

• 研究论文 •

超高效液相色谱-串联质谱法 分析乙螨唑在柑桔和土壤中的残留消解动态

王蒙岑¹, 吴慧明¹, 刘少颖¹, 求银园², 朱烨操², 朱国念^{*1}

(1. 浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029; 2. 温州医学院 环境与公共卫生学院, 浙江 温州 325035)

摘要:应用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)建立了乙螨唑在柑桔和土壤中的残留的分析方法,并研究了田间试验条件下乙螨唑在柑桔和土壤中的消解动态。样品采用乙腈提取,硅胶柱净化, UPLC-MS/MS检测, 外标法(ESTD)定量。在 0.002~1 mg/L 质量浓度范围内,乙螨唑的仪器响应值与质量浓度呈良好线性关系,相关系数为 0.998 9。该方法的最小检出量为 6.0×10^{-6} μg 乙螨唑在柑桔和土壤中的最低检测浓度均为 0.002 mg/kg。当乙螨唑在柑桔和土壤中的添加水平为 0.002~1 mg/kg 时,平均回收率为 87.3%~98.4%,相对标准偏差在 5.5%~8.6% 之间。消解动态试验表明,乙螨唑的消解动态曲线符合一级动力学方程,在柑桔和土壤中的半衰期分别为 5.6~7.6 d 和 5.3~8.6 d。

关键词:乙螨唑; 柑桔; 土壤; 残留; 消解动态; 超高效液相色谱-串联质谱

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2009.04.09

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)04-0456-06

Residue Decline Dynamics of Etoxazole in Orange and Soil by UPLC-MS/MS

WANG Meng-cen¹, WU Huiming¹, LIU Shao-ying¹, QIU Yin-yuan²,
ZHU Yecao², ZHU Guonian^{*1}

(1. Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029 China;

2. School of Environmental Science and Public Health, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035 Zhejiang Province, China)

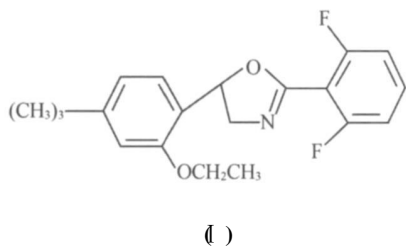
Abstract A rapid, accurate and sensitive method has been developed to determine etoxazole residues in orange and soil by UPLC-MS/MS. The decline dynamics of etoxazole residues in orange and soil were studied under the condition of field experiment. The samples were extracted by acetonitrile, followed by clean-up on silica gel cartridge and analyzed by UPLC-MS/MS. External reference method was used for quantitative determination. The linearity was satisfied ($r = 0.9989$) in the concentration range of 0.002~1 mg/L. The limit of detection was 6.0×10^{-6} μg , and the limit of quantification in orange and soil was 0.002 mg/kg. The average fortified recoveries varied from 87.3% to 98.4% with the coefficient of variation of 5.5%~8.6%. The study of residue dynamics indicated that the curve of decline accorded with the first-order kinetics equation, and the half-life of etoxazole in orange and soil were 5.6~7.6 d and 5.3~8.6 d, respectively.

Key words etoxazole; orange; soil; residues; decline dynamics; UPLC-MS/MS

收稿日期: 2009-06-12 修回日期: 2009-07-23

作者简介: 王蒙岑(1984-),男,浙江台州人,硕士研究生, E-mail: wmc163@163.com; * 通讯作者(Author for correspondence): 朱国念(1957-),男,浙江诸暨人,教授,博士生导师,主要从事农药残留分析和农药环境毒理研究,联系电话: 0571-86971220, E-mail: zhuguan@zju.edu.cn

乙螨唑 (etoxazole) 化学名称为 (R, S) - 5-特丁基-2-[2(2,6-二氟苯基)-4,5-二氢-1,3-噁唑-4-基]苯乙醚, 分子式: $C_{21}H_{23}F_2NO_2$, 结构式见 (I)。其难溶于水, 易溶于一般有机溶剂, 对酸不稳定, 对碱和热较稳定, 见光易分解, 在 50 °C 下避光保存 30 d 不分解^[1]。



乙螨唑为噁唑类杀虫、杀螨剂, 对叶螨的卵、幼虫和若虫均有显著的防效, 持效期长^[1]。柑桔全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor) 是柑桔上为害最严重的害虫之一, 广泛分布于我国各柑桔产区, 严重影响柑桔产量和品质, 目前广泛采用乙螨唑进行防治, 其防效明显且持效性优于哒螨灵和克螨特^[2]。

国外对乙螨唑的研究较多, 但主要集中于毒理和药理学^[3-8]。有关其残留分析方法的报道不多, 仅见 Tsukiyoka 等^[9]应用 GC/MS 建立了乙螨唑在农产品中的残留分析方法, 样品依次采用丙酮和正己烷提取, 经乙腈液-液分配和氟罗里硅土柱净化, GC/MS 检测。方法的最低检测限可达 0.002 mg/kg, 灵敏度为 GC-NPD 的 10 倍, 平均回收率达 83% 以上 (茶叶除外), 相对标准偏差小于 8%。

农药残留超标问题是影响我国柑桔出口的主要原因^[10-11]。目前我国尚未制定乙螨唑在柑桔中的残留限量标准, 有关其分析方法和消解动态方面的研究也未见报道。笔者应用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 建立了一套快速、准确、灵敏的残留分析方法, 可用于测定柑桔中乙螨唑的残留量。并通过 2008 年在浙江衢州、湖南株洲和福建漳州三地的田间试验, 研究了乙螨唑在柑桔和土壤中的残留消解动态, 以期为其安全性评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

乙螨唑 (etoxazole) 标准品 (纯度 ≥ 99.85%)

和 110 g/L 的乙螨唑悬浮剂, 由日本住友化学株式会社提供。田间试验地点为浙江衢州市、湖南株洲市和福建漳州市, 其中衢州点为黄红壤, 株洲点为红壤, 漳州点为沙质红壤, pH 值分别为 5.8、5.4 和 6.3。供试作物为柑桔。

1.2 仪器设备和试剂

Acquity UPLC-Quattro Premier XE MS/MS 及 ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) (美国 Waters 公司); DHZ-DA 大型冷冻恒温振荡器 (苏州太仓公司); R-210 旋转蒸发仪及 V-700 真空泵 (瑞士 BUCHI 公司); N-EVAP 11 氮吹仪 (杭州尔力公司); T18-Basic 高速匀浆机 (德国 KA 公司); Anke DL-5-B 离心机 (上海飞鸽公司); 玻璃层析柱 (10 mm × 400 mm) 等。

乙腈为色谱纯; 无水硫酸钠经 350 °C 灼烧 4 h 备用; 硅胶为 100~200 目, 经 130 °C 活化 2 h 于干燥器中冷却后, 经重蒸水脱活备用; 洗脱液: 石油醚-丙酮 (80:20 体积比)。其余试剂均为分析纯。

1.3 田间试验

1.3.1 试验设计 选择未施用过乙螨唑的柑桔果园中树龄为 5~10 年且长势良好的柑桔树, 每小区 2 株, 设空白对照, 小区间设保护行。药剂经稀释后, 采用机动喷雾施药 (每株 3~4 L), 空白对照喷等量清水。样品采集方法参照《农药残留试验准则》^[12] 进行。

1.3.2 柑桔消解动态试验 将 110 g/L 乙螨唑悬浮剂兑水稀释为 2 631 倍液 (38 mL 制剂兑水稀释至 100 L) 施药一次, 于柑桔结果初期施药, 分别于施药后 0 (2 h 以内)、1、3、5、7、10、14、21、28、35、50 d 采集柑桔样品。试验重复 3 次。

1.3.3 土壤消解动态试验 采用模拟试验: 在柑桔果园里选择一平整地块 (20 m²), 将与 1.3.2 节相同剂量的试验药液均匀喷至土壤表面, 采样间隔期与柑桔样品相同。

2 分析方法

2.1 样品预处理

将柑桔全果以四分法缩分, 高速捣碎后, 取 250 g 样品密封后低温保存; 将土壤样品去除残枝和碎石等杂物, 过 1 mm 筛, 按四分法缩分, 取 250 g 样品密封后低温保存。

2.2 样品提取与净化

称取 20 g 柑桔样品, 加入 50 mL 乙腈, 高速匀浆 2 min, 振荡 30 min, 3 000 r/min 下离心 3 min,

上清液转移至 150 mL 具塞量筒中,加 5 g 氯化钠和 8 g 硫酸镁,剧烈振摇 1 min,静置 15 min,取上清液 25 mL 至梨形瓶中,40 ℃ 下浓缩近干, N₂ 吹干后加入 3 mL 洗脱液,待净化。

称取 20 g 土壤样品,加入 20 mL 重蒸水浸泡 20 min,加入 50 mL 乙腈,振荡 30 min,减压抽滤,滤液转移至 150 mL 具塞量筒中。随后处理方法同柑桔样品。

称取 4 g 硅胶于 100 mL 烧杯中,加入 30 mL 石油醚,形成悬浮液,在 1 cm 直径的玻璃柱下端加入 2 cm 的无水硫酸钠,再将硅胶悬浮液移入层析柱,上端加 2 cm 无水硫酸钠,弃去 30 mL 石油醚。将待净化的残留液转移至层析柱,并分别用 4 和 10 mL 洗脱液洗涤梨形瓶,洗涤液均转移至层析柱。用 30 mL 洗脱液洗脱农药,收集流出液于 100 mL 梨形瓶中,40 ℃ 下浓缩近干, N₂ 吹干后,以乙腈定容至 10 mL,过 0.2 μm 滤膜,供测。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液-乙腈 (采用梯度洗脱,表 1); 流速 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样体积 10 μL。

表 1 超高效液相色谱的梯度洗脱

Table 1 Gradient elution of UPLC

时间 Time/ min	0.1% 甲酸水溶液 0.1% formic acid solution (V/V) /%	乙腈 Acetonitrile (V/V) /%
0	70	30
4.0	0	100
4.1	0	100
5.0	70	30

2.3.2 质谱条件 多反应监测模式 (MRM); ESI (+) 离子源; 毛细管电压 1.00 kV; 锥孔电压 40 V; 离子源温度 120 ℃; 锥孔反吹气流量 50 L/h; RF 透镜电压 0 V; 脱溶剂气温度 350 ℃, 脱溶剂气流量 500 L/h。

质量分析器 ① 低端分辨率 15 V, 高端分辨率 15 V; 离子能量 ① 0.5 入口透镜电压 1 V, 出口电压 3 V; 分析器 ② 低端分辨率 15 V, 高端分辨率 15 V; 离子能量 ② 1 Q。

乙螨唑的定量离子对 (m/z) 为 360.1/177.1, 定性离子对 (m/z) 为 360.1/140.9。母离子和子离子质谱图见图 1。

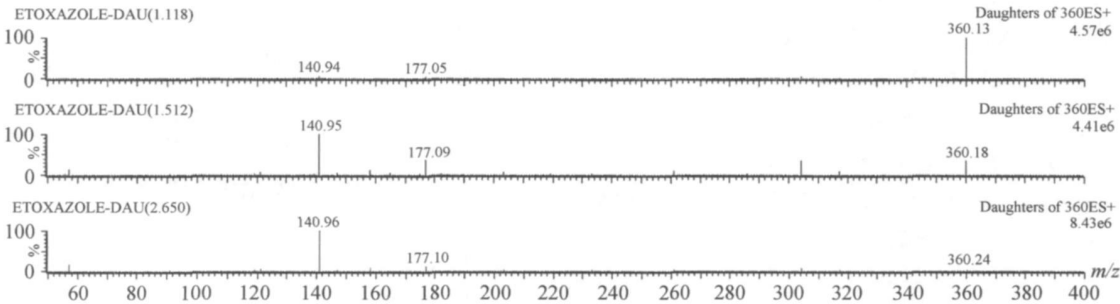


图 1 乙螨唑的母离子和子离子质谱图

Fig. 1 Mass spectrum of parent ion and daughter ion of etoxazole

2.4 标准工作曲线

准确称取乙螨唑标准品 5 mg 用乙腈溶解并定容至 10 mL, 制成标准母液。再用空白样品提取液稀释成质量浓度分别为 0.002、0.005、0.01、0.05、0.25、0.5、1 mg/L 的标准工作液进样检测。以进样浓度为 X 轴、响应值为 Y 轴得到标准工作曲线。

2.5 结果计算

采用外标法定量^[13]计算。添加回收率和样品消解动态均采用标准曲线法定量计算。

3 结果与分析

3.1 方法的灵敏度及线性范围

在本研究条件下, 乙螨唑的保留时间约为 3.7 min, 仪器的最小检出量为 6.0×10^{-6} μg。在 0.002~1 mg/L 质量浓度范围内的标准曲线方程为 $Y = 961.626X + 1.572.9$, 相关系数 $r = 0.998.9$ 。表明乙螨唑在 0.002~1 mg/L 质量浓度范围内的仪器响应值与质量浓度呈良好线性关系。

3.2 方法的准确度、精密度和最低检测浓度

取全果和土壤样品,添加系列浓度的乙螨唑标准溶液,每浓度重复5次,测定方法的回收率。结果(见表2)显示,添加水平为0.002~1 mg/kg时,乙螨唑在柑桔和土壤中的平均回收率分别为

87.3%~97.6%和94.1%~98.4%,相对标准偏差分别为6.7%~8.6%和5.5%~6.9%。柑桔和土壤中的最低检测浓度均为0.002 mg/kg说明所建立方法的准确度和精密度均较好,符合农药残留分析的要求^[14]。相关谱图见图2~6。

表2 乙螨唑在柑桔和土壤中的添加回收率

Table 2 Average fortified recovery of etoxazole in orange and soil

添加水平 Fortified level/ (mg/kg)	土壤 Soil		柑桔 Orange	
	平均回收率 Average recovery /%	相对标准偏差 RSD /%	平均回收率 Average recovery /%	相对标准偏差 RSD /%
0.002	94.1	5.5	97.6	8.6
0.1	98.4	6.9	94.6	6.7
1	95.8	5.6	87.3	7.7

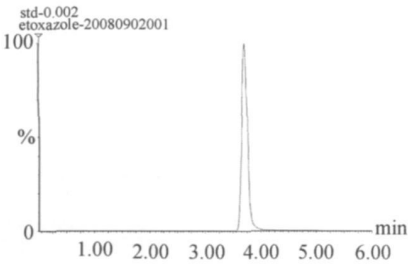


图2 乙螨唑标准品色谱图(0.002 mg/L)

Fig.2 Chromatogram of etoxazole standard sample(0.002 mg/L)

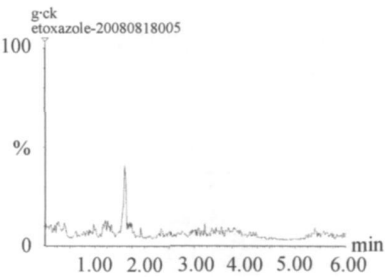


图5 柑桔空白样品色谱图

Fig.5 Chromatogram of blank orange sample

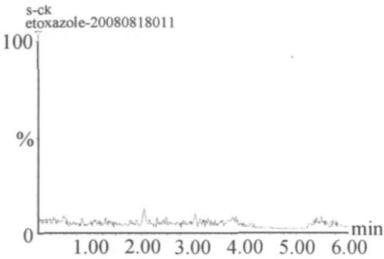


图3 土壤空白样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of blank soil sample

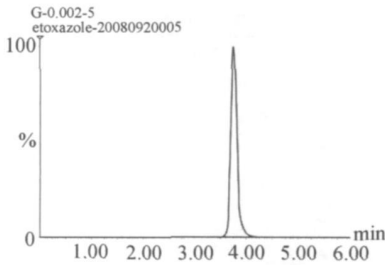


图6 柑桔样品0.002 mg/kg水平添加回收色谱图

Fig.6 Chromatogram of fortified recovery of etoxazole in orange sample (0.002 mg/kg)

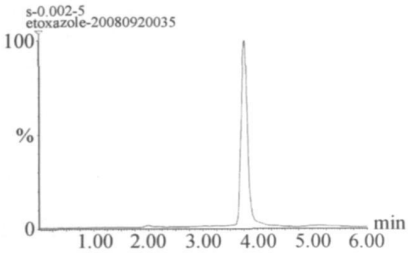


图4 土壤样品0.002 mg/kg水平添加回收色谱图

Fig.4 Chromatogram of fortified recovery of etoxazole in soil sample (0.002 mg/kg)

3.3 乙螨唑在柑桔和土壤中的消解动态

消解动态试验结果(表3)表明,乙螨唑在柑桔和土壤中的残留量随时间延长而逐渐降低。对试验结果进行回归分析,得到一系列的消解动态参数(表4),发现施药后间隔时间与乙螨唑的残留量成指数关系,消解动态曲线(图7)符合一级动力学方程。

表 3 乙螨唑在柑桔和土壤中的残留量

Table 3 The residual level of etoxazole in orange and soil

采样时间 Sampling time/d	土壤中残留量 Residue in soil/(mg/kg)			柑桔中残留量 Residue in orange/(mg/kg)		
	衢州 Quzhou	株洲 Zhuzhou	漳州 Zhangzhou	衢州 Quzhou	株洲 Zhuzhou	漳州 Zhangzhou
0	0.637	0.781	0.888	0.043	0.038	0.036
1	0.411	0.452	0.507	0.040	0.036	0.025
3	0.359	0.450	0.376	0.038	0.024	0.017
5	0.300	0.228	0.230	0.018	0.013	0.015
7	0.181	0.137	0.192	0.009	0.012	0.010
10	0.130	0.129	0.107	0.008	0.011	0.008
14	0.086	0.082	0.085	0.006	0.005	0.006
21	0.085	0.063	0.078	0.005	0.003	0.004
28	ND	0.011	0.058	ND	ND	0.002
35	ND	ND	0.033	ND	ND	ND
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注: ND 表示残留量低于最低检测浓度。Note: ND means not detected.

表 4 乙螨唑在柑桔和土壤中的消解动态

Table 4 The decline dynamics of etoxazole in orange and soil

样品类型 Sample type	试验地点 Trial location	消解动态方程 Decline dynamics equation	相关系数 Correlation coefficient r	半衰期 Half-life/d
土壤 Soil	衢州 Quzhou	$C_t = 0.459 6e^{-0.098 5t}$	0.936 6	7.0
	株洲 Zhuzhou	$C_t = 0.546 9e^{-0.131 9t}$	0.966 9	5.3
	漳州 Zhangzhou	$C_t = 0.429 8e^{-0.080 4t}$	0.924 5	8.6
柑桔 Orange	衢州 Quzhou	$C_t = 0.035 9e^{-0.113 7t}$	0.913 6	6.1
	株洲 Zhuzhou	$C_t = 0.033 3e^{-0.122 8t}$	0.976 6	5.6
	漳州 Zhangzhou	$C_t = 0.024 8e^{-0.091 2t}$	0.973 1	7.6

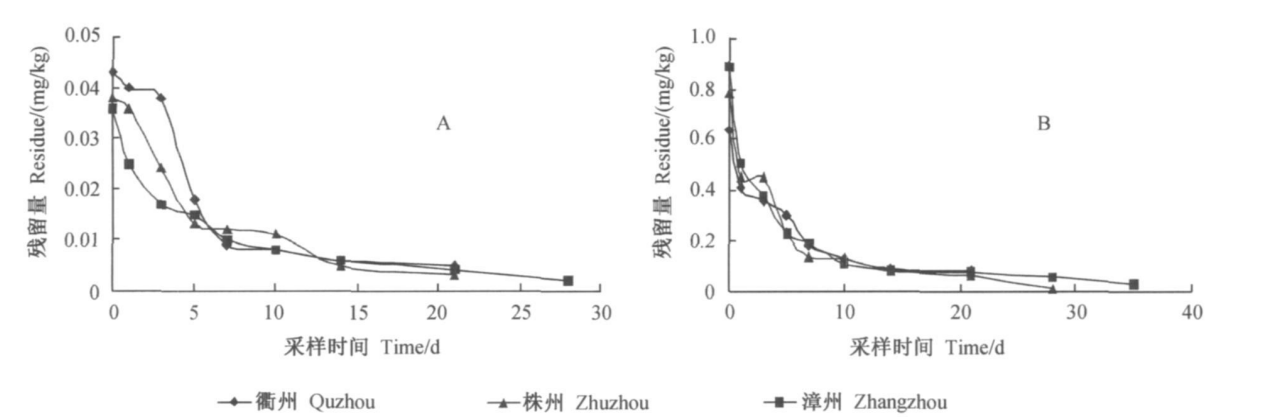


图 7 乙螨唑在柑桔 (A)和土壤 (B)中的消解动态曲线

Fig. 7 Decline dynamics curve of etoxazole in orange (A) and soil (B)

4 结论与讨论

在分析方法研究中,对 UPLC-MS/MS 各项参数进行了优化。通过筛选多种流动相体系和配比的试验,确定乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相,流

动相中加入的甲酸显著提高了质子化效率,并通过调整流速和梯度洗脱等条件,实现了目标峰和干扰峰的良好分离并使峰形得到改善。每个样品的分析时间仅需 6 min,节省了分析时间和试剂消

耗量。在质谱调谐中,采用流动注射泵连续进样,以全扫描模式确定乙螨唑的母离子 m/z 为 360.1,再在子离子扫描模式下对母离子碰撞电压进行优化,确定最佳碰撞电压为 25 V,以及 m/z 177.1 和 140.9 的子离子为特征碎片离子(见图 1)。最后对其余各项参数进行微调,使检测条件达到最佳。本研究所建立方法的灵敏度、准确性及精密度均较好,为监测乙螨唑在柑桔和土壤中的残留量提供了一个快速、准确、灵敏的分析方法。

虽然 Tsukidaka 等^[9]报道的乙螨唑的 GC/MS 分析方法的灵敏度和精密度都较高,适用于多种类型样品的分析(其中茶叶样品的添加回收率偏低),但样品的前处理步骤较繁琐。同时 GC-MS 中有来自柱流失、热解、吸附、记忆效应、化学反应等噪声存在,使得谱图本底值高且不稳定,这也是目前 GC-MS 分析中普遍存在的问题。相比之下,笔者应用 UPLC-MS/MS 所建立的分析方法,其前处理步骤更为简便(乙腈提取一次、硅胶柱净化)且分析时间更短,目标物在质谱第一分析器分离后,只选择需鉴定的离子进入碰撞室,最后以质谱为鉴定器,有效避免了噪声干扰,提高了灵敏度。UPLC 实现了在分析速度、分辨率和分离度三方面的极大提高,MS/MS 有效地避免了噪声干扰且灵敏度高,在实现定量结果的准确性和定性结果的可靠性上更具有优势。

消解动态试验结果表明,乙螨唑在柑桔和土壤中的残留量随时间延长而逐渐降低,消解动态曲线符合一级动力学方程。乙螨唑在衢州、株洲和漳州三地柑桔中的半衰期($T_{1/2}$)分别为 6.1、5.6 和 7.6 d,在土壤中的半衰期分别为 7.0、5.3 和 8.6 d。根据文献[15],乙螨唑在土壤中属易降解性农药。

消解动态各项参数表明,乙螨唑在 3 个试验点的消解速率存在一定差异,与 3 种土壤的 pH 值呈正相关,这正好符合乙螨唑在酸性条件下相对不稳定的特性。当然也不排除 3 个试验点之间气候(光照、气温、降雨量等)及土壤环境其他参数(土壤有机质含量等)差异的影响,因此还有待于结合单因子模拟试验,进一步研究影响乙螨唑消解速率的主要因素。

参考文献:

[1] ZHANG Yibing(张亦冰). 噁唑类杀虫杀螨剂 etoxazole

[J]. World Pestic(世界农药), 1999, 21(5): 61.

- [2] WANG Xue-gui(王学贵), ZHANG Min(张敏), JIANG Su-rong(蒋素蓉). 乙螨唑及其复配制剂防治柑桔全爪螨的田间试验初报 [J]. Modern Agrochem(现代农药), 2005, 4(3): 33-35
- [3] SEVGILER Y, ORUÇ E, ÜNER N. Evaluation of Etoxazole Toxicity in the Liver of Oreochromis niloticus [J]. Pestic Biochem Physiol, 2004, 78: 1-8.
- [4] ÜNER N, ORUÇ E, SEVGILER Y. Oxidative Stress-related and ATPase Effects of Etoxazole in Different Tissues of Oreochromis niloticus [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2005, 20: 99-106
- [5] ÜNER N, ORUÇ E, SEVGILER Y. Neurotoxicity Evaluation of the Organofluorine Pesticide Etoxazole in the Brain of Oreochromis niloticus [J]. Drug Chem Toxicol, 2006, 29(2): 157-165.
- [6] RENCÜZOĞULLARIE, İLAHB, KAYRALDIZ A, et al. The Genotoxic Effect of the New Acaricide Etoxazole [J]. Russ J Genet, 2004, 40(11): 1300-1304
- [7] NAUEN R, SMAGGHE G. Mode of Action of Etoxazole [J]. Pestic Manag Sci, 2006, 62: 379-382
- [8] UESUGIR, GOKA K, OSAKABE M. H. Genetic Basis of Resistances to Chlorfenvinpyr and Etoxazole in the Two-spotted Spider Mite [J]. J Econ Entomol, 2002, 95(6): 1267-1274.
- [9] TSUKIDAKA T, TERASAWA J, SATO M. Determination of Etoxazole in Agricultural Products by GC/MS [J]. Bull Nagano Res Inst Health Pollut, 2002(24): 4-8.
- [10] WEIQiwen(魏启文), CUIYehuan(崔野韩), HEYibing(何艺兵), et al. A Linenarius Codex of China and International [M]. Beijing(北京): World Knowledge Express(世界知识出版社), 2005: 1-13
- [11] JIANG Fulin(姜福林), ZHANG Hua(张华), SHI Taiyuan(石太渊), et al. 果蔬饮料现状及市场前景调查研究报告 [J]. Liaoning Agric Sci(辽宁农业科学), 2003, (6): 15-18.
- [12] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(中华人民共和国农业部). NY/T 788-2004 农药残留试验准则 [S]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 2004
- [13] ZHU Guo-nian(朱国念). Technology for Rapid Detection of Pesticide Residues(农药残留快速检测技术) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2008: 59-61.
- [14] FAN Defang(樊德方). Analysis and Detection of Pesticide Residues(农药残留量分析与检测) [M]. Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 1982: 116-126.
- [15] SEPA(国家环境保护总局). Guidelines on Environmental Safety Assessment for Chemical Pesticides(化学农药环境安全评价试验准则) [Z]. Beijing(北京): SEPA(国家环境保护总局), 2003.

(Ed TANG J)