

- 法研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(8): 31-33.
- [3] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第235号[EB/OL]. (2002-12-24) [2018-12-20]. http://www.moa.gov.cn/zwllm/nybz/200803/t20080304_1028649.htm.
- [4] 张毅, 岳振峰, 蓝芳, 等. 分散固相萃取净化与液相色谱/串联质谱法测定牛奶中8类禁用药物残留[J]. 分析化学, 2012, 40(5): 724-729.
- [5] 于敏, 张美娟, 张河霞, 等. 高效液相色谱法测定牛奶中硝基咪唑类残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(2): 447-451.
- [6] 张弛, 潘家荣, 帅瑞琪, 等. 动物性食品中硝基咪唑类兽药多残留酶联免疫检测方法的建立[J]. 核农学报, 2016, 30(2): 323-331.
- [7] 何东, 李秀英, 洗燕萍, 等. 气相色谱-质谱法测定祛痘化妆品中4种硝基咪唑类化合物[J]. 分析测试学报, 2015, 34(8): 911-916.
- [8] 方力, 邱凤梅, 余新威, 等. 基质分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测动物源食品中硝基咪唑类药物及其代谢物[J]. 色谱, 2018, 36(5): 431-438.
- [9] 刘永明, 曹彦忠, 李金, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定蜂蜜中3种硝基咪唑类药物残留[J]. 色谱, 2010, 28(6): 596-600.
- [10] 祝子铜, 雷美康, 彭芳, 等. 快速溶剂萃取-凝胶渗透色谱净化-LC/MS/MS结合测定蜂花粉中硝基咪唑类药物[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 522-529.
- [11] 黎翠玉, 吴敏, 严丽娟, 等. 高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(1): 17-22.
- [12] 徐伟, 聂四平, 李军, 等. 甲醛-三氯乙酸沉淀-凯氏定氮法测定牛奶中真蛋白质[J]. 理化检验-化学分册, 2015, 51(1): 31-34.
- [13] 王海静, 朱风华. 三氯乙酸法与硫酸铜法测定饲料真蛋白比较[J]. 饲料研究, 2012(11): 69-71.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑及其代谢物残留的测定 液相色谱-串联质谱法; GB/T 22982—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

实验技术与方法

同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定植物性食品中11种杀菌剂残留量

赵紫微, 刘柏林, 谢继安, 王秀莉, 单晓梅

(安徽省疾病预防控制中心, 安徽 合肥 230601)

摘要:目的 建立快速同时测定植物性食品中11种杀菌剂残留量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法。方法 植物性食品经乙腈提取, 经匀浆和高速离心后采用 QuEChERS 试剂净化, 用 HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)进行分离, 以0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相, 电喷雾电离, 正离子扫描(ESI⁺), 多反应监测(MRM)模式检测目标物, 同位素内标法定量。结果 11种杀菌剂在0.1~50.0 μg/L浓度范围内具有良好的线性, 相关系数(r^2)均大于0.999 1, 检出限为0.2~2.0 μg/kg, 平均回收率范围为63.1%~116.3%, 相对标准偏差(RSD)均小于12.1%。结论 该方法操作简单快速、灵敏度高、准确性好, 适用于对大批量植物性食品中多种杀菌剂的快速测定。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱; 杀菌剂; 植物性食品; 同位素内标; 农药残留; 食品污染物

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2019)01-0022-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.01.006

Rapid determination of 11 fungicide residues in plant foods by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope internal standards

ZHAO Ziwei, LIU Bolin, XIE Ji'an, WANG Xiuli, SHAN Xiaomei

(Anhui Center for Disease Control and Prevention, Anhui Hefei 230601, China)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for rapid and simultaneous determination of 11 fungicide residues in plant foods. **Methods** The plant foods were extracted by acetonitrile with homogenate and high speed centrifugation and purified by QuEChERS reagent. The 11 fungicides were separated on a HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid water-acetonitrile as

mobile phase. The identifications were performed by electrospray ionization with positive scanning mode (ESI⁺) under the multiple reaction monitoring (MRM), and the internal standard method was used to quantify the analytes. **Results** The calibration curves of the 11 kinds of fungicides showed good linearity in the concentration range of 0.1-50.0 μg/L, with the correlation coefficient (r^2) above 0.999 1. The detection limit was 0.2-2.0 μg/kg. The average recoveries were between 63.1% and 116.3%, and the relative standard deviations (RSD) were less than 12.1%. **Conclusion** The method was simple, rapid, sensitive and accurate. It was suitable for rapid determination of various fungicides in a large number of plant foods.

Key words: Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; fungicides; plant foods; isotope internal standards; pesticide residues; food contamination

植物性食品因其美味的口感和丰富的营养而广受人们的欢迎,是人们日常生活中必不可少的副食品。杀菌剂是用于防治由各种病原微生物引起的植物病害的一类农药。使用杀菌剂是防治植物病害的一种常用的方法,因此杀菌剂在植物性食品中检出率较高。杀菌剂的使用过程中会造成食品农药残留、环境污染等问题,当农药残留量超过最大残留限量(MRLs)时,则会对人体产生不同程度的影响^[1]。目前,国际食品法典农药残留委员会(CCPR)、联合国农粮组织(FAO)、美国环境保护部(EPA)、欧盟等权威机构相继制定了各种杀菌剂的最大残留限量标准^[2-3]。我国在2016年发布的GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[4]中,对苯醚甲环唑、三唑酮、甲霜灵、啞霉胺、甲基硫菌灵、多菌灵、丙环唑、戊唑醇、烯酰吗啉、咪鲜胺、腐霉利等在植物性食品中使用率较高的广谱性杀菌剂均有最高残留限量规定。

目前,检测杀菌剂的常见分析方法有气相色谱(GC)法^[5-6]、液相色谱(LC)法^[7-8]、气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法^[9-10]、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法^[11-13]等。近年来,高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)分析技术飞速发展,因其灵敏度高、选择性高等优点被广泛用于农药残留方面的检测。已有报道的相关研究大多采用外标法定量,采用内标法定量的研究^[14]很少。对于基质比较复杂的植物性食品,外标法定量无法避免基质效应的干扰,因此,本研究在前人经验的基础上,建立了一种同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法快速同时测定植物性食品中11种杀菌剂残留量的方法。使用商品化的QuEChERS试剂净化样品简便且快速,通过同位素内标校正保证了方法的灵敏度、分析效率和准确性,适用于大批量样品的快速测定。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

超高效液相色谱-串联质谱仪(ACQUITY™ UPLC-ZEVO TQ MS,美国Waters)、Milli-Q超纯水系统(美国

Millipore)、旋涡混匀器、台式高速冷冻离心机。

11种杀菌剂标准物质:苯醚甲环唑(difenoconazole, CAS: 119446-68-3)、三唑酮(triadimefon, CAS: 43121-43-3)、甲霜灵(metalaxyl, CAS: 57837-19-1)、啞霉胺(pyrimethanil, CAS: 53112-28-0)、甲基硫菌灵(thiophanate-methyl, CAS: 57837-19-1)、多菌灵(carbendazim, CAS: 10605-21-7)、丙环唑(propiconazole, CAS: 60207-90-1)、戊唑醇(tebuconazole, CAS: 107534-96-3)、烯酰吗啉(dime-thomorph, CAS: 110488-70-5)、咪鲜胺(prochloraz, CAS: 67747-09-5)、腐霉利(procymidone, CAS: 32809-16-8)浓度均为100 μg/ml,均购自美国AccuStandard;8种杀菌剂内标准物质:苯醚甲环唑-D₆(纯度:99%)、丙环唑-D₅(CAS: 1246818-14-3,纯度:98%)、戊唑醇-D₆(纯度:95%)均购自德国Dr. Ehrenstorfer,三唑酮-D₄(纯度:98%)、甲霜灵-D₆(CAS: 1398112-32-7,纯度:99%)、啞霉胺-D₅(CAS: 2118244-83-8,纯度:98%)、甲基硫菌灵-D₆(CAS: 1398065-77-4,纯度:99%)、多菌灵-D₄(CAS: 291765-95-2,纯度:98%)均购自加拿大C/D/N ISOTOPES;乙腈、甲酸、C₁₈、N-丙基乙二胺(PSA)散装填料均为色谱纯,无水硫酸镁为优级纯。QuEChERS试剂[PSA 50 mg、C₁₈ 散装吸附剂(EC) 50 mg、石墨碳黑 7.5 mg、无水硫酸镁 150 mg]。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的制备

混合标准应用液:分别准确移取10 μl(其中腐霉利100 μl)各标准储备液(100 μg/ml)于10 ml容量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,得到100 ng/ml(其中腐霉利为1 000 ng/ml)混合标准应用液,现配现用。

混合内标应用液:分别准确移取100 μl各内标储备液于100 ml容量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,得到100 ng/ml混合内标应用液,现配现用。

标准应用液系列:分别准确移取上述混合标准应用液10、50、100、200、500、1 000、5 000 μl到10 ml

容量瓶中,加入 500 μl 混合内标应用液,用乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0 $\mu\text{g/L}$ (其中腐霉利为 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、500.0 $\mu\text{g/L}$) 的标准应用液系列,现配现用。

1.2.2 样品处理

采集超市与农贸市场上当季的水果、蔬菜、菌菇。各类样品搅碎混匀后放入保鲜盒中并标记样品编号,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。称取 5.0 g 匀浆好的样品置于 50 ml 离心管中,加入 500 μl 100 ng/ml (其中腐霉利为 1 000 ng/ml) 混合内标应用液,10 ml 乙腈,振荡涡旋 1 min,10 000 r/min 离心 5 min (离心半径 11.5 cm)。取上清液 1.0 ml,加入 QuEChERS 试剂管中涡旋混匀 1 min,10 000 r/min 离心 3 min (离心半径 11.5 cm)。取上清液,过 0.22 μm 滤膜,UPLC-MS/MS 进样分析。

1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱:Waters Acquity HSS T3 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm,1.7 μm);柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;进样室温

度 10 $^{\circ}\text{C}$;进样体积 2 μl ;流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈;流速 0.40 ml/min。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 UPLC 梯度洗脱条件

Table 1 UPLC gradient elution condition

| 时间/min | 流速/(ml/min) | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|--------|-------------|---------|---------|
| 0.00 | 0.40 | 90.0 | 10.0 |
| 1.00 | 0.40 | 50.0 | 50.0 |
| 3.00 | 0.40 | 40.0 | 60.0 |
| 4.50 | 0.40 | 5.0 | 95.0 |
| 5.50 | 0.40 | 5.0 | 95.0 |
| 6.00 | 0.40 | 90.0 | 10.0 |
| 6.50 | 0.40 | 90.0 | 10.0 |

质谱:离子源:电喷雾离子源;电离模式:正离子模式(ESI⁺);检测方式:多反应监测(MRM);毛细管电压 3.8 kV;离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气温度 500 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气流量 1 000 L/h;碰撞气流量 0.13 ml/min。待测物的母离子、子离子及对应的碰撞能量、锥孔电压见表 2。

表 2 11 种杀菌剂及同位素内标的质谱分析参数

Table 2 MS conditions for eleven fungicides and internal standards

| 待测物 | 保留时间/min | 母离子/(<i>m/z</i>) | 子离子/(<i>m/z</i>) | 碰撞能量/eV | 锥孔电压/V |
|----------------------|----------|--------------------|--------------------------------|---------|--------|
| 苯醚甲环唑 | 4.34 | 406.2 | 251.1 [*] /337.2 | 26/28 | 48 |
| 苯醚甲环唑-D ₆ | 4.34 | 412.3/414.3 | 251.1 [*] /253.1 | 26 | 50 |
| 三唑酮 | 3.49 | 294.2 | 69.1/197.1 [*] | 20/16 | 34 |
| 三唑酮-D ₄ | 3.49 | 298.2 | 69.1/201.2 [*] | 20/16 | 34 |
| 甲霜灵 | 2.50 | 280.3 | 192.2/220.2 [*] | 18/14 | 28 |
| 甲霜灵-D ₆ | 2.47 | 286.3 | 198.3/226.2 [*] | 20/14 | 30 |
| 嘧霉胺 | 2.49 | 200.2 | 82.1/107.1 [*] | 25/24 | 54 |
| 嘧霉胺-D ₅ | 2.47 | 205.2 | 83.1/108.2 [*] | 25/24 | 54 |
| 甲基硫菌灵 | 2.05 | 343.2 | 151.0 [*] /311.1 | 20/12 | 34 |
| 甲基硫菌灵-D ₆ | 2.05 | 349.2 | 151.0 [*] /314.2 | 20/12 | 34 |
| 多菌灵 | 1.17 | 192.1 | 132.1/160.1 [*] | 30/18 | 36 |
| 多菌灵-D ₄ | 1.16 | 196.2 | 136.1/164.1 [*] | 20 | 38 |
| 丙环唑 | 4.08 | 342.2 | 69.1/159.0 [*] | 20/30 | 50 |
| 丙环唑-D ₅ | 4.07 | 347.3 | 73.9/159.0 [*] | 20/30 | 50 |
| 戊唑醇 | 3.70 | 308.3 | 70.0 [*] /125.0 | 20/30 | 46 |
| 戊唑醇-D ₆ | 3.67 | 314.3 | 72.1 [*] /125.1 | 20/30 | 46 |
| 烯酰吗啉 | 2.87 | 388.2 | 165.1/301.2 [*] | 32/22 | 48 |
| 咪鲜胺 | 3.28 | 376.2/378.2 | 70.1 [*] /308.1/310.1 | 24/12 | 28 |
| 腐霉利 | 4.01 | 284.3/286.1 | 67.1/256.1 [*] /258.1 | 28/18 | 44 |

注:* 为定量离子

1.2.4 加标回收率试验

分别称取已匀浆好的 5.0 g 阴性样品于 50 ml 离心管中,准确加入 5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g/kg}$ 浓度的 11 种杀菌剂混合标准应用液,按照相同的样品前处理步骤(1.2.2)进行处理。

2 结果与分析

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 流动相的优化

由于待测物较多,为了保证分离效果,选择梯度洗脱。液相色谱流动相一般由乙腈或甲醇和水相体

系组成,不同的流动相对待测物的峰形、灵敏度、分离度有影响。本试验比较了乙腈-水、甲醇-水体系对待测物分离的影响,发现同一梯度条件下,乙腈-水作为流动相时各待测物的保留时间比甲醇-水作为流动相时较短,分离度也更好。据文献报道^[14-15],加入少量的甲酸控制流动相的 pH 值,可以促进离子化作用,提供质子,在正离子模式下提高灵敏度;因此,本试验又比较了加入几种不同浓度的甲酸时的流动相,发现甲酸浓度为 0.1% 时,各待测物的分离度和灵敏度最好,拖尾现象得到了改善。故最终本试验选择的流动相体系为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈,使用表 1 中的程序

进行梯度洗脱,实现了 11 种待测物的完全分离,峰型

较理想(见图 1 和 2)。

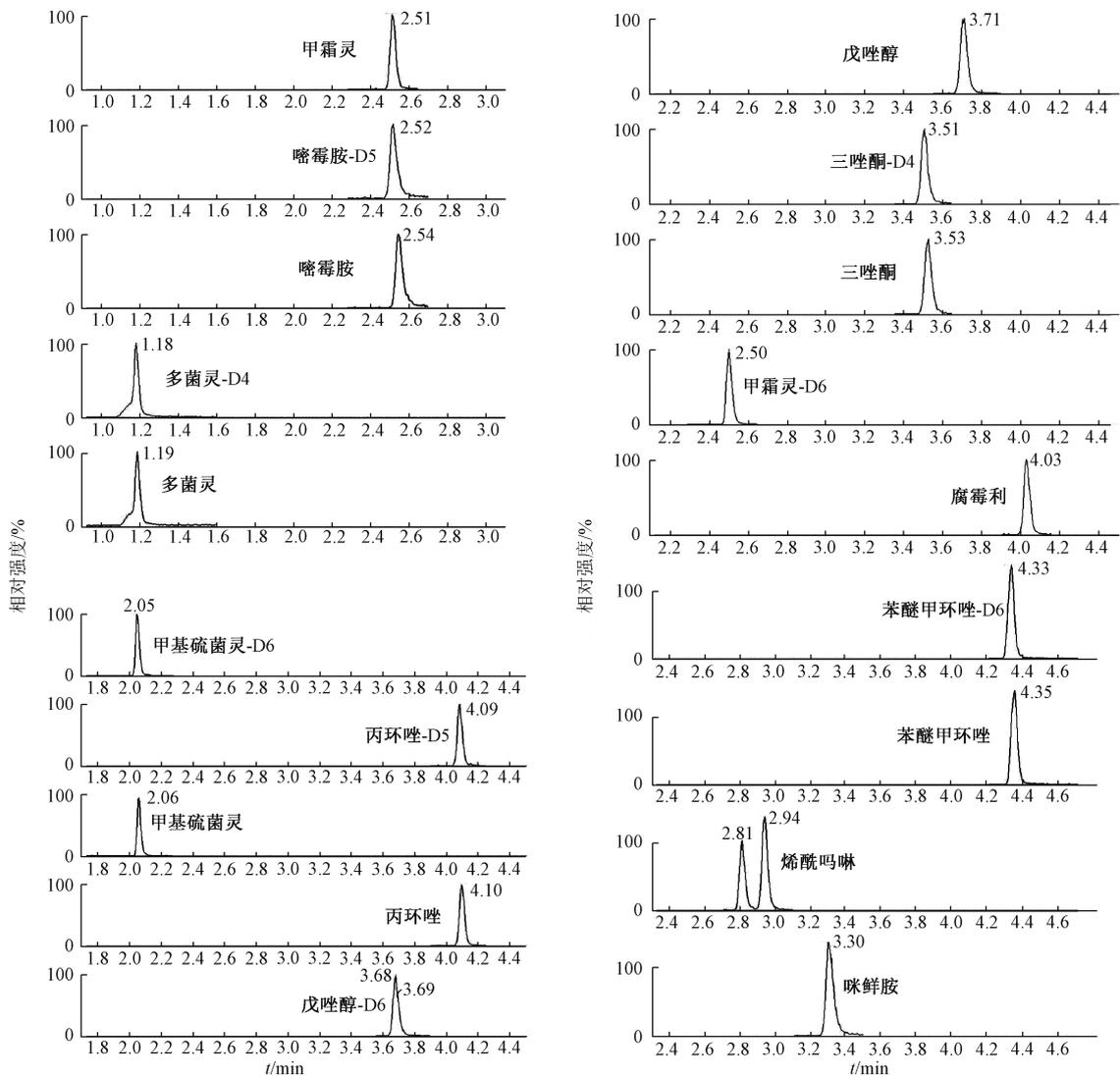
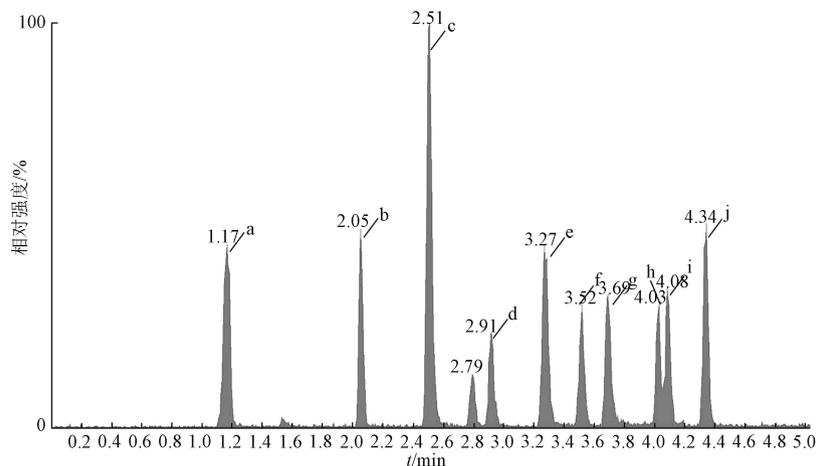


图 1 11 种杀菌剂及同位素内标的色谱图(浓度为 5.0 ng/ml)

Figure 1 Chromatograms of eleven fungicides and internal standards



注:a:多菌灵;b:甲基硫菌灵;c:甲霜灵,嘧霉胺;d:烯酰吗啉;e:咪鲜胺;f:三唑酮;g:戊唑醇;h:腐霉利;i:丙环唑;j:苯醚甲环唑

图 2 11 种杀菌剂的标准总离子色谱图(浓度为 5.0 ng/ml)

Figure 2 Total ion current chromatograms of eleven fungicides

2.1.2 质谱条件的优化

本试验研究的 11 种杀菌剂是含氮的化合物,呈碱性,易于和氢离子加和形成正离子,初步选择使用

正离子模式。在正离子扫描模式下,通过 Intellistart 软件对 11 种目标物进行了参数的选择和优化,确定了最佳锥孔电压和碰撞能量,确定了母离子和子离

子,见表2。为了进一步确定最佳扫描模式,又在负离子扫描模式下进行扫描,发现没有在正离子模式下的响应好、灵敏度高,因此,最终决定在正离子扫描模式下,运用MRM模式对分析物进行定性和定量。并且在进一步优化的过程中发现,通过把质谱方法中的时间窗口分段,分析待测物时进行分段扫描,可以进一步提高灵敏度。

2.2 样品净化方法的优化

由于植物性样品基质中含有较多的有机酸、糖类物质、色素、脂肪等,这些物质在提取过程中会同待测物一起被提取出来。若不进一步净化,在分析样品时会产生杂峰和基质效应,对检测结果造成影响。净化杀菌剂的吸附剂一般为 C_{18} 、PSA等,本试验比较了这两种吸附剂在不同用量条件下的净化效果。结果发现,在仅使用 C_{18} 吸附剂净化的条件

下,除腐霉利的回收率较低(图3a)外,用量为25 mg时各待测物回收率最高;在仅使用PSA吸附剂净化的条件下,用量为150 mg时各待测物回收率最高,但甲基硫菌灵的回收率均较低,且PSA用量越大甲基硫菌灵回收率越低(图3b);在同时使用 C_{18} 和PSA吸附剂净化的条件下,用量为150 mg时各待测物(除甲基硫菌灵和咪唑胺)回收率最高,不同用量对回收率的影响不大(图3c)。据文献报道^[13],可使用商品化的QuEChERS试剂净化样品,回收率较好。本试验进一步比较上述三种最优条件与使用商品化的QuEChERS试剂的净化效果,发现QuEChERS试剂净化条件对大部分待测物的回收率较高(图3d),并且商品化试剂使用便捷,节省了称取的时间,因此,最终本试验选择商品化的QuEChERS试剂净化样品。

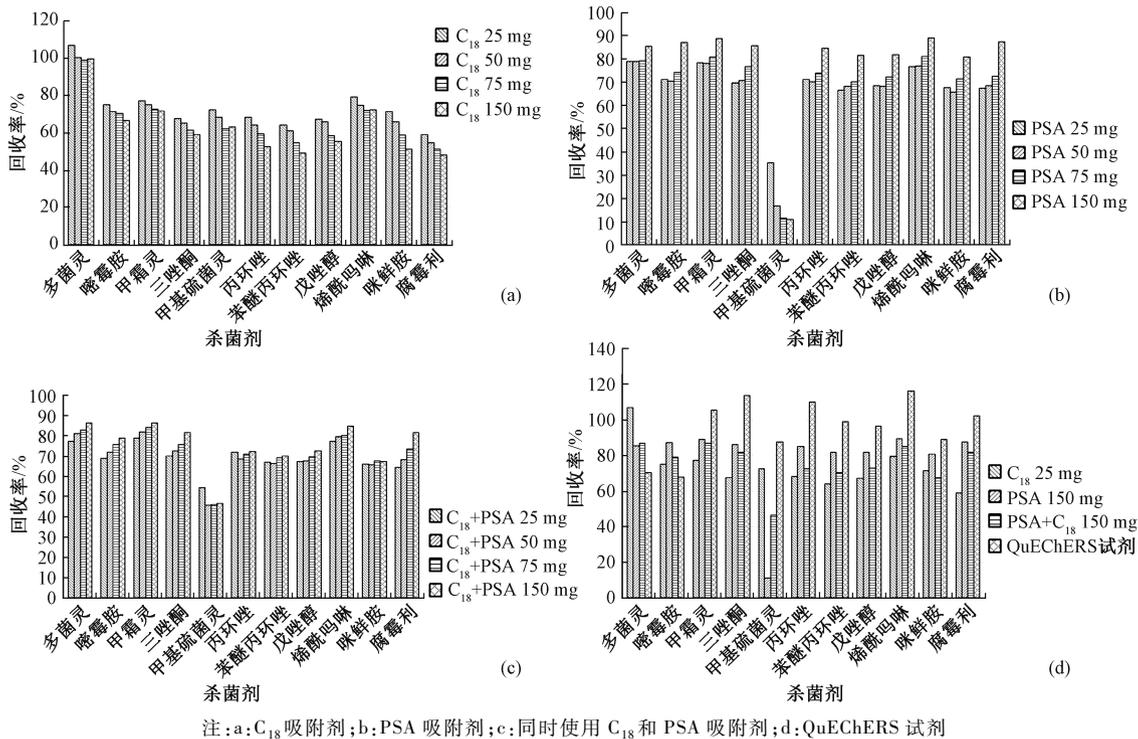


图3 11种杀菌剂在不同净化方法下的回收率

Figure 3 Recoveries of eleven fungicides by different purification methods

2.3 基质效应的影响及校正

植物性食品作为基质较为复杂的样品,在运用UPLC-MS/MS分析时,基质对待测物的离子化具有增强或抑制效应,因此分析物定量的准确性受基质效应的影响^[16]。根据本实验室研究基质效应对其他目标物影响的经验^[17-18],进一步考察了基质效应对11种杀菌剂的影响。以样品提取溶剂(乙腈)配制5.0 ng/ml的混合标准溶液,测定其峰面积为A;以阴性样品提取液作为溶剂配制5.0 ng/ml的混合标准溶液,测定其峰面积为B。其基质效应 $ME(\%) = B/A \times 100\%$,若 $ME > 100\%$ 说明是基质增强效应,若 $ME < 100\%$ 说明是基质抑制效应^[19]。表3中

可以看出植物性基质对11种待测物存在不同程度的基质影响。为了有效校正这种基质效应引起的定量误差,本试验采用同位素内标法进行定量,既能够减少前处理过程中产生的误差,又可以补偿基质效应对定量分析结果的影响,提高定量的准确性。

2.4 标准曲线、检出限、定量限

以阴性样品为基质,按照1.2.2样品前处理方法制备基质提取液,用基质提取液按照1.2.1方法配制标准曲线。在上述最佳条件下进样分析,绘制相应的标准曲线(见表3),其中各待测物的峰面积为纵坐标(y),浓度为横坐标(x, $\mu\text{g/L}$)。结果表明,11种待测物在0.1~50.0 $\mu\text{g/L}$ (腐霉利为1.0~

表 3 11 种杀菌剂的标准曲线、相关系数、检出限、定量限和基质效应

Table 3 Standard curve, correlation coefficient, LODs, LOQs and matrix effects for 11 kinds of fungicides

| 待测物 | 标准曲线 | 相关系数 r^2 | 检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 定量限/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 基质效应/% |
|-------|---------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|--------|
| 苯醚甲环唑 | $y=0.1541x-0.0014$ | 0.999 7 | 0.2 | 1.0 | 116 |
| 三唑酮 | $y=0.2058x+0.0004$ | 0.999 4 | 0.2 | 1.0 | 113 |
| 甲霜灵 | $y=0.2243x+0.0038$ | 0.999 5 | 0.2 | 1.0 | 113 |
| 啉霉胺 | $y=0.4847x+0.0160$ | 0.999 1 | 0.2 | 1.0 | 108 |
| 甲基硫菌灵 | $y=0.2151x-0.0013$ | 0.999 4 | 0.2 | 1.0 | 149 |
| 多菌灵 | $y=0.2204x+0.1339$ | 0.999 8 | 0.2 | 1.0 | 142 |
| 丙环唑 | $y=0.3145x+0.0024$ | 0.999 9 | 0.2 | 1.0 | 116 |
| 戊唑醇 | $y=0.2644x+0.0317$ | 0.999 8 | 0.2 | 1.0 | 126 |
| 烯酰吗啉 | $y=4602x-18.7278$ | 0.999 6 | 0.2 | 1.0 | 125 |
| 咪鲜胺 | $y=7103x-260.4512$ | 0.999 8 | 0.2 | 1.0 | 119 |
| 腐霉利 | $y=516.3x-158.8540$ | 0.999 7 | 2.0 | 10.0 | 110 |

500.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的浓度范围内线性关系均良好,相关系数(r^2)均大于 0.999 1。在阴性基质中加标,当添加的浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (腐霉利为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)时,各分析物峰的信噪比均等于 3($S/N=3$),因此将该浓度定义为检出限;当添加的浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (腐霉利为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)时,各分析物峰的信噪比等于 10($S/N=10$),故将该浓度定义为定量限。该定量限浓度下的回收率和精密度分别为 63.6%~119.2%和 3.5%~13.4%,均满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[20] 中的要求。

2.5 方法的回收率和精密度

GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[4] 规定的本试验分析的 11 种杀菌剂最大残留限量中,最严格的是烯酰吗啉,限值是 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按照此限量标准,本研究分别选取 2 种水果、2 种蔬菜和 1 种菌菇类阴性样品进行加标回收试验。加标水平分别为 5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每个加标浓度进行 3 次平行测定。结果得到的平均回收率范围为 63.1%~116.3%,相对标准偏差(RSD)为 1.4%~12.1%,见表 4。

表 4 5 种样品中 11 种杀菌剂的加标回收率和相对标准偏差($n=3$)

Table 4 Recoveries and relative standard deviation of eleven compounds in five samples

| 样品 | 待测物 | 添加量 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | 添加量 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | 添加量 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | 样品 | 待测物 | 添加量 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | 添加量 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | 添加量 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | |
|----|-------|---------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----|-------|---------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------------------|----------|
| | | 回收率/% | RSD /% | 回收率/% | RSD /% | 回收率/% | RSD /% | | | 回收率/% | RSD /% | 回收率/% | RSD /% | 回收率/% | RSD /% |
| 苹果 | 苯醚甲环唑 | 97.4 | 5.7 | 100.6 | 3.6 | 100.5 | 2.9 | 萝卜 | 苯醚甲环唑 | 99.4 | 2.6 | 95.1 | 1.4 | 100.1 | 3.7 |
| | 三唑酮 | 102.1 | 2.4 | 103.5 | 1.6 | 106.5 | 3.2 | | 三唑酮 | 98.4 | 2.3 | 105.5 | 2.5 | 100.9 | 1.8 |
| | 甲霜灵 | 102.6 | 3.1 | 100.8 | 2.8 | 102.8 | 2.2 | | 甲霜灵 | 97.2 | 3.6 | 99.6 | 2.7 | 99.5 | 2.8 |
| | 啉霉胺 | 107.7 | 3.2 | 104.5 | 4.1 | 106.4 | 3.8 | | 啉霉胺 | 101.7 | 6.6 | 98.5 | 4.0 | 104.4 | 2.7 |
| | 甲基硫菌灵 | 99.5 | 4.1 | 100.7 | 4.0 | 100.6 | 5.6 | | 甲基硫菌灵 | 87.0 | 5.6 | 84.2 | 4.7 | 89.0 | 5.1 |
| | 多菌灵 | 92.1 | 6.2 | 88.5 | 3.6 | 90.0 | 3.1 | | 多菌灵 | 80.2 | 6.2 | 84.4 | 5.7 | 88.4 | 3.4 |
| | 丙环唑 | 91.0 | 5.2 | 91.6 | 4.2 | 93.5 | 4.6 | | 丙环唑 | 93.3 | 5.6 | 91.0 | 3.9 | 96.7 | 2.0 |
| | 戊唑醇 | 111.4 | 4.8 | 105.2 | 3.3 | 110.1 | 2.7 | | 戊唑醇 | 97.2 | 2.3 | 99.4 | 1.8 | 107.3 | 2.5 |
| | 烯酰吗啉 | 112.3 | 6.4 | 109.7 | 5.2 | 116.2 | 5.7 | | 烯酰吗啉 | 89.9 | 5.2 | 95.6 | 3.5 | 109.9 | 4.6 |
| | 咪鲜胺 | 91.3 | 8.2 | 93.6 | 7.9 | 88.9 | 5.1 | | 咪鲜胺 | 67.4 | 6.3 | 63.1 | 5.9 | 69.2 | 4.5 |
| | 腐霉利 | 108.2 | 7.3 | 113.0 | 5.2 | 112.5 | 5.7 | | 腐霉利 | 68.4 | 12.1 | 75.0 | 7.4 | 66.5 | 4.2 |
| 梨子 | 苯醚甲环唑 | 103.7 | 4.4 | 97.4 | 6.2 | 99.1 | 3.0 | 平菇 | 苯醚甲环唑 | 107.4 | 7.3 | 95.8 | 4.6 | 95.7 | 3.5 |
| | 三唑酮 | 105.2 | 3.6 | 98.5 | 2.7 | 106.5 | 1.5 | | 三唑酮 | 93.1 | 3.6 | 85.9 | 4.1 | 91.5 | 3.8 |
| | 甲霜灵 | 101.7 | 5.6 | 102.3 | 4.6 | 103.5 | 3.7 | | 甲霜灵 | 102.0 | 3.4 | 98.7 | 2.6 | 102.4 | 1.9 |
| | 啉霉胺 | 98.3 | 7.3 | 95.8 | 2.6 | 101.3 | 4.8 | | 啉霉胺 | 96.1 | 4.6 | 94.7 | 4.8 | 97.4 | 3.5 |
| | 甲基硫菌灵 | 100.9 | 6.2 | 102.5 | 4.0 | 98.1 | 3.5 | | 甲基硫菌灵 | 97.8 | 10.6 | 95.4 | 3.9 | 97.9 | 2.1 |
| | 多菌灵 | 79.7 | 4.1 | 85.4 | 3.2 | 87.3 | 3.4 | | 多菌灵 | 81.4 | 3.3 | 83.1 | 8.7 | 84.7 | 4.1 |
| | 丙环唑 | 86.8 | 2.1 | 91.9 | 2.3 | 94.8 | 2.8 | | 丙环唑 | 96.3 | 5.2 | 93.9 | 3.5 | 91.9 | 1.7 |
| | 戊唑醇 | 101.1 | 3.6 | 97.2 | 3.3 | 101.2 | 2.3 | | 戊唑醇 | 89.3 | 2.6 | 91.3 | 2.8 | 96.4 | 2.5 |
| | 烯酰吗啉 | 112.2 | 5.2 | 108.7 | 4.6 | 107.1 | 3.3 | | 烯酰吗啉 | 109.6 | 4.7 | 111.9 | 3.4 | 107.1 | 3.8 |
| | 咪鲜胺 | 97.4 | 11.7 | 94.1 | 6.3 | 101.2 | 4.6 | | 咪鲜胺 | 93.7 | 5.3 | 102.0 | 4.8 | 101.1 | 9.4 |
| | 腐霉利 | 114.8 | 4.3 | 116.3 | 5.2 | 108.9 | 3.7 | | 腐霉利 | 102.8 | 2.4 | 108.6 | 3.7 | 112.6 | 1.6 |
| 芹菜 | 苯醚甲环唑 | 96.6 | 5.3 | 98.0 | 3.7 | 99.1 | 3.6 | 芹菜 | 丙环唑 | 96.1 | 2.7 | 95.7 | 3.4 | 97.6 | 3.6 |
| | 三唑酮 | 101.8 | 3.5 | 100.3 | 2.7 | 106.1 | 2.5 | | 戊唑醇 | 99.0 | 3.4 | 101.2 | 3.6 | 105.9 | 2.4 |
| | 甲霜灵 | 102.6 | 5.7 | 102.7 | 6.2 | 103.7 | 3.1 | | 烯酰吗啉 | 113.2 | 4.5 | 111.7 | 3.2 | 109.9 | 3.0 |
| | 啉霉胺 | 101.5 | 4.6 | 109.9 | 6.4 | 96.5 | 3.8 | | 咪鲜胺 | 78.6 | 4.1 | 84.6 | 4.5 | 88.6 | 5.2 |
| | 甲基硫菌灵 | 73.5 | 7.2 | 71.5 | 4.3 | 79.3 | 5.2 | | 腐霉利 | 86.7 | 6.6 | 93.9 | 4.8 | 95.0 | 3.1 |
| | 多菌灵 | 107.9 | 3.6 | 108.7 | 2.9 | 104.1 | 2.2 | | | | | | | | |

2.6 实际样品的测定

应用本试验建立的方法对农贸市场和超市销售的90份植物性食品进行测定,样品类型包括蔬菜、水果、食用菌等。结果发现,以高于方法定量限视为检出的原则,11种杀菌剂在样品中均有检出。其中检出率较高的包括多菌灵(50份)、甲基硫菌灵(46份)、烯酰吗啉(32份)、啉霉胺(32份)、腐霉利(29份)、苯醚甲环唑(21份)、戊唑醇(20份);检出率较低的包括咪鲜胺(4份)、三唑酮(6份)、甲霜灵(10份)、丙环唑(12份)。根据GB 2763—2016^[4]的规定,发现有2份韭菜样品中腐霉利的残留量超出了限量规定(0.2 mg/kg),含量为1.54~6.96 mg/kg。其余样品中杀菌剂残留量均未超出限量。

3 小结

本试验采用QuEChERS试剂净化样品,结合同位素内标法进行定量,建立了一种快速同时测定植物性样品中11种杀菌剂残留量的UPLC-MS/MS方法。该方法操作简单快速,通过内标校正提高了方法的灵敏度和准确性,回收率好,适用于大批量植物性食品的快速测定。

参考文献

- [1] 陈文品,许玫.普洱茶卫生与安全控制及相关研究现状[J].食品安全质量检测学报,2013,4(5):1373-1378.
- [2] European Community. Commission Regulation (EC) No 149/2008 of 29 January 2008 Amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto[S]. *Offic Journal of the European*, 2008.
- [3] 林维宣.各国食品中农药兽药残留限量规定[M].大连:大连海事大学出版社,2002.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,中华人民共和国农业部,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准食品中农药最大残留限量:GB 2763—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [5] 朱莉萍,朱涛,潘玉香,等.气相色谱法同时测定蔬菜及水果中多种农药残留量[J].分析化学,2008,36(7):999-1003.
- [6] 黄何何,方恩华,罗佳,等.气相色谱法测定果蔬中3种噁唑类杀菌剂的残留量[J].福建分析测试,2012,21(4):31-36.

- [7] 朱然,张倩,牛俊莉.分散固相萃取超高效液相色谱法快速测定水果中的杀菌剂残留[J].广东化工,2013,40(23):169-171.
- [8] 杨涛,艾尔肯·依不拉音,靳智,等.反相高效液相色谱法同时测定果蔬中6种防腐杀菌剂[J].食品科技,2008,33(9):245-247.
- [9] WEI Q Z, SONG Z Y, NIE J, et al. Tablet-effervescence-assisted dissolved carbon flotation for the extraction of four triazole fungicides in water by gas chromatography with mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(23):4603-4609.
- [10] 李继革,王玉飞,施家威,等.固相萃取-气相色谱-串联质谱法测定水果中11种三唑类杀菌剂[J].色谱,2012,30(3):262-266.
- [11] MIAO Q C, WANG J M, NIE J, et al. Magnetic dispersive solid-phase extraction based on a novel adsorbent for the detection of triazole pesticide residues in honey by HPLC-MS/MS[J]. *Anal Methods*, 2016, 8(26):5296-5303.
- [12] MARTA G, TOMASZ K, ALICJA N, et al. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2019, 282(1):6-47.
- [13] 吴岩,姜冰,徐义刚,等.QuEChERS-液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中16种农药残留[J].色谱,2015,33(3):28-34.
- [14] 王炼,朱作芳,羊雨婷.同位素内标-液相色谱-串联质谱法测定水果中11种农药残留量[J].中国食品卫生杂志,2016,28(2):209-214.
- [15] 孙亚米,吕燕,吴银良.液相色谱-串联质谱法快速测定果蔬中16种新型酰胺类杀菌剂残留量[J].食品科学,2015,36(12):230-236.
- [16] 廖艳华,唐阳,周劭桓.基质分散固相萃取和超高效液相色谱-串联质谱法测定水果、蔬菜中11种杀菌剂[J].现代预防医学,2018,45(7):1268-1273.
- [17] 刘柏林,谢继安,赵紫微,等.超高压液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱内标法同时测定禽类食品中11种喹诺酮类药物[J].中国食品卫生杂志,2017,29(3):316-321.
- [18] 刘柏林,谢继安,赵紫微,等.稳定同位素内标/超高压液相色谱-串联质谱法同时测定水果与豆芽中10种植物生长调节剂残留[J].分析测试学报,2017,36(5):601-606.
- [19] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(13):3019-3030.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.实验室质量控制规范 食品理化检测:GB/T 27404—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.