

高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定克氏原螯虾中二甲戊灵残留

杨秋红^{1,2}, 刘欢², 邹谱心³, 戚铭隆³, 刘永涛^{1,2}, 艾晓辉^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223; 2. 中国水产科学研究院, 农业部水产品质量安全控制重点实验室, 北京 100141; 3. 成都信息工程大学资源环境学院, 四川 成都 610225)

摘要:建立了高效液相色谱-三重四极杆质谱(HPLC-MS/MS)测定克氏原螯虾中二甲戊灵残留的分析方法。用含 0.1%(v/v) 乙酸的乙酸乙酯溶液提取克氏原螯虾中的二甲戊灵,于 35℃ 旋蒸至干,经含 0.1%(v/v) 乙酸的甲醇-水(8:2, v/v) 溶解残渣后,用酸性氧化铝柱、石墨化炭黑(GCB)进行净化。采用 Symmetry C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm) 进行分离,用加热大气压电喷雾电离(HESI)源、正离子模式进行扫描,在多反应监测模式(MRM)下检测。结果表明,二甲戊灵在 1.0~20.0 μg/L 范围内线性良好,相关系数为 0.996 0,检出限为 0.2 μg/kg;二甲戊灵的加标回收率为 63.3%~104.7%,精密密度为 6.9%~14.5%(n=7)。该方法简单、快速、灵敏度高,能够满足克氏原螯虾中二甲戊灵药物残留检测的需求。

关键词: 高效液相色谱-三重四极杆质谱; 残留; 二甲戊灵; 克氏原螯虾

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2018)06-0552-05

Determination of pendimethalin residues in *Procambarus clarkii* by high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

YANG Qiuhong^{1,2}, LIU Huan², ZOU Puxin³, QI Minglong³, LIU Yongtao^{1,2}, AI Xiaohui^{1,2*}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Control of Quality and Safety for Aquatic Products, Ministry of Agriculture, Beijing 100141, China; 3. Chengdu University of Information Technology, College of Resources and Environment, Chengdu 610225, China)

Abstract: A novel method was developed for the determination of pendimethalin in *Procambarus clarkii* by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Samples were extracted with ethyl acetate containing 0.1%(v/v) acetic acid, and the extracts were dried at 35℃. The final extracts were redissolved with methanol-water (8:2, v/v) containing 0.1%(v/v) acetic acid and cleaned up by acidic alumina column and graphitized carbon black (GCB). The prepared samples were separated on a Symmetry C18 column (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm) and characterized using a heated electrospray ionization (HESI) source in the positive ion multiple reaction monitoring mode. Under optimum experimental conditions, the standard curve was linear in the range of 1.0~20.0 μg/L with the correlation coefficient of 0.996 0. The limit of detection was 0.2 μg/kg. The spiked recoveries of the pendimethalin in the *Procambarus clarkii* samples ranged from 63.3% to 104.7% with RSDs of 6.9%~14.5% (n=7). The proposed method is quick, simple and sensitive, and suitable for the rapid determination

收稿日期: 2018-01-07

* 通讯联系人. Tel: (027) 81780298, E-mail: aixh@yfi.ac.cn.

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2018HY-ZD0606); 湖北省第二批现代农业产业技术体系项目(HBHZD-ZB-2017-004)。

Foundation item: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (CAFS) (No. 2018HY-ZD0606); the Second Project of China Agriculture Research System in Hubei Province (No. HBHZD-ZB-2017-004)。

and analysis of pendimethalin in *Procambarus clarkii* samples.

Key words: high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-MS/MS); residues; pendimethalin; *Procambarus clarkia*

二甲戊灵(pendimethalin)属于二硝基苯胺类除草剂^[1],其主要防除对象是一年生禾本科杂草、部分阔叶杂草,可广泛用于玉米、大豆、大蒜、葱、甘蓝、烟草、花生、棉花、水稻等多种作物的农田除草中^[2-4],现已成为仅次于草甘膦和百草枯的第三大除草剂^[5]。随着二甲戊灵的大量使用,二甲戊灵的生态毒性越来越多的引起人们的关注。有研究表明,二甲戊灵对水生动物有一定的毒性,甚至是可疑致癌物。美国环境保护署定义二甲戊灵具有持久性、生物累积性和毒性物质(毒性分类Ⅲ),可能具有致癌毒性(等级C)^[6]。

二甲戊灵的主要检测方法有气相色谱法、液相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-三重四极杆质谱法等^[8-12]。液相色谱-三重四极杆质谱法较液相色谱法,具有灵敏度高、选择性好的优点;较气相色谱法和气相色谱-质谱法,具有稳定性好的特点。目前仅有采用液相色谱-三重四极杆质谱测定水体中二甲戊灵的方法^[12],但克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)中二甲戊灵的检测方法未见报道。

本文建立了高效液相色谱-三重四极杆质谱准确测定克氏原螯虾体内二甲戊灵残留的方法。该法为水产品中农药残留的监控提供简便、快速的检测技术。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和材料

Accela-TSQ Quantum Access Max 高效液相色谱-三重四极杆质谱仪,配有 Thermo LC-Quan 2.6 数据采集处理软件(美国 Thermo 公司); AE-240 电子天平(美国梅特勒-托利多公司); Hei-VAP 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); 20PR-520 自动高速冷冻离心机(日本 Hitach 公司); HQ-60 涡旋混合器(北方同正生物技术有限公司); HR2105/90 高速搅碎机(美国飞利浦公司); SK40-120DJ 超声仪(张家港市神科超声电子有限公司)。

二甲戊灵标准品(纯度 98.8%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 弗罗里硅柱(1 g/3 mL)、中性氧化铝柱(1 g/3 mL)和乙酸、乙腈、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯(色谱纯)(美国 CNW 公司); 乙二胺-*N*-丙基硅

烷(PSA)、石墨化炭黑(GCB)(博纳艾杰尔科技公司); 超纯水(电阻率为 18.2 MΩ·cm,美国 Millipore 公司)。

1.2 样品前处理

1.2.1 制备

克氏原螯虾去头、去壳、去虾线,取可食肌肉部分,处理成不大于 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块后,混匀,用高速搅碎机充分搅匀,密封,标记,于 -18℃ 冷冻保存,备用。

1.2.2 提取

称取(5.00±0.01)g 解冻后的克氏原螯虾样品,置于 50 mL 具塞离心管中,加入 15 mL 含 0.1% (v/v) 乙酸的乙酸乙酯溶液,涡旋混匀 1 min,于室温下超声振荡提取 5 min,以 5 000 r/min 离心 5 min,取上层清液至鸡心瓶中,重复萃取一次,合并上清液并旋蒸至干,残渣用 2 mL 含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇-水溶液(8:2, v/v)溶解,转移至 10 mL 离心管中,过酸性氧化铝柱后,加入 0.1 g GCB,以 5 000 r/min 离心 5 min,取上层清液 1 mL,用 HPLC-MS/MS 测定。

1.3 标准溶液的配制

称取二甲戊灵标准品 1.00 mg,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液,于 -18℃ 冰箱中避光保存;用含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇-水(8:2, v/v)稀释标准储备液,分别配制质量浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μg/L 的系列标准工作液。

采用 1.2 节前处理方法处理空白克氏原螯虾样品,制备得到空白样品溶液,用空白样品溶液稀释二甲戊灵标准储备液,分别配制质量浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μg/L 的空白基质匹配标准溶液。

1.4 色谱条件

色谱柱: Symmetry C18 柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm, 美国 Waters 公司); 柱温: 35℃; 流动相: (A) 含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇溶液和 (B) 0.1% (v/v) 乙酸水溶液; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μL。梯度洗脱程序见表 1。

1.5 质谱条件

离子源: 加热大气压电喷雾(HESI)源,正离子

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

Time/min	$\varphi(A)$ /%	$\varphi(B)$ /%
0-5.0	80	20
5.0-7.0	98	2
7.0-10.0	80	20

A: methanol containing 0.1% (v/v) acetic acid; B: water containing 0.1% (v/v) acetic acid.

模式; 扫描方式: 选择反应监测 (SRM) 模式; 喷雾电压: 3 500 V; 蒸发气温度: 200 °C; 鞘气和辅助气: 高纯氮气, 压力均为 5 bar; 碰撞气: 高纯氩气, 压力为 0.2 Pa; 离子传输毛细管温度: 350 °C; 一极质谱扫描 (Q1) 半峰宽: 0.7 Da, 三极质谱扫描 (Q3) 半峰宽: 0.7 Da; 监测离子对: m/z 282.1/211.9 (定量离子) 和 282.1/193.9; 碰撞压力: 17 V 和 11 V。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

本试验比较了甲醇-甲醇-水 (5:5, v/v)、甲醇-水 (8:2, v/v) 和含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇-0.1% (v/v) 乙酸水溶液 (8:2, v/v) 4 种流动相组合在等度洗脱条件下二甲戊灵的分离效果。采用甲醇时, 二甲戊灵的色谱峰较宽, 且拖尾明显; 采用甲醇-水 (5:5, v/v) 时, 二甲戊灵的出峰时间较长, 且色谱峰较宽; 采用甲醇-水 (8:2, v/v) 时, 虽然没有明显的拖尾现象, 但二甲戊灵的色谱峰较宽; 采用含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇-0.1% (v/v) 乙酸水溶液 (8:2, v/v) 时, 二甲戊灵的色谱峰较窄、峰形尖锐, 且响应强度也高。因此采用含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇-0.1% (v/v) 乙酸水溶液作为流动相。

采用等度洗脱时, 虽然灵敏度较高, 但是色谱峰略微出现拖尾现象, 因此采用梯度洗脱程序 (见表 1), 以解决色谱峰拖尾问题。

2.2 质谱条件的优化

用蠕动泵将标准溶液注入质谱仪, 在 ESI⁺ 模式下对目标化合物进行一级质谱分析, 试验比较了直接注入标准溶液和标准溶液随初始流动相同时注入两种方式的分离效果。结果发现, 直接注入标准溶液, 目标化合物离子峰响应极低; 标准溶液随初始流动相注入后, 目标化合物离子峰响应值较高。

2.3 提取溶剂的选择

常用的水产品提取溶剂有乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷及其混合溶剂。本试验比较了乙腈、丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯和含 0.1% (v/v) 乙酸的乙酸乙酯作

为提取剂时, 克氏原螯虾中二甲戊灵的提取效率 (见图 1)。结果表明, 乙腈、丙酮能从样品中提取大量色素等杂质, 不利于后续净化, 难以获得较高的回收率; 二氯甲烷难以溶解水产品中的脂肪, 提取液浑浊; 乙酸乙酯作为提取溶剂时, 提取液澄清透明, 获得的色谱图杂峰较少, 且色谱峰形较好, 但回收率仍不理想; 采用含 0.1% (v/v) 乙酸的乙酸乙酯作为提取溶剂时, 得到的色谱图峰形好, 灵敏度高, 且二甲戊灵的回收率较高, 满足分析要求。因此最终选择含 0.1% (v/v) 乙酸的乙酸乙酯作为提取溶剂。

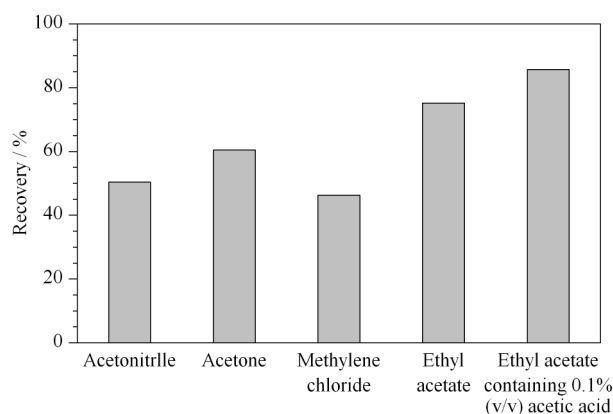


图 1 不同提取溶剂对克氏原螯虾中二甲戊灵回收率的影响

Fig. 1 Effects of different extraction solvent on the recoveries of pendimethalin in *Procamburus clarkii* samples

2.4 净化条件的优化

分别使用弗罗里硅柱、酸性氧化铝柱、GCB、PSA、酸性氧化铝柱+GCB、C18+PSA、C18+GCB 净化提取浓缩物。如图 2 所示, 采用酸性氧化铝柱且

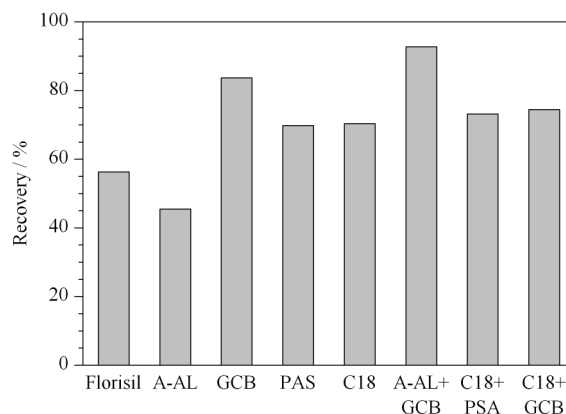


图 2 不同净化材料对克氏原螯虾中二甲戊灵回收率的影响

Fig. 2 Effect of different purification materials on the recoveries of pendimethalin in *Procamburus clarkii* samples

A-AL: acidic alumina; GCB: graphitized carbon black; PSA: primary secondary amine.

配合使用 GCB 吸附剂净化时效果最佳,回收率最高。

2.5 溶解液的选择

试验比较了甲醇、含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇-水(8:2, v/v) 分别溶解残渣后目标化合物的色谱响应。采用甲醇溶解残渣时二甲戊灵的色谱峰峰形不对称,且灵敏度较低;采用含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇-水(8:2, v/v) 溶解残渣,二甲戊灵的色谱峰峰形尖锐,灵敏度高。因此选用含 0.1% (v/v) 乙酸的甲醇-水(8:2, v/v) 作为旋蒸后的溶解液。

2.6 线性范围和检出限

在优化的条件下对系列标准工作液进行测定,以二甲戊灵的色谱峰面积为纵坐标(Y)、对应的质量浓度为横坐标(X , mg/L) 绘制标准曲线。结果表明,二甲戊灵在 1.0~20.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性相关,线性方程为 $Y=24.5 \times 10^4 X - 39.1 \times 10^4$,相关系数(R^2) 为 0.996 0。

在不含目标化合物的空白克氏原螯虾中添加一定含量的二甲戊灵标准溶液,并对其进行分析,根据 7 个空白样品基线噪声的平均值计算方法的检出限($S/N=3$) 和定量限($S/N=10$),分别为 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.6 $\mu\text{g/kg}$,满足残留分析的要求。

2.7 基质效应

在优化的条件下,对 1.3 节配制的克氏原螯虾空白基质匹配标准溶液进行测定,按 2.6 节描述绘制空白基质匹配标准曲线。用基质匹配标准曲线与溶剂标准曲线的斜率之比(M) 对基质效应进行评价,其比值越接近 1,说明基质效应越小,反之亦然。结果表明, $M=1.13$,说明基质效应较小,因此可直接采用溶剂标准曲线进行定量。

2.8 回收率和精密度

向克氏原螯虾样品中分别添加低、中、高(1.2、6.0、12.0 $\mu\text{g/kg}$) 3 个水平的二甲戊灵标准品,每个添加水平同时做 7 个平行样品,进行加标回收试验。结果表明,加标样品中二甲戊灵的回收率为 63.3%~104.7%,相对标准偏差为 6.9%~14.5% ($n=7$)。

2.9 实际样品测定

在稻虾综合种养试验地随机抽检 20 组克氏原螯虾样品,按 1.2 节和 1.4 节进行前处理和分析。结果表明,有两个样品检出二甲戊灵,含量分别为 0.803 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.711 $\mu\text{g/kg}$,检出率仅为 13.3%。二甲戊灵标准溶液(10 $\mu\text{g/L}$)、空白克氏原螯虾样品和加标克氏原螯虾样品(2 $\mu\text{g/kg}$) 的色谱图见图 3。

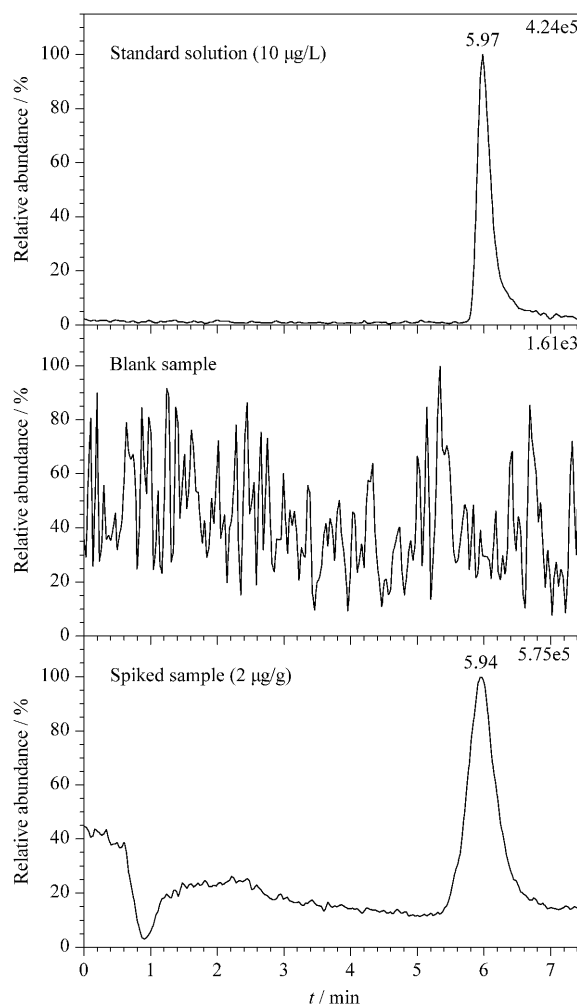


图3 二甲戊灵标准溶液、空白克氏原螯虾和加标克氏原螯虾样品的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of pendimethalin in a standard solution, a blank *Procambarus clarkia* sample and a spiked *Procambarus clarkia* sample

3 结论

本实验建立了高效液相色谱-三重四极杆质谱测定克氏原螯虾中二甲戊灵残留的分析方法。该方法前处理操作简单,回收率高,重复性好,灵敏度高,适合克氏原螯虾中二甲戊灵物质的残留分析。

参考文献:

- [1] Zhou T Y. [Master Dissertation]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014
- [2] 周天倚. 硕士学位论文. 长沙: 湖南农业大学, 2014
- [3] Sondhia S. Toxicol Environ Chem, 2009, 91(3): 425
- [4] Guo Q L, Cui S H, Zhang X M, et al. Jiangsu Agricultural Science, 2013, 41(7): 307
- [5] 郭庆龙, 崔淑华, 张晓梅, 等. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 307

- [4] Li W H, Wang X D, Chen L, et al. Jiangsu Agricultural Science, 2014, 42(3) : 252
李文华, 王学东, 陈莉, 等. 江苏农业科学, 2014, 42(3) : 252
- [5] Yu L X, Liang L, Zhang A J, et al. Pesticide Science and Administration, 2015, 36(5) : 35
于乐祥, 梁林, 张爱娟, 等. 农药科学与管理, 2015, 36(5) : 35
- [6] Jia H J, Jin Q, Liang Y, et al. Journal of Shihezi University: Natural Science, 2015, 33(6) : 689
贾会娟, 金前, 梁友, 等. 石河子大学学报: 自然科学版, 2015, 33(6) : 689
- [7] Liu Z J. Pestic Market News, 2004(22) : 14
刘志俊. 农药市场信息, 2004(22) : 14
- [8] Huang B, Cao A C, Li J, et al. Chinese Journal of Pesticide Science, 2017, 19(1) : 125
黄斌, 曹勘程, 李君, 等. 农药学学报, 2017, 19(1) : 125
- [9] Yang X, Zhang H, Liu Y, et al. Food Chem, 2011, 127(2) : 855
- [10] Cervera M I, Portolés T, Pitarch E, et al. J Chromatogr A, 2012, 1244: 168
- [11] Wang Y, Jin H Y, Ma S C, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218(2) : 334
- [12] Lim H H, Park T J, Lee S H, et al. Anal Sci Tech, 2017, 30(4) : 194