

## 超高效液相色谱法测定水果和饮料中残留的氟啶菌酯和啮螨酯

雒丽丽<sup>1</sup>, 薄海波<sup>2\*</sup>, 毕 阳<sup>1</sup>, 吴永隆<sup>1</sup>

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 青海省出入境检验检疫局, 青海 西宁 810000)

**摘要** :建立了多种水果和饮料中氟啶菌酯和啮螨酯残留的超高效液相色谱测定方法。样品用乙酸乙酯-环己烷(体积比为1:1)超声波萃取,凝胶渗透色谱法净化,超高效液相色谱-二极管阵列检测器检测,外标法定量。采用BEH C<sub>18</sub>色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为水-乙腈(体积比为3:7),流速为0.3 mL/min,柱温为40℃,紫外检测波长为251 nm。实验结果表明,氟啶菌酯和啮螨酯在0.05~2 mg/L范围内线性关系良好( $r > 0.999$ ),在不同的基质中添加3个浓度水平(0.01, 0.05, 0.1 mg/kg)的氟啶菌酯和啮螨酯,两者的回收率均在82.60%~101.11%之间,相对标准偏差为5.4%~15.3%,检出限不大于6 μg/kg,定量限不大于20 μg/kg。

**关键词** :超高效液相色谱;凝胶渗透色谱;氟啶菌酯;啮螨酯;农药残留;水果;饮料

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)02-0201-05 栏目类别 :研究论文

## Determination of fluoxastrobin and fluacrypyrim residues in fruits and beverages by ultra performance liquid chromatography

LUO Lili<sup>1</sup>, BO Haibo<sup>2\*</sup>, BI Yang<sup>1</sup>, WU Yonglong<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Qinghai Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xining 810000, China)

**Abstract** : A method was developed for the determination of fluoxastrobin and fluacrypyrim residues in fruits and beverages by ultra performance liquid chromatography with photo-diode array (UPLC-PDA) detection. The sample was extracted with ethyl acetate-cyclohexane (1:1, v/v) by ultrasonic, cleaned-up by gel permeation chromatography (GPC), and then determined by UPLC-PDA. The quantification was performed by external standard. A BEH C<sub>18</sub> column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) was used, and water-acetonitrile (3:7, v/v) was used as mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 40℃, and ultraviolet absorption wavelength was set at 251 nm. The calibration curves were linear between the peak area and the concentration in the range of 0.05–2 mg/L for fluoxastrobin and fluacrypyrim, the correlation coefficients were greater than 0.999. The average recoveries spiked in fruit and beverage matrices at the three concentration levels of 0.01, 0.05, 0.1 mg/kg ranged from 82.60% to 101.11% with the relative standard deviations of 5.4%–15.3%. The limits of detection (LOD) were not greater than 6 μg/kg and the limits of quantification (LOQ) were not greater than 20 μg/kg in fruit and beverage matrices for fluoxastrobin and fluacrypyrim.

**Key words** : ultra performance liquid chromatography (UPLC); gel permeation chromatography (GPC); fluoxastrobin; fluacrypyrim; pesticide residues; fruit; beverage

氟啶菌酯(fluoxastrobin)和啮螨酯(fluacrypyrim)是德国拜耳作物科学公司研发的新型广谱内吸性茎叶处理用的甲氧基丙烯酸酯类农药。氟啶菌酯主要用于防治禾谷类、马铃薯、蔬菜和咖啡等所有真菌纲病菌<sup>[1,2]</sup>,具有快速杀菌和持效期长的双重特性,且对作物具有很好的相容性<sup>[2,3]</sup>;其抑菌活

性高,对人类和环境的毒性相对较低,对非靶标生物安全<sup>[4-6]</sup>,因此于2006年在美国获准可用于防治花生、水果、蔬菜、草坪上多种病害的防治<sup>[7]</sup>。啮螨酯是在甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的基础上随机合成并经优化发现的,是第一个甲氧基丙烯酸酯类杀螨剂,主要用于防治果树中的多种螨类如苹果红蜘蛛、柑

\* 通讯联系人:薄海波,博士,高级工程师。E-mail:bohbl212@163.com.

基金项目:国家认证认可监督管理委员会2007年检验检疫行业标准研制项目(No. 2007B865)。

收稿日期:2008-08-04

橘红蜘蛛等<sup>[8,9]</sup>。这两种农药自问世以来迅速进入各国的农药市场。美国<sup>[10]</sup>、世界贸易组织<sup>[11]</sup>等均规定了多种农产品中氟啶菌酯和嘧啶酯的残留限量,其值大多数在 10 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[10,11]</sup>。目前我国对氟啶菌酯和嘧啶酯的药效试验研究刚刚起步,对氟啶菌酯和嘧啶酯残留分析的研究尚属空白。近年来,我国农产品出口屡遭国外绿色贸易壁垒,氟啶菌酯和嘧啶酯作为一种新型的、应用广泛的甲氧基丙烯酸酯类农药,国外的残留限量随时有可能成为我国农产品出口的障碍,因此研究氟啶菌酯和嘧啶酯的残留检测方法具有重要的现实意义。

目前,有关氟啶菌酯和嘧啶酯残留检测的研究在国内尚未见报道,仅检索到国外的少量报道。Preu<sup>[12]</sup>采用乙腈-水提取、液-液萃取去除脂溶性杂质、固相萃取(SPE)去除不同类型物质,再进行凝胶渗透色谱(GPC)净化,用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定了谷物、水果等多种基质中氟啶菌酯的残留。该方法净化效果良好,但实验步骤复杂,检测仪器设备昂贵,不利于在国内推广。凝胶渗透色谱是一种先进的样品净化方法,主要按照相对分子质量大小来完成净化,可以有效地去除基质提取液中色素等大分子干扰物质,近年来在食品样品的残留分析中有较广泛的应用<sup>[13-16]</sup>。超高效液相色谱(UPLC)是分离科学中的一个创新,能提供超高压(103.35 MPa (15 000 psi))的色谱泵、耐超高压的色谱系统以及小颗粒填料色谱柱和非常低的系统死体积,因而大幅度地提高了分析速度、灵敏度及色谱峰容量。本文利用 UPLC 的强大优势,省略了文献[12]中复杂的液-液萃取和固相萃取净化步骤,GPC 去除提取液中的色素等大分子干扰物质,实现了氟啶菌酯和嘧啶酯与 GPC 共流出物的良好分离。本方法简便快速,费用低廉。应用本文建立的方法测定了苹果、葡萄、梨、橙汁饮料、绿茶饮料、水蜜桃饮料等水果和饮料中氟啶菌酯和嘧啶酯的残留量,实验结果的重现性好,检出限均可满足国外对水果和饮料中目标物的残留限量要求。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂和样品

Acquit 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,配二极管阵列检测器(PDA),Empower 2.0 色谱工作站)。凝胶渗透色谱仪(美国 Waters 公司,配 Envirogel™ 色谱柱,馏分收集器)。Milli-Q 型超纯水机,超声波振荡仪,低速台式离心机(5 000 r/min),0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜。

乙腈、乙酸乙酯、环己烷、二氯甲烷均为农残级

试剂,氯化钠为分析纯,水为超纯水。

氟啶菌酯(分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{ClFN}_4\text{O}_5$ , 相对分子质量 ( $M_r$ ) 458.08, CAS No. 361377-29-9)和嘧啶酯(分子式  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$ ,  $M_r = 426.14$ , CAS No. 229977-93-9)标准品(纯度 99.5%(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司))。

供试样品:苹果、葡萄、梨、橙汁饮料、绿茶饮料、水蜜桃饮料等均从超市购买。

### 1.2 色谱分析条件

色谱柱 Acquity UPLC™ BEH  $\text{C}_{18}$  柱(50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 美国 Waters 公司);流动相:水-乙腈(体积比为 3:7);流速:0.3 mL/min;柱温:40  $^\circ\text{C}$ ;紫外最大吸收波长 251 nm;进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

### 1.3 标准溶液的配制

精密称取标准品 0.01 g(精确到 0.000 1 g),用乙酸乙酯溶解并定容于 10 mL 容量瓶中,得 1 g/L 贮备液,于 -18  $^\circ\text{C}$  下冷冻保存(可使用 3 个月)。实验中根据需要用流动相将贮备液稀释为适当浓度的标准溶液。

### 1.4 试样的制备

取有代表性的样品 500 g,将可食部分切碎,用高速捣碎机捣碎成浆状,装入干净样品瓶中,密封,于 -18  $^\circ\text{C}$  下冷冻保存。

将试样放至室温后,称取 10 g(果蔬类)或量取 10 mL(饮料类)试样,放入 50 mL 具塞离心管中,加入 3.0 g 氯化钠,加 20 mL 乙酸乙酯-环己烷(体积比为 1:1),涡旋振荡 1 min,超声提取 5 min,以 3 000 r/min 离心 3 min,取上清液。重复上述步骤 1 次,合并上清液,于 40  $^\circ\text{C}$  水浴中旋转蒸发至近干。加入 4 mL 二氯甲烷溶解,供 GPC 净化。

### 1.5 样品净化

凝胶柱:150 mm  $\times$  20 mm 柱串接 300 mm  $\times$  20 mm 柱(Bio Beads S-X3);洗脱剂为二氯甲烷,进样量为 2 mL,流速 5 mL/min,收集时间为 11 ~ 12.5 min。收集液于 40  $^\circ\text{C}$  下用氮气吹至近干,用 1 mL 的水-乙腈(体积比为 3:7)溶解,过 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜,供 UPLC-PDA 分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取条件的选择

#### 2.1.1 提取溶剂的选择

参考文献[12,17],对比了 3 种溶剂(乙腈-水、乙酸乙酯-环己烷(体积比为 1:1)、二氯甲烷-丙酮(体积比为 7:3))对加标样品的提取效果。实验结果显示:用乙腈提取时,样品不易和水分层;用二氯甲烷-丙酮提取时,杂质峰干扰较大;用乙酸乙酯-环己烷溶液的提取效果好,且可获得满意的回收率。

因此本文选取乙酸乙酯-环己烷(体积比为 1:1)作为提取溶剂。

### 2.1.2 提取条件的优化

考察了用乙酸乙酯-环己烷(体积比为 1:1)在超声波振荡器上提取不同时间(2.5 和 10 min,各测试 2 个平行样)对氟嘧菌酯和嘧啶酯的回收率影响。结果表明:提取时间为 2 min 时氟嘧菌酯和嘧啶酯的回收率偏低,而 5 min 和 10 min 的回收率无明显差异,三者的回收率分别为 67.7%、92.4% 和 92.6%。考察了提取次数对氟嘧菌酯和嘧啶酯回收率的影响。分别重复提取 2 次和 3 次,各测试 2 个平行样。两者的平均回收率分别为 93.1% 和 93.2%,没有明显的差异。故本方法选择提取两次。

### 2.2 净化条件的优化

考察了用  $C_{18}$  SPE 柱的净化效果。经仪器检测,在氟嘧菌酯和嘧啶酯出峰时间内出现杂质干扰峰,再经 GPC 净化,可得到满意的净化结果,但净化步骤太多,且 SPE 小柱一次性使用,费用较高。而水果、饮料中多含糖、维生素、色素等大分子物质,其相对分子质量和氟嘧菌酯和嘧啶酯的相差甚远,经 GPC 净化后,用 UPLC 分析,可以将氟嘧菌酯和嘧啶酯与 GPC 共流出物良好分离(见图 1-c)。本文只用 GPC 净化,基本上达到了文献[12]采用 SPE + GPC 的净化效果。故本文省略了 SPE 净化步骤,直接采用 GPC 净化方法。

适合本文所用凝胶渗透色谱柱的洗脱剂有二氯甲烷、乙酸乙酯-环己烷(体积比为 1:1)。实验结果表明:以二氯甲烷作为净化洗脱剂时,氟嘧菌酯和嘧啶酯的流出峰形窄,馏分收集时间仅为 1.5 min,回收率高且净化效果好;以乙酸乙酯-环己烷作洗脱剂时,洗脱效果与二氯甲烷相近,但柱压较高。故本文选取二氯甲烷作为净化的洗脱剂。另外,采用的洗脱剂流速不同对收集时间有影响:流速慢则收集时间长,而且杂质峰干扰较大。综合考虑柱压和收集时间等因素,确定洗脱剂的流速为 5 mL/min,收集时间为 11~12.5 min。

### 2.3 色谱条件的选择

#### 2.3.1 分离条件的优化

考察了采用不同比例的水-乙腈作为流动相等度洗脱对氟嘧菌酯和嘧啶酯的峰形与杂质峰的分离度和分析时间等因素的影响。根据实验结果确定流动相为水-乙腈(体积比为 3:7),流速 0.3 mL/min,柱温 40 °C。

#### 2.3.2 检测波长的选择

根据 PDA 扫描光谱图,得到目标物的最大紫外吸收波长为 191.6 nm 和 251.2 nm。考虑到 191.6

nm 为紫外末端吸收,基质干扰严重,故选择 251.2 nm 为检测波长。

### 2.4 标准曲线

配制质量浓度为 0.05、0.1、0.5、1、2 mg/L 的系列标准溶液,按色谱条件测定。目标物标准品的色谱图见图 1-a。以目标物的质量浓度  $X$  (mg/L) 为横坐标,峰面积  $Y$  为纵坐标进行线性回归,得方程为  $Y = 30100X - 299$ ,相关系数  $r = 0.9995$ 。

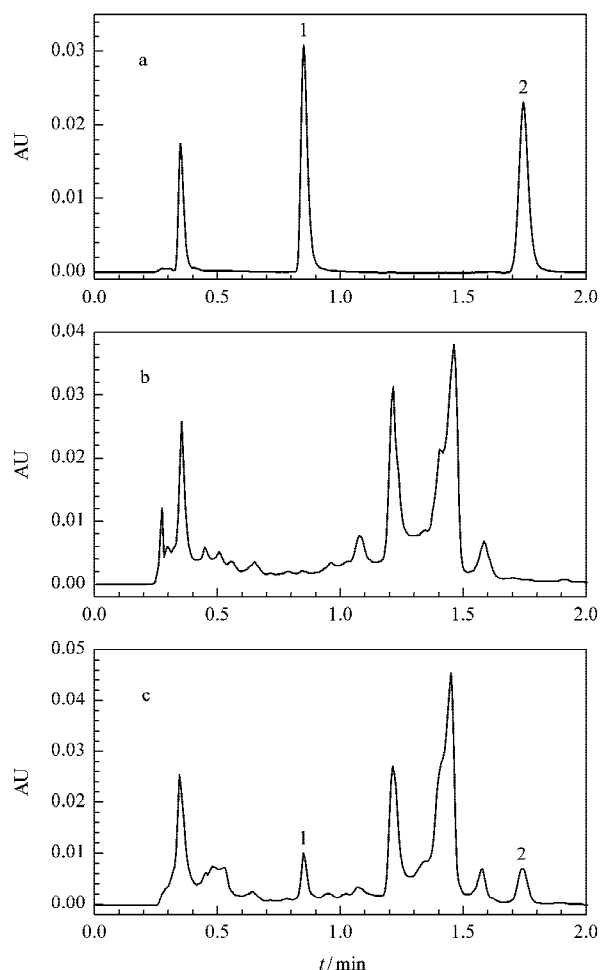


图 1 (a)氟嘧菌酯和嘧啶酯标准品、(b)苹果空白样品和(c)苹果空白样品添加限量水平的目标物标准品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) fluoxastrobin and fluacrypyrim standards, (b) an apple blank sample and (c) an apple blank sample spiked with the standards at the residue limit levels

1. fluoxastrobin; 2. fluacrypyrim.

### 2.5 回收率和精密度

采用标准添加法,在空白水果、饮料样品中添加 3 个浓度水平的氟嘧菌酯和嘧啶酯标准溶液,每个水平样品平行测定 6 次。苹果空白样品及其添加标准品的样品的色谱图见图 1-b, c。实验结果(见表 1)表明,方法的平均回收率为 82.60%~101.11%,相对标准偏差(RSD)为 5.4%~15.3%。

### 2.6 检出限与定量限

分别以 3 倍信噪比 ( $S/N = 3$ ) 和 10 倍信噪比 ( $S/N = 10$ ) 确定本方法的最低检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 结果 (见表 1) 表明, 不同基质中氟啶

菌酯和啮螨酯的 LOD 值和 LOQ 值略有差异, LOD 均不大于  $6 \mu\text{g}/\text{kg}$ , LOQ 值均不大于  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 可以满足各国对水果和饮料中氟啶菌酯和啮螨酯的限量要求。

表 1 空白水果、饮料样品添加氟啶菌酯和啮螨酯的回收率、精密度、检出限 ( $S/N = 3$ ) 和定量限 ( $S/N = 10$ ) ( $n = 6$ )

Table 1 Recoveries, precisions, limits of determination (LOD,  $S/N = 3$ ) and limits of quantification (LOQ,  $S/N = 10$ ) of fluoxastrobin and fluacrypyrim in blank samples of fruits and beverages ( $n = 6$ )

Sample	Compound	Spiked/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	Found/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	Recovery/ $\%$	RSD/ $\%$	LOD/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	LOQ/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
Apple	fluoxastrobin	10.0	9.01	90.1	14.6	3	10
		50.0	48.1	96.2	13.0		
		100	92.2	92.2	7.4		
	fluacrypyrim	10.0	9.34	93.4	4.4	4	10
		50.0	46.2	92.4	14.1		
		100	93.6	93.6	10.3		
Grapes	fluoxastrobin	10.0	9.46	94.6	11.5	5	20
		50.0	47.8	95.6	15.3		
		100	93.8	93.8	9.4		
	fluacrypyrim	10.0	9.45	94.5	8.8	3	10
		50.0	47.2	94.4	11.1		
		100	88.9	88.9	6.2		
Pears	fluoxastrobin	10.0	8.26	82.6	5.4	4	10
		50.0	48.7	97.4	9.4		
		100	87.8	87.8	6.3		
	fluacrypyrim	10.0	8.58	85.8	11.1	6	20
		50.0	47.8	95.6	6.7		
		100	87.4	87.4	11.9		
Orange juice	fluoxastrobin	10.0	10.1	101.1	6.6	2	8
		50.0	45.6	91.2	6.5		
		100	90.5	90.5	8.0		
	fluacrypyrim	10.0	9.90	99.0	7.9	3	10
		50.0	44.3	88.6	9.6		
		100	97.6	97.6	8.3		
Green tea	fluoxastrobin	10.0	9.23	92.3	10.6	3	9
		50.0	47.6	95.2	12.8		
		100	89.7	89.7	9.7		
	fluacrypyrim	10.0	9.45	94.5	5.9	2	9
		50.0	46.9	93.4	14.1		
		100	93.3	93.3	12.7		
Peach juice	fluoxastrobin	10.0	9.16	91.6	6.5	3	10
		50.0	49.3	98.6	10.2		
		100	87.5	87.5	7.5		
	fluacrypyrim	10.0	9.55	95.5	12.1	4	10
		50.0	45.1	90.2	9.3		
		100	89.8	89.8	5.4		

### 3 结论

本文建立的超高效液相色谱-二极管阵列测定氟啶菌酯和啮螨酯残留的分析方法简便快速, 用凝胶渗透色谱法净化效果好, 干扰小。方法灵敏度高, 可以满足国外对水果和饮料中氟啶菌酯和啮螨酯的残留检测要求。

### 参考文献:

[ 1 ] US Environment Protection Agency. Pesticide fact sheet. [ 2005-10 ]. <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/fluoxastrobin.pdf>

[ 2 ] Yin J J, Ma H Y, Guan A Y, et al. Pesticides (殷锦捷, 马海云, 关爱莹, 等. 农药), 2003, 42(3): 40

[ 3 ] Häuser-Hahn, P Baur, Schmitt W. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 2004, 57(3): 437

