DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250319005
引用格式: 汪春明, 王美玲, 霍思宇, 等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法检测牛奶及奶粉中 3 种新型杀菌剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(2): 177–186.
WANG CM, WANG ML, HUO SY, *et al*. Determination of 3 kinds of new fungicides in milk and formula by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(2): 177–186. (in Chinese with English abstract).

QuEChERS-液相色谱-串联质谱法检测牛奶及奶粉中 3 种新型杀菌剂

汪春明[1], 王美玲[1,2,3], 霍思宇[1*], 李瑶菲[1], 彭 涛[1], 陈冬东[1*]

[1. 中国质量检验检测科学研究院, 北京 100176; 2. 中检科(北京)测试认证有限公司, 北京 100076; 3. 检科院(北京)科学技术有限公司, 北京 100176]

摘 要: 目的 建立液相色谱-串联质谱法测定牛奶及奶粉中氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的方法。**方法** 样品经乙腈超声涡旋提取, 分析液经 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 除脂专用管净化, 离心后过膜上机检测。测试方法以乙腈-体积分数 0.1%甲酸水为流动相, 流速设置为 0.3 mL/min, 应用梯度洗脱程序, 采用 Shim-pack GIST-HP C_{18}-AQ 色谱柱进行分离, 电喷雾正离子模式, 多反应离子监测模式检测, 基质匹配外标法进行定量。**结果** 对于牛奶及奶粉基质, 氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺在 0.5~20.0 ng/mL 的质量浓度与其相对应的峰面积之间线性关系良好, R^2 均大于等于 0.9993, 在 0.005、0.010 和 0.050 mg/kg 3 种不同浓度添加水平下, 氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的平均回收率为 86.3%~105.9%, 相对标准偏差为 3.96%~9.18%。**结论** 本方法可满足牛奶及奶粉中氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺检测的正确度、精密度和灵敏度的要求。

关键词: 氟茚唑菌胺; 氟噻唑菌腈; 吡啶菌胺; 牛奶及奶粉; 液相色谱-串联质谱法

Determination of 3 kinds of new fungicides in milk and formula by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Chun-Ming[1], WANG Mei-Ling[1,2,3], HUO SI-YU[1*], LI Yao-Fei[1], PENG Tao[1], CHEN Dong-Dong[1*]

[1. *Chinese Academy of Quality and Inspection & Testing*, *Beijing* 100176, *China*; 2. *CAIQ* (*Beijing*) *Testing and Certification Co. Ltd.*, *Beijing* 100076, *China*; 3. *CAIQ* (*Beijing*) *Science and Technology Co. Ltd.*, *Beijing* 100176, *China*]

ABSTRACT: Objective To develop a method for determination of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid in the milk and formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by ultrasonic vortexing with acetonitrile. The analysis solution was purified by QuEChERS dSPE EMR-Lipid lipid

收稿日期: 2025-03-19
基金项目: 中国质量检验检测科学研究院基本科研业务费项目(2024JK043); 国家重点研发计划项目(2022YFF1100804); 国家市场监督管理总局技术创新中心项目(分析仪器与装备测试评价)
第一作者: 汪春明(1986—), 男, 硕士, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 598898364@qq.com
***通信作者:** 霍思宇(1994—), 男, 主要研究方向为食品安全。E-mail: huosy@acas.com.cn
陈冬东(1975—), 女, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: chendd@acas.com.cn

removal tubes, and then centrifuged and filtered before being analyzed. The test method used acetonitrile and 0.1% formic acid water as the mobile phase, with a flow rate of 0.3 mL/min. A gradient elution program was applied, and the separation was carried out on a Shim-pack GIST-HP C18-AQ chromatographic column. The detection was performed in positive ion mode with electrospray ionization and multiple reaction monitoring mode. Quantification was conducted using the matrix-matched external standard method. **Results** For milk and milk powder matrices, there was a good linear relationship between the mass concentrations of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid ranging from 0.5 to 20.0 ng/mL and their corresponding peak areas, with R^2 values all greater than or equal to 0.9993. At 3 kinds of different spiked levels of 0.005, 0.010 and 0.050 mg/kg, the average recoveries of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid were 86.3% to 105.9%, and the relative standard deviations were 3.96% to 9.18%. **Conclusion** This method can meet the requirements of accuracy, precision and sensitivity for the detection of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid in milk and milk powder.

KEY WORDS: fluindapyr; flutianil; fenpicoxamid; milk and formula; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引 言

自 20 世纪 50 年代起, 由病原微生物引发的植物病害问题日益突出。相关数据显示, 这类病害导致的粮食减产约占全球总损失的 30%[1]。为应对这一挑战, 农业生产中普遍采用杀菌剂进行病害防控。氟茚唑菌胺是琥珀酸脱氢酶抑制剂(succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI)类杀菌剂中的新优品种(图 1), 通过干扰病原菌细胞线粒体的呼吸作用, 有效地抑制病原菌的繁殖, 致其死亡[2], 其杀菌作用具有广谱性。适用于如谷物、玉米、蔬菜、水稻、果树等, 可以用于防治由链格孢属、壳针孢属等病原菌引起的病害[3]。氟噻唑菌腈是基于现有同类药物的一项突破, 对白粉病有靶向作用, 与现有防治药剂不同, 其对侵染前期的白粉菌无影响, 但可在侵染后期抑制病原菌扩展[4–6]。吡啶菌胺为线粒体呼吸链复合体III抑制剂型杀菌剂, 导致生物体不能正常合成三磷酸腺苷, 进而衰竭死亡, 可做到对谷物有重要威胁的病害均有效, 且持效期长[7–8]。虽然市面杀菌剂安全性过关, 但因其使用广泛, 杀菌剂及其代谢物残留在谷物及饲料中, 在被动物食用后可能会通过代谢积累在肌肉组织中, 继而存在于动物源性食品中[9]。其中牛奶及奶粉作为大众特别是婴幼儿最常饮用的高蛋白产品, 其质量安全直接关系到每一个人的身体健康与生活品质。值得注意的是, 牛奶中的药物残留风险与使用剂量呈正相关, 更易出现残留超标现象。在牛奶中的最大残留限量美国规定氟茚唑菌胺为 0.01 mg/kg, 欧盟规定氟噻唑菌腈为 0.01 mg/kg, 吡啶菌胺为 0.015 mg/kg。

目前检测氟茚唑菌胺的方法有高效液相色谱法[10], 检测氟噻唑菌腈的方法有气相色谱-串联质谱法[11], 且这些方法只针对于粮谷和果蔬基质。氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺灭菌剂均未收录在 GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》, 缺少相关国家检测标准。因此, 开发灵敏、高效的氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺残留分析方法, 用以检测牛奶及奶粉中这些化合物的实际残留水平, 不仅能够有效监控环境中的灭菌剂残留, 指导合理用药, 而且可以进一步保障动物源性食品的质量安全。

本研究旨在开发一种高效快捷的检测方法, 以精准测定牛奶及奶粉中氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的残留水平。为此, 本研究整合了快速样品前处理技术 QuEChERS, 并采用聚合物基质的净化材料 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 进行样品净化, 同时结合液相色谱-串联四极杆质谱法(liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry, LC-MS/MS)进行精确定量分析, 建立氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的分析测试方法, 本研究旨在为完善生乳质量安全标准体系, 建立有效监控机制提供理论支撑和实践指导。

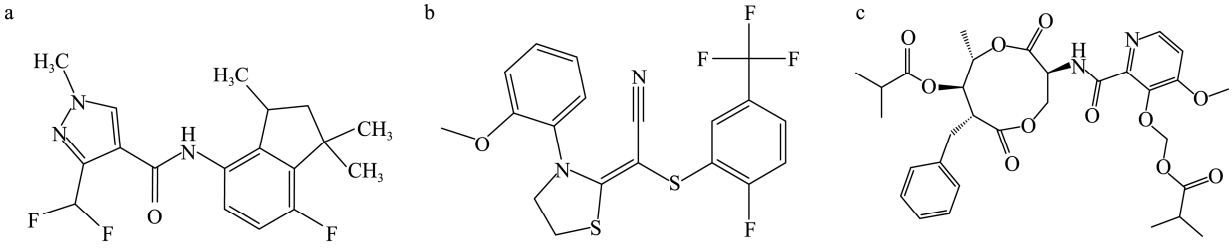


图 1 氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的化学结构式

Fig.1 Chemical structural formula of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid

1　材料与方法

1.1　仪器、试剂与材料

LC-40AD-LCMS-8050 三重四极杆液相色谱质谱联用仪、GL Sciences InertSustain C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3 μm) & (150 mm×2.1 mm, 3 μm)、Shim-pack GIST-HP C_{18}-AQ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.9 μm)(日本 Shimadzu 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司); EclipsePlus C_{18} 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(美国 Agilent 公司); STV-100 多管涡旋混合仪(中国茂丰公司); VORTEX GENIE 2 可调速涡旋混匀器(美国 Scientific Industries 公司); LG-25M 离心机(中国蜀科公司); EFAA-DC24-RT 氮吹仪(中国安谱公司); XS105 分析天平(精度 0.1 mg)、PL303 分析天平(精度 0.001 g)(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); 默克 Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈、吡啶菌胺标准品(质量浓度 100 μg/mL, 天津阿尔塔科技有限公司); 甲酸、乙酸铵、乙腈、丙酮、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 0.22 μm 尼龙滤膜、POLY-SERY HLB (500 mg, 6 mL, 上海安谱公司); 氨水、氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 十八烷基硅烷键合硅胶(C_{18})、QuEChERS dSPE EMR-Lipid、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)(美国 Agilent 科技有限公司); HMR-Lipid(北京纳鸥公司); 中性氧化铝(alumina N-neutral, AL-N)(天津 Bonna-Agela 公司); 0.22 μm 聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)滤膜、0.22 μm 聚醚砜(polyether sulfone, PES)滤膜、混合纤维素酯(mixed cellulose ester, MCE)滤膜(深圳逗点生物技术有限公司); 0.2 μm 亲水性聚丙烯滤膜(美国 Waters 公司)。

牛奶与奶粉供试样品(中国质检院测试评价中心提供)。

1.2　实验方法

1.2.1　混合标准中间液制备

取氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈及吡啶菌胺标准品溶液各 0.1 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 以乙腈为溶剂定容至刻度, 配制成质量浓度为 1.0 μg/mL 的混合标准中间液。

分别移取 1.0 μg/mL 混合标准中间液 5、10、20、50、100、200 μL, 置于 6 个 10 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至刻度, 得到相应浓度的中间工作溶液。

取 6 份 1 mL 空白基质溶液, 经氮气吹干后, 分别加入 1 mL 上述中间工作溶液复溶, 最终获得 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL 的系列基质匹配标准工作溶液。

1.2.2　样品前处理

(1)提取步骤

准确称取 2.0 g 样品, 置于 50 mL 带盖离心管中, 加入 4 mL 超纯水(一级水), 充分混匀后静置 30 min。随后加入 10 mL 乙腈, 先进行超声提取 10 min, 再以 2500 r/min 的转速涡旋振荡 10 min。提取完成后, 在–10 ℃条件下以 20000 r/min 高速离心 3 min, 取上清液用于后续净化处理。

(2)净化步骤

移取 5 mL 上述提取液, 加入装有 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 吸附剂的 15 mL 净化管中, 涡旋混合 10 min 以确保充分净化。随后以 11000 r/min 离心 5 min, 将所得净化液转移至另一支含有 1 g 氯化钠的 15 mL 离心管中, 涡旋混匀 1 min, 再次以 11000 r/min 离心 5 min。最后, 准确移取 1 mL 净化后的上清液, 经 0.22 μm PTFE 滤膜过滤后装入样品瓶, 供 LC-MS/MS 分析使用。

1.2.3　液相色谱-串联质谱条件

(1)液相色谱条件

采用 Shim-pack GIST-HP C_{18}-AQ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.9 μm)进行分离; 柱温箱温度为 40 ℃; 进样量为 5.0 μL。流动相由 A 相(乙腈)和 B 相(含 0.1%甲酸的水溶液, 体积分数)组成, 流速恒定为 0.3 mL/min; 梯度洗脱为 0~0.10 min, 45% B 相; 0.10~2.00 min, 45%~5% B 相; 2.00~4.00 min, 5% B 相; 4.00~4.50min, 5%~45% B 相; 4.50~6.00 min, 45% B 相; 6.50 min 控制器停止。

(2)质谱条件

离子源模式: 电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI); 扫描模式: 多反应监测(multi-reaction monitoring, MRM); 接口参数: 接口温度: 300 ℃、加热气流量(F): 10 L/min; 雾化系统: 雾化器流量(N): 3 L/min、干燥气流量: 10 L/min; 加热模块: 脱溶剂温度: 250 ℃、加热块温度: 300 ℃; 其他参数详见表 1。

表 1　定量定性离子对、保留时间、驻留时间及碰撞能量
Table 1　Quantitative and qualitative ion pairs, retention time, residence times and collision energy

名称	母离子 (*m*/*z*)	子离子 (*m*/*z*)	Q1Pre 偏差/V	碰撞能量/eV	Q3Pre 偏差/V
氟茚唑菌胺	352.15	312.2*	–12	–18	–22
		276.2	–12	–21	–18
氟噻唑菌腈	427.05	192*	–15	–25	–19
		132	–15	–50	–23
吡啶菌胺	615.20	239.1*	–22	–30	–16
		515.2	–22	–17	–38

注: *为定量离子。

1.3　数据处理

数据经 Excel 2016 (Microsoft Corporation)进行标准化处理, 并转化为可视化分析图表。

2　结果与分析

2.1　仪器条件的优化

2.1.1　质谱条件的优化

首先精确配制质量浓度为 1.0 μg/mL 的氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺标准溶液, 并分别在 ESI 正离子模式和负离子模式下对目标化合物进行全扫描。结果表明, 3 种目标物在正离子模式下响应更强, 均以质子化分子离子 $[M+H]^+$形式被有效检测, 其对应的母离子质荷比(*m*/*z*)分

别为 352.15(氟茚唑菌胺)、427.05(氟噻唑菌腈)和 615.20(吡啶菌胺), 所得质谱图见图 2。随后, 以前述母离子(*m/z* 352.15、427.05 和 615.20)为前体离子, 在碰撞能量设为–35 eV 的条件下进行产物离子扫描。在此基础上, 进一步对碰撞能量、Q1 与 Q3 的质量偏移(Pre 偏差)等关键参数进行系统优化。依据国际食品法典委员会(CAC/GL 90-2017)[12]对质谱确证方法的要求, 化合物鉴定需满足“四点鉴定法”, 即至少包含一个母离子和两个子离子, 总计不少于 4 个识别点。本研究从中筛选出离子丰度最高且受基质干扰最小的两对子离子, 作为各目标物的特征离子对; 其中, 信号强度更高的离子对被指定为定量离子。氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的最终优化参数, 包括特征离子对、保留时间、Q1/Q3 Pre 偏差及碰撞能量等, 详见表 1。

2.1.2 色谱柱条件的优化

在现代液相色谱分析体系中, 色谱柱的选择是决定分离效能的关键因素之一。鉴于市售色谱柱类型繁多且极性梯度分布广泛, 为系统评估不同极性色谱柱对氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的色谱行为影响, 并结合目标物官能团特性, 本研究选取了 5 类代表性色谱柱进行对比实验, 具体包括: 柱 1: GL Sciences InertSustain C_{18} (100 mm×2.1 mm, 3 μm); 柱 2: GL Sciences InertSustain C_{18} (150 mm×2.1 mm, 3 μm); 柱 3: Shim-pack GIST-HP C_{18}-AQ (150 mm×2.1 mm, 1.9 μm); 柱 4: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 柱 5: EclipsePlus C_{18} (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 上述色谱柱

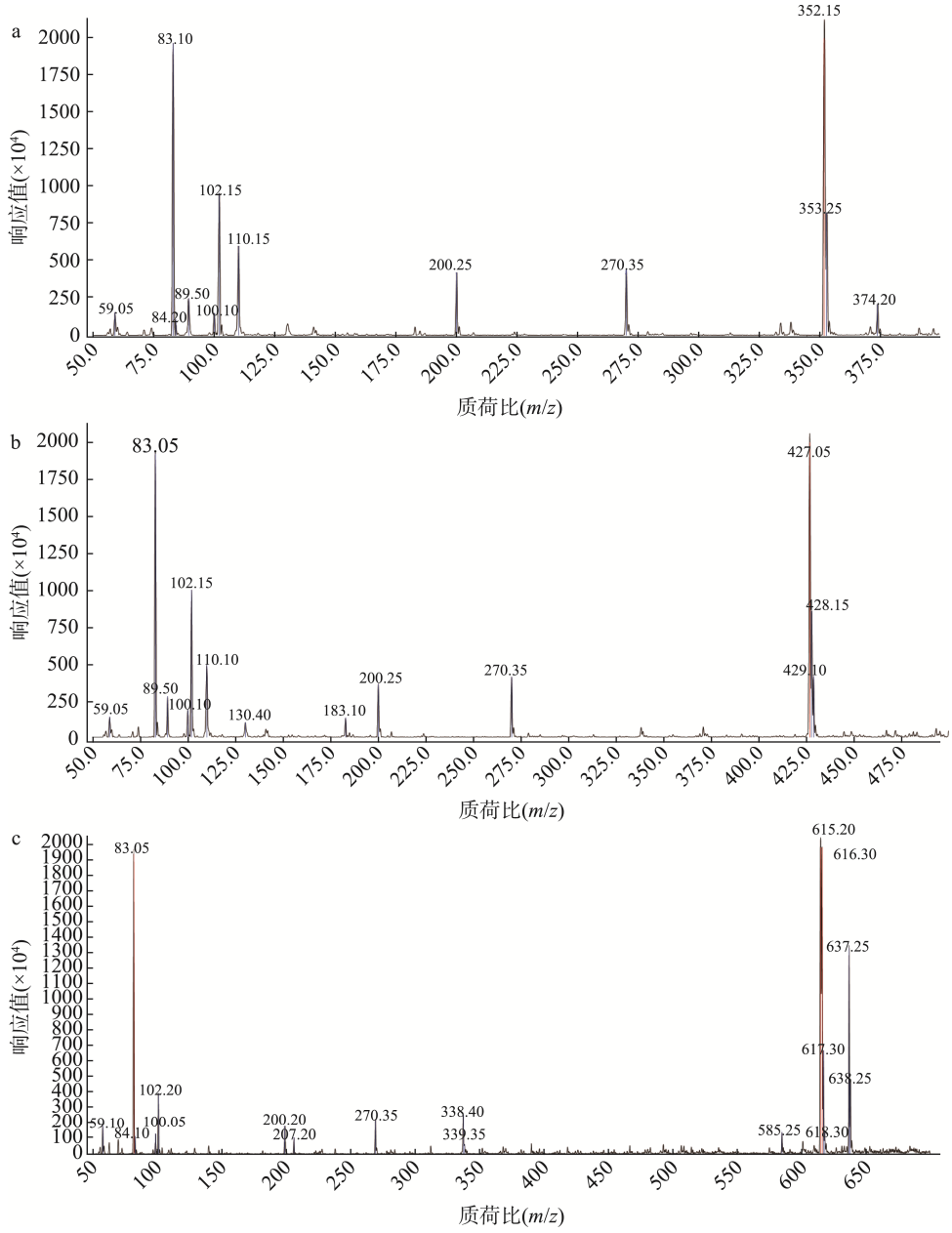


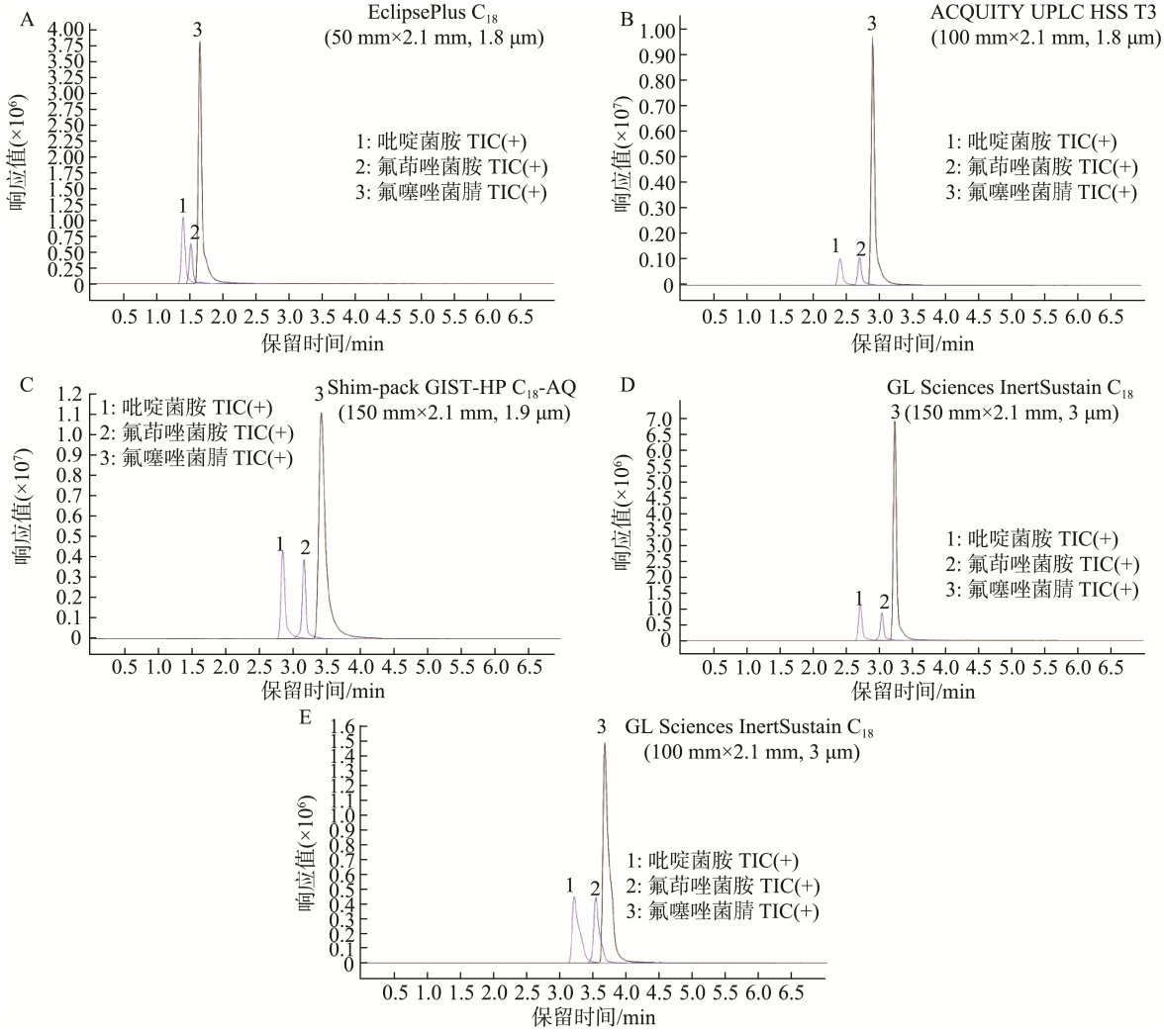
图 2 氟茚唑菌胺(a)、氟噻唑菌腈(b)和吡啶菌胺(c)的全扫描质谱图

Fig.2 Full scan mass spectra of fluindapyr (a), flutianil (b) and fenpicoxamid (c)

覆盖了从非极性到中等极性的典型色谱柱类型(相关响应谱图见图 3)。实验结果表明, 目标化合物在所选色谱柱上均呈现可检测响应。进一步分析发现, 色谱柱长度显著影响分离效果。例如, 使用较短的柱 5 时, 目标峰保留时间提前, 且峰形重叠较为严重, 分离度不足。值得注意的是, 即使填料粒径相同(如柱 1 与柱 2), 柱长增加也未必带来更好的分离效果——柱 2 的分离性能反而不如柱 1, 推测可能与其使用时间较长或操作不当导致柱效下降有关。此外, 尽管柱 1 与柱 3 均采用十八烷基(C_{18})官能团, 但柱 3 表现出更优的响应信号。这归因于其采用了键距优化技术: 通过精确控制硅胶表面C_{18}长链之间的间距, 增强了固定相与高水含量流动相的相容性, 从而提升对极性化合物的保留能力; 同时, 其更小的填料粒径(1.9 μm)进一步提高了柱效和灵敏度, 使其整体色谱响应优于柱 1 和柱 4。综合考虑分离度、峰形、保留行为及响应强度, 本研究最终选定 Shim-pack GIST-HP C_{18}-AQ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.9 μm)作为后续分析的首选色谱柱。

2.1.3　流动相条件的优化

在 ESI 质谱分析过程中, 流动相组成对目标化合物的离子化效率具有显著影响。研究表明, 在流动相中添加适量酸性添加剂(如甲酸、乙酸)可促进目标化合物形成$[M+H]^+$离子, 而引入碱性添加剂(如甲酸铵、乙酸铵或氨水)能有效抑制$[M+Na]^+$、$[M+K]^+$等加合离子形成, 同时促进$[M-H]^-$离子生成, 从而显著提升目标离子的检测灵敏度。本研究系统考察了不同流动相体系对氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的色谱与质谱响应的影响。有机相(A 相)分别选用乙腈和甲醇; 水相(B 相)则包括以下 3 种组合: 超纯水(一级水)、甲酸-乙酸铵-水溶液, 以及 0.1%甲酸-水溶液。通过对比不同 A/B 相组合的色谱表现发现: 当 A 相为乙腈、B 相为含 0.1%甲酸的一级水时, 目标化合物展现出最高的离子化效率, 色谱峰形尖锐对称, 分离度良好, 整体分析性能最优(部分对比色谱图见图 4)。因此, 本研究最终确定以乙腈和 0.1%甲酸水溶液(一级水配制)作为流动相体系用于后续定量分析。



注: 总离子流图(total ion current diagram, TIC)。

图 3　氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺在不同色谱柱上的响应值

Fig.3　Response values of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid on different chromatographic columns

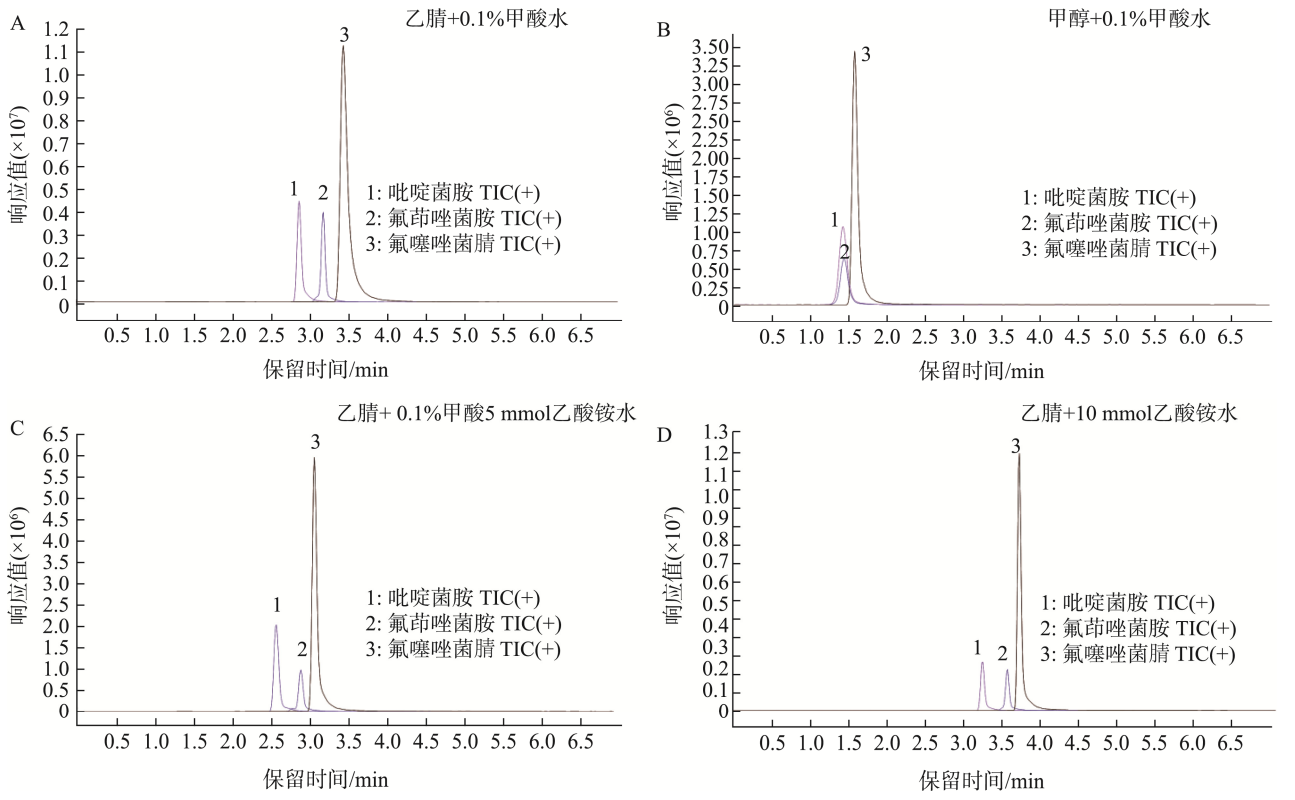


图 4 不同流动相对氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺分离效果的影响

Fig.4 Effects of different mobile phases on the separation effect of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid

2.2 前处理条件优化

2.2.1 净化填料的优化

近年来, 分析检测领域呈现出显著的技术革新趋势, 其核心发展方向聚焦于提升检测效率与缩短分析周期。在这一背景下, QuEChERS 前处理技术凭借其突出的操作简便性、经济性、高效性及环境友好性, 已在药物残留检测[13−18]、食品添加剂分析[19]以及生物毒素筛查[20−25]等多个领域获得广泛应用。该技术体系的核心净化机制基于 3 类功能化填料: PSA: 通过离子交换作用有效去除基质中的有机酸、金属离子及糖类、酚类等极性杂质; 十八烷基键合硅胶(C_{18}): 利用反相吸附机理选择性去除脂类等非极性干扰物; 石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB): 通过平面 π-π 相互作用特异性吸附色素、甾醇类等平面结构物质[26]。针对本研究富含脂质的复杂基质特性, 优先选择 C_{18} 填料作为基础净化组分。基于前期固相萃取柱筛选研究, 发现 AL-N 展现出卓越的脂质去除效能, 故将其纳入本次考察的净化体系。此外, 为评估新型脂质净化材料的适用性, 本研究同步引入了 3 种具有代表性的功能化材料: QuEChERS dSPE EMR-Lipid: 脂质亲和型吸附材料; HMR-Lipid: 具有亲脂性官能团的复合吸附剂; POLY-SERY HLB: 兼具亲水-亲脂平衡特性的混合型填料。这些新型材料在保持目标物回收率的同时, 可实现对脂质类干扰物的高效选择性去除。

本研究设计了 5 种差异化净化方案, 具体填料组合及处理方式如下: T1: 1000 mg C_{18}; T2: 500 mg POLY-SERY HLB; T3: 1000 mg AL-N; T4: 1000 mg QuEChERS dSPE EMR-Lipid; T5: 1000 mg HMR-Lipid。各样品均按照 1.2.2 节所述前处理流程进行提取, 并分别采用上述 5 种净化材料进行净化, 随后依据 1.2.3 节的仪器条件进行 LC-MS/MS 分析, 回收率计算结果如图 5 所示。结果显示, 经 C_{18} 净化后, 氟茚唑菌胺的回收率高达 154%, 推测其原因在于 C_{18} 对基质中干扰杂质(尤其是脂类)具有较强去除能力, 从而显著提升了目标物的色谱响应信号。相比之下, HMR-Lipid 净化效果较差, 氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的回收率分别仅为 65%、29%和 26%, 可能由于该材料未能有效清除基质干扰, 或其净化后提取液的溶剂组成与初始流动相存在较大差异, 导致目标物离子化效率下降、响应降低。而使用 QuEChERS dSPE EMR-Lipid、AL-N 和 POLY-SERY HLB 净化时, 3 类目标物的回收率分别稳定在 92%~104%、89%~103%和 80%~95%, 表现出良好的准确度与重现性。综合考虑回收率、净化效能及对目标分析物的保留能力, 本研究最终选定 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 作为最优净化材料用于后续分析。

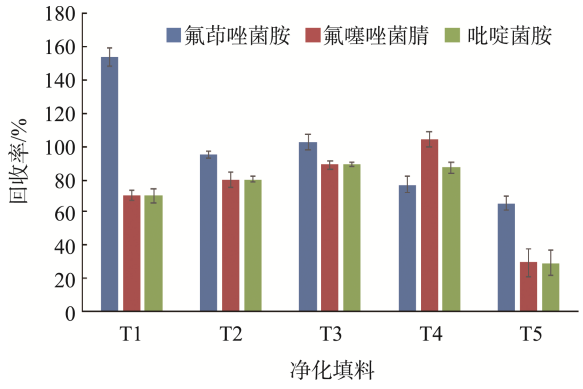


图 5　不同净化材料对氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺回收率的影响(n=3，质量浓度 0.02 mg/kg)

Fig.5　Effects of different purification materials on the recovery rates of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid (n=3, mass concentration 0.02 mg/kg)

2.2.2　滤膜的筛选

在样品前处理过程中，滤膜的选择对实验结果准确性具有决定性影响。滤膜筛选需重点考量其与待测样液的化学兼容性，具体各类型滤膜特性如下。MCE 微孔滤膜由硝酸纤维素酯与醋酸纤维素酯共聚而成，通过物理截留作用可有效去除流体中的微生物及微粒杂质，实现样品净化。尼龙膜(nylon membrane, NYLON)兼具亲水性与有机溶剂耐受性，适用于水相及有机溶液过滤。PTFE 具有极强化学惰性，可耐受强酸强碱及有机溶剂。聚丙烯膜(general hydrophilic polypropylene, GHP)专为水性及腐蚀性有机溶液设计，其低蛋白结合特性可确保蛋白类样品的高回收率。PES 凭借低蛋白吸附特性，特别适用于蛋白溶液过滤，同时兼容温和有机溶剂体系。为评估不同滤膜对目标物回收率的影响，实验设计如下：取 1 mL 20 ng/mL 溶剂标准溶液，分别经 MCE、NYLON、GHP、PES 及 PTFE 滤膜过滤后上机检测，回收率结果见图 6。结果显示，使用 MCE、GHP 和 PES 滤膜时，吡啶菌胺的回收率分别为 77%、69%和 79%。

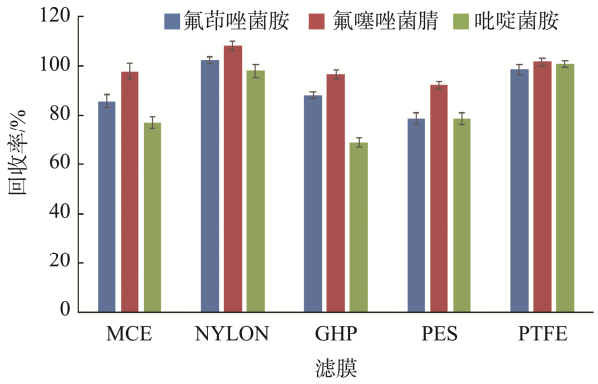


图 6　不同滤膜对氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的过滤效果(n=3，质量浓度 20 ng/mL)

Fig.6　Filtration effects of different membranes on fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid (n=3, mass concentration 20 ng/mL)

分析认为: MCE 和 PES 可能因部分溶解于标准溶液所用溶剂中，引入额外基质成分，增强基质效应，从而抑制目标物的离子化效率，导致响应降低；而 GHP 对吡啶菌胺可能存在非特异性吸附，是其回收率偏低的主要原因。相比之下，PTFE 和 NYLON 滤膜所得回收率均符合方法学验证要求，表现出良好的兼容性与惰性。综合考虑本研究中样品基质的复杂性、提取溶剂的组成(含乙腈等有机成分)以及滤膜的化学稳定性，最终选定 PTFE 滤膜作为样液过滤的首选材料。

2.2.3　提取溶剂的选择

在目标物检测过程中，常用的萃取溶剂包括乙腈、正己烷、酸化乙腈、乙酸乙酯、甲醇、丙酮及其不同比例混合体系。基于前期研究经验，对含油量高的样本而言，正己烷和乙酸乙酯会导致提取液油脂含量显著升高，这不仅增加后续净化难度，而且与 EMR-Lipid 净化材料(适用于水溶性提取体系)的兼容性不佳，因此在本研究中予以排除。基于前期研究基础，本研究进一步对比了以下 4 种提取溶剂对目标物的萃取效率：0.1%(体积分数)乙酸-乙腈、纯乙腈、0.1%(体积分数)氨水-乙腈和丙酮。所有样品均按照 1.2.2 节所述前处理流程进行提取、净化及仪器分析，并计算各目标物的回收率，结果如图 7 所示。结果显示，使用丙酮作为提取溶剂时，目标物回收率普遍低于 78%，这可能归因于丙酮对基质中共提物(如色素、脂质等)的高溶解能力，导致提取液成分复杂、净化难度加大，从而影响目标物的准确测定；相比之下，采用 0.1%乙酸-乙腈、纯乙腈和 0.1%氨水-乙腈时，目标物的回收率分别达到 75%~96%、92%~105%和 107%~122%。其中，氨水改性乙腈虽回收率略高，但存在部分目标物响应偏高、可能引入基质增强效应的风险；而乙酸改性体系回收率范围稍宽，稳定性略逊。综合考虑提取效率、回收率、稳定性与后续 EMR-Lipid 净化步骤的兼容性以及方法的稳健性，本研究最终选定纯乙腈作为最优提取溶剂。

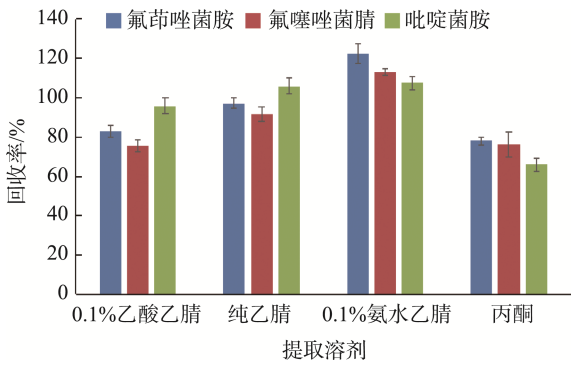


图 7　不同提取溶剂对氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的提取效率

Fig.7　Filtration effects of different extraction solvents on fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid in different

2.3 基质效应、标准曲线、检出限和定量限

基质效应是指样品基质中的共洗脱组分干扰目标分析物在质谱中的电离过程, 从而引起检测信号的增强或抑制。其主要成因在于提取物中残留的内源性物质(如脂类、色素、有机酸等)与目标物在色谱分离过程中未能完全分离, 进而在离子源中竞争电离, 影响质谱响应的准确性[27–28]。这种效应在复杂基质(如食品、生物样品)中尤为显著, 可能造成定量结果严重偏离真实值, 甚至导致假阳性或假阴性判断[29–30]。值得注意的是, 即使不存在明显的共洗脱峰, 流动相中痕量杂质也可能对分析物的峰形和响应产生不可忽视的影响。尽管基质效应无法完全消除, 但可通过采用基质匹配校准等策略有效降低其影响[31]。用 η 表示基质效应系数: η=(基质匹配标准曲线的斜率-溶剂标准曲线的斜率)/溶剂标准曲线的斜率×100%。当$|\eta|$<10%, 表明基质效应不显著; 反之则存在明显的基质增强或减弱效应[32]。实验中, 按照 1.2.2 节方法处理空白样品(信噪比 S/N<3), 获得空白基质提取液, 并依据 1.2.1 节分别配制相同浓度的溶剂标准溶液与基质匹配标准溶液。由表 2 可知, 氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺均表现出明显的基质抑制效应, 且三者之间的抑制程度相近。鉴于此, 本研究采用基质匹配校准曲线进行定量分析, 以有效校正基质带来的系统偏差。

方法的检出限定义为在空白样品中添加目标物后, 其色谱响应信噪比(S/N)≥3 所对应的浓度; 定量限则对应 S/N≥10 的添加浓度。以目标物质量浓度(X, ng/mL)为横坐标, 对应峰面积(Y)为纵坐标, 建立校准曲线。结果表明, 在 0.5~20.0 ng/mL 质量浓度范围内, 3 种目标物均呈现良好的线性关系, 相关系数(r^2)均大于等于 0.9993, 符合 GB 5009.295—2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》对方法验证的技术要求。最终确定本方法的检出限为 0.002 mg/kg, 定量限为 0.005 mg/kg。

2.4 回收率及精密度实验

依据 1.2.2 节的前处理流程和 1.2.3 节的仪器分析条件, 对奶粉和牛奶样品进行检测。选取信噪比(S/N)<3 且经确认不含目标物的样品作为空白基质。在此基础上, 设置 3 个加标浓度水平: 0.005、0.010 和 0.050 mg/kg, 开展加标回收实验。具体操作如下: 向各空白样品中准确加入相应浓度的目标物标准溶液, 充分混匀后静置 30 min, 以确保目标物被基质充分吸附或分散。随后, 所有加标样品均严格按照 1.2.2 和 1.2.3 节所述方法进行提取、净化及仪器分析。每个加标水平均独立重复测定 6 次, 以评估方法的准确度与精密度。GB 5009.295—2023 规定质量分数(ρ)为 1 μg/kg<ρ≤10 μg/kg, 回收率为 60%~120%, 重复性相对标准偏差≤20%; 质量分数为 10 μg/kg<ρ≤100 μg/kg, 回收率为 70%~120%, 重复性相对标准偏差≤15%, 由表 3 可知: 目标物的平均回收率为 86.3%~105.9%, 相对标准偏差为 3.96%~9.18%, 符合方法验证学的要求。

2.5 质控及实际样品测定

为验证本研究方法的准确性与可靠性, 采用该方法对奶粉中氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的质控样品进行测定。所用质控样品均具有经认证的特性值及其扩展不确定度, 其标称含量分别为: 氟茚唑菌胺(0.126±0.011) mg/kg、氟噻唑菌腈(0.113±0.012) mg/kg、吡啶菌胺(0.118±0.009) mg/kg。质控样品平行测定 6 次, 取平均值得: 氟茚唑菌胺 0.113 mg/kg、氟噻唑菌腈 0.118 mg/kg、吡啶菌胺 0.109 mg/kg, 采用稳健统计方法计算的 z 值分别为氟茚唑菌胺-0.85、氟噻唑菌腈 0.14、吡啶菌胺-0.43。所得$|z|$<2, 说明检测结果为满意, 证明本方法能够准确检测奶粉中的氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺。本研究应用所建立的方法对市售的 15 个品牌、共计 32 批次奶粉样品进行了氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺残留的检测。结果表明, 所有样品中均未检出上述 3 种目标化合物。鉴于乳制品在膳食结构中的重要地位及其潜在的农药残留风险, 为切实保障消费者健康与乳品质量安全, 建议持续开展对牛奶及奶粉中氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺等农药残留的监测工作。

表 2 氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的线性方程、相关系数、基质效应、检出限和定量限

Table 2 Calibration curves, correlation coefficients, matrix effects, limit of detection and limit of quantitation of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid

基质	目标物	线性方程	r^2	基质效应/%	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
奶粉	氟茚唑菌胺	Y=143880X–9776	0.9997	65.6	0.002	0.005
	氟噻唑菌腈	Y=152650X–748	0.9996	69.3	0.002	0.005
	吡啶菌胺	Y=871437X–52686	0.9998	69.8	0.002	0.005
牛奶	氟茚唑菌胺	Y=150399X–882	0.9994	64.1	0.002	0.005
	氟噻唑菌腈	Y=147722X–637	0.9993	70..2	0.002	0.005
	吡啶菌胺	Y=888816X–926	0.9997	69.2	0.002	0.005

表 3　氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺的平均回收率和相对标准偏差(*n*=6)

Table 3　Recoveries and relative standard deviations of fluindapyr, flutianil and fenpicoxamid (*n*=6)

基质	目标物	0.005 mg/kg		0.010 mg/kg		0.050 mg/kg	
		平均回收率/%	相对标准偏差/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
奶粉	氟茚唑菌胺	86.3	9.18	104.8	8.64	97.6	7.34
	氟噻唑菌腈	95.2	7.38	103.7	7.61	105.9	6.35
	吡啶菌胺	89.1	6.67	99.1	6.32	93.4	4.37
牛奶	氟茚唑菌胺	92.3	4.49	92.7	4.47	96.7	5.26
	氟噻唑菌腈	102.1	5.27	93.2	5.35	102.1	4.32
	吡啶菌胺	94.7	7.94	91.7	5.72	103.4	3.96

3　结　论

本研究建立了一种基于 QuEChERS 结合 LC-MS/MS 的分析方法, 用于同时测定牛奶和奶粉中 3 种新型杀菌剂(氟茚唑菌胺、氟噻唑菌腈和吡啶菌胺)的残留量。通过对 QuEChERS 前处理流程及 LC-MS/MS 仪器参数的系统优化, 实现了对目标化合物的良好分离与准确定量。该方法在选定的浓度范围内展现出良好的线性关系, 具有较高的灵敏度和精密度, 能够满足牛奶及奶粉基质中痕量杀菌剂的分析要求。为乳制品质量安全监控提供了可靠的技术手段, 有助于保障消费者食用乳制品的安全, 也为相关监管部门制定更完善的食品安全标准和监管措施提供了有力的数据支持, 对促进乳制品行业的健康发展具有重要意义。

参考文献

[1] FAO of the UN. The state of food and agriculture 2021: Making agrifood systems more resilient to shocks and stresses [Z]. FAO of the UN, 2021.

[2] 顾林玲. 新近登记、上市的 16 种农药品种[J]. 世界农药, 2022, 44(3): 9–20, 46.
GU LL. The new pesticides registered or launched recently [J]. World Pesticide, 2022, 44(3): 9–20, 46.

[3] PHILLIPS MCDOUGALL. AgriService products section-2018 market [R]. Phillips McDougall, 2019.

[4] Flutianil 对白粉病的生物学特性[J]. 世界农药, 2021, 43(1): 38.
Biological characteristics of Flutianil in powdery mildew [J]. World Pesticide, 2021, 43(1): 38.

[5] Nichino America 推出全新作用机理杀菌剂 Gatten 防治葡萄白粉病[J]. 农药, 2018, 57(4): 261.
Biological characteristics of flutianil against powdery mildew Nichino America launches a new mechanism of action fungicide gatten for controlling grape powdery mildew [J]. Agrochemicals, 2018, 57(4): 261.

[6] 张一宾. 新颖抗病激活剂类杀菌剂 flutianil[J]. 世界农药, 2017, 39(3): 63–64.
ZHANG YB. Novel anti disease activator fungicide flutianil [J]. World Pesticide, 2017, 39(3): 63–64.

[7] 金兰. 塞尔维亚批准了科迪华的杀菌剂 Fenpicoxamid[J]. 现代农药, 2022, 21(1): 60.
JIN L. Serbia has approved fenpicoxamid, a fungicide developed by Kodiva [J]. Modern Agrochemicals, 2022, 21(1): 60.

[8] 张佳琦. 可用于抗性治理杀菌剂 Fenpicoxamid[J]. 世界农药, 2018, 40(5): 63–64.
ZHANG JQ. Fenpicoxamid, a fungicide that can be used for resistance treatment [J]. World Pesticide, 2018, 40(5): 63–64.

[9] 张丽娟, 鲍晓瑾, 蓝小飞, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 测定肉类中 8 种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂[J]. 食品安全导刊, 2023(35): 55–60.
ZHANG LJ, BAO XJ, LAN XF, *et al*. Determination of 8 succinate dehydrogenase inhibitors fungicides in meats by modified QuEChERS extraction coupled with ultra performance liquid chromatographytandem mass spectrometry [J]. China Food Safety Magazine, 2023(35): 55–60.

[10] 黄伟, 何智宇, 姜宜飞, 等. 氟茚唑菌胺 • 四氟醚唑 24%悬乳剂高效液相色谱方法研究[J]. 农业与技术, 2019, 39(17): 30–32.
HUANG W, HE ZY, JIANG YF, *et al*. Study on the high performance liquid chromatography method of 24% suspension emulsion of fluindenazole and tetrafluoroether azole [J]. Agriculture and Technology, 2019, 39(17): 30–32.

[11] 张倩, 刘燕峤, 童跃聪, 等. QuEChERS 结合气相色谱-串联质谱法测定果蔬中 13 种新型酰胺类杀菌剂[J]. 中国食品工业, 2023(4): 78–83.
ZHANG Q, LIU YD, TONG YC, *et al*. QuEChERS combined with gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of 13 novel amide fungicides in fruits and vegetables [J]. China Food Industry, 2023(4): 78–83.

[12] CAC/GL 90-2017, Guidelines on perforamnce criteria for methods of analysis for the determiantion of pesticide residues in food and feed [Z]. 2018.

[13] KIM K, CHOI Y, MOK S, *et al*. Optimization of the QuEChERS method for multi-residue analysis of pharmaceuticals and pesticides in aquaculture products [J]. Food Chemistry, 2023, 399: 133958.

[14] GARCÍA-VARA M, POSTIGO C, PALMA P, *et al*. Development of QuEChERS-based multiresidue analytical methods to determine pesticides in corn, grapes and alfalfa [J]. Food Chemistry, 2022, 405: 134870.

[15] DAI J, LIN H, PAN Y, *et al*. Determination of chlorpromazine and its metabolites in animal-derived foods using QuEChERS-based extraction, EMR-Lipid cleanup, and UHPLC-Q-Orbitrap MS analysis [J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134298.

[16] SU Y, LU J, LIU J, *et al*. Optimization of a QuEChERS–LC–MS/MS method for 51 pesticide residues followed by determination of the residue levels and dietary intake risk assessment in foodstuffs [J]. Food Chemistry, 2024, 434: 137467.

[17] KOLOKA O, KOULAMA M, HELA D, *et al*. Determination of multiclass pharmaceutical residues in milk using modified QuEChERS and

liquid-chromatography-hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometry: Comparison of clean-up approaches and validation studies [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2023, 28(16): 6130.

[18] KAUFMANN A, BUTCHER P, MADEN K, *et al*. Assessment and validation of the p-QuEChERS sample preparation methodology for the analysis of> 200 veterinary drugs in various animal-based food matrices [J]. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2023, 40(3): 356–372.

[19] MAHLANGU WB, MASEKO BR, MONGADI IL, *et al*. Quantitative analysis and health risk assessment of bisphenols in selected canned foods using the modified QuEChERS method coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Packaging and Shelf Life, 2023, 37: 101078.

[20] AREO OM, ABAFE OA, GBASHI S, *et al*. Detection of multi-mycotoxins in rooibos and other consumed teas in South Africa by a modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Control, 2023, 143: 109255

[21] SADOK I, SZMAGARA A, KRZYSZCZAK A. Validated QuEChERS-based UHPLC-ESI-MS/MS method for the postharvest control of patulin (mycotoxin) contamination in red-pigmented fruits [J]. Food Chemistry, 2023, 400: 134066

[22] LONG Y, HUANG Y, ZHU M, *et al*. Development of QuEChERS clean-up based on EMR-lipid for simultaneous analysis of 9 mycotoxins, acaylamide and 5-Hydroxymethylfurfural in biscuit by UHPLC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2023, 9: 135265.

[23] XIE H, LI Y, LI J, *et al*. Mycotoxin determination in peaches and peach products with a modified QuEChERS extraction procedure coupled with UPLC-MS/MS analysis [J]. Foods, 2023, 12(17): 3216.

[24] RODRÍGUEZ-CAÑÁS I, GONZÁLEZ-JARTÍN JM, ALVARIÑO R, *et al*. Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification [J]. Food Chemistry, 2023, 408: 135182.

[25] ZHAO R, HUANG QW, YU ZY, *et al*. Simultaneous determination of 36 mycotoxins in fruits by QuEChERS coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(9): 760–770.

[26] 汪春明, 乐粉鹏, 赵鑫, 等. QuEChERS-同位素内标-高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬中灭蝇胺残留[J]. 食品科技, 2022, 47(5): 309–316.
WANG CM, YUE FP, ZHAO X, *et al*. Determination of cyromazine in the fruits and vegetables by QuEChERS-internal standard-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science and Technology, 2022, 47(5): 309–316.

[27] KIM SH, LEE YH, JEONG MJ, *et al*. LC-MS/MS method minimizing matrix effect for the analysis of bifenthrin and butachlor in Chinese chives and its application for residual study [J]. Foods, 2023, 12(8): 1683.

[28] CHOI S, SHIM WS, YOON J, *et al*. Method development and validation for the simultaneous quantitation of pentoxifylline, its pharmacologically active metabolites, and donepezil using LC-MS/MS in rat plasma: Its application to a pharmacokinetic study [J]. Separations, 2023, 10(5): 276.

[29] DAMALE RD, DUTTA A, SHAIKH N, *et al*. Multiresidue analysis of pesticides in four different pomegranate cultivars: Investigating matrix effect variability by GC-MS/MS and LC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2023, 407: 135179.

[30] TSIANTAS P, BEMPELOU E, DOULA M, *et al*. Validation and simultaneous monitoring of 311 pesticide residues in loamy sand agricultural soils by LC-MS/MS and GC-MS/MS, combined with QuEChERS-based extraction [J]. Molecules, 2023, 28(11): 4268.

[31] KANRAR B, GHOSH P, KHAN P, *et al*. Alternative strategies for the calibration and elimination of matrix effects in LC-MS/MS multiresidue analysis of tea matrix [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2022, 77(2): 224–234.

[32] ZHU YL, LIU XG, XU J, *et al*. Simultaneous determination of spirotetramat and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1299: 71–77.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)