

张蕊, 邓露晴, 李祥英, 等. 液相色谱-质谱联用测定咖啡中三氟菌酯及代谢物残留[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 72-76.
ZHANG Rui, DENG Luqing, LI Xiangying, et al. Determination of trifloxystrobin and its metabolite in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry[J].
Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(1): 72-76.

液相色谱-质谱联用测定咖啡中三氟菌酯及代谢物残留

张蕊, 邓露晴, 李祥英, 赵俊龙, 李梓琳, 凡帅, 刘承兰
(天然农药与化学生物学教育部重点实验室/广东省生物农药创制与应用重点实验室/
华南农业大学农学院, 广东广州 510642)

摘要:【目的】建立一种同时测定咖啡中三氟菌酯及其代谢物三氟菌酸残留量的液相色谱-质谱检测方法。【方法】样品中待测农药组分采用含 ϕ 为 1% 乙酸的乙腈匀浆后超声提取, 氯化钠和无水硫酸镁盐析及高速离心后, 取上清液经 C_{18} 分散固相萃取净化, 采用液相色谱-质谱联用检测, ESI (+) 电离和多反应监测 (MRM) 定量测定。【结果】添加三氟菌酯质量分数为 0.01~2.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 三氟菌酯在咖啡全果中的添加回收率为 87.8%~106.7%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.3%~5.8%; 在咖啡豆中添加回收率为 83.2%~88.1%, RSD 为 2.0%~6.2%。三氟菌酸在咖啡全果中的添加回收率为 71.5%~106.0%, RSD 为 1.0%~6.1%; 在咖啡豆中的添加回收率为 84.4%~105.2%, RSD 为 1.0%~5.2%。三氟菌酯及三氟菌酸在咖啡中的最小检出量均为 2.5×10^{-12} g, 最低检出限均为 0.01 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。【结论】该方法操作简便、快速和稳定, 可以满足咖啡实际样品中三氟菌酯及其代谢物三氟菌酸的残留检测要求。

关键词: 三氟菌酯; 三氟菌酸; 液相色谱-质谱联用; 农药残留; 咖啡

中图分类号: S482.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)01-0072-05

Determination of trifloxystrobin and its metabolite in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry

ZHANG Rui, DENG Luqing, LI Xiangying, ZHAO Junlong, LI Zilin, FAN Shuai, LIU Chenglan
(Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education/Key Laboratory of Bio-pesticide
Innovation and Application of Guangdong Province/College of Agriculture, South China Agricultural
University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】 To develop a method for determining trifloxystrobin and its metabolite trifloxystrobin acid simultaneously in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). 【Method】 The sample was ultrasonically extracted with acetonitrile (including $\phi=1\%$ acetic acid), and salted out with sodium chloride and anhydrous magnesium sulfate. After high-speed centrifugation, the supernatant was purified by C_{18} dispersive solid-phase extraction and detected by LC-MS. The quantitative determination was conducted by ESI (+) ionization mode and multi-reaction monitoring (MRM). 【Result】 The recovery rates of trifloxystrobin in coffee fruits ranged from 87.8% to 106.7%, and the relative standard deviation (RSD) ranged from 1.3% to 5.8% when the additive amount of trifloxystrobin ranged from 0.01 to 2.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The recovery rates of trifloxystrobin in coffee beans ranged from 83.2% to 88.1%, and the RSD ranged from 2.0% to 6.2%. The recovery rates of trifloxystrobin acid in coffee fruits ranged from 71.5% to 106.0%, and the RSD ranged from

收稿日期: 2018-04-23 网络首发时间: 2018-12-28 14:39:00

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20181227.1104.034.html>

作者简介: 张蕊 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 2567597829@qq.com; 通信作者: 刘承兰 (1976—), 男, 教授, 博士, E-mail: liuchenglan@scau.edu.cn

基金项目: 农业部农药检定所农药残留项目 (31371959)

1.0% to 6.1%. The recovery rates of trifloxystrobin acid in coffee beans ranged from 84.4% to 105.2%, and the RSD ranged from 1.0% to 5.2%. The minimum detectable amounts of both trifloxystrobin and trifloxystrobin acid in coffee were 2.5×10^{-12} g, and the minimum limits of quantitation were 0.01 mg·kg⁻¹. 【Conclusion】 This method is simple, rapid and stable, and can meet the requirement for detecting the residues of trifloxystrobin and its metabolites in coffee samples.

Key words: trifloxystrobin; trifloxystrobin acid; LC-MS; pesticide residue; coffee

脞菌酯 (Trifloxystrobin), 化学名称为甲基 (E)-甲氧基亚胺基-{(E)- α -[1-(α,α,α -三氟间甲苯基) 亚乙基氨基氧基]邻甲苯基} 乙酸乙酯, 化学分子式为 C₂₀H₁₉F₃N₂O₄, 相对分子质量为 408.37, 属甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂, 是一种呼吸链抑制剂, 杀菌谱广, 活性高, 对子囊菌亚门 Ascomycotina、担子菌门 Basidiomycota、半知菌纲 Deuteromycetes 和卵菌纲 Oomycetes 真菌都具有良好的活性^[1]。植物吸收脞菌酯后, 会被代谢为脞菌酸 (Trifloxystrobin acid, 编号为 CGA321113), 而脞菌酸毒性高于母体^[2]。因此, 有必要同时对其代谢物进行检测。美国规定, 脞菌酯在咖啡豆中的农药最高残留限量 (MRL) 为 0.02 mg·kg⁻¹。我国暂未制定脞菌酯在咖啡中的 MRL 值。

目前, 关于脞菌酯残留检测方法的报道较多, 主要有液相色谱法^[3-4]、气相色谱法^[5-6]、液相色谱-串联质谱^[7-8]及气相色谱-串联质谱法^[9-10]等, 也有关于同时检测脞菌酯和代谢物脞菌酸的研究^[11-14]。但鲜见有同时检测咖啡中脞菌酯和代谢物脞菌酸的报道。本试验采用含 ϕ 为 1% 乙酸的乙腈超声提取, C₁₈ 净化, 液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 测定, 以期建立一种同时检测咖啡全果和咖啡豆样品中脞菌酯和代谢物脞菌酸残留的简便、快速、灵敏的分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料

脞菌酯标准品: 纯度 (ϕ) 为 98.7%, 由 Dr. Ehrenstorfer 公司提供; 脞菌酸标准品: 纯度 (ϕ) 为 99.6%, 由 Sigma-Aldich 公司提供。

色谱级乙腈购自天津市富宇精细化工有限公司, 分析级乙腈、C₁₈ 净化剂和有机相针式尼龙过滤器 (13 mm×0.22 μ m) 购自上海安谱实验科技股份有限公司。

Waters TS-Q 三重四级杆质谱仪 (美国 Waters 公司); JY2002T 电子天平 (上海衡平仪器仪表厂); KQ-500 超声清洗仪 (昆山超声仪器有限公司); SC-3612 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); D1008E 掌上离心机 (大龙兴创实验仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液和基质溶液的配制 准确称取 10.1 mg (精确至 0.1 mg) 脞菌酯和脞菌酸标准品, 用乙腈定容至 10 mL, 配成质量浓度为 10 000 mg·L⁻¹ 的标准储备液, -20 °C 保存, 备用。使用时用乙腈逐级稀释成 50、10、5、1、0.5 μ g·L⁻¹ 系列质量浓度的标准工作溶液, -20 °C 下保存, 备用。将 10 000 mg·L⁻¹ 的标准储备液用咖啡全果和咖啡豆空白基质分别稀释成 50、10、5、1、0.5 μ g·L⁻¹ 系列质量浓度的标准工作溶液, -20 °C 保存, 备用。

1.2.2 样品前处理 准确称取 5.0 g (精确至 0.1 g) 粉碎后的咖啡全果和咖啡豆样品, 置 50 mL 离心管内, 加入 3 mL 去离子水, 再加入 10 mL ϕ 为 1% 乙酸的乙腈溶液, 超声提取 30 min; 加 1 g 氯化钠和 2 g 无水硫酸镁, 超声溶解 2 min, 在 3 500 r·min⁻¹ 下离心 3 min。取 1 mL 上清液置于预先装有 20 mg C₁₈ 的塑料离心管中, 涡旋 1 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 1 min 取上清液, 经 0.22 μ m 针式尼龙过滤器过滤, 置于自动进样瓶中, 上机检测。

1.2.3 液相色谱-质谱条件 色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈, 2.1 mm×50 mm×1.7 μ m; 柱温 30 °C, 进样量 5 μ L, 色谱流动相条件见表 1。电离方式: ESI(+) 电离, 多反应监测 (MRM) 定量测定; 离子喷雾电压 1.0 kV; 锥孔气: 氮气, 150 L·h⁻¹; 离子源温度 150 °C; 干燥气体: 氮气, 650 L·h⁻¹, 温度 350 °C; 碰撞气体: 氩气, 0.25 mL·min⁻¹。外标法定量, 其他质谱条件见表 2。

表 1 色谱条件

Table 1 Chromatographic conditions

<i>t</i> /min	流速/(mL·min ⁻¹) Flow velocity	流动相 ¹⁾ Mobile phase
0	0.3	60:40
0.5	0.3	60:40
3.0	0.3	20:80
4.0	0.3	20:80
5.0	0.3	60:40

1) *V*(乙腈): *V*(ϕ 为0.2%的甲酸水溶液)

1) *V*(Acetonitrile): *V*(0.2% Formic acid)

表 2 肟菌酯和肟菌酸质谱条件

Table 2 Mass spectrometry conditions of trifloxystrobin and trifloxystrobin acid

项目 Item	母离子 (m/z)	子离子 (m/z) ¹⁾	保留时间/min	锥孔电压 /V	碰撞能量 /V
	Parent ion	Daughter ion	Retention time	Cone voltage	Collision energy
肟菌酯 Trifloxystrobin	409.00	145.20*	2.94	30	40
	409.00	186.00	2.94	30	16
肟菌酸 Trifloxystrobin acid	395.10	145.00*	2.36	35	38
	395.10	186.20	2.36	35	14

1) “*”为定量离子

1) “*” was an ion for quantitative analysis

1.2.4 添加回收试验 在咖啡全果空白样品中添加肟菌酯及其代谢物肟菌酸的标准溶液,添加的质量分数分别为 0.01、0.05、0.50 和 2.00 mg·kg⁻¹,每个水平重复 5 次;在咖啡豆空白样品中添加肟菌酯及其代谢物肟菌酸的标准溶液,添加的质量分数分别为 0.01、0.05 和 0.50 mg·kg⁻¹,每个水平重复 5 次,采用上述液相色谱-质谱联用分析方法测定回收率。在咖啡全果空白样品中添加质量分数为 0.50 和 2.00 mg·kg⁻¹ 时,因响应值超过线性范围,进样前分别稀释 10 和 100 倍;在咖啡豆空白样品中添加的质量分数为 0.50 mg·kg⁻¹ 时,因响应值超过线性范围,进样前稀释 10 倍。

2 结果与分析

2.1 液相色谱条件的优化

采用梯度洗脱分离样品中的肟菌酯和肟菌酸,可以降低基质中杂质干扰,且可提高分离效果。通过比较甲醇-水、乙腈-水、甲醇-φ 为 0.2% 甲酸水溶液、乙腈-φ 为 0.2% 甲酸水溶液等不同的流动相,发现采用乙腈-φ 为 0.2% 甲酸水溶液为流动相,进行梯度洗脱时,2 种农药均有较高的的灵敏度和分辨率,因此选用流动相为乙腈-φ 为 0.2% 甲酸水溶液。

2.2 提取条件的选择

匀浆后的咖啡样品分别用甲醇、乙腈和丙酮作为溶剂进行提取,发现用甲醇和丙酮提取时,离心后分层不明显,上清液浑浊;用乙腈提取,离心后分层明显,且盐析效果好于前两者,有利于下一步的前处理,因此选择乙腈为提取溶剂。另外,由于肟菌酯在 25 °C 中性和弱酸性条件下稳定,不易水解;在碱性条件下遇水转化成酸易离解成盐溶解于水中,且水解速率随 pH 的增加而增加^[9]。故选择含有 φ 为 1% 乙酸的乙腈作为提取剂。在对样品进行超声提取时发现,肟菌酯和肟菌酸的提取率会随超声时间的延长而增加,但在超声 30 min 后,继续延长超声提取时间,肟菌酯和肟菌酸的提取率增长趋势并

不明显,因此本试验选择 30 min 为超声提取时间。

2.3 样品净化条件的选择

咖啡中基质较复杂,且颗粒较细,油脂及色素等杂质含量较高^[15]。本研究选用 N-丙基乙二胺 (PSA)、C₁₈、石墨化碳黑粉 (GCB) 等净化剂进行试验,结果发现,PSA 对目标物肟菌酸有较强的吸附作用;GCB 对 2 种目标物均有较强的吸附作用,导致回收率偏低,达不到农药残留检测要求;而 C₁₈ 具有疏水作用,对非极性至中等极性的化合物具有吸附作用,且分离效果好,对 pH 具有较宽适应性。本试验采用 C₁₈ 作为净化剂,结果显示其具有良好的回收率 (表 3),咖啡豆中肟菌酯的添加回收率为 83.2%~88.1%,肟菌酸的添加回收率为 84.4%~105.2%。咖啡豆添加样品色谱图见图 1,肟菌酯出峰时间为 2.94 min,肟菌酸出峰时间为 2.36 min。

2.4 标准曲线

在质量浓度为 0.000 5~0.050 0 mg·L⁻¹ 范围内,肟菌酯和肟菌酸的进样质量浓度 (x) 与色谱峰面积 (y) 之间呈较好的线性关系。肟菌酯的标准曲线为: $y=60\ 000\ 000x+30\ 786$, $r=0.999\ 0$;肟菌酸的标准曲线为: $y=20\ 000\ 000x-3\ 732$, $r=0.999\ 8$ 。肟菌酯在咖啡全果和咖啡豆中的保留时间分别为 2.91 和 2.94 min;

表 3 肟菌酯及肟菌酸在咖啡样品中的添加回收率 (RR)

Table 3 The recovery rates (RR) of trifloxystrobin and trifloxystrobin acid in coffee samples %

样品 Sample	$w_{\text{添加}}/$ (mg·kg ⁻¹) Additive	肟菌酯		肟菌酸	
		Trifloxystrobin	Trifloxystrobin	Trifloxystrobin acid	Trifloxystrobin acid
		RR	RSD	RR	RSD
咖啡全果	0.01	87.8	5.8	71.5	6.1
Coffee fruit	0.05	106.7	3.1	99.7	2.9
	0.50	97.9	5.2	106.0	3.0
	2.00	90.5	1.3	92.0	1.0
咖啡豆	0.01	86.9	6.2	86.2	5.1
Coffee bean	0.05	83.2	2.0	84.4	1.0
	0.50	88.1	5.3	105.2	5.2

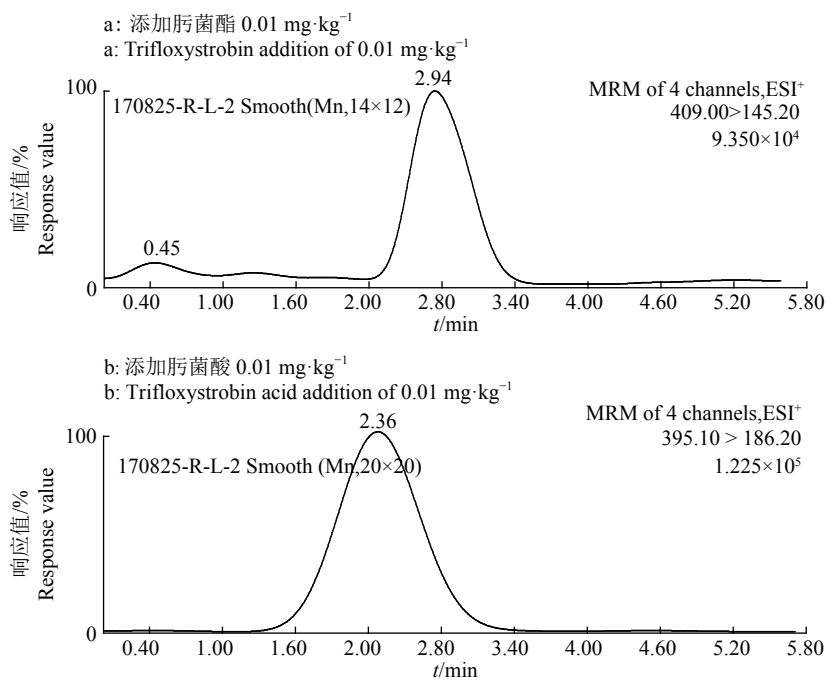


图 1 呋菌酯和呋菌酸在咖啡豆样品中的液相色谱-质谱图

Fig. 1 Liquid chromatography-mass spectrometry maps of trifloxystrobin and trifloxystrobin acid in coffee bean samples

呋菌酸在咖啡全果和咖啡豆中的保留时间分别为 2.31 和 2.36 min。

2.5 基质效应评价

咖啡样品中的油脂、糖、蛋白质和色素等杂质, 会影响目标峰的色谱信号, 造成基质效应。可通过基质匹配校准曲线和溶剂标准曲线斜率的对比, 来评估基质效应的大小。如果斜率为 $0 \sim \pm 20\%$, 表明样品存在弱基质效应; 斜率在 $\pm 20\% \sim \pm 50\%$ 之间, 则存在中等基质效应; 斜率超过 $\pm 50\%$ 之间, 则为强基质效应^[16]。利用不含目标分析物的空白基质的提取液来配制标准溶液, 从而消除和补偿基质效应^[17]。基

质效应计算公式为: 基质效应 = $[(\text{基质斜率} / \text{溶剂斜率}) - 1] \times 100\%$ 。由表 4 可见, 呋菌酯在咖啡全果中基质效应为 25.28%, 说明咖啡全果对呋菌酯的色谱响应存在增强基质效应, 呋菌酯在咖啡豆中基质效应为 -36.30%, 说明咖啡豆对呋菌酯的色谱响应存在减弱效应; 呋菌酸在咖啡中基质效应为 49.05%~144.48%, 表明咖啡中的杂质对呋菌酸的色谱信号有明显的基质增强效应。因此, 本试验采用基质标准曲线来消除基质效应, 以使呋菌酯和呋菌酸的残留测定获得更准确的结果。

表 4 呋菌酯和呋菌酸的基质标准曲线和溶剂效应

Table 4 The matrix standard curve and solvent effect of trifloxystrobin and trifloxystrobin acid

目标物 Target	基质 Matrix	线性方程 ¹⁾ Linear equation	相关系数 (R)	斜率比 Slope ratio	基质效应/% Matrix effect
呋菌酯 Trifloxystrobin	乙腈 Acetonitrile	$y=24\ 725.3x+1\ 886.16$	0.999 526		
	咖啡全果 Coffee fruit	$y=30\ 974.8x+24\ 869.2$	0.990 944	1.25	25.28
	咖啡豆 Coffee bean	$y=15\ 750.2x-670.587$	0.994 495	0.64	-36.30
呋菌酸 Trifloxystrobin acid	乙腈 Acetonitrile	$y=22\ 003.2x+745.203$	0.998 879		
	咖啡全果 Coffee fruit	$y=53\ 794.7x-639.725$	0.990 473	2.44	144.48
	咖啡豆 Coffee bean	$y=32\ 796.6x-256.338$	0.996 596	1.49	49.05

1) x: 标准质量浓度, y: 峰面积

1) x: Standard concentration, y: Peak area

2.6 方法的添加回收率和精密度

添加回收率试验结果 (表 3) 表明, 当咖啡全果中添加呋菌酯或呋菌酸为 $0.01 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 呋菌酯的添加回收率为 87.8%~106.7%, RSD 为 1.3%~

5.8%; 呋菌酸的添加回收率为 71.5%~106.0%, RSD 为 1.0%~6.1%。当咖啡豆中添加呋菌酯或呋菌酸为 $0.01 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 呋菌酯的添加回收率为 83.2%~88.1%, RSD 为 2.0%~6.2%; 呋菌酸的添加回

收率为 84.4%~105.2%, RSD 为 1.0%~5.2%。脞菌酯和脞菌酸的最小检出量均为 2.5×10^{-12} g, 最低检出限均为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。测定结果均达到农药残留试验准则 (NY-T 788—2004)^[18] 的要求。

3 结论

本研究采用分散固相萃取净化-液质联用技术, 建立了同时测定咖啡中脞菌酯及其代谢物脞菌酸残留的方法。样品用含 ϕ 为 1% 乙酸的乙腈超声提取, 氯化钠和无水硫酸镁盐析后, C_{18} 吸附剂净化, 液相色谱-质谱联用检测。该方法优化了样品前处理及 LC-MS 检测条件, 整个检测过程仅需 5 min, 大大缩短检测时间。本方法采用基质标准曲线定量, 在 $0.01 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 添加水平下, 脞菌酯及代谢物脞菌酸的添加回收率为 71.5%~106.7% 之间, RSD 为 1.0%~6.1%, 最小检出量均为 2.5×10^{-12} g, 最低检出限均为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 各项指标均符合农药残留检测的要求。本方法适用于咖啡样品中脞菌酯和脞菌酸残留的分析。本文中提取和净化条件仅在单因素试验上被优化, 并未考虑各因素之间的交叉作用对试验结果的影响, 所以可以采用正交试验或响应面试验进一步综合优化。

参考文献:

- [1] 余露. 拜耳推出新型杀菌剂: 脞菌酯[J]. 农药市场信息, 2010(10): 41.
- [2] WANG L, LI W, LI P, et al. Residues and dissipation of trifloxystrobin and its metabolite in tomatoes and soil[J]. Environ Monit Assess, 2014, 186(11): 7793-7799.
- [3] ZHU J, DAI X J, FANG J J, et al. Simultaneous detection and degradation patterns of kresoxim-methyl and trifloxystrobin residues in citrus fruits by HPLC combined with QuEChERS[J]. J Environ Sci Heal B, 2013, 48(6): 470-476.
- [4] LIKAS D T, TSIROPOULOS N G. Residue screening in apple, grape and wine food samples for seven new pesticides using HPLC with UV detection: An application to trifloxystrobin dissipation in grape and wine[J]. Intern J Environ Anal Chem, 2009, 89: 857-869.
- [5] 周凤霞, 陈存. 气相色谱法同时测定蔬菜中脞菌酯和脞菌酯残留量的方法研究[J]. 农业环境与发展, 2009(4):

81-84.

- [6] 钱训, 陈勇达, 张少军. 固相萃取-气相色谱测定马铃薯中脞菌酯残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 14(2): 535-539.
- [7] CHEN J, LOO B, RAY C. Determination of trifloxystrobin and its metabolites in Hawaii soils by ASE-LC-MS/MS[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(6): 1829-1837.
- [8] SANNINO A, BOLZONI L, BANDINI M. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables[J]. J Chromatogr A, 2004, 1036(2): 161-169.
- [9] MOHAPATRA S. Residue levels and dissipation behaviors for trifloxystrobin and tebuconazole in mango fruit and soil[J]. Environ Monit Assess, 2015, 187(3): 95.
- [10] CAO M, LI S, WANG Q, et al. Track of fate and primary metabolism of trifloxystrobin in rice paddy ecosystem[J]. Sci Total Environ, 2015, 518/519: 417-423.
- [11] 陈莉, 贾春虹, 朱晓丹, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定戊唑醇、脞菌酯及代谢物脞菌酸在西瓜和土壤中的残留[J]. 农药, 2013, 52(2): 119-121.
- [12] 王林. 脞菌酯及其代谢物在水稻和稻田中的残留研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.
- [13] WANG L, LI W, LI P, et al. Residues and dissipation of trifloxystrobin and its metabolite in tomatoes and soil[J]. Environ Monit Assess, 2014, 186(11): 7793-7799.
- [14] CHEN X X, XU J, LIU X G, et al. Simultaneous determination of trifloxystrobin and trifloxystrobin acid residue in rice and soil by a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2014, 37(13): 1640-1647.
- [15] 陈祎平, 林昭华, 梁振益, 等. 咖啡渣油脂的提取及其脂肪酸组成研究[J]. 食品科技, 2005(12): 84-86.
- [16] FOTOPOULOU A. Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables[J]. Int J Environ An Ch, 2004, 84(1/2/3): 15-27.
- [17] 方旭元, 夏高峰, 石巧巧, 等. QuEChERS-GC-MS 法检测当归中 9 种除草剂残留[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(6): 79-83.
- [18] 中华人民共和国农业部. 农药残留试验准则: NY/T 788—2004[S]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 5.

【责任编辑 周志红】