

QuEChERS 结合高效液相色谱串联质谱法 测定柑橘中多效唑残留量

周 勇, 刘 佳, 朱 航, 马海昊, 刘哲铭, 贾 楠, 霍晓宜, 周小毛*

(湖南省农业科学院 湖南省农业生物技术研究所, 长沙 410125)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定柑橘中多效唑残留量的分析方法。**方法** 样品采用 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safety)方法进行前处理, 用乙腈提取, N-丙基乙二胺(N-Propylethylenediamine, PSA)和无水硫酸镁净化, 并采用 HPLC-MS/MS 检测。采用 Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)进行分离, 0.1%甲酸水溶液-甲醇溶液作为流动相进行梯度洗脱, 洗脱流速为 0.3 mL/min, 柱温为 35 °C。**结果** 多效唑在 0.0005~1.0 mg/L 浓度范围内的相关系数 $r^2=0.9981$, 呈现良好的线性关系。在 0.002、0.2 和 2 mg/kg 添加水平下, 多效唑在柑橘全果、果肉和果皮中的平均添加回收率范围为 80.9%~102.7%, 相对标准偏差范围为 4.1%~13.1%, 方法的定量限均为 0.002 mg/kg。**结论** 该方法操作简便、准确度高、回收率及精密度好, 适用于柑橘中多效唑残留量的检测。

关键词: 多效唑; QuEChERS; 高效液相色谱-串联质谱法; 柑橘

Determination of paclobutrazol residue in citrus by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHOU Yong, LIU Jia, ZHU Hang, MA Hai-Hao, LIU Zhe-Ming,
JIA Nan, HUO Xiao-Yi, ZHOU Xiao-Mao*

(Institute of Biotechnology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of paclobutrazol residue in citrus by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The samples were pretreated by QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe), extracted by acetonitrile, purified by N-propylethylenediamine (PSA) and anhydrous magnesium sulfate, and detected by HPLC-MS/MS. A Hypersil GOLD C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) was used for separation, and 0.1% formic acid aqueous solution-methanol solution was used as mobile phase for gradient elution, the elution flow rate was 0.3 mL/min, and the column temperature was 35 °C. **Results** The correlation coefficient r^2 of paclobutrazol in the range of 0.0005-1.0 mg/L was 0.9981, showing a good linear relationship. The average recoveries and relative standard deviations of paclobutrazol in citrus fruit, pulp and

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0200308)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Project of China (2017YFD0200308)

*通讯作者: 周小毛, 教授, 主要研究方向为农药毒理学。E-mail: zhouxm1972@126.com

*Corresponding author: ZHOU Xiao-Mao, Professor, Institute of Biotechnology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China. E-mail: zhouxm1972@126.com

pericarp were 80.9%–102.7%, 4.1%–13.1% and 0.002 mg/kg respectively at 0.002, 0.2 and 2 mg/kg levels. **Conclusion** This method is simple to operate, high in accuracy, good in recovery rate and precision, and is suitable for the detection of paclobutrazol residues in citrus.

KEY WORDS: paclobutrazol; QuEChERS; high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry; citrus

1 引言

多效唑是一种植物生长调节剂,在蔬菜、水果等农作物生长中广泛应用^[1],通过抑制赤霉素的合成改变作物内源激素水平,从而提高作物的抗逆性^[2],可起到改善品质、提高产量和种植收益等作用^[3]。多效唑毒性低且无致畸致癌致突变的不良效应,人体每日允许摄入量为 0.1 mg/kg^[4],据报道多效唑在一些中药材种植中也有应用^[5,6]。多效唑在作物和土壤中的残留时间较长,会对土壤微生物及后茬作物造成一定的影响^[7,8]。我国已批准多效唑在苹果、荔枝等果树上的登记使用,但暂未批准其在柑橘上的登记^[9]。

柑橘是世界第 3 大贸易农产品^[10],也是我国优势农产品之一^[11],因营养价值高口感好而深受消费者欢迎。我国是世界上柑橘种植面积和产量第一大国,柑橘产业快速发展的同时也伴随着产品质量安全问题。在柑橘的实际生产中,多效唑作为植物生长调节剂也有应用,为了保障柑橘质量安全,需要对柑橘中多效唑残留量进行检测从而监管其在柑橘生产中的使用。

据报道,多效唑在农产品及果蔬中的残留检测方法主要有气相色谱法^[12–14]、液相色谱法^[15]、气质联用法^[16,17]和液质联用法^[18–20]等。液相色谱串联质谱法因其选择性强、灵敏度高等特点而广泛应用于农药残留检测;QuEChERS 前处理方法因其操作简单、有机溶剂用量少等优点而广泛应用于农残检测的样品前处理中^[21]。目前采用 QuEChERS 结合液相色谱串联质谱法测定柑橘中多效唑残留量鲜有报道。因此,本研究建立了 QuEChERS 结合液相色谱串联质谱法简便、高效、准确的测定柑橘中多效唑残留量,以期对柑橘中多效唑的残留检测提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

TSQ Endura 三重四级杆液质联用仪(赛默飞世尔公司);Hypersil GOLD C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)色谱柱;ME104E 电子天平(梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司);YP5102 电子天平(上海光正医疗仪器有限公司);MTV-100 多管旋涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司);XW-80A 微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);TDZ5-WS 低速离心机、TGL-16A 高速冷冻离心机(湖南平凡科技有限公司);DHG-9030A 电热鼓风干燥箱(中仪国科科技有限公司);

Blixer 6 V.V.乳化搅拌机(法国罗伯特公司);THZ-312 台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司)。

乙腈、甲醇(HPLC,德国默克公司);石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)、PSA(德国 CNW 科技公司);无水硫酸镁、氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);超纯水(屈臣氏集团有限公司)。

多效唑标准品:纯度为 98.1%,购自坛墨质检科技股份有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱 Hypersil GOLD C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm),流速为 0.3 mL/min;流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.1%甲酸水溶液;柱箱温度为 35 °C;进样量为 5 μL。流动相梯度洗脱程序见表 1(表 1 中流动相 A、B 两种溶剂的比例均为体积比)。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	20	80
0.50	20	80
2.00	95	5
4.50	95	5
4.60	20	80
5.50	20	80

2.2.2 质谱条件

电离源模式:(electron spray ionization, ESI);电离源极性:正;雾化气:氮气;鞘气压力:276 kPa;离子传输管温度:320 °C;喷嘴温度:300 °C;离子喷雾电压:3500 V。多效唑的保留时间、母离子、子离子和碰撞能量等参数见表 2。

表 2 多效唑质谱参数

保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	射频透镜电压/V	碰撞能量/V
3.88	294.1	70.3	116	37
	294.1	125.0	116	21

2.2.3 样品前处理

分别称取匀浆后的样品(果皮 5.0 g, 全果和果肉各 10.0 g)于 100 mL 离心管中, 加乙腈(果皮 20 mL, 全果和果肉各 40 mL), 再加 7.0 g 氯化钠, 高速涡旋震荡 1 min, 于 4000 r/min 条件下离心 3 min, 移取上层上清液 2 mL 于装有 100 mg PSA 和 400 mg 无水硫酸镁的 4 mL 小离心管中, 涡旋 1 min 后于 15000 r/min 条件下离心 3 min, 准确移取 1 mL 上清液过 0.22 μm 有机系滤膜, 待测。

2.2.4 标准曲线

称取 0.1019 g 多效唑标准物质, 用甲醇定容至 100 mL 得到浓度为 998 mg/L 的标准储备液, 再用甲醇逐级稀释得到浓度为 100、10 mg/L 的标准工作溶液。将 10 mg/L 的标准工作溶液梯度稀释成浓度分别为 0.0005、0.001、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mg/L 的系列标准工作溶液, 按 2.2.1 和 2.2.2 的液相色谱-质谱条件进行检测。

2.2.5 添加回收实验

分别称取匀浆的全果、果肉空白样品各 10.0 g 和果皮空白样品 5.0 g 进行添加回收率试验, 添加浓度分别为 0.002、0.2、2 mg/kg, 每个浓度 5 个重复, 添加后摇匀并静置 30 min, 将静置后的样品按照 2.2.3 的处理步骤进行前处理, 然后按照 2.2.1 和 2.2.2 的仪器条件进行分析检测, 计算添加回收率和相对标准偏差。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的优化

将多效唑标准溶液分别在 ESI +、ESI - 模式下进行全扫描, 测试其信号强度, 经检测 ESI + 模式的响应效果相对较好。确定化合物的分子离子, 将分子离子作为母离子, 优化射频透镜电压, 选择信号最强的 2 个子离子作为特征子离子, 其中响应相对较强的 70.2 作为定量离子, 响应相对较弱的 125.0 作为定性离子, 筛选出 294.1/70.3 为定量离子对, 294.1/125.0 为定性离子对, 优化碰撞能量得到

信号强度高的定量和定性子离子。多效唑的色谱图见图 1。

3.2 液相流动相的优化

在相同梯度洗脱条件下, 通过比较多效唑在甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液 2 种流动相下的响应强度, 结果表明流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液时, 多效唑的响应较高并且峰形更好, 因此选择甲醇-0.1%甲酸水溶液作为液相流动相条件。

3.3 净化条件的优化

柑橘样品基质较为复杂, 为了尽量降低后续检测中基质对检测的干扰, 对 PSA+无水硫酸镁和 PSA+GCB 两种净化剂组合进行了筛选。结果表明, PSA+无水硫酸镁净化后得到的添加回收率更好, 净化效果较好, 能够达到试验要求。因此选择 PSA+无水硫酸镁作为试验所用净化剂。

3.4 方法的线性、定量限

将配制的多效唑标准溶液按照浓度由低到高(0.0005、0.001、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mg/L)的顺序检测, 每个浓度重复 3 次。以其溶液浓度为横坐标, 对应的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到多效唑的线性回归方程 $Y = 47394076X + 342456$, 在 0.0005~1.0 mg/L 范围内, 线性关系良好, 相关系数 $r^2 = 0.9981$, 其在柑橘全果、果肉和果皮中的定量限均为 0.002 mg/kg。

3.5 方法的回收率

多效唑在柑橘全果、果肉及果皮中的添加回收率试验结果见表 3。结果表明, 在 0.002、0.2、2 mg/kg 3 个添加水平下, 多效唑在柑橘全果中的平均添加回收率为 93.0%~102.7%, 相对标准偏差为 4.1%~13.1%, 在柑橘果肉中的平均添加回收率为 89.4%~100.3%, 相对标准偏差为 5.2%~8.7%, 在柑橘果皮中的平均添加回收率为 80.9%~90.3%, 相对标准偏差为 6.5%~8.5%, 符合农药残留检测的要求。

全果、果肉、果皮空白样品的色谱图见图 2。全果、果肉、果皮添加样品色谱图见图 3。

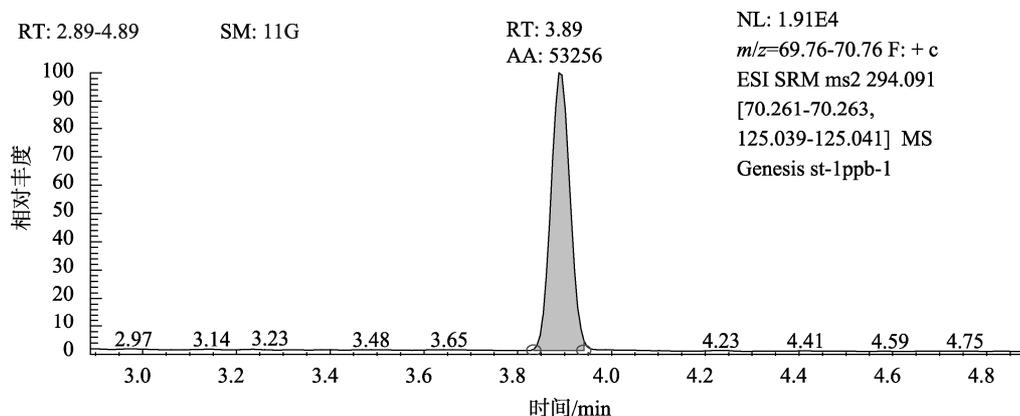


图 1 多效唑标准溶液色谱图(0.001 mg/L)

Fig.1 Chromatogram of paclobutrazol standard solution (0.001 mg/L)

表 3 多效唑在柑橘全果、果肉及果皮中的加标回收率及相对标准偏差

Table 3 Spiked recoveries and relative standard deviation of paclobutrazol in citrus fruit, pulp and pericarp

柑橘不同部位	添加水平/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
全果	0.002	93.0	13.1
	0.2	102.7	5.8
	2	99.1	4.1
果肉	0.002	100.3	8.7
	0.2	89.4	7.9
	2	99.9	5.2
果皮	0.002	80.9	8.5
	0.2	84.6	6.5
	2	90.3	7.8

3.6 实际样品的测定

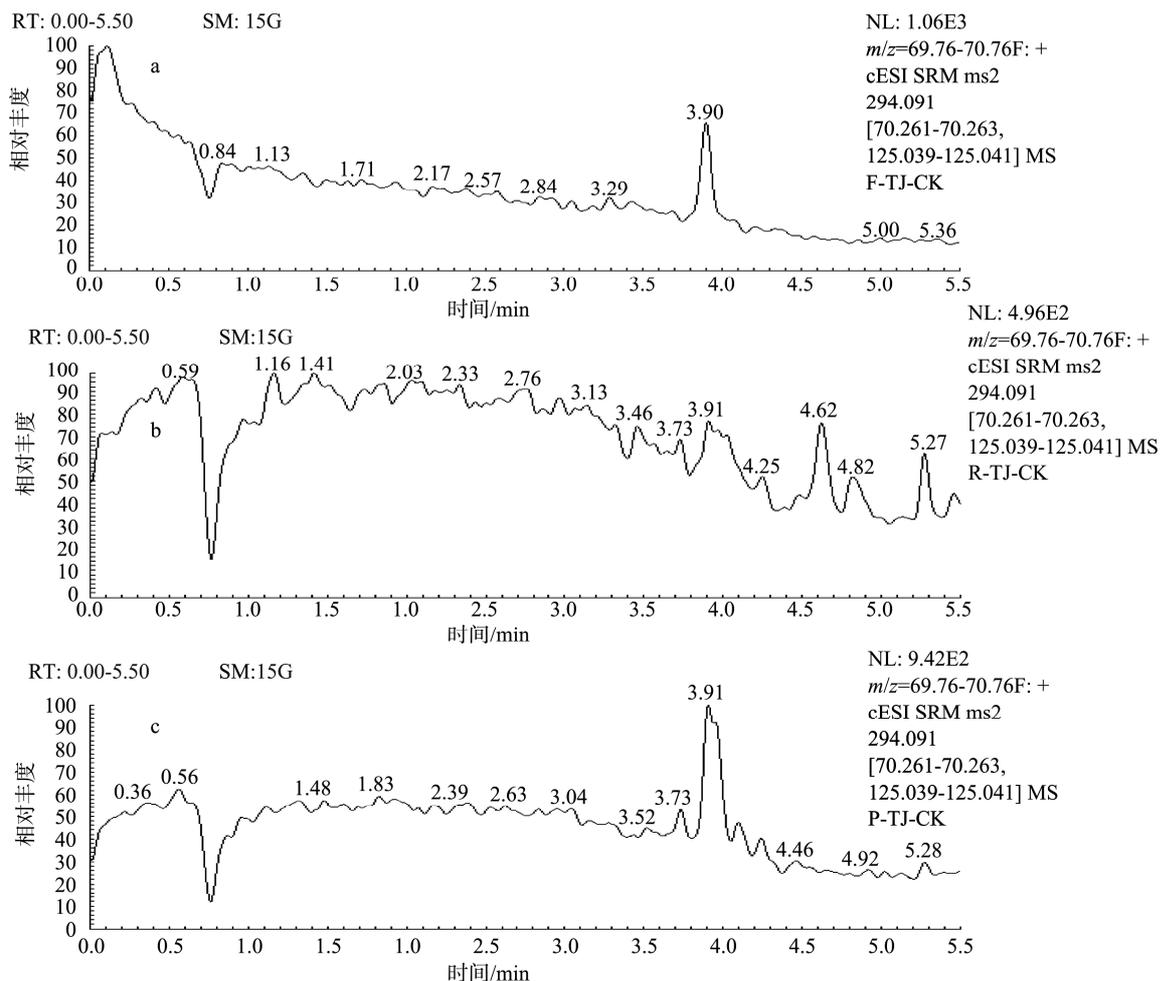
从本地水果市场和超市购买蜜桔、脐橙和砂糖橘 3 个

品种共 15 个样品, 采用本方法测定全果、果肉和果皮中多效唑的含量, 结果显示 15 个样品的全果、果肉和果皮中多效唑含量均小于 0.002 mg/kg。

4 结论

柑橘基质较为复杂, 多效唑检测方法的准确性与基质净化程度有较大关系, PSA 是农残分析前处理中常用净化剂, 可有效去除样品基质中的有机酸、色素和糖类等杂质, 将其与无水硫酸镁组合使用效果良好。本研究选择 PSA 和无水硫酸镁组合作为净化剂, 得到的加标回收率为 80.9%~102.7%, 相对标准偏差为 4.1%~13.1%, 符合农药残留检测的要求。

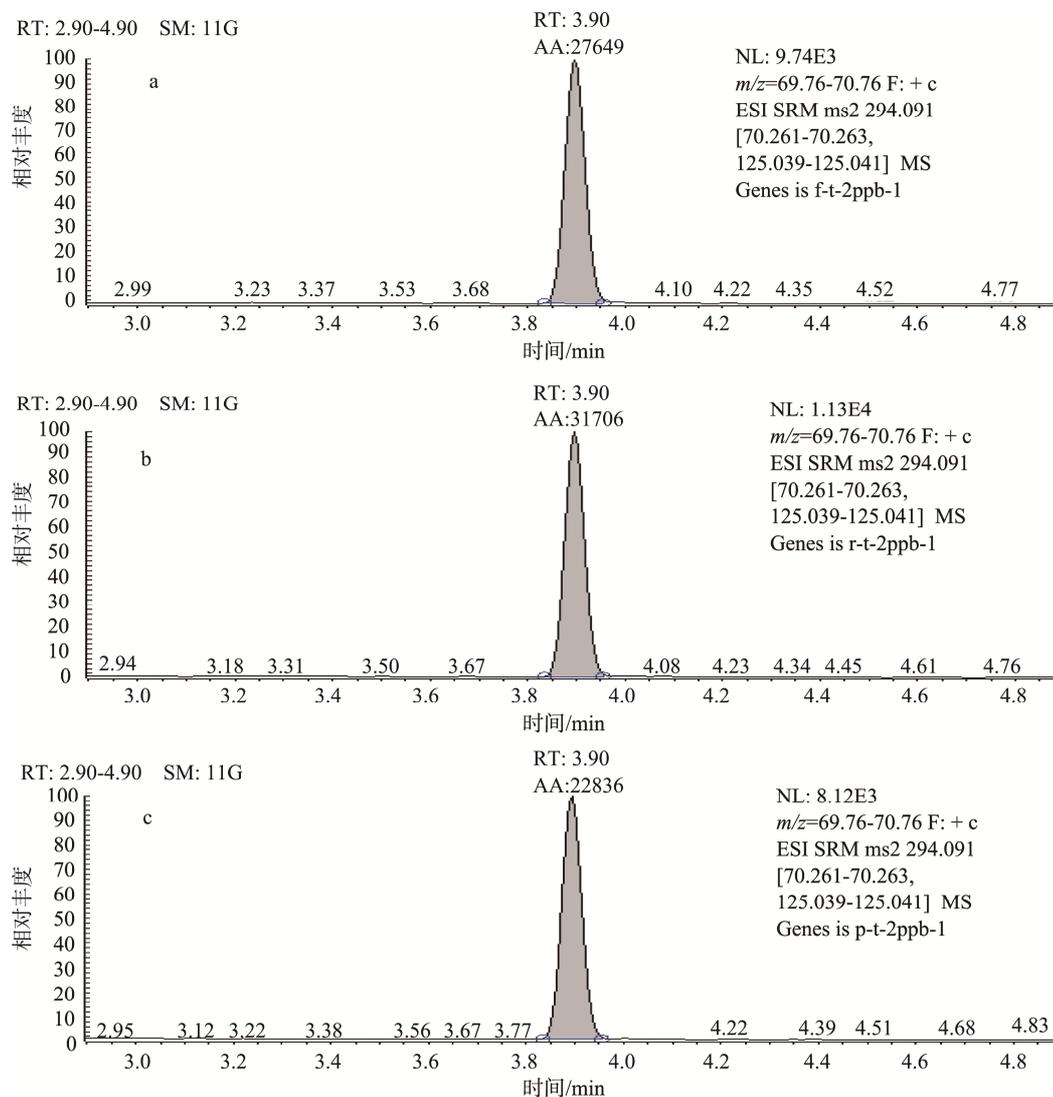
本研究通过对提取溶液体系、净化剂、色谱及质谱等条件的优化, 建立了 QuEChERS 结合液相色谱串联质谱法测定柑橘中多效唑残留量的分析方法, 该方法操作简便、快速, 灵敏度、正确度和精密度高, 适用于柑橘中多效唑残留量的检测。



注: a 全果, b 果肉, c 果皮。

图 2 空白样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of blank sample



注: a 全果, b 果肉, c 果皮。

图 3 加标样品色谱图(0.002 mg/kg)

Fig.3 Chromatogram of spiked sample(0.002 mg/kg)

参考文献

- [1] 戴莹, 王纪华, 韩平, 等. 农产品中 6 种植物生长调节剂残留限量标准及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 425-432.
Dai Y, Wang JH, Han P, *et al.* Research progress of 6 kinds of plant growth regulator residue limits standards and detection methods in agricultural products [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(2): 425-432.
- [2] 苟琰, 高驰, 邓晶晶, 等. QuEChERS 结合 GC-MS/MS-内标法测定川麦冬中多效唑残留量[J]. 中国药房, 2019, 30(3): 322-327.
Gou Y, Gao C, Deng JJ, *et al.* Determination of paclobutrazol residue in ophiopogon japonicus from sichuan by the QuEChERS combined with GC-MS/MS-internal standard detection [J]. China Pharm, 2019, 30(3): 322-327.
- [3] 聂萌恩, 柳青山, 白文斌, 等. 喷施多效唑对谷子农艺性状及抗倒伏力的影响[J]. 中国农学通报, 2019, 35(33): 35-41.
Nie ME, Liu QS, Bai WB, *et al.* Effects on agronomic characters and lodging resistance of foxtail millet by spraying paclobutrazol [J]. Chin Agric Sci Bull, 2019, 35(33): 35-41.
- [4] 朱慧香, 张宗俭, 陈虎保, 等. 常用植物生长调节剂应用指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
Zhu HX, Zhang ZJ, Chen HB, *et al.* Guideline of commonly used plant growth regulators [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [5] 陈春宇, 张蕾, 王秀全, 等. 生长调节剂对五味子成花及产量的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2011, 33(4): 360-363.
Chen CY, Zhang L, Wang XQ, *et al.* Effects of different growth regulators on blossom and yield of *Schisandra chinensis* [J]. J Jilin Agric Univ, 2011, 33(4): 360-363.
- [6] 余翠翠, 王晖, 隋春, 等. 四川三台麦冬产区生长调节剂使用情况调研及残留研究[J]. 中国现代中药, 2019, 21(12): 1669-1674.
Yu CC, Wang H, Sui C, *et al.* Study on application and residue analysis of plant growth regulator in ophiopogon japonicus in Santai county of Sichuan province [J]. Mod Chin Med, 2019, 21(12): 1669-1674.

- [7] 于声, 程波, 袁志华, 等. 多效唑 15%可湿性粉剂在小白菜和土壤中残留动态研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(5): 1768-1771.
Yu S, Cheng B, Yuan ZH, *et al.* Residual dynamics of 15% paclobutrazol wettable powder on cabbage and soil [J]. J Agro-Environ Sci, 2007, 26(5): 1768-1771.
- [8] 张健, 杜慧玲, 洪竖平. 苯磺隆、尿素、多效唑对土壤微生物的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2007, (1): 63-66.
Zhang J, Du HL, Hong JP. Influence of her, urea, trib enuronmethyl on soil microorganisms [J]. J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed), 2007, (1): 63-66.
- [9] 徐国锋, 聂继云, 李静, 等. GC/ECD 测定葡萄中多效唑和烯效唑的残留[J]. 农药, 2014, 53(10): 736-738.
Xu GF, Nie JY, Li J, *et al.* Simultaneous determination of paclobutrazol and uniconazole residues in grape by GC/ECD [J]. Agrochemicals, 2014, 53(10): 736-738.
- [10] 齐乐, 祁春节. 世界柑橘产业现状及发展趋势[J]. 农业展望, 2016, (12): 46-52.
Qi L, Qi CJ. Status quo and development trend of World'S citrus industry [J]. Agric Outlook, 2016, (12): 46-52.
- [11] 周晓洁, 赵良忠, 夏湘, 等. 在线净化/固相萃取-高效液相色谱法测定柑橘中多菌灵痕量残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 341-348.
Zhou XJ, Zhao LZ, Xia X, *et al.* Determination of trace carbendazim in citrus by high performance liquid chromatography with on-line clean-up and solid phase extraction [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(11): 341-348.
- [12] 李春丽, 尹桂豪, 刘春华, 等. 超声萃取-气相色谱法测定芒果园土壤中多效唑残留量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(11): 4856-4857.
Li CL, Yin GH, Liu CH, *et al.* Determination of paclobutrazol residue in soil of mango garden by ultrasonic extraction-gc method [J]. J Anhui Agric Sci, 2009, 37(11): 4856-4857.
- [13] 张娟, 刘爽, 许士明, 等. 叶面肥料中多效唑含量的气相色谱法检测[J]. 山东农业科学, 2016, 48(6): 130-132.
Zhang J, Liu S, Xu SM, *et al.* Detection of paclobutrazol content in foliar fertilizer by gas chromatography [J]. Shandong Agric Sci, 2016, 48(6): 130-132.
- [14] 余佳荣, 杨仁斌, 王海萍, 等. 多效唑在油菜植株、油菜籽和土壤中的残留[J]. 农药学报, 2008, 10(1): 113-116.
She JR, Yang RB, Wang HP, *et al.* Determination of residue of paclobutrazol in rapeseed plant, rapeseed and soil [J]. Chin J Pestic Sci, 2008, 10(1): 113-116.
- [15] 谭莹, 倪竹南, 汤鑫, 等. 果蔬中多效唑的高效液相色谱快速检测方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(23): 3361-3362, 3365.
Tan Y, Ni ZN, Tang J, *et al.* Rapid determination of paclobutrazol in vegetables and fruits by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(23): 3361-3362, 3365.
- [16] 白桦, 邱月明, 张青. 气相色谱-质谱法测定苹果中多效唑残留量[J]. 分析测试学报, 2005, (4): 65-67.
Bai H, Qiu YM, Zhang Q. Determination of residue of paclobutrazol in apple with gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2005, (4): 65-67.
- [17] 白桦, 邱月明, 郝楠, 等. 气相色谱-质谱法测定粮谷中多效唑残留量[J]. 检验检疫学报, 2004, 14(3): 54-55.
Bai H, Qiu YM, Hao N, *et al.* Determination of residue of paclobutrazol in cereal by HPLC-MS/MS [J]. J Inspect Quarant, 2004, 14(3): 54-55.
- [18] 黄何何, 张缙, 徐敦明, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中 21 种植物生长调节剂的残留量[J]. 色谱, 2014, 7: 707-716.
Huang HH, Zhang J, Xu DM, *et al.* Determination of 21 plant growth regulator residues in fruits by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 7: 707-716.
- [19] 王静静, 鹿毅, 杨涛, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定果蔬中 6 种植物生长抑制剂残留[J]. 分析测试学报, 2011, 30(2): 128-134.
Wang JJ, Lu Y, Yang T, *et al.* Determination of residue of 6 plant growth retardants in fruits and vegetables by HPLC-MS/MS [J]. J Instrum Anal, 2011, 30(2): 128-134.
- [20] 张慧, 吴颖, 路勇, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定苹果中的赤霉素、脱落酸、甲萘威、多效唑和烯效唑的残留量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 383-385.
Zhang H, Wu Y, Lu Y, *et al.* Determination of gibberellin, abscisic acid, carbaryl, paclobutrazol and uniconazole in apples by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Ind Sci Technol, 2010, 31(10): 383-385.
- [21] 董静, 潘玉香, 朱莉萍, 等. 果蔬中 54 种农药残留的 QuEChERS/GC-MS 快速分析[J]. 分析测试学报, 2008, (1): 66-69.
Dong J, Pan YX, Zhu LP, *et al.* Improvements and applications of the QuEChERS method in multi-residue analysis of 54 pesticides in vegetables and fruits [J]. J Instrum Anal, 2008, (1): 66-69.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



周 勇, 博士研究生, 助理研究员, 主要研究方向为农药残留分析。

E-mail: qimiaobuchugan@126.com



周小毛, 博士, 教授, 主要研究方向为农药毒理学。

E-mail: zhouxm1972@126.com