

超高效液相色谱 – 串联质谱法测定复杂基质食品中二硝基苯胺类除草剂残留量

张建莹*, 岳振峰, 蔡伊娜, 吴卫东, 陈波, 王宏莉, 赵琼晖

(深圳出入境检验检疫局 食品检验检疫技术中心, 广东 深圳 518045)

摘要: 建立了测定茶叶、大豆和鸡肝等复杂基质食品样品中8种二硝基苯胺类除草剂(氟乐灵、二甲戊乐灵、仲丁灵、异乐灵、磺乐灵、氨基乙氟灵、氨基丙氟灵和氨基丙氟灵)残留的超高效液相色谱 – 串联质谱检测方法。分析物采用电喷雾电离, 正离子扫描, 多反应监测(MRM)模式检测, 外标法定量。8种二硝基苯胺类除草剂的定量下限均为0.010 mg/kg。在0.010 ~ 0.100 mg/kg加标范围内, 回收率为75.9% ~ 113%, 相对标准偏差为1.7% ~ 19.0%。该方法高效、灵敏, 适用于茶叶、大豆和鸡肝等复杂基质食品中二硝基苯胺类除草剂多残留的测定。

关键词: 二硝基苯胺类除草剂; 复杂基质食品; 超高效液相色谱 – 电喷雾串联质谱

中图分类号: O657.63; S482.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2017)04-0550-05

Simultaneous Determination of Dinitroaniline Herbicides in Complex Matrix by Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Jian-ying*, YUE Zhen-feng, CAI Yi-na, WU Wei-dong,

CHEN Bo, WANG Hong-ju, ZHAO Qiong-hui

(Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Exit – Entry Inspection & Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

Abstract: A method was developed for the determination of 8 kinds of dinitroaniline herbicides, including trifluralin, pendimethalin, butralin, isopropalin, dinitramine, nitralin, oryzalin and prodiamine in complex matrices (tea, soybean and chicken livers) by ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS). Qualification and confirmation were achieved by electro-spray ionization (ESI) in positive mode using multiple reaction monitoring (MRM), and the external standard method was used for quantitation. The limits of quantitation were all 0.010 mg/kg. The recoveries of dinitroaniline herbicide residues were between 75.9% and 113% at spiked levels of 0.010 – 0.100 mg/kg. The RSDs of the method were between 1.7% and 19.0%. The method is precise and sensitive, and is suitable for both confirmation and quantification of trifluralin, pendimethalin, butralin, isopropalin, dinitramine, nitralin, oryzalin, prodiamine in tea, soybean and chicken livers.

Key words: dinitroaniline herbicides; complex matrix; ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS)

二硝基苯胺类除草剂主要包括氟乐灵、二甲戊乐灵、仲丁灵、异乐灵、磺乐灵、氨基乙氟灵、氨基丙氟灵和氨基丙氟灵等。此类除草剂作为一种选择性芽前土壤处理剂, 具有杀草谱广、除草效果稳定、高效低毒等特点, 在化学除草剂的应用中占有很高比例。鉴于土壤对二硝基苯胺类除草剂具有强吸附作用, 其残留会对后茬作物产生药害, 对人和哺乳动物细胞也具有基因毒性, 我国、欧盟和日本等很多国家对二硝基苯胺类除草剂制定了最高残留限量, 其中包括茶叶、大豆和鸡肝等复杂基质食品。

二硝基苯胺类除草剂残留的主要检测方法有GC/ECD, GC – MS和GC – MS/MS, 检测对象主要是土壤、水、果蔬、大豆及粮食^[1-15], 标准检测方法包括GB/T 19426 – 2006, GB/T 19648 – 2006, GB/

收稿日期: 2016 – 11 – 01; 修回日期: 2016 – 11 – 24

基金项目: 国家质检总局项目(2016IK240)

* 通讯作者: 张建莹, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 农兽药残留分析, Tel: 0755 – 26881671, E – mail: zhangjianying1001@163.com

T 20769-2008, GB/T 20770-2008, GB/T 20771-2008, SN/T 0712-2010, SN/T 0600-1996。但上述方法用于测定二硝基苯胺类除草剂残留存在以下问题: 或不能覆盖大部分二硝基苯胺类除草剂, 或需大量样品、消耗大量有机试剂, 或不适用于茶叶和鸡肝等复杂基质样品的检测。目前尚未有茶叶、大豆和鸡肝等复杂基质食品中二硝基苯胺类除草剂多残留的液相色谱-串联质谱法检测报道。茶叶、大豆、鸡肝等样品含有大量的色素、蛋白质和脂肪等干扰基质, 成分多、含量差异性大, 这些干扰基质成分包括无机物、有机物, 离子型、强极性化合物和非极性化合物^[16]。这些基质组分的存在, 使得食品中二硝基苯胺类除草剂的痕量分析甚至超痕量分析变得更为困难, 最终影响分析测定结果的准确性。选择有效的前处理技术和高灵敏度、高分辨的分析仪器手段是建立茶叶、大豆、鸡肝等复杂基质食品中的二硝基苯胺类除草剂多残留检测方法的关键。本研究采用乙腈提取目标化合物, 经 HLB 和 Envi-carb 固相萃取柱净化, 利用超高效液相色谱-串联质谱法建立了茶叶、大豆和鸡肝等复杂食品基质中的氟乐灵、二甲戊乐灵、仲丁灵、异乐灵、磺乐灵、氨基乙氟灵、氨基磺乐灵和氨基丙氟灵多残留检测的分析方法。本方法快速、简便、准确、灵敏, 完全可以满足国内外法规的要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱(美国 Waters 公司), Xevo-TQS 四极杆串联质谱仪(美国 Waters 公司), 超纯水仪(美国 Millipore 公司), 均质器(德国 Heidolph 公司), 旋涡振荡仪(德国 Heidolph 公司), 离心机(德国 Sigma 公司), Oasis HLB 固相萃取柱(60 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司), Envi-carb 固相萃取柱(0.25 g, 3 mL, Supelco 公司), 0.22 μm 有机滤膜。

甲醇、乙腈、正己烷、甲酸、乙酸铵(色谱纯, Merck 公司), 其他试剂均为分析纯, 实验用水为 Milli-Q 超纯水, 二硝基苯胺类除草剂标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。二硝基苯胺类除草剂标准溶液: 用丙酮配制为 1 000 mg/L 的标准储备液, -18 ℃ 避光保存。

1.2 样品前处理

称取 5 g(精确至 0.01 g)样品, 加入 10 mL 水, 混匀后静置 1 h。加入 4 g 氯化钠, 以 25 mL 正己烷饱和乙腈溶液分两次高速均质提取, 9 500 r/min 离心 5 min。合并两次提取液, 混匀。吸取 10.0 mL 提取液, 40 ℃ 水浴氮气吹至约 2.0 mL。

将浓缩液转入活化后的 HLB 固相萃取柱中, 5 mL 乙腈淋洗, 收集全部流出液, 氮气吹至近干, 用 2.0 mL 丙酮-正己烷混合溶液(8:2)溶解, 转入 Envi-carb 固相萃取柱中, 再用 5.0 mL 丙酮-正己烷混合溶液淋洗并抽干, 收集全部流出液, 氮气吹至近干, 用 50% 乙腈-水溶液定容至 1.0 mL, 旋涡混匀后过滤膜, 测定。

1.3 质谱条件

电喷雾离子源; 正离子扫描; 多反应监测(MRM); 单位分辨率; 电喷雾电压: 3 000 V; 辅助气流速: 850 L/h; 幕帘气流速: 50 L/h; 离子源温度: 105 ℃; 辅助气温度: 450 ℃; 其他质谱参数见表 1。

表 1 8 种二硝基苯胺类除草剂残留测定的质谱参数
Table 1 Mass parameters for the detection of 8 dinitroaniline herbicides

Compound	Parent ion	Daughter ions	Dwell time (s)	Cone (V)	Collision energy (eV)
Trifluralin(氟乐灵)	336.2	236.0*, 252.0	0.10	34	24, 23
Pendimethalin(二甲戊乐灵)	282.0	212.0*, 194.0	0.05	32	10, 17
Butralin(仲丁灵)	296.0	240.0*, 222.0	0.05	20	13, 20
Isopropalin(异乐灵)	310.0	226.0*, 268.0	0.05	32	19, 14
Dinitramine(氨基乙氟灵)	323.0	289.0*, 247.0	0.05	32	20, 16
Nitralin(磺乐灵)	346.0	304.0*, 262.0	0.05	32	16, 22
Oryzalin(氨基磺乐灵)	347.0	288.0*, 305.0	0.05	34	17, 14
Prodiamine(氨基丙氟灵)	351.0	267.0*, 291.0	0.05	30	20, 18

* quantitative ion

1.4 色谱条件

色谱柱: Acquity BEH C₁₈ (1.7 μ m, 50 mm $\times$ 2.1 mm, i. d., 美国 Waters 公司)。流动相: 0.05 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)(A) - 甲醇(B)。梯度洗脱程序: 0~5 min, 50%~80% B; 5~8 min, 80%~100% B; 8~8.1 min, 100%~50% B; 8.1~9.5 min, 50% B。流速: 0.3 mL/min。进样量 10 μ L。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的优化

二硝基苯胺类除草剂易挥发、易光解、水溶性极小, 易溶于有机溶剂, 在植物中与脂质结合^[1]。在针对此类除草剂残留的测定中, 提取溶剂需渗入组织内部才能得到良好的提取效果。利用有机溶剂提取目标物是一种经典方法, 溶剂多采用乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷等单一或混合溶剂。正己烷饱和的乙腈、丙酮和乙酸乙酯均能对此类农药充分提取, 但丙酮和乙酸乙酯提取的共萃取物中油脂含量较高, 不利于净化; 而正己烷饱和的乙腈溶液不但能沉淀蛋白质, 而且脂肪提出物和溶出杂质很少, 有利于后续的盐析和净化。因此, 本研究采用正己烷饱和的乙腈溶液作为提取溶剂。

2.2 净化条件的优化

由于茶叶、大豆、鸡肝和猪肉等样品中含有大量油脂、色素, 肉类样品中含有脂肪及脂溶性杂质, 采用正己烷饱和的乙腈溶液进行提取有可能将这些化合物同时提取出来, 在测定前需对提取液进行除油、脱色净化。二硝基苯胺类除草剂能溶于正己烷, 不能采用正己烷萃取以达到除去油脂或色素的目的。为了达到理想的净化效果, 提取溶液需进一步采用固相萃取柱净化。Oasis HLB 固相萃取柱可吸附部分脂肪、脂溶性杂质、色素; Envi - Carb 石墨碳固相萃取柱净化色素和吸附油脂效果好。两种固相萃取柱结合使用, 可较好的去除脂溶性杂质和色素干扰, 达到极佳的净化效果。本方法选用 Oasis HLB (6 mL, 200 mg) 固相萃取柱结合 Envi - Carb (3 mL, 0.25 g) 固相萃取柱进行净化。

进一步对 Envi - Carb 固相萃取柱的洗脱溶剂进行选择。试验了不同淋洗强度(丙酮 - 正己烷混合溶剂, 其中丙酮含量分别为 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) 后发现, 回收率随丙酮含量增加到 80% 时达到最大, 但同时洗脱下来的杂质也增多, 当丙酮含量大于 80% 后, 个别被测物回收率逐渐降低。为保证洗脱完全, 且避免杂质干扰过大, 故选择丙酮 - 正己烷(体积比 8:2) 配成混合溶剂。洗脱曲线试验结果表明, 洗脱剂体积大于 5 mL 时, 各被测物的回收率随洗脱剂体积增大基本变化不大, 但洗脱体积过大会使下一步的浓缩时间延长, 导致个别易挥发性被测物损失较大, 为避免浓缩时间过长造成损失及节省试剂, 最终选择洗脱体积为 5 mL。

2.3 LC - MS/MS 条件的优化

对比了甲醇 + 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.05% 甲酸, pH 3.0)、甲醇 + 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸)、甲醇 + 0.1% 乙酸水溶液、甲醇 + 水溶液、乙腈 + 0.05% 甲酸水溶液作流动相的色谱效果。结果表明, 选择甲醇 + 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸) 作为流动相并采用梯度洗脱时, 8 种二硝基苯胺类除草剂的分离度和灵敏度较高。0.01 mg/L 二硝基苯胺类除草剂标准溶液的总离子流图见图 1。

分别取 5.0 mg/L 二硝基苯胺类除草剂标准溶液, 以 30 μ L/min 流速注入离子源。在正离子检测方式下分别对各待测物进行一级质谱分析得到分子离子峰, 选择合适的锥孔电压。再对分子离子进行二级质谱分析, 选取丰度较强、干扰较小的两对子离子为定性离子, 对各参数进行优化, 确定最佳质谱参数如表 1 所示。

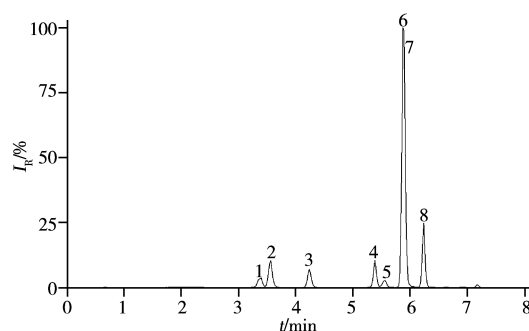


图 1 0.010 mg/L 二硝基苯胺类除草剂标准溶液的总离子流图

Fig. 1 TIC chromatogram of 0.010 mg/L dinitroaniline herbicides standard solution
1. oryzalin (氨磺乐灵), 2. trifluralin (氟乐灵), 3. dinitramine (氨基乙氟灵), 4. prodiamine (氨基丙氟灵), 5. pendimethalin (二甲戊乐灵), 6. trifluralin (氟乐灵), 7. butralin (仲丁灵), 8. isopropalin (异乐灵)

2.4 线性范围、定量下限与回收率

用空白样品提取液配成二硝基苯胺类除草剂的质量浓度分别为 0, 0.010, 0.020, 0.050, 0.100, 0.200 mg/L 的基质混合标准工作溶液。以各被测物的峰面积(y)对浓度(x , mg/L)绘制工作曲线。8 种二硝基苯胺类除草剂的浓度在 0.010 ~ 0.200 mg/L 范围内时, 线性关系良好, 其相关系数和回归方程见表 2。

方法基于回收率和 RSD 满足欧盟 SANTE/11945/2015 及国内外残留限量要求的最低试验添加水平, 加标样品定量离子对色谱信号 10 倍信噪比($S/N=10$)要求, 确定 8 种二硝基苯胺类除草剂的定量下限均为 0.010 mg/kg。在茶叶、鸡蛋、鸡肝和肉类空白样品中添加 3 个浓度水平的二硝基苯胺类除草剂标准溶液, 进行回收率实验, 每个加标水平重复测定 6 次, 由表 2 结果可知, 在 0.010 ~ 0.100 mg/kg 加标水平范围内, 加标回收率为 75.9% ~ 113%, 相对标准偏差为 1.7% ~ 19.0%, 方法的回收率和精密度良好。

表 2 二硝基苯胺类除草剂的线性范围、线性方程、相关系数及回收率($n=6$)

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, recoveries and relative standard deviations of 8 dinitroaniline herbicides ($n=6$)

Sample	Compound	Regression equation	r	Spiked (mg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
Tea	Trifluralin	$y = 1.820x + 1.635$	0.996 2	0.010, 0.050, 0.100	89.1, 89.7, 103	9.5, 7.6, 3.1
	Pendimethalin	$y = 171.6x - 16.13$	0.999 9	0.010, 0.050, 0.100	104, 105, 102	4.2, 3.0, 1.8
	Butralin	$y = 4.519x - 1.458$	0.999 5	0.010, 0.050, 0.100	99.1, 91.0, 104	3.5, 5.6, 4.8
	Isopropalin	$y = 593.6x - 168.6$	0.999 8	0.010, 0.050, 0.100	106, 97.0, 97.6	3.2, 3.7, 2.4
	Dinitramine	$y = 195.9x - 153.0$	0.998 6	0.010, 0.050, 0.100	102, 107, 92.0	5.0, 4.8, 4.9
	Nitralin	$y = 652.8x - 106.4$	0.999 7	0.010, 0.050, 0.100	100, 113, 90.3	5.1, 8.6, 7.7
	Oryzalin	$y = 265.2x + 29.75$	0.999 5	0.010, 0.050, 0.100	90.4, 100, 92.8	7.1, 2.7, 7.3
	Prodiamine	$y = 430.6x - 134.8$	0.999 6	0.010, 0.050, 0.100	106, 99.0, 94.5	5.5, 2.8, 7.9
Soybean	Trifluralin	$y = 0.8234x + 6.626$	0.991 0	0.010, 0.050, 0.100	109, 104, 97.7	5.9, 10.6, 17.7
	Pendimethalin	$y = 39.36x - 11.64$	0.997 2	0.010, 0.050, 0.100	82.8, 91.5, 87.4	7.8, 6.2, 10.5
	Butralin	$y = 4.618x - 5.693$	0.994 8	0.010, 0.050, 0.100	83.0, 85.0, 84.1	10.3, 8.6, 8.3
	Isopropalin	$y = 488.3x - 391.2$	0.996 6	0.010, 0.050, 0.100	80.3, 84.8, 82.8	4.3, 7.5, 7.3
	Dinitramine	$y = 160.8x - 156.2$	0.998 0	0.010, 0.050, 0.100	76.7, 86.0, 83.2	9.0, 5.3, 13.2
	Nitralin	$y = 352.8x - 490.8$	0.990 2	0.010, 0.050, 0.100	89.6, 91.8, 89.0	8.4, 4.7, 6.2
	Oryzalin	$y = 254.0x - 104.0$	0.998 3	0.010, 0.050, 0.100	105, 96.5, 92.1	11.0, 15.7, 19.0
	Prodiamine	$y = 160.8x + 156.2$	0.986 5	0.010, 0.050, 0.100	75.9, 85.8, 91.1	8.7, 13.6, 8.6
Chicken livers	Trifluralin	$y = 1.436x - 7.264$	0.991 1	0.010, 0.050, 0.100	109, 90.7, 82.8	8.4, 11.1, 13.1
	Pendimethalin	$y = 136.2x - 17.07$	0.999 5	0.010, 0.050, 0.100	91.3, 84.4, 76.9	4.9, 6.6, 8.3
	Butralin	$y = 3.995x - 702.7$	0.998 6	0.010, 0.050, 0.100	91.3, 90.5, 92.5	7.9, 8.3, 4.6
	Isopropalin	$y = 522.3x - 79.38$	0.998 1	0.010, 0.050, 0.100	87.5, 89.0, 86.9	7.5, 6.6, 4.9
	Dinitramine	$y = 186.4x + 43.13$	0.999 3	0.010, 0.050, 0.100	85.3, 91.3, 94.1	8.7, 5.8, 3.2
	Nitralin	$y = 381.4x + 30.82$	0.998 4	0.010, 0.050, 0.100	91.7, 92.8, 93.7	7.6, 1.4, 2.3
	Oryzalin	$y = 131.8x + 431.7$	0.997 0	0.010, 0.050, 0.100	90.9, 92.2, 93.2	7.0, 6.3, 1.7
	Prodiamine	$y = 263.4x - 314.7$	0.998 1	0.010, 0.050, 0.100	90.3, 91.3, 80.1	6.9, 8.5, 5.2

3 结 论

本文采用正己烷饱和的乙腈提取目标物, 经 Oasis HLB 柱和 Envi - Carb 柱净化后, 提取效率高、净化效果好, 方法具有较高的回收率、良好的精密度和较低的定量下限, 适用于对茶叶、大豆和鸡肝等复杂基质食品中的 8 种二硝基苯胺类除草剂的同时测定。

参考文献:

- [1] GB/T 19426 - 2006. Determination of 497 Kinds of Pesticide Residues and Related Chemicals in Honey, Fruit Juice and Wine. National Standards of the People's Republic of China(蜂蜜、果汁和果酒中 497 种农药及相关化学品残留量的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [2] GB/T 19648 - 2006. Determination of 500 Pesticides and Related Chemicals Residues in Fruits and Vegetables. National Standards of the People's Republic of China(水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留的测定. 中华人民共和国国家标准).

- [3] GB/T 19649 – 2006. Determination of 475 Pesticides and Related Chemicals Residues in Grains. National Standards of the People's Republic of China(粮谷中 475 种农药及相关化学品残留量的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [4] GB/T 20769 – 2008. Determination of 405 Pesticides and Related Chemicals Residues in Fruits and Vegetables. National Standards of the People's Republic of China(水果和蔬菜中 405 种农药及相关化学品残留量的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [5] GB/T 20770 – 2008. Determination of 372 Pesticides and Related Chemicals Residues in Grains. National Standards of the People's Republic of China(粮谷中 372 种农药及相关化学品残留量的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [6] GB/T 20771 – 2008. Determination of 420 Kinds of Pesticide Residues and Related Chemicals in Honey, Fruit Juice and Wine. National Standards of the People's Republic of China(蜂蜜、果汁和果酒中 420 种农药及相关化学品残留量的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [7] SN 0712 – 2010. The Method for Determination of Esprocarb, Pendimethalin, Pretilachlor, Flutolanil, Mebenil and Mefenacet Residues for Export Grains. Inspection and Quarantine Industry Standards of the People's Republic of China. (出口粮谷中戊草丹、二甲戊灵、丙草胺、氟酰胺、灭锈胺、苯噻草胺残留量检验方法. 中华人民共和国检验检疫行业标准).
- [8] SN 0600 – 1996. Method for the Inspection of the Residual Amount of Fluorine in the Grain for Export. Inspection and Quarantine Industry Standards of the People's Republic of China. (出口粮谷中氟乐灵残留量检验方法. 中华人民共和国检验检疫行业标准).
- [9] Huo J L, Yu J, Chu X G, Li J, Fu J, Ge Y Q, Li Y, Wang B N. *Food Sci.* (霍江莲, 于静, 储晓刚, 李军, 付佳, 葛毅强, 李妍, 王碧娜. 食品科学), **2009**, 20(30): 299 – 302.
- [10] Huo J L, Li J, Ge Y Q, Chu X G. *J. Agrochem.* (霍江莲, 李军, 葛毅强, 储晓刚. 农药), **2006**, 45(4): 223 – 226.
- [11] Chu X G, Hu X Z, Yao H Y. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1063: 201 – 210.
- [12] Chen Q Y, Ge B K, Han H F, Wang Y F. *J. Instrum. Anal.* (陈其勇, 葛宝坤, 韩红芳, 王云凤. 分析测试学报), **2011**, 30(5): 573 – 576.
- [13] Cabras P, Melis M, Spanedda L, Tuberioso C. *J. Chromatogr. A*, **1991**, 585(1): 164 – 167.
- [14] García V A I, Sánchez B C, Martínez L, Tadeo J L. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 719(1): 113 – 119.
- [15] Bian Z Y, Tang G L, Zhang H F, Li Z H, Hu Q Y. *Tobacco Sci. Technol.* (边照阳, 唐纲岭, 张洪非, 李中皓, 胡清源. 烟草化学), **2010**, 8: 50 – 54.
- [16] Yong W, Zhao Y S, Chu X G. *J. Univ. Chem.* (雍炜, 赵延胜, 储晓刚. 大学化学), **2009**, 24(1): 70 – 72.