

分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法 快速测定苹果中代森锰锌残留

陈武瑛^{1,2} 董丰收^{* 1} 刘新刚¹ 秦冬梅³
廖晓兰² 程莉¹ 王晨蕊¹ 郑永权^{* 1}

¹ (中国农业科学院植物保护研究所,农业部农药化学与应用重点开放实验室,北京 100193)

² (湖南农业大学生物安全科学技术学院,长沙 410123) ³ (农业部农药检定所,北京 100125)

摘 要 建立了苹果中代森锰锌残留的液质串联确证快速检测方法。苹果样品中的代森锰锌经硫酸二甲脂甲基衍生化后用分散固相萃取(QuEChERS)提取和净化,利用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)在多反应离子监测模式下进行检测。以碎片离子对 m/z 241/117 进行定性分析、 m/z 241/193 进行外标法定量分析。标准曲线线性方程为 $y = 25.496x - 228.84$, $r = 0.9968$, 其线性范围在 0.005 ~ 1.000 mg/kg 之间。在 0.005 ~ 0.5 mg/kg 范围内设定 4 个添加水平。代森锰锌在苹果中的平均回收率为 88.7% ~ 109.4%; 其相对标准偏差为 5.9% ~ 8.7%; 本方法的检出限(LOD)为 0.25 $\mu\text{g/kg}$; 定量限(LOQ)为 0.83 $\mu\text{g/kg}$ 。本方法简便、快速、准确,可用于苹果样品中代森锰锌的农药残留确证检测。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱;分散固相萃取;甲基化;代森锰锌;苹果

1 引 言

代森锰锌(Mancozed)是乙撑二硫代氨基甲酸酯(盐)类(EBDCs)杀菌剂,主要应用于防治果树、蔬菜、花卉及其它经济作物中藻菌纲和半知菌类引起的霜霉病、斑病、赤霉病等。由于代森锰锌的应用十分广泛,并且主要杂质和分解产物乙撑硫脲(ETU)具有致癌、致畸、致突变作用,因此引起广泛关注^[1]。代森锰锌难溶于水且不溶于大多数有机溶剂,只能采用间接方法测定。目前,代森锰锌在农产品中的残留分析主要采用顶空技术^[2,3],即以二硫化碳(CS_2)的检测量计算。该方法测出的是所有化合物产生的 CS_2 总量,缺乏专一性,且测定结果的稳定性和重复性较差。近年来,对代森锰锌残留方法的研究集中在甲基化后检测其衍生物亚乙基-1,2-双二硫代氨基甲酸甲酯(EBDC-dimethyl)^[4~8]。有研究采用碘甲烷为甲基化试剂,液-液萃取净化后经高效液相色谱检测了花生、水稻中的代森锰锌,该方法精确但溶剂消耗量大、耗时繁琐、检出限高^[4,5]。也有报道采用硫酸二甲脂为甲基化试剂,检测水、菠菜、草莓、梨等中代森锰锌的残留量^[6~8],但前处理仍然繁琐耗时。而目前关于代森锰锌在水果中的同类衍生化残留分析方法未见报道。我国在防治苹果病害时大量使用代森锰锌,因此建立快速检测苹果中代森锰锌残留量的确证分析方法具有重要意义。

分散固相萃取净化法因其具有快速、简单、廉价、有效、可靠、安全等特点。其技术核心是在农作物(水果、蔬菜等)的提取液中直接加入除水剂和杂质吸附剂,提取液经离心后直接进行色谱联用分析。该方法已应用于农药残留分析^[9~12]。

本研究建立了代森锰锌在苹果中残留分析检测方法。代森锰锌与硫酸二甲脂发生甲基衍生化反应,衍生化产物采用 QuEChERS 方法提取和净化,利用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)在多反应离子监测模式下进行检测。本方法有效地去除了干扰,提高了灵敏度,定性与定量分析准确。本方法简便快捷,易操作,能够满足苹果中代森锰锌的残留量的快速检测和确证的要求。

2009-06-25 收稿;2009-09-09 接受

本文系国家重点基础研究发展计划项目(No. 2009CB119000)和农业行业标准制定和修订项目资助

* E-mail: dongfengshou@yahoo.com.cn; yongquan_zheng@yahoo.com.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-串联质谱 (ACQUITY UPLC-TQD, Waters 公司); Acquity uplc® BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters 公司); XW-80A 漩涡混合器 (江苏海门市麒麟医用仪器厂); TG16-WS 台式快速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); 高速匀浆分散机 (德国 IKA 公司); Filter Unit 滤膜 (0.22 μm, MILLEX-GV 公司)。

代森锰锌标准品 (纯度 86.3%, 国家标准物质中心); 乙腈 (色谱纯); 水 (超纯水); 分散净化剂 *N*-丙基乙二胺 (PSA, Agela Technologies 公司); *L*-半胱氨酸酸盐 (*L*-Cysteine, 纯度 98.5%, 国药集团化学试剂有限公司); 硫酸二甲脂 (Dimethyl sulfate, 纯度 97%); 乙二胺四乙酸二钠盐、无水 Mg₂SO₄ 和 NaCl 均为分析纯。

2.2 标准溶液的配制

代森锰锌标准工作液的制备: 准确称取代森锰锌标准品 2.9 mg, 用超纯水稀释并定容到 500 mL, 配制成 5 mg/kg 的储备液, 置 4 °C 冰箱保存。准确移取适量标准储备液, 配制 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 和 5.0 mg/kg 的代森锰锌标准工作液系列。由于代森锰锌在水中不稳定半衰期为 1~2 d^[3], 所以标准品需要现用现配。

准确量取硫酸二甲脂溶液 4.88 mL, 溶于 1 L 乙腈中, 配制成 0.05 mg/kg 的提取液。

2.3 样品前处理

准确称取切碎均质良好的样品 10 g 于 50 mL 具塞离心管中, 加入 0.1 g *L*-半胱氨酸酸盐和 5 mL 蒸馏水后漩涡振荡 30 s; 加入 0.5 g 乙二胺四乙酸二钠盐和 10 mL 提取液, 匀浆提取 5 min, 再漩涡振荡 5 min; 放置 15 min 后, 加入 4 g 无水 Mg₂SO₄ 和 1 g NaCl, 剧烈振荡 1 min 后, 以 8000 r/min 离心 5 min。取 1 mL 上清液转入已加有 25 mg PSA、150 mg 无水 Mg₂SO₄ 的 1.5 mL 3810 型微量离心管中, 涡旋 1 min; 3000 r/min 离心 5 min。上清液过 0.22 μm 有机系滤膜于自动进样瓶中, 待测。

2.4 色谱和质谱条件

2.4.1 超高效液相色谱条件 BEH C₁₈ 色谱柱; 柱温: 45 °C; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.2% 甲酸溶液。梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 10% A; 0.5~1.5 min, 10%~90% A; 1.5~2.0 min, 90% A; 2.0~2.1 min, 90%~10% A; 2.1~4.0 min, 10% A。流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL。

2.4.2 质谱条件 大气压化学电离 APCI (+) 方式扫描方式; 毛细管电压: 3.0 kV; 离子源温度: 150 °C; 碰撞能量: 10 V; 去溶剂温度: 500 °C; 去溶剂气流量: N₂, 800 L/h; 锥孔电压: 15 V; 碰撞气为氩气。定性离子对 m/z 241/117、定量离子对 m/z 241/193。

3 结果与讨论

3.1 衍生化

本实验在加入抗氧化剂 *L*-半胱氨酸酸盐条件下, 代森锰锌与乙二胺四乙酸二钠盐反应转化生成代森钠, 后者再与硫酸二甲脂发生甲基化反应, 得到甲基化衍生产物亚乙基-1,2-双二硫代氨基甲酸甲酯 (EBDC-dimethyl), 在大气压化学电离 APCI (+) 方式下进行全扫描 (m/z 60~350), 获得其 $[M+1]$ 峰 (m/z 241) 为母离子 (如图 1A)。通过进一步优化二级质谱参数, 分别获得定性离子对 m/z 241/117 和定量离子对 m/z 241/193 (如图 1B)。

3.2 方法的线性关系

吸取系列代森锰锌标准溶液 1 mL 于 50 mL 具塞离心管中, 按 2.3 中的步骤继续操作后得到标准样液。取标准样液 1 mL 氮吹至干, 准确加入按 2.3 步骤反应得出的苹果空白溶液 1 mL, 即得基质标准样液。基质标准样液在本色谱条件下进样, 以代森锰锌的浓度为横坐标, 以它对应的峰面积为纵坐标作图。经最小二乘法拟合得基质标准曲线线性方程为 $y = 25.496x - 228.84$, $r = 0.9968$, 其线性范围在 0.005~1.000 mg/kg 之间。

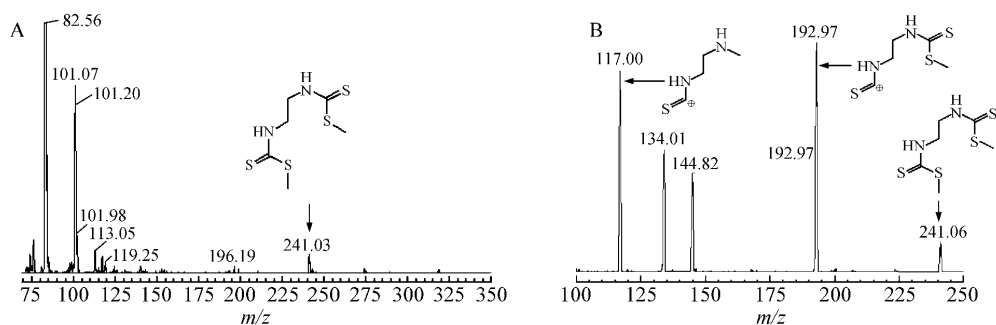


图 1 亚乙基-1,2-双二硫代氨基甲酸甲酯的质谱全扫描质谱图(A)和二级质谱图(B)

Fig.1 Mass spectrum of ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC)-dimethyl of full scan mode (A) and MS/MS mode (B)

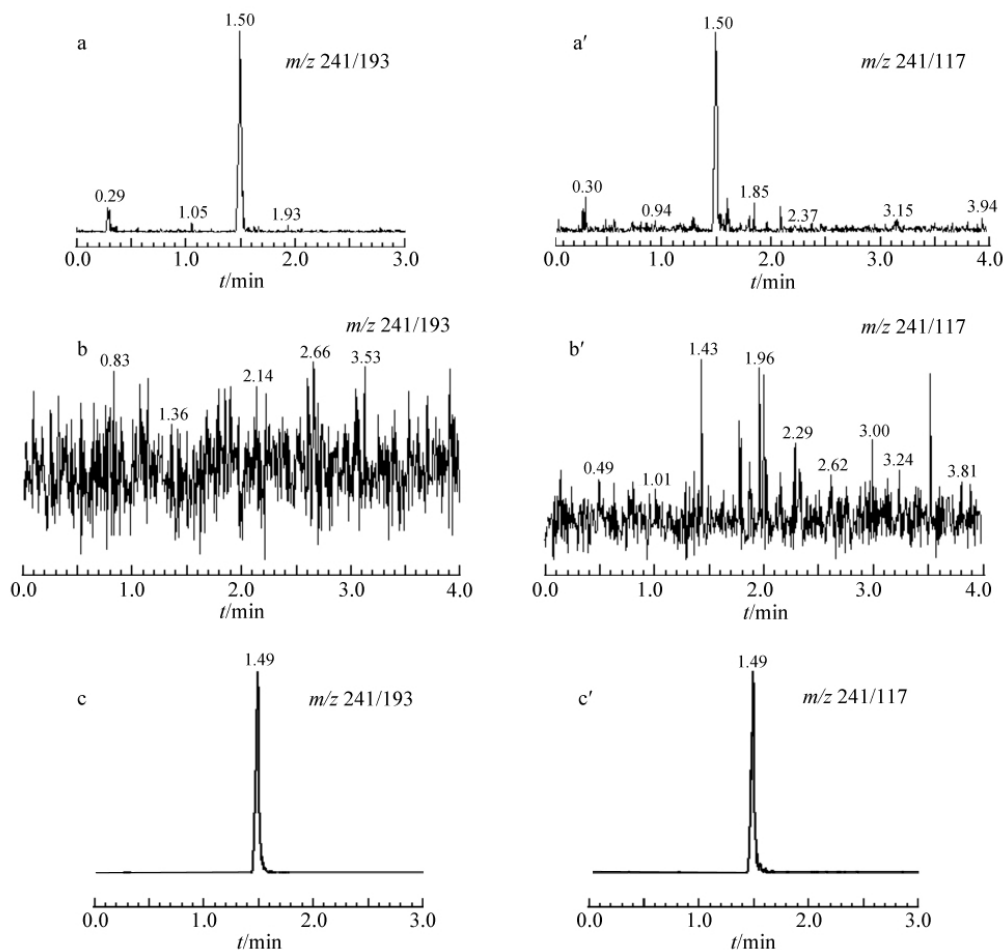


图 2 苹果中添加 0.005 mg/kg 标准品(a,a'), 苹果空白(b,b'), 和苹果实际样品(c,c')的亚乙基-1,2-双二硫代氨基甲酸甲酯色谱图

Fig.2 Chromatogram of EBDC-dimethylthe methylation standard (0.005 mg/kg) in spiked apple (a,a'), black apple sample (b,b') and real apple sample(c,c')

3.3 基质效应

基质效应(Matrix effects)是指色谱分离时共洗脱的物质改变了待测成分的离子化效率,所引起的信号的抑制或提高。基质效应影响大时会降低方法的灵敏度,影响方法的准确性^[4]。本研究对目标化合物中存在的基质效应进行了研究。取 3.2 中制备的 0.005, 0.01, 0.05, 0.5 和 1.0 mg/kg 的标准样液和基质标准样液,在相同色谱条件下分别进样,两者响应信号的差除以标准样液的响应信号,得出基质

效应。公式如: $\text{Matrix effect (ME)} = (A - B) / B (100\%)$ (A: 基质匹配标准样液的响应; B: 等浓度标准样液的响应), 结果如表 2。结果表明: 在低浓度时基质增强了仪器的响应值, 在高浓度时基质降低了仪器的响应值。这种现象可能是由于待测成分的沉淀作用所致^[5-17]。为保证方法的通用性和适用性, 本研究采用基质匹配标准样液校正消除基质效应影响。

表 2 苹果样品中亚乙基-1,2-双二硫代氨基甲酸甲酯的基质效应

Table 2 Matrix effect of EBDC-dimethyl in apple samples

浓度 Concentration (mg/kg)	基质匹配标准样液响应值 Response value of matrix-matched standard	溶剂标准样液响应值 Response value of the solvent standard	基质效应 Matrix effects
0.005	165.50	152.25	8.60
0.01	337.38	319.10	5.73
0.05	1576.12	1714.38	-8.06
0.5	7394.68	8724.16	-15.24
1	12668.67	15859.67	-20.12

3.4 回收率

在苹果空白样品中分别准确加入 0.05, 0.1, 0.5 和 5 mg/kg 代森锰锌标准工作液 1 mL 于 10 g 样本中, 分别相当于 0.005, 0.01, 0.05 和 0.5 mg/kg 的添加水平。按照 2.3 中所述步骤进行提取、衍生化、净化及测定(表 3)。由表 3 可见, 经基质匹配标准品校正后代森锰锌在苹果中的平均回收率为 88.71% ~ 109.39%; 相对标准偏差为 5.87% ~ 8.72%, 表明本方法有较好的准确度和精密度, 可以满足残留定量分析的要求。

表 3 代森锰锌在苹果样品中的添加回收率

Table 3 Recoveries of mancozeb in apple samples

添加水平 Spiked (mg/kg)	回收率 Recovery (%, n = 5)	相对标准偏差 RSD (%)
0.5	109.4	7.6
0.05	95.0	6.1
0.01	88.7	5.9
0.005	108.2	8.7

3.5 方法的灵敏度和仪器稳定性

以添加回收率最低添加浓度 0.005 mg/kg 添加水平的色谱图进行衡量, 本方法的灵敏度分别以噪音信号的 3 倍和 10 倍确定, 得出检出限 (LOD) 为 0.25 μg/kg, 定量限 (LOQ) 为 0.83 μg/kg (均以代森锰锌含量计)。

采用同一供试标准样液, 在相同色谱条件下, 每 1 h 进样 1 次, 连续进样 5 次, 测定其峰面积, 多次测定的峰面积相对标准偏差为 1.9%; 样品溶液重复制备 5 次, 测定的峰面积相对标准偏差为 2.07%, 表明仪器具有很好的稳定性。

3.6 苹果样品的测定

将购自北京某市场的苹果切碎后准确称取 10 g, 按 2.3 节前处理方法进行操作, 利用 2.4 节设定条件进行 UPLC-MS/MS 测定。结果表明, 此样品中代森锰锌残留量为 0.1 mg/kg (图 2C)。

上述结果表明, 本方法的灵敏度、准确度和精密度均满足我国国家标准的要求 (RAQCG)^[18], 可以用于苹果中代森锰锌的快速检测和确证分析。

References

1 World Health Organization, *Environmental Health Criteria* 78 (1998) *Dithiocarbamate Pesticides, ETU and PTU: A general introduction*. WHO, Geneva

2 Royer A, Ménand M, Grimault A, Communal P Y. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49(5): 2152 ~ 2158

3 Ahmad N, Guo L, Mandarakas P, Farah V, Appleby S, Gibson T. *J. AOAC Int.*, **1996**, 79(6): 1417 ~ 1422

4 MA Jing-Wei (马靖玮), DONG Shu-Jun (董姝君), YOU Wen-Yu (游文宇), ZHANG Jing-Ping (张敬平), NIU Wei-Min (钮伟民), PAN Can-Ping (潘灿平). *Journal of Pesticide Science.* (农药学学报), **2007**, 9(3): 297 ~ 300

5 XU Hui (徐辉). *J. Agrochemicals.* (农药), **2007**, 46(8): 540 ~ 541

6 Hayama T, Yada K, Onimaru S, Yoshida H, Todoroki K, Nohta H, Yamaguchi M. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1141(2): 251 ~ 258

7 Crnogorac G, Schwack W. *J. Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21(24): 4009 ~ 4016

8 Tadashi Hayama, Makoto Takada. *J. Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 392: 969 ~ 976

- 9 SHEN Chong-Yu(沈崇钰), SHEN Wei-Jian(沈伟健), WU Bin(吴斌), ZHAO Zeng-Yun(赵增运), YU Ke-Yao(余可垚), SUN Ning-Ning(孙宁宁), XU Jin-Zhong(徐锦忠), JIANG Yuan(蒋原), CHU Xiao-Gang(储晓刚). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2008, 36(12): 1757
- 10 Renata H, Eva M, Svethana H, Lubomir S. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(35): 6326 ~ 6334
- 11 Jiang Y, Li X, Xu J, Pan C, Zhang J, Niu W. *Food Additives and Contaminants Part A*, 2009, 26(6): 859 ~ 886
- 12 Zhao L M, Schultz D, Stevens J. *LC GC NORTH AMERICA*, 2009, Suppl.: 38 ~ 39
- 13 YANG Gui-Qiang(杨桂强), YAO Jian-Ren(姚建仁), ZHEN Yong-Quan(郑永权), DONG Feng-Shou(董丰收). *Journal of Modern Agrochemicals* (现代农药), 2005, 4(1): 6 ~ 9
- 14 King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2000, 11(11): 942 ~ 950
- 15 XIE Jia-Shu(谢家树), GE Qing-Hua(葛庆华). *J. Chin. J. Pharm. Ana.* (药物分析杂志), 2008, 28(8): 1386 ~ 1389
- 16 WANG Feng-Mei(王凤美), ZHANG Hong-Wei(张鸿伟), PANG Shi-Ping(庞士平), TANG Zhi-Xu(汤志旭), NIU Zeng-Yuan(牛增元), LUO Xin(罗忻). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2008, 36(12): 1629 ~ 1635
- 17 DONG Feng-Shou(董丰收), LIU Xin-Gang(刘新刚), ZHENG Yong-Quan(郑永权), LI Jing(李晶), ZHANG Wei-Guo(张伟国), ZHANG Xin-Zhong(张新忠), LI Chong-Jiu(李重九). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2008, 36(12): 1716 ~ 1721
- 18 General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China(中华人民共和国质量监督检验检疫总局). *Residues Analysis Quality Control Guide* (残留分析质量控制指南). Beijing(北京), 2002

Simplified Method for Determination of Mancozeb Residues in Apple Using Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

CHEN Wu-Ying^{1,2}, DONG Feng-Shou^{*1}, LIU Xin-Gang¹, QIN Dong-Mei³, LIAO Xiao-Lan²,
CHENG Li¹, WANG Chen-Rui¹, ZHENG Yong-Quan^{*1}

¹(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key laboratory of Pesticide Chemistry and Application, Ministry of Agriculture, Beijing 100193)

²(College of Bio-Safety Science & Technology Hunan Agricultural University, Changsha 410123)

³(Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100125)

Abstract It is difficult to directly determine mancozeb because they are insoluble in general solvents. And the residue analysis in agricultural and crops is more complicated currently. In this study, a rapid method has been developed for the determination of germicide mancozeb residues in apple. The mancozeb of apple sample, which was methylated by dimethyl sulfate, was extracted by the Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method and detected by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry under multiple reaction monitoring mode, then quantified by matrix-match standard solution. The qualitative results were obtained based on retention time, the precursor ion and two daughter ions, and the quantitation results were on the intension of the characteristic m/z 241/117 ion and m/z 241/193 ion. Average recoveries of mancozeb in apple samples were found in the range of 88.7% – 109.4% at four spiking levels from 0.005 to 0.5 mg/kg with relative standard deviations of 5.9% – 8.7%. Limits of detection of mancozeb were 2.5×10^{-4} mg/kg, while limits of quantification were 8.3×10^{-4} mg/kg. The method is simple, rapid, and accurate, and can meet the requirements of the domestic and international legislation.

Keywords Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry; Dispersion solid phase extraction; Methylation; Mancozeb; Apple

(Received 25 June 2009; accepted 9 September 2009)