

气相色谱-串联质谱法测定蔬菜、土壤和水中异菌脲及其代谢产物的残留量

潘 虎

(西藏自治区农牧科学院农业质量标准与检测研究所, 西藏 拉萨 850032)

摘 要:建立气相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜、土壤和水中异菌脲及其代谢产物(N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧化咪唑烷、N-[(3,5-二氯苯基)氨基]羧基]甘氨酸和3,5-二氯苯胺等4种化合物的残留分析方法。样品采用乙腈提取旋蒸后经NH₂/Carbon固相萃取柱净化,采用DB-5MS毛细管色谱柱程序升温分离,选择多反应监测模式测定。在本质谱条件下,异菌脲及其代谢产物等4种化合物的分离效果较好,4种化合物的回收率为84.3%~114.4%,RSD值为2.3%~8.3%,检出限为0.002~0.006 mg/kg。该方法快速、准确,符合多种基质中异菌脲及其代谢产物残留定量检测要求。

关键词:异菌脲; 3,5-二氯苯胺; 气相色谱-串联质谱法; 蔬菜

中图分类号:S481+.8

文献标志码:A

Determination of Iprodione and Its Metabolites Residues in Vegetables, Soil and Water by Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry

PAN Hu

(Institute of Agricultural Product Quality Standard and Testing Research, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China)

Abstract: A method based on GC-MS/MS was established to detect the residues of iprodione, N-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-dioximidazolidine, N-[(3,5-dichlorophenyl) amino] carbonyl] glycine and 3,5-dichloroaniline in vegetables, soil and water. Four compounds in samples were extracted with acetonitrile, then cleaned up using NH₂/Carbon SPE column, and finally separated on a DB-5MS column with temperature programming, and detected quantitatively in multiple reaction monitoring mode. Under this condition of GC-MS/MS, four compounds could be completely separated and the recovery rate of four compounds were 84.3% ~ 114.4%. The relative standard deviations were 2.3% ~ 8.3%, and the detection limits of this method were 0.002 ~ 0.006 mg/kg. This method is rapid, accurate and suitable for the quantitative determination of iprodione and its metabolites' residues in various substrates.

Key Words: Iprodione; 3,5-dichloroaniline; Gas chromatography-tandem mass spectrometry; Vegetable

异菌脲(Iprodione, C₁₃H₁₃N₃O₃Cl₂)是一种高效广谱的二甲酰亚胺类(DCs)杀菌剂,主要用于防治果蔬菌核病和灰霉病等真菌性病害,由于异菌脲的持续大量使用导致其在环境中的残留备受关注^[1-2]。异菌脲对水生动物具有较高毒性,对植物、鸟类具有中等毒性^[3-4],具有植物细胞遗传毒性,可导致染色体改变和细胞死亡^[5],可抑制人干细胞的

生长、影响男性精子质量和造成DNA的损伤^[6-7],可导致人体内分泌紊乱、神经系统功能失调、降低体内荷尔蒙分泌,甚至可能致癌^[8]。异菌脲在环境中积累后可抑制环境中其他微生物的生长,对环境微生物群落结构造成明显影响,可导致环境微生物多样性下降和土壤肥力缺失等^[9]。异菌脲的降解方式主要有自然水解反应、光化学降解和微生物降解,其中微生物是其在环境中主要、安全、高效的降解方式。异菌脲经微生物降解主要生产N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧化咪唑烷、N-[(3,5-二氯苯基)氨基]羧基]甘氨酸和3,5-二氯苯胺等3种代谢

收稿日期:2021-11-28

基金项目:国家自然科学基金(32060025);西藏财政本级农口部门预算项目(XZNKYZBS-2021-C-001)。

作者简介:潘虎(1986-),男,博士研究生,副研究员,主要从事农药残留检测分析研究,E-mail:ph2032007@126.com。

产物^[10-11],部分研究表明3,5-二氯苯胺是一种持久性有机污染物,具有较强的肾毒性和致癌作用,加剧了异菌脲的污染毒力^[12],故亟需加强异菌脲及其代谢产物的监测及质量安全风险评估等工作。

目前,有关异菌脲的监测方法报道较多^[13-14],但针对N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧化咪唑烷、N-[[(3,5-二氯苯基)氨基]羰基]甘氨酸和3,5-二氯苯胺的监测研究较少,气相色谱-三重四极杆质谱联用技术具有高效快捷、准确度高等特点、适用于多种基质中化合物的残留检测等^[15],已被广泛应用于各种化合物的残留检测。本研究采用石墨碳黑-氨基固相萃取前处理技术,建立了蔬菜、土壤和水体中同时监测异菌脲及其代谢产物的GC-MS/MS方法,以期为高原地区异菌脲及其代谢物的风险评估和安全使用提供精确的监测依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集、制备与储存

蔬菜(西红柿)、土壤和水样品于2021年6月份采集于西藏自治区拉萨市堆龙德庆区羊达设施农业示范园。蔬菜样品去除浮土、腐烂和根部后采用食品料理机高速制备成匀浆物;土壤样品自然阴干5~7 d,研磨成粉状物后过100目不锈钢土壤筛;水样品采用定性滤纸过滤。所有制备的样品装入塑料样品盒后-20℃保存备用。

1.2 仪器与试剂

气相色谱-串联质谱仪:Bruker-450GC-320MSMS;色谱柱:Agilent DB-5MS毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);旋转蒸发仪:瑞士R-215型;高速匀浆机:德国IKA-T25型;异菌脲(纯度≥96%)、N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧化咪唑烷(纯度≥96%)和3,5-二氯苯胺标准品(纯度≥96%)购置于Toronto Research Chemicals Inc.(TRC),N-[[(3,5-二氯苯基)氨基]羰基]甘氨酸(纯度≥96%)由上海纳孚生物科技有限公司合成;石墨碳黑-氨基柱:Varian公司生产;乙腈、丙酮、甲苯、正己烷均为Thermo Fisher Scientific公司色谱纯;氯化钠为成都联合化工有限公司分析纯。

1.3 标准溶液的配制

异菌脲及其代谢产物等4种农药标准储备溶液:将4种农药标准品分别用丙酮配制成100 mg/L

的标准溶液,-20℃保存备用。异菌脲及其代谢产物等4种农药标准工作溶液:将4种农药标准储备溶液用丙酮配制成5 mg/L混合标样,将上述混合标样用丙酮+正己烷(1+9)稀释成所需系列标准工作液。

1.4 样品前处理

参考GB 23200.8—2016《食品安全国家标准 水果和蔬菜中500种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法》和HJ 1023—2019《土壤和沉积物 有机磷类和拟除虫菊酯类等47种农药的测定 气相色谱-质谱法》进行前处理。

1.4.1 提取

分别取20.0 g蔬菜样品、10.0 g土壤样品和20.0 g水样品于150 mL烧杯中,分别加入40 mL乙腈、20 mL纯净水+40 mL乙腈和40 mL乙腈;然后分别高速匀浆1~2 min、150 rpm匀速震荡30 min和150 rpm匀速震荡10 min;滤纸过滤上述3种样品后加入5~6 g氯化钠,剧烈震荡1 min,静置30 min待分层,分层后取10 mL上层乙腈溶液旋转蒸发至近干,加入2 mL正己烷待净化。

1.4.2 净化

将石墨碳黑-氨基柱用5 mL乙腈+甲苯(3:1)预淋洗后将上述2 mL待净化溶液加入石墨碳黑-氨基柱中,收集淋洗液,再加5 mL乙腈+甲苯(3:1)冲洗石墨碳黑-氨基柱,重复3次,将上述淋洗液35℃旋转蒸发至干,用丙酮+正己烷(1:9)定容至5.0 mL,供GC-MS/MS分析。

1.5 气相色谱-串联质谱条件

1.5.1 气相色谱条件

色谱柱为DB-5MS毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气为氦气(纯度为99.999%),流速为1.0 mL/min;不分流模式,进样量1 μL,进样口温度为230℃;升温程序如下:60℃保持1 min,以15℃/min的速率升至150℃保持2 min,再以10℃/min的速率升至290℃保持4 min。

1.5.2 质谱条件

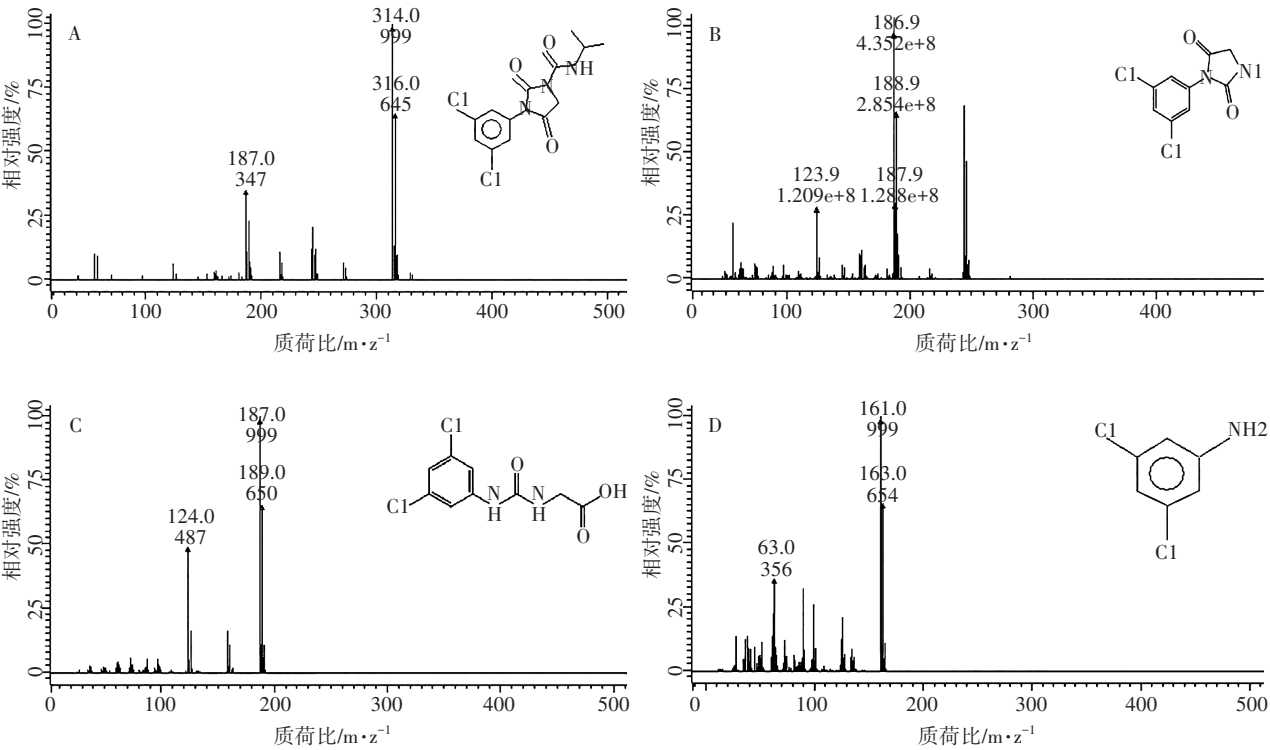
EI(电子轰击)方式,电子轰击能量为70 eV,传输线温度为280℃,离子源温度为230℃,溶剂延迟4 min。试验中各组分的定性分析采用SCAN模式,扫描质量范围为50~500 amu;定量测定采用多反应监测模式(MRM)。

2 结果与分析

2.1 异菌脲及其代谢产物检测离子对的筛选

按SCAN模式对异菌脲及其代谢产物的标准工作液(1.0 mg/L)进行检测,每个化合物的总离子流图如图1所示,按化合物CAS号查询Bruker-NIST谱库得到的总离子流图基本与图1相吻合。从图1及其结构式发现异菌脲及其代谢产物均含

有苯环结构和Cl⁻离子同位素(Cl³⁵⁻和Cl³⁷⁻)基峰,Cl⁻离子同位素基峰的化学结构较为稳定且容易辨识,故选择它们作为母离子,同时选择分子离子峰高大于10%的其他Cl⁻离子同位素峰作为子离子;采用5eV,10eV,15eV,20eV,25eV,30eV,35eV,40eV,45eV的碰撞能量进行优化,最终异菌脲及其代谢产物的离子对其碰撞能量优化结果见表1。



A:异菌脲;B:N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧化咪唑烷;C:N-[(3,5-二氯苯基)氨基]羧基甘氨酸;D:3,5-二氯苯胺。

图1 异菌脲及其代谢产物的总离子流

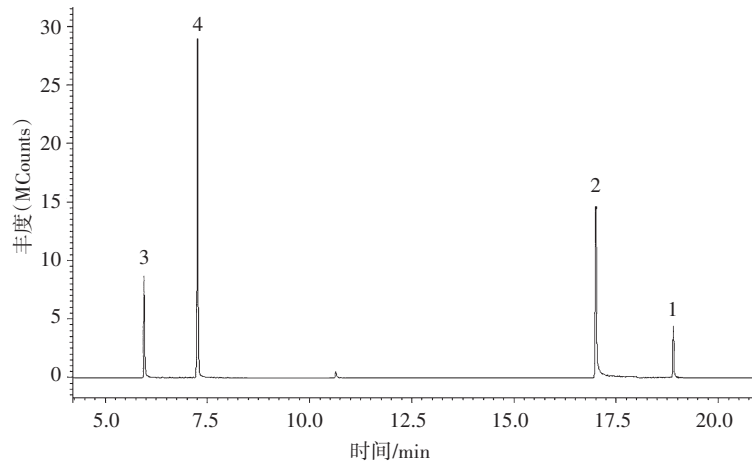
表1 异菌脲及其代谢产物的特征检测离子

化合物名称	CAS号	保留时间/min	定量转换 1		定量转换 2		定量离子/(m·z ⁻¹)
			母离子>子离子/(m·z ⁻¹)	能量/eV	母离子>子离子/(m·z ⁻¹)	能量/eV	
异菌脲	36734-19-7	18.895	314.0>245.0	10	316.0>247.0	10	247.0
N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧化咪唑烷	27387-87-7	16.996	244.0>187.0	20	246.0>189.0	15	189.0
N-[(3,5-二氯苯基)氨基]羧基甘氨酸	62584-33-2	5.951	189.0>126.0	20	187.0>124.0	15	126.0
3,5-二氯苯胺	626-43-7	7.254	161.0>99.0	20	161.0>126.0	15	126.0

2.2 标准色谱图

按多反应监测模式(MRM)对异菌脲及其代谢产物的混合标准工作液(1.0 mg/L)进行检测,4种

化合物的MRM色谱图见图2。由图2可见,在此条件下4种化合物均能较好地分离。



1.异菌脲;2. N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧代咪唑烷;3.N-[[(3,5-二氯苯基)氨基]羰基]甘氨酸;4.3,5-二氯苯胺。

图2 异菌脲及其代谢产物的MRM色谱

2.3 方法的线性范围、相关系数及检出限

分别配制质量浓度为 0.02 mg/L, 0.05 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 2.0 mg/L 的 4 种化合物的混合标准工作液进行质谱测定,以各化合物的质量浓度 C(mg/L)为横坐标(x),峰面积 A(×10⁶)为纵坐标(y)得到线性方程(表2)。由表2可以看出,标准曲线

在 0.02~2.0 mg/L 范围内呈现良好的线性关系,相关系数 *r* 为 0.983 6~0.999 6,满足仪器分析相关系数要求,同时根据线性方程发现异菌脲及其代谢产物在蔬菜、土壤和水中的基质效应依次递减^[16]。按照 3 倍信噪比计算本方法的检测限为 0.002~0.006 mg/kg。

表2 异菌脲及其代谢产物的的线性方程及检出限

化合物	线性范围/(mg·L ⁻¹)	样品	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	检出限/(mg·kg ⁻¹)
异菌脲	0.02~2.0	蔬菜	$y=368.4x+2.199\ 7$	0.999 6	0.003
		土壤	$y=40.02x+0.422\ 6$	0.999 3	0.005
		水	$y=27.44x+0.874\ 4$	0.998 7	0.006
N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧代咪唑烷	0.02~2.0	蔬菜	$y=395.79x+4.724\ 6$	0.999 6	0.002
		土壤	$y=84.943x+1.210\ 8$	0.997 6	0.003
		水	$y=66.343x-1.463\ 2$	0.999 0	0.002
N-[[(3,5-二氯苯基)氨基]羰基]甘氨酸	0.02~2.0	蔬菜	$y=87.377x+18.351\ 0$	0.994 7	0.003
		土壤	$y=66.546x-5.178\ 5$	0.988 1	0.003
		水	$y=33.372x-1.811\ 7$	0.983 6	0.005
3,5-二氯苯胺	0.02~2.0	蔬菜	$y=169.51x+8.006\ 7$	0.997 6	0.006
		土壤	$y=88.843x+1.419\ 2$	0.997 5	0.003
		水	$y=64.166x+0.222\ 4$	0.999 5	0.004

2.4 方法的精密度和准确度

在蔬菜、土壤和水等3种供试样品中添加0.04 mg/L, 0.4 mg/L和1.0 mg/L的异菌脲及其代谢产物混合标准工作液进行回收率试验(n=3), 得到平均加标回收率和相对标准偏差(RSD)。结果表明: 异

菌脲及其代谢产物的回收率为84.3%~114.4%, RSD值为2.3%~8.3%(表3), 该检测方法用于蔬菜、土壤和水中异菌脲及其代谢产物胺的残留分析准确可靠。

表3 异菌脲及其代谢产物的回收率和相对偏差(n=3) %

基质	添加水平/ (mg·kg ⁻¹)	异菌脲		N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二 氧代咪唑烷		N-[(3,5-二氯苯基)氨基] 羧基]甘氨酸		3,5-二氯苯胺	
		平均回收率	RSD	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
蔬菜	0.04	105.4	3.7	89.5	6.5	108.4	7.3	95.7	3.1
	0.4	92.6	5.2	94.2	4.7	113.8	6.3	93.9	4.5
	1.0	110.3	6.3	87.3	5.1	92.6	4.7	98.3	2.3
土壤	0.04	89.6	6.4	105.4	4.7	95.1	5.2	102.4	3.4
	0.4	93.3	4.9	114.4	5.9	85.4	4.8	97.3	4.1
	1.0	87.9	7.4	109.5	6.3	91.7	5.7	107.2	2.8
水	0.04	104.7	3.6	92.4	5.3	104.6	5.9	94.7	3.7
	0.4	102.3	2.9	84.3	7.9	88.9	8.3	95.6	4.1
	1.0	95.9	3.8	89.6	5.7	94.1	4.6	91.9	3.4

2.5 实际样品测试分析

本次抽样调查了拉萨市部分蔬菜生产基地的蔬菜、土壤及灌溉用水等各40份样品, 其中异菌脲检出率最高(10.76%), 依次为3,5-二氯苯胺(9.15%)、N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧代咪唑烷(5.4%)和N-[(3,5-二氯苯基)氨基]羧基]甘氨酸(3.6%)。异菌脲、N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧代咪唑烷、N-[(3,5-二氯苯基)氨基]羧基]甘氨酸和3,5-二氯苯胺的最大检出量分别为14.28 mg/kg, 11.34 mg/kg, 1.36 mg/kg和2.74 mg/kg, GB 2763—2021中规定的异菌脲最大残留限量值为30 mg/kg, 但有关其他3种药物尚无限量标准, 同时由于3,5-二氯苯胺的强毒性和结构稳定性等特点, 导致该药风险隐患较大, 亟需开展3,5-二氯苯胺的风险评估等工作, 制订合理的残留限量标准, 确保农产品及土壤环境的质量安全。

3 结论

本研究采用NH₂/Carbon固相萃取前处理技术来提取、净化、富集蔬菜、土壤和水体样品中异菌脲及其代谢产物的残留, 建立了同时检测异菌脲、N-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧代咪唑烷、N-[(3,5-二

氯苯基)氨基]羧基]甘氨酸和3,5-二氯苯胺等4种化合物的气相色谱-串联质谱分析方法。该方法提取效率高、净化效果好、灵敏度和准确度较高, 适用于蔬菜、土壤和水体中异菌脲及其代谢产物残留分析检测要求, 为高原地区异菌脲及其代谢物的风险评估和安全使用提供了定性和定量依据, 可有效确保高原设施蔬菜、土壤和水体的质量安全。

参考文献:

[1] ÖZDOĞAN FAN N, KAPUKÇİ İRAN F, MUTLUOĞLU FLU G, et al. Simultaneous Determination of Iprodione, Procymidone, and Chlorflurenol in Lake Water and Wastewater Matrices by GC-MS after Multivariate Optimization of Binary Dispersive Liquid-Liquid Microextraction [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2018, 190(10): 607.

[2] 刘茜, 张宪, 陈敏, 等. 啉菌环胺·异菌脲可湿性粉剂在葡萄和土壤中的残留消解动态及风险评估 [J]. 农产品质量与安全, 2021(2): 30-35, 41.

[3] EEVERS N, WHITE J C, VANGRONVELD J, et al. Bio- and Phytoremediation of Pesticide-Contaminated Environments: a Review [J]. Advances in Botanical Research, 2017, 83: 277-318.

[4] CARNEIRO L S, MARTÍNEZ L C, GONÇALVES W G, et al. The Fungicide Iprodione Affects Midgut Cells of Non-Target Honey Bee *Apis mellifera* Workers [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 189: 109991.

- [5] BERNARDES P M, ANDRADE-VIEIRA L F, ARAGÃO F B, et al. Toxicological Effects of Comercial Formulations of Fungicides Based on Procymidone and Iprodione in Seedlings and Root Tip Cells of *Allium Cepa* [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, 26(20): 21013–21021.
- [6] GRABKE A, FERNÁNDEZ-ORTUÑO D, AMIRI A, et al. Characterization of Iprodione Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry and Blackberry [J]. *Phytopathology*, 2014, 104(4): 396–402.
- [7] YANG Z G, JIANG W K, WANG X H, et al. An Amidase Gene, *ipaH*, is Responsible for the Initial Step in the Iprodione Degradation Pathway of *Paenarthrobacter* sp. Strain YJN-5 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(19): 50–58.
- [8] VERDENELLI R A, LAMARQUE A L, MERILES J M. Short-Term Effects of Combined Iprodione and Vermicompost Applications on Soil Microbial Community Structure [J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 414: 210–219.
- [9] LINDH C H, LITTORIN M, AMILON A, et al. Analysis of 3, 5-Dichloroaniline as a Biomarker of Vinclozolin and Iprodione in Human Urine Using Liquid Chromatography/Triple Quadrupole Mass Spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 2007, 21(4): 536–542.
- [10] ZHANG M L, REN Y J, JIANG W K, et al. Comparative Genomic Analysis of Iprodione-Degrading *Paenarthrobacter* Strains Reveals the Iprodione Catabolic Molecular Mechanism in *Paenarthrobacter* sp. Strain YJN-5 [J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(2): 1079–1095.
- [11] 杨正中, 吴 广, 金 文, 等. 异菌脲降解菌 YJN-G 的分离、鉴定及降解特性 [J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(1): 164–168.
- [12] LAI Q, SUN X F, LI L S, et al. Toxicity Effects of Procymidone, Iprodione and Their Metabolite of 3, 5-Dichloroaniline to Zebrafish [J]. *Chemosphere*, 2021, 272: 129577.
- [13] 曹雪琴, 杨 飞, 陈国通, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中 10 种保鲜剂残留量 [J]. *食品科学*, 2020, 41(4): 319–324.
- [14] 程冰峰, 杨倩文, 束兆林, 等. 异菌脲在土壤中的降解和移动性研究 [J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(6): 304–310.
- [15] 朱文霞. 快速溶剂提取-GC-MS/MS 法测定土壤中三唑磷、螺螨酯、异菌脲、氰氟草酯和多效唑 [J]. *化学分析计量*, 2020, 29(6): 71–74.
- [16] KWON H, LEHOTAY S J, GEIS-ASTEGGIANTE L. Variability of Matrix Effects in Liquid and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Pesticide Residues after QuEChERS Sample Preparation of Different Food Crops [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1270: 235–245.