

固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中 4 种有机磷农药及其代谢产物

刘 永^{1,2}, 唐英斐^{2,3}, 宋金凤^{2*}, 胡志伟²

(1. 黑龙江出入境检验检疫局技术中心, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江工商行政管理局, 黑龙江 哈尔滨 150018)

摘要:在蔬菜种植中经常使用的有机磷农药马拉硫磷、甲基对硫磷、敌百虫及乙酰甲胺磷可能转化的主要代谢产物分别为 *O*、*O*-二甲基二硫代磷酸酯、对硝基酚、敌敌畏及甲胺磷。根据蔬菜色素等基质的含量不同采用不同的净化方法,色素含量高的蔬菜采用活性炭和弗罗里硅土串联固相萃取小柱净化,其他蔬菜采用弗罗里硅土固相萃取小柱净化。色谱分离选择 ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱,以乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相进行梯度洗脱,得到的分离效果较好;质谱采用电喷雾正或负离子电离、多反应监测模式检测。液相色谱-质谱检测的基质效应为 15.3%~45.1%;4 种有机磷农药及其代谢物的方法回收率为 76.9%~102.8%,相对标准偏差为 5.92%~10.19%;定量限范围为 0.001~0.01 mg/L;在 0.01~1.00 mg/L 范围内线性相关系数为 0.998 2~0.999 9。方法具有良好的回收率、相对标准偏差、定量限及线性关系,适合蔬菜中有机磷及代谢物的检测,应用该检测方法对农贸市场购买的白菜、辣椒、西红柿及洋葱进行了检测。

关键词:固相萃取;液相色谱-串联质谱;有机磷农药;代谢产物;蔬菜

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2014)02-0139-06

Determination of four organophosphorus pesticides and their metabolites in vegetables using solid-phase extraction coupled with liquid chromatography- tandem mass spectrometry

LIU Yong^{1,2}, TANG Yingfei^{2,3}, SONG Jinfeng^{2*}, HU Zhiwei²

(1. Technology Center of Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China;

2. Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

3. Heilongjiang Province Administration for Industry & Commerce, Harbin 150018, China)

Abstract: Organophosphorus pesticides (OPs), malathion, methyl parathion, trichlorfon, and acephate were used frequently in vegetable cultivation, mainly metabolized into *O*、*O*-dimethyl dithiophosphate, 4-nitrophenol, dimethyl dichlorovinyl phosphate (DDVP) and methamidophos, respectively. A method of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed for the determination of the organophosphorus pesticides and their metabolites. According to the difference of coloring matter contents in vegetable matrix, the pre-treatment for vegetables with high coloring matter contents were performed using activated carbon coupled with a Florisil solid-phase extraction column, and others were purified by a Florisil solid-phase extraction column. A hydrophilic interaction chromatographic column (ACQUITY UPLC BEH HILIC) was used with acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate as mobile phases. The MS/MS detection was performed under positive or negative electrospray ionization (ESI) in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The results showed that the matrix effect of the LC-MS/MS was 15.3%~45.1%, the recoveries of the four organophosphorus pesticides and their

* 通讯联系人.E-mail:songnefu@126.com.

基金项目:国家质检总局课题(2009IK177).

收稿日期:2013-10-11

metabolites were 76.9%–102.8%, the precision ranged from 5.92% to 10.19%, the limits of quantification ranged from 0.001 to 0.01 mg/L, and the linear correlation coefficients were 0.998 2–0.999 9 in the range of 0.01–1.00 mg/L. This method was applied in the analysis of Chinese cabbages, hot peppers, tomatoes and onions from markets. This method can be applied in rapid detection of the organophosphorus pesticides and their metabolites in vegetables.

Key words: solid-phase extraction (SPE); liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); organophosphorus pesticides; metabolites; vegetables

有机磷农药具有广谱、高效等众多优点,是当前三大支柱农药之一,经过几十年的不断发展,在品种的数量、产量规模等方面都位居各种农药首位^[1]。由于有机磷农药对细菌、害虫、杂草生长等具有有效的控制作用和提高农业产量而被广泛使用,但有机磷农药使用过多,产生的负面效应也日益突显,致使农产品中农药残留严重超标,长期摄取含有机磷农药及代谢产物的农作物会对人的健康造成较大影响^[2]。

随着检测技术的发展和各国在食品安全研究方面的突破,除了对原药残留进行检测外,增加了对药物残留代谢产物的研究,并对其毒性较强的代谢产物进行检测。有机磷农药降解产物往往具有较强毒性,如敌百虫在一定条件下可迅速转化成毒性更强的敌敌畏^[3],乙酰甲胺磷在环境中容易降解成甲胺磷^[4],甲基对硫磷等含有苯硝基类有机磷农药最主要的降解产物是对硝基酚^[5],马拉硫磷代谢产物为中间体 *O,O*-二甲基二硫代磷酸酯等^[6]。我国在国家标准 GB 2763-2012 中对蔬菜中各种有机磷农药的残留限量有明确的规定,4 种有机磷农药及其代谢产物的残留限量为 0.02~8 mg/kg(对硝基酚及 *O,O*-二甲基二硫代磷酸酯没有规定),美国及欧盟的残留限量标准与 GB 2763-2012 所规定的限量基本一致^[7]。

有机磷农药的检测方法主要有气相色谱法^[8]、气相色谱-质谱联用法^[9]、气相色谱-串联质谱法^[10]、液相色谱-串联质谱法^[11]及毛细管电泳法^[12]等,前处理方法主要为液液萃取^[8,11]、QuEChERS 技术^[10,13]、固相萃取^[9,14]、固相微萃取^[15]等,但方法都局限于农药母体的检测,很少关注农药代谢产物的同时检测,而部分有机磷农药代谢产物在食品中的残留富集,对人体带来的伤害甚至远高于有机磷农药本身^[4]。有机磷农药代谢物的检测,若局限于某一种化合物或者是几种可能代谢物的检测,不具有针对性,不能作为有机磷农药的标记物^[16,17]。农药及其代谢产物的检测,对食品安全具有更重要的价值,可能是未来农药残留检测的热点和难点。本

文以菠菜和洋葱为研究对象,用固相萃取-液相色谱-质谱联用技术同时检测 4 种有机磷农药及其代谢产物,对农药残留检测的技术储备及农药代谢产物的研究具有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters ACQUITY Ultra Performance 液相色谱系统,并配有溶剂管理器;Waters XEVO TQ 三重四极杆质谱仪(Waters 公司);均质机(T 25, IKA 公司);组织捣碎机(Philips 公司);固相萃取装置(Supelco 公司)等。

有机磷农药及其代谢产物标准品:马拉硫磷(malathion,纯度 99.5%, Fluka 公司), *O,O*-二甲基二硫代磷酸酯(dimethyl dithiophosphate,纯度 97%, 维赛诺化学技术有限公司),甲基对硫磷(parathion-methyl,纯度 99.8%, Sigma 公司),对硝基酚(4-nitrophenol,纯度 99.5%, 国药集团化学试剂有限公司),敌百虫(trichlorfon,纯度 99.5%, Sigma 公司),敌敌畏(dimethyl dichlorovinyl phosphate, DDVP,纯度 99.8%, Fluka 公司),乙酰甲胺磷(acephate,纯度 99.5%, Fluka 公司),甲胺磷(methamidophos,纯度 99.5%, Fluka 公司)。标准品用乙腈溶解,于 4 ℃ 冰箱中保存,使用时用流动相定容。500 mg 6 mL 活性炭固相萃取柱及 500 mg 6 mL 弗罗里硅土固相萃取小柱均购自 Supelco 公司,其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 样品前处理方法

叶菜以菠菜为试验样本。提取:样品用组织捣碎机处理后,称取约 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 2 g MgSO_4 、20 mL 乙酸乙酯,均质器均质 2 min(不低于 10 000 r/min),然后于 4 000 r/min 下离心 5 min,取上层清液。净化:取 10 mL 上层清液过 500 mg 6 mL 活性炭和 500 mg 6 mL 弗罗里硅土串联小柱(小柱经 5 mL 乙酸乙酯活化处理),再用 10 mL 乙酸乙酯洗脱小柱,合并流出液和上样液,氮吹至近干,用 1.0 mL 乙腈-5 mmol/L 乙

酸铵水溶液(1:1, v/v)溶解残渣,待测定。

其他色素含量较低的蔬菜以洋葱为试验样本。提取方法与叶菜相同,净化方法略有不同,10 mL 上层清液只经过弗罗里硅土小柱,其他操作完全相同。

1.3 液相色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH HILIC(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);柱温:30 ℃。进样器用强溶剂(30% 乙腈水溶液)和弱溶剂(70% 乙腈水溶液)清洗。流动相:溶剂 A 为乙腈,溶剂 B 为 5 mmol/L 的

乙酸铵水溶液。梯度洗脱程序:0~1.0 min, 50% B; 1.0~1.5 min, 50% B~70% B; 1.5~2.0 min, 70% B; 2.0~2.1 min, 70% B~50% B; 2.1~3.0 min, 50% B。流速:0.25 mL/min。

1.4 质谱条件

毛细管电压:2.5 kV;离子源温度:150 ℃;脱溶剂气(N₂)流速:650 L/h;雾帘气(N₂)流速:50 L/h;脱溶剂气温度:400 ℃;碰撞气:氩气。数据处理为 MassLynx v 4.1 系统。其他质谱参数见表 1。

表 1 有机磷农药及其代谢产物的质谱参数
Table 1 Optimized mass spectrum conditions of the organophosphorus pesticides and their metabolites

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Daughter ion (<i>m/z</i>)	Dwell time/s	Cone voltage/V	Collision energy/V
Trichlorfon	257.0 [M+H] ⁺	127.0 [*]	0.02	30	18
		221.0	0.02	30	10
		109.0	0.02	35	15
DDVP	221.0 [M+H] ⁺	127.0 [*]	0.02	35	15
		125.0	0.02	15	17
Acephate	184.0 [M+H] ⁺	143.0 [*]	0.02	15	7
		94.0	0.02	25	13
Methamidophos	142.0 [M+H] ⁺	125.0 [*]	0.02	25	14
		127.0	0.02	20	12
Malathion	331.0 [M+H] ⁺	285.0 [*]	0.02	20	8
		111.9	0.02	30	20
Dimethyl dithiophosphate	157.0 [M-H] ⁻	141.9 [*]	0.02	30	15
		256.0	0.02	40	20
Parathion-methyl	274.0 [M+H] ⁺	88.0 [*]	0.02	40	25
		92.0	0.02	30	20
4-Nitrophenol	138.0 [M-H] ⁻	108.0 [*]	0.02	30	15

* Quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的选择

有机磷农药及其代谢产物在乙酸乙酯、乙腈、丙酮及二氯甲烷等试剂中均有较好的溶解度,考虑到二氯甲烷对环境的污染及乳化问题,丙酮更适合于粮谷等物质中的有机磷及代谢物提取,蔬菜通常采用乙腈和乙酸乙酯作提取试剂。叶菜类蔬菜由于多数色素含量较高,而乙腈对叶绿素、叶黄素及胡萝卜素的提取效率高,提取液颜色较深,净化效果不好;采用乙酸乙酯进行提取,色素含量较低,再用活性炭小柱除去残留的色素,效果较为理想。试验中选择反相 C18 净化小柱,将提取液浓缩后用含 5% 甲醇的乙酸铵溶液溶解过柱,由于 *O,O*-二甲基二硫代磷酸酯及对硝基酚极性较强,柱保留效果不好,损失较大;采用正相净化方式,用乙酸乙酯溶解,过氧化铝小柱,对硝基酚的吸附作用较大,造成回收率不高;使用乙酸乙酯溶解,过弗罗里硅土小柱,净化效果最佳,因而采用弗罗里硅土的正相萃取净化方式。

2.2 检测条件的选择

传统有机磷农药的检测一般采用气相色谱或气

相色谱-质谱联用的方法^[8,9],但在检测 *O,O*-二甲基二硫代磷酸酯及敌百虫的过程中都遇到了一些问题^[16]。*O,O*-二甲基二硫代磷酸酯和敌百虫都是一种遇热易分解的物质,实验发现,*O,O*-二甲基二硫代磷酸酯遇热甲基化或分解成其他小分子化合物(见图 1),但转化效率不高,速率较慢,因而色谱峰对称性不好,峰形不尖锐,定量误差较大。*O,O*-二甲基二硫代磷酸酯的检测多采用五氟溴苄苯(PFB-Br)衍生,将羟基屏蔽以减小 *O,O*-二甲基二硫代磷酸酯的活性,再进行气化检测的方式,但是衍生效率不高,且步骤较为繁琐,也不利于多组分的同时检测^[16]。敌百虫由于在高温条件下 C-P 键易发生断裂,分子重排后生成三氯乙醛和亚磷酸二甲酯,一般采用对亚磷酸二甲酯的检测来确定敌百虫的含量,但是敌百虫的定量分解与温度条件关系密切,只有在气相色谱进样口超过 260 ℃时,定量分解才较为充分^[18]。所以 *O,O*-二甲基二硫代磷酸酯和敌百虫的检测条件有一定的矛盾性,采用气相色谱或气相色谱-质谱联用直接或衍生的检测方法,都不利于多组分的同时检测。

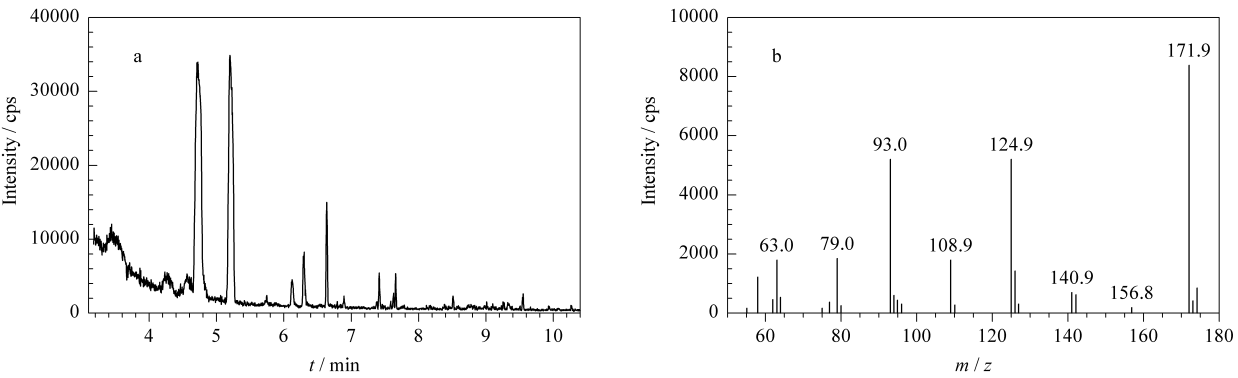


图 1 *O,O*-二甲基二硫代磷酸酯的 (a) 气相色谱图和 (b) 质谱图
Fig. 1 (a) Gas chromatogram and (b) mass spectrum of dimethyl dithiophosphate

采用液相色谱-质谱联用的方式进行检测,多数化合物效果较好,灵敏度高,且不需要衍生,但是*O,O*-二甲基二硫代磷酸酯和对硝基酚极性较强,保留弱,使用 C18 色谱柱不能满足分离要求。试验对色谱条件进行了优化和选择,使用 ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱进行分离,效果较好(见图 2)。

以菠菜作为基质,对 4 种有机磷农药及其代谢物采用活性炭和弗罗里硅土串联固相萃取小柱净化

后的绝对基质效应进行了考察,其基质效应都不高于 45.1%(见表 2),说明净化效果及质谱条件较为合理,有利于定量分析的准确性。

2.3 回收率和精密度

在蔬菜(菠菜)中添加有机磷农药及其代谢产物标准品进行回收率测定,每个水平测定 6 次,其加标回收率为 76.9%~102.8%,RSD 为 5.92%~10.19%(见表 2),结果表明方法符合检测要求。

表 2 菠菜中有机磷农药及其代谢产物的加标回收率、精密度 (*n*=6) 及基质效应
Table 2 Recoveries, relative standard deviations (RSDs) (*n*=6) and matrix effects of the organophosphorus pesticides and metabolites spiked in spinach

Compound	Spiked/(mg/kg)	Found/(mg/kg)	Average recovery/%	RSD/%	Matrix effect/%
Trichlorfon	0.10	0.0843	84.3	7.33	34.6
DDVP	0.10	0.0887	88.7	7.25	45.1
Acephate	0.10	0.0952	95.2	6.39	18.7
Methamidophos	0.10	0.1028	102.8	5.92	15.3
Malathion	0.10	0.0836	83.6	7.93	29.4
Dimethyl dithiophosphate	0.10	0.0769	76.9	8.86	19.8
Parathion-methyl	0.10	0.0821	82.1	10.19	32.3
4-Nitrophenol	0.10	0.0914	91.4	7.86	33.6

2.4 定量限及线性关系

将 8 种标准品配制成系列浓度的标准溶液,定量限采用在样品处理后的基质中添加标准品的方式获得,以至少大于 10 倍信噪比时的测得浓度计;以峰面积为纵坐标、标准品的质量浓度为横坐标绘制标准曲线,计算相关系数,结果表明,在 0.01~1.00 mg/kg 范围内均线性关系良好,相关系数(见表 3)均满足检测要求。

2.5 应用

试验采用购自哈尔滨市农贸市场的白菜、辣椒及西红柿,每个品种均有两个样本,用建立的固相萃取-液相色谱-串联质谱检测方法进行检测,发现一个西红柿样本中检测到 2.3 μg/kg 的马拉硫磷;一个辣椒样本中检测到 1.2 μg/kg 的对硝基酚,但由

于对硝基酚也可能为环境污染物,不能说明对硝基酚一定来自甲基对硫磷的降解。其他样本均未检出目标农药及其代谢物。

表 3 菠菜中有机磷农药及其代谢产物的定量限及标准曲线的线性相关系数
Table 3 Limits of quantification (LOQs, *S/N*>10) in spinach and correlation coefficients (*r*²) of standard curves for the organophosphorus pesticides and metabolites

Compound	LOQ/(mg/kg)	<i>r</i> ²
Trichlorfon	0.005	0.9985
DDVP	0.005	0.9991
Acephate	0.001	0.9993
Methamidophos	0.001	0.9983
Malathion	0.001	0.9980
Dimethyl dithiophosphate	0.01	0.9982
Parathion-methyl	0.01	0.9992
4-Nitrophenol	0.001	0.9999

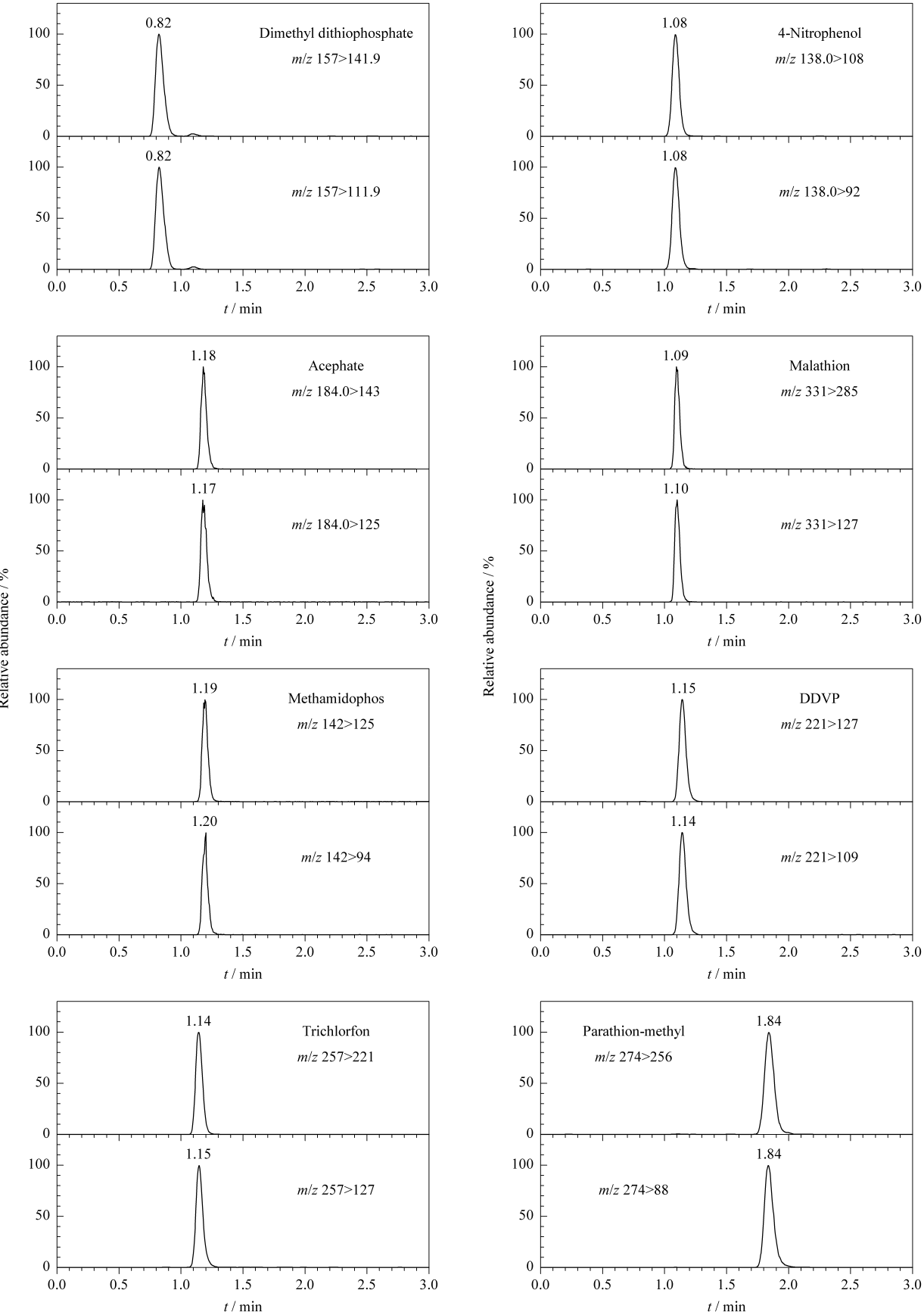


图 2 有机磷农药及其代谢产物混合标准溶液 (0.05 mg/L) 的 LC-MS/MS 谱图

Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms of a mixed standard solution of the organophosphorus pesticides and metabolites (0.05 mg/L)

3 结 论

色素含量高的蔬菜前处理采用活性炭和弗罗里硅土串联固相萃取净化方式,色素含量低的蔬菜用弗罗里硅土固相萃取净化方式,结果表明色素及其他杂质处理效果良好,经前处理的样品均为无色或浅黄色;液相色谱柱选择 ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱,增强极性化合物保留的同时,也起到了良好的净化分离作用,绝对基质效应较低。该方法具有良好的回收率、精密度、线性范围和定量限,符合农产品中农药残留检测方法的要求,适合科研或日常工作中检测有机磷农药及其代谢物。

参考文献:

[1] Zhang Q. Guangdong Chemical Industry (张强. 广东化工), 2013, 40(10): 142

[2] Wang J, Zheng X Y. Science & Technology Association Forum (王晶, 郑晓燕. 科协论坛), 2013(4): 89

[3] Jin T M, Sun X H. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities (金天明, 孙晓辉. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版), 2002, 17(5): 420

[4] Kong Z Q, Dong F S, Xu J, et al. Food Control, 2012, 23(1): 149

[5] Chávez-López C, Blanco-Jarvio A, Luna-Guido M, et al. Eur J Soil Biol, 2011, 47: 264

[6] Loewenherz C, Fenske R A, Simcox N J, et al. Environ Health Perspect, 1997, 105(12): 1344

[7] Lin W X. The Compilation of Residue Limits Standards for

Pesticides and Veterinary Drugs in Foodstuffs in the World (林维宣. 各国食品中农药兽药残留限量规定. 大连: 大连海事大学出版社), 2003

[8] Liu X P, Mitrevski B, Li D K, et al. Microchem J, 2013, 111(7): 25

[9] Rodrigues F de M, Mesquita P R R, de Oliveira L S, et al. Microchem J, 2011, 98(1): 56

[10] Chen X S, Bian Z Y, Yang F, et al. Chinese Journal of Chromatography (陈晓水, 边照阳, 杨飞, 等. 色谱), 2013, 31(11): 1116

[11] Xu Z L, Deng H, Deng X F, et al. Food Chem, 2012, 131(4): 1569

[12] Cao L W, Liang S L, Tan X F, et al. Chinese Journal of Chromatography (曹丽伟, 梁丝柳, 谭小芳, 等. 色谱), 2012, 30(12): 1295

[13] Wang L Z, Zhou Y, Chen Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (王连珠, 周昱, 陈泳, 等. 色谱), 2012, 30(2): 146

[14] Song W, Lin S S, Sun G D, et al. Chinese Journal of Chromatography (宋伟, 林姗姗, 孙广大, 等. 色谱), 2012, 30(3): 323

[15] Jiang S X, Feng J J. Chinese Journal of Chromatography (蒋生祥, 冯娟娟. 色谱), 2012, 30(3): 219

[16] Wu C H, Zheng L X, Zhou Z J. Fudan Univ J: Med Sci (邬春华, 郑力行, 周志俊. 复旦学报: 医学版), 2006, 33(4): 552

[17] Huang Y, Li Z Y, Zhao B S. Environmental Science and Management (黄雅, 李政一, 赵博生. 环境科学与管理), 2009, 34(4): 20

[18] Liu Y, Yang C Z, Kang Q H, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (刘永, 杨长志, 康庆贺, 等. 分析实验室), 2008, 27(2): 119