

液相色谱-串联质谱法测定蔬菜和水果中硝苯菌酯的残留量

张志勇¹, 单炜力², 简 秋², 段丽芳², 沈 燕¹, 刘贤金^{1*}

(1. 江苏省食品质量安全重点实验室, 农业部食品安全监控重点开放实验室,
江苏 南京 210014; 2. 农业部农药检定所, 北京 100125)

摘要: 建立了一种通过检测硝苯菌酯(2,4-二硝基-6-(1-甲基庚基)苯酚 crotonate, 2,4-DNOPC) 相应的水解产物 2,4-二硝基-6-(1-甲基庚基)苯酚(2,4-二硝基-6-(1-甲基庚基)phenol, 2,4-DNOP) 来测定蔬菜和水果中 2,4-DNOPC 残留量的液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS) 检测方法。蔬菜和水果样品用丙酮-甲醇-盐酸的混合液进行液-液分配提取, 在碱性条件下超声水解后再进行液-液分配提取, 然后进行 LC-MS/MS 测定。2,4-DNOPC 在 6 种蔬菜和水果中的回收率试验结果表明 2,4-DNOPC 在甘蓝中的添加回收率为 89.7%~93.3%, 相对标准偏差(RSD) 为 6.3%~8.5%; 在黄瓜中的添加回收率为 87.7%~95.1%, RSD 为 5.8%~10.4%; 在番茄中的添加回收率为 89.3%~96.0%, RSD 为 6.8%~9.2%; 在苹果中的添加回收率为 92.0%~98.3%, RSD 为 5.1%~10.3%; 在梨中的添加回收率为 89.0%~95.0%, RSD 为 5.3%~10.2%; 在葡萄中的添加回收率为 81.2%~95.8%, RSD 为 5.8%~10.4%。2,4-DNOPC 在 6 种蔬菜和水果的最低检测浓度均为 0.01 mg/kg。该检测方法样品前处理简单、快速, 分析时间短, 灵敏度、准确度和精密性均符合农药残留检测要求, 适用于蔬菜和水果中硝苯菌酯残留量的检测。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 硝苯菌酯; 蔬菜; 水果

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)09-0962-04

Determination of meptyldinocap residues in vegetable and fruit by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Zhiyong¹, SHAN Weili², JIAN Qiu², DUAN Lifang², SHEN Yan¹, LIU Xianjin^{1*}

(1. Key Laboratory of Food Safety and Quality of Jiangsu Province, Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Management of Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China;

2. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100125, China)

Abstract: A method was developed for the determination of the residues of meptyldinocap (2,4-dinitro-6-(1-methylheptyl) phenyl crotonate, 2,4-DNOPC) as 2,4-dinitrooctylphenol (2,4-dinitro-6-(1-methylheptyl) phenol, 2,4-DNOP), which is a hydrolysate of 2,4-DNOPC, in six vegetable and fruit by using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). The residues of 2,4-DNOPC in vegetable and fruit samples were extracted by the mixture of acetone, methanol and hydrochloric acid, then extracted by liquid-liquid partitioning, hydrolyzed under alkaline condition with ultrasonication, and extracted again by liquid-liquid partitioning, then analyzed by using LC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode via negative electrospray ionization with an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column. The method was validated at four fortification levels in vegetable and fruit. The validation results were as follows: the recoveries of 2,4-DNOPC in cabbages were from 89.7% to 93.3% (the relative standard deviations (RSD) of 6.3% - 8.5%), in cucumbers from 87.7% to 95.1% (RSD of 5.8% - 10.4%), in tomatoes from 89.3% to 96.0% (RSD of 6.8% - 9.2%), in apples from 92.0% to 98.3% (RSD of 5.1% - 10.3%), in pears from 89.0% to 95.0% (RSD of 5.3% - 10.2%), in grapes from 81.2% to 95.8% (RSD of 5.8% - 10.4%). The

* 通讯联系人: 刘贤金, 博士, 研究员, 主要从事农产品安全性研究. E-mail: jaasliu@jaas.ac.cn.

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(11)4069)。

收稿日期: 2012-06-06

limits of quantification of 2,4-DNOPC in all the test samples were 0.01 mg/kg. The results showed that the method is simple, rapid, and is characterized with acceptable sensitivity and accuracy to meet the requirements of the pesticide residue analysis. This method is applicable to confirm the residues of mepyldinocap in vegetable and fruit samples.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); mepyldinocap; vegetable; fruit

硝苯菌酯(mepyldinocap, 2-异辛基-4,6-二硝基苯基-2-丁烯酸酯(2,4-dinitro-6-(1-methylheptyl)phenyl crotonate, 2,4-DNOPC), CAS: 131-72-6) 为非内吸性杀螨剂,同时具有一定的接触性杀菌作用。该药由美国陶氏益农公司开发,并正在中国登记。硝苯菌酯是从杀菌(螨)剂敌螨普(dinocap, CAS: 39300-45-3) 6种异构体中分离出来的具有最高生物活性的异构体之一^[1]。主要用于防治苹果、柑橘、梨、葡萄、黄瓜、甜瓜、西瓜、南瓜、草莓、蔷薇和观赏植物的红蜘蛛和白粉病,对桑树白粉病和茄子红蜘蛛都有良好的防治效果,同时还具有杀螨卵的作用^[2-4]。目前欧盟已制定了多种农产品中硝苯菌酯的最大残留限量(MRL),如在柑橘、苹果、梨中的 MRL 为 0.05 mg/kg,在葡萄中的 MRL 为 1 mg/kg,在草莓中的 MRL 为 3 mg/kg^[5]。目前我国还没有制定农产品中该种农药的 MRL。由于该药具有热不稳定性 and 化学不稳定性,因此用气相色谱-质谱(GC-MS)分析时选择性、精密度和重现性较差;由于电喷雾离子化程度较低,在采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析时灵敏度也不尽理想^[6]。敌螨普和硝苯菌酯在农产品中的残留量分析方法目前主要采用有机溶剂提取后,再水解成对应的酚,通过采用 LC 或 LC-MS/MS 分析其对应的水解产物酚的残留量,从而计算其母体的残留量^[7-10]。图 1 为 2,4-DNOPC 在碱性、超声条件下转化为对应产物 2,4-二硝基-6-(1-甲基庚基)苯酚(2,4-dinitro-6-(1-methylheptyl)phenol, 2,4-DNOP) 的反应式,而农产品中硝苯菌酯

的浓度与其对应的酚的浓度的转化计算公式为:
 $C_{2,4-DNOPC} = 1.23 C_{2,4-DNOP}$ ^[1]。国外研究者只报道了硝苯菌酯在芒果、石榴和土壤中的残留检测方法,本文建立了一种通过检测甘蓝、黄瓜、番茄、苹果、梨和葡萄等 6 种蔬菜和水果样品中 2,4-DNOP 的残留量来计算母体化合物 2,4-DNOPC 的方法。该方法具有测定操作简便、结果可靠、快速、灵敏、精密度和回收率高的特点,能完全满足该药在农产品安全监测和农药登记残留试验中的要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液相色谱-质谱联用仪(Agilent 1200SL G6410A)、搅拌机(SZ-120,广东美的生活电器制造有限公司)、24 孔氮吹仪(N-EVAP112,德国邦德公司)、匀浆机(IKAT18,德国 IKA 公司)、电子天平(JY2002,上海精密科学仪器有限公司)、超声波清洗器(KQ-600E,昆山市超声仪器有限公司)。

2,4-DNOPC 和 2,4-DNOP 标准品(含量均为 98%,美国陶氏益农公司提供);甲醇、丙酮、正己烷、乙酸乙酯、正己烷、乙腈(HPLC 纯,德国 MERCK 公司)、氢氧化钠、浓盐酸、硫酸钠、冰醋酸、无水硫酸钠均为国产分析纯。

1.2 标准溶液的配制

分别精确称取 2,4-DNOPC 和 2,4-DNOP 标准品(精确至 0.1 mg),以甲醇溶解定容至 50.0 mL,配成标准母液。用流动相甲醇-水-甲酸(90:10:0.1, v/v/v)稀释至 100 μg/L,再分别用流动相、不同蔬菜和水果空白基质提取液逐级稀释,配制成 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 和 5 mg/L 系列质量浓度的标准工作液。不同质量浓度的 2,4-DNOPC 标准溶液用于添加回收试验,2,4-DNOP 标准溶液用于制作标准曲线和定量检测。

1.3 样品前处理

由于不能直接检测农产品中硝苯菌酯母体,因此采用提取、液-液分配提取后水解成相应的酚(2,4-DNOP),然后再经过液-液分配提取后直接检测 2,4-DNOP。

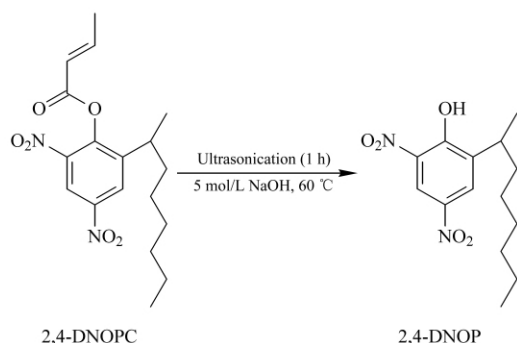


图 1 2,4-DNOPC 水解为 2,4-DNOP 的反应式
 Fig. 1 Conversion of 2,4-DNOPC to 2,4-DNOP

1.3.1 提取

称 10.0 g 样品于聚乙烯瓶中,加入丙酮-甲醇-4 mol/L 盐酸(100:10:5, v/v/v) 共 50 mL,匀浆混匀,用约 5 mL 提取液淋洗混匀器探头,将样品离心,收集上清液。再加入 30 mL 提取液至残留物中浸泡,样品离心后,合并上清液。在量筒中用提取液将合并的上清液定容至 100 mL。取 50 mL 转移到一圆形烧瓶,于 35 °C 下旋转蒸发浓缩至低于 1 mL。

1.3.2 第一次液-液分配提取

将超纯水(20 mL)、1 mol/L HCl(2 mL) 和 10 mL 正己烷-乙酸乙酯(50:50, v/v) 混合液与样品提取溶液混合,剧烈振荡直至分层。上层有机相转入一圆形烧瓶中,再用 10 mL 的正己烷-乙酸乙酯的混合液重复提取两次,合并有机相于圆形烧瓶中。于 35 °C 下旋转蒸发除去溶剂。

1.3.3 水解

在蒸干的残留物中添加甲醇(10 mL) 和 5 mol/L 氢氧化钠(5 mL),用超声波在 60 °C 水浴中水解 60 min,并转移至聚丙烯管。

1.3.4 第二次液-液分配提取

样品冷却至室温后,加入超纯水(8 mL)、浓盐酸(3 mL) 和乙酸乙酯(10 mL)。剧烈振荡约 60 s 分层。用带有玻璃棉的漏斗将上层乙酸乙酯相转移至装有约 75 g 硫酸钠(用约 20 mL 乙酸乙酯预湿)的锥形瓶中。用 10 mL 的乙酸乙酯重复两次,合并有机相。用约 10 mL 乙酸乙酯冲洗硫酸盐,合并有机相,于 55 °C 左右旋转蒸发至干;用 1 mL 含 0.1% 冰醋酸的甲醇-水(70:30, v/v) 混合液溶解残留物并定容,然后用 LC-MS/MS 定量分析。

1.4 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm); 保护柱: ZORBAX SB-Aq Narrow-Bore 柱(12.5 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-甲酸(90:10:0.1, v/v/v) 流速 0.42 mL/min; 进样体积: 3.0 μL。

1.5 质谱条件

电喷雾离子源,负离子电离(ESI⁻) 模式;离子源温度 350 °C;雾化气压力 2.4×10^5 Pa;毛细管电压为 4.0 kV;去溶剂气流速 600 L/h;脱溶剂气温度 350 °C;干燥气流速 10 L/min;在分析过程中,采用多反应监测(MRM) 模式,以保留时间和离子对信息比较进行定性分析;以母离子和响应值最高的子离子进行定量分析。2,4-DNOP 的保留时间为 2.7 min,母离子为 m/z 295.3,子离子为 m/z 134.1(碰撞电压为 55 V) 和 m/z 193.1(碰撞电压为 25 V),其中 m/z 193.1 为定量离子。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

由于硝苯菌酯在水中的溶解度较小(0.151 mg/L, 20 °C),而在丙酮、乙酸乙酯、二氯乙烷、二甲苯、正庚烷和甲醇中的溶解度分别为 >252 g/L、>256 g/L、>252 g/L、>256 g/L、>251 g/L、>253 g/L(25 °C)^[11,12]。因此本研究选择丙酮-甲醇-盐酸的混合液作为提取蔬菜和水果样品中的硝苯菌酯的提取溶剂,再采用水和乙酸乙酯-正己烷的混合液进行液-液分配。结果表明,所选择的提取液提取效果最好,在该提取溶剂下既能得到较好的峰形、提高灵敏度,又能得到较高的回收率。

2.2 线性范围和最低检测浓度

分别用流动相(甲醇-水-甲酸(90:10:0.1, v/v/v))、甘蓝、黄瓜、番茄、苹果、梨、葡萄 6 种不同蔬菜和水果空白基质提取液配制 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 mg/L 的 2,4-DNOP 标准溶液,进样 3.0 μL,平行测定 5 次。当 2,4-DNOP 的质量浓度为 0.01 ~ 5 mg/L 时,其在流动相和不同基质中的线性回归方程见表 1。2,4-DNOPC 在上述几种蔬菜和水果中的最小检出质量为 0.007 5 ng,最低检测浓度均为 0.01 mg/kg,而文献^[1,6]报道的芒果、石榴和土壤中的 2,4-DNOPC 的最低检测浓度均为 0.025 mg/kg。用流动相配制的 2,4-DNOP 标准溶液的色谱图见图 2。

表 1 不同溶剂配制的 2,4-DNOP 标准溶液的标准曲线

Table 1 Parameters of linear curves of 2,4-DNOP made up with different matrix solvents

Solvent	Regression equation	r^2
Mobile phase	$y = 12.379x + 9586.496$	0.9963
Extract from blank cabbages	$y = 16.296x + 3646.491$	0.9989
Extract from blank cucumbers	$y = 14.384x + 6144.797$	0.9962
Extract from blank tomatoes	$y = 19.345x + 5264.431$	0.9921
Extract from blank apples	$y = 11.380x + 4611.640$	0.9927
Extract from blank pears	$y = 19.264x + 4595.922$	0.9913
Extract from blank grapes	$y = 17.452x + 5459.962$	0.9939

y: peak area; x: mass concentration, mg/L.

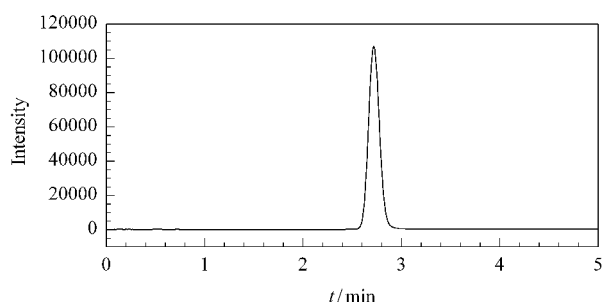


图 2 用流动相配制的 2,4-DNOP 标准溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of 2,4-DNOP standard solution made up with mobile phase

2.3 基质效应

LC-MS 分析中的基质效应最初在 1993 年被发现,当改变样品基质的种类和浓度时,待测物的电喷雾化质谱的响应值有可能会发生变化。因此美国食品药品监督管理局在 2001 年出版的《生物分析方法验证准则》中明确提出:在 LC-MS 分析方法开发和验证过程中需对基质效应进行评价。因此,本文首先研究了几种不同基质对该方法的影响。结果表明,与流动相相比,基质的存在对仪器响应有一定的影响(见表 2),但在样品检测中,不同样品的定量标准曲线的制作是采用相应的空白基质提取液制作,而且其灵敏度及检出限仍能达到残留试验的要求^[13],因此其基质效应对该方法本身影响并不大。

2.4 回收率和精密度

在 6 种蔬菜和水果空白样品中添加 2,4-

DNOPC 标准溶液后,通过检测其水解产物 2,4-DNOP 来确定其回收率,每个添加水平重复 5 次。在 6 种蔬菜和水果中分别添加 0.01、0.05、0.1 和 1.0 mg/kg 4 个水平的 2,4-DNOPC,其在甘蓝中的添加回收率为 89.7%~93.3%,相对标准偏差(RSD)为 6.3%~8.5%;在黄瓜中的添加回收率为 87.7%~95.1%,RSD 为 5.8%~10.4%;在番茄中的添加回收率为 89.3%~96.0%,RSD 为 6.8%~9.2%;在苹果中的添加回收率为 92.0%~98.3%,RSD 为 5.1%~10.3%;在梨中的添加回收率为 89.0%~95.0%,RSD 为 5.3%~10.2%;在葡萄中的添加回收率为 81.2%~95.8%,RSD 为 5.8%~10.4%(见表 2)。2,4-DNOPC 在 6 种蔬菜和水果中的添加回收率和 RSD 均符合 NY/T 788-2004《农药残留试验准则》的要求^[13]。

表 2 2,4-DNOPC 在 6 种蔬菜和水果中的加标回收率与精密度($n=5$)

Spiked / (mg/kg)	Cabbage		Cucumber		Tomato		Apple		Pear		Grape	
	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD
0.01	89.7	6.3	91.6	10.4	91.3	8.4	92.0	10.3	91.9	9.4	86.7	9.1
0.05	90.2	8.4	89.4	5.8	94.5	9.2	93.4	6.6	95.0	5.3	95.8	10.4
0.1	93.3	8.1	87.7	7.6	96.0	6.8	98.3	7.8	89.0	10.2	81.2	5.8
1.0	90.7	8.5	95.1	6.5	89.3	7.6	95.9	5.1	94.4	8.6	93.5	6.6

2.5 实际样品的测定

采用本文建立的方法对江苏省南京市蔬菜和水果批发场所销售的 10 批次甘蓝、黄瓜、番茄、苹果、梨和葡萄 6 种蔬菜和水果样品中的 2,4-DNOPC 残留量进行了分析。结果表明,所有蔬菜和水果样品中均未检出 2,4-DNOPC(<0.01 mg/kg)。

3 结论

由于 2,4-DNOPC 具有特殊的理化性质,采用传统的仪器分析方法如 GC-MS、LC-MS 方法等对其母体都难以检测。本文建立了一种通过检测其相应的水解产物酚(2,4-DNOP),再计算其母体化合物 2,4-DNOPC 含量的检测方法。该方法具有重现性和分离效果好、线性范围宽、回收率高、精密度好等特点,适用于蔬菜和水果中 2,4-DNOPC 的残留监测及该药的残留登记试验,并为制定硝苯菌酯在农产品中的残留检测国家标准方法奠定了基础。

参考文献:

[1] Mandal S, Kanrar B, Das S, et al. J Agric Food Chem, 2010, 58: 8911

- [2] Černohlávková J, Jarkovsky J, Hofman J. Ecotoxicol Environ Saf, 2009, 72(1): 80
- [3] Sedláčková B, Lebeda A. Phytoparasitica, 2008, 36(3): 272
- [4] Food and Agriculture Organization. Joint Meeting on Pesticide Residues Report and Evaluation. [2009-04-04]. http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticide/JMPR/Download/98_eva/dinocap.pdf
- [5] European Union EC 396/2005
- [6] Banerjee K, Dasgupta S, Jadhav M R. J AOAC Int, 2010, 93(6): 1957
- [7] Schenk F J, Hennessy M K. J Liq Chromatogr Rel Technol, 1993, 16: 755
- [8] Liang D, Shiga N, Matano O, et al. J Chromatogr, 1987, 387: 385
- [9] Johansson C E. Pest Sci, 1975: 6: 97
- [10] Jansson C, Pihlstrom T, Osterdahl B G, et al. J Chromatogr A, 2004, 1023: 93
- [11] Food and Agriculture Organization. Joint Meeting on Pesticide Residues Report and Evaluation. [2009-09-23]. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation10/Meptyldinocap.pdf
- [12] United States Environmental Protection Agency. Fact Sheet for Meptyldinocap. [2009-09]. <http://www.epa.gov/oppr001/factsheets/meptyldinocap.pdf>
- [13] NY/T 788-2004