液并进行母离子全扫描,确定以分子离子  $m/z$  275 为母离子,然后对其进行子离子扫描,得到 2 个监测离子分别为 153 和 214,并且通过调节毛细管电压,锥孔电压及碰撞能量等,优化质谱参数,并得到最终结果。具体数值见表 2。

表 2 敌菌灵的多反应监测质谱参数

Table 2 The MS parameters in multiple reaction of anilazine

| 定性离子对<br>( $m/z$ ) | 定量离子对<br>( $m/z$ ) | 锥孔电压/<br>V | 碰撞能量/<br>eV |
|--------------------|--------------------|------------|-------------|
| 275/153            | 275/153            | 120        | 25          |
| 275/214            | 275/153            | 120        | 20          |

1.5 标准贮备液及标准工作曲线绘制

准确称取敌菌灵农药标准品,用甲醇定容,得到浓度为 1 mg/mL 标准贮备液,并置于 4 ℃ 冰箱保存。分别吸取适量敌菌灵农药标准贮备液,用甲醇稀释成标准工作液,在空白基质中分别添加 0.1,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 μg 的敌菌灵标准溶液,按样品同样处理后上机测定,得到敌菌灵的标准工作曲线。敌菌灵标准品图谱见图 1。

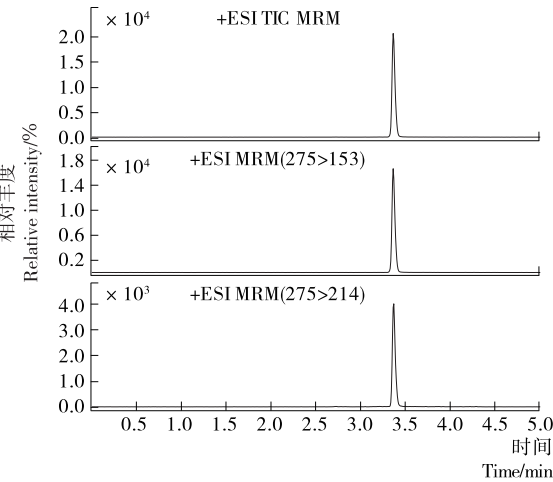


图 1 敌菌灵标准品图谱

Figure 1 MRM chromatogram of anilazine

### 1.6 样品提取溶剂的选择

根据化学性质,敌菌灵易溶于甲醇、乙腈、丙酮等多数有机试剂,在水中几乎不溶解<sup>[1-2]</sup>。试验选取了3种在农药残留检测中常用且极性各不相同的提取试剂:乙酸乙酯、丙酮和乙腈。通过在空白基质中添加敌菌灵标准品,并使用这3种试剂进行提取,测定其样品回收率。

### 1.7 净化固相萃取柱的选择

净化是样品前处理部分的关键环节,选取合适的固相萃取柱能够有效地去除基质中的杂质,缩短净化时间,有效富集被测物,大大提高检测的灵敏度。方法选择GCB固相萃取柱及Florisil柱进行比对,通过添加敌菌灵标准溶液,经过固相萃取柱净化后,测定其回收率,对其进行比较。

### 1.8 净化固相萃取柱的选择

于15 mL试管中加入适量的敌菌灵标准工作液,氮吹至近干后,加入3 mL正己烷溶解,涡旋混和均匀,通过预淋洗完的Florisil柱,分别用5, 10, 15, 20 mL 4种不同用量的正己烷—丙酮溶液(体积比85:15)进行洗脱,同时收集洗脱液,40℃条件下氮吹至近干,用1 mL甲醇溶解,经0.22 μm有机相滤膜过滤,上机分析。

### 1.9 基质效应的评价

吸取适量敌菌灵农药标准贮备液,分别使用甲醇及空白样品处理液进行定容,得到相同浓度的工作液后上机测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品提取溶剂的选择

提取结果显示,乙酸乙酯、丙酮和乙腈3种试剂均能有效提取敌菌灵,回收率分别为95%, 92%, 97%(均大于80%),能达到农药残留分析的要求<sup>[13]</sup>。其中使用乙腈提取时,在提取液加入氯化钠并振荡离心后能够与水相有效分离,而丙酮却难以与基质中的水分离,为下一步的净化工作带来困难。与此同时,乙腈相较于乙酸乙酯,在样品中提取出的色素、脂肪、蛋白等杂质少,有利于下一步的净化。综合考虑,选择乙腈作为提取试剂。

### 2.2 净化固相萃取柱的选择

通过试验发现,GCB柱具有优异的色素、杂质吸附性能,但对被测物有较强的吸附,且难以洗脱,造成试验整体回收率偏低,其回收率在70%左右,而相对Florisil柱的回收率达到95%。故方法选择色素吸附性能稍弱,但利于被测物洗脱,能够满足试验回收率要求的Florisil固相萃取柱作为净化用固相萃取柱。

过GCB、Florisil固相萃取柱标准品图谱见图2、3。对比图2~3可知,GCB固相萃取柱和Florisil固相萃取柱都能基本去除基质中的干扰杂质,但使用GCB柱净化相对回收率较低,综合被测物回收率及净化效果,最终选择Florisil固相萃取柱为净化用固相萃取柱。

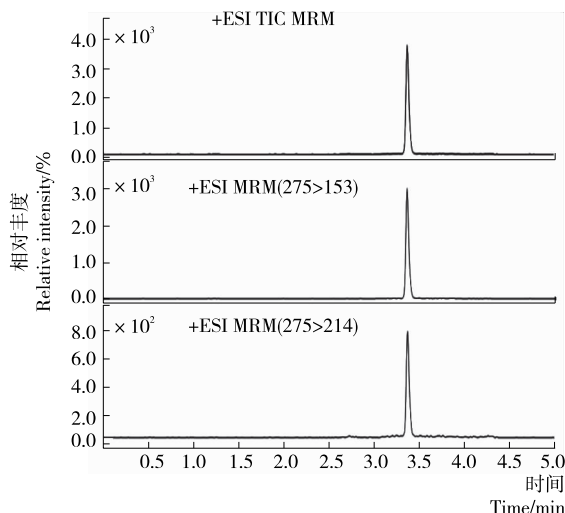


图2 过GCB固相萃取柱标准品图谱

Figure 2 MRM chromatogram of anilazine through GCB solid phase extraction column

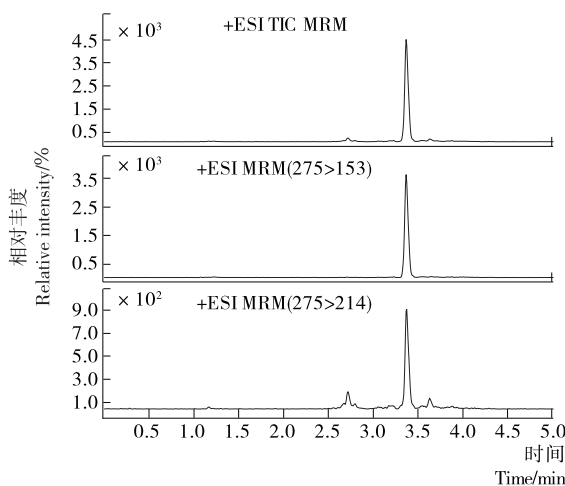


图3 过Florisil固相萃取柱标准品图谱

Figure 3 MRM chromatogram of anilazine through florisil solid phase extraction column

### 2.3 固相萃取柱洗脱液的选择

淋洗液与回收率图谱见图4。由图4可知,洗脱液使用量为5 mL时,敌菌灵的回收率仅达到25%左右,并不能满足农残分析要求;当洗脱液用量提高到15 mL时,几

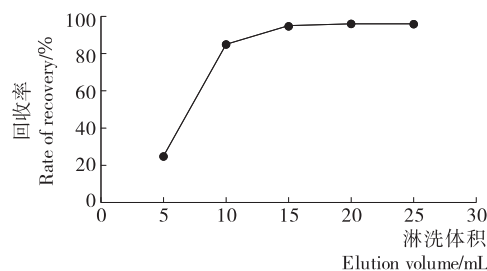


图4 淋洗液与回收率图谱

Figure 4 The linear graph of eluent and recovery rate

乎能完全将敌菌灵洗脱,回收率达到 95%;增加使用量至 20 mL 时,未能显著提高回收率,故在综合成本及效率因素考虑后,方法选择使用 15 mL 正己烷—丙酮溶液(体积比 85:15)进行洗脱。

#### 2.4 基质效应的评价

经过上机测定后发现,在番茄及黄瓜基质中敌菌灵的离子化效率较甲醇溶液中低,基质效应在 80% 左右,结果见表 3。故在样品分析时采用相同基质内添加标准物质进行标准曲线校正以消除基质效应的影响。

表 3 敌菌灵的基质效应

Table 3 The matrix effect of anilazine

| 基质  | 黄瓜     | 番茄     | 甲醇      |
|-----|--------|--------|---------|
| 峰面积 | 83 442 | 82 192 | 103 937 |

#### 2.5 线性关系与检出限

以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制敌菌灵标准工作曲线如图 3 所示,在 0.1~10.0  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内呈线性关系,线性方程为  $Y=172.63X-335.62$  ( $R^2=0.999\ 8$ )。

同时以 3 倍信噪比,测得敌菌灵方法检出限为 0.01 mg/kg;以 10 倍信噪比,测得敌菌灵方法定量限为 0.03 mg/kg。

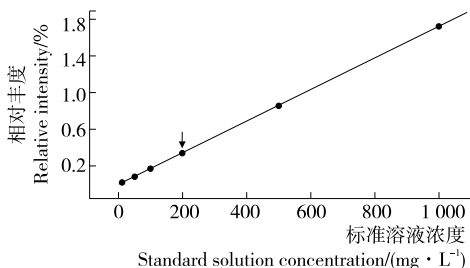


图 5 敌菌灵的标准工作曲线

Figure 5 The calibration curve of anilazine

#### 2.6 准确度及精密度试验

采用标准物质添加法,选取番茄及黄瓜阴性样品,分别添加 0.03、0.10、0.50 mg/kg 进行回收率试验,每个添加水平重复测定 6 次,测定后得到敌菌灵在番茄及黄瓜基质中的回收率及相对标准偏差(RSD)见表 4。

### 3 结论

试验采用固相萃取前处理,建立了高效液相色谱—串联质谱法测定番茄和黄瓜中敌菌灵残留量的方法,并优化了试验条件,在保证分离度的前提下,采用固相萃取小柱净化,以  $\text{C}_{18}$  色谱柱为分离柱,以甲酸水—乙腈为流动相进行梯度洗脱,经 LC-MS/MS 检测,以多反应监测模式监测目标化合物的特征离子进行定性定量分析。该方法添加回收率在 88.3%~95.2%,变异系数在 4.5%~8.8%。试验证明高效液相色谱—串联质谱法前处理方法

表 4 敌菌灵回收率及相对标准偏差测定结果

Table 4 Result of the recovery rate and relative standard deviation of anilazine

| 基质 | 添加水平/<br>( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | 平均回收量/<br>( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | 平均回收<br>率/% | RSD/<br>% |
|----|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------|-----------|
| 番茄 | 0.03                                          | 0.026 5                                        | 88.3        | 8.8       |
|    | 0.10                                          | 0.091 8                                        | 91.8        | 6.9       |
|    | 0.50                                          | 0.475 0                                        | 95.0        | 5.2       |
| 黄瓜 | 0.03                                          | 0.026 9                                        | 89.7        | 6.4       |
|    | 0.10                                          | 0.092 2                                        | 92.2        | 4.5       |
|    | 0.50                                          | 0.476 1                                        | 95.2        | 5.1       |

简单、分离被测物能力强,能准确定量、定性;能够节省分析时间,提高检测效率。使用试验方法完全可以满足番茄和黄瓜中敌菌灵残留量的日常检测需求。但由于研究过程中,采用基质种类与数量有限,在叶菜类等类似基质样品中的利用有待进一步的探索和研究。

#### 参考文献

- [1] 新农农药敌菌灵[J]. 湖南化工, 1972(4): 68.
- [2] 王景明, 王国庆. 三聚氰胺在精细化工领域中的应用[J]. 河北化工, 1995(3): 43-47.
- [3] 刘宁, 李健, 刘涛. 食品中敌菌灵残留分析研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 155-157.
- [4] 徐秋生, 刘俊, 贺慧琳, 等. SPE-HPLC 测定黄瓜中敌菌灵和苯甲酰胺类农药残留[J]. 食品工业, 2017, 38(4): 310-313.
- [5] 刘士华, 王兴征, 侯淑云, 等. 农药残留检测前处理步骤及其质量控制[J]. 北京农业, 2014(15): 5-6.
- [6] 胡宝文, 安尔松. 固相萃取在农药残留分析中的应用[J]. 天津农业科学, 2006(1): 41.
- [7] 李健, 刘宁, 陈平, 等. 食品中敌菌灵残留量的 HPLC 测定方法研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 278-281.
- [8] 徐秋生, 刘俊, 贺慧琳, 等. SPE-HPLC 测定黄瓜、番茄中敌菌灵和异菌脲残留量[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3): 157-161.
- [9] 中华人民共和国农业部. NY/T 1722—2009 蔬菜中敌菌灵残留量的测定 高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009: 1-4.
- [10] 徐秋生, 刘俊, 贺慧琳, 等. 固相萃取—高效液相色谱法测定蔬菜中残留的敌菌灵和苯甲酰胺类杀虫剂[J]. 分析仪器, 2016(6): 23-28.
- [11] 罗祎, 李立, 袁宗辉, 等. 粮谷中敌菌灵的 GC-MS 检测方法研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 544-546.
- [12] 郑姝宁, 李凌云, 林桓, 等. 超快速液相色谱—串联质谱法快速筛查蔬菜中 176 种农药的残留量[J]. 色谱, 2013, 31(1): 71-78.
- [13] 中华人民共和国农业农村部. NY/T 788—2018 农作物中农药残留试验准则[S]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 5-6.