

离子阱飞行时间质谱在三唑类农药筛查中的应用

LCMS-IT-TOF-030

摘要：建立 27 种三唑类农药的分离方法，使用离子阱飞行时间质谱建立获得其多级质谱数据，对其裂解规律进行研究，建立其液相色谱 - 离子阱 - 飞行时间质谱数据库。使用离子阱飞行时间质谱对 27 种唑类农药进行定量分析，考察其线性范围、灵敏度和质量测量准确度。选择大蒜样品作为基质，考察了离子阱飞行时间质谱对不同残留浓度水平下目标物筛查分析的灵敏度和准确度（质量测量准确度）以及影响因素，为建立农药筛查方法提供参考

关键词：唑类农药 离子阱飞行时间质谱 农药筛查

目前，食品中农药、兽药（抗生素、激素）、违法添加物的滥用残留问题严重。现阶段我国登记的农药有近 700 种，实际生产中还普遍存在超范围使用的情况。因此，需要能够进行多农、兽残分析，并且在实际样品中实现快速准确筛查的方法。本实验利用离子阱飞行时间质谱对 27 种唑类农药进行分离及多级质谱分析，同时建立筛查列表，对不同添加浓度的实际样品进行分析。

试剂、仪器及实验过程

1.1 试剂

1.1.1 标准物质：农药标准品：

(1) 三环唑 (tricyclazole)、(2) 粉唑醇 (flutriafol)、(3) 氧环唑 (azaconazole)、(4) 多效唑 (paclobutrazol)、(5) 灭菌唑 (triticonazole)、(6) 三唑醇 triadimenol、(7) 环丙唑醇 (cyproconazole)、(8) 硅氟唑 (simeconazole)、(9) 腈菌唑 (myclobutanil)、(10) 氟环唑 (epoxiconazole)、(11) 三唑酮 (triadimefon)、(12) 糠菌唑 (bromuconazole)、(13) 戊唑醇 (tebuconazole)、(14) 氟唑唑 (fluquinconazole)、(15) 四氟唑唑 (tetraconazole)、(16) 氟硅唑 (flusilazole)、(17) 己唑醇 (hexaconazole)、(18) 戊菌唑 (penconazole)、(19) 氟菌唑 (triflumizole)、(20) 叶菌唑 (metconazole)、(21) 腈苯唑 (fenbuconazole)、(22) 烯唑醇 (diniconazole)、(23) 丙环唑 (propiconazole)、(24) 种菌唑 (ipconazole)、(25) 苯醚甲环唑 (difenoconazole)、(26) 亚胺唑 (imibenconazole)、(27) 乙螨唑 (etoxazole)

1.1.2 标准储备溶液：

称取 0.01 g (精确至 0.001 g) 的农药标准品，用乙腈溶解并定容至 10 mL，配成浓度约为 1000 mg/L 的标准储备溶液，将标准储备溶液转移至棕色密封瓶中贮存，置于 -18℃ 保存。

1.1.3 混合标准中间溶液：

取适量的各标准储备液于 100 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，配制成浓度为 10.0 mg/L 混合标准中间液，置于 4℃ 保存。

1.1.4 标准工作溶液：

取适量的混合标准中间溶液，用定溶液（乙腈 -0.1%

甲酸水溶液 =1:1）流动相稀释，配制成浓度为 10^{-4} 400 $\mu\text{g/L}$ 标准工作溶液，标准工作溶液需用现配。

1.2 仪器及分析条件

1.2.1 液相色谱条件

分析仪器：Prominence UFLC_{XR} 系统，包括 LC-20AD_{XR} × 2 (输液泵)，SIL-20AC_{XR} (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱)，CBM-20A (系统控制器)，DGU-20A₃ (在线脱气机)，SPD-M20A (二极管阵列检测器)，LCMS-IT-TOF (离子阱 - 飞行时间质谱) 和 LCMSsolution Ver.3.60 (工作站)。

(1) 唑类农药多级质谱分析条件

分析模式：流动注射 (FIA)

流动相：A 水 +0.1% 甲酸

B 乙腈 A/B=50/50 (v/v)

流速：0.1 mL/min

进样量：0.1 μL

(2) 筛查方法分析条件

流速：0.3 mL/min

色谱柱：C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm)

柱温：30℃

进样量：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱

流动相 A 水 +0.1% 甲酸 B 乙腈，初始浓度：5%

Time	Module	Action	Value
5.00	Pumps	B.Conc	40
20.00	Pumps	B.Conc	45
21.00	Pumps	B.Conc	95
28.00	Pumps	B.Conc	95
28.10	Pumps	B.Conc	5
35.00	Controller	Stop	

1.2.2 质谱条件

分析仪器：LCMS-IT-TOF

离子源：ESI(+)

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 1.5 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

碰撞气：氦气

脱溶剂管温度：200℃

加热模块温度：200℃

结果与讨论

2.1 多级质谱数据分析

采用离子阱-飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)获得正离子模式下27种唑类农药的多级质谱数据并进行裂解规律的研究。表1总结了27种唑类农药经分离后的保留时间、正离子模式多级质谱碎片信息及MS¹分子离子峰的相对误差。

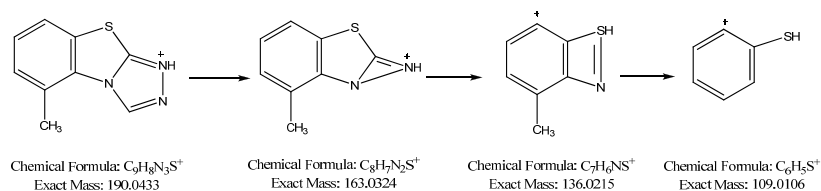
表1 27种唑类农药保留时间、多级质谱碎片及相对误差

#	保留时间 (min)	中文名	分子式	正离子模式多级质谱碎片	误差 (ppm)
1	5.190	三环唑	C ₉ H ₇ N ₃ S	190.0436→163.0334→136.0184→109.0118	1.58
2	7.419	粉唑醇	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	302.1090→233.0774→123.0254	-2.98
3	7.789	氧环唑	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₂	300.0300→230.9976→158.9763→123.0018	-0.33
4	9.789	多效唑	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O	294.1365→207.0911→165.0050	-1.02
5	10.539	灭菌唑	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O	318.1357→249.1045→125.0179	-3.46
6	10.398	三唑醇	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	296.1154→227.0845→100.0792	-2.03
7	10.670	环丙唑醇	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	292.1199→125.0164	-4.11
8	11.666	硅氟唑	C ₁₄ H ₂₀ FN ₃ OSi	294.1428→209.0787*,225.1084→135.0620→115.0583	-1.36
9	12.341	腈菌唑	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	289.1212→220.0874,125.0185	-1.04
10	12.848	氟环唑	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	330.0808→141.0109,121.0485,261.0477	1.21
11	12.802	三唑酮	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	294.1002→225.0681→197.0738→129.0093	-0.68
12	13.352	糠菌唑	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ BrN ₃ O	375.9610→306.9287→158.9787	-1.06
13	13.800	戊唑醇	C ₁₆ H ₂₂ ON ₃ Cl	308.1519→165.0495	-1.62
14	13.487	氟唑唑	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₃ O	376.0170→349.0023→306.9820	1.86
15	14.178	四氟醚唑	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	372.0287→158.9770→123.0003	-0.27
16	14.866	氟硅唑	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	316.1061→247.0743→169.0500→149.0474,105.0688	-4.75
17	14.870	己唑醇	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	314.0821→297.0794,158.9838	-0.64
18	14.772	戊菌唑	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	284.0712→172.9920→137.0093	-1.41

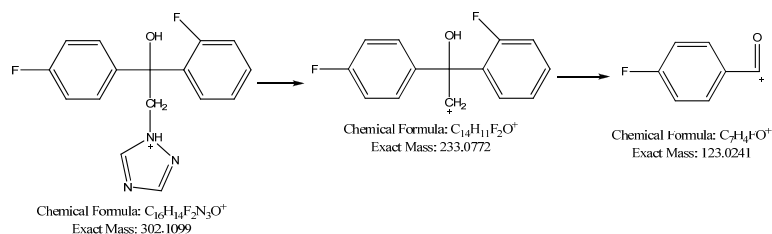
19	15.273	氟菌唑	$C_{15}H_{15}N_3F_3ClO$	346.0929→278.0602→250.0528→208.0132, 187.9998	0
20	15.814	叶菌唑	$C_{17}H_{22}ClN_3O$	320.1521→177.0477→142.0803	-0.94
21	15.884	腈苯唑	$C_{19}H_{17}ClN_4$	337.1209→194.0475,125.0160	-1.78
22	16.597	烯唑醇	$C_{15}H_{17}O N_3 Cl_2$	326.0816→252.0086→216.0360→189.0248→153.0434	-1.53
23	16.711	丙环唑	$C_{15}H_{17}O_2N_3Cl_2$	342.0763→158.9753→122.9985	-2.34
24	21.182	种菌唑	$C_{17}H_{24}ClN_3O$	334.1673→191.0622→163.0309	-2.39
25	21.800	苯醚甲环唑	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	406.0723→337.0378→251.0020→188.0389→153.0710	0.74
26	22.664	亚胺唑	$C_{17}H_{13}Cl_3N_4S$	410.9990→341.9644,171.0018*→125.0179	-2.19
27	23.065	乙螨唑	$C_{21}H_{23}F_2NO_2$	360.1775→304.1140→141.0157→113.0218	0

根据获得的多级质谱碎片信息对 27 种唑类的裂解规律进行推测，以下为每个唑类农药可能的裂解途径示意图。

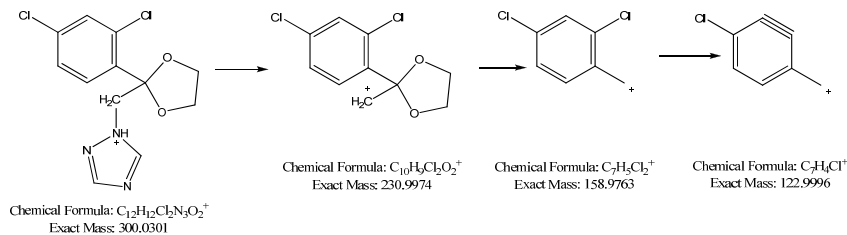
(1) 三环唑



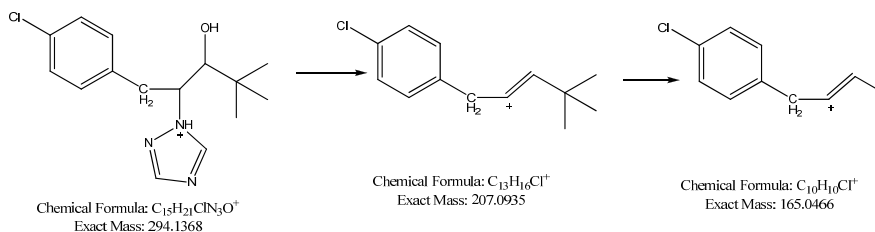
(2) 粉唑醇



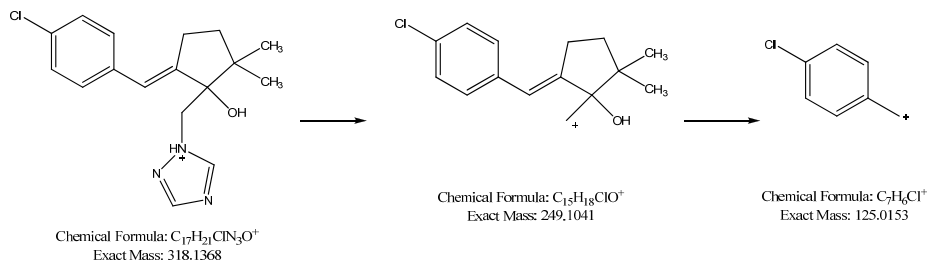
(3) 氧环唑



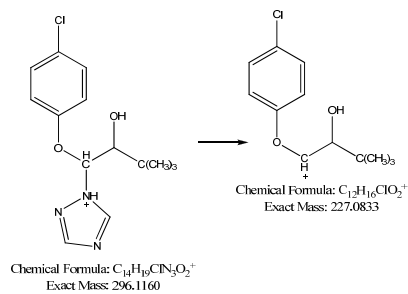
(4) 多效唑



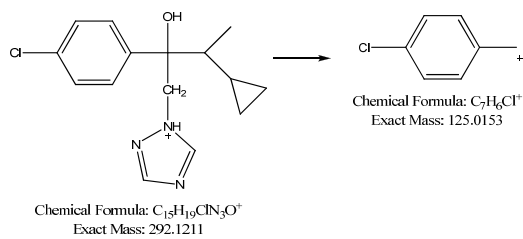
(5) 灭菌唑



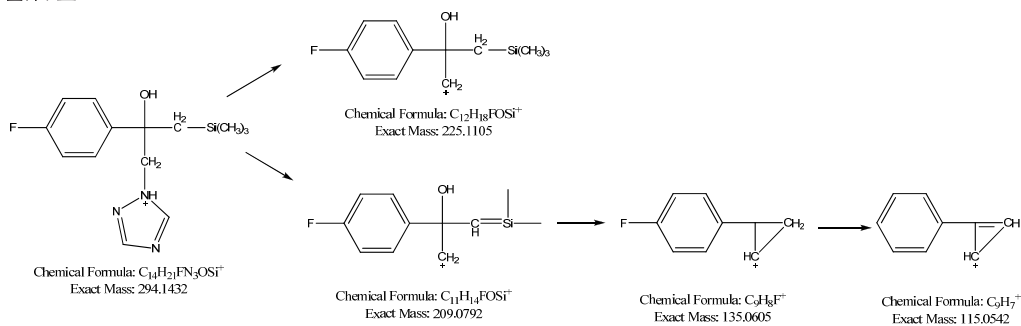
(6) 三唑醇



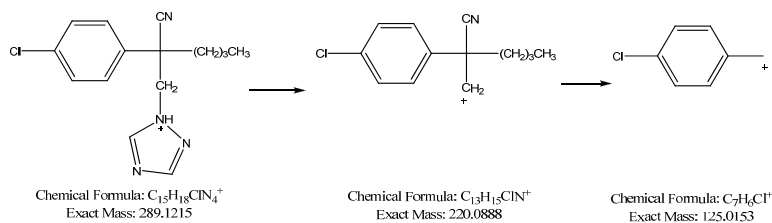
(7) 环丙唑醇



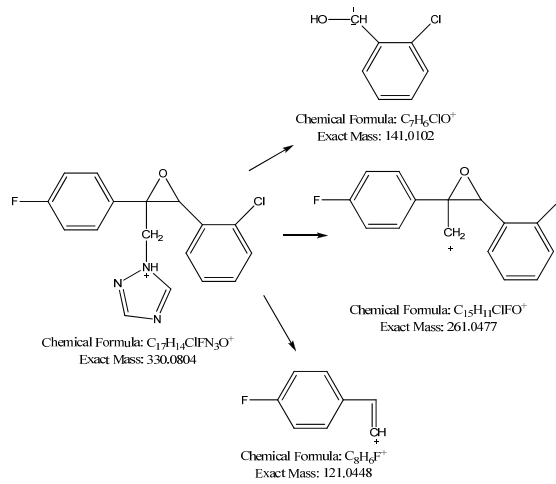
(8) 硅氟唑



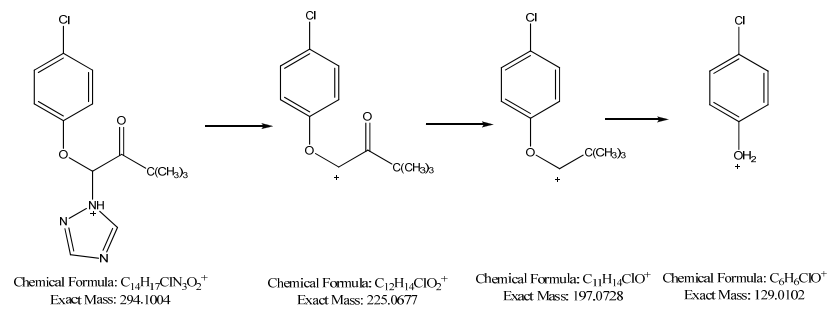
(9) 腈菌唑



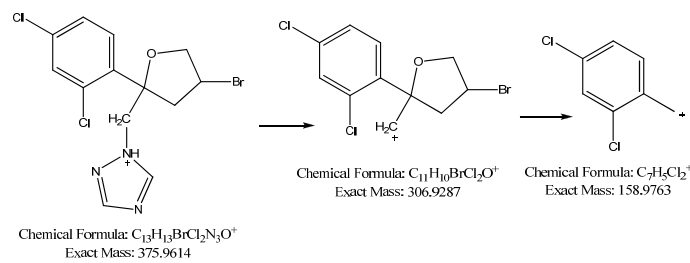
(10) 氟环唑



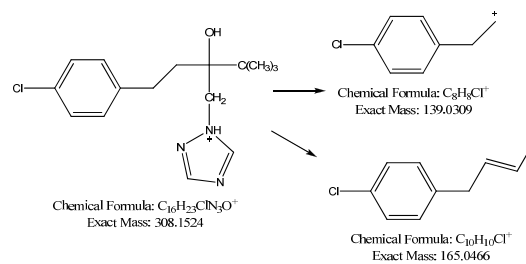
(11) 三唑酮



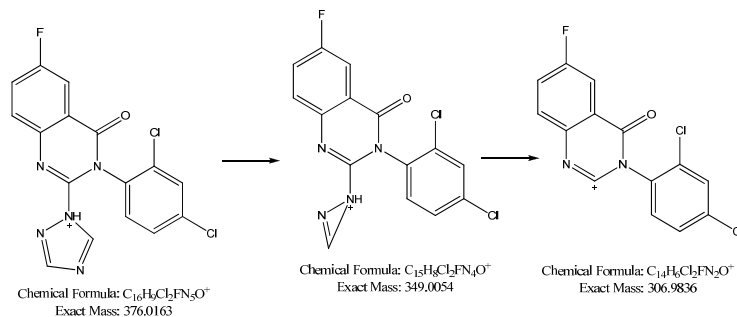
(12) 糠菌唑



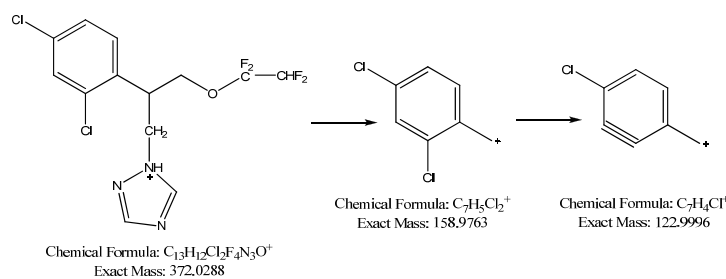
(13) 戊唑醇



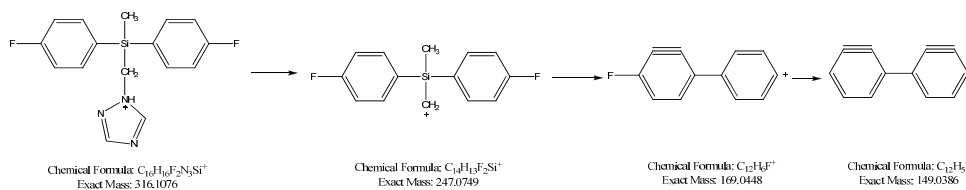
(14) 氟喹唑



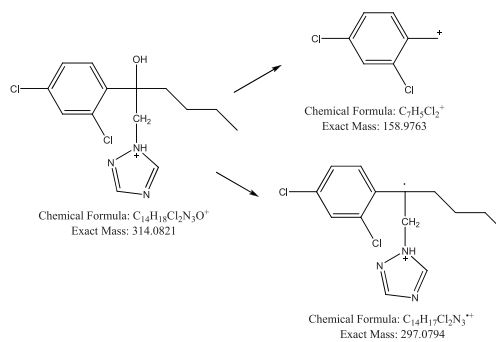
(15) 四氟醚唑



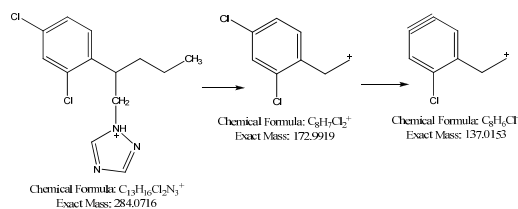
(16) 氟硅唑



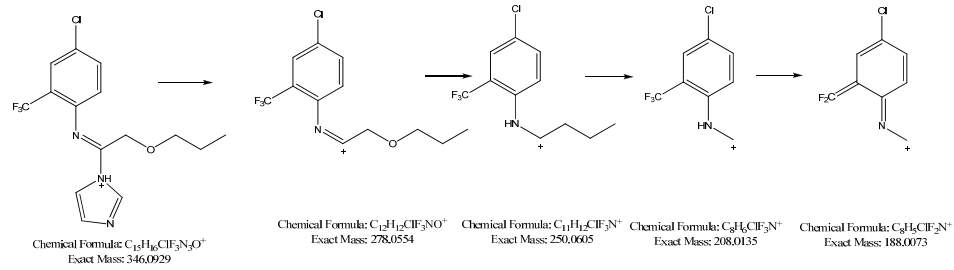
(17) 己唑醇



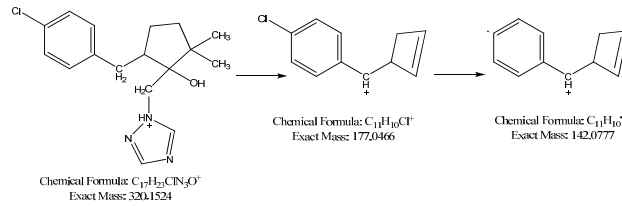
(18) 戊菌唑



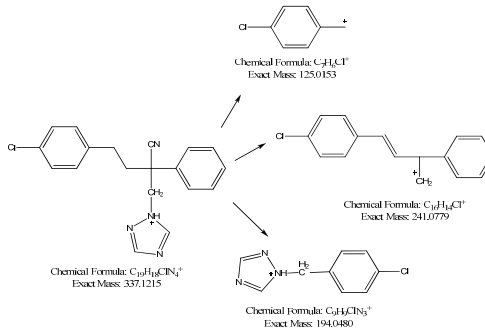
(19) 氟菌唑



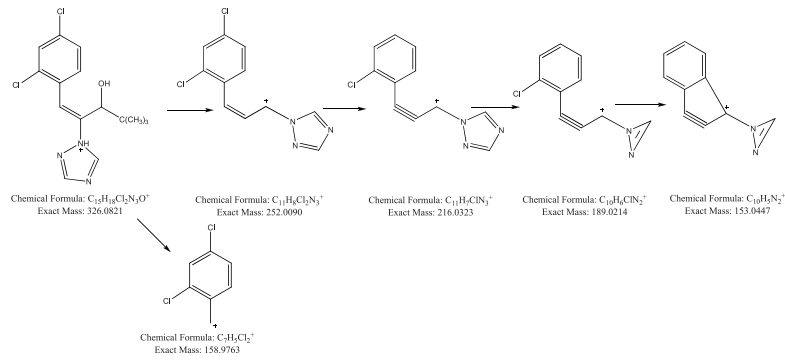
(20) 叶菌唑



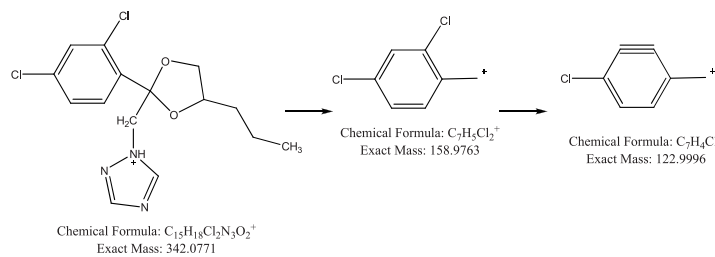
(21) 腈苯唑



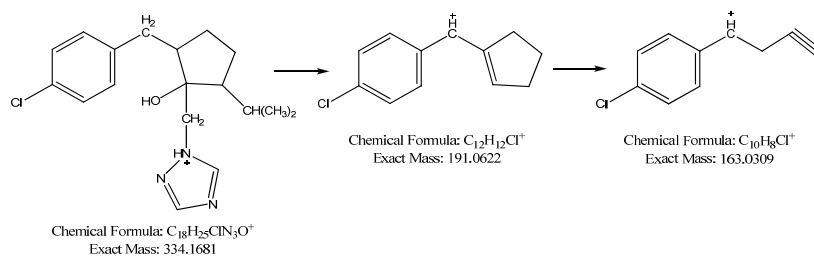
(22) 烯醇唑



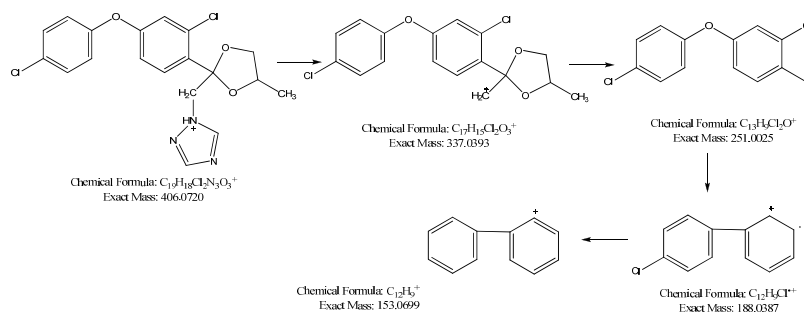
(23) 丙环唑



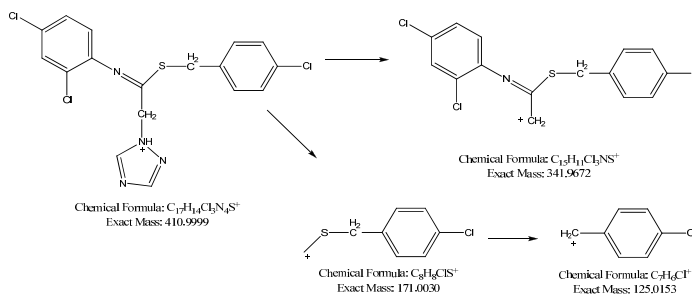
(24) 种菌唑



(25) 苯醚甲环唑



(26) 亚胺唑



(27) 乙螨唑

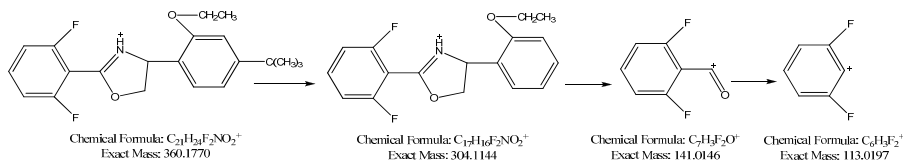


图 1 27 种唑类农药的多级裂解途径示意图

根据对 27 种唑类农药的多级质谱裂解途径的推导，大多数的三唑类农药会产生丢失唑环结构 (见图 2) 的碎片，经过一系列裂解最终产生 m/z 158.9763 和 m/z 125.0153 的碎片。唑环类中性丢失以及 m/z 158.9763 和 m/z 125.0153 的碎片可作为大部分含氯三唑类农药的裂解特征。

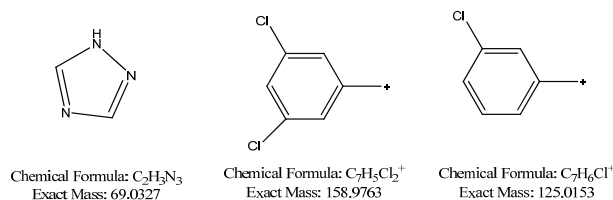
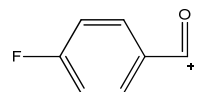


图 2 唑环结构和 m/z 125.0153 和 m/z 158.9763 碎片的结构

当唑类农药的结构中含有 F 取代以及苯环以外其它环结构时, 唑类农药的裂解规律较复杂, 如氟啶唑、氟环唑和氟硅唑等。但是, 如果苯环上具有 F 元素取代时 (粉醇唑、氟环唑等), 易于产生 $m/z123.0241$ 的碎片离子, 如图 3 所示



Chemical Formula: $C_7H_5FO^+$
Exact Mass: 123.0241

图 3 $m/z123.0241$ 碎片离子的结构

2.2 线性范围及灵敏度实验

配制浓度范围为 $10 \mu\text{g/L}$ – $400 \mu\text{g/L}$ 三唑类农药混合标准工作溶液, 采用 LCMS-IT-TOF 正离子模式 MS^1 进行检测, 得到各农药的线性范围和相关参数。根据混合标准样品中各目标化合物的信噪比并结合实际浓度水平标准品检测得到方法灵敏度。三唑类农药线性关系良好。图 4 为唑类农药混和标准品的 ($10 \mu\text{g/L}$) 提取离子流图, 表 2 为 27 种唑类农药的线性范围及检出限。

表 2 27 种三唑类农药的线性范围及检出限

#	名称	理论质量数	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	线性方程	相关系数	LOD ($\mu\text{g/L}$)
1	三环唑	190.0433	10-200	$y=155400X + 252931$	0.9998	1.0
2	粉唑醇	302.1099	10-200	$y=134791X + 189780$	0.9995	1.0
3	氧环唑	300.0301	10-200	$y=91694X + 169820$	0.9996	0.4
4	多效唑	294.1368	10-200	$y=163566X + 23574$	0.9998	0.4
5	灭菌唑	318.1368	10-400	$y=95383X + 171071$	0.9992	1.0
6	三唑醇	296.1160	10-400	$y=33423X - 45216$	0.9997	2.0
7	环丙唑醇	292.1211	10-200	$y=39210X - 125491$	0.9998	1.0
8	硅氟唑	294.1432	10-400	$y=164660X + 70641$	0.9994	0.4
9	腈菌唑	289.1215	10-400	$y=67588X + 14372$	0.9996	1.0
10	氟环唑	330.0804	10-400	$y=77047X - 168449$	0.9997	1.0
11	三唑酮	294.1004	10-400	$y=120683X + 293869$	0.9994	0.4
12	糠菌唑	375.9614	10-400	$y=18163X - 178366$	0.9999	2.0
13	戊唑醇	308.1524	10-400	$y=121880X - 494889$	0.9997	0.4
14	氟啶唑	376.0163	20-400	$y=26703X - 328226$	0.9998	4.0
15	四氟醚唑	372.0288	10-400	$y=75717X - 357899$	0.9998	0.4
16	氟硅唑	316.1061	10-400	$y=175177X - 11610$	0.9991	0.4
17	己唑醇	314.0821	10-200	$y=78765X - 299026$	0.9999	1.0
18	戊菌唑	284.0716	10-400	$y=99611X - 2031$	0.9990	1.0
19	氟菌唑	346.0929	20-400	$y=104659X - 1777061$	0.9996	1.0
20	叶菌唑	320.1524	10-400	$y=123982X - 669741$	0.9999	0.4
21	腈苯唑	337.1215	10-400	$y=77922X - 593613$	0.9999	1.0

22	烯唑醇	326.0821	10-400	y=94082X -473123	0.9999	0.4
23	丙环唑	342.0771	10-400	y=98083X -620124	0.9999	2.0
24	种菌唑	334.1681	20-400	y=33664X-869997	0.9988	0.4
25	苯醚甲环唑	406.0720	50-400	y=75122X -2280876	0.9987	1.0
26	亚胺唑	410.9999	10-200	y=19677X -573195	0.973	1.0
27	乙螨唑	360.1775	10-100	y=65609X -517595	0.9913	0.2

2.3 复杂基质中唑类农药筛查灵敏度及准确度

在大蒜基质中添加混合标准品，添加浓度水平为 10 $\mu\text{g/L}$ ，20 $\mu\text{g/L}$ ，40 $\mu\text{g/L}$ ，建立 27 种唑类农残的筛选列表，采用 MetID Solution 对不同添加浓度水平的样品进行筛选，参考化合物的色谱保留时间，准确质量数，质量数测量误差，同位素拟合得分等参数，对筛查结果进行判断。图 5 为大蒜基质中添加 10 $\mu\text{g/L}$ 三唑类农药的 MS¹ 总离子流图，图 6 为大蒜基质 10 $\mu\text{g/L}$ 添加浓度 27 种唑类农药的提取离子流图。

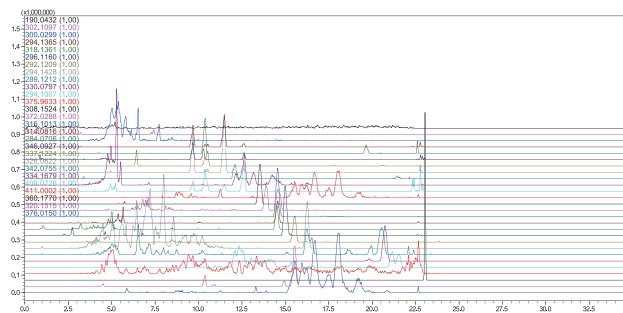


图 6 大蒜基质中添加 27 种三唑类农药提取离子流图
(添加浓度:10 $\mu\text{g/L}$)

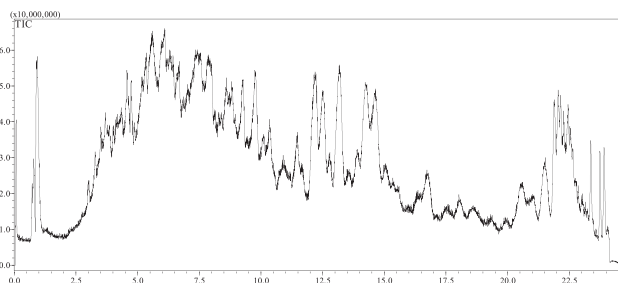


图 5 大蒜基质中添加 27 种三唑类农药总离子流图
(添加浓度:10 $\mu\text{g/L}$)

表 3 总结了 10、20、40 $\mu\text{g/L}$ 添加水平的筛查结果、检测准确度及检出限，由表 3 的结果可知大蒜基质中 27 种唑类农药在 20 $\mu\text{g/L}$ 及 40 $\mu\text{g/L}$ 的添加水平下均可被检出，26 种在 10 $\mu\text{g/L}$ 的浓度水平可被检测出，氟环唑的基质抑制效应较强，信号强度较低。

表 3 大蒜中各添加水平筛查结果、检出限及不同添加浓度下准确质量数检测结果

#	农药	添加水平为 10 $\mu\text{g/L}$			添加水平为 20 $\mu\text{g/L}$			添加水平为 40 $\mu\text{g/L}$			LOD $\mu\text{g/L}$
		实测质量数 m/z	误差 ppm	Iso Score	实测质量数 m/z	误差 ppm	Iso Score	实测质量数 m/z	误差 ppm	Iso Score	
1	三环唑	190.0447	7.13	44.02	190.0436	1.34	32.35	190.0435	0.82	87.39	10.0
2	粉唑醇	302.1094	-1.8	0	302.1097	-0.81	68.89	302.1092	-2.47	88.37	5.0
3	氧环唑	300.0285	-5.36	40.26	300.0299	-0.7	88.7	300.0299	-0.7	95.93	5.0
4	多效唑	294.1351	-5.67	61.68	294.1357	-3.63	77.35	294.1361	-2.27	80.04	1.0
5	三唑醇	296.1138	-7.53	6.17	296.1145	-5.17	77.31	296.1153	-2.47	83.74	2.0
6	灭菌唑	318.1356	-3.67	74.49	318.1350	-5.55	100	318.1353	-4.61	100	1.0
7	环丙唑醇	292.119	-7.25	47.07	292.1191	-6.9	82.06	292.1199	-4.16	100	1.0

8	糠菌唑	375.9629	4.11	17.57	375.9617	0.92	70.45	375.9607	-1.74	86.13	10.0
9	硅氟唑	294.1421	-3.89	64.33	294.1420	-4.23	95.52	294.1422	-3.55	98.13	1.0
10	腈菌唑	289.1214	-0.18	29.43	289.1208	-2.25	74.08	289.1209	-1.91	90.42	1.0
11	三唑酮	294.0993	-3.68	68.44	294.0992	-4.02	95.35	294.0993	-3.68	100	1.0
12	氟环唑	-	-	-	330.0740	-19.37	10.8	330.0786	-18.10	21.5	20.0
13	氟啶唑	376.0081	-21.73	33.2	376.0115	-12.69	51.25	376.0131	-8.43	84.55	5.0
14	戊唑醇	308.1514	-3.3	39.85	308.1514	-3.3	95.12	308.1517	-2.33	100	1.0
15	四氟醚唑	372.0356	18.26	31.51	372.0301	3.48	99.34	372.0287	-0.29	100	1.0
16	戊菌唑	284.0711	-1.69	63.6	284.0706	-3.45	100	284.0709	-2.39	100	1.0
17	己唑醇	314.0788	-10.65	21.81	314.0808	-4.28	27.46	314.0817	-1.41	27.59	2.0
18	氟硅唑	316.1003	-23.12	44.32	316.1002	-23.43	63.4	316.1005	-22.48	65.64	1.0
19	氟菌唑	346.0918	-3.04	62.18	346.0913	-4.48	86.54	346.0911	-5.06	99.59	1.0
20	叶菌唑	320.1518	-1.93	94.91	320.1510	-4.42	98.71	320.1510	-4.42	100	1.0
21	腈苯唑	337.1196	-5.49	73.78	337.1193	-6.38	88.94	337.1197	-5.19	99.75	1.0
22	丙环唑	342.0737	-9.82	80.72	342.0752	-5.43	95.03	342.0747	-6.9	100	10.0
23	烯唑醇	326.0771	-15.47	19.99	326.0798	-7.19	73.47	326.0804	-5.35	87.55	1.0
24	种菌唑	334.1665	-4.69	80.51	334.1665	-4.69	91.66	334.1669	-3.49	93.69	1.0
25	苯醚甲环唑	406.0711	-2.15	88.99	406.0713	-1.66	100	406.0713	-1.66	100	5.0
		406.0727	1.79	77.12	406.0713	-1.66	94.31	406.0716	-0.92	100	5.0
26	亚胺唑	411.0072	17.7	16.23	411.0031	7.72	27.03	411.0022	5.53	49.6	10.0
27	乙螨唑	360.1761	-2.39	82.44	360.1756	-3.78	94.55	360.1755	-4.06	82.95	0.5

结论

使用 LCMS-IT-TOF 对 27 种唑类农残进行多级质谱分析, 获得其正离子模式下多级质谱数据, 分析总结唑类农药的裂解规律。进行线性范围及灵敏度实验, 27 种唑类农药线性关系良好。对大蒜基质中添加的不同水平唑类农药进行筛查, 除氟环唑外均在 10 $\mu\text{g/L}$ 的添加水平下被检出。使用 LCMS-IT-TOF 系统的对唑类农药进行研究, 可将其应用于唑类农药的快速检测。