Vol. 37 No. 7
790 – 795

分析试验室
Chinese Journal of Analysis Laboratory

2018 年 7 月
第 37 卷 第 7 期

DOI: 10. 13595/j. cnki. issn1000-0720. 2018. 0150

UPLC-MS/MS 法测定蔬菜中代森锰锌和甲基代森锌

雷 云[1],吴珊月[1],林 钦[2],林木土[1],刘文菁[1,2],王 征[2],戴 明[*2]
(1. 福建医科大学药学院,福州 350004; 2. 福建省产品质量检验研究院,
国家加工食品质量监督检验中心,福州 350002)

摘 要: 建立了蔬菜中的代森锰锌和甲基代森锌经碘甲烷衍生化反应后用正己烷液液萃取,并利用 UPLC-MS/MS 检测的方法。实验优化了衍生化的条件和提取方法,以外标法定量分析。方法具有良好的线性关系,代森锰锌和甲基代森锌质量浓度分别在 6. 89 ~ 344. 5 ng/mL 与 6. 15 ~ 307. 5 ng/mL 范围内线性回归系数 r 均大于 0. 995; 检测限均小于 1 μg/kg; 代森锰锌和甲基代森锌在蔬菜中的加标回收率在 83. 1% ~ 97. 6% 范围内,相对标准偏差(RSD, $n = 6$) 在 4. 3% ~ 13% 范围内。方法可满足对蔬菜中的代森锰锌及甲基代森锌农药残留检测的要求。

关键词: UPLC-MS/MS; 代森锰锌; 甲基代森锌; 衍生化反应
中图分类号: S132; O657. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0720(2018) 07-0790-06

Determination of mancozeb and propineb in vegetables with UPLC-MS/MS

LEI Yun[1], WU Shan-yue[1], LIN Qin[2], LIN Mu-tu[1], LIU Wen-jing[1,2], WANG Zheng[2] and DAI Ming[*2]
(1. Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy, Fuijan Medical University, Fuzhou 350004; 2. Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, National Center of Processed Food Quality Supervision and Inspection(Fuzhou), Fuzhou 350002)

Abstract: A sensitivity and reproducibility method was developed for the determination of the mancozeb and propineb pesticides in vegetables by ultra high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry(UPLC-MS/MS). The samples were derived with methyl iodide and then extracted by hexane for liquid - liquid extraction. The conditions of derivatization and the extraction method were optimized and the quantitative analysis of external standard method were carried out. The method has a good linear relationship and the linear regression coefficients were greater than 0. 995. The linear ranges of mancozeb and propineb in vegetable were 6. 89 to 344. 5 ng/mL and 6. 15 to 307. 5 ng/mL, respectively. And the limits of detection were less than 1 μg/kg. The recoveries of mancozeb and propineb were ranged from 83. 1% to 97. 6% and the relative standard deviations (RSD, $n = 6$) in the range of 4. 3% ~ 13%. This method can effectively satisfy the requirements for residue detection of mancozeb and propineb pesticides in vegetables.

Keywords: UPLC-MS/MS; Mancozeb; Propineb; Derivative reaction

代森锰锌和甲基代森锌在农作物防治疾病上应用相当成功[1-3],但是其分解产物乙撑硫脲(ETU)会对人体健康造成危害[4]。根据 GB 2763 - 2016,代森锰锌的日容许摄入量(ADI): 30 μg/kg BW,甲基代森锌的 ADI 为 7 μg/kg BW[5]。目前普遍采用顶空气相色谱法检测代森锰锌及甲基代森锌在农作物中的残留如番茄、西瓜及其瓜叶、大黄、辣椒及马铃薯等[6~11],但该法

收稿日期: 2017-10-24
基金项目: 福建省科技厅引导性项目(2015Y0059,2017Y0023) 资助
* **通信作者, E-mail:** 48030910@ qq. com

分析的是二硫代氨基甲酸酯(盐)类杀菌剂产生的二硫化碳总量,专一性较差[12],无法确定农作物具体使用的是哪一种二硫代氨基甲酸酯(盐)类农药,并且,由于某些农作物本身可能分解产生二硫化碳,极易产生误判。此外也有通过液相色谱法并经衍生化检测花生中代森锰锌残留量的报道[13]。

GB 2763 - 2014 将 SN/T 0711 - 2011 指定为代森锰锌和甲基代森锌的检测方法[14]。但本研究通过前期实验发现,SN/T 0711 - 2011 中所采用的固相萃取方法[15],由于衍生产物的溶解度差,造成回收率极低。同时,实验过程中发现过量的碘甲烷衍生剂极易继续与代森锰锌和甲基代森锌生成的二取代物继续反应生成三取代物和四取代物,因此,无法检测到标准中要求检测的二取代衍生物;如果要尽可能的生成二取代物,就必需严格控制衍生剂的用量,但同时样品中的杂质也可能会与衍生剂反应,极易造成衍生剂不足而使代森锰锌和甲基代森锌无法衍生上。针对 SN/T 0711 - 2011 存在的问题,本研究对衍生剂用量、提取方法、检测目标物和检测条件等进行了研究,建立了 UPLC-MS/MS 法检测代森锰锌和甲基代森锌的方法。本方法找到了正确的检测目标物,有效地提高了衍生化产物的提取效率,提高了检测灵敏度和重现性,定性和定量分析准确,可以有效满足蔬菜中的代森锰锌及甲基代森锌的检测需求。

1　实验部分

1.1　仪器与试剂

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪(美国沃特世公司),配 Quattro Premier XE 串联四极杆质谱仪(美国沃特世公司);Avanti J-E 冷冻高速离心机(美国贝克曼公司);Milli-Q 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司);KQ-800KDE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器公司);0.2 μm PTFE 聚四氟乙烯一次性过滤头(美国热电公司)。

代森锰锌标准品(纯度 78.3%)、甲基代森锌标准品(纯度 71.5%)(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司);碘甲烷(纯度 99%,日本 TCI 公司);甲酸(色谱纯,德国默克公司);乙腈(色谱纯,山东禹王公司化工分公司);乙二胺四乙酸二钠(纯度≥99.0%)、L-半胱氨酸盐酸盐(纯度≥98.5%)、四丁基硫酸氢铵、正己烷、HCl 和 NaOH 均为分析纯。

1.2　溶液配制

碱性 EDTA 提取液:称取 74.4 g EDTA-2Na,加入 700 mL 的超纯水,超声溶解,加入 17.0 mL 500 g/L NaOH 溶液,超声溶解,调节 pH 9.5 ~ 10,加水定容至 1000 mL,混匀备用。四丁基硫酸氢铵溶液:称取 13.6 g 四丁基硫酸氢铵,加水定容到 100 mL。

代森锰锌及甲基代森锌标准储备溶液:分别准确称取适量代森锰锌及甲基代森锌标准品,用乙腈配制成约 50 μg/mL 的储备液。代森锰锌及甲基代森锌标准中间溶液的配制:准确移取代森锰锌及甲基代森锌标准储备溶液 5.0 mL,用乙腈稀释定容到 50 mL,配制成约 5.0 μg/mL 的中间液。代森锰锌及甲基代森锌标准使用溶液的配制:取 5.0 mL空白样品碱性 EDTA 提取液,准确加入适量摇匀的代森锰锌及甲基代森锌标准中间溶液,经衍生、萃取后配成质量浓度为 10 ~ 300 ng/mL 的标准系列。

1.3　样品前处理

称取 5.00 g 样品,加入 0.20 g L-半胱氨酸盐酸盐,振摇混匀,放置 5 min,加入 20.0 mL 碱性 EDTA 提取液,涡旋混匀,超声提取 10 min,摇匀,4℃,10000 r/min 高速离心 5 min;准确移取上清液 5.0 mL 于 50 mL 离心管中,加入 0.5 mL 四丁基硫酸氢铵溶液和 200 μL 2 mol/L HCl 溶液,混匀;加入 200 μL 碘甲烷,立即涡旋混匀 2 min,避光静置 30 min,取出,加入 100 μL 甲酸,涡旋混匀;加入 5 mL正己烷,涡旋萃取 2 min,离心,吸出正己烷层至 10 mL 刻度试管中,再加入 5 mL 正己烷萃取 1 次,吸出正己烷层合并;40℃ N_2 吹至近干,乙腈定容至 1.0 mL 刻度,混匀,过 0.2 μm PTFE 滤膜,待测。

1.4　UPLC 条件

Waters BEH-C18 色谱柱(1.7 μm,100 mm × 2.0 mm);柱温:35℃;进样量:7.5 μL;流动相及梯度:A 相为纯水;B 相为乙腈,0 ~ 3 min,B 相 40% →40%;3 ~ 5 min,B 相 40% →80%;5 ~ 6 min,B 相 80% →80%;6 ~ 6.1 min,B 相 80% →40%;6.1 ~ 8 min,B 相 40% →40%;流速 0.3 mL/min。

1.4　质谱条件

电离源:电喷雾正离子模式;毛细管电压:3.50 kV;源温度:120℃;脱溶剂气温度:400℃;脱溶剂气流量:700 L/h;碰撞室压力:3.1 ×10^{-3} Pa;特征离子及其它质谱参数见表 1。

2　结果与讨论

2.1　质谱条件优化

分别取约 30 μg/mL 的代森锰锌和甲基代森锌标准溶液100 μL,加入 5.0 mL 空白样品碱性

表 1 特征离子及其它质谱参数

Table 1 Characteristic ions and other mass spectrometric parameters

Analytes	Parent ion (m/z)	Daughter ions (m/z)	Cone voltage /V	Collision energy /eV
Trimethyl derivative of mancozeb	255	134*	15	10
		207	15	6
Tetramethyl derivative of mancozeb	269	148	10	18
		75*	10	18
Trimethyl derivative of propineb	269	148*	10	18
		221	12	10
Tetramethyl derivative of propineb	283	89*	12	25
		162	12	12

Note 1: * Quantitation ion; Note 2: Derived agent should be enough for mancozeb and propinebreaction to generate tetramethyl derivative, and the results were quantified by peak area.

EDTA 提取液中，涡旋混匀，加入 0.5 mL 四丁基硫酸氢铵溶液和 200 μL 2 mol/L HCl，其后按 1.3 节衍生和萃取。将衍生后标准溶液由注射泵直接进样，首先作一级质谱全扫描（见图 1），扫描结果在 ESI(+) 模式下，找到代森锰锌三取代衍生物准分子离子峰 m/z 255 和四取代衍生物准分子离子峰 m/z 269，找到甲基代森锌三取代衍生物准分子离子峰 m/z 269 和四取代衍生物准分子离子峰 m/z 283。再分别对母离子进行子离子扫描，通过优化碰撞能量等参数得到代森锰锌和甲基代森锌衍生物的子离子扫描图（见图 2），最终确定相应的质谱参数（见 1.4 节质谱分析条件）。

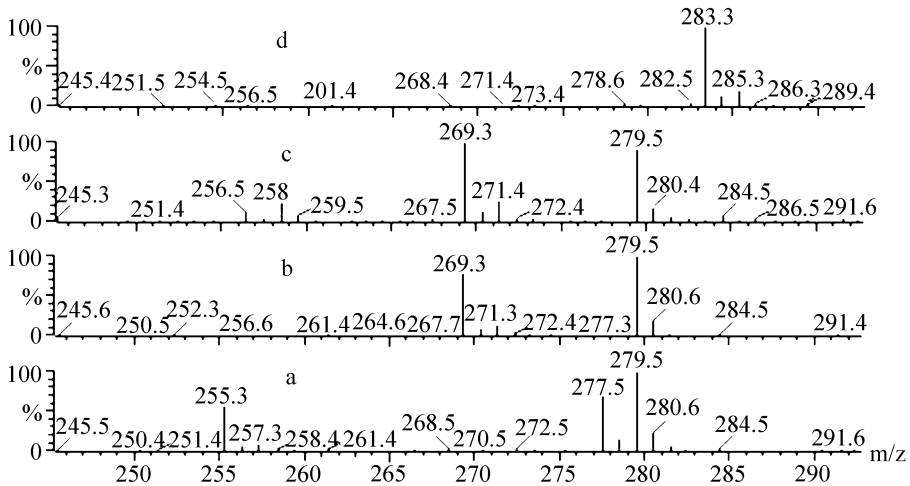

图 1 代森锰锌和甲基代森锌衍生物一级质谱扫描图

Fig. 1 The mass spectra of MS scan of derivatives of mancozeb and propineb

(a) Trimethyl derivative of mancozeb; (b) Tetramethyl derivative of mancozeb; (c) Trimethyl derivative of propineb; (d) Tetramethyl derivative of propineb

2.2 色谱条件优化

采用了 Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪和 1.7 μm 粒径的 BEH-C_{18} 超高效液相色谱柱，具有极高的分离效率。分别实验了纯水/乙腈体系、0.005% 甲酸/乙腈体系、0.1% 甲酸/乙腈体系、0.5% 甲酸/乙腈体系作为流动相的分离效果，实验发现流动相酸度越强，出峰时间越早且峰形展宽越严重，最终发现在纯水/乙腈体系下具有最佳的峰形、分离度和灵敏度。优化调整后的色谱条件和洗脱梯度见 1.4 节，此时，代森锰锌三取代衍生物、四取代衍生物、甲基代森锌三取代衍生物和四取代衍生物的色谱分离总离子流图和定量离子监测图见图 3。

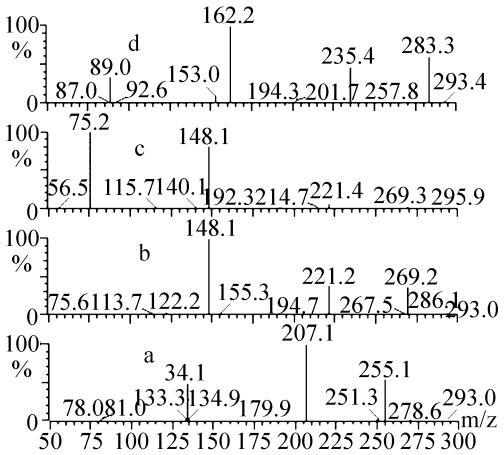

图 2　代森锰锌和甲基代森锌衍生物二级质谱扫描图

Fig. 2　The mass spectra of MS/MS scan of derivatives of mancozeb and propineb

(a) Trimethyl derivative of mancozeb; (b) Tetramethyl derivative of mancozeb; (c) Trimethyl derivative of propineb; (d) Tetramethyl derivative of propineb

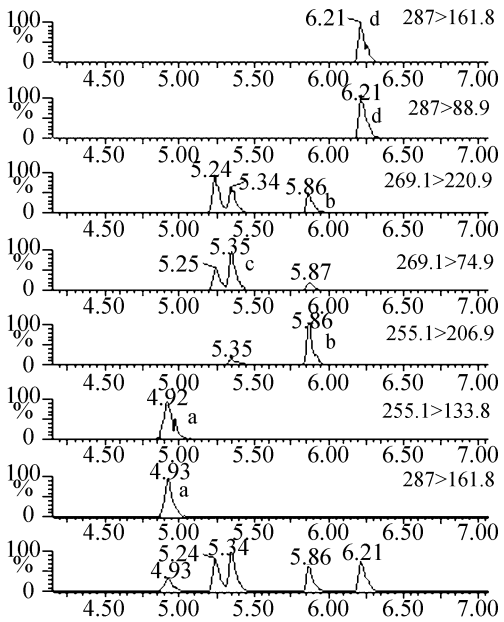

图 3　代森锰锌和甲基代森锌衍生物的总离子流图和定量离子监测图

Fig. 3　TIC and SIM chromatograms of mancozeb and propineb derivatives

(a) Trimethyl derivative of mancozeb (RT = 4.93 min);
(b) Tetramethyl derivative of mancozeb (RT = 5.86 min);
(c) Trimethyl derivative of propineb (RT = 5.25 and 5.35 min); (d) Tetramethyl derivative of propineb (RT = 6.21 min)

2.3　衍生化反应条件的优化

2.3.1　**衍生剂用量**　代森锰锌及甲基代森锌先生成可溶性的代森钠和甲基代森钠，再与碘甲烷反应生成甲基化产物。目前文献报道的甲基化产物均为二取代产物，但本研究发现过量的衍生剂会与生成的二取代物继续反应生成三取代物和四取代物，基本不会有二取代物剩余；如果要检测二取代物，就必需严格控制衍生剂的用量，但同时样品中的大量杂质可能也会与衍生剂反应，将造成代森锰锌和甲基代森锌无法衍生上而检测不到。

实验发现，由于四取代物存在较大的空间排挤作用，即使衍生剂过量很多，代森锰锌及甲基代森锌也不会全部衍生反应生成四取代物，而是以一定比例生成三取代物和四取代物的混合物。本实验通过设置一系列不同剂量的衍生剂，比较空白加标样的衍生检测结果，发现当衍生剂碘甲烷的添加量为 200 μL 时代森锰锌及甲基代森锌衍生物具有最大的响应高度。

2.3.2　**L-半胱氨酸用量**　由于代森锰锌及甲基代森锌在碱性条件下易发生分解，需要加入一定量的稳定剂 L-半胱氨酸来避免分解。称取 5.0 g 的样品于离心管中，分别加入 0，100，150，200，300，400 mg L-半胱氨酸，再分别加入定量的标准溶液，之后的处理按照 1.3 节，比较结果，发现 200 mg L-半胱氨酸的添加水平具有最好的响应值，之后随着剂量的增加，响应反而有所下降，因此，确定了 L-半胱氨酸的适宜添加量为 200 mg。

2.4　衍生产物提取方法

由于代森锰锌及甲基代森锌的衍生产物主要为三取代物和四取代物，其极性较弱，在水溶液中的溶解度很小，按照 SN/T 0711 - 2011 中所采用的固相萃取方法回收率极低，因此，需要实验合适的萃取方法将衍生产物提取出来。针对代森锰锌及甲基代森锌衍生产物的极性特点，实验发现，在酸性条件下，衍生物可由正己烷萃取出来，并且 5 mL 衍生溶液用正己烷萃取 2 次，每次 5 mL，即可达到 90% 以上的提取效率，正己烷提取液氮气吹干后用乙腈复溶即可上机测试。

2.5　定量方法

由图 3 可知，代森锰锌及甲基代森锌衍生反应生成了三取代物和四取代物的混合物。由于目前尚无厂家生产代森锰锌及甲基代森锌的同位素内标，无法进行内标法校正。因此，实验比较了标准系列谱图中三取代物和四取代物的峰面积比值（见表 2 和表 3），发现其比值都很接近，所以，只要以三取代物或四取代物的峰面积进行外标法计算就可以准确地定量了。由于甲基代森锌的三取代物存在两种异构体，计算时需要将两个峰面积加在一起计算，在实际工作中较麻烦。因此，选择以代

森锰锌及基代森锌的四取代物作为目标进行外标法计算，虽然四取代物的灵敏度不及三取代物，但也远优于 SN/T 0711 – 2011 中 10 μg/kg 的要求，具有良好的灵敏度。

表 2 代森锰锌衍生物峰面积比值

Table 2 Peak area ratios of mancozeb derivatives

Number	Concentration of standard solution/(ng/mL)	Mancozeb three substituted derivatives	Mancozeb four substituted derivatives	Peak area ratio	Mean	RSD/%
		255 > 134 Peak area	269 > 75 Peak area			
1	6.89	479	209	2.29		
2	17.2	1037	401	2.59		
3	34.4	1318	651	2.02	2.22	13
4	68.9	2079	1016	2.05		
5	172.2	6099	3268	1.87		
6	344.5	15529	6274	2.48		

表 3 甲基代森锌衍生物峰面积比值

Table 3 Peak area ratio of propineb derivatives

Number	Concentration of standard solution/(ng/mL)	Propineb three substituted derivatives	Propineb four substituted derivatives	Peak area ratio	Mean	RSD/%
		269 > 148 Peak area	283 > 162 Peak area			
1	6.15	593	61	9.72		
2	15.4	1920	206	9.32		
3	30.7	5000	640	7.81	8.27	13
4	61.5	10000	1384	7.23		
5	153.7	30137	3994	7.55		
6	307.5	63882	7976	8.01		

2.6 方法的线性范围和检测限

分别取 5.0 mL 的豆芽空白提取液于 50 mL 离心管中，依次加入代森锰锌为 344.5 ng/mL，甲代森锌为 307.5 ng/mL 的标准中间液 20，50，100，200 μL，以及代森锰锌浓度为 3.445 μg/mL，甲基代森锌浓度为 3.075 μg/mL 的标准中间液 50，100 μL，按照 1.3 节的步骤进行前处理。将处理后的标准溶液在本仪器条件下进样，以代森锰锌和甲基代森锌的质量浓度为横坐标(ρ)，以对应的四取代衍生物的峰面积为纵坐标(Y)，绘制代森锰锌和甲基代森锌的标准工作曲线，线性方程和相关系数如表 4，所测样品溶液浓度应在线性范围内，超出范围的溶液应用乙腈做适当的稀释。同时，用 8 ng/mL样品加标液的峰高按 3 倍噪音峰高和 10 倍噪音峰高计算代森锰锌和甲基代森锌的检测限和定量限如表 4。

表 4 代森锰锌和甲基代森锌的线性方程与检测限

Table 4 Linear equations and limits of detection for mancozeb and propineb

Analytes	Linear range/(ng/mL)	Linear equation	R	LOD* (CS2)/(μg/kg)	LOQ(CS2)/(μg/kg)
Mancozeb	6.89 ~ 344.5	$Y = 17.96\rho + 41.71$	0.996	0.2	0.5
propineb	6.15 ~ 307.5	$Y = 25.69\rho - 90.22$	0.996	0.7	2.3

* Colculate by carbon disulfide (CS_2)

2.7 回收率和重复性实验

取不含代森锰锌和甲基代森锌的空白豆芽样品进行标准添加试验，添加 3 个浓度水平，每个添加量做 6 个平行试验，结果见表 5。该方法对代森锰锌的回收率在 85.4% ~ 96.3% 之间，RSD 在 4.3% ~ 13% 之间；对甲基代森锌的回收率在 83.1% ~ 97.6% 之间，RSD 在 4.3% ~ 11% 之间。

表 5　豆芽中代森锰锌和甲代森锌的加标回收率和相对标准偏差($n=6$)

Table 5　Spiked recoveries and relative standard deviations(RSDs) of mancozeb and propineb in bean sprout ($n=6$)

Analytes	Spiked level/ (μg/kg)	Bean sprout	
		Recovery/%	RSD/%
Mancozeb	6. 890	85. 4	8. 5
	13. 78	96. 3	13
	137. 8	91. 6	4. 3
propineb	6. 150	97. 6	11
	12. 30	92. 4	8. 8
	123. 0	83. 1	4. 3

2. 8　蔬菜样品检测

按实验方法对市售的 12 个蔬菜样品进行了检测,12 个样品均未检出甲基代森锌,但有 11 个样品都检出了代森锰锌。其中有 2 个样品超过了 GB 2763 - 2016 的农药残留限量要求,还有 3 个样品的残留量非常高,分别为 1136. 7,5. 42 和 32. 3 mg/kg,但由于 GB 2763 - 2016 未规定该类蔬菜的代森锰锌残留限量,因此无法进行判定。可见,代森锰锌在农业生产中的使用非常广泛,由于检测方法的缺陷,近年来对其监测的力度不够,造成了使用者的滥用不能得到有效的控制。

3　结论

建立了蔬菜中的代森锰锌及甲基代森锌经碘甲烷衍生化反应后用正己烷液液萃取,利用超高效液相色谱 - 串联四级杆质谱检测的方法。实验优化了衍生化的条件,建立了正己烷液液萃取的提取方法,确定了衍生化的产物并以代森锰锌四取代衍生物离子对 m/z 269/75 和甲基代森锌四取代衍生物离子对 m/z 283 /89 进行外标法定量分析。所建立的分析方法具有良好的线性关系和灵敏度。本方法灵敏度高,重现性好,定性定量准确,可有效满足对蔬菜中的代森锰锌及甲基代森锌农药残留检测的要求,为相关国家标准的修订提供了可靠的技术支撑。

参考文献

[1] Ma J W,Pan C P, Zhang L, Zhang J F. Chin J Pestic Sci. , 2010,12 (1) : 22
马婧玮,潘灿平,张　玲,张军锋. 农药学学报,2010,12(1) : 22

[2] Zhu W X,Yang Y Z, Liu Y F,Wei W. J. Instrum. Anal. , 2010,29 (11) : 1109
祝伟霞,杨冀州,刘亚风,魏　蔚. 分析测试学报,2010,29 (11) : 1109

[3] Sumaiyya M,Sagar CU. Food Chem. , 2014,150: 175

[4] Luan C Y. Effects of hexachlorobenzene and mancozeb on the apoptosis of PC-12 cells [D]. Nanjing Medical University,2011
栾春业. 农药六氯苯,代森锰锌对 PC-12 细胞凋亡的影响 [D]. 南京医科大学,2011

[5] GB 2763 - 2016 Maximum Residue Limits for Pesticides in Food.
GB 2763 - 2016 食品中农药最大残留量.

[6] Sheng Y H,Wang W. Acta Agric. Shanghai, 2000,16(S) : 108
盛亚红,王伟民. 上海农业学报,2000,16(S) : 108

[7] Ma H L, Ji R,Zhang Y G, *et al*. Chin. J. Pestic. Sci. , 2000,2: 63
马恒麟,纪　然,张永刚,等. 农药学学报,2000,2: 63

[8] Pang Z Z,Sun H, Xue J, *et al*. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2012,27(5) : 1283
庞作正,孙　晖,薛　健,等. 中华中医药杂志,2012,27(5) : 1283

[9] Ahmad N, Guo L, Mandarakas P, Farah V, Appleby S, Gibson T. J AOAC Int, 1996,79: 1417

[10] Wang Y E, Wang J H, Liu R Z, et al. J. Anhui Agric. Sci. ,2012,40(31) : 15252
王亚恩,王建华,刘润珠,等. 安徽农业科学,2012,40(31) : 15252

[11] Yang X F,Chen Q, Lei S R , Guo L A , Wang F L. Southwest China J. Agric. Sci. , 2016,29(12) : 2830
杨晓凤,陈　倩,雷绍荣,郭灵安,王方灵. 西南农业学报,2016,29(12) : 2830

[12] Zhang Y,Zhang Z H, Li A M, *et al*. Hubei Agric. Sci. , 2015,54(12) : 3000
张　悦,张正海,李爱民,等. 湖北农业科学,2015,54(12) : 3000

[13] Ma J W, Dong S J, You W Y. Chin J Pestic Sci, 2007,9 (3) : 297
马婧玮,董姝君,游文宇. 农药学学报,2007,9 (3) : 297

[14] GB 2763 - 2014 Maximum residue limits for pesticides in food.
GB 2763 - 2014 食品中农药最大残留量.

[15] SN/T 0711 - 2011 Determination of dithiocarbamate (salt) residues in tea products for export—LC-MS/MS method
SN/T 0711 - 2011 出口茶叶中二硫代氨基甲酸酯(盐) 类农药残留量的检测方法 LC-MS/MS 法