

基于SCIEX三重四极杆质谱系统对茶叶中琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的快速检测

Rapid Detection of SDHIs in tea by SCIEX Triple Quad LC-MS/MS system

程龙¹, 罗发美², 伍旭东², 赵祥龙¹, 李立军¹, 郭立海¹

Cheng Long¹, Luo famei², Wu xudong², Zhao Xianglong¹, Li Lijun¹, Guo Lihai¹

¹ SCIEX应用支持中心 广州; ² 普洱市质量技术监督综合检测中心 云南省普洱市

¹ SCIEX China, Guangzhou; ² Pu 'er City Quality and Technical supervision of comprehensive testing center, Pu 'er City, Yunnan Province

Keywords: SDHIs; succinate dehydrogenase inhibitors; LC-MS/MS

引言

转基因作物发展迅速, 在挤压了除草剂和杀虫剂市场的同时, 为杀菌剂营造了相对宽松的环境。近几年, 杀菌剂的发展较快, 其中, 琥珀酸脱氢酶抑制剂 (succinate dehydrogenase inhibitors, SDHIs) 类杀菌剂更是异军突起。SDHIs类杀菌剂都含有酰胺基团, 是一类通过抑制病原菌内的琥珀酸脱氢酶活性, 阻碍呼吸作用, 从而抑制病原菌生长的新型杀菌剂。该类杀菌剂主要应用于茶叶、蔬菜、水果、粮食等的杀菌和防霉。此类产品已征战市场近半个世纪, 然而最近, SDHIs类杀菌剂新品迭出, 而且新品上市后增长势头迅猛, 吸引了前所未有的关注, 是典型的慢热型产品。

此类杀菌剂有较早开发的, 也有新开发的, 历经3代, 已经查到的此类化合物共24个品种上市或即将上市^[1-2]。本文运用SCIEX Triple Quad™ 3500系统对茶叶中19种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂进行快速检测。

实验方法特点:

1. 本实验涵盖了常见的较早上市的SDHIs类杀菌剂化合物, 并包含了新上市的8种SDHIs类杀菌剂^[3], 总计19种, 覆盖种类比较全面且广。
2. 基于改良的QuEChERS前处理方法, 简便快速, 操作简单, 省时省力, 可以快速筛查并定量SDHIs类杀菌剂。



液质检测平台: SCIEX ExionLC™ 液相 + SCIEX Triple Quad™ 3500 系统

3. 建立LC-MS/MS方法, 10 min内完成19种的SDHIs类杀菌剂检测, 快速高效。
4. 灵敏度高, 线性范围0.01 ng/ml-100 ng/ml, 各浓度点的准确度均在80-120%之间, 且r均大于0.995, 线性相关性良好, 定量准确。方法的定量限高于欧盟法规中对茶叶基质的最大限量要求值。

实验方法

1. 色谱条件

- a) 色谱柱: Phenomenex Kinetex C18 (50 × 3.0 mm, 2.6 μm), 或性能相当者。
- b) 流动相: A为0.1%甲酸水溶液, B为乙腈, 梯度洗脱程序见表1。
- c) 流速: 300 μL/min。
- d) 柱温: 35°C。
- e) 进样量: 10 μL。

表1. 梯度洗脱程序表。

梯度时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	95	5
6	5	95
8	5	95
8.1	95	5
10	95	5

2. 质谱方法

扫描方式: MRM

离子源: ESI+源

离子源参数:

电压 IS: 5500 V (+) 源温度 TEM: 550 °C

气帘气 CUR: 25 psi 碰撞气 CAD: Medium

雾化气 GS1: 45 psi 辅助气 GS2: 50 psi

3. 样品前处理

3.1 制备: 将茶叶样品放入粉碎机中粉碎, 样品全部过425 μm 的标准网筛。混匀, 制备好的试样均分成两份, 装入洁净的盛样容器内, 密封并标明标记。

3.2 提取: 称取2 g茶叶样品 (精确至0.1 g) 于50 mL塑料离心管中, 加入10 mL水, 放置30 min。加入10 mL乙腈, 振荡15 min。再加入4 g硫酸镁、1 g氯化钠和1 g柠檬酸钠和0.5 g柠檬酸氢二钠, 剧烈振荡1 min, 以3000 r/min离心5 min, 准确移取上清层 (乙腈层) 6 mL至15 mL塑料离心管中, 供净化。

3.3 净化: 向待净化的离心管里加入450 mg PSA、450 mg C18、200mg GCB、900 mg硫酸镁, 振荡混匀30 s, 以3000 r/min离心5 min, 用0.22 μm的滤芯过滤后, 取0.5 mL, 加入0.5 mL的水, 待 LC-MS/MS上机测定。

19种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的MRM参数列表2:

Q1	Q3	Dwell Time (ms)	ID	DP	CE
236.1	142.9	15	Carboxin-1	65	22
236.1	86.9	15	Carboxin-2	65	32
268.1	174.9	15	oxyCarboxin-1	75	20
268.1	146.9	15	oxyCarboxin-2	75	32
270.1	119	15	Mepronil-1	110	32
270.1	228	15	Mepronil-2	110	21
324	231	15	benodanil-1	80	30
324	203	15	benodanil-2	80	50
324.1	262.1	15	Flutolanil-1	70	25
324.1	242.1	15	Flutolanil-2	70	33
202.1	108.9	15	fenfuram-1	80	27
202.1	83	15	fenfuram-2	80	20
334.1	156.9	15	furametpyr-1	125	36
334.1	290	15	furametpyr-2	125	22
528.8	148	15	thifluzamide-1	115	39
528.8	168	15	thifluzamide-2	115	35
343.1	307	15	Boscalid-1	105	28
343.1	272	15	Boscalid-2	105	42
360.2	255.9	15	penthiopyrad-1	105	30
360.2	276	15	penthiopyrad-2	105	18
360.1	244.1	15	isopyrazam-1	110	32
360.1	320.1	15	isopyrazam-2	110	31
382.1	342.1	15	fluxapyroxad-1	71	29
382.1	314	15	fluxapyroxad-2	71	36
414	266	15	bixafen-1	85	33
414	394	15	bixafen-2	85	20
332.1	159	15	sedaxane-1	89	26
332.1	292.1	15	sedaxane-2	89	20
318.1	141.1	15	penflufen-1	95	40
318.1	234.1	15	penflufen-2	95	23
397	208	15	fluopyram-1	76	31
397	145	15	fluopyram-2	76	74
398.1	286.1	15	benzovindiflupyr-1	100	40
398.1	342	15	benzovindiflupyr-2	100	26
360.1	125	15	isofetamid-1	70	39
360.1	210.1	15	isofetamid-2	70	15
426	406	15	pydiflumetofen-1	85	19
426	192.9	15	pydiflumetofen-2	85	40

实验结果

1. 19种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的提取离子色谱图:

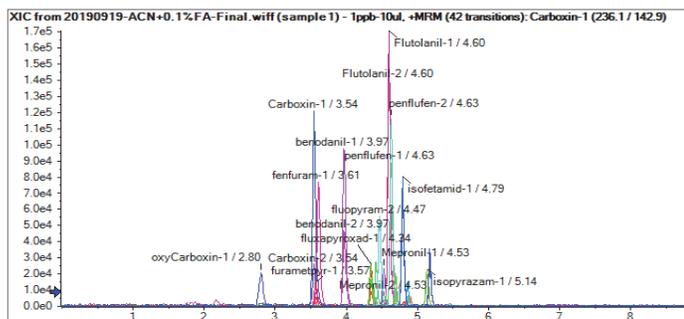


图1. 19种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂提取离子流图。

2. 线性范围、回归方程及回归系数

19种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂在0.01~100 ng/mL均具有良好的线性，其回归系数 $r > 0.995$ ，详见表2。

表3. 19种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂在茶叶中欧盟最大限量值、线性范围、回归曲线及回归系数。

英文通用名	中文通用名	CAS	分子式	欧盟MRL (mg/kg)	线性范围 (ng/ml)	回归方程	回归系数r
carboxin	萎锈灵	5234-68-4	$C_{12}H_{13}NO_2S$	0.1	0.01-100	$y = 7.49661e4 x + 8561.56666$	$r = 0.99842$
oxycarboxin	氧化萎锈灵	5259-88-1	$C_{12}H_{13}NO_4S$	0.05	0.1-100	$y = 9.23068e4 x + -3101.37919$	$r = 0.99751$
mepronil	灭锈胺	55814-41-0	$C_{17}H_{19}NO_2$	0.05	0.05-100	$y = 7.28068e4 x + -9787.37073$	$r = 0.99601$
flutolanil	氟酰胺	66332-96-5	$C_{17}H_{16}F_3NO_2$	0.05	0.01-100	$y = 3.89985e5 x + 5.96502e4$	$r = 0.99551$
benodanil	麦锈灵	15310-01-7	$C_{13}H_{10}INO$	未规定	0.01-100	$y = 2.89930e5 x + 18901.93293$	$r = 0.99860$
fenfuram	甲咪酰胺	24691-80-3	$C_{12}H_{11}NO_2$	未规定	0.1-100	$y = 2.51465e5 x + 370.88446$	$r = 0.99771$
furametpyr	咪唑菌胺	123572-88-3	$C_{17}H_{20}ClN_3O_2$	未规定	0.1-100	$y = 4.22441e4 x + 5817.90255$	$r = 0.99611$
thifluzamide	噁唑酰胺	130000-40-7	$C_{13}H_6Br_2F_2N_2O_2S$	未规定	0.2-100	$y = 7797.05891 x + -602.36242$	$r = 0.99957$
boscalid	啉酰胺	188425-85-6	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$	0.01	0.5-100	$y = 6.56221e4 x + -1927.30106$	$r = 0.99975$
penthiopyrad	吡噻菌胺	183675-82-3	$C_{16}H_{20}F_3N_3OS$	0.02	0.1-100	$y = 14072.41618 x + 59.55027$	$r = 0.99857$
isopyrazam	吡唑萘菌胺	881685-58-1	$C_{20}H_{23}F_2N_3O$	0.01	0.1-100	$y = 5.65747e4 x + 7811.07312$	$r = 0.99904$
fluxapyroxad	氟唑菌酰胺	907204-31-3	$C_{18}H_{12}F_5N_3O$	0.01	0.1-100	$y = 7.53851e4 x + 2048.99133$	$r = 0.99859$
bixafen	联苯吡菌胺	581809-46-3	$C_{18}H_{12}Cl_2F_3N_3O$	0.01	0.2-100	$y = 25431.65822 x + 162.65296$	$r = 0.99918$
sedaxane	氟唑环菌胺	874967-67-6	$C_{18}H_{19}F_2N_3O$	未规定	0.1-100	$y = 6.82645e4 x + 1809.81355$	$r = 0.99846$
penflufen	氟唑菌苯胺	494793-67-8	$C_{18}H_{24}FN_3O$	未规定	0.01-100	$y = 2.41453e5 x + 23859.95574$	$r = 0.99707$
fluopyram	氟吡菌酰胺	658066-35-4	$C_{16}H_{11}ClF_6N_2O$	0.05	0.05-100	$y = 1.62361e5 x + -5985.87043$	$r = 0.99952$
benzovindiflupyr	苯并烯氟菌唑	1072957-71-1	$C_{18}H_{15}Cl_2F_2N_3O$	0.05	0.2-100	$y = 3.18231e4 x + 4752.81164$	$r = 0.99825$
isofetamid	异丙噁菌胺	875915-78-9	$C_{20}H_{25}NO_3S$	0.05	0.05-100	$y = 1.70976e5 x + 8606.51270$	$r = 0.99893$
pydiflumetofen	氟唑菌酰羟胺	1228284-64-7	$C_{16}H_{16}Cl_3F_2N_3O_2$	未规定	0.05-100	$y = 7.50147e4 x + 11060.03474$	$r = 0.99708$

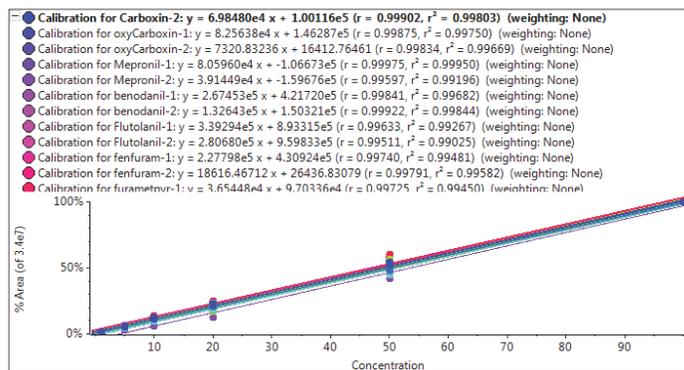


图2. 19种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂标准曲线。

3. 方法重现性:

使用不同空白基质考察实验的重现性，添加浓度0.01 mg/kg，连续进样6针，所有化合物RSD值均小于4%，表明样品在Turbo V™离子源作用下，在复杂基质中，仍然具有良好的重现性。

化合物名称	RSD%(n=6)	化合物名称	RSD%(n=6)
萎锈灵	2.8	吡唑萘菌胺	2.55
氧化萎锈灵	3.84	氟唑菌酰胺	3.37
灭锈胺	1.9	联苯吡菌胺	3.3
氟酰胺	1.68	氟唑环菌胺	2.56
麦锈灵	2.95	氟唑菌苯胺	2.73
甲咪唑胺	2.01	氟吡菌酰胺	2.35
呋吡菌胺	2.06	苯并烯氟菌唑	2.93
噻呋酰胺	1.82	异丙噻菌胺	2.13
啶酰菌胺	2.31	氟唑菌酰胺	3.44
吡噻菌胺	3.7		

总结

1. 本文基于SCIEX Triple Quad™ 3500系统，建立茶叶中琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂检测的LC-MS/MS方法。基于改良的QuEChERS前处理方法，简便快速，操作简单，省时省力。
2. 灵敏度高，线性范围0.01 ng/ml-100 ng/ml各浓度点准确度均在80-120%之间，且r均大于0.995，线性相关性良好，定量准确。方法的定量限高于欧盟法规中对茶叶基质的最大限量要求值。
3. SCIEX的Turbo V™离子源，可实现最高750 °C离子源温度设计和主动排废气功能带来高离子化效率和极强的抗污染能力。在日常工作中，大批量样本检测过程，仍可以保证稳定的高灵敏度和重现性。

参考文献

- [1] 仇是胜, 柏亚罗, 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的研发进展(II)[J], 现代农药.2015,14(1):1-7.
- [2] 李良孔, 袁善奎, 潘洪玉, 等. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类(SDHIs)杀菌剂及其抗性研究进展[J], 农药.2011,50(3):165-172.
- [3] 杨欢, 孙伟华, 曹赵云, 等. 改良QuEChERS方法快速测定果蔬中8种新型琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂[J], 色谱. 2016,34(11):1070-1076.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12046-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)