

# 固相萃取-气相色谱 - 三重四级杆质谱法测定蔬菜中 五氯硝基苯和百菌清残留量

曹忠波, 张媛媛\*, 刘晓晶, 华正罡

(辽宁省疾病预防控制中心, 沈阳 110005)

**摘要:** **目的** 建立固相萃取-气相色谱-三重四级杆质谱法测定蔬菜中五氯硝基苯和百菌清残留量的检测方法。**方法** 样品采用正己烷溶剂提取, 串联 Florisil-Carb 固相萃取小柱净化, 采用多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式检测, 内标法进行定量。**结果** 五氯硝基苯和百菌清的平均回收率分别在 78.7%~91.6%、80.2%~90.8%之间; 检出限( $S/N=3$ )为 0.005 mg/kg 和 0.004 mg/kg。**结论** 该方法具有灵敏度高、分离效果好、重复性好的特点, 适用于大批量蔬菜样品中五氯硝基苯和百菌清杀菌剂残留检测的要求。

**关键词:** 固相萃取; 五氯硝基苯和百菌清; 气相色谱-三重四级杆质谱联用仪

## Determination of pentachloronitrobenzene and chlorothalonil residues in vegetables by solid phase extraction-gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry

CAO Zhong-Bo, ZHANG Yuan-Yuan\*, LIU Xiao-Jing, HUA Zheng-Gang

(Center for Disease Control and Prevention of Liaoning, Shenyang 110005, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of quintozone and chlorothalonil residues in vegetables by solid phase extraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted with N-hexane solvent, purified with Florisil-carb solid phase extraction column in series, detected by multiple reaction monitoring (MRM) mode, and quantified by internal standard method. **Results** The average recoveries of quintozone and chlorothalonil were 78.7%–91.6% and 80.2%–90.8%, and the detection limits ( $S/N=3$ ) were 0.005 mg/kg and 0.004 mg/kg, respectively. **Conclusions** This method has the characteristics of high sensitivity, good separation effect and good repeatability. It is suitable for the detection of pentachloronitrobenzene and chlorothalonil residues in a large number of vegetable samples.

**KEY WORDS:** solid phase extraction; pentachloronitrobenzene and chlorothalonil; gas chromatography triple quadrupole mass spectrometer

### 1 引言

五氯硝基苯(pentachloronitrobenzene, PCNB)和百菌清属保护性杀菌剂。五氯硝基苯对多种蔬菜的苗期病害及土壤传染的病害有较好的防治效果, 百菌清是一种高效、低

毒的非内吸性广谱有机氯杀菌剂, 对多种作物的真菌病害有良好的预防作用, 广泛应用于蔬菜、果树、小麦等多种农作物病害的防治<sup>[1]</sup>。但其毒性危害、环境污染、农药残留等问题日益突出。世界卫生组织(WHO)的数据显示, 百菌清对鱼类和水生无脊椎动物的毒性极大, 啮齿动物暴露

\*通讯作者: 张媛媛, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全理化检测。E-mail: yuanyuande\_1984@163.com

\*Corresponding author: ZHANG Yuan-Yuan, Associate Chief Technician, Center for Disease Control and Prevention of Liaoning, Shenyang 110005, China. E-mail: yuanyuande\_1984@163.com

在该物质中后会导致肾脏和胃部损害以及肿瘤的产生<sup>[2]</sup>。欧盟决定在 2020 年正式实施对百菌清的禁令<sup>[3]</sup>, 五氯硝基苯作为一种有机氯类杀菌剂, 其使用安全性问题已经在世界各国引起了广泛关注, 欧盟和美国均已出台禁用或限制使用范围的措施<sup>[4]</sup>。我国目前对五氯硝基苯导致的环境问题引起高度重视, 逐步采取相应的监督管理措施。

目前农药残留检测前处理技术主要有固相萃取、固相微萃取、分散固相萃取(QuEChERS)<sup>[5]</sup>、凝胶净化、超临界液体萃取及分子印迹技术等<sup>[6]</sup>, 一般采用气相色谱法<sup>[7,8]</sup>、高效液相色谱法<sup>[9]</sup>、气相色谱-质谱联用<sup>[10,11]</sup>、液相色谱质谱联用<sup>[12]</sup>等技术检测。针对蔬菜中百菌清和五氯硝基苯有机氯农药杀菌剂, 尤其涉及利用二级质谱确证方法标准方法报道的较少。

本文建立了串联固相萃取柱净化-气相色谱三重四级杆串联质谱(gas chromatography triple four-pole tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)进行多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式的快速测定方法, 以期满足蔬菜中五氯硝基苯和百菌清残留量检测要求。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 材料与仪器

Agilent7000B-7890A 气相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国安捷伦公司); T25 型高速均质分散器(德国 IKA 公司); R-210 旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司); Florisil 固相萃取小柱柱、Carb 固相萃取小柱(1000 mg/6 mL, 迪马科技有限公司); TurboVapII 氮气浓缩仪(美国 Caliper 公司); ST16R 高速离心机(美国 Thermo 公司)。

五氯硝基苯、百菌清、顺式-环氧七氯标准溶液(100 μg/mL, 农业部环境保护科研检测所); 乙腈、正己烷、丙酮(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 氯化钠、无水硫酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱: DB-5MS Ultra Inert 超高惰性石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 μm, 0.25 μm); 升温程序: 初始温度 40 °C, 保持 1 min, 以 30 °C/min 速率升至 130 °C, 再以 5 °C/min 速率升至 250 °C, 保持 5 min; 载气: 高纯氮气(纯度 >

99.999%), 流速为 1.0 mL/min; 进样口温度: 260 °C; 进样方式: 不分流进样, 2 min 后开启分流阀。进样体积: 1 μL。

#### 2.2.2 质谱条件

扫描模式: 多重反应监测; 传输线温度: 280 °C; 电子轰击源(EI): 70 eV; 四级杆温度: 150 °C; 离子源温度: 230 °C; 溶剂延迟: 14 min; 碰撞气: 高纯氮气(纯度 > 99.999%), 碰撞流量: 1.5 mL/min; 淬灭流量(He): 2.0 mL/min。五氯硝基苯、百菌清、顺式-环氧七氯质谱检测具体参数见表 1。

#### 2.2.3 样品前处理

(1)提取: 称取 15 g 样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 5 g 氯化钠, 振荡混匀, 加入 30 mL 正己烷, 涡旋混匀 1 min, 用高速均质分散器高速提取 5 min, 加入 8 g 无水硫酸钠(350 °C 烘烤 4 h), 涡旋混匀 1 min, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液 20 mL 至浓缩瓶中, 于 30 °C 水浴中减压蒸馏浓缩至近干, 待净化。

(2)净化: 串联 Florisil-Carb 柱依次用 5 mL 丙酮+正己烷(1:9, V/V)溶液和 5 mL 正己烷活化, 用 5 mL 正己烷润洗浓缩瓶, 上样于固相萃取小柱中, 再 10 mL 丙酮+正己烷(1:9, V/V)溶液洗脱, 收集并合并洗脱液, 氮吹至近干, 加入 60 μL 内标溶液, 用正己烷准确定容至 1 mL, 待 GC-MS/MS 分析测定。

## 3 结果与分析

### 3.1 提取溶剂的选择

蔬菜样品在农药残留检测时, 样品色素含量较高, 基质干扰严重, 使检测灵敏度降低, 且对色谱柱及离子源污染较为严重, 故在样品前处理中有效去除色素较为关键。

在农药残留检测中, 常用的提取有机溶剂有乙腈和正己烷, 本文比较了 2 种试剂的提取效果。乙腈极性较大, 并能与水互溶, 提取液中水溶性色素等杂质较多, 所以乙腈提取液比正己烷提取液颜色较深。在提取液浓缩过程中, 乙腈沸点高于正己烷, 正己烷更易于浓缩, 减小目标物损失的可能性。在空白样品添加五氯硝基苯和百菌清混标 1、2 mg/L 2 个浓度水平, 并分别以乙腈和正己烷为提取溶剂, 比较两者平均回收率, 结果见图 1, 可得正己烷的提取效率优于乙腈。所以, 本研究选择正己烷作为提取剂。

表 1 五氯硝基苯、百菌清及内标物的质谱检测参数

Table 1 Parameters of PCNB, chlorothalonil and internal standard

序号	化合物名称	保留时间/min	定量离子对	碰撞电压/eV	定性离子对	碰撞电压/ev
1	五氯硝基苯	15.73	295 > 237	15	295 > 214	15
2	百菌清	16.55	266 > 231	20	266 > 124	20
3	顺式-环氧七氯(内标)	21.53	353 > 81	30	353 > 237	30

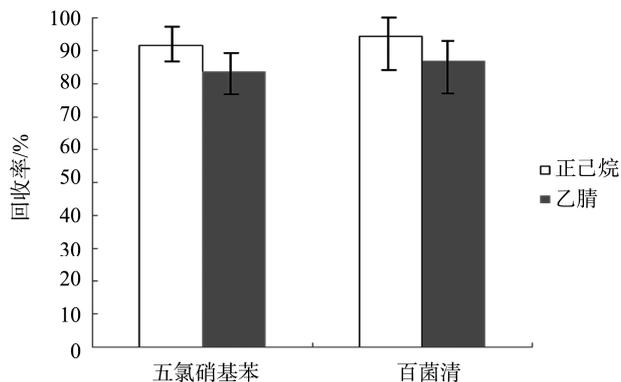


图 1 不同溶剂对回收率的影响(n=3)

Fig.1 Effect of different solvents on recovery(n=3)

### 3.2 固相萃取柱的选择

植物性样品中含有大量色素和有机酸等,包括叶绿素、叶黄素、类胡萝卜素等,这些化合物通常对农药残留分析产生干扰,且能危害分析仪器。Florsil 是硅酸镁吸附剂,这种吸附剂具有强极性,可以从非极性溶液中萃取极性化合物。Carb 是具有片状结构的石墨化碳黑,对平面分子具有较好的保留,其典型应用为农药残留分析。本文采用 Florsil 和 Carb 固相萃取小柱串联模式,有效去除样品色素、维生素、甾醇、有机酸等干扰物质<sup>[13]</sup>,使上机测试液更加清澈,提高目标化合物的检测灵敏度。

### 3.3 质谱不同扫描模式的选择

本实验分别采用全扫(scan)、选择离子(selective ion monitor, SIM)和二级质谱多反应监测 3 种不同质谱扫描方式对样品进行测定。全扫模式时,由于蔬菜基质非常复杂,存在严重干扰,无法进行准确定性;在选择离子(SIM)模式下通过选择目标物质谱离子丰度最强的离子进行扫描,基质干扰问题得到了明显地改善,样品中五氯硝基苯和百

菌清可以检出,样品中仍存在其他干扰峰,如果保留时间发生偏离和不同保留时间处具有相似质谱信息,仍会影响准确定性。在多反应监测模式下,分别选择百菌清和五氯硝基苯特征的母离子,优化碰撞电压能量,将母离子进一步打碎,根据母离子及子离子进行定性、定量分析,有效地去除干扰离子,减小基质干扰,显著提高目标化合物灵敏度<sup>[14]</sup>。因此本实验最终采用多反应监测模式。

按照串联质谱多反应监测模式建立方法,先对各化合物进行全扫描,后选择化合物一级碎片离子峰最强的离子峰,作为母离子,优化碰撞电压能量,进行产物离子扫描,确定化合物的定性、定量离子对。多反应监测色谱图见图 2。

### 3.4 方法的线性范围

蔬菜样品含有大量色素、维生素、甾醇、有机酸等干扰物,产生一定的基质效应。为了降低基质效应的影响,试验采用系列空白基质混合标准溶液建立校准曲线。配制浓度在 0.01~2 mg/L 范围标准系列,按照 2.2.1 条件测定结果见表 2。0.01~2 mg/L 质量浓度范围内,线性关系良好,相关系数均大于 0.9994,线性关系均满足《实验室质量控制规范食品理化检测》要求<sup>[15]</sup>。

### 3.5 精密度、准确度及检出限

在芹菜空白基质中添加五氯硝基苯和百菌清混标进行加标回收实验,添加浓度水平为 0.2、1、2 mg/L。按 2.2.2 节前处理方法进行,利用 2.2.1 节设定条件进行 GC-MS/MS 测定,内标法定量。其回收率和精密度结果见表 3,试剂样品空白和样品加标的反应监测总离子流图分别为图 3、图 4。五氯硝基苯和百菌清在蔬菜中回收率范围分别为 78.7%~91.6%、80.2%~90.8%,检出限(S/N=3)分别为 0.005 mg/kg、0.004 mg/kg,均满足食品安全国家标准<sup>[15]</sup>要求。

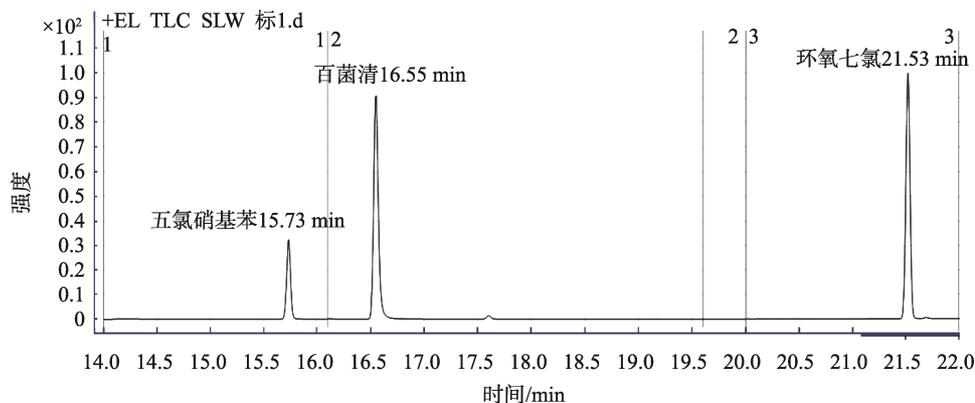


图 2 多反应监测(MRM)总离子流色谱图

Fig.2 Total ion flow chromatogram of MRM

表 2 五氯硝基苯和百菌清的线性范围和相关系数

Table 2 Linear range and correlation coefficient of PCNB and chlorothalonil

化合物名称	线性范围/(mg/L)	线性方程	相关系数
五氯硝基苯	0.01~2.0	$Y=0.047X+0.0045$	$r=0.9998$
百菌清	0.01~2.0	$Y=2.83X+0.0187$	$r=0.9994$

表 3 五氯硝基苯和百菌清的回收率、精密度及检出限

Table 3 Recovery, precision and detection limit of PCNB and chlorothalonil

化合物	添加浓度/(mg/L)	平均回收率/(n=6)	相对标准偏差 RSD%(n=6)	检出限 LOD/(mg/kg)
五氯硝基苯	0.2	78.7	8.6	0.005
	1	91.6	7.2	
	2	89.8	5.7	
百菌清	0.2	80.2	9.2	0.004
	1	86.3	4.9	
	2	90.8	5.1	

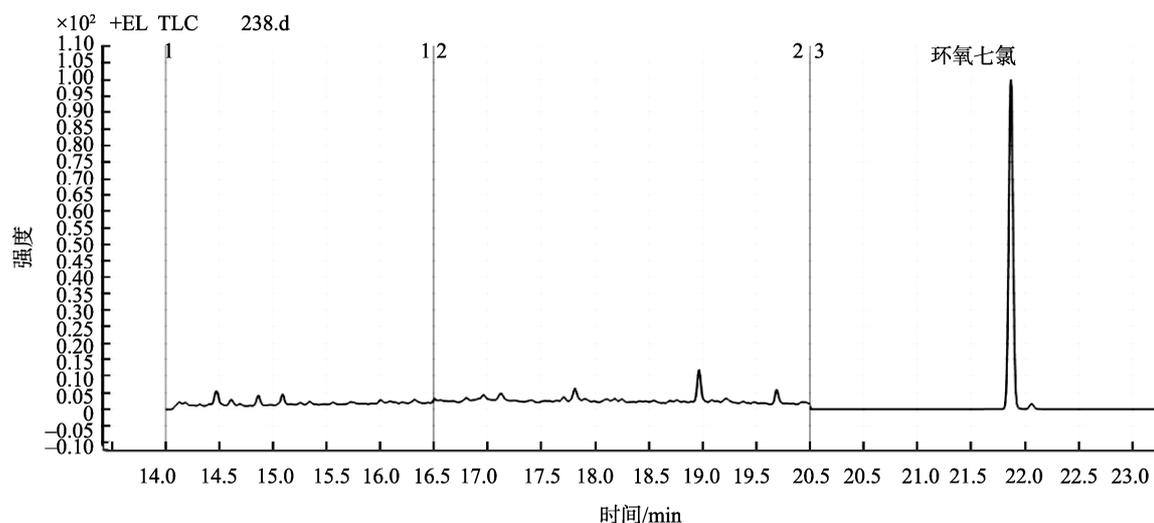


图 3 样品空白多反应监测总离子流图

Fig.3 Total ion chromatogram of sample MRM

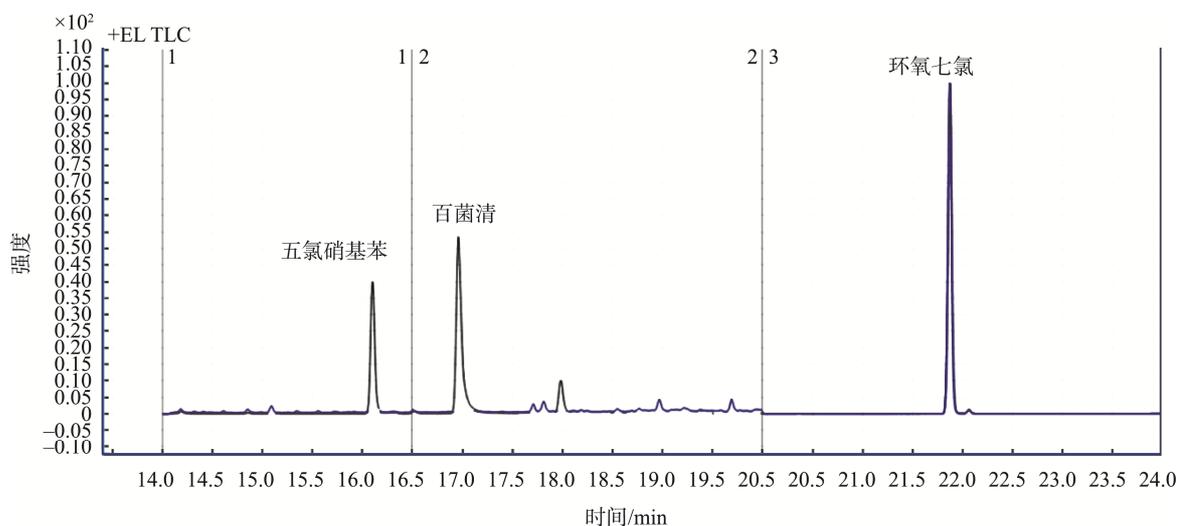


图 4 样品加标多反应监测(MRM)总离子流图

Fig.4 Total ion chromatogram of MRM for sample addition standard

### 3.6 实际样品测定

本研究采集 30 份市售蔬菜(韭菜、白菜、芹菜、菠菜等)样品,按 2.2.2 方法处理、并在 2.2.1 仪器条件下测定,五氯硝基苯和百菌清均未检出,符合我国国家标准 GB 2763-2019《食品中农药最大残留限量》<sup>[16]</sup>规定限量要求。

## 4 结 论

本研究建立了固相萃取-相色谱-三重四级杆质谱法测定蔬菜中五氯硝基苯和百菌清的残留检测方法,并对提取溶剂、净化方法进行优化。该方法具有灵敏度高、分离效果好、重复性好的特点,适用于大批量水果和蔬菜中五氯硝基苯残留检测的要求。

### 参考文献

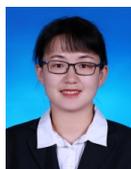
- [1] 赵丽,董玉英,荣国琼,等.气相色谱-质谱法同时测定水果中五氯硝基苯-百菌清残留量[J].安徽农业科学,2017,45(9):94-95.  
Zhao L, Dong YY, Rong GQ, *et al.* Simultaneous determination of chloronitrobenzene chlorothalonil residues in fruits by GC-MS [J]. *Anhui Agric Sci*, 2017, 45(9): 94-95.
- [2] 刘庆菊,韩平,巩文雯,等.农产品中百菌清残留快速检测研究进展[J].食品科技,2018,43(6):306-311.  
Liu QJ, Han P, Gong WW, *et al.* Research progress in rapid detection of chlorothalonil residues in agricultural products [J]. *Food Sci Technol*, 2018, 43(6): 306-311.
- [3] 余露.瑞士禁止销售和使用杀菌剂百菌清[J].农药市场信息,2020,(2):49.  
Yu L. Sales and use of fungicide chlorothalonil are prohibited in Switzerland [J]. *Pestic Market Inform*, 2020, (2): 49.
- [4] 刘刚.中国农科院植保所:建议我国重视五氯硝基苯的应用风险[J].农药市场信息,2018,(23):51.  
Liu G. Chinese academy of agricultural sciences: It is suggested that China should pay attention to the application risk of pentachloronitrobenzene [J]. *Pestic Market Inform*, 2018, (23): 51.
- [5] 王婧. QuEChERS 前处理方法在农药残留检测中的应用[J].山西农业科学,2017,45(12):2051-2055.  
Wang J. Application of QuEChERS pretreatment method in pesticide residue detection [J]. *Shanxi Agric Sci*, 2017, 45(12): 2051-2055.
- [6] 王琪,吕小兰,王贵生.蔬菜中农药残留检测前处理技术的研究进展[J].农业技术与装备,2017,325(1):47-48.  
Wang Q, Lv XL, Wang GS. Research progress of pretreatment technology for pesticide residue detection in vegetables [J]. *Agric Technol Equip*, 2017, 325(1): 47-48.
- [7] GB/T 5009.136-2003 植物性食品中五氯硝基苯残留量的测定[S].  
GB/T 5009.136-2003 Determination of the residual amount of pentachloronitrobenzene in plant food [S].
- [8] NY/T 761-2008 蔬菜水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定[S].  
NY/T 761-2008 Determination of organophosphorus, organochlorine, pyrethroid and carbamate pesticide residues in vegetables and fruits [S].
- [9] 金永富,欧阳立群,吴富中.蔬菜中五氯硝基苯残留量的高效液相色谱测定[J].中国卫生检验杂志,2011,21(2):361-362.  
Jin YF, Ouyang LQ, Wu FZ. Determination of pentachloronitrobenzene in vegetable with high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(2): 361-362.
- [10] 陈红平,刘新,汪庆华,等.气相色谱-质谱法同时测定茶叶中 72 种农药残留量[J].食品科学,2011,32(6):159-164.  
Chen HP, Liu X, Wang QH, *et al.* Simultaneous determination of 72 pesticide residues in tea by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2011, 32(6): 159-164.
- [11] 董丰收,刘新刚,郑永权,等.气相色谱-离子阱串联质谱法测定人参中五氯硝基苯及其代谢产物残留[J].分析化学,2008,36(12):1716-1720.  
Dong FS, Liu XG, Zheng YQ, *et al.* Determination of pentachloronitrobenzene and its metabolite residues in Ginseng by gas chromatography ion trap tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2008, 36(12): 1716-1720.
- [12] 杨清华,李跑,丁胜华,等.果蔬中多农药残留检测技术研究进展[J].中国果菜,2019,39(11):38-42.  
Yang QH, Li P, Ding SH, *et al.* Research progress in detection technology of multi pesticide residues in fruits and vegetables [J]. *Fruit Veget China*, 2019, 39(11): 38-42.
- [13] 崔淑华,许美玲,钱家亮,等.液相色谱-串联质谱法测定果蔬中 4 种新型卵菌纲杀菌剂残留[J].分析化学,2011,39(12):1836-1840.  
Cui SH, Xu ML, Qian JL, *et al.* Determination of four new fungicides in fruits and vegetables by liquid chromatography mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2011, 39(12): 1836-1840.
- [14] 范叶,易泽夫,王壮波.蔬菜农药残留检测中基质效应影响因素分析[J].蔬菜,2019,(2):60-64.  
Fan Y, Yi ZF, Wang ZB. Analysis of factors influencing matrix effect in the detection of pesticide residues in vegetables [J]. *Vegetables*, 2019, (2): 60-64.
- [15] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范-食品理化检测[S].  
GB/T 27404-2008 Laboratory quality control specification-Food physical and chemical testing [S].
- [16] GB 2763-2019 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].  
GB 2763-2019 National food safety standard-Maximum residue limit of pesticide in food [S].

(责任编辑:王欣)

### 作者简介



曹忠波,副主任技师,主要研究方向为食品安全理化检测。  
E-mail: 12243098@qq.com



张媛媛,副主任技师,主要研究方向为食品安全理化检测。  
E-mail: yuanyuande\_1984@163.com