

气相色谱-负化学离子源质谱测定大豆和玉米中 12 种三唑类杀菌剂的残留量

沈伟健^{1*}, 桂茜雯¹, 余可垚¹, 孙宁宁¹, 赵增运¹, 沈崇钰¹,
吴 斌¹, 蒋 原¹, 储晓刚²

(1. 江苏出入境检验检疫局食品实验室, 江苏 南京 210001 ; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要 :建立了一种可用于大豆和玉米中 12 种三唑类杀菌剂残留量测定的分散固相萃取-气相色谱-负化学离子源质谱方法。样品经含 1% 冰醋酸的乙腈提取,分散固相萃取法净化,采用气相色谱-负化学离子源质谱分时段选择离子监测技术进行测定与确证,外标法定量。12 种农药在 50 ~ 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性关系均良好;所有农药的方法定量限(LOQ)均低于 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$;在 10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平下所有农药的回收率为 70% ~ 130% ,相对标准偏差(RSD) \leq 13. 9%。该方法在检测大豆和玉米基质时无干扰现象出现。

关键词 :气相色谱-负化学离子源质谱;选择离子监测;分散固相萃取;三唑类杀菌剂;大豆;玉米

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)01-0091-05 栏目类别 :研究论文

Determination of 12 azole fungicide residues in beans and corn by offline disperse solid phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry

SHEN Weijian^{1*}, GUI Qianwen¹, YU Keyao¹, SUN Ningning¹, ZHAO Zengyun¹,
SHEN Chongyu¹, WU Bin¹, JIANG Yuan¹, CHU Xiaogang²

(1. Laboratory of Food, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China ;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract : A confirmatory method is proposed for the determination of 12 azole fungicide residues in beans and corn with the technique of offline disperse solid phase extraction (DSPE) and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry (GC-NCI/MS). The pesticides interested were extracted from the samples with acetonitrile containing 1% acetic acid and simultaneous liquid-liquid partitioning formed by adding anhydrous magnesium sulfate plus sodium acetate followed by a simple cleanup step known as dispersive solid-phase extraction. The aliquot was determined and confirmed by GC-NCI/MS using external standard method. The recoveries of all pesticides were between 70% and 130% at the three spiked levels, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The relative standard deviations were less than 13. 9%. The linearity of method was good from 50 to 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$. The limits of quantification (LOQ) were less than 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method is selective with no interference and is suitable for the confirmatory of pesticide residues in beans and corn.

Key words : gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry (GC-NCI/MS); selected ion monitoring ; disperse solid phase extraction ; azole fungicides ; beans ; corn

三唑类杀菌剂具有高效、广谱、低毒、低抗性、双效性,是目前最有发展前景的一类杀菌剂。它不仅在甲基甾醇抑制剂中占有绝对优势,也是杀菌剂中

最大的一类。2003 年三唑类杀菌剂的销售额为 12. 48 亿美元,占世界农药市场的 4. 7% ,占杀菌剂市场的 21. 7% ,占脱甲基甾醇合成抑制剂市场的

* 通讯联系人 :沈伟健,硕士,工程师. Tel : (025)52345193, E-mail : swj9722418@ yahoo. com. cn.

基金项目 : 国家“ 十一五 ”科技支撑计划项目(2006BAK02A08).

收稿日期 : 2008-07-07

66.63%。但国外发达国家已经明确限定这类农药在食品中的最高残留限量,如日本肯定列表中规定大豆和玉米中丙环唑最高残留限量(MRL)分别为0.05和1.0 mg/kg,己唑醇分别为0.05和0.02 mg/kg,腈菌唑分别为0.05和0.02 mg/kg,三唑酮分别为0.2和0.1 mg/kg等,因此开发一种简单快速、准确稳定的可用于大豆和玉米中多种三唑类杀菌剂残留量的检测方法是很有必要的。

由于每种唑类农药分子中均含有三唑(或咪唑)官能团,而且多数还具有卤素原子,因此可采用气相色谱-氮磷检测器(NPD)或气相色谱-电子捕获检测器(ECD)进行检测^[1],但这两种方法均属初筛范畴,出现阳性结果时还需采用相应的确证手段进一步验证。理想的确证手段是色谱-质谱联用技术,其中液相色谱-质谱联用方法^[2]由于仪器设备投资较大,使其应用推广受到一定的限制,因此目前广泛使用的确证手段是已相当普及的气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)。目前GC-MS中主要用到了电子轰击(EI)和化学电离(CI)两种离子源技术。已报道的用于三唑类杀菌剂残留检测的GC-MS方法使用的均是EI技术^[3-5],但由于EI技术分析具有复杂基质成分的食品样品时极易出现干扰现象,因而需要在样品前处理中进行严格而繁琐的净化过程。而CI源中的负化学离子源(NCI)是一种“软电离”技术,对含电负性基团的物质具有高选择性和高灵敏度,已成为目前农药残留检测中较为热门的一种离子源技术,现已有一些应用该技术测定食品中的拟除虫菊酯^[6]、有机氯^[7]、有机磷^[8]、二苯醚类^[9]、酰胺类除草剂^[10]和三唑醇^[11]以及苯醚甲环唑^[12]等三唑类杀菌剂农药残留的报道。但尚未见有NCI源用于食品中多种唑类农药残留检测的报道。

2003年Steven提出的QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)方法是一种采用分散型固相萃取净化技术的样品前处理方法^[13,14],优点是快速、简单、经济,不足之处是提取效率和净化效果不太理想,因而常使得后续的检测方法的检出限难以满足要求。本文对QuEChERS方法进行了适当的改进,并采用GC-NCI/MS法测定了大豆和玉米中12种三唑类杀菌剂的残留量。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

气相色谱-质谱仪:Agilent 6890N GC-5973 Inert MS(配有CI源)。

丙酮和乙腈均为色谱纯,冰醋酸、无水硫酸镁和无水乙酸钠均为分析纯。水为去离子水。Pesti-

Card 石墨化碳黑填料(120~400目,北京艾杰尔科技有限责任公司),乙二胺-*N*-丙基甲硅烷(PSA)填料(40~60目)和C18-H(17%)填料(40~60目,北京振翔工贸有限责任公司)。氯唑磷(isazofos)、三唑酮(triadimefon)、氟菌唑(triflumizole)、多效唑(paclobutrazol)、抑霉唑(imazalil)、己唑醇(hexaconazole)、腈菌唑(myclobutanil)、苯氧三唑醇(diclobutrazol)、丙环唑(propiconazole, I + II)、氟环唑(epoxiconazole)、氟唑唑(fluquinconazole)和苯醚甲环唑(difenoconazole)等农药标准品(纯度≥98.0%(均购自于德国Dr. Ehrenstorfer公司))。

1.2 标准储备液和工作液的配制

标准储备液的配制:分别准确称取氯唑磷、三唑酮、氟菌唑、多效唑、抑霉唑、己唑醇、腈菌唑、苯氧三唑醇、丙环唑、氟环唑、氟唑唑和苯醚甲环唑等农药标准品各10.0 mg(精确到0.01 mg)置于10 mL容量瓶中,用丙酮溶解并定容至刻度,由此配制成质量浓度均为1.00 g/L的12种农药的单标准储备液,4℃冷藏保存。

标准工作液的配制:各取0.5 mL上述标准储备液于同一个10 mL容量瓶中,并用丙酮稀释至刻度,配制成50 mg/L混合工作储备液。实验中根据需要通过逐级稀释得到10 000, 1 000, 500, 200, 100和50 μg/L的系列混合标准工作液。

1.3 样品前处理

1.3.1 提取

将准确称取的15 g(精确至0.01 g)均匀试样置于250 mL锥形瓶中,相继加入30 mL含1%冰醋酸的乙腈、15 g无水硫酸镁和6 g无水乙酸钠后,置于振荡器中振荡40 min,过滤于150 mL浓缩瓶中。再加入20 mL含1%冰醋酸的乙腈溶液重复提取一次。合并提取液,于40℃下旋转蒸发浓缩至干,用2 mL乙腈溶解残渣后待净化。

1.3.2 净化

将待净化的样品溶液转移到小试管(事先加入200 mg PSA填料、100 mg石墨化碳黑填料和100 mg C18-H(17%)填料)中,涡旋1 min,过0.45 μm有机相滤膜后供GC-MS测定和确证。

1.4 GC-MS条件

1.4.1 GC条件

DB-17 ms石英弹性毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm φ, 0.25 μm),柱温控制程序:初始温度为70℃,以30℃/min的升温速率升至220℃,以2℃/min的升温速率升至228℃,以8℃/min的升温速率升至280℃,以10℃/min的升温速率升

至 300 °C(保持 12.5 min);进样口温度 300 °C;接口温度 250 °C;载气:氦气(纯度 ≥99.999%),流速 1.0 mL/min;进样量:1 μL;脉冲不分流进样,脉冲压力为 0.17 MPa(25 psi),脉冲时间为 2.0 min。

1.4.2 MS 条件

采用负化学离子源。反应气:高纯甲烷(纯度 ≥99.99%);离子源温度:150 °C;四极杆温度:150 °C;电离能量:105 eV;溶剂延迟时间:6.50 min;数据采集方式:分时段选择离子监测(SIM)方式,具体参数见表 1。

表 1 GC-NCI/MS 分时段 SIM 测定三唑类杀菌剂的主要参数及线性关系和定量限

Table 1 List of selected ions for each pesticide and its linear equation, correlation coefficient and limit of quantification (LOQ)

Pesticide	Retention time window/min	Retention time/min	SIM ions (<i>m/z</i>)	Linear equation **	Correlation coefficient	LOQ/ (μg/kg)
Isazofos	6.50 - 8.50	7.78	313 [*] , 314, 315	$y = 34.528x + 338.21$	0.9996	2.0
Triadimefon	8.50 - 11.65	9.20	127 [*] , 129, 166	$y = 797.59x + 17922$	0.9933	0.50
Triflumizole		9.78	286, 345 [*] , 347	$y = 1480.2x + 27709$	0.9955	1.0
Paclobutrazol		10.92	293 [*] , 294, 295	$y = 12.447x + 293.65$	0.9978	8.0
Hexaconazole		11.48	221, 257 [*] , 259, 277	$y = 1266.0x + 25936$	0.9945	0.25
Imazalil	11.65 - 13.50	11.85	35, 240, 296 [*]	$y = 23.416x + 223.45$	0.9927	4.0
Diclobutrazol		11.90	104, 222 [*] , 224, 327	$y = 801.12x + 14006$	0.9971	0.50
Myclobutanil		12.54	288 [*] , 289, 290	$y = 1346.9x + 27680$	0.9947	0.25
Propiconazole- I	13.50 - 17.00	14.04	256 [*] , 258, 305, 341	$y = 25.547x + 835.91$	0.9947	1.0
Propiconazole- II		14.13	256 [*] , 258, 305, 341	$y = 255.86x + 5180.1$	0.9915	1.0
Epoxiconazole		15.28	224, 247, 293 [*] , 295	$y = 939.86x + 20473$	0.9918	0.50
Fluquinconazole	17.00 - 30.00	18.58	339 [*] , 348, 350, 375	$y = 3125.8x + 47759$	0.9964	0.50
Difenoconazole		22.63	310, 348 [*] , 350, 405	$y = 64.035x + 1077.5$	0.9948	3.0

* quantification ion. ** y : the peak area of quantification ion; x : mass concentration of the pesticide, μg/L.

2 结果与讨论

2.1 分散固相萃取技术

本文对文献[11,12]报道的 QuEChERS 方法进行了适当改进。原方法在样品提取后只移取了 1 mL 提取液,最后定容至 1 mL,使得最终得到的待测溶液的质量浓度为 1 kg/L。而本方法则将提取液全部取出,最后定容至 2 mL;且为提高提取效率,用适量的提取溶剂再提取一次,使得最终得到的待测溶液的质量浓度为 7.5 kg/L,从而既保证了回收率,也使方法的检出限在理论上提高了 7.5 倍。

本方法中的 PSA 填料主要用于去除样品基质中的糖类和脂肪酸;C18-H(17%)填料用于去除样品中的油脂和其他非极性干扰物;石墨化碳黑粉末用于去除大豆和玉米中的色素和食品基质中的甾醇等;无水 MgSO₄ 能较充分地吸除基质中的水分,有利于减轻后续的旋转蒸发和上机进样前的除水压力;无水乙酸钠与提取溶液中冰醋酸组成乙酸-乙酸钠酸性缓冲体系。这种分散固相萃取净化技术的运用,可以简化操作,有效地缩短分析时间,减少有机溶剂的使用量。

2.2 农药的断裂机理

三唑类杀菌剂是一类带有三唑官能团的有机化合物,在 NCI 源的软电离下,这类农药主要有 3 种

断裂情况:第一种是通过反应 $M + e \rightarrow M^-$,生成分子离子及其同位素离子簇,如氯唑磷、多效唑和腈菌唑等杀菌剂;第二种是除了上述反应生成相对丰度较高的分子离子外,由于分子离子出现一定的能量过剩使得部分分子离子进一步断裂成少数几个相对丰度较高的碎片,断裂反应为 $M + e \rightarrow (M - X)^- + X$,如氟菌唑、己唑醇、抑霉唑、苄氯三唑醇、丙环唑、氟唑唑和苯醚甲环唑等杀菌剂;第三种是因为生成的分子离子内能过高,完全或绝大多数发生了断裂,导致最后没有或基本上没有分子离子出现,如三唑酮和氟环唑。

2.3 方法的性能指标

2.3.1 线性关系与定量限

将“1.2”节中配制好的 50~1000 μg/L 范围内 5 个系列浓度混合标准工作液按上述 GC-MS 条件进样,以各个农药的定量离子峰面积 y 对质量浓度 x (μg/L)做标准曲线,得到 12 种农药的线性方程及其相关系数;结合 10 μg/kg 的添加水平的加标回收图谱,根据信噪比(S/N) ≥ 10 计算方法的定量限(见表 1)。

2.3.2 准确度和精密度

在阴性的大豆和玉米样品中分别添加 10、20 和 40 μg/kg 3 个水平的混合标准溶液,按照上述提取、净化和检测步骤,每个添加水平做 6 个平行试

验,最后计算各种杀菌剂的平均回收率和相对标准偏差(RSD),以分别考察方法的准确度和精密度

(见表 2)。其中混合标准溶液和阴性大豆样品谱图见图 1 和图 2。

表 2 3 个添加水平下大豆与玉米中三唑类杀菌剂的平均回收率(R)及相对标准偏差(RSD)($n=6$)

Table 2 Average recoveries (R) and their relative standard deviations ($RSDs$) of triazole fungicides at three spiked levels in beans and corn ($n=6$)

Pesticide	Beans						Corn					
	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		20 $\mu\text{g}/\text{kg}$		40 $\mu\text{g}/\text{kg}$		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		20 $\mu\text{g}/\text{kg}$		40 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	R	RSD										
Isazofos	66.2	4.9	61.3	4.2	64.6	3.8	41.0	6.9	45.5	5.0	57.3	3.6
Triadimefon	115.2	3.5	111.8	8.5	86.4	3.0	74.7	2.3	75.2	3.5	79.3	6.7
Triflumizole	126.6	6.8	112.9	9.5	84.4	5.6	72.8	3.3	70.1	6.4	72.3	6.8
Paclobutrazol	103.2	5.4	106.3	4.9	103.5	4.3	79.1	7.2	83.1	6.8	81.3	7.0
Hexaconazole	120.6	5.2	131.9	10.7	122.2	10.5	110.7	3.4	84.7	6.5	92.8	4.9
Imazalil	119.2	10.8	123.2	8.7	119.2	10.8	72.8	7.8	70.3	6.2	73.4	6.4
Diclobutrazol	98.1	3.3	86.6	8.1	95.3	6.2	75.0	5.1	77.3	5.5	79.4	6.0
Myclobutanil	114.3	3.7	122.3	8.3	124.1	4.5	77.2	6.5	76.3	3.8	86.5	5.0
Propiconazole	98.3	5.6	93.7	8.5	98.0	5.8	76.7	4.9	77.2	3.9	75.9	6.0
Epoxiconazole	116.3	3.4	124.2	5.1	82.3	12.7	106.7	4.3	121.4	2.2	104.3	6.7
Fluquinconazole	111.4	6.9	117.7	3.8	103.5	5.2	121.8	7.7	96.6	12.5	125.4	12.0
Difenoconazole	88.0	7.3	107.6	3.3	92.4	6.3	86.0	13.9	92.2	9.0	89.2	5.3

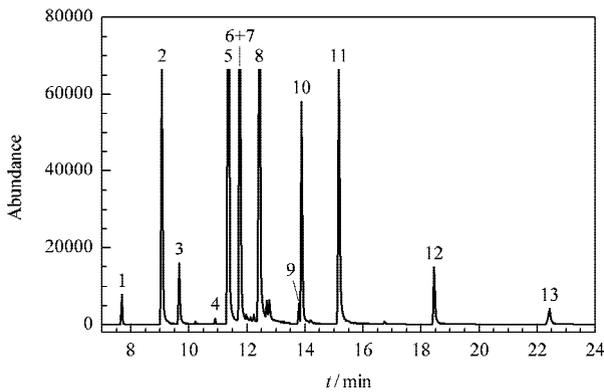


图 1 三唑类杀菌剂混合标准溶液(0.1 mg/L)的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of triazole mixture solution at the concentration of 0.1 mg/L

Peaks: 1. isazofos; 2. triadimefon; 3. triflumizole; 4. paclobutrazol; 5. hexaconazole; 6, 7. imazalil + diclobutrazol; 8. myclobutanil; 9, 10. propiconazole; 11. epoxiconazole; 12. fluquinconazole; 13. difenoconazole.

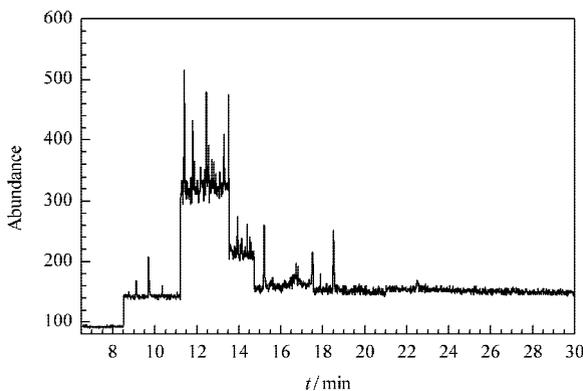


图 2 阴性大豆样品的总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion current chromatogram of a negative bean sample

由图 2 可以看出,阴性大豆样品经过处理后检测得到的总离子流色谱图接近于仪器平衡时得到的色谱图,说明本方法的选择性相当好,无任何干扰存在。

由表 2 数据可知,3 个添加水平下大豆和玉米中所有的三唑类杀菌剂的平均回收率除了氯唑磷回收率稍偏低外,其他农药均处于 70% ~ 130% 之间, RSD 均小于或等于 13.9%,表明由本方法得到的数据是准确、稳定而可靠的,结合本方法的高灵敏度特点,可知本方法能够从根本上消除检测结果出现假阴性的可能性。

2.4 实际样品测定

自本方法建立后,已用于检测样品近千个,阳性检出情况也有发生,主要是苯醚甲环唑和氟菌唑这 2 种农药。其中的一个阳性样品的总离子流色谱图见图 3。

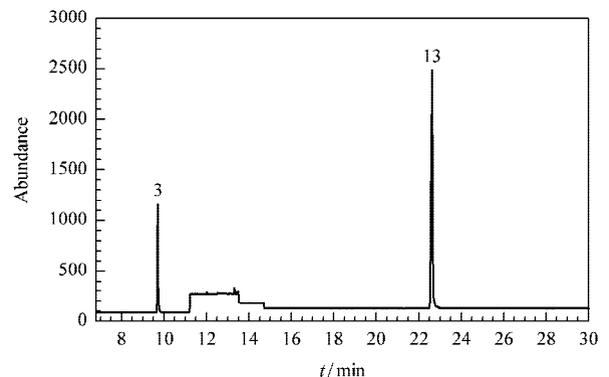


图 3 实际阳性大豆样品的总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion current chromatogram of a real positive bean sample

For peaks, see Fig. 1.

3 结语

本文运用分散固相萃取净化-气相色谱-负化学离子源质谱技术测定了大豆和玉米中 12 种三唑类杀菌剂的残留量。方法简便快速,准确度和精密度高,除了氯唑磷外其他所有农药在 10,20 和 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 等 3 个添加水平下的回收率均处于 70% ~ 130% 之间, $\text{RSD} \leq 13.9\%$;方法的灵敏度高,定量限均低于或等于 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$;方法的选择性好,没有干扰现象,因此可用于大豆和玉米中 12 种三唑类杀菌剂残留量的测定和确证。

参考文献:

- [1] Karthika C , Sachin P J . J Zhejiang Univ Sci B , 2008 , 9(2) : 160
- [2] Trosken E R , Bittner N , Volkel W . J Chromatogr A , 2005 , 1083 : 113
- [3] Štěpán R , Hajšlová J , Kocourek V , et al . Anal Chim Acta , 2004 , 520(1/2) : 245
- [4] Zhang W G , Gao J S , Chen S S , et al . Chinese Journal of Analytical Chemistry (张伟国,高金山,陈姗姗,等. 分析化学), 2005 , 33(10) : 1442
- [5] Charlton A J , Jones A . J Chromatogr A , 2007 , 1141(1) :

- 117
- [6] Shen C Y , Shen W J , Jiang Y , et al . Chinese Journal of Analytical Chemistry (沈崇钰,沈伟健,蒋原,等. 分析化学), 2006 , 34(S) : 36
- [7] Lin Z G , Jin Z , Liu Y , et al . Chemical Journal of Chinese Universities (林竹光,金珍,刘勇,等. 高等学校化学学报), 2005 , 26(12) : 2218
- [8] Lin Z G , Fan Y L , Ma Y , et al . Chinese Journal of Chromatography (林竹光,范玉兰,马玉,等. 色谱), 2006 , 24 (12) : 221
- [9] Shen W J , Xu J Z , Zhao Z Y , et al . Chinese Journal of Analytical Chemistry (沈伟健,徐锦忠,赵增运,等. 分析化学), 2008 , 36(5) : 663
- [10] Shen W J , Xu J Z , Yang W Q , et al . Chinese Journal of Chromatography (沈伟健,徐锦忠,杨雯莹,等. 色谱), 2007 , 25(5) : 753
- [11] Shen W J , Lin H , Zhao Z Y , et al . Chinese Journal of Chromatography (沈伟健,林宏,赵增运,等. 色谱), 2008 , 26(4) : 515
- [12] Shen W J , Yang W Q , Shen C Y , et al . Chinese Journal of Chromatography (沈伟健,杨雯莹,沈崇钰,等. 色谱), 2007 , 25(3) : 418
- [13] Paya P , Anastassiades M , Mack D , et al . Anal Bioanal Chem , 2007 , 389(6) : 1697
- [14] Garrido Frenich A , Martínez Vidal J L , Pastor-Montoro E , et al . Anal Bioanal Chem , 2008 , 390(3) : 945

2007 年中国化学类期刊 CSCD 影响因子前 15 名排行表

期刊名称	影响因子	排名
色谱	0.9661	1
分析化学	0.9637	2
燃料化学学报	0.8669	3
化学学报	0.8143	4
物理化学学报	0.7605	5
催化学报	0.7361	6
高等学校化学学报	0.7270	7
高分子学报	0.6675	8
有机化学	0.6290	9
分析测试学报	0.6241	10
无机化学学报	0.6091	11
环境化学	0.5310	12
化学进展	0.4898	13
结构化学	0.4801	14
分析实验室	0.4731	15

据中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库提供的最新数据(见《中国科技期刊研究》,2008,19(6):1089)统计(统计源为中国科学引文数据库(CSCD)核心库)《色谱》以影响因子 0.9661 居中国科技期刊 CSCD 影响因子 300 名排行表中第 51 名,名列化学类核心期刊的第 1 名。