

高效液相色谱-加热电喷雾串联三重四级杆质谱法测定 蔬菜中 18 种常用农药残留

赵 静*, 高 进, 吴宇宽, 唐 澈, 杨 艳, 余 静, 晏桂芳

(湖北省农产品质量安全检测中心, 湖北武汉 430070)

摘 要:建立了蔬菜中 18 种农药残留的高效液相色谱-加热电喷雾串联三重四级杆质谱测定方法。样品由乙腈提取, 氨基柱净化, 经 C18 液相色谱柱分离后, 加热电喷雾离子源正负离子同时采集, 在选择反应监测模式下进行测定。结果表明, 该方法简便、快速、灵敏, 方法的线性范围、回收率、精密度和检出限均符合农药残留分析的要求。

关键词:高效液相色谱; 加热电喷雾串联三重四级杆质谱; 农药残留

中图分类号: O657.63 文献标识码: A

随着人们生活水平的提高, 社会各界对农产品质量安全问题给予高度重视。近年来各国政府不断增加农残检测项目, 其限量标准越来越严格, 对农药残留检测技术提出了更高要求。当前面临的主要问题是杀虫剂和杀菌剂的残留分析。根据国家标准^[1], 在实际工作中需针对不同类别的农药选用适当的净化方式和仪器进行检测, 若发现超标样品还必须质谱确证, 方法工作量大, 分析时间冗长。有机磷、有机氯和拟除虫菊酯类等杀虫剂农药以气相色谱法、气相色谱-质谱联用法检测为主^[2-6], 方法灵敏快捷, 已基本成熟。氟基甲酸酯类型农药主要的方法有液相色谱柱后衍生荧光检测法^[7], 液相色谱紫外检测法^[8]等。

目前, 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)^[9-11]和气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)^[12-13]联用技术在多组分农药残留分析中的应用日益增多, 特别是三重四级杆质谱具有高选择性、强抗干扰能力和准确定量的特点为农残分析提供了方便。另外, 它配备有加热型电喷雾离子源(HESI)可以和快速液相配合使用, 适合在高线速度下工作, 去溶剂化效果好, 提高了灵敏度。

针对我国农业生产中使用最普遍的 18 种杀虫剂和杀菌剂类农药, 本文选择六类有代表性的蔬菜品种作为研究基质, 建立了以乙腈作为提取溶剂, 固相萃取(SPE)作为净化方法, HPLC-HESI-MS/MS 为检测方法, 对蔬菜中农药的多残留进行检测。该方法快速、准确, 能满足高通量残留分析的要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Thermo Fisher Science Surveyor Plus 液相色谱系统, TSQ Quantum Ultra EMR 三重四级杆串联质谱仪(美国, Thermo 公司); T25 高速分散机(德国, IKA 公司); OASYS 水浴氮吹仪(美国, Organomation 公司); WH-3 微型涡旋振荡器(上海楚定分析仪器有限公司); 氨基柱(美国, Agilent 公司); combinMat60 食物料理机(博朗公司)

灭多威, 多菌灵, 嘧霉胺, 甲萘威, 涕灭威, 克百威, 啉虫脒, 涕灭威亚砷, 3-OH 克百威, 涕灭威砷, 吡虫啉, 辛硫磷, 哒螨灵, 苯醚甲环唑, 阿维菌素, 灭幼脲, 除虫脲, 氟虫腈 18 种标样(纯度 > 99%, 标准介质为甲醇, 浓度均为 1 000 mg/L)均购自农业部环境保护科研监测所。甲醇、乙腈、二氯甲烷(色谱纯, 美国 J. T. Baker 公司); 其他试剂均为分析纯; 实验用水为 Milli-Q 超纯水仪系统制得。

收稿日期: 2010-12-14

修回日期: 2011-01-30

* 通讯作者: 赵 静, 女, 硕士, 工程师, 从事农产品分析检测工作。

1.2 样品处理

1.2.1 制样和提取 将蔬菜样品切碎,按四分法取样,用食物料理机将其打碎后装入样品盒,在 -20°C 保存。测定前将样品盒取出放至常温,准确称取 20.0 g,加入 40 mL 乙腈,用高速分散机 9.2×10^3 r/min 匀浆 2 min。在已加入约 5 g 氯化钠的 100 mL 具塞量筒中过滤,震荡 1 min 后静置 30 min,取 10 mL 上层有机相溶液于 10 mL 离心管中,在 70°C 水浴下氮气吹至近干,待净化。

1.2.2 净化 选用氨基柱净化,先用 4 mL 甲醇/二氯甲烷(5/95,V/V)溶液活化小柱,再依次用 4、4、2 mL 的甲醇/二氯甲烷溶液分三次加入 1.2.1 节的样品离心管中,在漩涡仪上震荡后上样洗脱,同时用 10.0 mL 离心管收集洗脱液,于 50°C 水浴氮气下吹至近干,加入 3 mL 甲醇,在涡旋仪上涡旋 0.5 min,加水定容至 5 mL,混匀后过 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜,待测。

1.3 色谱条件

色谱条件:色谱柱:Thermo Hypersil Gold C18(100×2.1 mm i. d., $5\ \mu\text{m}$); 流动相:A 为甲醇,B 为 0.2% 乙酸铵:0~1 min,A 相由 10% 线性变化至 90%;1~8 min,A 相保持 90%;8~8.5 min,A 相 90% 线性变化至 10%;8.5~13 min,A 相保持 10%;柱温: 35°C ;进样量:10 μL ;流速:250 $\mu\text{L}/\text{min}$;运行时间:13 min。

质谱条件:加热电喷雾离子源(HESI);正负离子同时采集;扫描模式:SRM;干燥气:氮气;鞘气/辅助气:30/10 units;离子传输管温度: 270°C ;喷雾电压:3 000 V。

表 1 测定 18 种农药的质谱条件

Table 1 MS/MS conditions for the detection of 18 pesticides

Analyte	Precursor ion(m/z)	ESI	Product ion(m/z)	CE	Retain time	Analyte	Precursor ion(m/z)	ESI	Product ion(m/z)	CE	Retain time
Methomyl	163.0	+	106.0* 88.0	8 6	3.64	Aldicarb-sulfone	240.0	+	148.0* 86.0	15 21	3.55
Carbendazim	192.0	+	160.0* 132.1	18 30	3.61	Imidacloprid	256.1	+	209.0* 175.0	17 19	3.82
Pyrimethanic	200.2	+	80.3* 82.1	31 31	4.89	Phoxime	299.0	+	129.0* 153.0	11 5	5.45
Carbaryl	202.0	+	145.0* 127.0	14 29	4.45	Pyridaben	365.1	+	309.0* 147.0	12 25	7.46
Aldicarb	208.0	+	89.0* 116.0	18 5	4.24	Difenoconazole	406.0	+	250.9* 337.0	26 18	5.66
Carbofuran	222.0	+	123.0* 165.0	21 10	4.38	Avermectius	890.0	+	306.9* 567.1	22 13	7.64
Acetamiprid	223.0	+	125.9* 90.0	20 34	3.96	Chlorobenzuron	306.9	-	154.0* 126.3	15 28	5.32
Aldicarb-sulfoxide	224.0	+	132.0* 89.0	11 17	3.44	Diflubenzuron	308.9	-	289.1* 156.0	13 13	5.22
3-OH carbofuran	238.0	+	163.0* 107.0	16 29	3.93	Fipronil	435.0	-	330.0* 249.9	19 30	5.13

* quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 净化条件的优化

为了寻找好的净化方法以提高回收率,分别采用了氨基柱/洗涤体系为甲醇-二氯甲烷(95:5)、石墨碳黑氨基串联柱/洗涤体系为乙腈-甲苯(3:1)、佛罗里硅土柱/洗涤体系为丙酮-正己烷(10:90)进行试验。结果发现:石墨碳黑氨基串联柱和佛罗里硅土柱净化方法的回收率偏低,多数农药的回收率为 50%,说明它们对农药有较强的吸附作用,难以解吸;氨基柱净化方法的 18 种农药回收率均在 80% 以上,且分离效果较好,因此,选用氨基柱/洗涤体系为甲醇-二氯甲烷(95:5,V/V)作为净化条件。

2.2 空白基质的选择和标准工作溶液的配制

使用三重四级杆串联质谱 SRM 模式时,可以较好消除共流出物的干扰,提高离子的选择性,进而提高灵敏度。但由于基体干扰,在不同基质下响应信号有所不同。按照实验方法将处理好的样品分门别类的上机测定,先筛选出阴性样品作为空白基质溶液,然后吸取适量空白基质溶液配制标准工作溶液,对同一品种的其他样品定量。例如:用豆类,瓜类的空白基质和纯溶剂分别配制 1.0、10.0、20.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作溶液做工作曲线,从线性方程和相关系数中,可以发现同一农药在不同基质中响应信号值可以增强或抑制,辛硫磷在豆类、瓜类样品中均比在纯溶剂中响应信号高,多菌灵的响应信号却降低。用基质定量多菌灵的回收率为 100%、98%;辛硫磷为 90%、95%;但用纯溶剂定量多菌灵为 90%,辛硫磷为 91%。所以,定量时使用基质配制标准比纯溶剂更准确。

2.3 工作曲线和线性关系

以瓜类中冬瓜为例,准确配制 1.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液,在 1.3 的实验条件下测定。以农药的峰面积对质量浓度作图,绘制工作曲线,计算得到其线性方程和相关系数,结果见表 2。由表可知在 1.0~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内,各农药线性关系良好。

表 2 18 中农药的线性方程、相关系数和线性范围

Table 2 Linear equations, correlation coefficients(r) and linear ranges of the 18 pesticides

Compound	Linear equation	r	Linear range ($\mu\text{g/L}$)
Methomyl	$y=1.69 \times 10^4 + 6.59 \times 10^7 x$	0.9953	1.0~200.0
Carbendazim	$y=7.10 \times 10^5 + 2.82 \times 10^8 x$	0.9956	1.0~200.0
Pyrimethanic	$y=2.18 \times 10^5 + 1.12 \times 10^8 x$	0.9987	1.0~200.0
Carbaryl	$y=8.17 + 1.09 \times 10^8 x$	0.9992	1.0~200.0
Aldicarb	$y=-9.77 \times 10^4 + 1.53 \times 10^8 x$	0.9990	1.0~200.0
Carbofuran	$y=5.40 \times 10^5 + 5.05 \times 10^8 x$	0.9971	1.0~200.0
Acetamiprid	$y=2.70 \times 10^5 + 1.83 \times 10^8 x$	0.9969	1.0~200.0
Aldicarb-sulfoxide	$y=1.25 \times 10^6 + 1.88 \times 10^8 x$	0.9883	1.0~200.0
3-OH carbofuran	$y=1.64 \times 10^5 + 4.11 \times 10^7 x$	0.9951	1.0~200.0
Imidacloprid	$y=2.43 \times 10^5 + 6.38 \times 10^7 x$	0.9992	1.0~200.0
Phoxime	$y=7.99 \times 10^5 + 1.96 \times 10^8 x$	0.9979	1.0~200.0
Pyridaben	$y=2.92 \times 10^6 + 9.68 \times 10^8 x$	0.9972	1.0~200.0
Difenoconazole	$y=8.40 \times 10^4 + 1.60 \times 10^8 x$	0.9987	1.0~200.0
Avermectius	$y=3.31 \times 10^5 + 5.21 \times 10^8 x$	0.9958	1.0~200.0
Chlorobenzuron	$y=5.81 \times 10^4 + 1.03 \times 10^7 x$	0.9954	1.0~200.0
Diflubenzuron	$y=5.22 \times 10^4 + 6.51 \times 10^6 x$	0.9967	1.0~200.0
Fipronil	$y=2.06 \times 10^6 + 1.96 \times 10^8 x$	0.9983	1.0~200.0
Aldicarb-sulfone	$y=1.20 \times 10^5 + 1.30 \times 10^8 x$	0.9991	1.0~200.0

2.4 方法回收率和精密度

以瓜类蔬菜为例,任意选取一个冬瓜的阴性样品进行加入回收率试验。分别移取适量混合标准溶液于 20.0 g 样品中,制成农药分别为 0.02、0.05、0.10 mg/kg 三个添加水平的加标样品,按照实验方法进行处理和测定,每个水平重复 6 次。计算平均回收率、日内和日间精密度以及检出限(LOD)和定量限(LOQ),如表 3。三个添加浓度的加标回收率分别是:70%~120%,74%~118%,71%~102%,日内相对标准偏差(Intra-day RSD) $\leq 10.9\%$,日间相对标准偏差(Inter-day RSD) $\leq 14.5\%$,18 种农药的检出限 LOD(S/N=3)为 0.001~0.23 $\mu\text{g/kg}$,定量限 LOQ(S/N=10)为 0.003~0.7 $\mu\text{g/kg}$,均满足农药残留的检测要求。

2.5 不同品种蔬菜基质对测定结果的影响

由于蔬菜品种不同,所含色素,脂肪差别较大,为了实验结果的可靠性,在不同品种的样品中分别选择一个未检出农药的样品,制成农药为 0.1 mg/kg 的加标样品,然后按照 1.2 和 1.3 节中方法进行样品处理和测定。六种蔬菜:花菜,白菜,四季豆,空心菜,番茄,韭菜的回收率分别为:87%~120%,72%~

120%, 84%~119%, 74%~118%, 88%~116%, 71%~120%。

表 3 18 种农药的添加回收率、精密度和检出限($n=6$)

Table 3 Recoveries, intra-day and inter-day precisions, limits of detection (LOD, $S/N=3$), and limits of quantification (LOQ, $S/N=10$) of the 18 pesticides ($n=6$)

Compound	Added (mg/kg)			Recovery (%)			Intra-day RSD (%)			Inter-day RSD (%)			LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
Methomyl	0.02	0.05	0.1	70	90	71	4.8	3.8	1.9	5.2	4.0	2.3	0.001	0.003
Carbendazim	0.02	0.05	0.1	100	80	91	1.6	3.2	5.3	2.3	3.9	7.0	0.03	0.09
Pyrimethanic	0.02	0.05	0.1	90	102	84	5.7	4.5	2.1	5.5	5.6	5.0	0.023	0.07
Carbaryl	0.02	0.05	0.1	85	100	84	8.3	9.9	5.7	9.6	10.7	6.9	0.133	0.40
Aldicarb	0.02	0.05	0.1	70	86	74	4.5	6.8	5.8	6.3	6.0	5.5	0.001	0.002
Carbofuran	0.02	0.05	0.1	85	92	88	6.9	3.6	6.4	7.0	6.5	4.2	0.067	0.2
Acetamiprid	0.02	0.05	0.1	105	100	88	2.9	7.1	3.2	2.5	7.0	3.9	0.007	0.02
Aldicarb-sulfoxide	0.02	0.05	0.1	75	74	75	4.1	3.9	2.8	5.2	4.1	3.0	0.167	0.5
3-OH carbofuran	0.02	0.05	0.1	75	80	91	2.0	4.2	5.9	2.5	5.0	5.5	0.001	0.003
Aldicarb-sulfone	0.02	0.05	0.1	90	82	91	5.6	1.5	7.2	5.9	2.1	7.8	0.001	0.004
Imidacloprid	0.02	0.05	0.1	105	108	89	2.8	3.2	2.9	3.0	4.1	3.6	0.03	0.09
Phoxime	0.02	0.05	0.1	90	74	79	3.9	4.0	6.0	3.5	4.2	5.0	0.001	0.004
Pyridaben	0.02	0.05	0.1	90	112	10	5.1	5.6	1.1	5.5	6.0	2.3	0.001	0.004
Difenoconazole	0.02	0.05	0.1	85	92	91	4.6	3.9	2.7	6.6	5.2	4.8	0.003	0.009
Avermectius	0.02	0.05	0.1	65	100	79	8.0	7.8	6.6	9.8	9.1	7.8	0.233	0.7
Chlorobenzuron	0.02	0.05	0.1	85	112	84	6.7	8.2	4.0	8.3	7.5	6.4	0.003	0.01
Ddiflubenzuron	0.02	0.05	0.1	90	92	95	7.3	4.5	9.1	8.5	6.3	11	0.017	0.05
Fipronil	0.02	0.05	0.1	120	118	102	1.6	10.9	2.7	3.5	14.5	4.1	0.002	0.007

2.6 样品测定

采用本文建立的测定方法,对从市场和种植基地采集到的 200 个蔬菜样品中 18 种农药残留进行测定。检测结果表明,叶类,白菜类和豆类蔬菜样品中多菌灵,啉虫脒,啞螨灵,吡虫啉均有不同程度的检出,其最高含量分别为 0.081 mg/kg, 0.076 mg/kg, 0.027 mg/kg, 0.106 mg/kg, 均低于限量标准,其它农药均未检出,标样和样品的色谱图如图 1。

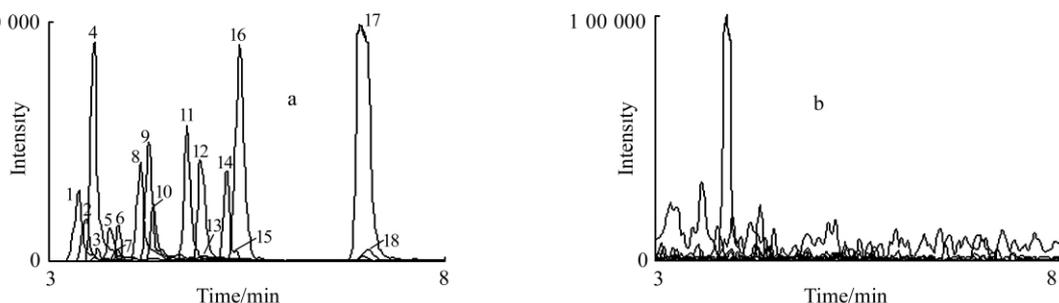


图 1 18 种农药标准样品(a)和空白样品(b)的选择反应监测(SRM)色谱叠加图

Fig. 1 Select reaction monitoring chromatogram(SRM) overlay of 18 pesticides and blank sample

1. Aldicarb-sulfoxide; 2. Aldicarb-sulfone; 3. Carbendazim; 4. Methomyl; 5. Imidacloprid; 6. 3-OH-carbofuran; 7. Acetamipria; 8. Aldicarb; 9. Carbofuran; 10. Carbaryl; 11. Pyrimethanic; 12. Fipronil; 13. Diflubenzuron; 14. Chlorobenzaron; 15. Phoxime; 16. Dife noconazol; 17. Pyridaben; 18. Avermectius.

3 结论

本文建立了乙腈提取,氨基柱净化,高效液相色谱-电喷雾串联三重四级杆质谱法快速检测蔬菜样品中 18 种农药残留的方法。该方法具有样品处理简单,线性范围宽,重现性好,快速准确等特点,当称样量减少到 10.0 g 后,实验结果无明显差异。此方法与以往方法相比,实验中避免使用衍生剂,降低了检测成本,提高了工作效率,具有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] NY/T761-2008. Pesticide Multiresidue Screen Methods for Determination of Organophosphorus Pesticides, Organochlorine Pesticides, Pyrethroid Pesticides and Carbamate Pesticides In Vegetables And Fruits(蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定)[S].
- [2] Xiao Q, Hu B, Yu C H, et al. Talanta[J], 2006, **69**:848.
- [3] Zhao E C, Han L J, Jiang S R, et al. J. Chromatogr. A[J], 2006, **1114**:269.
- [4] YE Jiang-lei(叶江雷), CHEN Luan(陈 奎), GONG Zhen-bin(弓振斌). Food Science(食品科学)[J], 2007, (11): 428.
- [5] CAI Lu-sha(蔡璐莎), HU Qi(胡 奇), RUI San-ya(芮三亚). Food Science(食品科学)[J], 2006, **27**(11):449.
- [6] ZHU Li-ping(朱莉萍), ZHU Tao(朱 涛), PAN Yu-xiang(潘玉香). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志)[J], 2008, **18**(2):242.
- [7] LIU Chang-wu(刘长武), LIU Xiao-wei(刘潇威), ZHAI Guang-shu(翟广书). Chinese Journal of Chromatography(色谱)[J], 2003, **21**(3):255.
- [8] CHEN Li(陈 黎), WANG Jin-fang(王金芳), DU Peng(杜 鹏). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)[J], 2008, **36**(10):1364.
- [9] TIAN Miao(田 苗), SONG Huan(宋 欢), XUE Yuan-yuan(薛园园). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J], 2010, **26**(3):284.
- [10] Hernandez F, Pozo O J, Sancho J V, et al. J. Chromatogr. A[J], 2006, **1109**:242.
- [11] LIU Jun(刘 军), SHEN Jing(沈 菁), LIU Jian(刘 建). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J], 2010, **26**(1):55.
- [12] Lee J M, Park J W, Jang G C, et al. J. Chromatogr. A[J], 2008, **1187**:25.
- [13] Aguado S C, Morito N S, Arrebola F J, et al. Food Chem. [J], 2009, **107**:1314.

Determination of 18 Pesticides in Vegetables Using High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

ZHAO Jing*, GAO Jin, WU Yu-kuan, TANG Che, YANG Yan,
YU Jing, YAN Gui-fang
(Hubei Inspection Center for Agri-food Quality & Safety, Wuhan 430070)

Abstract: A method for the determination of pesticides in vegetables by high performance liquid chromatography–heated electrospray ionization tandem mass spectrometry was developed. After extracted by acetonitrile and cleaned up by solid phase extraction, the samples were detected in SRM mode and quantified. The results indicated that the developed method is easier, faster and more sensitive. The linear range, recovery, precision and limits of detection can meet the requirement of residue analysis.

Keywords: High performance liquid chromatography; Heated electrospray ionization tandem mass spectrometry; Pesticide residue