

高效液相色谱-串联质谱法测定青刀豆中毒死蜃代谢物磷酸二乙酯*

Determination of Chlorpyrifos Metabolite DEP in Green String Bean Using HPLC-MS/MS

潘艳坤**,莫建光,韦英亮,谢一兴

PAN Yan-kun, MO Jian-guang, WEI Ying-liang, XIE Yi-xing

(广西分析测试研究中心,广西南宁 530022)

(Guangxi Research Center for Analysis and Test, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:建立高效液相-串联质谱法测定青刀豆中的毒死蜃代谢物磷酸二乙酯残留量的检测方法。青刀豆样品经盐酸酸化后用乙腈提取,提取液经活性炭固相萃取小柱净化,以 Thermo Scientific Waters SpherisorbRR column-NH₂ 色谱柱为分析柱,乙酸铵水溶液和乙腈体系为流动相,等梯度淋洗。检测器采用三重四极杆串联质谱仪,配备电喷雾电离源,在负离子扫描模式下采用选择反应监测,定量离子为 $m/z153 > 125$,定性离子为 $m/z153 > 125,79$ 。该方法检测磷酸二乙酯在 $16\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $8000\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内有良好的线性关系,方法定量限($S/N = 10$)为 $2\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,加标回收率为 $83\% \sim 90\%$,测定值的相对标准偏差小于 9.8% 。

关键词:磷酸二乙酯 青刀豆 高效液相色谱-串联质谱

中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2012)04-0348-04

Abstract: A high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method has been developed for determination of chlorpyrifos metabolite diethyl phosphate (DEP) in green string bean. The sample was extracted with ethyl acetate/acetonitrile(1+1) mixed solvent, purified by carbon SPE column, and then was detected by HPLC-MS/MS. The LC separation was performed on a Thermo Scientific Waters SpherisorbRR column-NH₂ with $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ammonium acetate-acetonitrile as the mobile phase. The quantitative and confirmatory determination of the DEP was performed by select reaction monitoring (SRM) mode. The DEP determination revealed good linear relationship over the range from $16\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ to $8000\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The method quantification limits (MQLs) for the analyses was $2\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The recovery was $83\% \sim 90\%$, with RSD's ($n = 6$) less than 9.8% .

Key words: diethyl phosphate, green string bean, HPLC-MS/MS

广西是全国青刀豆的主要生产区,每年大量出口青刀豆为原料制成的青刀豆罐头。毒死蜃是青刀豆种植过程中主要使用的有机磷农药。毒死蜃(CP)等有机磷农药因为植物体自身的代谢作用降解成为磷酸二乙酯(DEP)、二乙基硫代磷酸酯(DETP)等烷基磷酸酯并存在于植物体内,其中磷酸二乙酯的含量常

常作为毒死蜃等多种有机磷农药的生物标志物^[1~5],用来监测生物对毒性物质的接触水平。

目前磷酸二乙酯残留的检测方法主要有气相色谱法^[6]、气质联用法^[1,7]、液相色谱法^[8]和液相色谱串联质谱法^[9,10]。应用气相色谱法和气质联用法检测磷酸二乙酯需要先进行衍生化反应,前处理步骤繁琐,而液相色谱串联质谱法则可直接对磷酸二乙酯进行测定,并具有定性特异性的优点。在文献^[9,11]中均报道了用液质法测定人尿中磷酸二乙酯的含量,但是在这些方法中使用的 C₁₈ 液相色谱分析柱对磷酸二乙酯的保留性较差,因而引起的质谱基质效应会对

收稿日期:2012-05-10

作者简介:潘艳坤(1977-),女,硕士,主要从事分析测试研究。

*广西大型仪器协作共用网服务体系建设项目——食品药品公共安全检测技术服务项目(No. 09-090-10B)资助。

定量产生明显影响,无法准确定量测定基质更为复杂的植物性样品中的磷酸二乙酯残留量。本研究并建立高效液相-串联质谱法测定青刀豆中的毒死蜱代谢物磷酸二乙酯残留的检测方法。本方法不仅在提取和净化步骤上针对青刀豆样品,而且液相色谱使用的氨基色谱分析柱更适合磷酸二乙酯的分离,有效降低了基质效应对定量准确性影响,可以准确测定毒死蜱在青刀豆中的生物标志物磷酸二乙酯残留量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

三重四极杆液相色谱-质谱联用仪 TSQ Quantum Access Max(美国 Thermo Fisher Scientific 公司出品),配备电喷雾电离源(ESI),高速匀浆机(德国 IKA 公司出品),旋转蒸发仪(上海亚荣公司出品),离心机(上海安亭公司出品),固相萃取装置(美国 Supelco 公司出品),活性炭净化小柱,500mg/6ml(美国 Varian 公司出品)。磷酸二乙酯标准品(比利时 Acros Organics 公司产品)纯度>94%。磷酸二乙酯的化学结构式如图 1 所示。

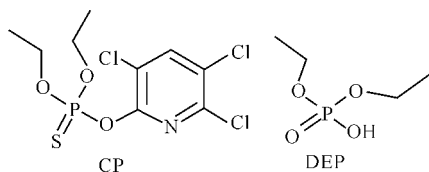


图 1 毒死蜱(CP)和磷酸二乙酯(DEP)的化学结构式

Fig.1 Chemical structural formula of CP and DEP

1.2 标准溶液配制

精密称取磷酸二乙酯标准品适量,用乙腈配制成质量浓度为 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合储备液。量取适量混和储备液用乙腈稀释成不同浓度的混合标准溶液。

1.3 样品处理

青刀豆样品用搅拌机搅碎,称量供试品 5g (准确至 0.01g) 置于 50ml 塑料离心管中。在离心管中加入 5ml 饱和氯化钠溶液, 0.5ml $12\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸,涡旋混匀后加入 10ml 乙酸乙酯/乙腈(1+1)提取剂。试样经匀浆机 $15000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 匀浆提取 1min 后于 $3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心样品 3min ,吸取上清液到圆底烧瓶中。用 10ml 乙酸乙酯/乙腈(1+1)提取剂清洗匀浆机刀头,转入离心管中再提取样品 1 次,再经 $3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心后将上清液并入圆底烧瓶中,提取液于 45°C 水浴中真空旋转蒸至剩余约 2ml 。将浓缩液转移至已用乙腈活化的活性炭净化小柱,用 10ml 乙腈洗脱,收集洗脱液。收集的洗脱液经减压浓缩近干后,用流动相 1.0ml 溶解样品,过 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜后待上机。

1.4 色谱和质谱条件

色谱条件:色谱柱为 Thermo Scientific Waters SpherisorbRR column- NH_2 $2.1\text{mm} \times 150\text{mm}$, $5\mu\text{m}$ (美国, ThermoFisher);流动相为 $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液+乙腈(55+45, pH 值 6.5);柱温 30°C ;流速 $0.2\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量: $10\mu\text{l}$ 。

质谱条件:ESI 负电离源,选择反应监测(SRM)扫描模式;喷雾电压 3000V ;毛细管温度 350°C ;蒸发温度 100°C ;壳气流量 30psi ,辅助气流量 5psi ;定量离子 m/z $153 > 125$,定性离子 m/z $153 > 125, 79$ 。质谱经 Tune Master 软件自动优化后得到最优的套管透镜补偿电压和碰撞能量参数。

2 结果与分析

2.1 提取试剂选择

磷酸二乙酯可溶于水,具有较强酸性($pK_a = 1.37$)^[1],也可溶于醇类、醚类等有机溶剂,但是不溶于饱和食盐水。所以,本方法先在青刀豆样品中加入饱和氯化钠溶液,经 $12\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓盐酸将样品酸化后,加入乙酸乙酯/乙腈(1+1)混和溶剂对样品进行液液萃取。在酸性条件下,磷酸二乙酯在有机溶剂中的溶解度得到提高,这将利于有机溶剂从水相中提取出磷酸二乙酯。在样品中分别加入 0.5ml $12\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸、 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸、 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸等不同浓度的盐酸以比较不同酸性条件对提取效率的影响。实验结果表明,在样品中加入 0.5ml $12\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸,再经乙酸乙酯/乙腈(1+1)混和溶剂提取的效果最好,提取率可达 90%以上。而加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸的提取率仅为 50%,加入 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸的提取效率最低。实验还比较了乙酸乙酯、乙腈和乙酸乙酯/乙腈(1+1)混和溶剂在酸性条件下对磷酸二乙酯的提取效率,结果表明,乙酸乙酯/乙腈(1+1)混和溶剂的提取效率最佳。氯化钠饱和溶液的加入也因为盐析效应有效提高了磷酸二乙酯在有机相中的分配,从而提高了提取效率。

2.2 净化条件选择

实验比较了佛罗里硅土、氧化铝、硅胶小柱等正相 SPE 小柱、 C_{18} 反相 SPE 小柱以及活性炭 SPE 小柱的净化效果。实验发现,由于磷酸二乙酯极性太强,在极性的佛罗里硅土、氧化铝、硅胶等正相小柱上会产生强烈吸附,甲醇、乙腈等具有强洗脱能力的极性溶剂也无法将磷酸二乙酯从 SPE 小柱上完全洗脱下来,造成回收率偏低,而 C_{18} 小柱对样品提取液的净化效果同样不佳。本试验最后选用了活性炭 SPE 小柱对青刀豆样品提取液进行净化,该方法可有效吸

附提取液中的叶绿素等大分子色素,而且操作简单,经乙腈洗脱后,磷酸二酯过柱后的回收率达95%以上。

2.3 液相条件选择

文献[10]曾报道应用C₁₈液相分析柱、乙酸铵-乙腈体系流动相对毒死蜱的几种代谢物进行分离测定。但是我们实验发现,由于磷酸二酯的强极性,导致其在C₁₈柱上不能得到很好的保留,即使改变流动相中的水相比例,磷酸二酯出峰时间依旧过早,样品中的杂质无法得到有效分离。由于质谱的基质效应^[11]的影响,杂质将对磷酸二酯在质谱检测器上的响应产生严重干扰。用基质提取液配制的标准品溶液得到的质谱响应值明显低于相同浓度的纯标准品溶液,基质效应造成的离子抑制作用对定量测定的准确性和精密度产生严重影响,因此有必要寻找对磷酸二酯具有较好保留性的色谱分析柱进行分离,以降低基质效应对定量测定的影响。根据磷酸二酯具有酸性的性质,根据氨基柱在弱酸性条件下具有阴离子交换性的特性,本方法选用氨基柱做为分析柱。实验结果表明,在乙酸铵-乙腈体系流动相(pH值为6.5)条件下,磷酸二酯在氨基柱上可得到很好的保留,而且峰形良好,磷酸二酯和基质杂质能得到有效的分离,用基质提取液配制的标准品溶液得到的质谱响应值与相同浓度的纯标准品溶液一致,基质效应对定量的影响得到有效降低。磷酸二酯标样的HPLC-MS/MS选择反应监测(SRM)色谱图及青刀豆样品中检出DEP的SRM色谱图见图2。

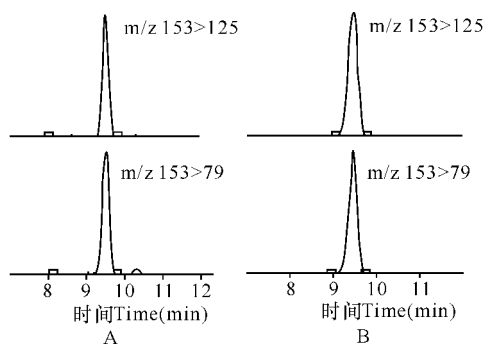


图2 DEP标准样品的SRM色谱(A)和青刀豆样品中检出DEP的SRM色谱(B)

Fig. 2 HPLC-SRM chromatography of DEP standard (A) and DEP detected in green string bean sample (B)

2.4 质谱条件选择

磷酸二酯在ESI离子源、负离子扫描模式下具有较高的灵敏度。其母离子为[M-H]⁻(m/z 153.25),在一定的碰撞能量下对母离子进行碰撞而得到的二级质谱图如图3所示。图3中丰度较强的碎片分别为m/z 125.22和m/z 79.22。选择碎片

m/z 125.22作为定量离子,另一丰度较高的离子m/z 79.22作为定性离子。经过对质谱透镜补偿(Tube Lens offset)及碰撞能量等参数的优化,将得到最优的质谱参数,使磷酸二酯检测的灵敏度得到提高。优化后的质谱参数见表1。

表1 优化后的DEP测定质谱参数

Table 1 Mass parameter for determination of DEP

母离子 Parent (m/z)	子离子 Production (m/z)	质谱透镜补偿 Tube Lens offset(V)	碰撞能量 Collision energy(eV)
153	79	87	25
153	125	87	13

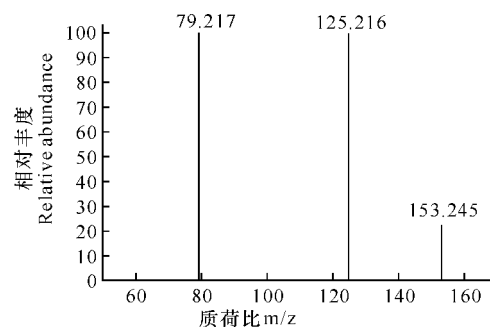


图3 DEP的二次质谱

Fig. 3 MS2 spectrum of DEP standard

2.5 线性范围与定量下限

配制浓度为16~8000μg·L⁻¹的一系列磷酸二酯标准工作液,以峰面积(Y)对磷酸二酯的含量(X)作图。结果表明,在16~8000μg·L⁻¹浓度范围内,峰面积与标准溶液中磷酸二酯的含量呈良好的线性关系,线性方程为Y = -28154.9 + 5126.9X,相关系数R² = 0.9981。经验证,确定本方法的定量下限(S/N = 10)为2μg·kg⁻¹。

2.6 回收率与精密度

以未检出磷酸二酯残留的青刀豆做为样品基质,在20μg·kg⁻¹、100μg·kg⁻¹、500μg·kg⁻¹3个含量水平上添加磷酸二酯标准样品,按前述实验方法测定并计算回收率,每个添加水平平行测定6次。实验测得青刀豆中磷酸二酯的回收率分别为83%~90%,相对标准偏差为4.5%~9.8%(表2),结果符合GB 27404-2008实验室质量控制规范:食品理化检测^[12]中关于残留分析的要求。

2.7 实际样品检测

对田间生长的青刀豆喷散一定浓度的毒死蜱农药,分别按喷药后0d、1d、3d、5d、7d、14d、21d等7个生长期的青刀豆进行采摘并测定其磷酸二酯和毒死蜱含量。磷酸二酯的测定按1.3、1.4的方法进行定,毒死蜱的测定按GB/T 20769-2008^[13]中规定的方法进行。测定结果表明,在喷药后第5天采摘的

青刀豆样品中毒死蜱的含量已未能检出(毒死蜱检出限 0.005mg/kg),而磷酸二乙酯含量在喷药后第 3 天达到峰值后逐渐降低,喷药后第 21 天采摘的青刀豆样品仍可检出含有磷酸二乙酯残留。

表 2 青刀豆中 DEP 的测定方法回收率与相对标准偏差

Table 2 Recoveries and relative standard deviations of DEP determination in green string bean

样品 Sample	分析物 Analyt	<i>n</i>	加入量 Added ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
青刀豆 Green string bean	DEP	6	20	87	9.8
			200	83	4.5
			800	90	5.2

3 结束语

本次实验建立高效液相-串联质谱法测定青刀豆中的毒死蜱代谢物磷酸二乙酯残留量的检测方法,样品经浓盐酸酸化后用乙腈提取,活性炭固相萃取小柱净化,以氨基柱为色谱分析柱进行分析测定。该法操作简便,定性确认准确,方法回收率为 83%~90%,测定值的相对标准偏差小于 9.8%,定量限($S/N = 10$)为 0.002 mg/kg,可以作为监测毒死蜱在青刀豆中的代谢情况提供准确可靠的检测依据。

参考文献:

[1] Xiao F Z, Jeffrey H D, Yan H L, et al. Dialkylphosphates (DAPs) in fruits and vegetables may confound biomonitoring in organophosphorus insecticide exposure and risk assessment[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(1):10638-10645.

[2] 邬春华, 郑力行, 何永华, 等. 尿中毒死蜱及其代谢物的分析[J]. *复旦大学学报:医学版*, 2007, 34(3): 423-426.

[3] 凌云, 王菡, 雍炜, 等. 气相色谱-质谱/质谱法检测蔬菜中的毒死蜱及其代谢物[J]. *色谱*, 2009, 27(1): 78-81.

[4] 郑光, 周志俊. 毒死蜱的毒理学研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(4): 496-498.

[5] 孙运光, 周志俊, 顾祖维. 有机磷农药生物标志物的研究进展[J]. *劳动医学*, 2000, 17(1): 58-60.

[6] 杨玉林, 芮振荣, 王宏等. 气相色谱法分析尿样中六种有机磷农药代谢产物[J]. *中国卫生检验杂志*, 2003, 13(1): 24-26.

[7] Bardarov V, Atanasov V. Study on GC separation and mass spectral detection/fragmentation of dialkylphosphates as their pentafluorobenzyl derivatives[J]. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 2009, 44(4): 379-388.

[8] Mary T K, Michel L. Trace determination of diethylphthalate in aqueous media by solidphase microextraction-liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 841(1): 177-185.

[9] Dulaurent S, Saint-Marcoux F, Marquet P, et al. Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 831(1): 223-229.

[10] 向平, 沈敏, 卓先义, 等. 液相色谱-质谱分析中的基质效应[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(6): 753-756.

[11] Wolfgang B, Michael L, Wolfgang L. Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine by Reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 822(1): 160-169.

[12] GB 27404-2008. 实验室质量控制规范: 食品理化检测[S]. 中华人民共和国国家标准.

[13] GB/T 20769-2008. 水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[J]. 中华人民共和国国家标准.

(责任编辑: 邓大玉)