

液质联用法测定人参中氟啶胺的残留

王艺纯, 郭美玲, 唐秋竹, 李秀芬, 徐飞* (吉林省药品检验所, 长春 130033)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱法测定人参中氟啶胺的残留量。方法: 采用固相萃取技术进行样品前处理, 采用 Waters BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm), 以乙腈-5 mM 乙酸铵为流动相梯度洗脱, 电喷雾离子源负离子模式多反应监测 (MRM) 模式定性分析, 采用外标曲线法对人参中氟啶胺的残留量进行检测。结果: 氟啶胺浓度在 0.0015~0.4 μg·L⁻¹ 具有良好的线性关系, $r=1.0000$; 加样回收率符合要求; 方法的检出限 (信噪比 $S/N=3$) 为 1.1 μg·kg⁻¹。结论: 本方法易于操作, 结果准确, 重现性良好, 可用于人参中氟啶胺残留量的测定。

关键词: 氟啶胺; 人参; 农药残留; 液质联用; 含量测定

中图分类号: R282; S48 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)05-0550-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.05.015

Determination of the Residue of Fluazinam in Ginseng by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Wang Yichun, Guo Meiling, Tang Qiuzhu, Li Xiufen, Xu Fei* (Jilin Institute for Drug Control, Changchun 130033, China)

Abstract Objective: To establish the quality standard of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the determination of residue of fluazinam in ginseng. **Methods:** Samples were purified with SPE column and residue of fluazinam was determined by LC-MS/MS under multiple reaction-monitoring negative ionization mode (MRM) using external calibration curve with Waters BEH C18 column (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm) and the mobile phase of acetonitrile-ammonium acetate gradient elution for separation with HPLC. **Results:** The linear range of concentrations of fluazinam was 0.0015~0.4 μg·L⁻¹ ($r=1.0000$) with a good linear relationship. The recovery rates were satisfactory and the detection limit ($S/N=3$) was 1.1 μg·kg⁻¹. **Conclusion:** The method is simple, rapid, precise, and reproducible, which can be used for the determination of residue of fluazinam in ginseng.

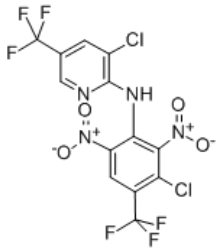
Keywords: fluazinam; ginseng; pesticide residue; LC-MS/MS; content determination

人参是我国传统中医药中一味非常名贵的药材, 历来被视为百药之王, 而随着中药国际化的日益发展, 越来越多的西方国家也认识到了人参的药用和保健价值。而农药残留是人参最重要的安全问题。目前, 人参中的农药残留研究主要集中于有机磷和有机氯等常见或已被禁用的农药品种, 而一些新型农药的研究较少。

氟啶胺是由日本石原产业公司开发的新型取代苯胺类的广谱杀菌剂, 其化学结构式见表1。纯品为黄色结晶粉末, 密度为 1.757 g·mL⁻¹ (20 ℃), 熔点为 115~117 ℃。不溶于水, 溶于甲醇、丙酮等有机试剂。对热、酸、碱稳定, 在光照下易分解。氟啶胺对灰葡萄孢引起的多种灰霉病有特效。同苯并咪唑类、二羧酰亚胺类, 及目前市

场上已有的杀菌剂无交互抗性。对交链孢属、疫霉属、单轴霉属、核盘菌属和黑星菌属等病菌引起的病害亦有良好的活性^[1-4]。

表 1 氟啶胺基本信息表

中文通用名	结构式	分子式
氟啶胺		C ₁₃ H ₄ C ₁₂ F ₆ N ₄ O ₄
中文商品名: 福帅得	分子量: 465.09	英文通用名: Fluazinam
化学名称: 3-氯-N-(3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基)-α, α, α-三氟-2, 6-二硝基-对-甲苯胺		

本试验采用固相萃取小柱净化,液质法检测人参茎叶、人参根及土壤中氟啶胺的残留,并将该方法用于实际样品的检测。研究证明该方法受人参中复杂基质干扰较小,能满足人参中氟啶胺农药残留的检测要求,为研究氟啶胺在人参种植过程中的残留消解奠定了基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

API4000三重四极杆液质联用仪(美国AB公司);KQ700E型超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司);Milli-Q Gradient(美国密理博公司);IKA T18型组织捣碎机;DS-1型固相萃取柱;Thermo-Flosiril(1000 mg, 6 mL);BT-15D 0.1 mg 分析天平(美国赛多利斯公司)。

1.2 试剂

乙腈(色谱级, Fisher试剂公司)、丙酮(农残级, 天津科密欧试剂有限公司)、正己烷(农残级, 天津科密欧试剂有限公司)、氯化钠(分析纯, 国药集团试剂有限公司)、无水硫酸镁(分析纯, 国药集团试剂有限公司)、乙酸铵(国药集团试剂有限公司), 氟啶胺标准品(Dr. Ehrenstorfer, 批号: C13671500), 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 样品的制备与保存

喷洒氟啶胺前,取人参茎叶、人参根及土壤空白样品,氟啶胺的喷洒选取推荐使用剂量262.5 g.a.i/ha,于喷药后的第7天,取人参茎叶、人参根及土壤样品,做好标记,迅速密封,于-20℃

保存。

2.2 氟啶胺的含量测定方法

2.2.1 液相色谱柱及流动相

Waters BEH C18 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm);以乙腈-5 mM乙酸铵(65:35)为流动相,梯度洗脱程序见表1;流速:0.3 mL · min⁻¹;柱温:35℃;进样量:5 μL。

表 1 液相色谱流动相梯度

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 12	65	35
12.1 ~ 13	65 ~ 90	35 ~ 10
13.1 ~ 20	90	10
20.1 ~ 21	90 ~ 65	10 ~ 35
21.1 ~ 30	65	35

2.2.2 质谱条件

ESI 负离子模式、喷雾电压-4000 V、离子传输毛细管温度 300℃、采用 MRM 扫描模式。见表 2。

表 2 氟啶胺质谱条件参数

母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
462.8	397.8	20
	415.8*	23

注: 462.8 → 415.8 为定量离子对; 462.8 → 397.8 为定性离子对; * 为定量离子对。

2.2.3 线性关系考察

取氟啶胺对照品 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解, 并稀释至刻度, 即得每 1 mL 含氟啶胺 100 μg 的溶液, 作为标准储备液。该储备液在 0 ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。精密量取标准工作储备液, 采用系列稀释法配制成 1.5、7.5、15、40、80、200、400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准工作溶液。按照上述色谱及质谱条件进行试验, 对定量离子对进行扫描, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 制作标准曲线, 得回归方程:

$$Y=20765X+10818 \quad r=1.0000$$

结果证明氟啶胺浓度在 0.0015 ~ 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。对照品色谱图见图 1。

2.2.4 样品处理

参考相关文献^[5-10], 建立样品处理方法。分别取剪碎的人参茎叶及人参根样品置于匀浆仪中匀浆, 取土壤样品及匀浆后的人参茎叶和人参根样

品各 4.5 g, 精密称定, 置 50 mL 聚苯乙烯具塞离心管中, 加入水 15 mL, 混匀, 放置 2 h, 精密加入乙腈 15 mL, 剧烈振摇提取 1 min, 再加入预先称好的无水硫酸镁 4 g 与氯化钠 1 g 的混合粉末, 再次剧烈振摇 1 min 后, 离心 (4000 转 $\cdot \text{min}^{-1}$) 1 min。精密吸取上清液 10 mL, 40 $^{\circ}\text{C}$ 蒸干, 加正己烷 1 mL 使溶解, 转移置弗罗里硅土固相萃取小柱 [1000 mg/6 mL, 用正己烷-丙酮 (20 : 80) 混合溶液 10 mL 和正己烷 10 mL 预洗] 上, 残渣用正己烷洗涤 3 次, 每次 1 mL, 洗液转移置同一弗罗里硅土固相萃取小柱上, 再用正己烷-丙酮 (20 : 80) 混合溶液 10 mL 洗脱, 收集全部洗脱液, 置氮吹仪上吹至近干, 加甲醇定容至 5 mL, 即得。按照上述色谱及质谱条件进行试验, 供试品色谱图见图 2。分别取空白土壤、人参茎叶和人参根样品各 4.5 g, 同法制备空白样品, 进样测定, 空白样品色谱图见图 3。

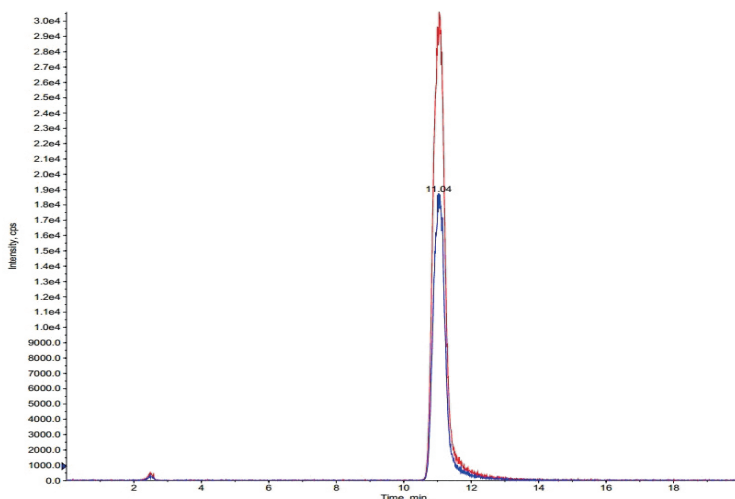


图 1 氟啶胺对照品质谱图

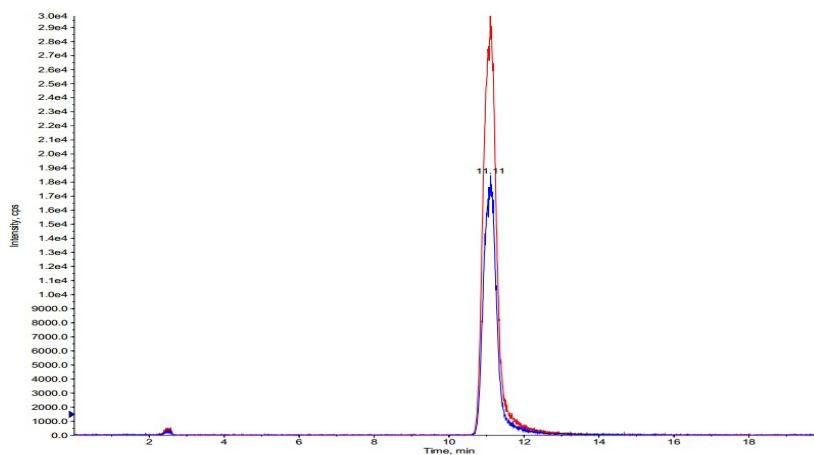


图 2 氟啶胺供试品质谱图

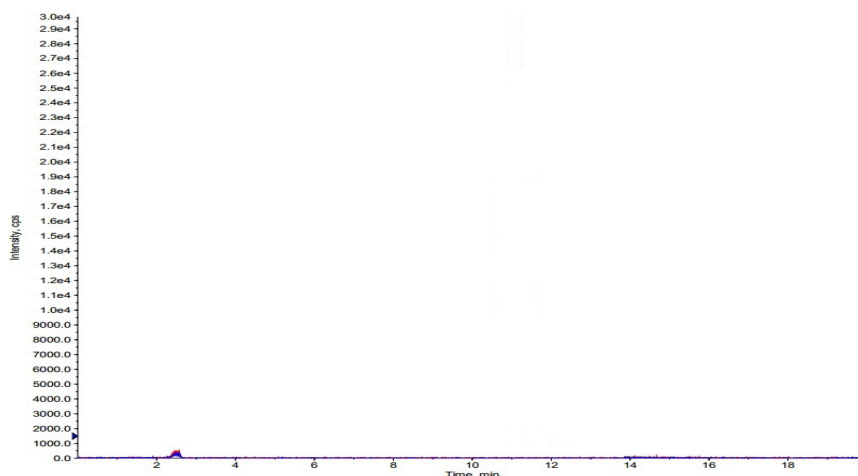


图3 空白样品图

2.2.5 精密度试验

取同一供试品溶液，按上述液质联用条件，连续进样测定6次，氟啶胺峰面积积分值的RSD为2.0%，表明仪器进样精密度良好。

2.2.6 重复性试验

取人参样品，依“2.2.4”样品处理方法提取6份供试品溶液，按上述液质联用条件测定，结果氟啶胺含量 $\bar{X} = 3.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，RSD为7.4%。

2.2.7 回收率试验

我国目前尚未制定氟啶胺在人参中的最大允许残留限量（MRL）。欧盟规定氟啶胺在人参中的最大残留量为 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[11-12]。参照氟啶胺在人参中的最大残留限量（MRL），根据防效及残留量结果，设定3个加标浓度为0.05、0.5、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。取空白土壤、人参茎叶及人参根样品各4.5 g，分别添加氟啶胺0.05、0.5、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3个水平，重复5次，按照上述前处理方法和仪器条件测定，结果见表3。

表3 回收率试验结果

样品	添加水平 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率 /%					平均回收率 /%	CV
土壤	0.05	85.5	84.3	85.3	82.6	84.8	84.5	1.4%
	0.5	97.2	98.5	100.1	101.3	100.8	99.6	1.7%
	1.0	99.8	98.6	100.2	100.8	100.5	100.0	0.9%
人参茎叶	0.05	79.2	76.8	77.6	78.4	79.5	78.3	1.4%
	0.5	102.1	103.5	101.0	103.4	102.5	102.5	1.0%
	1.0	102.5	103.5	104.1	103.8	102.8	90.0	0.7%
人参根	0.05	75.2	75.1	77.3	77.0	78.3	76.6	1.8%
	0.5	98.5	97.5	98.0	99.2	96.5	97.9	1.0%
	1.0	100.2	104.2	102.6	103.5	102.5	102.6	1.5%

2.2.8 检出限

精密量取氟啶胺对照品溶液（ $3.9321 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）0.3 mL，加入具塞聚乙烯离心管中，挥干，取不含

氟啶胺的人参样品4.5 g，精密称定，置50 mL聚苯乙烯具塞离心管中，其余按“2.2.4”样品处理方法制备。当样品浓度为 $1.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时，色谱图中氟

啶胺色谱峰基本为3倍的基线噪音,由此确定该方法检出限为 $1.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

3 结果与讨论

3.1 供试品制备方法考察

氟罗里硅土柱洗脱溶剂系统的考察:分别以正己烷-二氯甲烷、正己烷-丙酮系统作为洗脱溶剂,洗脱人参样品中的氟啶胺,结果正己烷-丙酮系统优于正己烷-二氯甲烷系统,因此,选择正己烷-丙酮作为洗脱溶剂系统^[2-3]。

氟罗里硅土柱洗脱溶剂比例的考察:采用正己烷-丙酮(80:20)、正己烷-丙酮(50:50)、正己烷-丙酮(20:80)作为样品洗脱溶剂,结果正己烷-丙酮(20:80)作为洗脱溶剂明显优于正己烷-丙酮(80:20)、正己烷-丙酮(50:50),因此,选择正己烷-丙酮(20:80)作为洗脱溶剂。

洗脱剂量的考察:采用正己烷-丙酮(20:80)为洗脱溶剂,分别考察洗脱量为10、20、30 mL时的洗脱情况,结果三者无显著性差异,因此,选择洗脱体积为10 mL。

3.2 对照品溶液的配制方法考察

在痕量分析中,通常采用空白基质加标制备校准曲线,以消除常见的基质效应。在试验中,考察了氟啶胺采用空白基质配制对照液与采用纯溶剂配制对照液,结果无差异,考虑到试验操作的便捷性,最终决定采用纯溶剂配制对照品溶液。

3.3 液质联用仪分析条件的确定

质谱条件的优化:根据氟啶胺分子的结构,选择ESI(-)作为电离化模式,将氟啶胺标准品配制成 $1 \sim 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甲醇溶液,通过全扫描模式找出母离子。使用二级扫描的方式,根据母离子选择特征离子,选用离子强度较大的2个子离子作为定量和辅助定性离子,并优化其碰撞能量及去簇电压,最后在MRM方式中进一步确定离子碰撞能量(CE)、去簇电压(DP)。

3.4 质量分析评价

本方法可以快速、简便地测定氟啶胺在人参种植过程中的残留量,方法技术先进,回收率良好、灵敏度高、精密度好^[13-15],对于基质复杂的人参样品,利用选择离子对同时定性和定量测定人参中氟啶胺的残留量,大大提高了方法的选择性,可以满足国内外检测限量的要求和国际通用的质量控

制要求。

参考文献:

- [1] 何建玲. 土壤中氟啶胺光化学降解行为研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 313-314.
- [2] 徐秀莹, 刘晓凤, 王鸣华. 氟啶胺的水解与土壤降解特性研究[J]. 安全与环境学报, 2014, 14(5): 252-256.
- [3] 晓岚. 新杀菌剂氟啶胺的生物活性[J]. 农药译丛, 1996, 18(1): 43-48.
- [4] 尚慧, 杨佩文, 董丽英, 等. 福帅得(氟啶胺)防治大白菜根肿病田间药效试验报告[J]. 研究论述, 2008, 3(1): 32-33.
- [5] 宋金翠, 杨成, 刘艳荣. 液质联用测定氟尼辛葡甲胺的条件优化[J]. 食品工程, 2000, 2(4): 55-64.
- [6] 中国药典: 四部[S]. 2015: 209-224.
- [7] 董丰收, 杨爽, 刘新刚, 等. 气相色谱电子捕获法测定氟啶胺在辣椒和土壤中动态残留[J]. 中国农业科学, 2008, 41(6): 1684-1690.
- [8] 张武, 李二虎, 张强, 等. 超高效液相色谱串联质谱测定马铃薯和土壤中氟啶胺残留[J]. 农药科学与管理, 2012, 33(8): 35-39.
- [9] 王芳, 成妙金, 李欧燕. 40%氟霜·氟啶胺悬浮剂的高效液相色谱分析[J]. 现代农药, 2015, 14(1): 26-28.
- [10] 韩红新, 吴莉宇, 徐志, 等. 液质联用(ESI)检测蔬菜中4种农药残留[J]. 农药, 2008, 47(3): 1241-1243.
- [11] 章强华, 董国堃, 姚晗. 人参常用农药国外残留限量标准的分析[J]. 人参研究, 2006, 1(1): 2-10.
- [12] 郑庆伟. 欧盟拟放宽人参根中氟啶胺的最大残留限量[J]. 农药市场信息, 2014, 15: 39-39.
- [13] 沈燕, 刘贤进, 余向阳, 等. 大米中多农药残留的串联液质联用检测法[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1): 222-224.
- [14] 丁明, 钟冬莲, 汤富彬, 等. 固相萃取/液质联用测定竹笋中丁基氟虫脒农药残留研究[J]. 分析测试学报, 2013, 32(3): 372-376.
- [15] 宋金翠, 杨成, 刘艳荣. 液质联用测定氟尼辛葡甲胺的条件优化[J]. 食品工程, 2000, 2(4): 55-64.

(收稿日期 2016年11月14日 编辑 王雅雯)