

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.11.021

液相色谱-串联质谱法测定果园土壤中的多种农药及其代谢产物^①

朱 恒¹, 张 丹¹, 张进忠^{1,2}, 王国民³, 唐柏彬³

1. 西南大学 资源环境学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 重庆市农业资源与环境重点实验室, 重庆 400716;
3. 重庆出入境检验检疫局, 重庆市进出口食品安全工程技术研究中心, 重庆 400020

摘要: 采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS), 建立了果园土壤中乐果、甲基托布津、联苯菊酯及其主要代谢产物氧乐果、多菌灵、三氟氯氰菊酯的同时测定方法. 样品经二氯甲烷-甲醇(1/1, V/V)振荡提取后, 用 LC-Al-N 固相萃取小柱净化, C₁₈ 柱分离, 以乙腈-乙酸铵溶液(含 0.2% 甲酸)为流动相梯度洗脱. 在多反应监测(MRM)模式下, 获得上述 6 种化合物的线性范围为 2~500 $\mu\text{g/kg}$, 检测限分别为 0.5, 0.2, 0.2, 0.5, 1 和 1 $\mu\text{g/kg}$, 在加标水平为 5, 10, 20 $\mu\text{g/kg}$ 的平均回收率为 72.02%~110.56%, 相对标准偏差为 2.66%~7.99%, 并成功应用于实际土壤中多种农药及其代谢产物的测定.

关键词: 果园土壤; 农药; 农药代谢产物; 残留检测; 液相色谱-串联质谱法

中图分类号: X592

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)11-0144-07

中国是水果生产大国^[1], 苹果、柑橘、梨、桃和柿子等果树的种植面积均居世界前列^[2]. 在果园施用杀虫剂和杀菌剂, 如联苯菊酯、乐果和甲基托布津等农药, 为果品的稳产和丰产发挥了重要作用. 但是, 果园施入的农药只有 10%~20% 作用于果树, 其余部分中约有 40%~60% 会直接进入土壤^[3], 给土壤生态环境带来潜在威胁^[4]. 农药在土壤中迁移、转化、富集与积累, 不仅危害土壤生态环境, 而且危害果品安全, 通过食物链进而影响人体健康^[5]. 因此, 加强果园土壤中农药残留监控十分必要和非常迫切.

目前, 环境和农产品中乐果、联苯菊酯和甲基托布津的残留检测大多采用气相色谱法或高效液相色谱法^[6-11], 我们也开展了果园土壤中乐果、甲基托布津和联苯菊酯残留的同时测定研究^[6], 但未见同时测定这些化合物及其主要代谢产物研究的报道. 为此, 本研究以果园中常用的杀虫剂及其代谢产物(乐果和氧乐果、联苯菊酯和三氟氯氰菊酯)、杀菌剂及其代谢产物(甲基托布津和多菌灵)为检测对象^[12], 优化提取和净化条件, 采用 LC-MS/MS 法建立果园土壤中多种农药残留的同时测定方法, 以期为保护果园土壤生态环境和人体健康、促进我国果业的可持续发展提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

LC-MS/MS 仪: Quattro Premier XE 型, 美国 Waters 公司;

① 收稿日期: 2014-04-07

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903056).

作者简介: 朱 恒(1988-), 男, 重庆荣昌人, 硕士研究生, 主要从事环境污染化学研究.

通信作者: 张进忠, 教授, 博士研究生导师.

固相萃取(SPE)柱: LC-NH₂ 柱(60 mg,3 mL)、LC-Alunina-N 柱(60 mg,3 mL)和 LC-Florisil 柱(100 mg, 3 mL)均为美国 Supelco supelclean 产品;

氮吹仪: DC12 型, 上海安谱科学仪器有限公司; 旋涡混合器: XH-B 型, 江苏康健医疗用品有限公司; 超声波清洗器: AS10200B 型, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机: Z323K 型, 德国 Hettich 公司; 旋转蒸发仪: Laborota 4011 型, 德国 Heidolph 公司.

乐果、甲基托布津、联苯菊酯及其代谢产物标准贮备溶液: 分别称取 25 mg 乐果、氧乐果、多菌灵、甲基托布津、联苯菊酯、三氟氯氰菊酯标准品(纯度均高于 98%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司), 用甲醇(HPLC 级)溶解, 定容至 50 mL, 配制成浓度为 500 mg/L 的 6 种化合物的单一标准贮备溶液, 于 4 ℃冰箱中冷藏保存;

混合标准中间溶液: 分别移取 6 种化合物的单一标准贮备液, 用甲醇稀释, 使每种化合物的浓度均为 100 mg/L, 于 4 ℃冰箱中冷藏保存;

混合标准工作溶液: 根据需要临用前移取一定体积的混合标准中间溶液, 用流动相(20%乙腈—80%乙酸铵溶液)稀释, 配制成适当浓度的混合标准工作溶液.

1.2 实验方法

采用多点混合采样法, 采集重庆市金果园内梨园、枣园和桃园等 3 个园区的表土样品(0~20 cm). 土样取回后均匀摊放在塑料布上, 去除砾石、植物残体和其他杂物, 自然风干 1 周, 压磨、过 2 mm 的尼龙筛、混匀, 研磨、过 40 目尼龙筛、再混匀, 装入塑料袋备测.

称取 5 g(精确至 0.001 g)处理后的土样于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇, 2 600 r/min 旋涡混匀 1 min, 超声提取 30 min, 6 000 r/min 离心 5 min. 准确移取上清液 10 mL, 在氮吹仪上 40 ℃吹干溶剂, 用 1 mL 流动相(20%乙腈—80%乙酸铵溶液)溶解, 过 0.45 μm 滤膜后供 LC-MS/MS 分析.

1.3 LC-MS/MS 测定条件

1.3.1 质谱检测条件

最佳质谱条件: 正离子模式下, 毛细管电压: 3 000 V; 离子源温度: 110 ℃; 去溶剂气温度: 350 ℃; 锥孔气流速: 50 L/h; 去溶剂气流速: 600 L/h; 碰撞器压力: 3.99×10^{-3} mbar; 监测模式: 多反应监测模式. 待测物的定性和定量离子对、锥孔电压、碰撞能量和驻留时间如表 1 所示.

表 1 待测物的定性和定量离子对及锥孔电压与碰撞能量和驻留时间

化合物	离子转换	锥孔电压/V	碰撞能量/V	驻留时间/s
氧乐果	214.20>155.20*	15.0	16.0	0.20
	214.20>183.20	15.0	12.0	0.20
多菌灵	192.30>132.20*	15.0	28.0	0.20
	192.30>160.20	15.0	16.0	0.20
乐果	230.10>125.10*	10.0	20.0	0.20
	230.10>199.10	10.0	10.0	0.20
甲基托布津	343.00>92.90*	24.0	44.0	0.20
	343.00>150.90	24.0	26.0	0.20
三氟氯氰菊酯	467.40>208.20*	10.0	20.0	0.20
	467.40>225.20	10.0	18.0	0.20
联苯菊酯	440.40>166.00*	5.0	50.0	0.20
	440.40>181.30	5.0	28.0	0.20

注: * 为定量离子对.

1.3.2 色谱分离条件

Acquity UPLC™ BEH C₁₈柱: 150 mm×2.1 mm, 膜厚 5 μm, 美国 Waters 公司; 柱温为 30 ℃; 进样量为 10 μL. 分别以乙腈和 5 mol/L 乙酸铵溶液(0.2%甲酸)为流动相 A 和流动相 B, 色谱分离采用梯度洗脱程序: 0→2 min, 20%A; 2→4 min, 40%A; 4→6 min, 90%A; 6→9 min, 20%A.

2 结果与讨论

2.1 样品提取条件的优化

2.1.1 提取剂的筛选

目前, 通常采用乙腈、丙酮、二氯甲烷和三氯甲烷提取乐果、氧乐果^[6, 9], 乙酸乙酯提取多菌灵和甲基托布津^[13], 甲醇提取三氟氯氰菊酯和联苯菊酯^[14]. 本研究以甲醇、乙腈、丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯、三氯甲烷和甲醇-二氯甲烷(1:1, V/V)为提取溶剂, 比较它们对土壤中 6 种化合物的提取效率, 筛选出对 6 种化合物具有较高提取效率的有机溶剂, 获得的结果见图 1.

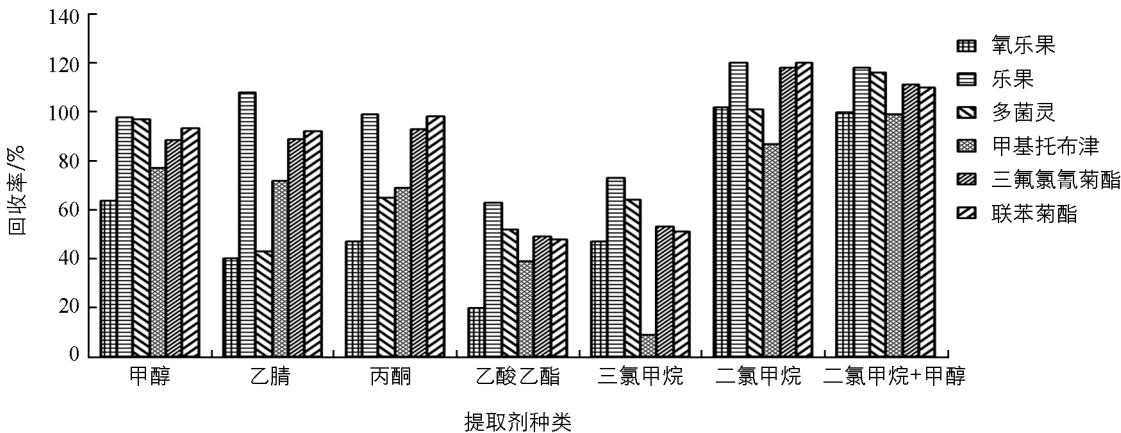


图 1 不同提取剂对 6 种化合物的提取效果

从图 1 可以看出, 乙酸乙酯和三氯甲烷对 6 种化合物的回收率都很低; 甲醇可提取乐果、多菌灵、三氟氯氰菊酯和联苯菊酯, 但氧乐果和甲基托布津的回收率相对较低; 乙腈对乐果、三氟氯氰菊酯和联苯菊酯的提取效果较好, 但氧乐果和多菌灵的回收率约为 40%; 丙酮对乐果、三氟氯氰菊酯和联苯菊酯的回收率均在 92% 以上, 但氧乐果低于 50%; 二氯甲烷、甲醇-二氯甲烷对 6 种化合物的回收率均在 90% 以上, 但单独用二氯甲烷提取甲基托布津的回收率略低于甲醇-二氯甲烷混合溶剂. 因此, 本研究选用甲醇-二氯甲烷混合溶剂为提取剂.

2.1.2 提取剂用量的确定

考察了提取剂用量对 6 种化合物回收率的影响, 获得如图 2 所示的结果. 从图 2 可以看出, 对于乐果、多菌灵、三氟氯氰菊酯和联苯菊酯等 4 种化合物, 用 20 mL 甲醇-二氯甲烷混合溶剂能够基本提取完全. 但在提取甲基托布津和氧乐果时, 需要 40 mL 才能基本提取完全, 且对其余 4 种化合物的回收率影响不大. 因此, 研究中采用 40 mL 提取剂分 2 次提取.

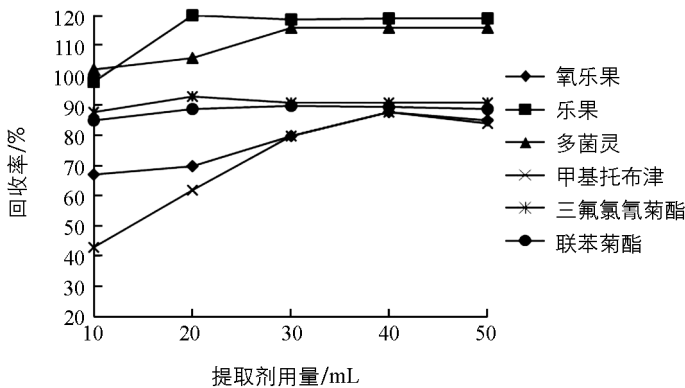


图 2 提取剂用量对回收率的影响

2.2 提取液净化条件的优化

2.2.1 SPE 小柱的筛选

现有研究中,大多采用 Florisil 柱净化提取液中的联苯菊酯、三氟氯氰菊酯^[15-16].在酸性条件下,多菌灵可形成阳离子,在 SCX 柱上有较好的保留,而甲基托布津不适合用 SCX 柱净化^[16].本研究采用 LC-NH₂、LC-Al-N 和 LC-Florisil 等 SPE 小柱净化提取液,考察它们对 6 种化合物的保留效果,获得如图 3 所示的结果.从图 3 可以看出,LC-Florisil 柱对三氟氯氰菊酯、联苯菊酯的保留效果较好,与检测三氟氯氰菊酯、联苯菊酯残留的报道一致,回收率均在 90%左右^[18];除多菌灵外,LC-NH₂ 柱对其他 5 种化合物都有较好的保留效果;LC-Al-N 柱净化 6 种化合物,均能获得理想的保留效果,回收率均在 95%以上.因此,选择 LC-Al-N 柱净化样品提取液.

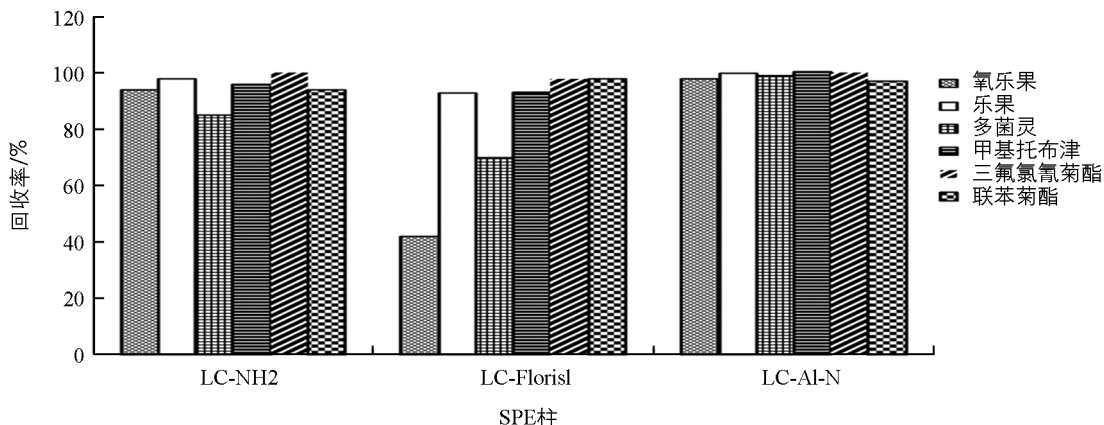


图 3 不同 SPE 柱对 6 种化合物的保留效果

2.2.2 洗脱剂的选择

基于有研究采用乙酸乙酯—正己烷、乙腈、二氯甲烷—甲醇等洗脱 SPE 柱保留的联苯菊酯和多菌灵等农药^[18-19],本文考察乙酸乙酯—正己烷(1:1, V/V)、乙腈、二氯甲烷—甲醇(1:1, V/V)和乙酸乙酯—丙酮(1:1, V/V)对 6 种化合物的洗脱效果,获得如图 4 所示的结果.

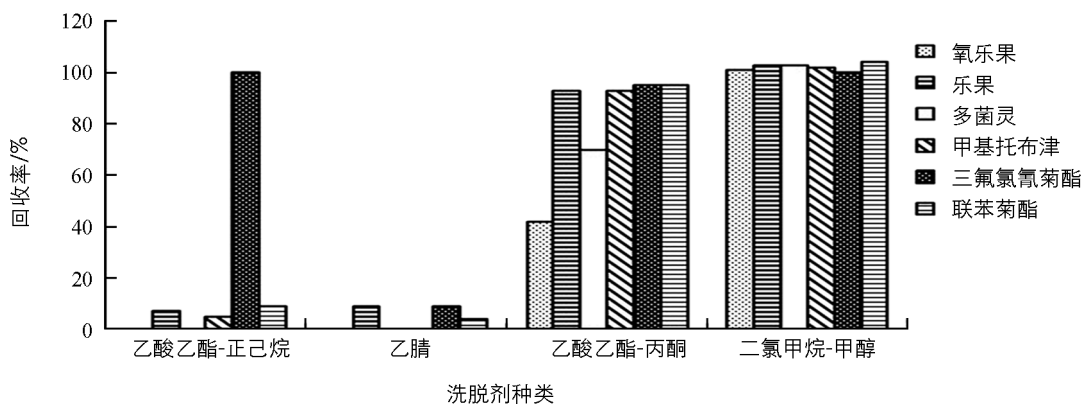


图 4 不同洗脱剂提取 6 种化合物的回收率

从图 4 可以看出,用乙酸乙酯—正己烷为洗脱剂时,三氟氯氰菊酯的回收率达到 100%,其他 5 种化合物的回收率均低于 10%;用乙腈做洗脱剂时,6 种化合物的回收率均低于 10%;乙酸乙酯—丙酮对 6 种化合物均有较强的洗脱能力,乐果、甲基托布津、三氟氯氰菊酯和联苯菊酯的回收率均超过 90%,多菌灵的回收率为 69.8%,但乐果的回收率低于 50%;用二氯甲烷—甲醇(1:1, V/V)洗脱时,6 种化合物的回收率均在 100%附近.因此,选定二氯甲烷—甲醇洗脱 SPE 柱保留的 6 种化合物.

2.2.3 洗脱剂用量的确定

在 LC-Al-N 小柱中加入混合标准溶液,用不同体积的二氯甲烷-甲醇(1 : 1, V/V)洗脱,获得如图 5 所示的结果.从图 5 可以看出,当洗脱剂用量为 4 mL 时,氧乐果、乐果、甲基托布津、三氟氯氰菊酯和联苯菊酯的回收率达到 100%,而多菌灵被完全洗脱需要 8 mL 洗脱液.综合考虑,洗脱 6 种化合物的最佳洗脱剂用量确定为 8 mL.

2.3 线性范围和检测限

在选定的 LC-MS/MS 条件下进行测定,以各组分 的峰面积(A)对浓度(C)绘制标准曲线.结果表明,在 2~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内,6 种化合物的峰面积与其质量浓度间均呈良好的线性关系,获得氧乐果、乐果、多菌灵、甲基托布津、三氟氯氰菊酯和联苯菊酯的检测限($S/N=3$)分别为 0.5,0.2,0.2,0.5,1 和 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.本方法获得的检测限低于国际通行最高限量规定或肯定列表一律标准(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$),且低于文献[20]报道的检测限(如乐果 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,多菌灵 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,甲基托布津 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

2.4 回收率和精密度

在空白土样中添加 6 种化合物的混合标准工作溶液,加标水平为 5,10 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,分别平行测定 8 次,获得如表 2 所示的结果.从表 2 可以看出,6 种化合物的回收率为 72.02%~110.56%,相对标准偏差(RSDs)为 2.66%~7.99%,符合农业行业标准对回收率和精密度的要求,且优于文献[21~22]的回收率,表明本文建立的方法准确可靠.

表 2 6 种化合物在空白土样中的添加回收率和精密度($n=8$)

化合物	添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率范围/ %	RSD/ %	化合物	添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率范围/ %	RSD/ %
氧乐果	5	82.12~90.67	4.39	甲基托布津	5	79.87~87.55	3.85
	10	76.50~93.28	7.72		10	88.42~107.28	7.90
	20	92.85~106.98	5.73		20	75.48~108.17	7.62
乐果	5	78.10~101.14	7.76	三氟氯氰菊酯	5	75.24~86.56	7.99
	10	78.96~93.66	5.38		10	79.32~101.02	7.32
	20	75.17~88.34	2.66		20	76.12~98.36	7.24
多菌灵	5	86.50~110.56	6.31	联苯菊酯	5	88.09~105.51	3.40
	10	72.02~90.45	5.88		10	94.05~109.89	4.28
	20	76.87~90.31	5.54		20	87.78~104.40	7.46

2.5 实际样品分析

用建立的 LC-MS/MS 法测定果园土壤样品,仅在梨园土壤中检出联苯菊酯(含量为 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$),低于果园土壤杀虫剂残留限量标准(GB15618-1995,联苯菊酯 0.50 mg/kg),未检出其他农药和中间体.

3 结 论

采用 LC-MS/MS 法,建立了果园土壤中常用杀虫剂、杀菌剂及其主要代谢产物的同时测定方法.在 2~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度范围内,乐果、甲基托布津、联苯菊酯、氧化乐果、多菌灵和三氟氯氰菊酯的色谱

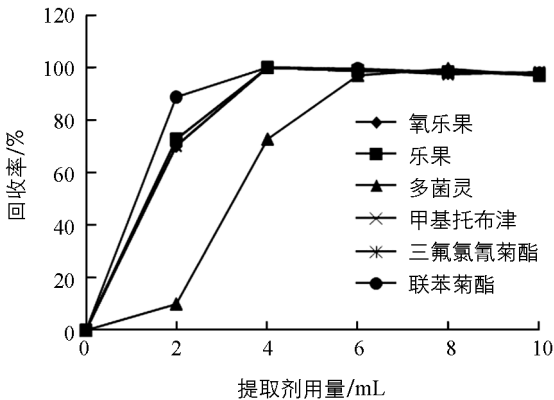


图 5 不同洗脱剂用量对 6 种化合物的回收率

峰面积与其浓度间线性关系良好,获得的检测限分别为 0.5,0.2,0.2,0.5,1 和 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,加标回收率为 72.02%~110.56%,RSD 为 2.66%~7.99%。方法操作简便,分离效果好,灵敏度高,可满足果园土壤中多种农药残留检测的实际需要。

参考文献:

- [1] 郑钦玉,李建中,苏武斌,等.三峡库区野果植物资源调查初报[J].西南农业大学学报:自然科学版,2006,28(4): 614—623.
- [2] 史光瑚,王国平.我国果树生产现状与发展建议[J].中国果树,1997(4): 3—5.
- [3] 张丽.化学农药对农业环境的污染与防治[J].南京农专学报,2001,17(4): 37—43.
- [4] 史婕,申鸿,郭涛,等.氯氰菊酯对紫色土土著微生物数量及土壤酶活性的影响[J].西南大学学报:自然科学版,2012,34(5): 97—101.
- [5] 王茂起,王竹天,包大跃,等.中国 2000 年食品污染状况监测与分析[J].中国食品卫生杂志,2002(2): 3—8.
- [6] 张丹,张进忠,骆云中,等.高效液相色谱同时测定果园土壤中的乐果、甲基托布津和联苯菊酯残留[J].西南师范大学学报:自然科学版,2012,37(3): 92—95.
- [7] WATANABE E, KOBARA Y, BABA K, et al. Aqueous Acetonitrile Extraction for Pesticide Residue Analysis in Agricultural Products with HPLC-DAD[J]. Food Chemistry, 2013, 154: 7—12.
- [8] 廖涛,杨玉平,程薇,等.苹果中多菌灵、啶菌灵和甲基托布津的高效液相色谱法分析[J].分析测试技术与仪器, 2010, 16(4): 257—261.
- [9] 夏晶晖,吴中军,胡华,等.蔬菜有机磷农药残留检测分析[J].西南大学学报:自然科学版,2008,30(6): 126—129.
- [10] BOERIS V, ARANCIBIA J A, OLIVIERI A C. Determination of Five Pesticides in Juice, Fruit and Vegetable Samples by Means of Liquid Chromatography Combined with Multivariate Curve Resolution[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 814: 23—30.
- [11] MA G F, CHEN L G. Development of Magnetic Molecularly Imprinted Polymers Based on Carbon Nanotubes: Application for Trace Analysis of Pyrethroids in Fruit Matrices[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1329: 1—9.
- [12] 张丹.果园土壤中多种农药残留的同时测定方法研究[D].重庆:西南大学,2012.
- [13] 廖涛,杨玉平,程薇,等.苹果中多菌灵、啶菌灵和甲基托布津的高效液相色谱法分析[J].分析测试技术与仪器, 2010, 16(4): 257—261.
- [14] 吴超峰,王秀敏,尹兵.高效液相色谱法测定联苯菊酯悬浮剂中的联苯菊酯[J].理化检验—化学分册,2011,47(3): 305—311.
- [15] 黄智辉,王登飞,陈练洪,等.气相色谱法同时测定蔬菜中三氟氯氰菊酯、氟氯氰菊酯、氟氰戊菊酯残留量[J].食品科技,2009,34(1): 264—266.
- [16] 顾海东,陶冠红,孙欣阳,等.加速溶剂萃取—气相色谱法测定土壤中的联苯菊酯[J].化学分析计量,2009,18(6): 43—45.
- [17] GARRIDO F A, MARTNEZ V J L, PASTOR M E, et al. High-Throughput Determination of Pesticide Residues in Food Commodities by Use of Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 390(3): 947—959.
- [18] 谢湘云,沈爱斯,叶江雷,等.固相萃取小柱净化—气相色谱法测定土壤和沉积物中有机氯和拟除虫菊酯农药残留[J].环境化学,2006,25(3): 347—350.
- [19] 潘艳坤,劳燕文,谢一兴,等.固相萃取—高效液相色谱法对罗汉果及其提取物中甲基托布津与多菌灵的同时测定[J].分析测试学报,2010,29(2): 199—202.
- [20] 刘宝峰,刘罡一,马又娥,等.高效液相色谱—串联质谱法检测蔬菜水果中 65 种农药残留方法研究[J].科技通报, 2010, 26(1): 93—99.

[21] 杨 琳, 温裕云, 弓振斌. 加速溶剂萃取-液相色谱-串联质谱法测定近岸及河口沉积物中的拟除虫菊酯农药 [J]. 分析化学, 2010, 38(7): 968—972.

[22] 张 云, 李耀平, 李敏新, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中 7 种有机磷类农药残留物 [J]. 分析实验室, 2009, 28(增刊): 191—194.

Determination of Multiple Pesticides and Their Metabolites in Orchard Soil by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ZHU Heng¹, ZHANG Dan¹, ZHANG Jin-zhong^{1,2},
WANG Guo-min³, TANG Bo-bin³

- 1. School of Resources and Environment, Southwest University, Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;
- 2. Chongqing Key Laboratory of Agricultural Resources and Environment, Chongqing 400716, China;
- 3. Chongqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing Engineering Technology Research Center of Import and Export Food Safety, Chongqing 400020, China

Abstract: A simultaneous determination method for the residues of dimethoate, thiophanate methyl and bifenthrin and their major metabolites, omethoate, carbendazim and cyhalothrin, in orchard soil was developed by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Soil samples were extracted by mechanical shaking with dichloromethane-methanol (1/1, V/V), purified by LC-Al-N solid phase extraction (SPE) column, separated by C₁₈ column, and eluted by acetonitrile-ammonium acetate (0.2% formic acid) as the mobile phases with gradient elution. Under the mode of multiple reaction monitoring (MRM), the linear ranges of the above 6 compounds were 2~500 μg/kg, and the limits of detection were 0.5, 0.2, 0.2, 0.5, 1 and 1 μg/kg, respectively. The average recoveries spiked with 5, 10 and 20 μg/kg ranged from 72.02% to 110.56% with relative standard deviations (RSDs) around 2.66%~7.99%. This method has been successfully applied to determine multiple pesticides and their metabolites in actual soil samples.

Key words: orchard soil; pesticide; metabolite of pesticides; residual detection; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

责任编辑 陈绍兰

