

液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱测定水果中的丁酰肼

余苹中^{1,2,3}, 宋稳成⁴, 李雪生², 潘灿平², 刘丰茂²

(1.北京市农林科学院 植保环保研究所, 北京 100097; 2.中国农业大学 理学院, 北京 100193; 3.北京农产品质量检测与农田环境监测技术研究中心, 北京 100097; 4.农业部 农药检定所, 北京 100125)

摘要: 建立了4种水果中丁酰肼残留量的液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱检测方法。样品经匀浆提取净化后, 采用LC-MS/MS法, ESI(+)电离方式, 多反应监测(MRM)定量, 用Vensil HILIC色谱柱, 以含0.1%甲酸的水和乙腈为流动相进行洗脱。结果表明: 丁酰肼在0.01~1.0 mg/L质量浓度范围内呈现良好的线性, 相关系数为0.9991, 方法的检出限为2.5 µg/kg, 当添加质量分数为0.01、0.1、0.5 mg/kg时, 4种水果中丁酰肼的平均回收率为77.7%~103.7%, 相对标准偏差为2.0%~9.3%。

关键词: 液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法; 水果; 丁酰肼; 残留

中图分类号: TQ450.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-0413(2010)03-0191-03

Determination of Daminozide Residue in Fruits by Liquid Chromatography-ESI Tandem Mass Spectrometry

YU Ping-zhong^{1,2,3}, SONG Wen-cheng⁴, LI Xue-sheng², PAN Can-ping², LIU Feng-mao²

(1. Institute of Plant Protection and Environmental Protection, Academy of Beijing Agricultural Science, Beijing 100097, China; 2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Beijing Research Center for Agrifood Testing and Farmland Monitoring, Beijing 100097, China; 4. Institute for Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100125, China)

Abstract: A method for determination of daminozide residue in four fruits by liquid chromatography-ESI tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been developed. After sample was extracted and cleaned up, daminozide was determined by LC/MS/MS-ESI(+), quantified with multiple reaction monitoring(MRM) mode. The separation was performed on a Vensil HILIC column with a gradient system of water (containing 0.1% formic acid)-acetonitrile as mobile phase. The results showed that the calibration linear range of daminozide was from 0.01 to 1.0 mg/L with a correlation coefficient of 0.9991. The detection limit was 2.5 µg/kg. Average recoveries (spiked at the levels of 0.01, 0.1, 0.5 mg/kg) range from 77.7-103.7%, the relative standard deviations was between 2.0 and 9.3%.

Key words: LC-MS/MS; fruit; daminozide; residue

丁酰肼(daminozide)化学名称N-二甲酸琥珀酰肼酸, 是一种植物生长调节剂, 在防止落花落果及促进结实增产等方面有着显著效果。近年来丁酰肼在农业生产中广泛应用, 而丁酰肼的水解产物1,1-二甲基联氨是一种潜在的致癌物^[1-2], 丁酰肼在水果中的残留越来越受到人们的关注, 欧盟规定丁酰肼在香蕉、苹果、梨、柚中的最大残留限量(MRL)为0.02 mg/kg, 日本规定丁酰肼在香蕉中的残留不得检出^[3]。随着人们对丁酰肼残留限量要求提高, 对丁酰肼残留检测分析方法的要求也越来越高, 丁酰肼有很高的极性和热稳定性, 衍生化反应是气相色谱法分析丁酰肼的关键, 丁酰肼没有生色基团, 不能用紫外和荧光检测器直接检测。目前, 国外报道的丁酰肼检测方法主要有薄层色谱法、气相色谱法、比色法、色谱质谱联用法^[4-13], 而国内主要是用一些衍生化试剂进行衍生以后, 用气相色谱进行测定^[14-18]。本文采用高效液相色谱-电喷雾串联

四极杆质谱联用技术检测4种水果中丁酰肼的残留量, 前处理方法简单快速, 灵敏度和检出限都有了较大的提高。

1 材料与方法

1.1 材料

香蕉、草莓、猕猴桃及西红柿样品从市场购买。

1.2 仪器和试剂

高效液相-离子阱-质谱系统(LC-IT-MS) Agilent1100 Series LC及LC-MSn Ion Trap system(Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)。MilliQ净化超纯水系统。台式离心机TDL-4013(上海安亭科学仪器厂), 超高速离心机(德国Sigma 3k15)。精确天平(精确到0.00001 g Sartorius BP211D)。丁酰肼标准品(97.0%)购买于德国Augsburg公司, 甲醇购买于Burdick&Jackson公司, 88%甲酸及硅藻土载体545(celite545)购于中国国药集团化学试剂有限公司。

收稿日期: 2009-12-10, 修返日期: 2010-01-25

基金项目: 北京市科委项目(Z07090500550702)

作者简介: 余苹中, 女, 湖南岳阳人, 助理, 在读博士, 主要从事农药检测与环境分析研究。Tel 010-51503435 E-mail pzhayu@sina.com.cn。

1.3 分析步骤

1.3.1 丁酰肼储备液

精确称量10 mg丁酰肼于25 mL的容量瓶中,用甲醇溶解定容,配制成400 mg/L的标准品,放置于冰箱中保存。用甲醇逐步稀释,配制成0.01、0.1、0.25、0.5、1、10 mg/L的标准溶液进行测定。

1.3.2 样品制备

新鲜的香蕉及猕猴桃去皮,草莓及西红柿去花托后经匀浆机匀浆。

1.3.3 添加回收实验

精确称取20 g匀浆后的样品,置于50 mL的离心管中,加入1 g celite545,每种水果分别添加0.01、0.1、0.5 mg/kg三个质量分数,每个质量分数3次重复。加入水-甲醇(体积比1:1)溶液定容至约30 mL,在涡旋式混合器上充分混合2 min,4000 r/min下离心5 min,静置分层后倒上清液入另一个50 mL的离心管中,残渣再分别用5 mL水-甲醇(体积比1:1)混合液匀质2次,离心,合并上清液,用甲醇定容至40 mL。振匀后取约1.5 mL入2 mL的离心小管,加50 mg celite545匀质后在超高速离心机于6000 r/min下离心5 min,上清液过0.45 μ m滤膜后进样。

1.4 检测条件

1.4.1 液相色谱条件

Agilent1100系列液相色谱仪,配置有G1311A四元泵,G1379A脱气机,G1367A自动进样器。色谱柱:Vensil HILIC柱,5 μ m 4.6 mm $\times$ 250 mm。流动相:水(加0.1%甲酸)-乙腈(体积比30:70),流速0.6 mL/min,柱温25 $^{\circ}$ C,进样量10 μ L。

1.4.2 质谱条件

Agilent6410串联四极杆质谱仪(HPLC-QQQ MS/MS),配置了ESI离子源。在ESI(+)模式下,采集数据,经实验优化设定质谱参数如下:毛细管电压4000 V,脱溶剂气流量9 L/min,雾化器压力262 kPa,脱溶剂气温度350 $^{\circ}$ C,碰撞气为高纯氮气,Q1和Q3的分辨率均为单位质量分辨。丁酰肼定性核质比采用161.00>115.00,定量离子对核质比为161.00>143.00。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

采用不同比例的甲醇、乙腈、水等混合溶剂体系进行一系列预实验,结果表明以不同比例的乙腈-水为流动相时信号较高,当在流动相中加入一定量的添加剂时,丁酰肼在ESI(+)模式下的离子化效率增加,因此分别考虑了在流动相中加入0.1%(体积分数,下同)甲酸、0.1%乙酸、0.1%三氟乙

酸和5 mmol/L甲酸铵的分离效果。实验结果表明流动相中加入0.1%甲酸时,丁酰肼具有较高的灵敏度和分辨率。为了找到最佳的甲酸添加量,从0.1%变化到0.25%的实验结果表明0.1%时的灵敏度最高,分离效果最好,酸度过高则会抑制丁酰肼的离子化。

2.2 子离子和母离子的选择

用流动相配制10 mg/L丁酰肼标准液,在上述液质分析条件下进行标准品全扫描,确定丁酰肼母离子的质量数,然后分别对子离子和碰撞能量进行优化,从中选出丰度最高的碰撞能量作为最佳的碰撞能量,选择2个丰度比较高的子离子作为定性和定量离子,建立多粒子反应监测模式,得到主要的离子峰为115.2、143.1、161.1(M+H)、183.1(M+Na),选择其中MRM色谱图峰形好、响应值高的m/z 143离子作为定量离子(见图1)。

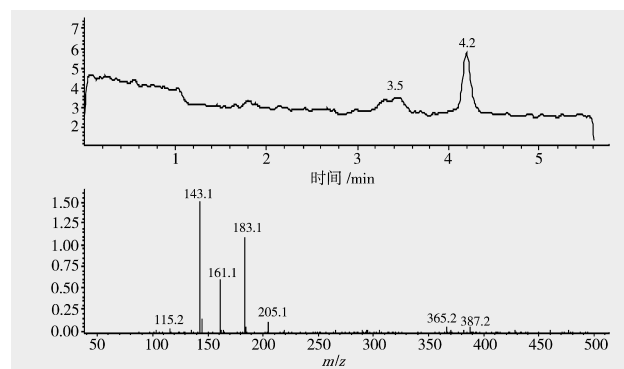


图1 丁酰肼LC-IT-MS条件下的TIC图

2.3 样品前处理条件的选择

分别选用甲醇、乙腈、丙酮进行提取实验,结果表明:丙酮提取时溶出样品杂质、色素较多,对后续的净化和仪器测定有一定的影响,甲醇和乙腈提取效果高,且溶出杂质少,对分子基质有一定的沉降作用,同时可以直接浓缩,减少了处理环节,考虑甲醇和乙腈的成本以及毒性方面的影响,最终选择甲醇作为提取液。

2.4 标准曲线与线性范围

用甲醇溶液配制质量浓度为0.01、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/L的丁酰肼系列标准溶液。按照上述方法进行LC-MS/MS分析,建立标准曲线。以丁酰肼的定量离子143浓度(x)为横坐标,待测物的质谱峰面积(y)为纵坐标进行回归计算,得到丁酰肼直线回归方程为 $y=10^7x-101851$,相关系数 $r=0.9991$ 。用甲醇溶液配制成质量浓度为0.01 mg/L的丁酰肼待测样品,进行LC-MS/MS分析,进行5样本平行分析,所得的变异系数RSD为2.72%。

2.5 方法检出限、最低检出质量分数

按照国际纯粹与应用化学联合会IUPAC检出限 $S/N>3$ 计算,定量限以 $S/N>10$ 计算,丁酰肼的检出限为0.2 μ g/L,在

西红柿、猕猴桃、香蕉及草莓上的最低检出质量分数分别为20(S/N=10.4)、100(S/N=11.4)、20(S/N=15.4)、2.5 μg/kg(S/N=10.6),完全满足农药残留分析的要求。

2.6 添加回收率和精密度

在20 g的4种水果中分别添加质量分数为0.01、0.1、0.5 mg/kg的丁酰肼,样品按上述条件进行处理和测定,结果见表1。

表1 丁酰肼在4种水果基质中的加标回收率及RSD测定 (n=5)

添加 基质	0.01 mg/kg		0.1 mg/kg		0.5 mg/kg	
	平均 回收率/%	RSD/ %	平均 回收率/%	RSD/ %	平均 回收率/%	RSD/ %
草莓	79.4	7.0	82.7	5.8	91.5	3.4
西红柿	103.7	6.5	90.7	3.6	96.3	2.1
猕猴桃	79.9	9.3	89.0	2.0	82.4	3.4
香蕉	77.7	4.4	80.1	4.7	81.5	3.2

3 结论与讨论

建立了草莓等4种水果中丁酰肼残留量的液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱检测分析方法,该方法有较好的精密度、准确度和灵敏度,操作方法简单,可操作性极强,避免了衍生化常规检验方法中的许多难题,能很好地满足农药残留检测分析的要求。

参考文献:

[1] HANS G J, ROB J V, ODILE M S. Determination of Daminozide in Apples and Apple Leaves by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry[J]. J of Chromat A, 1999, 833(1/2): 53-60.

[2] 魏福香. 为何撤销丁酰肼在花生的登记[J]. 农药科学与管理, 2004, 25(6): 40.

[3] 刘新艳, 欧阳喜新, 潘灿平. 草莓等水果中生长调节剂残留分析方法概述[C]//江树人. 农药与环境安全国际会议论文集. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 290-296.

[4] WILBUR L S, KURT S, EILLS G. Results of a Survey for the Presence of Dam Inozide and Unsymmetrical Dimethylhydrazine in Food[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37(2): 570.

[5] CHEVRIER J P, PHISTER A. Toxicity of 1,1-Dimethylhydrazine in Animals II Chronic Poisoning[J]. Eur J Toxicol, 1974, 7: 242.

[6] NEWSOME W H. Determination of Daminozide Residues on Foods and Its Degradation to 1,1-Dimethyl-hydrzzine by Cooking[J]. J Agric Food Chem, 1980, 28(2): 319-320.

[7] RUTSCHMANN M A, BUSER H R. Determination of Daminozide and Dimethylhydrazine Residues in Swiss Juice Concentrates Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39(1): 178-181.

[8] ALLEN H. Daminozide Residues in Sweet Cherries and Their Determination for Color-metric and Liquid-chromatographic Method[J]. Pest Sci, 1980, 11(3): 347-350.

[9] CONDITT M K, BAUMGARDNER J R, HELLMANN. Gas Chromatographic Mass Spectrometric Determination of Daminozide in High Protein Food Products[J]. J Assoc off Anal Chem, 1988, 71(4): 735-739.

[10] WRIGHT D. New Method for the Determination of 1,1-Dimethylhydrazine Residues in Apples and Peaches[J]. J Assoc off Anal Chem, 1987, 70(4): 718-720.

[11] TAPAN K M, PAUL W G. Determination of Daminozide Residues at Very Low Levels in Fruits by Gas Chromatography-Mass Spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 1995, 43(6): 1421-1423.

[12] LUI C H, MATTERN G C, SINGER G M. Determination of Daminozide in Apples by Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry[J]. J Assoc off Anal Chem, 1989, 72(6): 984-988.

[13] KIM I S, SASINOS F I, STEPHENS R D. Analysis for Daminozide in Apple Juice by Anion-exchange Chromatography-particle Beam Mass Spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 1990, 38(6): 1223-1226.

[14] 吴淑秀, 公茂金. 衍生化气相色谱法测花生米中丁酰肼的残留量[J]. 农业与技术, 2005, 25(6): 116-118.

[15] 贾建, 王晓云, 杨天祝. 气相色谱法检测花生中丁酰肼残留[J]. 化学工程师, 2004, 106(7): 57-58.

[16] 储晓刚, 雍炜, 蔡慧霞, 等. 用顶空气相色谱法快速测定浓缩菠萝汁中乙烯利的残留量[J]. 色谱, 2001, 19(3): 286-288.

[17] 林黎明. 超声衍生化GC/MS检测花生中丁酰肼残留[J]. 化学通报, 2000(11): 31-32.

[18] 李秀勇, 阮新. 花生中丁酰肼残留量的气相色谱法测定[J]. 分析测试技术与仪器, 2000, 6(4): 232.

责任编辑: 李新

(上接第187页)

2.4 讨论与分析

把毒死蜱施于大王椰子根部,毒死蜱逐渐被大王椰子吸收传导渗入植物组织内,不易被雨水和阳光降解。采用气相色谱法测定分析大王椰子中毒死蜱的残留和消解动态,施药1 d后开始吸收,5 d后达到最大值,半衰期1.65 d,14 d后残留显著降低,消解到≤0.0015 mg/kg。研究结果表明,施药3~10 d大王椰子中的毒死蜱残留可有效防治椰心叶甲。此施药方法简单,对周围环境污染小,效果好,值得推广。对于不同树龄的大王椰子,施药量可能有所不同,使其达到最佳药效果。

参考文献:

[1] 周学良, 朱良天. 精细化学品大全: 农药卷[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2000: 76.

[2] 金绍强, 陆小磊, 吴慧明, 等. 毒死蜱在4种作物中残留量的气相色谱分析方法[J]. 浙江农业科学学报, 2009(1): 168-172.

[3] 中国植物保护学会植物检疫学分会. 植物检疫害虫彩色图谱[M]. 北京: 科学出版社, 1993: 108.

[4] 纪燕玲, 蔡选光, 郑道序, 等. 汕头市椰心叶甲发生情况调查初报[J]. 粤东林业科技, 2007(1): 12-13.

[5] 陆永跃, 曾玲, 王琳, 等. 棕榈科植物有害生物椰心叶甲的风险性分析[J]. 华东昆虫学报, 2004, 13(2): 17-20.

责任编辑: 李新