

# 液质联用法测定桃中三种杀菌剂的含量分布

徐小民<sup>1</sup>, 何华丽<sup>2</sup>, 吕美玲<sup>3</sup>, 任一平<sup>1\*</sup>, 韩见龙<sup>1</sup>, 黄百芬<sup>1</sup>

(1. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051; 2. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 杭州 310014;  
3. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京 100102)

**摘要:** **目的** 建立桃皮和肉中多菌灵、甲基硫菌灵和敌菌灵三种杀菌剂的液质联用(LC-MS/MS)测定方法, 研究其在桃中的含量分布。**方法** 桃皮和肉经分离后, 分别用乙腈均质提取、PSA 固相分散净化、C<sub>18</sub> 高压液相色谱柱分离、MS/MS 测定; 分别计算皮和肉中三种杀菌剂的含量, 研究三种杀菌剂在两者间的分布状况。**结果** 方法检测限分别为 0.1、0.2、10 μg/kg; 敌菌灵在样品中未检出, 多菌灵和甲基硫菌灵在皮和肉中呈不同的含量分布特性。**结论** 该方法灵敏度高、准确、操作简单, 可用于桃中三种杀菌剂的含量分布研究。**关键词:** 多菌灵; 甲基硫菌灵; 敌菌灵; 液质联用; 桃; 含量分布

## Distribution of three fungicides in peaches determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

XU Xiao-Min<sup>1</sup>, HE Hua-Li<sup>2</sup>, LV Mei-Ling<sup>3</sup>, REN Yi-Ping<sup>1\*</sup>, HAN Jian-Long<sup>1</sup>, HUANG Bai-Fen<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China; 2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 3. Agilent Technologies (China) Co., Ltd, Beijing 100102, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of three kinds of fungicides (carbendazim, thiophanate-methyl and anilazine) in the peel and pulp of peaches by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and study their distributions in peaches. **Methods** The peel and pulp separated from peaches were extracted with acetonitrile by homogenization, purified by solid-phase dispersion extraction with PSA, separated by C<sub>18</sub> HPLC column and measured by MS/MS, respectively. The concentrations of three kinds of fungicides in peel and pulp were calculated respectively. The results were used to study the distribution levels in peaches. **Results** The LODs were 0.1, 0.2 and 10 μg/kg for carbendazim, thiophanate-methyl and anilazine, respectively. Anilazine was not detected in samples. Different distribution results were found for carbendazim and thiophanate-methyl in peel and pulp. **Conclusion** The method is sensitive, accurate and easy to operate. It is suitable for the distribution study of these fungicides in peaches.

**KEY WORDS:** carbendazim; thiophanate-methyl; anilazine; liquid chromatography–tandem mass spectrometry; peaches; distribution

基金项目: 浙江省重点科技创新团队项目(2011R50021)

**Fund:** Supported by the Program for Zhejiang Leading Team of Science and Technology Innovation (2011R50021)

\*通讯作者: 任一平, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全检验。E-mail: renyiping@263.net

\*Corresponding author: REN Yi-Ping, Professor, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, No. 630, Xincheng Road, Hangzhou 310051, China. E-mail: renyiping@263.net

## 1 引言

现代农业生产离不开农药, 由此造成的食品中农药残留问题是当前食品安全研究领域的热点问题之一。如何减少农药残留并降低膳食农药摄入的风险, 是解决这一问题的关键, 有文献报道采用去皮、清洗、储藏和烹调等方式来去除食品中的农药残留, 但实际的去除效果文献之间互相矛盾<sup>[1-7]</sup>。综合比较现有文献发现, 造成这种矛盾结论的一个基础性的关键问题是对农药在农产品中各个部位的含量分布与迁移规律的认识不足。不同的农药因理化性质等的差异, 其从农产品表皮迁移到内部的能力存在差异, 必然造成不同部位含量水平的差异<sup>[8-12]</sup>, 农产品中农药分布与迁移研究将对指导合理饮食习惯、选择合适的农药使用范围以及建立最大残留限量等, 具有较高的理论参考价值<sup>[10]</sup>。

本文选择桃作为基体, 多菌灵、甲基硫菌灵和敌菌灵三种杀菌剂为目标化合物, 研究其在桃皮和肉中的含量分布。多菌灵和甲基硫菌灵为苯并咪唑类杀菌剂的代表<sup>[13]</sup>, 三种杀菌剂均很难用气相色谱或者气质联用法检测, 文献中多采用高压液相色谱法(HPLC)<sup>[13-15]</sup>。果肉中的含量相对于果皮中要小的多, HPLC 法的检测灵敏度难以满足要求, 液质联用法(LC-MS/MS)的检测灵敏度能达到 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的水平<sup>[16]</sup>, 但很少有同时检测的方法报道, 本文采用 LC-MS/MS 的方法来同时检测桃皮和桃肉中的三种杀菌剂残留, 用于含量分布研究。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

Agilent 6460 Triple Quad LC-MS/MS, 配有 1290 Infinity 液相色谱仪和电喷雾离子源(Jet Stream ESI), 购自美国安捷伦科技公司。

甲酸铵(Acros); 甲酸(色谱纯, Acros); 乙腈(色谱纯, Tedia); 高纯水(Millipore system); 氯化钠和无水硫酸镁(分析纯, 使用前经 500  $^{\circ}\text{C}$  烘烤 4 h); PTFE 滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ , 上海安谱科学仪器有限公司); PSA(天津艾杰尔科技有限公司)。

多菌灵、甲基硫菌灵和敌菌灵均由 Chem Service 提供。

待测桃样品购自杭州及周边农贸市场和超市。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准溶液

分别称取各标准品 10 mg, 用甲醇溶解并定容到 10 mL, 配制成 1 mg/mL 的标准储备液, 然后用甲醇稀释得到 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准使用溶液, 按一定比例稀释配制标准系列, 绘制标准曲线。

#### 2.2.2 样品前处理

取约 1 kg 的桃子, 按日常食用方法去皮、去核, 分别收集桃皮和桃肉, 称重并记录其质量(分别为  $m_1$  和  $m_2$ ), 再分别匀浆, 注意整个操作过程中尽量不要让分离后的皮和肉互相接触。

分别称取匀浆后的皮和肉各 10 g, 加入 20 mL 乙腈, 混匀 1 min, 加入 1 g 氯化钠和 4 g 无水硫酸镁, 迅速混匀后于 3000 r/min 离心 5 min, 取 2 mL 上清液加入 100 mg 无水硫酸镁和 50 mg PSA, 混匀, 3000 r/min 离心 2 min, 准确吸取 1 mL 上清液, 加入 1 mL 纯水, 混匀, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后用 LC-MS/MS 测定。

#### 2.2.3 实验条件

色谱条件:

色谱柱: Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (RRHT 1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  100 mm); 梯度洗脱条件见表 1。柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 5  $\mu\text{L}$ 。

质谱条件:

电喷雾电离源, ESI(+); 多反应监测模式(MRM), 参数见表 2; 干燥气温度: 325  $^{\circ}\text{C}$ ; 干燥气流量: 10 L/min; 雾化气压力: 25 psi; 鞘气温度: 400  $^{\circ}\text{C}$ ; 鞘气流量: 12 L/min; 毛细管电压: 4500 V; 喷嘴电压: 500 V; 电子倍增管电压补偿: 300 eV。

## 3 结果与讨论

### 3.1 流动相的选择

实验发现流动相中甲酸铵的浓度对被测物的响

表 1 梯度洗脱条件  
Table 1 Conditions of gradient elution

保留时间(min)	B %	流量 (mL/min)
0	20	0.2
3	20	0.2
9	40	0.4
15	60	0.4
19	95	0.4
24	95	0.2

表2 MRM参数  
Table 2 Parameters of MRM

农药	定量离子对 ( $m/z$ )	定性离子对 ( $m/z$ )	驻留时间 (ms)	传输电压 (V)	碰撞能量 (eV)	池加速电压(V)
多菌灵	192/160	192/160,192/132	300	100	18,35	3
甲基硫菌灵	343/151	343/151,343/311	300	90	15,5	3
敌菌灵	275/153	275/153,275/214	300	115	25,20	3

应值或者保留时间有影响。图1所示为不同浓度甲酸铵对多菌灵保留时间和响应信号的影响。不加甲酸铵,响应值低,保留时间较短,易受基体的干扰,加入5 mmol/L的甲酸铵后可以使保留时间增加到2.5 min,且响应达最大值,继续增加其浓度,虽然保留时间增加了,但是响应值反而降低了。甲基硫菌灵的保留时间不随甲酸铵浓度变化而变化,但响应值的变化与多菌灵的一致。敌菌灵的保留时间和响应值则都保持不变。因此,方法选择流动相中甲酸铵的最佳浓度为5 mmol/L。

### 3.2 定容溶剂的选择

采用乙腈百分比含量不同的定容溶剂时多菌灵的色谱分离效果见图2。在乙腈含量高于60%时,色谱峰变宽,到50%时色谱峰尖锐灵敏度,若继续降低乙腈含量,在过滤膜时会部分被吸附。甲基硫菌灵在乙腈含量降到60%时能得到尖锐的色谱峰,敌菌灵的则不受乙腈含量变化的影响。因此,方法选择最佳的定容溶剂为50%的乙腈/水混合溶剂。

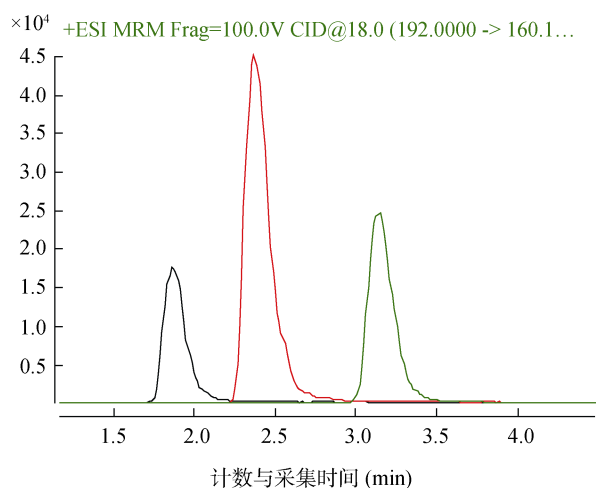


图1 流动相中甲酸铵浓度对多菌灵保留时间和响应值的影响

(按保留时间由小到大,甲酸铵浓度分别为0、5、10 mmol/L)

Fig. 1 Effects of ammonium formate concentration in mobile phase on retention time and signal response of carbendazim

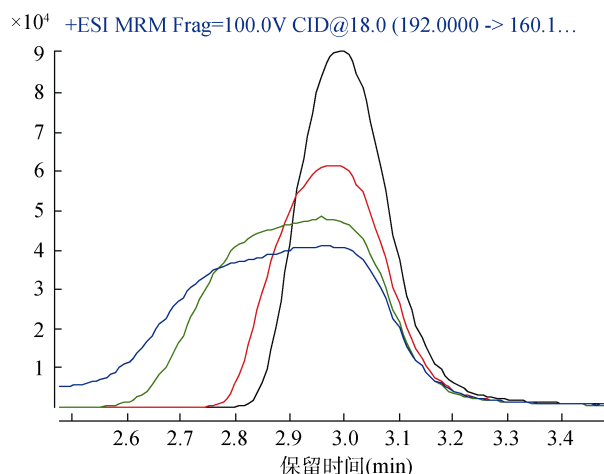


图2 定容溶剂中乙腈百分比对多菌灵色谱分离效果的影响(色谱峰起始位置从左到右乙腈含量分别为:100%、80%、60%、50%)

Fig. 2 Effects of acetonitrile percentage in dissolving solvent on separation of carbendazim

### 3.3 方法学验证

方法学参数见表3。在所选择的线性范围内,三种杀菌剂的线性相关系数均大于0.999。多菌灵和甲基硫菌灵的检测限(LOD)和定量限(LOQ)均低于1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。敌菌灵的LOD为10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。样品按2、20和100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度水平加标平行测定6次计算回收率和相对标准偏差(RSD),其中多菌灵的回收率和RSD范围分别为71.5%~106%和6.6%~9.7%,甲基硫菌灵的回收率和RSD分别为:86.0%~112%和8.0%~9.2%,敌菌灵的回收率和RSD分别为:82.8%~117%和8.5%~11.2%。

### 3.4 样品中三种杀菌剂的含量与分布

实验中共检测市售桃子样品102份,其中敌菌灵在样品的皮和肉中均未检出。多菌灵在样品的皮和肉中的检出率均为43.1%,甲基硫菌灵在样品的皮和肉中的检出率分别为19.6%和6.9%。多菌灵和甲基硫菌灵在样品中的总浓度、皮中的百分比、皮和肉中的浓度见表4。多菌灵在皮中的平均百分比为58.9%,最低百分比为20.7%,说明在肉中的含量最高可以达

表 3 方法学参数( $n=6$ )  
Table 3 Method validation data( $n=6$ )

	多菌灵	甲基硫菌灵	敌菌灵
线性范围 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0.2~100	0.4~400	20~1000
相关系数	0.9994	0.9998	0.9995
2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平加标回收率 (%)	71.5~92.3	86.0~112	--
RSD (% , $n=6$ )	9.7	8.4	--
20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平加标回收率 (%)	82.6~105	92.4~107	82.8~117
RSD (% , $n=6$ )	6.6	8.0	11.2
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平加标回收率 (%)	85.0~106	90.0~104	84.6~108
RSD (% , $n=6$ )	8.4	9.2	8.5
LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0.1	0.2	10
LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0.2	0.4	20

表 4 样品中多菌灵和甲基硫菌灵的含量分布  
Table 4 The distribution of carbendazim and thiophanate-methyl in samples

	多菌灵				甲基硫菌灵			
	皮中浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	肉中浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	总浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	皮中百分比 (%)	皮中浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	肉中浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	总浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	皮中百分比 (%)
最小值	0.35	0.10	0.10	20.7	0.70	0.25	0.12	51.1
最大值	427	38.4	77.9	86.8	689	2.86	96.3	100
中位值	22.18	2.07	5.87	58.3	12.81	0.87	1.54	100
平均值	55.35	5.70	12.6	58.9	87.22	1.21	13.0	92.6

注: 1) 总浓度= $(C_1 \times m_1 + C_2 \times m_2) / (m_1 + m_2)$ , 其中  $C_1$  和  $C_2$  分别为皮和肉中浓度,  $m_1$  和  $m_2$  分别为皮和肉中总质量, 下同; 2) 皮中百分比= $100 \times (C_1 \times m_1) / (C_1 \times m_1 + C_2 \times m_2)$ ; 3) 平均值由阳性样品含量之和除以阳性样品数得到

到近 80%, 其具有较强的从皮到肉的迁移能力。甲基硫菌灵在皮中的百分比平均值为 92.6%, 最低也在 50%以上, 说明其从皮到肉中的迁移能力较弱。这组数据说明在桃子的食用过程中, 若去皮能去除大部分的甲基硫菌灵残留, 而多菌灵的去除效果则不是很明显, 在选择使用这两种农药时, 如果杀菌效果相当, 建议使用甲基硫菌灵。

#### 4 结 论

LC-MS/MS 法检测桃中的三种杀菌剂, 实验操作简单, 灵敏度和准确度高。多菌灵和甲基硫菌灵在桃皮和肉中表现出了不同的分布特性, 这一结果可以用于指导合理饮食和两种农药的使用。

#### 参考文献

[1] Keikotlhaile BM, Spanoghe P, Steurbaut W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A me-

meta-analysis approach [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48: 1-6.

- [2] Ling Y, Wang H, Yong W, *et al.* The effects of washing and cooking on chlorpyrifos and its toxic metabolites in vegetables [J]. Food Control, 2011, 22: 54-58.
- [3] Rasmussen RR, Poulsen ME, Hansen HCB. Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing [J]. Food Addit Contam, 2003, 20: 1044-1063.
- [4] Kaushik G, Satya S, Naik SN. Food processing a tool to pesticide residue dissipation-A review [J]. Food Res Int, 2009, 42: 26-40.
- [5] Ticha J, Hajslova J, Jech M, *et al.* Changes of pesticide residues in apples during cold storage [J]. Food Control, 2008, 19: 247-256.
- [6] Zhang ZY, Liu XJ, Hong XY. *et al.* Effects of home preparation on pesticide residues in cabbage [J]. Food Control, 2007, 18: 1484-1487.
- [7] Krol WJ, Arsenault TL, Pylypiw HM, *et al.* Reduction of pesti-

- cide residues on produce by rinsing [J]. *J Agr Food Chem*, 2000, 48: 4666–4670.
- [8] Vaquero-Fernandez L, Sanz-Asensio J, Lopez-Alonso M, *et al.* Fate and distribution of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol fungicides from treated grapes intended for winemaking [J]. *Food Addit Contam*, 2009, 26: 164–171.
- [9] Teixeira MJ, Aguiar AC, Afonso MM, *et al.* Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 513: 333–340.
- [10] Xu XM, Yu S, Li R, *et al.* Distribution and migration study of pesticides between peel and pulp in grape by online gel permeation chromatography-gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2012, 135: 161–169.
- [11] 任晓萍, 余向阳, 蔺经, 等. 桃中多菌灵残留动态和最终残留分析[J]. *江苏农业学报*, 2009, 25 (3): 665–667.  
Ren XP, Quan XY, Lin J, *et al.* Analysis of carbendazim residue dynamics and final residue in peach [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2009, 25 (3): 665–667.
- [12] 庞永倩. 苹果果实各部位菊酯类农药残留量分析[J]. *化学分析计量*, 2011, 20 (3): 70–72.  
Pang YQ. Analysis on pyrethroid pesticide residues in each part of apple [J]. *Chem Anal Meter*, 2011, 20 (3): 70–72.
- [13] 李海飞, 李静, 徐国锋, 等. 高效液相色谱快速测定水果中的3种苯并咪唑类杀菌剂[J]. *现代农业科技*, 2009, (1): 114–116.  
Li HF, Li J, Xu GF, *et al.* Fast determination of 3 benzimidazole fungicides in fruit by high performance liquid chromatography [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2009, (1): 114–116.
- [14] 饶钦雄, 曲明清, 赵晓燕, 等. HPLC 法测定常见蔬菜水果中多菌灵、噻菌灵和苯菌灵残留量[J]. *上海农业学报*, 2009, 25 (4): 85–88.  
Rao QX, Qu MQ, Zhao XY, *et al.* Determination of carbendazim, thiabendazole and benomyl residues in vegetables and fruits by HPLC [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2009, 25 (4): 85–88.
- [15] 李健, 刘宁, 陈平, 等. 食品中敌菌灵残留量的 HPLC 测定方法研究[J]. *食品科学*, 2007, 28 (1): 278–281.  
Li J, Liu N, Chen P, *et al.* HPLC method for determination of anilazine pesticides residue limits of in foods [J]. *Food Sci*, 2007, 28 (1): 278–281.
- [16] 胡梅, 王骏, 张卉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定蒜苔中多菌灵和噻菌灵的残留量[J]. *山东农业科学*, 2010, (4): 89–91.  
Hu M, Wang J, Zhang H, *et al.* Determination of carbendazim and thiabendazole residues in garlic sprouts by UPLC-MS/MS [J]. *Shandong Agric Sci*, 2010, (4): 89–91.

(责任编辑: 张宏梁)

### 作者简介



徐小民, 博士, 主要研究方向为卫生理化检验。  
E-mail: chemxuxm@163.com



任一平, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全检验。  
E-mail: renyiping@263.net