固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定中药材中 7 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的残留量

张育乐¹, 黄超群², 朱晓雨^{2*}, 陈笑梅^{1,2}, 莫卫民¹

(1. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江出入境检验检疫局, 浙江 杭州 310016)

摘要:建立了采用固相萃取-液相色谱-串联质谱同时测定麦冬、玄参、延胡索中 7 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂残留量的方法。样品经乙酸乙酯提取,氨基固相萃取柱净化后,经 C₁₈ 色谱柱分离,以甲醇和 1.0% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱,电喷雾正离子模式离子化,选择反应监测方式监测,串联质谱测定,外标法定量。结果显示,各目标物在 1 或 2 个数量级浓度范围内的线性关系良好,相关系数均大于 0.996。醚菌胺、啉氧菌酯和肟菌酯的定量限为 2 μg/kg,嘧菌酯和吡唑醚菌酯的定量限为 4 μg/kg, Z-苯氧菌胺和醚菌酯的定量限为 10 μg/kg。各杀菌剂的回收率为 60.4% ~ 110%,相对标准偏差为 1.2% ~ 17%。该方法能满足麦冬、玄参、延胡索中 7 种目标杀菌剂残留量的检测。

关键词:固相萃取;液相色谱-串联质谱法;甲氧基丙烯酸酯类杀虫剂;中药材

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2013)03-0264-06

Determination of seven strobilurin fungicide residues in Chinese herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction

ZHANG Yule¹, HUANG Chaoqun², ZHU Xiaoyu^{2*}, CHEN Xiaomei^{1,2}, MO Weimin¹

(1. College of Chemical Engineering and Material, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310016, China)

Abstract: An LC-MS/MS method was developed for the simultaneously determination of seven strobilurin fungicide residues in Chinese herbs. The strobilurin fungicides include Z-metominostrobin, kresoxim-methyl, dimoxystrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, azoxystrobin and trifloxystrobin. The sample was extracted with ethyl acetate and cleaned-up by an amino SPE column. The seven strobilurin fungicide residues were separated on a C₁₈ column with gradient elution of 1.0% formic acid and methanol as mobile phases, and detected by ESI-MS in positive ion and selective reaction monitoring (SRM) mode. External standard method was used to the quantification with good linear relationships ($r \geq 0.996$). The LOQs were 2 μg/kg for dimoxystrobin, picoxystrobin and trifloxystrobin, 4 μg/kg for pyraclostrobin and azoxystrobin, 10 μg/kg for Z-metominostrobin and kresoxim-methyl. The recoveries were from 60.4% to 110% with the RSDs between 1.2% and 17%. The developed method is suitable for the determination and confirmation of the seven strobilurin fungicide residues in the three of Eight Zhes (*Ophiopogon japonicus* (Thunb.), *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. and *Corydalis yanhusuo* W T Wang).

Key words: solid phase extraction (SPE); liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); strobilurin fungicides; Chinese herbs

全球环境的不断恶化使得农药的使用受到了越来越大的压力,但为了维持全球几十亿人的生存,人类仍然离不开农药。然而我们不能由此忽视农药带来的负面影响。为了使农药在起到防治作物病虫害

作用的同时,对人类健康的危害又很小,近年来人们更加关注生物源及仿生农药的开发。甲氧基丙烯酸酯类(strobilurin fungicides)杀菌剂是以生物源物质天然抗生素 strobilurin A 为先导化合物开发的新

* 通讯联系人. Tel: (0571) 81100628, E-mail: zxy@zjz.gov.cn.

基金项目: 质量检验公益性行业科研专项(201310149-01).

收稿日期: 2012-10-25

型杀菌剂,是能量生成抑制剂,具有广谱性及较高的杀菌活性,对已经对二甲酰亚胺类和苯并咪唑类杀菌剂等产生抗性的菌株有效。目前我国对该类农药还未做限量规定,但为了应对国外贸易技术壁垒,促进该类杀菌剂的科学合理使用,建立此类农药的检测方法非常必要。

浙江省的道地药材很多,其中以“浙八味”(白术、白芍、浙贝母、杭白菊、延胡索、玄参、笕麦冬、温郁金)最为有名。通过查阅大量“浙八味”病虫害防治的相关文献^[1,2],发现甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂在延胡索、玄参、笕麦冬的栽培中有所应用。

目前,甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的测定主要采用飞行时间质谱和离子阱质谱法^[3]、液相色谱-串联质谱法^[4-8]、气相色谱-质谱法^[9-12]、气相色谱法^[12-14]和高效液相色谱法^[15,16],但测定的样品多是水果、蔬菜、谷物等,且只包含此类杀菌剂中的一种或少数几种。有关中药材中甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的测定未见相关报道。鉴于串联质谱检测方法越来越多地用于农药残留的测定^[17,18],本研究建立了一种采用液相色谱-质谱/质谱同时测定中药材中多种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Thermo TSQ Quantum Ultra 液相色谱-串联质谱仪,配电喷雾电离源(美国 Thermo Fisher 公司); Surveyor 液相色谱系统(美国 Finnigan 公司); Amino SPE 柱(500 mg, 6 mL;美国 Waters 公司);均质器(德国 IKA 公司);台式离心机(美国 Thermo 公司); Rotavapor R-210 旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司);涡旋混匀器(上海医大仪器厂);超纯水净化系统(美国 Millipore 公司); AE260 电子天平(瑞士 Mettler 公司);微孔过滤膜(0.22 μm, 有机相)。

乙酸乙酯、甲醇、甲苯、甲酸(HPLC 级,美国 Tedia 公司);氯化钠(分析纯,赫维化工有限公司)。

标准品:醚菌胺、啉氧菌酯、肟菌酯、嘧菌酯、吡唑醚菌酯、Z-苯氧菌胺和醚菌酯(纯度大于 99.5%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。标准储备液:分别准确称取每种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂标准品各 10 mg(依据纯度换算),用甲醇溶解并定容至 50 mL,配制成质量浓度均为 200 mg/L 的标准储备液。进一步稀释成混合标准工作溶液。取一定量 1.2 节所述提取净化后的空白样品液,氮气吹干,加入等量的标准工作液,得到基质匹配标准曲线溶液。

1.2 样品处理

1.2.1 提取

称取 2 g(精确至 0.01 g)中药材试样于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 超纯水浸泡 15 min;再加入 15 mL 乙酸乙酯,均质 1 min;加入 5 g 氯化钠,摇匀,离心。吸取上层有机相于 100 mL 浓缩瓶中。重复提取一次,合并提取液,浓缩至近干,用 5 mL 乙酸乙酯-甲苯(7:3, v/v)定容,混匀,待净化。

1.2.2 净化

取 1.0 mL 试液,转移至预活化的氨基固相萃取柱,用 10 mL 乙酸乙酯-甲苯(7:3, v/v)洗脱,收集洗脱液,浓缩至近干;用 4.0 mL 甲醇溶解并定容,混匀,过滤,供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.3 液相色谱与质谱条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent XDB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm);流动相:甲醇(A)和 1.0%甲酸溶液(B)。梯度洗脱程序:0~2.0 min, 40% A; 2.0~4.0 min, 40% A~80% A; 4.0~8.0 min, 80% A; 8.0~9.0 min, 80% A~40% A; 9.0~13.0 min, 40% A。流速:250 μL/min;进样量:10 μL;柱温:室温。

1.3.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源;扫描方式:正离子方式;监测方式:选择反应监测(SRM);电喷雾电压:3 500 V;离子化温度:300 ℃;毛细管温度:300 ℃。雾化气、气帘气均为高纯氮气;碰撞气为氩气,压力为 0.2 Pa;鞘气流速:6.5 L/min;辅助气流速:5.0 L/min。其他质谱条件如表 1 所示。

表 1 7 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的选择反应监测串联质谱条件
Table 1 MS/MS parameters of the seven strobilurin fungicides in SRM mode

Compound	Qualitative and quantitative ions (<i>m/z</i>)	Collision energy/V	Tube lens voltage/V	Retention time/min
Z-Metaminostrobin (Z-苯氧菌胺)	285.1/196.0*	12	125	5.54
	285.1/65.0	31		
Kresoxim-methyl (醚菌酯)	313.9/266.9*	5	98	7.32
	313.9/234.9	13		
Dimoxystrobin (醚菌胺)	326.9/115.9*	22	99	7.24
	326.9/205.0	5		
Picoxystrobin (啉氧菌酯)	367.9/144.9*	20	103	6.94
	367.9/114.9	45		
Pyraclostrobin (吡唑醚菌酯)	387.9/193.9*	9	106	7.83
	387.9/162.9	22		
Azoxystrobin (嘧菌酯)	403.9/328.9*	28	107	5.87
	403.9/344.0	23		
Trifloxystrobin (肟菌酯)	408.9/185.9*	17	108	8.57
	408.9/205.9	14		

* Quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择

采用 7 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂标准溶液 (质量浓度均为 1.0 mg/L) 在电喷雾正离子模式下进行母离子全扫描, 确定准分子离子峰 $[M + H]^+$;

调节喷雾电压、离子化温度、透镜补偿电压等参数后进行子离子扫描, 优化碰撞能量; 每个化合物选择 2 个子离子, 以响应值较高的子离子作为定量离子, 另一个作为辅助定性离子。优化后的参数见表 1。7 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂混合标准溶液的 SRM 色谱图见图 1。

图 1 7 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂标准溶液的 SRM 色谱图
Fig. 1 Chromatograms for a mixture of the seven standard solutions in SRM mode

2.2 提取条件的选择

2.2.1 提取溶剂的选择

有文献报道采用乙腈^[3,9,10]、乙酸乙酯-环己烷^[4,6,10]、乙酸乙酯^[3,4]、丙酮^[12]作为提取甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的溶剂,本文通过试验比较了几种提取溶剂的提取效果。结果表明:用乙腈提取时,样品不易和水分层;以丙酮为提取溶剂,浓缩时难以浓缩至干;用乙酸乙酯、乙酸乙酯-环己烷(1:1, v/v)提取时,目标物的回收率差别不大,均能满足实验要求。考虑到实验的方便性及环己烷的毒性,本文选取了毒性小的乙酸乙酯作为提取溶剂。

2.2.2 提取方法的选择

考察了用乙酸乙酯在超声波萃取仪、振荡器、均质器上对加标样品的提取效果。各测试两个平行样。结果表明:超声波提取和振荡提取不但耗时,且对于质地较轻的样品经超声或振荡提取,离心后基质仍分布于上清液中,影响提取和净化效果。故本法选择快速方便的均质提取。

2.3 净化条件的选择

文献报道,测定水果、蔬菜中的甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂时采用的净化方法有 GPC 净化^[10]、氨基柱净化^[9]、QuEChERS 净化^[4]。由于 GPC 净化时间长,耗费大量溶剂,因此本文仅对氨基柱净化和 QuEChERS 净化方法进行了比较。

试验结果表明:采用 QuEChERS 的净化效果不如氨基柱理想,杂质峰较多(见图2);同时由于基质抑制作用,采用 QuEChERS 方法所得的回收率比氨基柱低 15% 左右(见图3)。因此,本方法选择氨基柱净化。另外,所测定的中药材中含有大量的皂苷,其可转变为糖类,而氨基柱能较好地去除糖类杂质。

2.4 淋洗条件的优化

分别用不同配比的正己烷-乙酸乙酯、乙酸乙酯-乙腈及乙酸乙酯、乙腈淋洗氨基柱上的目标化合物,进行淋洗条件的优化。

结果表明,以乙酸乙酯为洗脱液时,除吡唑醚菌酯外,其余物质大部分已淋洗出来。继续用极性较强的乙酸乙酯-乙腈及乙腈淋洗,吡唑醚菌酯仍未淋洗出来。由于目标化合物与氨基柱的吸附或键合作用过强,考虑在淋洗液中加入甲苯,甲苯能降低氨基柱对某些含苯环化合物的吸附作用,又由于目标化合物和甲苯结构中均含有苯环(相似相溶),可将吡唑醚菌酯从氨基柱上洗脱下来。本方法考虑到各目标化合物的极性,经过试验发现,使用 10 mL 的乙酸乙酯-甲苯(8:2, v/v)不能将吡唑醚菌酯完全洗脱,而使用相同体积的乙酸乙酯-甲苯(7:3, v/v)则可将吡唑醚菌酯较为完全地洗脱下来。

图2 QuEChERS方法和氨基柱的净化效果

Fig. 2 Effects of QuEChERS method and an amino SPE column on the clean-up efficiency

a. blank sample cleaned-up by QuEChERS method; b. blank sample cleaned-up by an amino SPE column; c. spiked sample cleaned-up by QuEChERS method; d. spiked sample cleaned-up by an amino SPE column.

图3 QuEChERS方法和氨基柱净化方法对7种目标物回收率的影响

Fig. 3 Effects of QuEChERS and an amino SPE column on the recovery

Compounds: 1. Z-metominostrobin; 2. kresoxim-methyl; 3. dimoxystrobin; 4. picoxystrobin; 5. pyraclostrobin; 6. azoxystrobin; 7. trifloxystrobin.

2.5 线性关系和定量限

本文采用外标法定量,用样品加标方法做回收率测定。在麦冬、玄参、延胡索 3 种药材中添加标准品,同时做空白试验。本试验中样品存在基质效应,某些基质对离子信号强度具有增强或抑制效应,导致测定结果偏高或偏低,因此在标准曲线的制作中,采用样品基质溶液配制标准工作液以提高方法的准确性。各类杀菌剂的检出限(以 $S/N=3$ 计)、定量限(以 $S/N=10$ 计)及线性关系参数见表 2。

2.6 回收率和精密度

选用不含待测组分的麦冬、玄参、延胡索样品进行 3 个浓度水平的添加回收试验。每个浓度水平平行测定 6 次,相应的回收率和 RSD 见表 3。结果表明,本方法对于 7 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的回

收率为 60.4%~110%, RSD 为 1.2%~17%。

表 2 7 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的检出限、定量限、线性范围及相关系数
Table 2 Limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), linear ranges and correlation coefficients of the seven strobilurin fungicides

Compound	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)	Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	Correlation coefficient
Dimoxystrobin	0.5	2.0	1.0–20	0.9999
Picoxystrobin	0.5	2.0	1.0–20	0.9999
Trifloxystrobin	0.5	2.0	1.0–20	0.9997
Pyraclostrobin	1.5	4.0	2.0–40	0.9995
Azoxystrobin	1.0	4.0	2.0–40	0.9990
Z-Metominostrobin	3	10	5.0–100	0.9997
Kresoxim-methyl	2.5	10	5.0–100	0.9995

表 3 中药材中 7 种杀菌剂的加标回收率和精密度 ($n=6$)
Table 3 Recoveries and precisions of the seven strobilurin fungicides in Chinese herbs ($n=6$)

Compound	Spiked/ ($\mu\text{g/kg}$)	<i>Ophiopogon japonicus</i> (Thunb.) (麦冬)		<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl. (玄参)		<i>Corydalis yanhusuo</i> W T Wang (延胡索)	
		Recovery range/%	RSD/%	Recovery range/%	RSD/%	Recovery range/%	RSD/%
Dimoxystrobin	2	99.5–109	3.9	78.2–94.1	6.9	85.7–109	8.0
	5	78.0–98.0	8.2	73.9–79.8	2.7	81.7–100	7.8
	10	77.1–109	12	76.8–94.6	7.8	80.4–98.7	8.0
Picoxystrobin	2	73.5–99.0	9.5	66.5–90.6	12	88.8–104	5.3
	5	68.1–93.6	12	61.4–75.3	8.0	81.7–96.3	6.2
	10	75.1–85.9	4.6	60.4–80.2	12	80.4–96.6	7.1
Trifloxystrobin	2	72.9–90.2	8.4	66.6–96.3	16	83.7–109	9.2
	5	67.2–85.9	8.5	66.4–87.2	12	77.6–96.0	7.8
	10	71.9–80.3	4.5	70.2–89.5	12	75.0–102	13
Pyraclostrobin	4	98.1–107	3.4	67.3–87.4	11	88.4–103.0	5.0
	10	79.3–90.4	4.8	68.2–83.3	7.6	83.1–97.6	5.5
	20	75.0–95.1	10	67.5–82.1	7.1	82.8–88.2	2.7
Azoxystrobin	4	77.2–109	13	69.2–109	17	86.6–107	9.1
	10	78.0–87.9	4.8	70.2–86.2	8.2	80.1–99.8	7.1
	20	72.1–90.4	8.9	76.4–88.3	6.0	85.0–94.5	4.0
Z-Metominostrobin *	10	82.4–94.7	4.9	88.8–96.7	3.2	98.9–104	2.0
Kresoxim-methyl	10	86.1–89.5	1.2	70.3–91.2	11	92.3–110	6.7
	25	73.5–91.9	7.5	69.0–78.6	5.7	77.4–105	11
	50	71.2–87.3	7.5	73.6–94.7	8.5	80.2–93.6	5.7

* without higher spiked level because of the low concentration of standard solution bought.

3 结论

建立了中药材中甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的液相色谱-串联质谱测定方法。本方法操作简单、方便,重现性较好。另外,甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂作为低毒的仿生农药在欧洲国家的应用已经较为普遍,符合社会发展趋势。加强此类杀菌剂的检测方法研究不但可以应对国外贸易技术壁垒,同时为今后此类农药的普遍使用奠定了技术基础。

参考文献:

[1] Wang D L. Journal of Anhui Agri Sci (王答龙. 安徽农业科

学), 2008, 36(23): 10037

[2] Wang S W, Hou Z G, Zou J, et al. Agrochemicals (王思威, 侯志广, 邹静, 等. 农药), 2010, 49(6): 436

[3] Schurek J, Vaclavik L, Hooijerink H (Dick), et al. Anal Chem, 2008, 80: 9567

[4] Banerjee K, Oulkar D P, Patil S B, et al. J Agric Food Chem, 2009, 57: 4068

[5] Lissalde S, Mazzella N, Fauvelle V, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 1492

[6] Zhang F, Wang L, Zhou L, et al. Ecotoxicol Environ Saf, 2012, 78: 116

[7] Zheng J H, Pang G F, Fan C L, et al. Chinese Journal of Chromatography (郑军红, 庞国芳, 范春林, 等. 色谱), 2009, 27(3): 254

[8] Xu Y J, Geng J P, Zhang X Z, et al. Chemical Research and

- Application (徐英江, 耿金培, 张秀珍, 等. 化学研究与应用), 2009, 21(12): 1704
- [9] Wang Y F, Ge B K, Gao J H, et al. Food Research and Development (王云凤, 葛宝坤, 高建会, 等. 食品研究与开发), 2009, 30(4): 130
- [10] Bo H B, Wang J H, Guo C H, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (薄海波, 王金花, 郭春海, 等. 分析化学), 2008, 36(11): 1471
- [11] SN/T 2237-2008
- [12] Wu J L, Wang H C, Wu X T, et al. Chinese Journal of Pesticide Science (吴加伦, 王怀昌, 武秀婷, 等. 农药学报), 2012, 14(1): 67
- [13] Wu J S, Feng J W, Ren Y X, et al. Agrochemicals (吴洁珊, 冯家望, 任永霞, 等. 农药), 2011, 50(10): 754
- [14] Bo H B, Bi Y, Chen L R, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (薄海波, 毕阳, 陈立仁. 分析化学), 2005, 33(5): 695
- [15] de Melo Abreu S, Pierluigi C, Cabrasb P, et al. Anal Chim Acta, 2006, 573: 291
- [16] Luo L L, Bo H B, Bi Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (雒丽丽, 薄海波, 毕阳, 等. 色谱), 2009, 27(2): 201
- [17] Chen D J, Zhang Z G, Zhou Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (陈达捷, 张志刚, 周昱, 等. 色谱), 2012, 30(9): 896
- [18] Li J G, Wang Y F, Shi J W, et al. Chinese Journal of Chromatography (李继革, 王玉飞, 施家威, 等. 色谱), 2012, 30(3): 262