改进的 QuEChERS-气相色谱-质谱联用法测定
蔬菜中的氟吗啉和烯酰吗啉残留

丁立平^{1*}, 蔡春平², 王丹红²
(1. 福清出入境检验检疫局技术中心, 福建 福清 350300;
2. 福建出入境检验检疫局技术中心, 福建 福州 350001)

摘要:建立了同时测定蔬菜中氟吗啉和烯酰吗啉残留的改进的 QuEChERS-气相色谱-质谱(GC-MS)联用法。前处理过程以乙腈高速匀浆提取样品,应用改进的 QuEChERS 方法对样品进行提取、盐析和净化,并采用气相色谱-质谱联用仪在选择离子监测(SIM)模式下测定了多种蔬菜中的氟吗啉和烯酰吗啉残留量,以基质匹配标准溶液外标法定量。选用 DB-5 MS 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),流速 1.1 mL/min,采用电子轰击电离源,选择监测离子氟吗啉为 m/z 285、371、165;烯酰吗啉为 m/z 301、387、165。结果表明:在优化条件下,氟吗啉和烯酰吗啉在 10~1 000 μg/kg 范围内线性关系良好,相关系数不低于 0.999,不同基质中的检出限($S/N=3$)范围为 0.67~2.42 μg/kg。对于生姜、番茄、胡萝卜、菠菜、甘蓝和白木耳空白样品,在 10、20、100 μg/kg 共 3 个水平下氟吗啉和烯酰吗啉的加标回收率为 71%~116%,相对标准偏差(RSD)为 1.8%~14.7%。同时,本研究对蔬菜中氟吗啉和烯酰吗啉残留检测的裂解机理和基质效应进行了考察。本方法具有操作简便、快速、准确的特点,可用于蔬菜中氟吗啉和烯酰吗啉残留量的日常检测。

关键词:改进的 QuEChERS;气相色谱-质谱;氟吗啉;烯酰吗啉;蔬菜;残留
中图分类号:O658 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8713(2014)08-0849-06

Determination of flumorph and dimethomorph residues
in vegetables by improved QuEChERS-gas
chromatography-mass spectrometry

DING Liping^{1*}, CAI Chunping², WANG Danhong²
(1. Technology Center of Fuqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuqing 350300, China;
2. Technology Center of Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

Abstract: To determine the residues of flumorph and dimethomorph in vegetables, a method was established with improved QuEChERS-gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). With acetonitrile as the extraction solvent, the samples were pretreated with the improved QuEChERS method including extraction, salting-out and purification processes. Then all the sample extracts were analyzed with GC-MS in selected-ion monitoring (SIM) mode, and quantified by matrix-matched standard solution in external standard method. Under electron ionization conditions, the analysis was carried out with a capillary column (DB-5 MS, 30 m×0.25 mm×0.25 μm) at a flow rate of 1.1 mL/min. The quantitation was performed to detect ions of m/z 285, 371, 165 for flumorph and m/z 301, 387, 165 for dimethomorph. Good linearity was obtained in the range of 10–1 000 μg/kg for both pesticides with correlation coefficients greater than 0.999. The recovery experiments were carried out by spiking blank samples of ginger, tomato, carrot, spinach, cabbage and tremella at the three levels of 10, 20 and 100 μg/kg. For both pesticides in different matrices, the limits of detection ($S/N=3$) were in the range of 0.67–2.42 μg/kg. The average recoveries of flumorph and dimethomorph ranged from 71% to

* 通讯联系人.E-mail:43548624@qq.com.
基金项目:国家质检总局项目(2013IK148);福建出入境检验检疫局项目(FK2013-18,FK2013-19).
收稿日期:2014-06-05

116% with the relative standard deviations (RSDs) in the range of 1.8%–14.7%. Meanwhile, the pyrolysis mechanism and matrix effect for the determination of flumorph and dimethomorph in vegetables were investigated in this study. The method is simple, rapid and accurate, and can be used for the routine analysis of flumorph and dimethomorph in vegetables.

Key words: improved QuEChERS; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); flumorph; dimethomorph; vegetables; residue

氟吗啉和烯酰吗啉(见图1)属于羧酸酰胺类(carboxylic acid amides, CAAs)真菌杀菌剂,化学名分别为(*E,Z*)-4-[3-(4-氟苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)丙烯酰]吗啉和(*E,Z*)-4-[3-(4-氯苯基)-3-(3,4-二甲氧基苯基)丙烯酰]吗啉,在农业生产中主要用于防治卵菌病害,对甘蓝、番茄等植物的卵菌病害具有优良治疗作用^[1]。其中,氟吗啉是我国第一个自主创制、具有自主知识产权且商品化的杀菌剂^[2]。研究显示这两种农药属于中低毒性杀菌剂,但对人畜仍具有一定的毒性危害^[3,4]。由于烯酰吗啉已广泛使用,其残留水平备受关注,为此美国、日本和欧盟对蔬菜中的烯酰吗啉设定了最大残留限量(MRL),其中欧盟设定值最严格(0.05 mg/kg)^[5]。而氟吗啉作为我国自主创制的新开发农药,尚未见对其设定最大残留限量值^[6]。

当前有关氟吗啉和烯酰吗啉的检测主要集中于使用液相色谱^[7,8]和液相色谱-串联质谱法^[9]。已有的研究中存在液相色谱法检测限高,以及液相色谱-串联质谱仪器设备普及率低的问题,为了更好地适应蔬菜中这两种农药残留检测的需要,亟待开发出快速、实用的检测方法。王惠云等^[10]以及检验检疫行业标准^[11]使用气相色谱-质谱法测定蔬菜和水果中的烯酰吗啉残留,但尚未见同时检测食品中氟吗啉和烯酰吗啉残留的气相色谱-质谱联用法的报道或标准。

2003年Anastassiades等^[12]建立了QuEChERS前处理方法,随着研究的深入该方法不断发

图1 氟吗啉和烯酰吗啉的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of flumorph and dimethomorph

展,并与气相色谱-串联质谱^[13]、液相色谱-串联质谱^[14]相结合,在蔬菜、水果、烟草以及肉类等基质的农兽药残留检测领域得到了广泛的应用。此外,该方法在应用中可根据实际检测需求进行不同的改进。研究表明,根据实际检测需要对QuEChERS方法进行有效的改进可以取得较好的效果^[15]。

本研究探索建立了改进的QuEChERS前处理方法,在蔬菜中氟吗啉和烯酰吗啉残留检测应用中取得了较好的前处理净化效果,并结合气相色谱-质谱联用法实现了对两者的定量和定性分析。此外,本研究对氟吗啉和烯酰吗啉的裂解机理进行了研究,并对检测过程中存在的基质效应进行了考察。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890N-5975B 气相色谱-质谱联用仪,美国 Agilent 公司;IKA T-25 高速分散器,德国 IKA 公司;RV10 旋转蒸发仪,德国 IKA 公司;ZM200 超离心研磨仪,德国 Retsch 公司;3K-15 冷冻离心机,德国 Sigma 公司;Sartorius BS1100S 型分析天平(十万分之一,德国)。

乙腈、乙酸钠、无水硫酸钠、无水硫酸镁(分析纯),国药集团;中性氧化铝(48~75 μm)、石墨化碳(GCB)(分析纯),天津 Agela Technologies 公司。缓冲盐组成:Na₂SO₄ 和 C₂H₃NaO₂ 质量比为 4:1;净化剂组成:MgSO₄、硅胶、GCB 的质量比为 5:9:1;烯酰吗啉(纯度 99.0%)和氟吗啉(纯度 99.0%)标准品,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

1.2 供试样品

生姜、番茄、胡萝卜、菠菜、甘蓝和白木耳样品均购自当地市场,取可食部分制成糜样,冷冻保存在-18℃冰箱中备用。

1.3 实验方法

1.3.1 基质匹配标准溶液配制

选择空白基质样品,使用乙腈进行提取,得到空白基质提取液。称量氟吗啉和烯酰吗啉标准样品各 10.0 mg,用乙腈定容至 100 mL,配制成 100 mg/L 的标准储备液,于-18℃冰箱中保存备用。使用前

根据检测要求使用空白基质提取液稀释成相应浓度的工作溶液。

1.3.2 样品的提取和净化

称取解冻样品 10.0 g 于 50 mL 具塞离心管中,加入 5.0 g 缓冲盐和 20.0 mL 乙腈,以 10 000 r/min 高速匀浆 1 min。另取 50 mL 离心管,加入 20.0 mL 的乙腈清洗高速分散器刀头,然后合并到前一离心管中。合并溶液后的离心管于 4 500 r/min 离心 5 min,上清液全部倒入 100 mL 鸡心瓶中,40 ℃下旋转蒸发近干,加入 2.00 mL 乙腈定容。称取 0.30 g 净化剂加入 5 mL 具塞离心管中,准确加入上述上清液 1.00 mL,涡旋 1 min 混匀,于 10 000 r/min 离心 3 min,取上清液并经 0.22 μm 滤膜过滤,待分析。

1.3.3 气相色谱-质谱条件

气相色谱柱:DB-5 MS 毛细管(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气:高纯氦气(99.999%),恒流模式,柱流速:1.1 mL/min;进样量:1.00 μL,不分流进样;进样口温度:280 ℃;柱升温程序:初始温度 70 ℃,保持 1 min,以 20 ℃/min 升至 260 ℃,保持 2 min,以 5 ℃/min 升至 280 ℃,保持 7 min,以 30 ℃/min 升至 300 ℃,保持 2 min 以去除色谱柱中的残留杂质。

质谱电子轰击离子(EI)源,电子轰击能量 70 eV,单四极杆质量分析器;离子源温度:230 ℃;四极杆温度:150 ℃;传输线温度:280 ℃;全扫描(SCAN)模式:扫描范围 m/z 50~550,确定待测物扫描离子、保留时间和检查有无杂质干扰;溶剂延迟:15 min;选择离子监测(SIM)模式:氟吗啉定量离子 m/z 285,定性离子 m/z 371、165,驻留时间 100 ms;烯酰吗啉定量离子 m/z 301,定性离子 m/z 387、165,驻留时间 100 ms。

1.3.4 工作曲线绘制

将氟吗啉和烯酰吗啉的标准储备液用空白基质提取液稀释成 10、20、40、100、1 000 μg/kg 的系列工作溶液,采用外标法定量。按照 1.3.3 节的条件进行分析。以工作溶液的峰面积为纵坐标(Y),分析物的含量为横坐标(X , μg/kg)绘制工作曲线。

1.3.5 添加回收试验

按照 1.3.2 节条件称取空白样品并加入适量稀释的氟吗啉和烯酰吗啉标准溶液,混匀后静置 2 h,制得加标样品。并按照 1.3.2 节和 1.3.3 节进行前处理和分析测试。对制得的 10、20、100 μg/kg 的 3 个水平的加标样品进行测定(每个水平重复 6 次),计算回收率和相对标准偏差。

1.3.6 定性与定量离子的选择

用乙腈配制 1.0 mg/L 的氟吗啉和烯酰吗啉标准溶液,按照 1.3.3 节中色谱和质谱条件进行全扫描。在 m/z 50~550 范围得到化合物的全扫描质谱图,结合所得全扫描质谱图并依据裂解机理确定定性和定量离子。

1.3.7 基质效应的考察

配制质量浓度为 10、20、40、100、1 000 μg/L 的氟吗啉、烯酰吗啉的基质匹配标准溶液和同样浓度的溶剂标准溶液(用乙腈配制),分别按照 1.3.3 节的条件进行测定,得到基质标准曲线和溶剂标准曲线,以二者斜率的比值 η 来判定基质效应的强弱^[17,18]。 $\eta>1$ 表明基质增强, $\eta<1$ 表明基质抑制。

1.3.8 实际样品的测定

在市场上随机购买 12 份蔬菜样品,分别是胡萝卜 3 份、菠菜 2 份、生姜 2 份、番茄 2 份和甘蓝 3 份,分别按照文献^[11]以及 1.3.2 节和 1.3.3 节进行前处理和分析测试。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理的净化效果

本文借鉴文献^[15]中的前处理方法,应用优化的净化剂组成和用量进行前处理。图 2 显示了 6 种蔬菜基质的净化效果,可见目标化合物无干扰峰影响,表明选择的前处理条件有较好的净化效果。

2.2 定性和定量离子的确定

在 1.3.3 节和 1.3.6 节条件下得到氟吗啉和烯

图 2 生姜、番茄、胡萝卜、菠菜、甘蓝和白木耳的净化效果
Fig. 2 Clean-up effects for ginger, tomato, carrot, spinach, cabbage and tremella samples

酰吗啉的全扫描总离子流图和质谱图,并对两者裂解机理进行研究(见图 3)。发现氟吗啉和烯酰吗啉离子具有相似的裂解机理,都是分子离子发生 α 断裂之后再经过消除反应(*re*)得到 m/z 165 离子。

与文献^[6]提供的断裂机理进行比较,发现该文献中对氟吗啉的裂解推断有待商榷,即文献^[6]未说明裂解机理并且其推断的裂解方式不能得到 m/z 165 的离子碎片。

图 3 氟吗啉和烯酰吗啉的总离子流图、质谱图和推断的裂解机理图

Fig. 3 Total ion chromatogram, mass spectra and inferred mechanisms of mass cleavages of flumorph and dimethomorph

2.3 线性关系、检出限和基质效应

外标法定量结果表明:氟吗啉和烯酰吗啉在 10 ~ 1 000 $\mu\text{g/kg}$ 范围内具有良好的线性关系。两种目标物在不同基质中的线性方程、相关系数、线性范围和检出限见表 1。

2.4 添加回收率

表 2 结果显示,在 10、20 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下,氟吗啉和烯酰吗啉的加标回收率为 71% ~ 116%,相对标准偏差(RSD)为 1.8% ~ 14.7%,结果符合残留物分析的要求^[16]。

表 1 不同基质中氟吗啉和烯酰吗啉的线性范围、线性方程、相关系数(*r*)和检出限(LOD)
Table 1 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients (*r*) and limits of detection (LODs) of flumorph and dimethomorph in different matrices

Matrix	Flumorph				Dimethomorph			
	Regression equation	<i>r</i>	Linear range/ (μg/kg)	LOD/ (μg/kg)	Regression equation	<i>r</i>	Linear range/ (μg/kg)	LOD/ (μg/kg)
Solvent	$Y=3236.5X+23403$	0.9999	10–1000	0.81	$Y=3079.0X+25521$	0.9998	10–1000	1.55
Ginger	$Y=4763.5X-1416.5$	0.9995	10–1000	1.73	$Y=4989.1X-9253.6$	0.9999	10–1000	2.42
Tomato	$Y=5018.8X+27161$	0.9994	10–1000	0.67	$Y=3942.4X+195081$	0.9998	10–1000	1.15
Carrot	$Y=3858.1X+19160$	0.9997	10–1000	0.91	$Y=3184.0X+10525$	0.9994	10–1000	1.58
Spinach	$Y=3172.2X+15941$	0.9996	10–1000	0.83	$Y=2838.5X+5203.4$	0.9995	10–1000	1.31
Cabbage	$Y=2345.7X+51598$	0.9994	10–1000	0.76	$Y=2158.6X-1754.1$	0.9997	10–1000	1.88
Tremella	$Y=4816.5X+2965.2$	0.9998	10–1000	0.83	$Y=5086.8X-23746$	0.9994	10–1000	1.31

LOD: *S*/*N*=3; η : slope ratio of matrix standard curve and solvent standard curve; *Y*: peak area; *X*: mass concentration, μg/kg.

表 2 不同样品中氟吗啉和烯酰吗啉的加标回收率和相对标准偏差(*n*=6)
Table 2 Recoveries and RSDs of flumorph and dimethomorph spiked in different samples (*n*=6)

Sample	Flumorph						Dimethomorph					
	10 μg/kg		20 μg/kg		100 μg/kg		10 μg/kg		20 μg/kg		100 μg/kg	
	Recovery/ %	RSD/ %	Recovery/ %	RSD/ %	Recovery/ %	RSD/ %	Recovery/ %	RSD/ %	Recovery/ %	RSD/ %	Recovery/ %	RSD/ %
Ginger	112	9.7	98	4.7	101	2.3	101	9.0	99	2.9	99	2.2
Tomato	104	7.9	103	8.9	87	6.4	74	1.3	91	7.0	85	5.2
Carrot	114	6.5	98	5.6	92	5.0	84	5.9	83	5.3	86	3.3
Spinach	112	4.5	89	14.6	78	4.5	76	6.2	73	10.1	71	7.0
Cabbage	88	14.7	75	14.2	81	7.9	75	9.0	73	6.7	74	6.8
Tremella	113	3.1	106	5.9	92	2.3	116	5.5	96	1.8	88	1.9

2.5 基质效应分析

基质效应通常表现为样品分析液中共流出物改变了分析目标物的响应值,从而影响定量分析的准确度和重现性。目前,基质效应的产生机制尚未完全研究清楚,研究人员也尝试通过各种手段来加以克服^[17–19],欧盟官方推荐使用同种基质的工作曲线校正来消除^[16]。图 4 是根据 2.3 节中不同基质的基质标准曲线与溶剂标准曲线斜率比值 η 绘制的柱状图,从中可以看出生姜、番茄和白木耳对氟吗啉和烯酰吗啉具有明显的基质增强效应,而甘蓝则对二者有明显的基质抑制效应。

图 4 6 种蔬菜的基质效应

Fig. 4 Matrix effects of six kinds of vegetables

2.6 实际样品检测结果

通过使用标准方法^[11]和本方法对市场购得的 12 份实际样品进行检测,结果表明均无氟吗啉和烯酰吗啉检出。

3 结论

本文应用乙腈高速匀浆提取,以无水硫酸镁、硅胶和石墨化炭混合物为净化剂,GC-MS 检测,外标法定量,建立了蔬菜中氟吗啉和烯酰吗啉残留的同时分析方法。方法方便、快捷、可靠,适用于蔬菜中氟吗啉和烯酰吗啉的快速检测。

参考文献:

[1] Zhu S S, Chen L, Lu X H, et al. Chinese Journal of Pesticide Science (朱书生, 陈磊, 卢晓红, 等. 农药学报), 2010, 12(2): 168
[2] Zhu S S, Liu X L, Li J Q, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (朱书生, 刘西莉, 李健强, 等. 高等学校化学学报), 2006, 27(10): 1887
[3] Li F Z, Wang J, Yao B Y, et al. Journal of Toxicology (李凤珍, 王捷, 姚宝玉, 等. 毒理学杂志), 2005, 19(3): 260
[4] Zhu X P, Cai L M, Wang J. Agrochemicals (朱新萍, 蔡磊明, 王捷. 农药), 2009, 28(7): 511
[5] Wu N C, Li C L, Liu C H. Chinese Journal of Tropical Crops (吴南村, 李春丽, 刘春华. 热带作物学报), 2011, 32(12): 2394

[6] Wang Y S, Yang C H, Zhang C Y, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王岩松, 杨春晖, 张春野, 等. 分析化学), 2012, 40(2): 286

[7] Shao H, Huang Y T, Jin M J, et al. Science and Technology of Food Industry (邵华, 黄玉婷, 金茂俊, 等. 食品工业科技), 2012, 33(16): 70

[8] Li E H, Hu M, Wu B B, et al. Modern Agrochemicals (李二虎, 胡敏, 吴兵兵, 等. 现代农药), 2007, 16(4): 38

[9] Wang Y S, He M R, Zhang C Y, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王岩松, 贺明睿, 张春野, 等. 分析化学), 2012, 40(11): 1764

[10] Wang H Y, Zhang A M, Liu Y B. The Administration and Technique of Environmental Monitoring (王惠云, 张爱美, 刘永波. 环境监测管理和技术), 2009, 21(5): 49

[11] SN/T 2917-2011

[12] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412

[13] Chen X S, Bian Z Y, Yang F, et al. Chinese Journal of Chromatography (陈晓水, 边照阳, 杨飞, 等. 色谱), 2013, 31(11): 1116

[14] Wang L Z, Zhou Y, Huang X Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (王连珠, 周昱, 黄小燕, 等. 色谱), 2013, 31(12): 1167

[15] Ding L P, Liu W, Fang G W, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (丁立平, 刘微, 方光伟, 等. 分析试验室), 2013, 32(8): 117

[16] 2002/657/EC

[17] Huang B Y, Ouyang X H, Pan C P. Chinese Journal of Pesticide Science (黄宝勇, 欧阳喜辉, 潘灿平. 农药学学报), 2005, 7(4): 299

[18] Zhang X Z, Luo F J, Zhang F, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (张新忠, 罗逢健, 张芬, 等. 分析化学), 2012, 40(11): 1686

[19] Huang B Y, Pan C P, Wang Y R, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (黄宝勇, 潘灿平, 王一茹, 等. 高等学校化学学报), 2006, 27(2): 227