

高效液相色谱法测定含脂羊毛中灭蝇胺和环虫腈

樊苑牧 俞雪钧 顾晓俊 殷居易 裘亚钧 陈树兵 陈杰
湛嘉 贺小雨 陈俊 黄绍棠*

(宁波出入境检验检疫局技术中心, 宁波 315012)

摘 要 建立了高效液相色谱法(HPLC)测定含脂羊毛中的灭蝇胺和环虫腈的方法及 HPLC-MS/MS 确证方法。样品用 80 mL 1% 三氯乙酸溶液超声提取, MCX 柱净化, Hypersil NH₂ 色谱柱分离, 水-乙腈为流动相梯度洗脱, 214 nm 检测, HPLC-MS/MS 确证。在正离子电喷雾电离(ESI⁺)模式下, 环虫腈[M + H]⁺ 及 2 个主要的特征离子分别为 m/z 191.0, 150.0 和 163.0; 灭蝇胺[M + H]⁺ 及 2 个主要的特征离子分别为 m/z 167.0, 85.0 和 125.0。在 0.05 ~ 5.0 mg/L 范围内, 灭蝇胺和环虫腈均有良好的线性关系, 相关系数均为 0.9999。本方法的检出限灭蝇胺为 0.02 mg/kg, 环虫腈为 0.01 mg/kg。方法的平均加标回收率: 灭蝇胺为 95.0% ~ 99.9%, 环虫腈为 83.6% ~ 92.2%。

关键词 灭蝇胺; 环虫腈; 含脂羊毛; 残留分析; 高效液相色谱法; 高效液相色谱-串联质谱

1 引言

灭蝇胺, 又名环丙氨嗪, 是三嗪类昆虫生长调节剂, 可抑制双翅目及部分鞘翅目昆虫幼虫的生长发育和羽化, 被广泛添加到动物饲料中, 用于控制动物厩舍内蝇蛆的生长发育。其在动物体内的代谢物三聚氰胺, 能导致小鼠膀胱肿瘤, 美国和欧盟各国均制定了严格的饲料添加浓度和畜产品中的最高残留限量为 0.05 mg/kg。环虫腈, 又名地昔尼尔, 是干扰昆虫表皮形成的昆虫生长调节剂, 具有很强的附着力, 对外寄生虫具有良好的持效性, 能有效防治棉花、玉米等作物的绿盲蝽象、烟芽夜蛾、棉铃象等害虫, 并有效防治家蝇和埃及伊蚊。1992 年国际羊毛局为关注生态环境, 开始对含脂羊毛进行药物残留检测^[1], 1994 年在羊毛中检出灭蝇胺, 1999 年检出环虫腈。欧盟有关纺织品生态标签(Eco-label)标准的指令(2002/371/EC)和国际纺织品生态学研究检测协会的生态纺织品标准 100 (Oeko-Tex standard 100)都对杀虫剂在羊毛或纺织品中的残留提出了限量要求。2007 年修订的 Eco-label 标准^[2]规定, 昆虫生长调节剂在含脂羊毛及其它含角蛋白纤维中的残留不得超过 2 mg/kg。

目前, 有关灭蝇胺和环虫腈残留量检测方法较少^[3~8], 主要有蔬菜和土壤中灭蝇胺及其代谢物三聚氰胺的检测。检测方法主要有 HPLC, HPLC-MS/MS 和 GC-MS, 而含脂羊毛中灭蝇胺、环虫腈残留量检测方法未见报道。灭蝇胺、环虫腈与三聚氰胺的化学结构相似, 本研究参考文献[3~12], 建立了三氯乙酸溶液提取, MCX 柱富集与净化, 高效液相色谱(HPLC)检测的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent1100 HPLC(美国 Agilent 公司); API 3000 MS/MS 串联质谱检测器(加拿大 ABI 公司); SIGMA-3K 台式高速冷冻离心机(Sigma 公司); QL-901 旋涡混合器(其林贝尔仪器制造公司); 固相萃取仪(Supelco 公司); N-EVAPTM 氮吹仪; 超声波清洗仪(50 Hz); Oasis MCX SPE 柱(美国 Waters 公司)。

灭蝇胺(Cyromazine)和环虫腈(Dicyclanil) 购自 Dr. Ehrenstorfer, 纯度 99.0%; 乙腈和甲醇(HPLC 级, Tedia 公司); 氨水和三氯乙酸(分析纯); 水为超纯水。

含脂羊毛样品(利华羊毛工业有限公司, 编号 060427, 070126, 071031, 070716, 071012), -20 °C 保存。

2009-02-18 收稿; 2009-09-11 接受

本文系国家质检总局科研项目(No. 20061K021)和宁波市科研项目(No. 2005C100095)资助

* E-mail: huangst@nbciq.gov.cn

2.2 试样前处理

称取 2 g 试样于 250 mL 锥形瓶中,加入 80 mL 1% 三氯乙酸溶液,振荡,使溶液充分润湿羊毛后超声提取 30 min,过滤,取 40 mL 滤液过 SPE 柱净化。

分别用 6 mL 甲醇、6 mL 水预淋洗 MCX 柱,然后上试样,用 6 mL 0.01 mol/L HCl 溶液洗涤 MCX 柱,再用 6 mL 水和 6 mL 甲醇洗涤 MCX 柱,抽干后用 10% 氨水-甲醇溶液 6 mL 洗脱并接收,洗脱液于 40 ℃ 水浴中以氮气吹干,最后用 1 mL 乙腈溶解并定容,过 0.45 μm 滤膜后备用。

2.3 色谱质谱条件

Hypersil NH₂ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:214 nm;进样量:20 μL。流动相:水(A)-乙腈(B) 梯度洗脱:0~5.5 min,97% B;5.5~6 min,97%→90% B;6~20 min,90% B;20~21 min,90%→97% B。MS/MS 条件:正离子电喷雾电离(ESI+);离子源雾化温度:500 ℃;碰撞气、气帘气和雾化气均为 N₂,流量分别为 8 和 14 mL/min;聚焦电压:82 V;吸入电压:10 V;碰撞电荷吸入电压:13 V;以多反应监测模式测定;其它条件见表 1。

表 1 灭蝇胺和环虫腈的 LC-MS/MS 测定条件
Table 1 Determination conditions of cyromazine and dicyclanil

农药 Pesticide	保留时间 Retention time (min)	母离子/子离子 Parent ion/daughter ion (m/z)		碰撞电压 Collision voltage (V)	去簇电压 Declustering potential (V)
环虫腈 Dicyclanil	3.91	191/150*	191/163	28 27	35 35
灭蝇胺 Cyromazine	11.17	167/125	167/85*	25 26	20 20

* :定量离子对(Quantitative ions)。

3 结果与讨论

3.1 提取净化条件的选择

由于灭蝇胺和环虫腈均为极性物质,微溶于水,可溶于热水、乙醇,其结构与化学性质与三聚氰胺非常接近。常见的三聚氰胺提取液有:磷酸盐缓冲溶液(pH 2)、稀 HCl、20% 二乙胺、20% 氨水-乙腈溶液、甲醇等。本研究比较了甲醇、乙腈、水和 1% 三氯乙酸水溶液等不同溶剂的提取效果,最终选定以 1% 三氯乙酸为提取剂。比较了不同时间的提取效率,最终确定超声提取 30 min。灭蝇胺和环虫腈均为弱碱性化合物,比较了 ENVI™-Florisisil 小柱、Waters Oasis HLB 小柱及 Waters Oasis MCX 小柱净化效果,实验表明,在 Waters Oasis MCX 固相萃取小柱上净化效果最好。在酸性条件下上样,使待测物保持正离子态而被吸附在固相萃取柱上,依次用 6 mL 0.01 mol/L HCl 溶液、6 mL 水和 6 mL 甲醇洗涤 MCX 柱,再用 6 mL 10% 氨水-甲醇溶液洗脱,能有效去除基质干扰,可获得较高的回收率和较好的重现性。

3.2 色谱条件的选择

在 190~400 nm 波长范围内对灭蝇胺、环虫腈混合标准溶液进行波长扫描,发现两种物质均在 214 nm 处有较好吸收。本方法以 214 nm 为检测波长。因灭蝇胺和环虫腈均为极性物质,在普通的 C₁₈ 柱上保留值很低,很难进行分析。灭蝇胺和环虫腈极易与 C₁₈ 柱上残余的硅醇基形成氢键,使得峰形拖尾,因此需要在流动相中加入离子对试剂或加酸可以增加 C₁₈ 柱对灭蝇胺和环虫腈的保留并改善峰形。本研究参考文献[3~12],对不同的 C₁₈ 柱和 NH₂ 柱进行了比较,发现 NH₂ 柱分离效果优于 C₁₈ 柱,具体条件见 2.3 节。对杂质和目标峰能完全分离,并且能使标准峰的响应较高,说明本方法对灭蝇胺和环虫腈残留的测定是可行的。灭蝇胺和环虫腈的标样溶液、空白羊毛试样及羊毛试样加标色谱图见图 1。

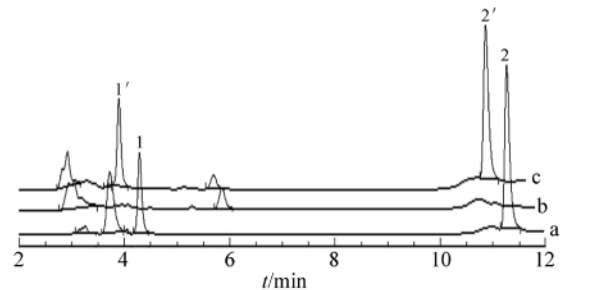


图 1 灭蝇胺、环虫腈标准溶液(a)、空白羊毛样品(b)及加标羊毛样品(c)色谱图
Fig. 1 Chromatogram of standard solution(a), greasy wool blank sample(b) and greasy wool sample added standard solution(c)
1, 1', 环虫腈(Dicyclanil); 2, 2', 灭蝇胺(Cyromazine)。

3.3 线性关系及检出限

用乙腈配制灭蝇胺-环虫腈(浓度比 2:1)混合标样贮备溶液(以灭蝇胺浓度计,下同),并用乙腈依次稀释至 0.05、0.1、0.5、1.0 和 5.0 mg/L 的标准工作曲线溶液。在优化的实验条件下,灭蝇胺线性方程是 $y = 216.95x - 2.93$, 相关系数 $r = 0.99999$; 环虫腈线性方程为 $y = 175.32x - 1.19$, 相关系数 $r = 0.99986$, 由此可见二者均有很好的线性关系。根据 $S/N \geq 10$, 本方法对灭蝇胺的检出限为 0.02 mg/kg, 对环虫腈的检出限为 0.01 mg/kg。在 0.05 ~ 5.0 mg/L 范围内能够满足定量分析二者残留的要求。

3.4 精密度和回收率实验

在相同的实验条件下,分别测定添加 0.2、1.0 和 2.0 mg/kg 灭蝇胺标准品、0.1、0.5 和 1.0 mg/kg 环虫腈标准的含脂羊毛样品各 3 次,平均回收率检测结果见表 2。按照 2.2 节中灭蝇胺、环虫腈提取方法,对羊毛进行 3 种浓度的添加回收率和精密度实验,其平均添加回收率:灭蝇胺在 95.0% ~ 99.9% 之间,环虫腈在 83.6% ~ 92.2% 之间;灭蝇胺的相对标准偏差为 7.1% ~ 17.6%,环虫腈的相对标准偏差为 6.1% ~ 17.3%。说明本方法对羊毛中灭蝇胺和环虫腈的检测重现性好,准确度较高。

3.5 HPLC-MS/MS 确证

由于 HPLC-MS/MS 的死体积小于 HPLC,因此在相同的色谱条件下,环虫腈和灭蝇胺的保留时间较 HPLC 小。对环虫腈和灭蝇胺标准溶液在正离子模式下进行全扫描,分别找出环虫腈和灭蝇胺准分子离子 $[M + H]^+$ m/z 191.0 和 167.0,以分子离子峰为母离子对离子源参数进行优化。在优化的色谱及质谱条件下,再对环虫腈和灭蝇胺的子离子进行全扫描,环虫腈准分子离子在碰撞池内碰撞产生 8 个碎片离子 m/z 175.0、150.0、163.0、109.0、92.0、83.1、67.0 和 41.0,其中 m/z 150.0 和 163.0 离子响应高,干扰少,因此将 m/z 150.0 和 163.0 作为环虫腈的定性依据。灭蝇胺的 $[M + H]^+$ 离子在碰撞池内碰撞产生 6 个碎片离子 m/z 125.0、108.0、85.0、83.1、68.0 和 60.0,其中 m/z 125.0 和 85.0 响应高,干扰少,因此将它们作为灭蝇胺的定性依据。图 2 为环虫腈和灭蝇胺的总离子流图。

3.6 样品测定

应用建立的方法测定含脂羊毛样品中的灭蝇胺、环虫腈的含量,根据化合物的色谱峰保留时间定性,峰面积定量,根据化合物的质谱离子丰度比进行确证。检测结果见表 3,羊毛样品色谱图见图 3。

表 3 含脂羊毛样品实验结果

Table 3 Results of cyromazine and dicyclanil in greasy wool sample

农药 Pesticide	羊毛样品编号 No. of wool sample				
	060427	070126	071031	07071	6071012
环虫腈 Dicyclanil (mg/kg)	0.090	1.00	0.14	0.86	0.48
灭蝇胺 Cyromazine (mg/kg)	0.60	0.69	0.64	1.6	0.70

表 2 羊毛样品加标回收率实验结果

Table 2 Spiked recoveries of cyromazine and dicyclanil on greasy wool sample

农药 Pesticide	加入量 Spiked level (mg/kg)	测定值 Found (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
环虫腈 Dicyclanil	0.2	0.176	88.2	17.6
	1.0	0.836	83.6	15.9
	2.0	1.843	92.2	7.1
灭蝇胺 Cyromazine	0.1	0.0976	97.6	6.1
	0.5	0.475	95.0	17.3
	1.0	0.999	99.9	8.1

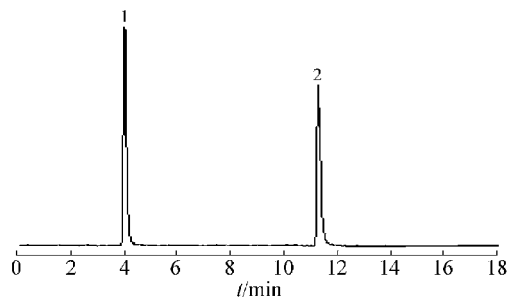


图 2 环虫腈和灭蝇胺的总离子流图(1.0 μg/L)

Fig. 2 Total ion chromatogram of dicyclanil and cyromazine

1. 环虫腈(Dicyclanil); 2. 灭蝇胺(Cyromazine)。

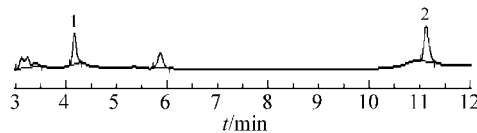


图 3 羊毛样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of greasy wool sample

1. 环虫腈(Dicyclanil); 2. 灭蝇胺(Cyromazine)。

References

- 1 Nunn C R , Russell I M , Williams S. Residues of Pesticides in Australian Wool 2004-2005: Results from AWI Survey. http://www.awta.com.au/Documents/Research%20Papers/Wool%20Contamination/IWTO2005_11_RWG03.pdf [2007-04-03]
- 2 Revision of the Textile Eco-label Draft final report-July 13th 2007. http://ec.europa.eu/environment/gpp/pdf/toolkit/textiles_GPP_background_report.pdf [2008-07-30]
- 3 Sancho J V , Ibáñez M , Grimalt S , Pozo Ó J , Hernández F. *Anal. Chim. Acta* , 2005 , 530 (2) : 237 ~ 243
- 4 Yokley R A , Mayer L C , Rezaaiyan R , Myra E. *Journal of Agricultural Food Chemistry* , 2000 , 48 (8) : 3352 ~ 3358
- 5 HE Mao-Hua (何茂华) , MU Wei (慕卫) , LIU Feng (刘峰) , ZHANG Yue-Liang (张月亮). *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)* (山东农业大学学报) , 2004 , 35 (3) : 383 ~ 385
- 6 WANG Ran (王冉) , LIU Tie-Zheng (刘铁铮) , LIU Wei-Rong (柳伟荣). *Acta Agriculturae Zhejiangensis* (浙江农业学报) , 2005 , 17 (6) : 376 ~ 379
- 7 GUO Jun (郭筠) , MO Han-Hong (莫汉宏) , AN Feng-Chun (安凤春) , LI Jian-Zhong (李建中) , ZHENG Ming-Hui (郑明辉). *Environmental Chemistry* (环境化学) , 2004 , 23 (6) : 700 ~ 703
- 8 WANG Ran (王冉) , LIU Wei-Rong (柳伟荣) , GENG Zhi-Ming (耿志明) , CHEN Ming (陈明) , LIU Tie-Zeng (刘铁铮). *China Feed* (中国饲料) , 2005 , 2 : 34 ~ 36
- 9 DD CEN/TS. Materials and articles in contact with foodstuffs-Plastics substances subject to limitation-Part 27: Determination of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine in food simulants
- 10 LIU Mei (刘梅) , LI Jin-Qiang (李金强) , TIAN De-Jian (田德金) , LI Pei-Nuan (李佩暖) , CAO Peng (曹鹏) , FU Jian (付建) , LOU Xi-Shan (娄喜山). *Chemical Analysis And Meterage* (化学分析计量) , 2008 , 17 (2) : 48 ~ 50
- 11 WANG Hao (王浩) , LIU Yan-Qin (刘艳琴) , CAO Hong (曹红) , YANG Hong-Mei (杨红梅) , LIU Xiao-Li (刘小力). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , 2008 , 36 (2) : 273 ~ 273
- 12 CAO Qin-Ren (蔡勤仁) , OUYANG Ying-Yu (欧阳颖瑜) , QIAN Zhen-Jie (钱振杰) , PENG Yu-Fen (彭玉芬). *Chinese Journal of Chromatography* (色谱) , 2008 , 26 (3) : 339 ~ 342

Determination of Cyromazine and Dicyclanil Residues on Greasy Wool by High Performance Liquid Chromatography

FAN Yuan-Mu , YU Xue-Jun , GU Xiao-Jun , YIN Ju-Yi , QIU Ya-Jun ,

CHEN Shu-Bing , CHEN Jie , ZHAN Jia , HE Xiao-Yu , CHEN Jun , HUANG Shao-Tang*

(Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of People's Republic of China , Ningbo 315012)

Abstract A method for the determination of cyromazine and dicyclanil residues on greasy wool was developed with HPLC and confirmed with HPLC-MS/MS. The cyromazine and dicyclanil residues on greasy wool were extracted with 1% trichloroacetic acid solution with ultrasonic , and cleaned up by MCX SPE column. The HPLC separation was performed on a Hypersil NH₂ using water-acetonitrile (V/V) as the mobile phase with gradient elution and detected at the wavelength of 214 nm. The corroboration method of HPLC-MS/MS was used with electro-spray ionization of positive ion mode. The $[M + H]^+$ and characteristic ions of dicyclanil were m/z 191.0 , 150.0 and 163.0 , and cyromazine were m/z 167.0 , 85.0 and 125.0. The linear ranges of cyromazine and dicyclanil were 0.05 – 5.0 mg/L. There were good linear relationships between the peak area and concentration in the linear range. The correlation coefficient was 0.9999. The detection limit of cyromazine was 0.02 mg/kg , and dicyclanil was 0.01 mg/kg. The average recoveries of cyromazine and the dicyclanil were 95.0% – 99.9% and 83.6% – 92.2% , respectively.

Keywords Cyromazine; Dicyclanil; Greasy wool; Pesticide residue; High performance liquid chromatography; High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(Received 18 February 2009; accepted 11 September 2009)