

分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱联用快速检测玉米及土壤中莠去津残留

陈武瑛^{1,2}, 廖晓兰¹, 徐 军², 董丰收², 程 莉², 刘新刚², 张 盈¹, 郑永权²

(1. 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 长沙 410123; 2. 农业部农药化学与应用重点开放实验室, 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘 要: 采用分散固相萃取(QuEChERS)为样品前处理方法, 建立了超高效液相色谱-串联四极杆质谱快速检测玉米及土壤中莠去津残留分析方法。玉米及土壤样品经乙腈提取、乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)分散固相(DSPE)净化后, 应用超高效液相色谱/电喷雾串联四极杆质谱仪多离子反应监测(MRM)定量检测, 分别以碎片离子 m/z 216>146 和 m/z 216>174 定性, 以 m/z 216>96 进行外标法定量。结果表明, 在 0.005~0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 添加水平范围内莠去津的平均添加回收率在 77.01%~112.62%之间, 相对标准偏差在 2.23%~8.43%之间, 对莠去津的检出限(LOD)为 0.39~0.91 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 定量检出限(LOQ)为 1.33~3.02 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。该方法灵敏度高, 操作简单, 定量准确, 测定浓度范围宽, 可用于莠去津的残留分析。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; QuEChERS 方法; 莠去津; 玉米; 土壤

中图分类号: X830.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2010)03-0604-05

Simplified Method for Determination of Atrazine Residues in Corn and Soil Using QuEChERS and UPLC-MS/MS

CHEN Wu-ying^{1,2}, LIAO Xiao-lan¹, XU Jun², DONG Feng-shou², CHENG Li², LIU Xin-gang², ZHANG Ying¹, ZHENG Yong-quan²

(1. College of Bio-safety Science & Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410123, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Pesticide Chemistry and Application, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract: A rapid method for the determination of atrazine residues in corn and soil was established based on matrix solid-phase dispersion and ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The sample was extracted by acetonitrile and then purified by primary secondary amine (PSA). The atrazine residues was analyzed by UPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring mode. The qualitative results were obtained based on retention time, the precursor ion and two daughter ions, and the quantitation results were on the intensity of the characteristic 216>146 ion, m/z 216>174 ion and m/z 216>96 ion. Average recoveries of atrazine in soil and corn samples were found in the range of 77.01%~112.62% at three spiking levels from 0.005 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ to 0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ with relative standard deviations of 2.23%~8.43%. Limits of detections of atrazine were 0.39~0.91 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, while limits of quantifications were 1.33~3.02 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The method is simple and suitable for the routine and confirmation analysis.

Keywords: UPLC-MS/MS; QuEChERS; atrazine; corn; soil

莠去津(atrazine 又名阿特拉津)化学名称为 2-氯-4-二乙氨基-6-异丙氨基-1,3,5-嗪, 是一种三氮苯类除草剂。主要用于玉米、高粱和甘蔗等作物田防除各种阔叶杂草及一年生禾本科杂草, 对多年生杂草

也有一定的抑制效果。莠去津因其残留期较长、水溶性较高、应用量大和施用范围广而导致其对环境的影响日益突出^[1]。美国卫生与社会服务部报告称, 长期暴露在莠去津中, 人的免疫系统、淋巴系统、生殖系统和内分泌系统都会受到影响, 有可能产生畸形、诱导有机体突变^[2]。另有研究报道, 莠去津可能对人体具有致癌性, 长期接触莠去津会引发卵巢癌和乳腺癌^[3-4]。

对莠去津残留分析, 国内外通常采用气相色谱法^[5-6]和高效液相色谱法^[7-10]。最近研究报道将色谱与

收稿日期: 2009-08-26

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119000); 农业行业标准制定和修订项目

作者简介: 陈武瑛(1982—), 女, 湖南凤凰人, 硕士生, 从事农药残留分析研究。E-mail: chenwuying333@126.com

通讯作者: 郑永权 E-mail: yongquan_zheng@yahoo.com.cn

质谱联用^[11-13],也有报道用酶免疫分析法^[14]。前处理多采用液液分配^[8]和固相萃取技术来净化^[11-13]。采用液相色谱法杂质干扰严重且灵敏度低。在酶联免疫法中,结构和组成相近的化合物容易产生交叉反应,同时在该法中需合成抗原、制备抗体这不仅工作量大条件要求也较严格。传统的液-液萃取操作繁琐,所用的有机溶剂会对环境造成二次污染。

本文建立了超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱快速检测玉米中莠去津残留分析方法。采用 QuEChERS 方法提取净化,超高效液相色谱-电喷雾串联质谱方法(UPLC-MS/MS)检测。该分析方法采用 UPLC-MS/MS 方法进行定性和定量,具有较好的特异性。目前,国内外尚未见相关报道。

1 材料与方法

1.1 药剂与仪器

莠去津标准品(纯度 98.0%,国家标准物中心);乙腈(色谱纯);水(超纯水);N-丙基乙二胺(PSA, Agela Technologies 公司);石墨化碳黑(GCB, 德国 CNW Technologies GmbH 公司);无水硫酸镁和氯化钠均为分析纯。

UPLC-MS/MS(Acquity-TQD, Waters 公司);Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 1.7 μm 2.1 $\times$ 50 mm, (Waters);XW-80A 漩涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂);TG16-WS 台式快速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);HY-5 回旋振荡器(常州国华电器);HR 1727/06/BC 飞利浦粉碎机(珠海飞利浦家庭电器有限公司);Filter Unit 滤膜(0.22 μm , MILLEX-GV)。

1.2 液相色谱/质谱检测条件

1.2.1 液相色谱条件

柱温 45 $^{\circ}\text{C}$;流动相为: V_A (乙腈): V_B (0.2%甲酸水溶液);二元梯度洗脱分离:0~3.0 min, 10%A;3.0~3.1 min, 90%A;3.1~4.9 min, 10%A。流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量 3 μL 。

1.2.2 质谱条件

大气压化学电离 ESI(+)方式扫描方式;毛细管电压 3.0 kV;离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$;去溶剂温度 350 $^{\circ}\text{C}$;去溶剂气流量 $\text{N}_2=500 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$;锥孔反吹气 $\text{N}_2=50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$;碰撞气为氩气。定性离子对 216>146、216>174,定量离子对 216>96(见表 1)。

1.3 标样溶液的配制

准确称取莠去津标准品 10 mg 用甲醇稀释定容到 100 mL 中,配成质量浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的储备

表 1 莠去津的选择监控离子、锥孔电压及碰撞能量

Table 1 Precursor ions and product ions of the atrazine in the

positive ion mode				
	母离子	子离子/ m/z	锥孔电压/V	碰撞能量/V
1	216	96	38	20
2	216	146	38	20
3	216	174	38	17

液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。准确移取适量标准储备液,配制质量浓度为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的莠去津标准溶液系列。

1.4 样品前处理方法

1.4.1 土壤样品分析

提取:准确称取土壤样品 10 g 于 50 mL 具塞离心管中加入 5 mL 蒸馏水后漩涡振荡 30 s;加入 10 mL 乙腈后再漩涡振荡 3 min;加入 4 g 无水 MgSO_4 和 1 g NaCl,剧烈振荡 1 min 后在 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 4 min。

净化:取上清液 1.5 mL 转入已加有 50 mg PSA、200 mg 无水 MgSO_4 的 2 mL 3810 型微量离心管中,涡旋 1 min;4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度下离心 5 min。上清液过 0.22 μm 有机系滤膜于自动进样瓶中,待测。

1.4.2 植物样品分析

提取:准确称取粉碎的玉米秆样品 10 g 于 50 mL 具塞离心管中加入 5 mL 蒸馏水后,再加入 10 mL 乙腈后用粉碎机匀浆 3 min 后漩涡振荡 3 min;加入 4 g 无水 MgSO_4 和 1 g NaCl,漩涡振荡 30 s 后在 7 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min。

准确称取粉碎的玉米粒样品 10 g 于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 乙腈,漩涡振荡 3 min;加入 3 g NaCl,漩涡振荡 30 s 后在 7 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min。

净化:取上清液 1.5 mL 转入已加有 25 mg PSA、5 mg Carb、100 mg 无水 MgSO_4 的 2 mL 3810 型微量离心管中,涡旋 1 min;4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min。上清液过 0.22 μm 有机系滤膜于自动进样瓶中,待测。

2 结果与讨论

2.1 检测条件的选择

为了获得最佳的灵敏度和分离效果,首先,采用直接进样方式,扫描范围 m/z 为 100~500,选择合适的离子源和流动相。实验结果表明,在表 1 所示的选择监控离子、锥孔电压及碰撞能量下,电喷雾离子化可使莠去津具有较好的电离效果并获得特征离子峰[M+H]。在此基础上,进一步优化色谱和质谱参

数。通过试验证明,采用乙腈-甲酸水体系为流动相,在表 1 梯度洗脱条件下,可得到较高的灵敏度、重现性及峰形。

2.2 净化方法的选择

由于玉米秆和玉米粒的基质较土壤复杂,仅用 PSA 作吸附剂达不到理想效果,因此本实验在玉米秆和玉米粒的净化时加入了石墨化碳黑。结果表明,采用 PSA 和石墨化碳黑净化玉米秆和玉米粒回收率要高于这两者单用,且无干扰峰,方法的重现性好,结果准确可靠。

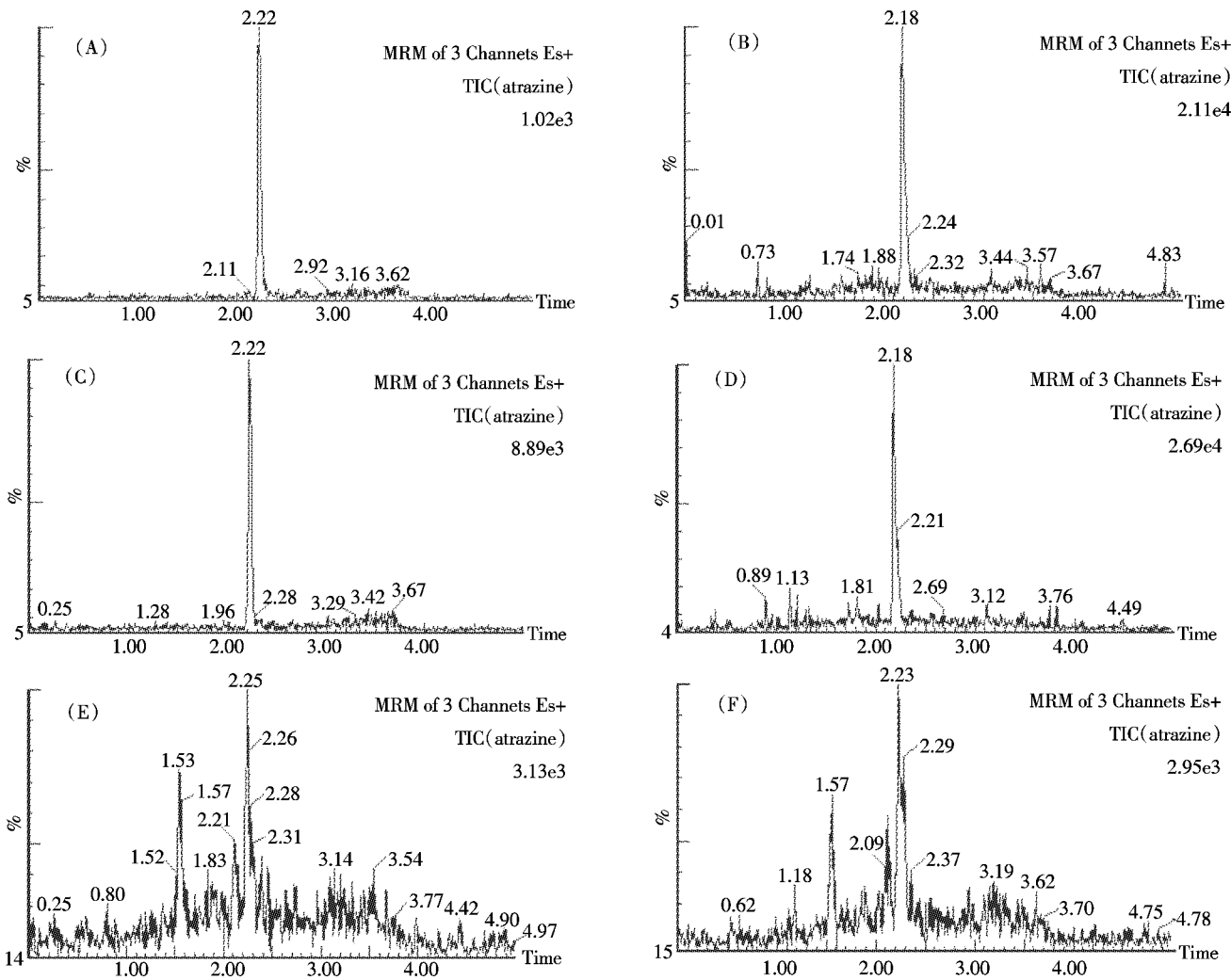
2.3 标准工作曲线的制备

基质效应(matrix effects)是指色谱分离时共洗脱的物质改变了待测成分的离子化效率所引起的信号的抑制或提高。基质效应影响大时会降低方法的灵敏度和影响方法的准确性给测定带来误差。LC-MS 会对电喷雾电离(ESI)接口离子化效率产生影响,从而产生基质效应^[14]。

为提高定量准确性,本试验采用基质匹配标准溶液校正方法对基质效应进行补偿^[15]。取浓度为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg·kg⁻¹ 的莠去津标准品各 1 mL 氮吹致干,准确加入按 1.4 步骤反应得出的空白样品 1 mL,即得基质匹配标准溶液。基质匹配标准溶液在 1.2 节的色谱条件下进样,以莠去津的浓度为横坐标,以它对应的峰面积为纵坐标作图。经最小二乘法拟合得标准曲线线性方程、相关系数(表 2)。基质匹配标准品和溶剂标准品的色谱图见图 1。

表 2 莠去津的回归方程、相关系数及方法检出限
Table 2 The regression equation, correlative coefficient, LOQ and LOD

样品	方程	相关系数 <i>r</i> ²	最低检出限/最低检测浓度/ μg·kg ⁻¹	μg·kg ⁻¹
土	$y=107.71x-2\ 009.4$	0.998 3	0.54	1.80
玉米秆	$y=119.77x-2\ 036.9$	0.999 0	0.91	3.02
玉米粒	$y=143.91x-69.953$	1.000 0	0.90	3.00
溶剂标准品	$y=127.13x-476.44$	0.999 3	0.39	1.33



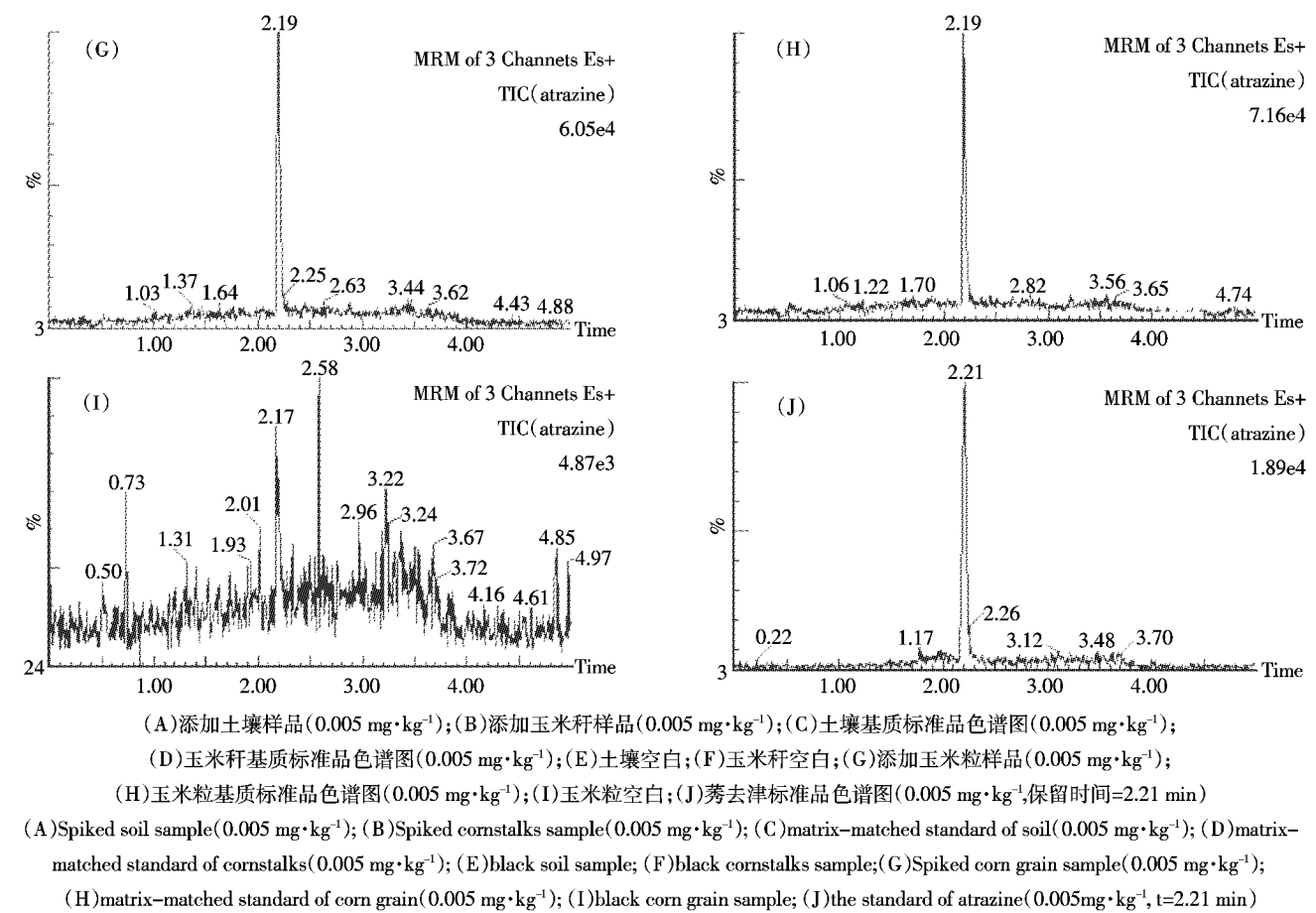


图 1 莠去津在样品中的色谱图

Figure 1 Chromagram of atrazine in sample

2.4 方法的回收率和检出限

莠去津在美国、日本、中国、澳大利亚、以色列等国的 MRL 值在 $0.1\sim0.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间^[6]。根据莠去津在 LC-MS-MS 的响应情况,在 $0.005\sim0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围内分别设定了 3 种添加水平,每个水平重复 5 次,得到各种农药的添加回收率与相对标准偏差(RSD),

见表 3。由表 3 可以看出,莠去津的平均回收率为 $77.01\%\sim112.62\%$,变异系数为 $2.23\%\sim8.43\%$ 。各基质的添加回收和空白的色谱图见图 1。以最低添加浓度 $0.005\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的添加回收率的色谱图进行衡量,该方法的灵敏度分别以噪音信号的 3 倍和 10 倍确定,得出最低检出限(LOD)和最低检测浓度(LOQ)见表 2,

表 3 莠去津在土壤和玉米中的回收率及标准偏差($n=5$)

Table 3 Average recovery and relative standard deviation(RSD) of atrazine in corn and soil samples(5 replicates)

样品	添加水平 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率/%					平均回收率/%	变异系数/%
		1	2	3	4	5		
土壤	0.005	116.91	103.93	105.44	100.00	109.36	107.13	5.99
	0.050	115.46	114.00	108.27	109.94	115.42	112.62	2.94
	0.500	95.63	92.83	85.89	98.26	90.02	92.53	5.20
玉米粒	0.005	79.19	73.86	73.97	79.46	78.58	77.01	3.69
	0.050	86.95	94.03	89.69	98.43	97.03	93.23	5.20
	0.500	88.32	85.25	88.37	89.43	91.39	88.55	2.23
玉米秆	0.005	107.04	89.83	100.00	89.42	94.04	96.07	7.77
	0.050	89.13	95.77	92.80	94.00	100.31	94.40	4.35
	0.500	93.34	80.32	96.09	95.57	82.51	89.57	8.43

LOD 为 $0.39\sim 0.91\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, LOQ 为 $1.33\sim 3.02\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。因此该方法完全满足农药残留测定中对准确度、精密度和灵敏度的要求。

2.5 方法的灵敏度和仪器稳定性

采用同一供试标准溶液,在相同色谱条件下,在不同日进样,连续进样 6 次,测定其峰面积,多次测定的峰面积相对标准偏差为 10.72%,表明仪器具有较好的稳定性。

3 结论

建立了土壤、玉米粒和玉米秆中莠去津残留量的超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱快速检测方法。该方法莠去津在 $0.005\sim 1\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性关系,平均回收率为 77.01%~112.62%,变异系数为 2.23%~8.43%,最低检出限 (LOD) 为 $0.39\sim 0.91\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,最低检测浓度 (LOQ) 为 $1.33\sim 3.02\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。采用该方法简单快速、准确可靠,可满足农药残留分析的要求,并可用于大量样品的快速检测。

参考文献:

- [1] Martine M. Spectrophotometric method to determine ternary mixture of atrazine, diuron and chlorpyrifos in water and soil by a ratiospec-trum2zero crossing method[J]. *J Assoc of Anal Chem*, 1995, 28(2):423-430.
- [2] Toxicological profile for atrazine[G]//US Department of Health and Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003.
- [3] Chapin R E, Stevens J T, Hughes C L, et al. Atrazine: Mechanisms of hormonal imbalance in female SD rats[J]. *Funda Appl Toxicol*, 1996, 29:1-17.
- [4] Hincapie M, Maldonado M I, Oller I, et al. Solar photocatalytic degradation and detoxification of EU priority substances[J]. *Catal Today*, 2005, 101:203-210.
- [5] 李二虎, 胡敏, 吴兵兵, 等. 气相色谱法测定玉米中莠去津和丁草胺农药残留[J]. *农药科学与管理*, 2007, 28(7):12-14.
LI Er-hu, HU Min, WU Bing-bing, et al. Determination of residues of atrazine and butachlor in corn by gas chromatography[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2007, 28(7):12-14.
- [6] 朱莉萍, 董静, 孙军, 等. 分散型固相萃取-气相色谱法测定蔬菜及其制品中灭线磷、噻嗪胺、莠去津、氟硅唑、噻嗪酮、异丙威残留量[J]. *分析实验室*, 2008, 28(7):79-82.
ZHU Li-ping, DONG Jing, SUN Jun, et al. Determination of ethoprophos, pyrimethanil, atrazine, flusilazole, buprofezin, isoprocarb in vegetable foods and products by dispersive-SPE-gas chromatography[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2008, 28(7):79-82.
- [7] 祁彦, 占春瑞, 张新忠, 等. 高效液相色谱法测定大豆中 13 种三嗪类除草剂多残留量[J]. *分析化学研究报告*, 2006, 34(6):787-790.
QI Yan, ZHAN Chun-rui, ZHANG Xin-zhong, et al. Simultaneous de-termination of thirteen triazine herbicides residues in soybeans by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(6):787-790.
- [8] 李克斌, 郭宏升, 陈经涛, 等. 高效液相色谱同柱分析土壤中灭草松和莠去津残留[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(增刊):280-283.
LI Ke-bin, GUO Hong-sheng, CHEN Jing-tao, et al. Simultaneous determination of bentazone and atrazine residues in soils by using high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(sup):280-283.
- [9] 范润珍. HPLC 法测定土壤中莠去津残留量方法的改进[J]. *农药科学与管理*, 2003, 24(11):14-16.
FAN Run-zhen. The improvement of analytical method for atrazine desidue in soil with HPLC[J]. *Pesticide Science and Adiministration*, 2003, 24(11):14-16.
- [10] 刘凤玲. 42%扑·莠·乙草胺悬乳剂的液相色谱分析[J]. *农药*, 2008, 47(10):737-738.
LIU Feng-ling. Analysis of prometryne·atrazine·acetochlor 42% SE by HPLC[J]. *Agrochemicals*, 2008, 47(10):737-738.
- [11] 张敬波, 董振霖, 赵守成, 等. 气相色谱-质谱联用法检测玉米中 21 种三嗪除草剂残留量[J]. *质谱学报*, 2006, 247(3):148-154.
ZHANG Jing-bo, DONG Zhen-lin, ZHAO Shou-cheng, et al. Simultaneous determination of triazine herbicides in maize by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2006, 247(3):148-154.
- [12] 王国强, 朱昱, 齐宝坤, 等. 固相萃取-硅烷化-气质联用分析尿中莠去津及其去烷基代谢物[J]. *分析化学研究简报*, 2009, 37(3):441-444.
WANG Guo-qiang, ZHU Yu, QI Bao-kun, et al. Solid phase extraction-silyl derivation-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of atrazine and its N-desalkalated metabolites in urine[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(3):441-444.
- [13] 陈砚滕, 钟淑婷, 甘凤娟, 等. 超高效液相色谱/串联质谱分析生活饮用水中莠去津和灭草松[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(4):590-592.
CHEN Yan-meng, ZHONG Shu-ting, GAN Feng-juan, et al. Determination of atrazine and bentazone in drinking water by UPLC-ESI-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2008, 18(4):590-592.
- [14] Antignac J P, deWach K, Monteau F, et al. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529:129-136.
- [15] 李晶, 董丰收, 刘新刚, 等. 基质固相分散萃取-气相色谱法同时检测人参中五氯硝基苯及其代谢物残留[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(1):216-220.
LI Jing, DONG Feng-shou, LIU Xin-gang, et al. Simultaneous determination of pentachloronitrobenzene residue and Its metabolites pentachloroaniline and pentachlorothioanisole in ginseng based on matrix solid phase dispersion and gas chromatography[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1):216-220.
- [16] <http://www.mrl database.com/>.