

· 研究论文 ·

超高效液相色谱-串联四级杆质谱联用法测定 水果中多效唑、氯吡脞和咪鲜胺的残留

徐永^{*1}, 寿林飞¹, 虞淼¹, 徐正宁²

(1. 浙江省农药检定管理所, 杭州 310020; 2. 南京大学 大气科学学院, 南京 210032)

摘要:建立了超高效液相色谱-串联四级杆质谱(UPLC-MS/MS)法同时分析西瓜、杨梅中多效唑、氯吡脞和咪鲜胺3种农药残留的方法。样品经乙腈提取后用氨基固相萃取柱净化,反相液相色谱分离,采用三重四级杆串联质谱检测,用基质匹配标准品的外标法定量。结果表明:在添加水平为0.05~0.2 mg/kg范围时,西瓜中多效唑、氯吡脞和咪鲜胺的平均添加回收率分别为85.4%~99.4%、85.6%~98.7%和88.8%~100.3%,相对标准偏差(RSD)分别为2.7%~4.0%、2.5%~3.6%和2.3%~4.6%;杨梅中多效唑、氯吡脞、咪鲜胺的平均添加回收率分别为84.3%~99.3%、84.6%~98.2%和83.6%~99.2%,RSD分别为2.4%~4.5%、2.9%~3.7%和2.2%~3.9%。该方法对两种水果中3种农药的检出限(LOD)均为0.5 μg/kg,定量限(LOQ)均为1.7 μg/kg。方法灵敏度高、操作简便、定量准确、测定浓度范围宽,可用于多效唑、氯吡脞、咪鲜胺在西瓜、杨梅等水果中的残留分析。

关键词:超高效液相色谱-串联四级杆质谱;水果;多效唑;氯吡脞;咪鲜胺;残留

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2012.01.09

中图分类号:S481.8 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2012)01-0061-06

UPLC-MS/MS method for determination of paclobutrazol, forchlorfenuron and prochloraz residues in fruits

XU Yong^{*1}, SHOU Linfei¹, YU Miao¹, XU Zhengning²

(1. Institute for the Control of Agrochemicals, Zhejiang Department of Agriculture, Hangzhou 310020, China;
2. College of Atmospheric Science, Nanjing University, Nanjing 210032, China)

Abstract: A rapid method for determination of paclobutrazol, forchlorfenuron and prochloraz residues in watermelon and waxberry was established using ultra high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The sample was extracted with acetonitrile and cleaned by solid phase extraction (SPE) cartridge. The mass spectrometer was operated with electrospray in the positive ion mode (ESI⁺). The target analytes were quantified by external standard method and matrix-matched standard solution used to compensate for matrix effect. Average recoveries of paclobutrazol, forchlorfenuron and prochloraz in watermelon samples were in the range of 85.4% - 99.4%, 85.6% - 98.7% and 88.8% - 100.3% at three spiking levels from 0.05 - 0.2 mg/kg with relative standard deviations of 2.7% - 4.0%, 2.5% - 3.6% and 2.3% - 4.6%. Average recoveries of paclobutrazol, forchlorfenuron and prochloraz in waxberry samples were found in the range of 84.3%

收稿日期:2011-08-22;修回日期:2011-11-09.

作者简介: *徐永,男,通信作者(Author for correspondence),高级农艺师,研究方向为农产品、土壤中农药残留检测和农产品质量安全监管,

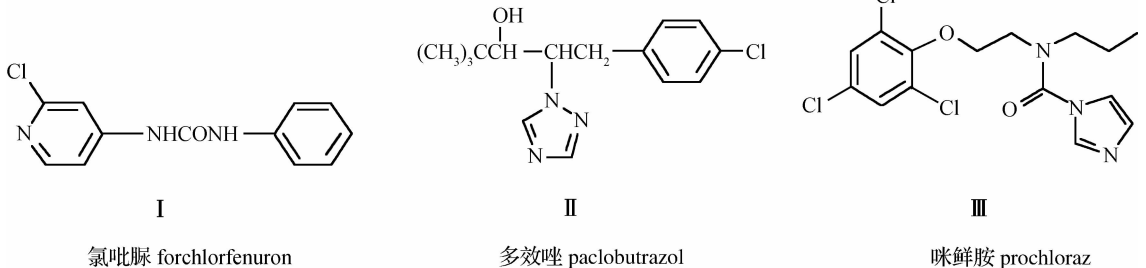
E-mail: xuyong_hz@yahoo.com.cn

-99.3% ,84.6% -98.2% and 83.6% -99.2% at three spiking levels from 0.05 -0.2 mg/kg with relative standard deviations of 2.4% -4.5% ,2.9% -3.7% and 2.2% -3.9%. Limits of detections (LOD) of paclobutrazol, forchlorfenuron and prochloraz in fruits were 0.5, 0.5 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, while limits of quantifications (LOQ) were 1.7, 1.7 and 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method is simple and suitable for the routine and confirmation analysis on fruits.

Key words: ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; fruits; paclobutrazol; forchlorfenuron; prochloraz; residue

氯吡脞(结构式见 **Scheme 1** 中的 I 式)和多效唑(结构式如 II 式)属于植物生长调节剂,常用于促进葡萄、西瓜、猕猴桃、黄瓜和杨梅等水果的生长^[1-3];咪鲜胺(结构式如 III 式)是一种杀菌剂,主要用于杨梅、柑橘等水果收获后的产品保鲜^[4]。有关这 3 种药剂的用量,各国都有严格的规定,如我国和欧盟规定多效唑在苹果上的最大残留限量(MRL)

值为 0.5 mg/kg,日本规定多效唑在西瓜和浆果中的 MRL 值分别为 0.01 和 0.5 mg/kg^[5];我国规定氯吡脞在西瓜和葡萄中的 MRL 值分别为 0.1 和 0.05 mg/kg,美国规定氯吡脞在葡萄中的 MRL 值为 0.03 mg/kg^[5];我国规定咪鲜胺在柑橘类水果中的 MRL 值为 5 mg/kg^[5]。



Scheme 1

有关这 3 种农药在水果上的残留检测方法已有一些报道,主要是采用高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)、气相色谱-质谱联用(GC/MS)等分析方法^[6-10],目前尚未见有关采用超高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪(UPLC-MS/MS)同时分析水果中多效唑、氯吡脞和咪鲜胺残留的方法。本文采用简单快速的前处理方法,通过 UPLC-MS/MS 快速检测,建立了 3 种农药在西瓜和杨梅中的残留分析方法。

1 材料与方法

1.1 药剂与仪器

多效唑(paclobutrazol)、氯吡脞(forchlorfenuron)和咪鲜胺(prochloraz)标准品(纯度 99.8%,Sigma 公司产品);甲醇、乙腈(色谱纯,Merck 公司);二氯甲烷(色谱纯);超纯水;甲酸(96%)、乙酸(99%)、乙酸铵(均为 TEDIA 公司产品);氯化钠(分析纯,140 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 4 h)。

超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(UPLC-MS/MS, Xevo TQ MS)和 Acquity UPLC

BEH C_{18} 柱[50 mm \times 2.1 mm (*i. d.*), 1.7 μm] (美国 Waters 公司);氮吹仪(美国 Organomation 公司);均质机(T18,德国 IKA 公司);超纯水纯化系统(milli-Q reference, Millipore 公司);氨基固相萃取柱(6 mL, 500 mg, Agela Technologies 公司);Filter Unit 滤膜(0.22 μm 有机系, Agela Technologies 公司)。

分别从浙江省温州市农贸市场抽取西瓜样品 5 批次,从浙江省台州市农贸市场抽取杨梅样品 5 批次,用于实际样品的检测。

1.2 标准溶液的配制

准确称取 3 种农药标准品各 10.0 mg (精确到 0.01 mg), 分别用甲醇稀释并定容至 100 mL, 配制质量浓度为 100 mg/L 的单一农药标准储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。准确移取适量的 3 种农药标准储备液, 用甲醇配制质量浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.5 和 1 mg/L 的系列混合标准溶液, 其中每个系列中 3 种农药的质量浓度均相同。

1.3 样品前处理方法

1.3.1 试样制备 取不少于 1 000 g 的水果样品, 用干净纱布轻轻擦去样品表面的附着物, 采用对角

线分割法,对角取可食部分,切碎,充分混匀后用食品加工器粉碎,备用。

1.3.2 提取与净化

1.3.2.1 提取 准确称取 25.0 g(精确至 0.01 g)试样于匀浆机中,加入 50.0 mL 乙腈,高速匀浆 2 min 后用滤纸过滤,收集滤液 40~50 mL 到装有 5.0~7.0 g 氯化钠的 100 mL 具塞量筒中,加塞,剧烈振荡 1 min,在室温下静置 10 min,待分层。准确吸取 10.0 mL 乙腈相于 150 mL 烧杯中,于 80 °C 水浴锅上加热,同时缓缓通入氮气或空气流,使乙腈蒸发至近干。加入 2.0 mL 混合溶液(甲醇-二氯甲烷 = 1:99,体积比)溶解残渣,盖上铝箔,待净化。

1.3.2.2 净化 将氨基固相萃取柱用 4.0 mL 淋洗剂[V(甲醇):V(二氯甲烷) = 1:9]预淋洗,加入样品溶液用淋洗剂进行洗脱,并用 15 mL 离心管收集洗脱液,用 2 mL 上述淋洗剂淋洗烧杯后过柱,并重复操作一次。将离心管置于氮吹仪上,50 °C 水浴,氮吹蒸发至近干,用甲醇定容至 5.0 mL,过 0.22 μm 有机滤膜,待 UPLC-MS/MS 测定。

1.4 检测条件

1.4.1 UPLC 检测条件 采用二元梯度洗脱分离,

流动相参数见表 1,进样体积 5 μL。流动相 A:甲醇,过 0.22 μm 有机相滤膜。流动相 B:准确称取 0.385 g 乙酸铵,溶解在 1 000 mL 超纯水中,过 0.22 μm 水相滤膜,配成 5 mmol/L 的乙酸铵水溶液。

表 1 流动相梯度洗脱参数

Table 1 Parameters for procedure of gradient elution

时间 Time/min	流速 Rate/ (mL/min)	流动相 A 体积分数 $\varphi_A/\%$	流动相 B 体积分数 $\varphi_B/\%$	梯度曲线 Curve
0.00	0.3	10	90	初始量 Initial
3.50	0.3	90	10	6
8.00	0.3	90	10	6
9.00	0.3	10	90	6
10.00	0.3	10	90	1

1.4.2 质谱检测条件 电喷雾离子源,正离子电离(ESI⁺);离子源温度 150 °C;毛细管电压 3.0 kV;去溶剂温度 400 °C;去溶剂气流量 800 L/h;锥孔气流速 40 L/h;锥孔电压 30 V;采用 MRM 多反应离子监测模式;其余质谱条件见表 2。

表 2 质谱条件

Table 2 Parameters of mass spectrometry

农药 Pesticide	扫描方式 Scan mode	分子离子峰 Molecular ion peak	定性离子/碰撞能量 Ion for qualification/Collision energy	定量离子/碰撞能量 Ion for quantification/Collision energy
多效唑 paclobutrazol	+	+H	294/125(41),294/70(49)	294/125(41)
氯吡脞 forchlorfenuron	+	+H	248/129(15),248/93(30)	248/129(15)
咪鲜胺 prochloraz	+	+H	376/308(14),376/70(24)	376/308(14)

1.5 实际样品测定

采用所建立的方法对供试样品进行测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱检测条件的选择

为了获得最佳的灵敏度和分离效果,采用直接进样方式,扫描范围为 m/z 100~500。结果表明,电喷雾离子化、正离子扫描模式可得到较好的电离效果,并获得特征离子峰[M+H]。在此基础上进一步选择质谱参数、合适的监测离子、锥孔电压及碰撞能量。

2.2 样品前处理条件的选择

乙腈、二氯甲烷和乙酸乙酯都可以作为这 3 种农药的提取溶剂。通过在同一基质中进行的添加回收率测定实验,最终选择了极性大、穿透力强、提取

效率高的乙腈作为提取剂(见表 3)。由于离心法只能去除部分大颗粒杂质,不能有效去除糖类、色素等主要干扰物质,故分别使用了氨基柱、C₁₈柱以及中性氧化铝、酸性氧化铝和碱性氧化铝等固相萃取柱进行净化,发现氨基固相萃取柱去除杂质的效果最好,且回收率较好,重现性高(见表 4)。

2.3 离子化试剂及流动相的选择

甲醇、乙腈、水等是 UPLC 分析常用的流动相。采用不同比例的多溶剂体系进行了一系列预实验,发现以不同比例的甲醇-水为流动相虽然可改善色谱分离效果,但对质谱检测的灵敏度未有明显提高;在流动相中加入一定量的酸可以改变不同组分的保留时间,使农药与杂质得到更好的分离。因此不同比例的甲醇-水(流动相)中分别加入了 5 mmol/L 的乙酸铵、甲酸和乙酸进行实验。结果

表 3 不同提取溶剂的提取效果比较

Table 3 Extraction effects by several extraction solvents

农药 Pesticide	添加水平 Fortified levels/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 Average recovery/%, $n=5$		
		乙腈 Acetonitrile	二氯甲烷 Dichloromethane	乙酸乙酯 Ethyl acetate
多效唑 paclobutrazol	1	97.5	85.3	73.3
咪鲜胺 prochloraz	1	98.6	78.2	66.8
氯吡啶 forchlorfenuron	1	99.3	79.1	65.5

表 4 采用不同固相萃取柱获得的平均回收率

Table 4 Performances between different SPE columns($n=5$)

农药 Pesticide	添加水平 Fortified levels/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	% 回收率				
		氨基柱 Amino SPE	C_{18} 柱 C_{18} SPE	中性氧化铝柱 Neutral alumina SPE	酸性氧化铝柱 Acid alumina SPE	碱性氧化铝柱 Alkali alumina SPE
多效唑 paclobutrazol	1	97.1	81.1	75.2	59.8	73.9
咪鲜胺 prochloraz	1	102.2	79.3	69.2	61.4	85.7
氯吡啶 forchlorfenuron	1	95.7	72.5	78.1	76.5	65.5

表明:流动相中加入 5 mmol/L 乙酸铵可获得较高的灵敏度和分辨率。同时,通过 1~5 mmol/L 不同乙酸铵浓度实验证明,添加 5 mmol/L 时的灵敏度最高、分离度最好,最后确定以甲醇与含 5 mmol/L 乙酸铵的水为流动相。

2.4 方法的线性关系

为提高定量的准确性,采用基质匹配标准溶液校正方法对基质效应进行了补偿。取标准溶液 1 mL,用氮气吹干,准确加入按 1.3 节方法处理得到的基质空白样 1 mL,即得基质匹配标准溶液。将基质匹配标准溶液按 1.4 节中的色谱条件进行测定,结果表明,多效唑、咪酰胺和氯吡啶在 0.05 mg/kg 添加水平时,基质匹配标样峰面积/溶剂标样峰面积分别为 1.87、1.93 和 1.69,基质匹配标准品中 3 种农

药的响应值均明显高于溶剂标准品,属于基质增强效应。以农药的质量浓度为横坐标,以其对应的峰面积为纵坐标作图。经最小二乘法拟合得标准曲线线性方程及相关系数(R^2),其中多效唑的回归方程为 $y = 1 \times 10^6 x + 11681$, $R^2 = 0.997$,氯吡啶的回归方程为 $y = 7145x + 881.7$, $R^2 = 0.9965$,咪鲜胺的回归方程为 $y = 1 \times 10^6 x + 7832$, $R^2 = 0.9982$ 。

2.5 方法的准确度、精密度、灵敏度和仪器的稳定性

方法的准确度、精密度和灵敏度分别用添加回收率、相对标准偏差(RSD)和定量限(LOQ)衡量^[11]。添加回收率以基质标准品为标准得出(见表 5),3 种农药在西瓜和杨梅中的回收率和 RSD 均符合农药残留分析的要求;该方法对供试两种水果中多效唑、氯吡啶、咪鲜胺的检出限(LOD)均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,

表 5 农药在西瓜、杨梅中的添加回收率

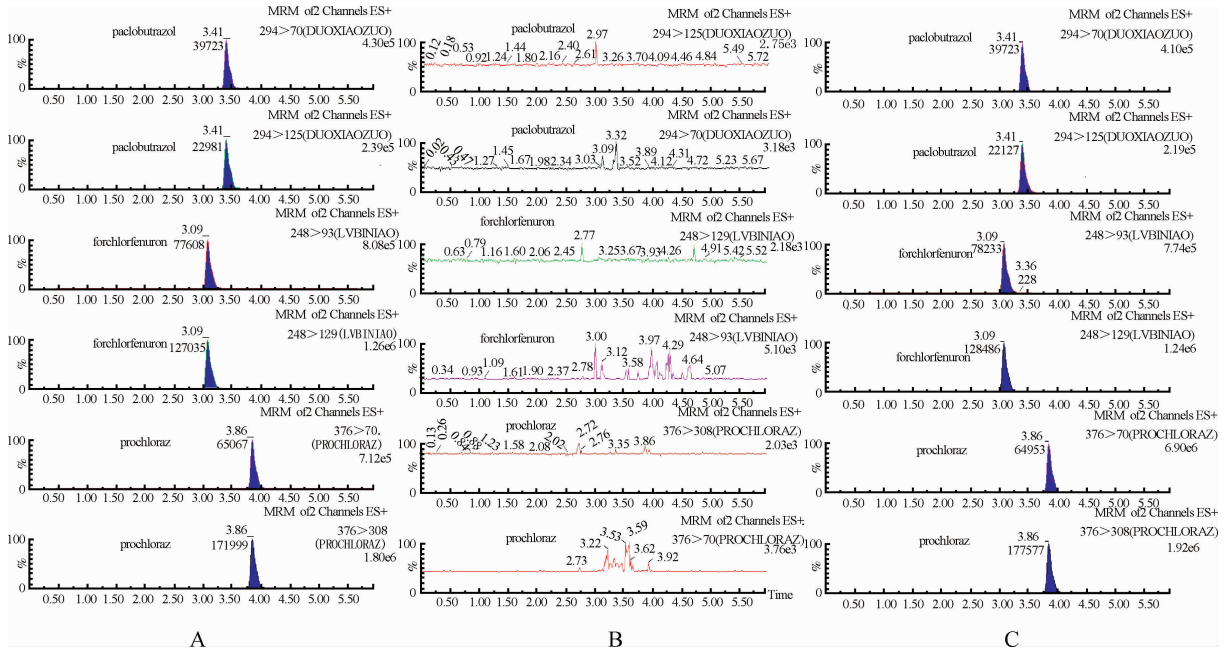
Table 5 Recovery of pesticides in watermelon and waxberry ($n=5$)

农药 Pesticides	添加水平 Fortified levels/ (mg/kg)	西瓜 Watermelon		杨梅 Waxberry	
		平均回收率 Average recovery/%	相对标准偏差 RSD/%	平均回收率 Average recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
多效唑 paclobutrazol	0.05	85.4	2.7	84.3	4.5
	0.1	91.3	2.7	91.2	3.5
	0.2	99.4	4.0	99.3	2.4
氯吡啶 forchlorfenuron	0.05	85.6	3.0	84.6	3.2
	0.1	93.1	2.5	92.2	3.7
	0.2	98.7	3.6	98.2	2.9
咪鲜胺 prochloraz	0.05	88.8	3.3	83.6	3.9
	0.1	94.3	2.3	88.9	3.4
	0.2	100.3	4.6	99.2	2.2

定量限(LOQ)均为 1.7 μg/kg。标准溶液、空白样品、添加样品及实际样品的多反应监测图谱见图 1。

5 次,测其峰面积,多次测定的峰面积的 RSD 为 1.5%,基质匹配标准溶液重复 5 次测得的峰面积的 RSD 为 3.2%,表明仪器具有很好的稳定性。

用同一供试标样在相同色谱条件下,连续进样



A. 100 μg/L 标准溶液; B. 空白样品; C. 10 μg/kg 添加样品

A. 100 μg/L Standard sample; B. Sample untreated; C. Fortified sample at 10 μg/kg

图 1 UPLC-MS/MS 多反应监测图谱

Fig. 1 UPLC-MS/MS multiple-reaction ion MRM chromatograms

2.6 实际样品测定结果

结果见表 6。从检测结果来看,部分西瓜中有微量氯吡脞检出,部分杨梅中有微量多效唑检出,但检出结果均低于我国限量标准要求,食用西瓜和杨梅安全。

3 结论

本研究建立了采用 UPLC-MS/MS 法测定西瓜、杨梅中多效唑、氯吡脞、咪鲜胺 3 种农药残留量的方法。在 0.05 ~ 0.2 mg/kg 添加水平范围内,西瓜中多效唑、氯吡脞和咪鲜胺的平均添加回收率分别为 85.4% ~ 99.4%、85.6% ~ 98.7% 和 88.8% ~ 100.3%,相对标准偏差(RSD)分别为 2.7% ~ 4.0%、2.5% ~ 3.6% 和 2.3% ~ 4.6%;杨梅中多效唑、氯吡脞、咪鲜胺的平均添加回收率分别为 84.3% ~ 99.3%、84.6% ~ 98.2% 和 83.6% ~ 99.2%,RSD 分别为 2.4% ~ 4.5%、2.9% ~ 3.7% 和 2.2% ~ 3.9%。该方法对水果中多效唑、氯吡脞、咪鲜胺的检出限(LOD)均为 0.5 μg/kg,定量限(LOQ)均为 1.7 μg/kg。该方法灵敏度、准确度和精密性均满足农药残留分析要求,适用于西瓜、杨梅等水果中多效唑、氯吡脞、咪鲜胺残留的定性和定量分析,并可用于大量样品的快速检测。

表 6 实际样品中 3 种农药的残留检测结果

Table 6 Residues of 3 pesticides in real samples

样品 Samples	残留量 Residues/(mg/kg)		
	多效唑	氯吡脞	咪鲜胺
	paclobutrazol	forchlorfenuron	prochloraz
西瓜 Watermelon 1	ND*	0.012 3	ND*
西瓜 Watermelon 2	ND*	0.013 5	ND*
西瓜 Watermelon 3	ND*	ND*	ND*
西瓜 Watermelon 4	ND*	ND*	ND*
西瓜 Watermelon 5	ND*	ND*	ND*
杨梅 Waxberry 1	ND*	ND*	ND*
杨梅 Waxberry 2	ND*	ND*	ND*
杨梅 Waxberry 3	0.027	ND*	ND*
杨梅 Waxberry 4	ND*	ND*	ND*
杨梅 Waxberry 5	ND*	ND*	ND*

* ND: 未检出(Not detected).

参考文献(Reference):

- [1] 王金波,魏敏宣.多效唑在果树上的应用[J].河北果树,2003(1):36-36.
WANG Jinbo, WEI Minxuan. Application of paclobutrazol on fruit trees[J]. *Hebei Fruits*, 2003(1):36-36. (in Chinese)
- [2] 王央杰,李三玉,王向阳.CPPU促进巨峰葡萄果粒肥大的机理研究[J].科技通报,1998(3):13-13.
WANG Yangjie, LI Sanyu, WANG Xiangyang. Mechanism of CPPU on stimulating fruit growth of kyoho grape[J]. *Sci Tech Bull*, 1998(3):13-13. (in Chinese)
- [3] 张卫炜,杨永珍.氯吡啶的研究及应用进展[J].农药科学与管理,2006(5):6-56.
ZHANG Weiwei, YANG Yongzhen. Advances in research and application of forchlorfenuron[J]. *Pestic Sci Admin*, 2006(5):6-56. (in Chinese)
- [4] 陈平,柳训才.咪鲜胺的应用概况及其残留检测研究[J].湖北农业科学,2007(3):46-46.
CHEN Ping, LIU Xunca. Application summary and research on residual determination of prochloraz[J]. *Hubei Agric Sci*, 2007(3):46-46. (in Chinese)
- [5] 中国技术性贸易措施网[DB/OL][2011-11-09]. <http://www.tbt-sps.gov.cn/FOODSAFE/XLBZ/Pages/pesticide.aspx> WTO/TBT-SPS Notification and Enquiry of China. [DB/OL][2011-11-09]. <http://www.tbt-sps.gov.cn/FOODSAFE/XLBZ/Pages/pesticide.aspx>. (in Chinese)
- [6] 吕燕,赵健,杨挺,等.气相色谱质谱法检测蔬菜中多效唑的残留[J].中国测试,2010(4):36-36.
LU Yan, ZHAO Jian, YANG Ting, et al. Determination of paclobutrazol residue in cabbages and cucumbers by gas chromatography mass spectrum method[J]. *China Test*, 2010(4):36-36. (in Chinese)
- [7] 谢艳丽,章程辉,梁振益,等.毛细管气相色谱法检测荔枝中多效唑残留量[J].现代农药,2011(1):10-10.
XIE Yanli, ZHANG Chenghui, LIANG Zhenyi, et al. Residue determination of paclobutrazol in litchi with capillary gas chromatography[J]. *Modern Agrochemicals*, 2011(1):10-10. (in Chinese)
- [8] 胡江涛,盛毅,方智,等.分散固相萃取-高效液相色谱法快速检测猕猴桃中的氯吡啶[J].色谱,2007,25(3):440-443.
HU Jiangtao, SHENG Yi, FANG Zhi, et al. HPLC determination of forchlorfenuron in kiwifruit with pre-enrichment by DSPE. [J]. *Chinese J Chromatogr*, 2007, 25(3):440-443. (in Chinese)
- [9] 陈长龙,李建中,王会利,等.氯吡啶在土壤和西瓜中的残留分析[J].环境化学,2006(6):25-25.
CHEN Changlong, LI Jianzhong, WANG Huili, et al. Residue analysis on forchlorfenuron in watermelon soil field[J]. *Environ Chem*, 2006(6):25-25. (in Chinese)
- [10] 汪传刚,龚道新,邹雅竹,等.HPLC法检测咪鲜胺及其主要代谢物在稻田水土中的残留[J].农业环境科学学报,2006(4):25-25.
WANG Chuangang, GONG Daoxin, ZOU Yazhu, et al. Residue determination of prochloraz and its major metabolites by HPLC in paddy water and soil[J]. *J Agro-Environ Sci*, 2006(4):25-25. (in Chinese)
- [11] NY/T 788—2004. 农药残留试验准则[S].北京:中国农业出版社,2004.
NY/T 788—2004. Pesticide residue test criterion[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2004. (in Chinese)

(责任编辑:金淑惠)

· 公 告 ·

《农药学学报》加入“中国知网”优先数字出版期刊群

为适应当前数字化出版的迅猛发展趋势,《农药学学报》在2010年与清华同方“中国知网”签署“独家网络全文发行合作协议”的基础上,2011年进一步与“中国知网”签署了“期刊优先数字出版合作协议”。自2012年2月起,已被本刊录用并经编辑加工的部分稿件,在经过作者授权之后将在印刷版期刊出版前以单篇或整期定稿的形式优先出版数字期刊,该文章可在“中国知网”的“优先数字出版”栏目中检索和下载,与正式发表的文章一样,该文可以作为文献被正常引用。优先数字出版将明显缩短文章出版周期,加快信息发布及传播的速度,及时确认作者科研成果的首发权,便于读者及时获取科研情报,提高文献的被引率和影响力。

《农药学学报》编辑部

2012年2月