

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90019

高效液相色谱—串联质谱法测定油菜和油菜籽中草除灵残留量

Determination of anilazine in rape and rapeseed by LC-MS/MS

窦银花

DOU Yin-hua

(上海必诺检测技术服务有限公司, 上海 201114)

(Shanghai Bino Testing Service Co., Ltd., Shanghai 201114, China)

摘要:目的: 建立一种高效液相色谱—串联质谱法 (LC-MS/MS) 用于油菜与油菜籽内草除灵残留量的测定。方法: 提取试剂为乙腈, 净化柱为石墨化碳黑—氨基复合柱, 色谱峰分析借助 C_{18} 色谱柱, 通过甲醇—乙酸铵水溶液进行梯度洗脱处理。结果: 在 $0.01 \sim 1.00 \mu\text{g/mL}$ 线性区间内, LC-MS/MS 方法具有良好线性, R^2 值为 0.999, 方法检出限、定量限分别为 0.008, 0.027 mg/kg。当加标水平为 0.03, 0.06, 0.15 mg/kg 时, 加标回收率为 73.3%~91.3%, RSD 为 4.4%~8.1%。结论: 高效液相色谱—串联质谱法 (LC-MS/MS) 可用于测定油菜与油菜籽内草除灵残留量。

关键词: 草除灵; 油菜; 油菜籽; 高效液相色谱—串联质谱法; 残留量

Abstract: Objective: A detection method was developed for benazolin residual in rape and rapeseed by High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Methods: The rape and rapeseed were extracted with acetonitrile reagent, purified by Pesti Carb-NH₂, separated by C_{18} column, carried out with methanol-ammonium acetate aqueous solution, detected by HPLC-MS/MS. Results: The liner relation was good in the ranger of $0.01 \sim 1.00 \mu\text{g/mL}$, and the coefficient of determination was 0.999, the limit of detection (LOD) was 0.008 mg/kg, with the limit of quantification (LOQ) of 0.027 mg/kg. At the spiking levels of 0.03, 0.06, 0.15 mg/kg, the recovery rate of the method was 73.3%~91.3%, and RSD was 4.4%~8.1%. Conclusion: The presedent treatment method is easily-conducting, efficient, and highly sensitive and selective, and it can be used to determine benazolin in rape and rapeseed.

Keywords: benazolin; rape; rapeseed; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); residual amount

草除灵是一种专效性芽后传导性除草剂, 用于油菜田防除猪殃殃和繁缕, 对油菜安全, 对阔叶杂草有效, 具有内吸传导作用^[1-2]。其可以经由食物链、环境最终迁移至人和畜体内。GB 2763—2016 规定: 草除灵于油菜籽内的最大残留限量 (MRL) 为 0.2 mg/kg。从 2004 年开始, 国际标准禁止了除草灵的上市与应用^[3]。

食品中农药残留分析是在复杂的基质内定性与定量分析目标化合物。对于农药残留而言, 其分析步骤主要为提取、净化、检测, 前 2 步为前处理, 与分析结果的准确性和可靠性直接相关。目前中国还没有关于草除灵的检测标准, 主要采用液相色谱法^[3-5]和气相色谱法^[6-8]进行检测, 而采用液相色谱—质谱联用法 (LC-MS) 测定草除灵的文獻较少^[9-12]。研究拟采用乙腈提取, 经固相萃取柱净化, LC-MS 联用技术测定油菜、油菜籽内草除灵残留量, 旨在为草除灵的测定提供一种有成效的科学测试方法。

1 试验部分

1.1 试验设备

电子分析天平: BL60S 型, 德国赛多利斯公司;
涡旋振荡器: 945616 型, 美国 Talboys 公司;
捣碎机: FA25 型, 德国 FLUKO 公司;
高速冷冻离心机: Sovall ST16R 型, 美国赛默飞世尔公司;
氮吹仪: DC-24 型, 上海安谱实验室科技股份有限公司;
高效液相色谱—质谱联用仪: Agilent infinity II 1290/QQQ 6470B 型, 美国安捷伦公司。

1.2 试剂与材料

油菜、油菜籽: 市售;
乙腈、正己烷、甲苯: 色谱纯, 美国 Sigama 公司;
氯化钠: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;
草除灵标准物质: $(99.30 \pm 2.30)\%$, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;
石墨化炭黑—氨基复合柱: 500 mg/500 mg, 容积 6 mL, 北京迪科马科技有限公司;

作者简介: 窦银花 (1988—), 女, 上海必诺检测技术服务有限公司工程师, 硕士。E-mail: dyh5466177@126.com

收稿日期: 2021-08-16

氟罗里硅土(Florisil)固相萃取柱;500 mg/6 mL,美国 Waters 公司。

1.3 样品前处理

(1) 油菜:精准称量 5.00 g 已粉碎均匀的油菜,加入 20 mL 乙腈,15 000 r/min 匀浆提取 2 min,加入 5~7 g 氯化钠,多次快速振荡,8 000 r/min 离心 3 min,取上清液,加入 10 mL 乙腈,重复 2 次提取,准确移取上清液 10 mL,于 40 ℃ 水浴中氮气吹至近干,加入 3 mL 乙腈—甲苯溶液($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲苯}}$ 为 3:1),待净化。

(2) 油菜籽:精准称量 5.00 g 已粉碎均匀的油菜籽,加入 10 mL 乙腈—正己烷溶液的上层液体,涡旋振荡,静置 30 min,准确加入 20 mL 乙腈—正己烷溶液的下层液体,15 000 r/min 匀浆提取 2 min,去除正己烷层,加入 5~7 g 氯化钠,剧烈振荡,8 000 r/min 离心 3 min,取上清液,加入 10 mL 正己烷饱和的乙腈溶液,重复提取 2 次,准确移取上清液 10 mL,于 40 ℃ 水浴中氮气吹至近干,加入 3 mL 乙腈—甲苯溶液($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲苯}}$ 为 3:1),待净化。

(3) 净化:用 5 mL 乙腈—甲苯溶液预淋洗石墨化碳黑—氨基复合柱,弃去淋洗液。将待净化液洗涤入固相萃取柱内,通过 3 mL 的乙腈—甲苯($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲苯}}$ 为 3:1)溶液洗涤,重复 3 次。于 40 ℃ 水浴中氮气吹至近干,加入 1 mL 乙腈—水溶液($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 1:1)复溶,过 0.22 μm 滤膜,待测。

1.4 LC-MS 分析条件

1.4.1 液相色谱 色谱柱为 Poroshell 120 C₁₈ (3.0 mm×100 mm, 2.7 μm),流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 2.0 mmol/L 乙酸铵—0.1%甲酸水溶液,流速 0.3 mL/min,进样体积 5 μL,柱温 40 ℃,按表 1 进行梯度洗脱。

1.4.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源,干燥气温度 350 ℃,干燥气流量 5.1 L/min,雾化器压力 2.4×10^7 Pa,鞘气温度 300 ℃,鞘气流速 11.0 L/min,毛细管电压 4 000 V,喷嘴电压 1 100 V,正离子扫描模式,母离子和子离子质谱参数见表 2。

表 1 流动相洗脱条件

Table 1 The mobile phase elution conditions

时间/ min	流动相 A/%	流动相 B/%	时间/ min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	95	5	6.0	5	95
2.0	95	5	8.0	5	95
3.0	65	35	8.1	95	5
5.0	65	35	10.0	95	5

表 2 草除灵的母离子和子离子质谱参数[†]

Table 2 Themass spectrometry parameters of the precursor ion and product ion of benazolin

母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
244.0	197.9	73	10
244.0	169.8*	73	22

[†] * 为定量离子。

1.5 试验方法

1.5.1 标准曲线绘制 精准称量标准品草除灵,甲醇定容,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液。移取 1 mL 标准贮备液,甲醇定容,配成质量浓度分别为 100.0, 10.0, 1.0, 0.1 μg/mL 的标准中间液,用空白基质分别配制 0.025, 0.050, 0.100, 0.500, 1.000, 2.000 μg/mL 的草除灵标准溶液,并绘制标准工作曲线。

1.5.2 提取溶剂的选择 选取乙腈(或正己烷饱和的乙腈)、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷 4 种不同极性的提取试剂,空白基质中加入草除灵标准溶液,测其回收率。

1.5.3 固相萃取柱(SPE 小柱)的选择 选择石墨化碳黑/氨基(GCB/NH₂)复合 SPE 小柱和弗罗里硅土柱进行对比,将草除灵标准溶液加入到空白基质中,转移全部待净化液至固相萃取柱净化,经仪器测定,计算加标回收率。

1.5.4 复溶溶剂的选择 取适量草除灵标准工作液于离心管中,氮气吹干,分别加入乙腈、水、甲醇、乙腈+水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 1:1)、甲醇+水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ 为 1:1)5 种复溶标准工作液,经 0.22 μm 有机滤膜过滤,待测。

1.5.5 基质效应评价 取适量草除灵标准农药贮备液,分别使用乙腈+水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 1:1)和空白基质样品处理液进行定容,对相同质量浓度的工作液进行测定^[13]。

1.5.6 空白基质的加标回收试验 油菜和油菜籽两种空白基质中分别添加 0.03, 0.06, 0.15 mg/kg 3 个水平的标准溶液进行回收率测定,各水平重复 6 次。

2 结果与分析

2.1 提取试剂的选择

根据草除灵标准物质的回收率可知,乙腈(或正己烷饱和的乙腈)、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷均能高效提取草除灵,其回收率均在 80% 以上。其中丙酮与基质中的水互溶,难以进一步用固相萃取柱净化;乙酸乙酯和二氯甲烷在提取草除灵的同时,也提取出基质中的脂肪、蛋白、色素等杂质。对于基质油菜籽,以正己烷饱和的乙腈作为提取溶剂时,乙腈能提取出溶于正己烷中的草除灵,正己烷又能去除乙腈中的脂类杂质,有利于进一步净化。

2.2 净化小柱的选择

由图 1~图 3 可知,对于杂质、色素,Florisil 柱的吸附能力较低,对草除灵目标物的响应干扰较大,且回收率为 75% 左右,而 GCB/NH₂ 柱带有芳香性正六元环结构,具有高净化效果,能有效吸附色素和杂质,近乎去除基质中 90% 的杂质,其独特的选择性能高效地将草除灵从杂质中洗脱出来,回收率为 85% 左右。因此,选择 GCB/NH₂ 柱作为净化柱。

2.3 复溶溶剂的选择

由图 4 可知,选择单一的甲醇和乙腈作复溶溶剂回收率为 70% 左右,选择水作为复溶溶剂回收率仅 60%。

而使用混合溶剂乙腈+水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为1:1)和甲醇+水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ 为1:1)的回收率相对较高。从极性角度考虑,水的极性大于甲醇,甲醇的极性大于乙腈,而草除灵是非极性物质,应选择乙腈作复溶剂,乙腈中加入适量水可大大提高复溶剂的极性,更利于油脂基质中草除灵的提取,所以选择乙腈+水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为1:1)作复溶剂。

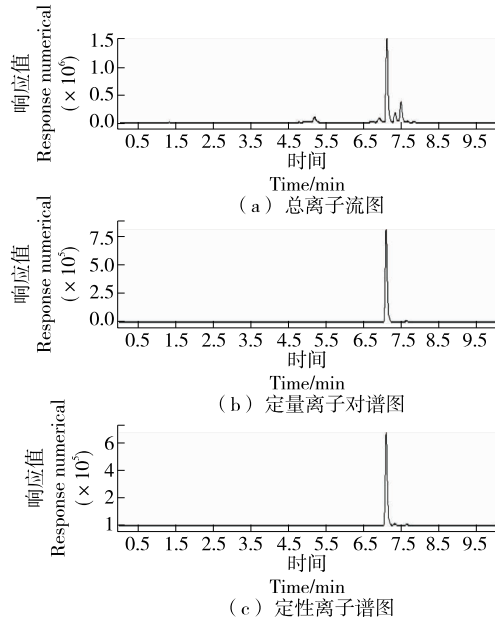


图1 草除灵标准工作液谱图

Figure 1 Benazolin standard working solution spectrum

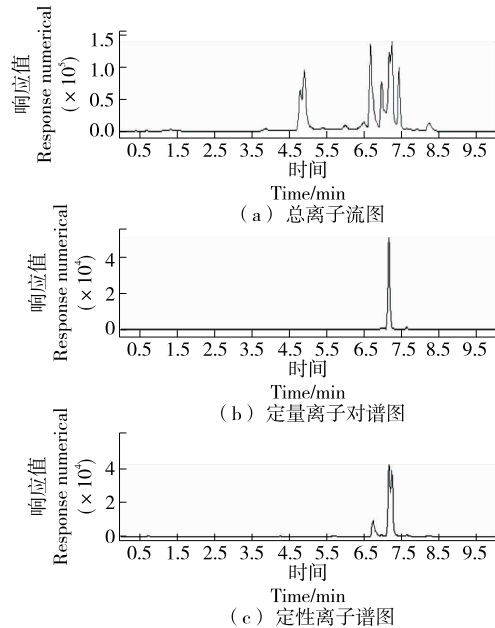


图2 经 Florisil 固相萃取柱净化的草除灵标准谱图

Figure 2 Standard spectra of benazolin after purification by florisisl solid-phase extraction column

2.4 基质效应

由表3可知,油菜和油菜籽基质中的草除灵离子化效率低于乙腈+水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为1:1)溶液中的,其基质效应为73%左右^[13],说明基质对草除灵有抑制作用。对于阳性样品而言,采用对应的空白基质配制标准曲线,草除灵离子化效率接近,可避免基质效应带来的试验结果偏离,从而提高阳性样品数据测定的准确性。

2.5 检出限、定量限、线性关系、准确度及精密度

2.5.1 线性关系 用草除灵标准中间液配制标准曲线,其线性方程为 $Y=3\ 085.8X-16\ 881(R^2=0.999)$,相关性良好。

2.5.2 检出限与定量限 试验测得 LC-MS 方法的检出限为 0.008 mg/kg,定量限为 0.027 mg/kg。

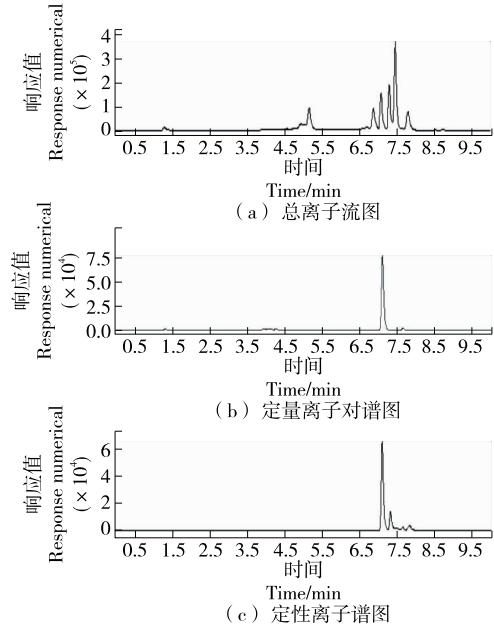


图3 经 GCB/ NH_2 固相萃取柱净化的草除灵标准图谱
Figure 3 Standard spectra of benazolin after purification by GCB/ NH_2 solid phase extraction column

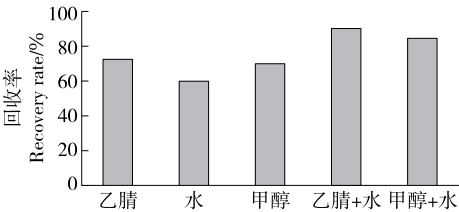


图4 复溶溶剂对回收率的影响

Figure 4 Effect of resolution solvent on recovery rate

表3 草除灵的基质效应

Table 3 The matrix effect of benazolin

基质	峰面积
油菜	30 725
油菜籽	27 968
乙腈+水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为1:1)	39 392

2.5.3 准确度与精密度 由表 4 可知,在 0.03,0.06,0.15 mg/kg 添加水平下,油菜基质中草除灵的平均回收率为 86.3%~91.3%,相对标准偏差(RSD)为 4.4%~6.7%;油菜籽基质中草除灵的平均回收率为 73.3%~84.2%,RSD 为 7.3%~8.7%。

表 4 草除灵回收率和相对标准偏差

Table 4 The recovery rate and relative standard deviation of benazolin

添加水平/ (mg · kg ⁻¹)	油菜		油菜籽	
	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
0.03	86.3	5.9	81.0	7.3
0.06	87.6	6.7	84.2	8.1
0.15	91.3	4.4	73.3	7.5

3 结论

建立了一种适合油菜和油菜籽中草除灵的检测方法。结果表明,以乙腈作为提取溶剂,石墨化炭黑—氨基复合柱净化,C₁₈柱分离,采用高效液相色谱—串联质谱法进行测定,该方法的前处理方便快捷、净化完全、高效简便,且能够得到较低的检出限和较高的回收率,并能满足日常检测需求。有关其他类似基质中草除灵残留量的检测有待进一步探究。

参考文献

- [1] 陈雯青. 油料作物及其油脂制品中草除灵残留量的检测[J]. 食品与机械, 2017, 33(7): 70-74.
CHEN Wen-qing. Determination of herbicide residues in oil crops and oil products[J]. Food & Machinery, 2017, 33(7): 70-74.
- [2] 孙惠青, 李义强, 徐广军, 等. 草除灵在油菜植株、油菜籽及土壤中残留分析方法研究[J]. 农药科学与管理, 2012, 33(8): 22-24.
SUN Hui-qing, LI Yi-qiang, XU Guang-jun, et al. Study on residue analysis method of cao chu ling in rape plant, rapeseed and soil[J]. Pesticide Science and Management, 2012, 33(8): 22-24.
- [3] 刘进玺, 陈颖慧, 冯书惠, 等. 高效液相色谱法测定油菜籽中的草除灵乙酸[J]. 分析实验室, 2017, 36(5): 534-537.
LIU Jin-xi, CHEN Ying-hui, FENG Shu-hui, et al. Determination of cao chu ling acetic acid in rapeseed by HPLC[J]. Analytical Laboratory, 2017, 36(5): 534-537.
- [4] 黄雪, 罗俊凯, 龚道新, 等. 高效液相色谱法测定土壤中草除灵和高效氟吡甲禾灵的残留量[J]. 农药学报, 2013, 15(1): 125-128.
HUANG Xue, LUO Jun-kai, GONG Dao-xin, et al. Determination of cao chu ling and high performance flumepyrazine residues in soil by HPLC[J]. Journal of Pesticide Science, 2013, 15(1): 125-128.
- [5] 黎其万, 刘宏程. 测定植物油中甲萘威和克百威农药残留的高效液相色谱法[J]. 食品与发酵工业, 2005(8): 91-92.
LI Qi-wan, LIU Hong-cheng. Determination of carbaryl and carbofuran pesticide residues in vegetable oil by HPLC[J]. Food and Fermentation Industry, 2005(8): 91-92.

- [6] 韦丹青, 胡永健, 杨亚琴, 等. 固相萃取—气相色谱法测定油料和植物油中草除灵[J]. 现代农药, 2018, 17(2): 45-53, 77.
WEI Dan-qing, HU Yong-jian, YANG Ya-qin, et al. Determination of cao chu ling in oil and vegetable oils by solid phase extraction gas chromatography[J]. Modern Pesticides, 2018, 17(2): 45-53, 77.
- [7] 杨开莲, 谢承礼, 周岳明. 草除灵的气相色谱分析[J]. 云南化工, 2007, 34(1): 58-59.
YANG Kai-lian, XIE Cheng-li, ZHOU Yue-ming. Gas chromatographic analysis of cao chu ling[J]. Yunnan Chemical Industry, 2007, 34(1): 58-59.
- [8] 曾凡刚, 杨立新, 杨立伟. 凝胶渗透色谱净化—气相色谱法快速测定植物油中 4 种有机磷农药残留[J]. 农药, 2010, 49(2): 120-122.
CENG Fan-gang, YANG Li-xin, YANG Li-wei. Rapid determination of 4 organophosphorus pesticide residues in vegetable oil by GPC-GC[J]. Pesticides, 2010, 49(2): 120-122.
- [9] 郭松年, 李玺, 房俊房, 等. QuEChERS-液质联用法测定菜籽油中 7 种芳氧苯氧丙酸酯类除草剂残留[J]. 中国油脂, 2017, 42(8): 71-75.
GUO Song-nian, LI Xi, FANG Jun-fang, et al. Determination of seven aryloxyphenoxypropionate herbicide residues in rapeseed oil by QuEChERS liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Oil, 2017, 42(8): 71-75.
- [10] 徐娟, 王岚, 黄华军, 等. 低温冷冻及分散固相萃取净化—超高效液相色谱—串联质谱法测定植物油中 104 种农药残留[J]. 色谱, 2015, 33(3): 242-249.
XU Juan, WANG Lan, HUANG Hua-jun, et al. Determination of 104 pesticide residues in vegetable oil by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry after purification by low temperature freezing and dispersion solid phase extraction[J]. Chromatography, 2015, 33(3): 242-249.
- [11] 王连珠, 李晓莲, 方恩华, 等. QuEChERS-液相色谱—串联质谱法测定棕榈原油中敌草快等 6 种农药残留[J]. 色谱, 2016, 34(7): 686-691.
WANG Lian-zhu, LI Xiao-lian, FANG En-hua, et al. Determination of six pesticide residues in palm crude oil by QuEChERS liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chromatography, 2016, 34(7): 686-691.
- [12] 花锦, 张小燕, 杜利君, 等. QuEChERS-超高效液相色谱—串联质谱法同时测定油料和植物油中 77 种农药残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1 691-1 697.
HUA Jin, ZHANG Xiao-yan, DU Li-jun, et al. Simultaneous determination of 77 pesticide residues in oil and vegetable oils by QuEChERS ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2015, 6(5): 1 691-1 697.
- [13] 陈景春. 液相色谱—串联质谱法测定番茄和黄瓜中敌菌灵残留量[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 75-78.
CHEN Jing-chun. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of tribendazim residues in tomatoes and cucumbers[J]. Food & Machinery, 2019, 35(11): 75-78.