

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定香草兰中多菌灵和甲霜灵残留

乐渊<sup>1</sup>, 尹桂豪<sup>1</sup>, 刘春华<sup>1</sup>, 宗迎<sup>2</sup>, 万瑶<sup>1</sup>, 徐志<sup>1</sup>

(1.中国热带农业科学院分析测试中心, 海南 海口 571101; 2.中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南 万宁 571533)

**摘要:**建立了香草兰样品中多菌灵和甲霜灵残留的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。样品用乙腈溶液提取,经氨基活性碳复合固相萃取柱净化,以多离子反应监测(MRM)模式进行测定。多菌灵和甲霜灵的最低检出限均为 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,在 10.0 ~ 500.0  $\text{ng}/\text{mL}$  的线性范围内,相关系数均大于 0.99。多菌灵在香草兰中的添加回收率为 84.2%~100.3%,相对标准偏差(RSD)为 1.3%~5.4%;甲霜灵在香草兰中的添加回收率为 80.4%~100.0%,相对标准偏差(RSD)为 1.7%~6.2%。该方法灵敏度高、准确性好、分析时间短,适用于香草兰样品中多菌灵和甲霜灵残留量的检测。

**关键词:**超高效液相色谱-串联质谱法;多菌灵;甲霜灵;香草兰

中图分类号:TS207.7; O657

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2012)19-0098-04

## Determination of carbendazim and metalaxyl in vanilla by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LE Yuan<sup>1</sup>, YIN Gui-hao<sup>1</sup>, LIU Chun-hua<sup>1</sup>, ZONG Ying<sup>2</sup>, WAN Yao<sup>1</sup>, XU Zhi<sup>1</sup>

(1. Analysis and Testing Center, Academy of Tropical Agriculture Science, Haikou 571101, China;

2. Beverage and Spice Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Science, Wanning 571533, China)

**Abstract:** An analytical method was developed for the determination of carbendazim and metalaxyl in vanilla by using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The pesticides were extracted by acetonitrile, and cleaned up by carbon/ $\text{NH}_2$  solid phase extraction (SPE) column, then quantified with multiple reactions monitoring (MRM). The limits of detection (LOD) for both pesticides were 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Calibration curves exhibited good linearity over the concentration range from 10.0 to 500.0  $\text{ng}/\text{mL}$ , with their correlation coefficients above 0.99. Average recoveries for carbendazim spiked at 3 levels ranged from 84.2% to 100.3%, with a relative standard deviations (RSD) range from 1.3% to 5.4%. Average recoveries for metalaxyl spiked at 3 levels ranged from 80.4% to 100.0%, with a RSD range from 1.7% to 6.2%. The developed method was sensitive, rapid and reliable. As a result, it can be applied for determination of carbendazim and metalaxyl in vanilla.

**Key words:** UPLC-MS/MS; carbendazim; metalaxyl; vanilla

香草兰又名香荚兰、香子兰等,是一种名贵的多年生热带藤本香料植物,原产于墨西哥东南部及洪都拉斯、马达加斯加等热带岛屿国家和地区<sup>[1]</sup>。香草兰鲜豆荚经生香加工后具有沁人心脾的独特香气,广泛用于高档食品、香烟、酒、化妆品和医药等的配香原料,素有“天然食品香料之王”的美誉。自1962年中国热带农业科学院从斯里兰卡引种试种成功后,香草兰在我国海南省和云南省等地有较大面积种植<sup>[2]</sup>。在种植过程中,为有效防治根(茎)腐病和细菌性软腐病等病害,通常会施用各种农药<sup>[3]</sup>。多菌灵又名棉萎灵、苯并咪唑44号,是一种广谱性杀菌剂,对水稻、棉花、蔬菜和果树等作物由真菌引起的病害有防治效果<sup>[4-6]</sup>。甲霜灵属低毒内吸性杀菌剂,可用于防治黄瓜霜霉病和疫病,茄子、番茄及辣椒的棉疫

病等<sup>[7-8]</sup>。多菌灵和甲霜灵可用于防治香草兰镰刀菌根(茎)腐病和疫病等病害。

然而,农药的不合理使用会影响农产品的质量安全,进而有害于消费者的身体健康。目前有关香草兰中多菌灵和甲霜灵的残留检测研究尚未见报道,本试验利用固相萃取小柱净化,超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定香草兰中多菌灵和甲霜灵的残留量。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

试验原料:香草兰豆荚由中国热带农业科学院香辛饮料研究所提供。

试验试剂:多菌灵和甲霜灵标准品购自农业部环境保护科研监测所;甲醇、乙腈购自美国Fisher公司,色谱纯;甲苯购自上海国药集团,分析纯;试验用水为经Milli-Q净化系统0.22  $\mu\text{m}$ 过滤膜过滤的纯化水。

试验仪器和设备:Waters超高效液相色谱-四极杆串联质谱仪(ACQUITY UPLC/Quattro Premier™ XE),配有电喷雾离子源(ESI)和Masslynx™ 4.0工作站,购自美国

收稿日期:2012-07-16

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(200903024-03)

作者简介:乐渊(1985-),男,硕士,研究实习生,E-mail:leyuan06@sina.com

通讯作者:徐志(1978-),男,硕士,副研究员,E-mail:honic@yeah.net

net

Waters公司;ACQUITY\_UPLC™ BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱,购自美国Waters公司;氨基活性碳复合固相萃取柱(500 mg/6mL),购自美国瓦里安公司;电子分析天平,购自瑞典梅特勒托利多公司;离心机,购自上海安亭科学仪器厂;超声仪,购自上海必能信超声有限公司。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 标准溶液的配制** 将多菌灵和甲霜灵标准品用甲醇配制成浓度为100 μg/mL的混合标准储备液,在-18℃避光保存,有效期3个月。将上述标准储备液用流动相(甲醇-水,体积比为1:1,下同)稀释成浓度为10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 ng/mL的系列混合标准溶液,现配现用。

**1.2.2 样品前处理** 取香草兰豆荚(约200 g),用干净纱布轻轻擦去表面的附着物,切成小片段,粉碎后密封,制成试样备用,常温下保存。称取5.00 g样品于50.0 mL聚四氟乙烯离心管中,加入10 mL乙腈,超声15 min,随后在离心机中以4 000 r/min的转速离心5 min,将上清液转移到蒸馏瓶中。残渣再加入10 mL乙腈,重复提取1次,合并上清液于蒸馏瓶中,35℃下浓缩至干。加入2 mL甲苯-乙腈(体积比为1:3,下同)溶解,待净化。氨基活性碳固相萃取小柱预先用6 mL甲苯-乙腈活化,然后加入上

述提取液,用20 mL甲苯-乙腈洗脱,流速约为1滴/s,收集全部洗脱液于蒸馏瓶中,35℃下浓缩至干。用1.00 mL甲醇-水溶解,涡旋,过0.2 μm微孔滤膜,待仪器测定。

**1.2.3 仪器工作条件** UPLC工作条件:流动相A为甲醇,流动相B为含1 mmol乙酸铵的水溶液;柱温:35℃;样品室温度:10℃;进样体积:5 μL;流速:0.25 mL/min。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相		梯度变化曲线
	A(%)	B(%)	
0	10.0	90.0	6
1.0	30.0	70.0	6
3.0	70.0	30.0	6
3.5	70.0	30.0	6
4.0	75.0	25.0	6
4.5	10.0	90.0	6
5.0	10.0	90.0	6

ESI-MS/MS工作条件:正离子电离模式;毛细管电压:3.00 kV;脱溶剂气温度:350℃;脱溶剂气流量:900 L/h;锥孔气流量:50 L/h;离子源温度:110℃;碰撞气流速:0.21 mL/min。MRM分析的质谱参数见表2。

表2 MRM分析的质谱参数

药剂	保留时间(min)	电离方式	母离子(m/z)	锥孔电压(V)	子离子1(m/z)	碰撞能量	子离子2(m/z)	碰撞能量
多菌灵	3.52	ES <sup>+</sup>	192.0	33	160.1*	18	132.1	28
甲霜灵	4.41	ES <sup>+</sup>	280.2	20	220.1*	14	192.1	12

注:带“\*”为定量离子。

## 2 结果与分析

### 2.1 固相萃取柱的选择

由于香草兰含有多种香气成份,基质较为复杂,直接上机会对仪器测定造成干扰,文献报道多采用固相萃取柱净化的方法去除基质干扰<sup>[9-11]</sup>。固相萃取柱的类型是影响方法回收率的重要因素之一。通过加标富集的方法测试了费罗里硅土柱、氨基固相萃取柱、氨基活性碳复合固相萃取小柱和中性氧化铝柱等4种固相萃取柱的净化富集效果。费罗里硅土柱的回收率为70.8%~75.9%(多菌灵)与56.5%~64.7%(甲霜灵);中性氧化铝柱的回收率为54.6%~60.1%(多菌灵)与37.9%~49.2%(甲霜灵);氨基固相萃取柱和氨基活性碳复合固相萃取柱的回收率达79.1%~86.3%(多菌灵)和90.0%~103.2%(甲霜灵)。氨基活性碳复合固相萃取柱的洗脱液为澄清透明,另外3种小柱的洗脱液呈深黄色,说明氨基活性碳固相萃取柱去除色素等杂质的效果好。因此,选用氨基固相萃取柱作为测定多菌灵和甲霜灵的前处理固相萃取柱。

### 2.2 提取溶剂和体积的选择

提取溶剂的种类也直接影响方法回收率的高低。

良好的提取溶剂应对目标农药的提取效率高,而对杂质则会较少提取<sup>[12-13]</sup>。试验在空白香草兰样品中添加20 μg/kg水平的多菌灵与甲霜灵,分别用乙腈、甲醇、丙酮、二氯甲烷和乙酸乙酯等溶剂提取。结果表明,以乙腈作提取溶剂时,回收率最高、分别达87.7%(多菌灵)和97.6%(甲霜灵),且提取液颜色较浅,其他4种溶剂的提取液呈棕黄色、颜色较深。因此,选用乙腈作为提取溶剂。

过少的提取溶剂因不能将目标农药从样品中完全提取出来,会导致方法的回收率低;而过多的提取溶剂则会使试验成本增高,并导致环境污染<sup>[14]</sup>。在空白香草兰样品中添加20 μg/kg水平的多菌灵与甲霜灵,用不同体积的乙腈进行提取,测定结果见图1。当提取溶剂体积为20 mL时,多菌灵和甲霜灵的回收率达86.2%、94.9%,体积再增加,回收率没有明显提高。为减少溶剂的使用量,提取溶剂体积选为20 mL。

### 2.3 洗脱溶剂体积的选择

因甲苯-乙腈混合溶剂对多菌灵和甲霜灵有较强的洗脱能力<sup>[15-16]</sup>,故选择甲苯-乙腈作为洗脱溶剂。在空白香草兰样品中添加20 μg/kg水平的多菌灵与甲霜灵,用不

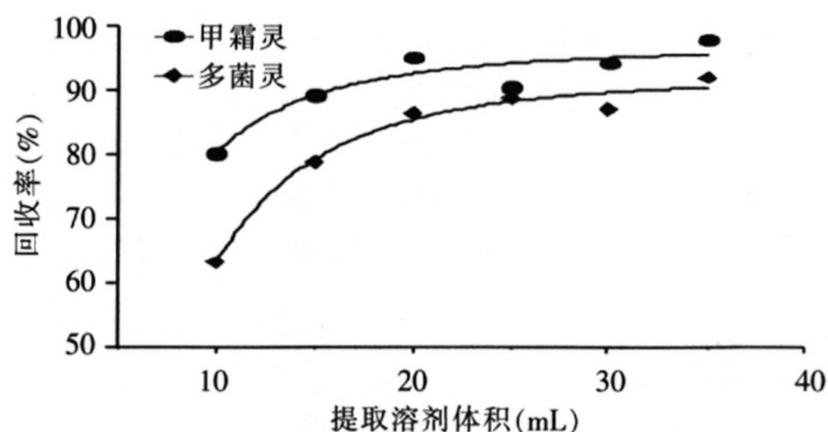


图1 提取溶剂体积对回收率的影响

同体积的洗脱剂洗脱,结果见图2。当洗脱体积为20 mL时,多菌灵和甲霜灵的回收率达87.5%和94.5%,洗脱溶剂体积再增加,回收率没有明显提高。因此,洗脱溶剂体积选为20 mL。

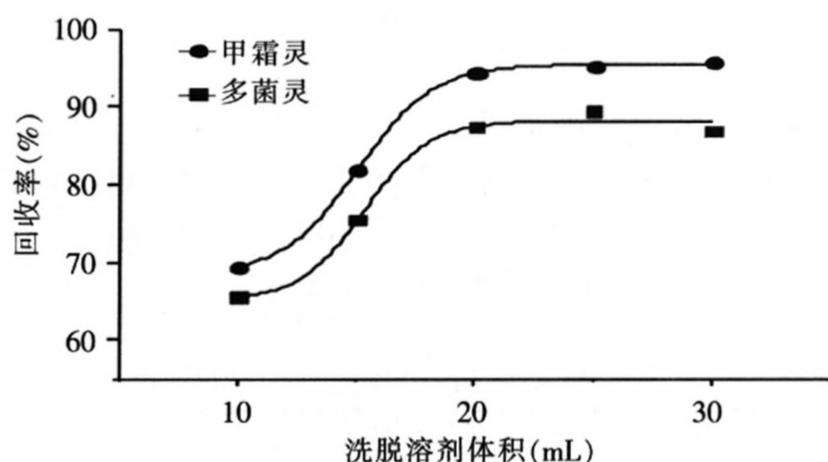


图2 洗脱溶剂体积对回收率的影响

## 2.4 仪器条件的优化

试验比较了甲醇-水(含0.1%甲酸)、乙腈-水(含0.1%甲酸)和甲醇-水(含1 mmol 乙酸铵)作为流动相时的效果,结果表明,甲醇-水(含1 mmol 乙酸铵)体系具有对多菌灵和甲霜灵较好的分离能力与峰形,加入的乙酸铵能增加离子化效率,使质谱的灵敏度提高。

分别对多菌灵和甲霜灵进行质谱分析,以优化质谱分析条件,获得最佳灵敏度。质谱检测采用正离子模式,与负离子模式相比响应更好。研究了不同参数,如毛细管电压(2.0~4.5 kV)、脱溶剂气温度(250~450℃)、脱溶剂气流量(350~900 L/h)和锥孔气流量(10~60 L/min)等对测定结果的影响,确定最佳参数分别为3.0 kV、350℃、900 L/h和50 L/min。此条件下的标准质谱峰见图3。

## 2.5 标准曲线与检出限

分别配制浓度为10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 ng/mL的多菌灵和甲霜灵混合标准溶液,用上述方法测定,经线性回归发现线性范围为10.0~500.0 ng/mL。分别以多菌灵和甲霜灵峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标绘制标准曲线,其回归方程及相关系数见表3。以信噪比 $S/N=3$ 计,方法中多菌灵和甲霜灵的最低检出限(LOD)均为2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

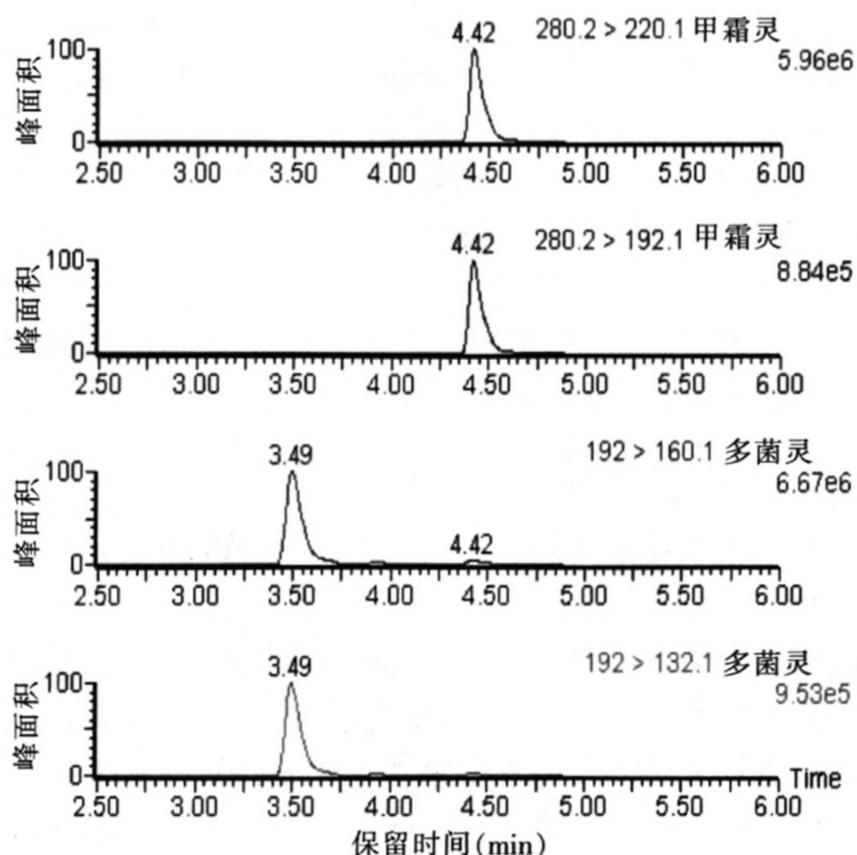


图3 甲霜灵和多菌灵的标准质谱峰

表3 多菌灵和甲霜灵的标准曲线

药剂	回归方程	相关系数 $R^2$	线性范围 (ng/mL)
多菌灵	$y=5762.85x+41419.1$	0.9927	10.0~500.0
甲霜灵	$y=5721.91x+13168.2$	0.9979	10.0~500.0

## 2.6 精密度与准确度试验

取空白香草兰样品,按2.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3个水平进行加标,按上述方法进行处理,平行测定5次,作回收率和精密度试验。结果(表4)显示,回收率在80.4%~100.3%之间,相对标准偏差(RSD)在1.3%~6.2%之间,符合方法学要求。

表4 方法回收率及精密度试验结果(n=5)

药剂	标准加入量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
多菌灵	2.0	86.4~100.3	94.7	5.4
	10.0	86.0~90.5	87.8	2.0
	20.0	84.2~87.7	85.8	1.3
甲霜灵	2.0	80.4~95.1	88.5	6.2
	10.0	92.6~100.0	97.2	3.2
	20.0	93.2~97.6	95.9	1.7

## 3 结语

本研究结果表明,采用超高效液相色谱-串联质谱法测定香草兰中多菌灵和甲霜灵的残留,分析时间短,只需要5.0 min,大大提高了工作效率。采用氨基活性碳复合固相萃取柱净化样品,具有回收率高、重复性好等优点。多离子反应监测(MRM)模式抗干扰能力强,使得方法的选择性好、灵敏度高,精密度和准确度都能达到定量分析

的要求,适用于香草兰样品中多菌灵与甲霜灵的分析。

#### 参考文献:

- [1] 宋应辉,吴小炜.世界香荚兰产品现状及未来预测[J].云南热作科技,1997,20(4):12-16.
- [2] 陈封宝,王庆煌,董邦伯.香荚兰在海南兴隆地区引种试种研究[J].热带作物学报,1989,10(1):53-61.
- [3] 彭正强,程立生.香草兰害虫研究概况[J].热带作物科技,1991,12(1):36-38.
- [4] 吴旭刚,袁旭,庞宏宇.RP-HPLC法测定葱蒜类蔬菜中多菌灵的残留[J].食品科学,2008,29(5):367-369.
- [5] 王宇,陈彤,张月梅,等.高效液相色谱-串联质谱法测定人参中的多菌灵残留[J].大连工业大学学报,2010,29(3):165-167.
- [6] 杨俊,王文辉,王齐,等.高效液相色谱法测定芦荟中多菌灵的残留量[J].分析试验室,2009,28(5):173-175.
- [7] 徐娟,陈捷,林峰,等.液相色谱-串联质谱法测定八种食品中甲霜灵[J].食品科学,2010,31(4):175-178.
- [8] 董顺玲,胡家焱,何志强,等.RP-HPLC测定中药材中甲霜灵的残留量[J].中国药科大学学报,2004,35(2):131-134.
- [9] Jamal H, Iris H, Jean-Marc R. Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1020(2): 173-187.
- [10] Bernhard M H. Method development for the determination of 52 pesticides in tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(51): 8953-8959.
- [11] Chen G Q, Wang Y, Song W Q, et al. Rapid and selective quantification of L-theanine in ready-to-drink teas from Chinese market using SPE and UPLC-UV[J].Food Chemistry, 2012, 135(2): 402-407.
- [12] Sagar C U, Kaushik B, Soma D, et al. Dissipation and distribution behavior of azoxystrobin, carbendazim, and difenoconazole in pomegranate fruits [J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(14):7866-7873.
- [13] Luis V F, Jesus S A, Purificacion F Z, et al. Development of a liquid-liquid extraction method for the determination of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol during the fermentative process of must by GC-NPD [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(5): 750-757.
- [14] 李冠华,沈彬,张占恩.液相微萃取 GC/MS 法测定甲霜灵、三唑酮和二甲戊灵[J].苏州科技学院学报(工程技术版),2008,21(3):38-42.
- [15] 何书海,李腾崖,陈菲.高效液相色谱法对环境样品中甲基托布津与甲霜灵残留的测定[J].分析测试学报,2010,29(2):161-164.
- [16] 辜雪英,仇满珍,刘云珠.高效液相色谱法测定柑橘中多菌灵、噻菌灵、甲基硫菌灵和硫菌灵残留量[J].理化检验-化学分册,2010,46(7):797-799.

(上接第 94 页)

剂量依赖关系。当多糖浓度分别为 9 mg/mL 时,菌丝体多糖组分 M1、M2 和 M3 对·OH 的清除率分别为 61.67%、43.59% 和 37.02%; 对 O<sub>2</sub><sup>-·</sup> 的清除率分别为 64.63%、44.71% 和 36.07%。

#### 参考文献:

- [1] Zhang L N, Li X L, Xu X J, et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan[J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(8): 1515-1521.
- [2] 张倩,江萍,秦礼康,等.多糖功能的研究进展[J].食品研究与开发,1998,19(3):11-13.
- [3] Markova N, Michailova L, Kussovski V, et al. Intranasal application of lentinan enhances bactericidal activity of rat alveolar macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Pharmazie, 2005, 60(1): 42-48.
- [4] 毕和平,张立伟,韩长日,等.三叉苦提取物抗氧化作用的研究[J].食品科学,2007,28(7):57-60.
- [5] 苗敬芝,吕兆启.灵芝深层液体发酵多糖的提取与测定[J].食品科技,2003(2):13-14.
- [6] 武梅.灵芝菌丝体液体发酵培养产灵芝多糖动态研究[J].云南大学学报(自然科学版),1999,21(2):165-166.
- [7] 宋频然,常继东.灵芝胞外多糖高产菌株筛选及其深层发酵培养基的优化[J].食用菌学报,2003,10(2):9-16.
- [8] 李建武,肖能康,余瑞元,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:125.
- [9] 张劲松,方积年.白木通多糖的研究[J].药学学报,1997,32(6):438-441.
- [10] 申进文,余海尤,霍云凤,等.斜生褐孔菌多糖组分的纯化及其生物活性研究[J].菌物学报,2009,28(4):564-570.
- [11] 张志军,李淑芳,魏雪生,等.灵芝多糖体外抗氧化活性的研究[J].化学与生物工程,2011,28(3):63-65.
- [12] 周萍,安东,王朝川,等.食用菌复合多糖的抗氧化活性研究[J].中国食用菌,2011,30(6):42-44,48.
- [13] 盛伟,方晓阳.杏鲍菇菌丝体胞内与胞外多糖体外抗氧化活性研究[J].中国林副特产,2009,98(1):7-10.
- [14] Cao G, Sofie E, Prior R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 22(5):749-760.
- [15] 毕华南.墨汁鬼伞液体发酵培养条件及生物活性研究[D].无锡:江南大学,2008.