

超高效液相色谱-串联质谱法测定甘蓝中 三乙膦酸铝的残留

韩丙军¹, 何 燕¹, 林 冰¹, 黄海珠¹, 陈丽霞^{*2}, 许丽建²

(1. 中国热带农业科学院 分析测试中心/海南省热带果蔬产品质量安全重点实验室, 海口 571101;

2. 琼台师范学院数理系, 海口 571100)

摘 要: 建立了一种超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 检测甘蓝中三乙膦酸铝残留的方法。通过测定甘蓝样品中乙基膦酸和亚膦酸的含量, 对三乙膦酸铝进行定量。采用电喷雾负离子 (ESI⁻) 电离, 多反应监测模式 (MRM) 定性分析, 基质匹配标准曲线外标法定量。结果表明: 三乙膦酸铝在不同配比的乙腈-水溶液中均可解离为乙基膦酸和亚膦酸, 且二者的质量比均为 40:60; 三乙膦酸铝的检出限 (LOD) 为 1.3 µg/kg; 在 10~500 µg/L 范围内, 乙基膦酸和亚膦酸的线性相关系数均大于 0.999; 在 0.01、0.1 和 0.5 mg/kg 3 个添加水平下, 甘蓝中三乙膦酸铝的平均回收率在 82%~107% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 在 6.7%~9.2% ($n=5$) 之间。该方法简单、快速, 灵敏度及准确度高, 可满足甘蓝中三乙膦酸铝残留的检测要求。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 甘蓝; 三乙膦酸铝; 乙基膦酸; 亚膦酸; 残留

中图分类号: S482.2

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2017)03-0403-06

Determination of fosetyl-aluminium residue in cabbage (*Brassica oleraceae* L.) by using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HAN Bingjun¹, HE Yan¹, LIN Bing¹, HUANG Haizhu¹, CHEN Lixia^{*2}, XU Lijian²

(1. Analysis & Testing Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Provincial Key Laboratory of Quality and Safety for Tropical Fruits and Vegetables, Haikou 571101, China; 2. Mathematical Department, Qiongtai Teachers College, Haikou 571100, China)

Abstract: A rapid method for analyzing the fosetyl-aluminium (Al) residues in Chinese cabbage was developed using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). This method quantified the concentration of fosetyl-Al by determining the contents of ethyl phosphonic acid and phosphorous acid. Analytes were detected by electro-spray ionization (ESI⁻) and multiple reaction monitoring (MRM) mode. Fosetyl-Al dissociated as ethyl phosphonic acid and phosphorous acid, and the ratios between the two acids were 40:60 with different solution. Quantification was performed by peak area external standard methods using matrix-matched calibration curves, which

收稿日期: 2016-12-05; 录用日期: 2017-05-04.

基金项目: 海南省应用技术研发与示范推广专项 (ZDXM2015044); 海南自然科学基金面上项目 (20163078); 海南省高等学校科学研究项目 (Hnky2016ZD-14); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金 (1630082017005).

作者简介: 韩丙军, 男, 副研究员, 主要从事农药残留分析与研究。E-mail: hanbjun@163.com; *陈丽霞, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 副教授, 研究方向为生物食品安全, E-mail: chenlxqt@163.com

were linear in the range of 10-500 µg/L with good linear relationships. The correlation coefficients were better than 0.999. The limit of quantification (LOQ) of fosetyl-Al was 1.3 µg/kg. At 0.01, 0.10 and 0.50 mg/kg spiked levels, the recoveries and the relative standard deviations (RSD) were 82%-107% and 6.7%-9.2% ($n=5$) for fosetyl-Al. This method was simple, rapid, accurate, which could be applied to the determination of fosetyl-Al residues in Chinese cabbage.

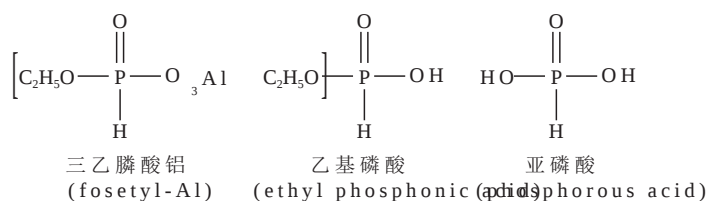
Keywords: ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); cabbage; fosetyl-aluminium; ethyl phosphonic acid; phosphorous acid; residue

三乙磷酸铝 (fosetyl-aluminium) 是一种高效、广谱、内吸性的低毒杀菌剂^[1]。其在植物体内可以上、下双向传导, 对由单轴霉菌属、霜霉属和霉属引起的病害具有良好的防治效果, 是目前防治水稻稻瘟病、果树、蔬菜霜霉病和疫病应用较多的药剂^[2-3]。

三乙磷酸铝在基质中解离后一般以乙基磷酸和亚磷酸分子的形式存在 (图式 1)。其传统的检测方法是采用络合滴定法测定三乙磷酸铝含量^[4], 但该法操作复杂, 在进行痕量分析时, 误差较大。近年来, 随着色谱技术的普及, 各类基于色谱分离后的分析技术被应用于测定三乙磷酸铝中, 常规方法主要是先采用三甲基硅重氮甲烷在恒温下对三乙磷酸铝进行衍生化^[5-6], 或在密闭反应瓶中用氢氧化钠碱解三乙磷酸铝生成乙醇^[7], 然后通过气相色谱法测定衍生化或碱解后的产物, 从而对三乙磷酸铝进行定量, 但样品前处理过程较复

杂, 实验条件较难控制。而采用离子色谱分析法, 可通过测定乙基磷酸的含量达到对三乙磷酸铝进行定量的目的^[8-12], 但样品前处理过程易受复杂基质的干扰而影响测定结果的准确性。此外, 液相色谱技术也被应用于三乙磷酸铝的定量分析中^[13], 如采用离子对反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定三乙磷酸铝的含量^[14], 但其检出限较高, 不能满足三乙磷酸铝残留分析的需求。

中国国家标准^[15]中规定, 三乙磷酸铝的残留量定义为乙基磷酸和亚磷酸及其盐的残留量之和, 以乙基磷酸的残留量表示。现有文献中大多测定乙基磷酸的含量^[16-17], 尚不能满足国家标准中对于三乙磷酸铝残留定义的需求。因此, 本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法对甘蓝中乙基磷酸和亚磷酸的含量及其各自所占比例进行研究, 以期用于甘蓝中三乙磷酸铝残留的准确、快速分析。



图式 1 三乙磷酸铝、乙基磷酸和亚磷酸的化学结构式

Scheme 1 Structures of fosetyl-Al, ethyl phosphonic acid and phosphorous acid

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

超高效液相色谱-串联质谱仪 (UPLC-MS/MS): ACQUITY 超高压液相色谱系统, 美国 Waters 公司; API4000+串联质谱仪, 美国 AB SCIEX 公司。ULTRA-TURRAX T25 digital 高速匀浆机, IKA 公司; GL-10C 高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; R206 旋转蒸发仪, 上海申生科技有限公司。

三乙磷酸铝 (fosetyl-aluminium) 标准溶液 (纯

度 1 000 µg/mL), 农业部环境质量监督检验测试中心 (天津); 亚磷酸 (纯度 > 99.97%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙腈 (色谱纯), Fisher 试剂公司; 氯化钠和无水硫酸镁 (分析纯), 广州化学试剂厂; PSA 吸附剂 (乙二胺-*N*-丙基硅烷, 分析纯), ANPEL 仪器 (上海) 有限公司。试验用水均为超纯水。

1.2 分析方法

1.2.1 样品的提取和净化 甘蓝中三乙磷酸铝的提取参照 QuEChERS 方法^[18]并稍加改进: 准确称

取甘蓝样品 (10.0 ± 0.2) g 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈, 于 15 000 r/min 下匀浆 2 min; 加入 1.5 g 氯化钠, 剧烈振荡 1 min 后, 于 4 000 r/min 下离心 5 min; 取 5 mL 上清液, 加入 100 mg 无水硫酸镁和 100 mg PSA 吸附剂, 剧烈振荡 1 min 后, 于 4 000 r/min 下离心 5 min; 取 2 mL 上清液, 浓缩并定容至 1 mL, 经 0.22 μ m 微膜过滤, 待测。

1.2.2 仪器分析条件 色谱条件: ACQUITY UPLC® BEH HILIC 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μ m), 柱温 35 $^{\circ}$ C。流速 0.25 mL/min, 进样量 2 μ L。流动相 A 为乙腈, B 为 0.05% 的甲酸水溶液, $V(\text{乙腈}): V(0.05\% \text{ 甲酸水溶液}) = 10:90$, 其梯度洗脱条件为: 0~0.5 min, 流动相 A 10%; 保持 0.5~3.0 min, 流动相 A 从 10% 变为 90%; 保持 3.0~3.5 min, 流动相 A 从 90% 变为 10%; 保持 3.5~5.0 min, 流动相 A 10%; 保持 5.0 min 停止。

质谱条件: 电喷雾负离子 (ESI⁻) 扫描; 多反应监测 (MRM) 模式; 雾化气压力 379.225 kPa; 喷雾电压 4 500 kV; 同时监测乙基磷酸和亚磷酸, 其中乙基磷酸的母离子和定量离子对分别为

m/z 109 和 81/63, 亚磷酸的母离子和定量离子对分别为 m/z 81 和 79/63。

1.2.3 标准溶液的配制及标准曲线的绘制 外标法定量。用甲醇溶解亚磷酸标准品, 配成 1 000 μ g/mL 的标准储备液, 再用乙腈稀释, 配成 10 μ g/mL 的标准工作溶液。同时用乙腈稀释 1 000 μ g/mL 的三乙磷酸铝标准溶液, 配成 10 μ g/mL 的标准工作溶液。取不含待测物的甘蓝样品, 按 1.2.1 节的前处理方法制得空白基质溶液, 并用其稀释 10 μ g/mL 的混合标准工作溶液, 分别配成 0.01、0.02、0.10、0.20 和 0.50 μ g/mL 的三乙磷酸铝和亚磷酸系列基质匹配混合标准工作溶液, 以标准溶液质量浓度 (x) 与监测定量离子峰面积 (y) 绘制标准曲线。其中, 亚磷酸以配制浓度直接绘制标准曲线; 乙基磷酸含量以三乙磷酸铝含量减去亚磷酸含量计, 并以其绘制标准曲线。

1.2.4 基质效应 采用相对响应值法研究甘蓝基质对目标物定量的基质效应^[19]。根据公式 (1) 计算基质效应。当基质效应大于 1 时, 表现为基质增强效应; 当基质效应小于 1 时, 为基质抑制效应。

$$\text{基质效应}/\% = (\text{空白基质标准响应值}/\text{纯溶剂标准响应值}) \times 100 \quad (1)$$

1.2.5 乙基磷酸和亚磷酸比例的测定 分别以 $V(\text{乙腈}): V(\text{水}) = 4:1$ 、 $2:1$ 、 $1:1$ 、 $1:2$ 和 $1:4$ 的溶液作溶剂, 配制 0.5 μ g/mL 的三乙磷酸铝溶液, 同时采用纯乙腈溶剂按 1.2.3 节的方法配制系列亚磷酸的标准溶液, 对各三乙磷酸铝溶液中的亚磷酸进行定量。并将三乙磷酸铝含量减去亚磷酸含量计为乙基磷酸含量。将乙基磷酸和亚磷酸的含量进行归一化, 计算两种酸在不同溶液中的比例。

1.2.6 添加回收试验 分别在甘蓝空白样品中添加三乙磷酸铝标准溶液, 添加水平分别为 0.01、0.1 和 0.5 mg/kg。每个处理重复 5 次, 计算平均添加回收率和相对标准偏差 (RSD)。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

根据三乙磷酸铝的残留定义, 首先选择负离子模式进行激发, 采用直接进样的方式优化质谱分析条件, 其在质谱中的裂解碎片如图 1 所示。在一级质谱中, 将乙基磷酸和亚磷酸分别产生稳定的 $[M-H]^{-}$ 离子定为母离子, 其 m/z 分别为 109

和 81。此后, 在 SIM 模式下, 对化合物的碎裂电压 (DP) 进行优化, 乙基磷酸和亚磷酸的最优 DP 均为 -81 V。母离子进入二级质谱, 发生断裂或重排等反应产生不同的离子碎片。其中, 乙基磷酸的子离子分别为亚磷酸 (定量离子, $m/z = 81$) 和偏亚磷酸 (定性离子, $m/z = 63$); 亚磷酸的子离子分别为偏磷酸 (定量离子, $m/z = 79$) 和偏亚磷酸 (定性离子, $m/z = 63$)。最后, 分别优化目标物离子碎片的最佳碰撞能量 (CE), 乙基磷酸两个子离子的 CE 分别为 -18 eV 和 -30 eV, 亚磷酸两个子离子的 CE 分别为 -23 eV 和 -33 eV。

2.2 色谱条件的优化

考虑到质谱检测器可以通过多通道的模式实现分析目标物的良好分离, 因此, 在色谱条件中重点考虑分析目标物的峰形, 同时调整流动相使目标物在适合的时间出峰。乙基磷酸和亚磷酸均属于极性化合物, 不易被色谱柱保留, 故选择适合于分析极性较高化合物的 Waters ACQUITY UPLC® BEH HILIC 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μ m) 进行分析。同时, 由于目标物及其碎片主要为酸性基团, 易与色谱柱中的金属离子结合导致色谱

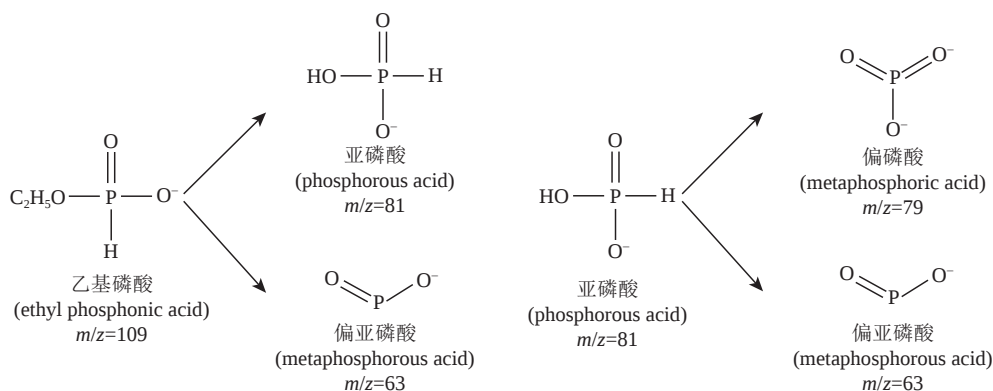


图1 乙基磷酸和亚磷酸可能的裂解途径

Fig. 1 Fragmentation pathways of ethyl phosphonic acid and phosphorous acid

峰出现拖尾现象。因此,在色谱流动相中加入甲酸以改变流动相的极性,进而改变目标物的出峰时间和峰形。结果发现,以 $V(\text{乙腈}):V(0.05\% \text{ 甲酸水溶液}) = 10:90$ 为流动相时,目标物约在 1.51 min 出峰,且峰形尖锐,可在实现快速检测的同时获得良好的检测效果。典型色谱图见图 2。

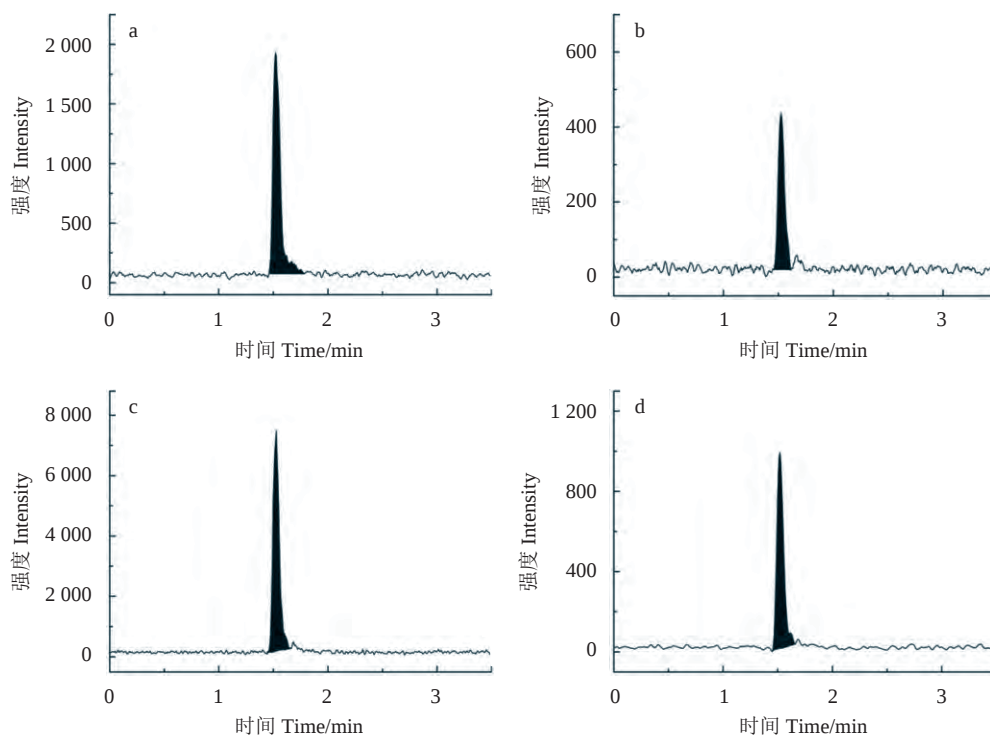
2.3 基质效应

结果表明,甘蓝基质对乙基磷酸和亚磷酸的基质效应分别为 80% 和 103%,说明基质效应对样品定量存在一定影响。因此,为了降低样品基

质效应对目标物离子化的干扰,需要使用对应的基质匹配标准曲线定量。

2.4 乙基磷酸和亚磷酸的比例

由图 3 可知,乙腈与水在不同配比下,乙基磷酸和亚磷酸的比例均稳定在 40:60。将亚磷酸的含量折算为乙基磷酸,并与乙基磷酸含量相加计为三乙磷酸铝含量,计算公式为:三乙磷酸铝含量 = 乙基磷酸含量 + 亚磷酸含量 $\times$ (乙基磷酸相对分子质量/亚磷酸相对分子质量),即三乙磷酸铝含量 = 乙基磷酸含量 + $1.34 \times$ 亚磷酸含量。



a 和 b: 乙基磷酸定量离子和定性离子; c 和 d: 亚磷酸定量离子和定性离子。

a and b: Quantitative and qualitative ion for ethyl phosphonic acid; c and d: Quantitative and qualitative ion for phosphorous acid.

图2 甘蓝基质中乙基磷酸和亚磷酸典型色谱图 (0.01 $\mu\text{g/mL}$)Fig. 2 The typical total ion chromatograms of the ethyl phosphonic acid and phosphorous acid (0.01 $\mu\text{g/mL}$)

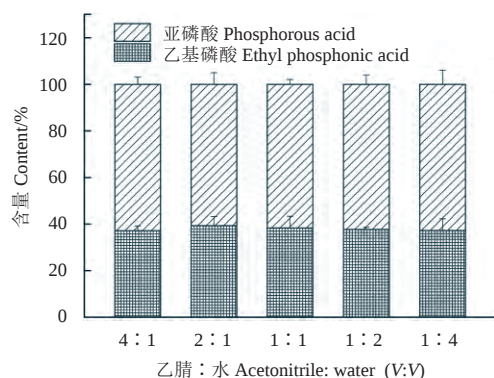


图3 乙基磷酸和亚磷酸在不同配比的乙腈和水溶液中的比例

Fig. 3 The ratio between the ethyl phosphonic acid and phosphorous acid in different solvents

2.5 方法的线性范围和检出限

乙基磷酸和亚磷酸的线性回归方程分别为 $y = 1.35 \times 10^6 x - 1.10 \times 10^4$ ($r = 0.9993$) 和 $y = 4.16 \times 10^6 x - 3.31 \times 10^4$ ($r = 0.9995$), 检出限 (LOD, $S/N = 10$) 分别为 1 和 0.2 $\mu\text{g/kg}$, 合计三乙磷酸铝的 LOD 为 1.3 $\mu\text{g/kg}$ 。中国国家标准^[15]中规定黄瓜、苹果、葡萄和荔枝中三乙磷酸铝的 MRL 值分别为 30、30、10 和 1 mg/kg , 尚未制定甘蓝中的最大残留限量 (MRL), 本方法参考以上数据, 认为可满足检测分析的需求。

2.6 方法的准确度与精密度

结果表明, 在 0.01~0.5 mg/kg 3 个添加水平下, 三乙磷酸铝在甘蓝中的平均回收率在 82%~107% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 在 6.7%~9.2% 之间 ($n = 5$), 符合农药残留测定的要求^[20]。

3 结论

本研究建立了一种高效液相色谱-串联质谱检测甘蓝中三乙磷酸铝残留的分析方法。样品采用 QuEChERS 方法进行前处理, 通过测定乙基磷酸和亚磷酸的含量对三乙磷酸铝进行定量, 可满足对三乙磷酸铝残留定义的要求; 通过测定溶液中乙基磷酸和亚磷酸的浓度, 确认二者在溶液中存在的比例。该方法简单、快速、灵敏度及准确度高, 可满足甘蓝中三乙磷酸铝残留分析的要求。

参考文献(Reference):

[1] JMPR Report. FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides: fosetyl-aluminium, aluminium tris(ethylphosphonate) [EB/OL]. 2013. <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/>

documents/Pests_Pesticides/Specs/Fosetyl_Al_2013.pdf.

- [2] 丘能升. 稻瘟灵与三乙磷酸铝混剂对稻瘟病的防治效果[J]. 亚热带农业研究, 2008, 4(1): 29-32.
- QIU N S. Controlling effect of the tank mixture of fosetyl-aluminum and isoprothiolane on rice blast disease[J]. Subtrop Agric Res, 2008, 4(1): 29-32.
- [3] 许允成, 叶志强, 范志先. 20%三乙磷酸铝复合水剂防治大棚黄瓜霜霉病[J]. 农药, 2001, 40(1): 25.
- XU Y C, YE Z Q, FAN Z X. The experiment with phosethyl-Al 20% compound hydrate fungicide for controlling cucumber downy mildew in plastic house[J]. Pesticides, 2001, 40(1): 25.
- [4] 赖丰英, 周微. 农药混剂中三乙磷酸铝含量测定方法的探讨[J]. 化工技术与开发, 2007, 36(1): 39-41, 35.
- LAI F Y, ZHOU W. Determination of phosethyl-Al in pesticide mixture[J]. Technol Dev Chem Ind, 2007, 36(1): 39-41, 35.
- [5] 孙立荣, 迟志娟, 刘贤金, 等. 气相色谱法测定苹果中三乙磷酸铝残留[J]. 农药, 2009, 48(10): 747-748, 759.
- SUN L R, CHI Z J, LIU X J, et al. The analysis method for fosetyl-Al residues in apples by GC[J]. Agrochemicals, 2009, 48(10): 747-748, 759.
- [6] 苟春林, 葛谦, 刘元柏, 等. 苹果和土壤中三乙磷酸铝含量的气相色谱分析[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(6): 1686-1687.
- GOU C L, GE Q, LIU Y B, et al. Determination of fosetyl-aluminium residue in apple and soil by gas chromatography[J]. J Anhui Agric Sci, 2014, 42(6): 1686-1687.
- [7] 范志先, 宋述尧, 马凡如, 等. 三乙磷酸铝及其与代森锰锌混剂的顶空气相色谱分析方法[J]. 色谱, 1993, 11(5): 285-287.
- FAN Z X, SONG S Y, MA F R, et al. Quantitative analysis of phosethyl-Al and ND-901 (phosethyl-Al + Mancozeb) by a headspace chromatography[J]. Chin J Chromatogr, 1993, 11(5): 285-287.
- [8] 王雪, 朱岩, 张嘉捷. 离子色谱法同时测定三(乙基磷酸)铝原药纯度及杂质离子的含量[J]. 浙江大学学报(理学版), 2009, 36(2): 180-182.
- WANG X, ZHU Y, ZHANG J J. Determination of phosethyl-Al and the impurities by ion-exchange chromatography[J]. J Zhejiang Univ: Sci Ed, 2009, 36(2): 180-182.
- [9] 范志先, 李娇, 丁宁, 等. 三乙磷酸铝原药全分析[J]. 现代农药, 2010, 9(6): 28-31, 34.
- FAN Z X, LI J, DING N, et al. Complete analysis of fosetyl-aluminum technical[J]. Mod Agrochem, 2010, 9(6): 28-31, 34.
- [10] 丁宁, 范志先, 葛海英, 等. 三乙磷酸铝的纯化与离子色谱分析[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2008, 29(3): 200-203, 209.
- DING N, FAN Z X, GE H Y, et al. The purification of fosetyl-Al and its quantitative analysis by ion chromatography[J]. J Qingdao Univ Sci Technol: Nat Sci Ed, 2008, 29(3): 200-203, 209.
- [11] GIORDANO R, CIARALLI L, CIPROTTI M, et al. Applicability of high-performance ion chromatography (HPIC) to the determination of fosetyl-aluminum in commercial formulations[J]. Microchem J, 1995, 52(1): 68-76.

- [12] OUIMETTE D G, COFFEY M D. Quantitative analysis of organic phosphonates, phosphonate, and other inorganic anions in plants and soil by using high-performance ion chromatography[J]. *Phytopathol*, 1988, 78(9): 1150-1155.
- [13] ROSATI D, VENET C. Method of analyzing phosphorous acid, fosetyl-Al, or both simultaneously: US8122760 B2[P]. 2012-02-28.
- [14] 范志先, 贾淑敏, 丁宁, 等. 离子对反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定三乙磷酸铝的含量[J]. *色谱*, 2009, 27(6): 849-851.
FAN Z X, JIA S M, DING N, et al. Determination of fosetyl-aluminium by ion-pair reversed phase-high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *Chin J Chromatogr*, 2009, 27(6): 849-851.
- [15] 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
Maximum residue limits for pesticides in food: GB 2763—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [16] 王洪艳, 梁春实, 蔡柳燕, 等. 高效液相色谱串联质谱法检测菠菜中三乙磷酸铝残留量[J]. *农产品加工·学刊*, 2012(2): 124-126.
WANG H Y, LIANG C S, CAI L Y, et al. Rapid determination of fosetyl-aluminum residues in spinach by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Acad Period Farm Prod Process*, 2012(2): 124-126.
- [17] HERNÁNDEZ F, SANCHO J V, POZO Ó J, et al. Rapid determination of fosetyl-aluminum residues in lettuce by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry[J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(4): 832-838.
- [18] RAJSKI Ł, LOZANO A, BELMONTE-VALLES N, et al. Comparison of three multiresidue methods to analyse pesticides in green tea with liquid and gas chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2013, 138(3): 921-931.
- [19] 张海燕. 超高效液相色谱-串联质谱法测定番茄(酱)及香梨中矮壮素和缩节胺残留量[J]. *农药学报*, 2016, 18(5): 619-624.
ZHANG H Y. Analysis of chlormequat chloride and mepiquat chloride residues in tomato, tomato paste and pear by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2016, 18(5): 619-624.
- [20] 农药残留试验准则: NY/T 788—2004[S]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
Guideline on pesticide residue trials: NY/T 788—2004[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2004.

(责任编辑: 曲来娥)