

◆ 残留与环境 ◆

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定草莓中 咯菌腈和异菌脲残留量

赵圣英¹, 高祥文¹, 于建垒², 刘同金², 梁 慧², 房 锋^{2*}, 李瑞娟^{2*}

(1. 山东仕邦农化有限公司, 济南 250100; 2. 山东省农业科学院植物保护研究所, 济南 250100)

摘要:为了建立一种同时检测草莓中咯菌腈和异菌脲残留量的分析方法,本研究采用乙腈提取草莓样品中的咯菌腈和异菌脲, GCB、PSA 净化, 超高效液相色谱-串联质谱检测, 外标法定量。结果表明, 咯菌腈和异菌脲的质量浓度与峰面积间在 0.01~1 mg/L 范围内呈良好线性关系, 咯菌腈在 0.01~3.0 mg/kg 添加水平下, 平均回收率为 83%~105%, 相对标准偏差为 2.0%~12.1%; 异菌脲在 0.01~10 mg/kg 添加水平下, 平均回收率为 93%~101%, 相对标准偏差为 4.9%~9.4%, 咯菌腈和异菌脲的最低检出浓度均为 0.01 mg/kg。该方法简单、灵敏度高、重现性好, 适用于草莓样品中同时测定咯菌腈和异菌脲的残留量。

关键词: 咯菌腈; 异菌脲; 草莓; 超高效液相色谱-串联质谱法; 残留

中图分类号: TQ 450.2 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2023.04.011

Determination of Fludioxonil and Iprodione Residues in Strawberry by UPLC-MS/MS

ZHAO Shengying¹, GAO Xiangwen¹, YU Jianlei², LIU Tongjin², LIANG Hui², FANG Feng^{2*}, LI Ruijuan^{2*}

(1. Shandong Shibang Agricultural Chemistry Co., LTD, Jinan 250100, China; 2. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: This study aims to develop a new method for residue analysis of fludioxonil and iprodione in strawberry by UPLC-MS/MS. Fludioxonil and iprodione residues in strawberry were extracted with acetonitrile, purified by GCB and PSA, and determined by UPLC-MS/MS. The quantitative analysis was carried out by external standard method. The results showed that fludioxonil and iprodione showed a good linear relationship at the mass concentration range of 0.01-1 mg/L. At the addition level of 0.01-3.0 mg/kg, the average recoveries of fludioxonil in strawberry were 83%-105%, the relative standard deviations were 2.0%-12.1%. At the addition level of 0.01-10 mg/kg, the average recoveries of iprodione in strawberry were 93%-101%, the relative standard deviations were 4.9%-9.4%. The detection limit of fludioxonil and iprodione were 0.01 mg/kg. The method is simple and reliable, sensitive and reproducible, which can be applied for determining fludioxonil and iprodione in strawberry samples.

Key words: fludioxonil; iprodione; strawberry; UPLC-MS/MS; residue

咯菌腈(Fludioxonil), 化学名称为4-(2,2-二氟-1,3-苯并二氧-4-基)吡咯-3-腈, 属于触杀性苯基吡咯类杀菌剂, 其作用机理主要通过抑制分裂蛋白活化

激酶/组氨酸激酶活性, 影响真菌分生孢子萌发、芽管伸长及菌丝生长, 可以防治小麦、玉米、蔬菜等作物的大部分真菌病害^[1-2]。异菌脲(Iprodione), 化学名

收稿日期: 2023-05-11

基金项目: 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2023D01); 农业农村部农药登记残留试验项目(PR2022-005)

作者简介: 赵圣英(1974—), 女, 山东临沂人, 本科, 工程师, 主要从事农药登记工作。E-mail: syzhao2004@163.com

共同第一作者简介: 高祥文(1973—), 男, 山东菏泽人, 本科, 工程师, 主要从事农药研发科研工作。E-mail: xiangwengao@126.com

通信作者: 李瑞娟(1978—), 女, 山东金乡人, 硕士, 研究员, 主要从事农药残留及农药毒理研究。E-mail: ruijuanli@163.com

共同通信作者: 房锋(1982—), 男, 山东泰安人, 博士, 副研究员, 主要从事农药残留及农药毒理研究。E-mail: 57135653@qq.com

称为3-(3,5二氯苯基)-1-异丙基氨基甲酰基乙内酰胺,是一种高效、广谱的二甲酰亚胺类触杀型杀菌剂,兼具保护和治疗作用,其作用机理是抑制蛋白激酶,控制许多细胞功能的细胞内信号,抑制真菌孢子的萌发、产生和菌丝生长,主要用于防治草莓、葡萄、马铃薯等作物的灰霉病、早疫病、黑斑病等真菌病害^[3]。

目前,咯菌腈和异菌脲残留检测分析方法主要有气相色谱法、气相色谱质谱联用法、液相色谱法、液相色谱串联质谱法等,基质主要包括黄瓜、葡萄、番茄、桃等^[4-13],但同时分析草莓中咯菌腈和异菌脲残留的方法尚未见报道。本研究首次建立了咯菌腈和异菌脲在草莓中同时测定的方法,该方法具有操作简便、准确度和精密度高、线性关系良好等特点,为咯菌腈和异菌脲在草莓中的残留降解规律研究、风险评估及安全使用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试剂

咯菌腈标准品(纯度99.7%)、异菌脲标准品(纯度99.3%),上海安谱瑾世标准技术服务有限公司;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯),美国TEDIA公司;硫酸镁(分析纯)、氯化钠(分析纯)、柠檬酸钠(分析纯)、柠檬酸二钠(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;PSA(*N*-丙基二胺,40~60 μm)、GCB(石墨化碳黑,120~400目),博纳艾杰尔科技有限公司。

1.2 仪器

Waters Hclass/xevo TQD超高效液相色谱-三重串联四极杆质谱联用仪,沃特世科技(上海)有限公司;ME204万分之一电子天平、ME802百分之一天平,梅特勒托利多科技(中国)有限公司;Heraeus Multifuge X1R离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;UMV-2漩涡混合器,北京优晟联合科技有限

公司。

1.3 试验材料

草莓品种为‘甜宝’,山东省农业科学院济阳试验示范基地。

1.4 样品前处理

准确称取10.0 g草莓浆液(精确至0.1 g)于50 mL塑料离心管,加入10 mL乙腈,4 g硫酸镁,1 g氯化钠,1 g柠檬酸钠,0.5 g柠檬酸氢二钠,加入陶瓷均质子,盖上离心管盖,剧烈振荡1 min后,4 200 r/min离心5 min,取5 mL上清液加入含有885 mg硫酸镁,150 mg PSA,20 mg GCB的15 mL离心管中,涡旋混匀1 min,4 200 r/min离心5 min,吸取上清液经0.22 μm滤膜过滤,用超高效液相色谱-三重串联四极杆质谱联用仪测定。

1.5 仪器分析条件

(1)液相色谱条件。色谱柱为ACQUITY UPLC® BEH(1.7 μm,2.1 mm×100 mm);柱温为35℃;进样量为4 μL,流动相A、B分别为乙腈和0.1%甲酸水溶液;流速为0.4 mL/min;采用梯度洗脱模式,洗脱程序见表1。

表 1 流动相梯度洗脱参数			
时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	乙腈A/%	0.1%甲酸水溶液B/%
0.0	0.4	50.0	50.0
0.3	0.4	90.0	10.0
3.0	0.4	90.0	10.0
3.01	0.4	50.0	50.0
5.0	0.4	50.0	50.0

(2)质谱条件。采集类型为多重反应监测MRM;离子源为电喷雾离子源ESI;扫描方式咯菌腈为负离子,异菌脲为正离子;毛细管电压为E⁺/2.5 kV,E⁻/1.5 kV;离子源温度为150℃;雾化气体为氮气;雾化器压力<0.690 MPa;撞气体类型为氩气。咯菌腈和异菌脲的质谱参数见表2。

表 2 MRM 模式下咯菌腈和异菌脲质谱参数					
名称	保留时间/min	定量离子对 (<i>m/z</i>)	定性离子对 (<i>m/z</i>)	滞留时间/ms	碰撞能量/eV
咯菌腈	1.52	247.01/126.01	247.01/126.01, 247.01/180	0.118	32; 32
异菌脲	1.70	330/245	330/245, 330/188	0.071	15; 15

1.6 标准溶液的配制

分别称取咯菌腈标准品0.010 2 g、异菌脲标准品0.010 4 g(准确至0.000 1 g)于100 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配制成质量浓度为102 μg/mL咯菌腈标准母液、104 μg/mL异菌脲标准母液,于-6℃避光保存。母液用甲醇分别配制

成100.0、10.0、1.0 mg/L的混合标准溶液。用草莓空白基质配制1.0、0.3、0.1、0.03、0.01mg/L的系列混合基质标准工作溶液。

1.7 添加回收率试验

GB 2763—2021规定咯菌腈在草莓中的最大残留限量为3 mg/kg^[14],CAC规定异菌脲在草莓中的最

大残留限量为10 mg/kg^[15],根据NY/T 788—2018《农作物中农药残留试验准则》^[16]的要求,在草莓空白样品中添加0.01、0.3、3.0 mg/kg质量分数的咯菌腈,0.01、0.3、10.0 mg/kg质量分数的异菌脲,每个加标量平行测定5次,采用1.4样品前处理方法和1.5仪器分析条件进行检测,计算加标回收率和变异系数。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂、净化方法的选择

国内对咯菌腈和异菌脲残留检测的样品前处理,多采用乙腈、二氯甲烷等提取,固相萃取法(SPE)和QuEChERS法净化,固相萃取法净化多采用Florisisil小柱,QuEChERS法净化多采用PSA和无水硫酸镁。本试验过程中,采用乙腈作为提取溶剂,咯菌腈和异菌脲回收率为83%~105%,乙腈相对二氯甲烷后续净化简便,故采用乙腈作为草莓中咯菌腈和异菌脲的提取溶剂。

以草莓空白样品为基质,添加0.3 mg/kg的咯菌腈和异菌脲标准溶液,采用乙腈提取。当不添加净化剂时,咯菌腈回收率为106%~111%,相对标准偏差(RSD)为1.9%;异菌脲回收率为97%~108%,RSD为3.1%。从表3可知,不同用量的PSA对咯菌腈和异菌脲的回收率差异不大,但当添加量为150 mg时,咯菌腈和异菌脲的RSD最小。随着GCB用量的增加,净化液颜色逐渐变浅,当其用量为20 mg时,净化效果较好,减少了草莓基质对咯菌腈和异菌脲定性和定量的影响,咯菌腈和异菌脲回收率分别为99%~108%和93%~104%,回收率符合农作物中农药残留试验准则的要求。综合考虑,试验选择乙腈提取,150 mg PSA,20 mg GCB对样品进行净化。

表3 不同量 PSA 和 GCB 对咯菌腈和异菌脲回收率的影响

净化剂	咯菌腈		异菌脲	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
不加PSA、GCB	106~111	1.9	97~108	3.1
100 mg PSA	102~107	2.1	99~112	5.7
150 mg PSA	102~105	1.3	95~106	4.3
200 mg PSA	104~109	2.2	96~110	5.7
10 mg GCB	103~110	2.7	96~105	4.2
20 mg GCB	99~108	3.6	93~104	4.8
30 mg GCB	100~107	3.3	63~68	3.3

2.2 质谱和色谱条件优化

分别在电喷雾正离子模式和负离子模式下,对1 mg/L的咯菌腈标准溶液和1 mg/L异菌脲标准溶液进行全扫描,确定待测物的母离子和电离方式,调

节毛细管电压和锥孔电压,使母离子信号最强,使用Waters TQD MS手动调谐分析,优化各离子的碰撞能量等质谱参数,选择2个信号强度较强的子离子作为定性离子,离子丰度最强的子离子作为定量离子。结果表明,在负离子模式下,咯菌腈的[M-H]⁻信号强度比正离子模式下的[M+H]⁺强,在正离子模式下,异菌脲的[M+H]⁺信号强度比负离子模式下[M-H]⁻的强。综合考虑,试验选择负离子模式下测定咯菌腈,正离子模式下测定异菌脲,质谱参数见表2。

试验比较了流动相分别为甲醇/水、乙腈/水和乙腈/0.1%甲酸水对咯菌腈和异菌脲的色谱峰形及离子化效率的影响。结果表明,乙腈为有机相时,待测物峰形尖锐对称,无拖尾,且离子化效率高,优于甲醇,以0.1%甲酸水为无机相时,进一步改善峰形,异菌脲的离子化效率提高,咯菌腈的离子化效率有所降低,综合考虑,最终确定优化后的流动相梯度条件见表1。

2.3 标准曲线

在1.5所述的液相色谱质谱条件下,对0.01、0.03、0.1、0.3、1.0 mg/L系列浓度的咯菌腈和异菌脲基质标准溶液分别进样,得到相应的响应值。以溶液质量浓度为横坐标,以其相应的峰面积为纵坐标作图,在0.01~1 mg/L范围内,咯菌腈的标准曲线为 $y=15\ 002.5x+38.39$,相关系数为0.99 52,异菌脲的标准曲线为 $y=64\ 025.2x+181.65$,相关系数为0.998 8,说明咯菌腈和异菌脲在上述浓度范围内质量浓度与峰面积具有良好的线性关系。

2.4 方法的准确度、精密度和定量限

结果表明(表4):添加水平为0.01、0.3 mg/kg和3 mg/kg时,咯菌腈在草莓中的平均回收率为83%~105%,相对标准偏差为2.0%~12.1%;添加水平为0.01、0.3 mg/kg和10 mg/kg时,异菌脲在草莓中的平均回收率为93%~101%,相对标准偏差为4.9%~9.4%。其准确度及精密度均满足农药残留分析与检测标准要求。通过添加试验可知,咯菌腈和异菌脲在草莓中残留分析方法的定量限(LOQ)为0.01 mg/kg,符合《农作物中农药残留试验准则》的要求。

2.5 实际样品分析

50%咯菌腈·异菌脲悬浮剂在草莓上的残留试验样品56份,利用本方法进行检测。结果表明,处理区草莓样品中咯菌腈残留量为0.021~0.18 mg/kg,异菌脲残留量为0.22~1.87 mg/kg,对照区样品咯菌腈、异菌脲残留均未检出。因此,咯菌腈残留量低

于 GB 2763—2021 规定的 MRL 值 3 mg/kg^[14], 异菌脲 残留量低于 CAC 规定的 MRL 值 10 mg/kg^[15]。

表 4 空白草莓添加咯菌腈和异菌脲的回收率和精密度

化合物	添加浓度/ (mg·kg ⁻¹)	回收率/%						RSD/%
		1	2	3	4	5	平均值	
咯菌腈	0.01	72	84	87	96	74	83	12.1
	0.3	101	105	107	106	106	105	2.0
	3	85	90	88	93	97	91	5.1
异菌脲	0.01	88	88	94	86	108	93	9.4
	0.3	105	97	101	94	105	100	4.9
	10	89	102	102	109	102	101	7.1

3 结论

本研究以乙腈为提取溶剂,通过对样品前处理净化方法、色谱和质谱条件进行优化,首次建立了草莓中同时检测咯菌腈和异菌脲残留量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法。咯菌腈在草莓中的平均回收率为83%~105%,相对标准偏差为2.0%~12.1%,异菌脲在草莓中的平均回收率为93%~101%,相对标准偏差为4.9%~9.4%。该方法操作简便,灵敏度、准确度、精密度均符合《农作物中农药残留试验准则》的要求,为咯菌腈和异菌脲在草莓中残留量的同时测定提供理论参考和技术支持。

参考文献

[1] 杨玉柱, 焦必宁. 新型杀菌剂咯菌腈研究进展[J]. 现代农药, 2007, 6(5): 35-39.

[2] 禾丽菲, 陈乐乐, 肖 斌, 等. 番茄叶霉病菌对咯菌腈敏感基线的建立及田间防治效果评价[J]. 中国农业科学, 2018, 51(8): 1475-1483.

[3] CARNEIRO L S, MARTINEZ L C, GONCALVES W G, et al. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 189: 109991.

[4] 邢小霞, 于鑫, 张清明, 等. 6.25%精甲·咯菌腈悬浮种衣剂有效成分在大豆植株和根围土壤中的降解动态及残留分布[J]. 现代农药, 2022, 21(5): 27-33.

[5] 冯玉洁, 潘飞, 谢圣华, 等. 超高效液相色谱法测定啉酰菌胺和咯菌腈在番茄与土壤中的残留[J]. 热带作物学报, 2019, 40(3): 596-600.

[6] 韩梅, 侯雪, 郭灵安. 气相色谱-串联质谱法测定葵花籽中28种农药残留[J]. 农药学报, 2016, 18(1): 93-100.

[7] 张一汀, 井乐刚, 张晓波, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定番茄和土壤中咯菌腈残留量[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(1): 243-248.

[8] 张文. 62%啉菌环胺·咯菌腈水分散粒剂在葡萄上的残留分析及消解动态研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.

[9] 张颂函, 陈秀, 李玉博, 等. 异菌脲对桃树褐腐病防效和膳食风险评估[J]. 现代农药, 2023, 22(1): 68-72.

[10] 胡坤, 杨长志, 魏冬旭, 等. 气相色谱-质谱法测定植物源食品中异菌脲残留量[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(4): 57-60; 12.

[11] 梁林, 张爱娟, 潘金菊, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定黄瓜及番茄中异菌脲残留[J]. 农药科学与管理, 2014, 35(4): 45-48.

[12] 潘虎, 蒲继锋, 代艳娜, 等. GC-ECD法测定不同基质中异菌脲的残留[J]. 东北农业科学, 2022, 47(4): 127-129.

[13] 石妍, 顾钢, 周挺, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定烟叶中异菌脲残留量[J]. 农药, 2019, 58(6): 440-442.

[14] 国家卫生健康委员会, 农业农村部, 国家市场监督管理总局. GB2763—2021 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]. 北京: 中国农业出版社, 2021.

[15] CAC. Pesticide database[DB/OL]. [2022-3-17]. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=111.

[16] 中华人民共和国农业农村部. NY/T 788—2018. 农作物中农药残留试验准则[S]. 北京: 中国农业出版社, 2018.

(责任编辑:高蕾)

抗色素干扰农残检测新技术研发成功

近日,中国农业科学院茶叶研究所茶叶质量与风险评估创新团队在农药残留快速检测技术方面取得新进展,研发出近红外仿生荧光探针抗干扰检测农药残留新技术。该研究结果发表于《生物传感与生物电子(Biosensors and Bioelectronics)》。

该研究根据天然色素光学背景特点,构建了一种能够靶向响应乙酰胆碱酯酶活性的近红外荧光探针,采用近红外激发策略实现了不同植物色素共存下荧光响应信号的准确测量,并在此基础上建立了灵敏度高、可靠性好的农药残留抗干扰快速检测方法。利用该探针,实现了对甜菜、胡萝卜、蓝莓、生菜等不同色系样品中有机磷和氨基甲酸酯类农药的直接快速检测,对样品中敌敌畏的检出限(5.0 μg/kg)低于液质联用等常规仪器检测方法。

(来源:中国农业科学院)