

固相萃取-高效液相色谱-串联质谱联用测定 竹笋中残留的7种杀虫剂农药

丁明^{1,2*}, 钟冬莲¹, 汤富彬¹, 方伟²

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江农林大学, 浙江 临安 311300)

摘要: 建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)同时测定竹笋中丁烯氟虫腈、毒死蜱、氯虫苯甲酰胺、氟虫腈、吡虫啉、茚虫威和辛硫磷7种农药残留的分析方法。样品用乙腈提取后,经PSA固相萃取小柱净化,采用Atlantis T3色谱柱分离,以0.1%甲酸水溶液(含5 mmol/L乙酸铵)和乙腈为流动相,梯度洗脱分离,在电喷雾离子源正、负离子模式下采用质谱多反应监测(MRM)模式检测。结果表明,7种农药在10~100 μg/L范围内具有良好的线性关系(相关系数 r 为0.990~0.9994);4、8、32 μg/kg添加水平下的平均回收率为76.0%~102.6%;相对标准偏差为3.2%~11.0%;7种农药的检出限为0.02~0.5 μg/kg,定量限为0.08~1.5 μg/kg。该方法准确度、灵敏度高,简单、快速,可满足竹笋中7种杀虫剂残留同时检测的要求。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 农药残留; 竹笋

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)02-0117-05

Determination of seven pesticide residues in bamboo shoots by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase extraction

DING Ming^{1,2*}, ZHONG Donglian¹, TANG Fubin¹, FANG Wei²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China;

2. Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China)

Abstract: A simple and efficient method based on solid-phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed for the determination of butylene fipronil, chlorpyrifos, chlorantraniliprole, fipronil, imidacloprid, indoxacarb and phoxim residues in bamboo shoots. The sample was extracted with acetonitrile and purified by a primary secondary amine (PSA) solid-phase extraction cartridge. The detection of targets was performed by HPLC-MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) mode. All the seven pesticides were completely separated in 15 min with an excellent linear relationship. The limits of detection and the limits of quantification for the seven pesticides were 0.02–0.5 μg/kg and 0.08–1.5 μg/kg, respectively. The recoveries of the seven pesticides spiked in a bamboo shoot sample at the levels of 4, 8, 32 μg/kg were in the range from 76.0% to 102.6% (the RSD ≤ 11.0%, $n = 3$). The method was successfully applied to the real bamboo shoot samples. The method has high accuracy and sensitivity, and is simple and quick. It can meet the requirement of the simultaneous determination of the seven pesticides in bamboo shoots.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); pesticide residues; bamboo shoots

我国竹类资源丰富,栽培面积大。竹笋是丰富生活的美味佳肴,也是地方经济的主要收入来源之一。然而,在竹笋的生产中,常常遭受地下虫害危害,影响竹笋食品产量和品质^[1]。当前,由于竹林

经营方式的改变及呋喃丹等高毒高残留防治药剂的禁用,使得毒死蜱等高效低毒的杀虫剂逐渐被广泛使用^[2,3]。这类高效低毒的化学农药的使用控制了病虫害的发生,提高了生产力,然而它们可通过食物

* 通讯联系人. Tel: (0571) 63122616, E-mail: dm2616@163.com.

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项经费(201204414)。

收稿日期: 2012-10-11

链进入人体,威胁人类的健康^[4]。因此,日本和欧盟作为竹笋的主要进口国,均制订了竹笋中农药的最大残留限量(MRL),如欧盟规定竹笋中毒死蜱和氟虫腈的 MRL 值分别为 0.05 和 0.005 mg/kg,日本规定竹笋中毒死蜱、氟虫腈和辛硫磷的 MRL 值分别为 0.03、0.002 和 0.004 mg/kg。然而,现有竹笋中的农药残留检测均集中于有机磷和有机氯等常见的或已被禁用长时间的农药,一些新型的杀虫剂如氟虫腈、丁烯氟虫腈等却鲜有报道。随着竹笋产量和出口量的增加,这些新型农药的残留检测也日益受到关注。

由于农药残留限量要求日益严格,其检测技术的发展也随之受到重视,建立高灵敏度的多残留分析方法包括前处理技术(如干扰物质、基质效应的消除和浓缩等)已十分迫切。目前,关于竹笋中农药残留分析方法的报道较少,且主要以气相色谱(GC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)和液相色谱-紫外检测(LC-UV)为检测手段^[5-9]。GC 和 GC-MS 方法常常受到化合物极性及其处理的相对复杂和耗时等限制。LC-UV 方法存在检出限高的缺陷,尤其在低含量农药检测时,易造成假阳性。

近年来,农药残留检测技术快速发展,高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)已成为食品和农产品中农药多残留检测的重要手段^[10-14]。本文依据目前我国竹笋中地下害虫杀虫剂的使用情况,建立了竹笋中 7 种常见地下害虫杀虫剂残留的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱联用(SPE-HPLC-MS/MS)检测技术,对提取和净化方法进行了优化和评估,并应用于实际样品的分析检测。该方法操作简便,灵敏度高,可同时定性和定量检测竹笋中多种农药残留,对于竹笋食品安全的监测有重要的意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Quattro Premier XE 三重四极杆液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司); Milli-Q Gradient 超纯水系统(美国密理博公司); KQ3200 超声波清洗器(江苏昆山超声仪器公司); T25 Digital 高速均质机(德国 IKA 公司); MTN-2800W 氮吹仪(天津奥特赛恩斯公司); 固相萃取装置(美国安捷伦公司); PSA 固相萃取小柱(美国 CNW 公司)。乙腈(农残级,美国天地公司)、甲酸(美国化学协会(ACS)级)、乙酸铵(ACS 级)、高纯水等; 丁烯氟虫腈标准品(大连瑞泽农药股份有限公司); 氟虫腈、茚虫威、氯虫苯甲酰胺、吡虫啉、辛硫磷和毒死蜱标准品(中

国标准物质中心)。

1.2 材料

毛竹笋和雷竹笋(中国林科院亚热带林业研究所); 麻竹笋(福建漳州华安林业局科技中心)。

1.3 实验方法

1.3.1 试样处理

取新鲜笋可食部分样品,切碎后用组织捣碎机绞碎成糊状;称取 25 g(准确至 0.01 g)样品置于 100 mL 具塞离心管中,准确加入乙腈 40 mL、无水硫酸钠 5 g,于高速均质机中均质 120 s;经中速定性滤纸过滤至 50 mL 具塞离心管中,用 10 mL 乙腈冲洗滤渣,合并滤液至盛有 6 g NaCl 的 50 mL 具塞离心管中,剧烈振荡 1 min,静置 5 min 待水相与乙腈相分层;取乙腈相在 40 °C 水浴中旋转蒸至近干,用氮气吹干。用 4 mL 乙腈充分溶解残余物,上样于 PSA 固相萃取柱(预先用 5 mL 乙腈平衡)净化,收集流出液,氮气吹干;用乙腈溶解、定容至 1.0 mL 后,用 0.22 μm 滤膜过滤到进样瓶中,供 LC-MS/MS 分析。

1.3.2 分析条件

HPLC 条件 色谱柱: Waters Atlantis T3 柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵) 流动相 B: 乙腈。梯度洗脱程序: 0 ~ 5 min, 20% B ~ 90% B; 5 ~ 7 min, 90% B; 7 ~ 13 min, 90% B ~ 20% B; 13 ~ 15 min, 20% B。流速: 0.3 mL/min。

质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子扫描多反应监测(MRM)模式,离子源温度为 110 °C;毛细管电压为 3.80 kV;脱溶剂气温度为 350 °C;干燥气流速为 12 mL/min;雾化器压力为 0.345 MPa。

采用流动注射的方式将目标物标准溶液直接注入质谱仪,在 m/z 100 ~ 500 进行全扫描,得到一级质谱图和准分子离子峰 $[M - H]^-$ (母离子);参考欧盟指令(2002/657/EC)^[15],以准分子离子为母离子进行二级质谱扫描,选择丰度较高的两个碎片离子作为定量和定性离子,组成监测离子对;碰撞气流速为 0.15 mL/min。

1.3.3 测定方法

在负离子模式条件下,分别将加入内标物质的样品溶液和基质匹配标准溶液注入液相色谱-串联质谱仪进行测定,以其基质匹配标准溶液峰的保留时间和 2 对质谱监测离子对为依据进行定性,以定量离子对的峰面积计算样品中待测物的含量。各组分的质量参数见表 1。

表 1 7 种农药和内标物的质谱参数

Table 1 MS/MS parameters of the seven pesticides and internal standard

No.	Pesticide	Qualitative precursor/ product ions (m/z)	Collision voltages/V	Cone voltage/V	ESI mode
IS	chlorpyrifos-methyl	322.0/125.0 [*] ; 322.0/290.0	15; 15	25	+
1	butylene fipronil	488.9/249.9 [*] ; 488.9/288.0	40; 39	30	-
2	chlorpyrifos	349.5/96.5 [*] ; 349.5/197.8	27; 20	23	+
3	chlorantraniliprole	483.6/286.0 [*] ; 483.6/453.0	18; 15	16	+
4	fipronil	435.0/250.0 [*] ; 435.0/330.0	26; 15	30	-
5	imidacloprid	255.9/175.0 [*] ; 255.9/209.0	16; 17	26	+
6	indoxacarb	528.2/249.1 [*] ; 528.2/293.1	16; 13	30	+
7	phoxim	298.9/76.8 [*] ; 298.9/129.0	29; 11	22	+

* Quantitative precursor/product ion.

1.3.4 目标化合物的确证

根据欧盟指令(2002/657/EC)规定的在应用质谱仪对目标化合物进行确证时的评价准则(即低分辨率质谱需满足4分),本实验选取一个母离子(1分)和两个子离子(各1.5分)以确证各化合物。在本实验条件下7种农药的检测结果能够达到这个要求,符合对目标化合物的确证准则。样品溶液和标准溶液均按优化后的色谱和质谱条件进行测定,根据色谱峰的保留时间和所选择的对应的两对离子对的丰度比来确定样品中目标化合物的存在与否。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择与优化

根据待测物的化学结构,氟虫腈和丁烯氟虫腈为苯基吡唑类化合物,适合在ESI源的负离子模式下离子化,产生的母离子为 $[M-H]^-$,其余化合物因含有羰基等多电子基团而适合在ESI源的正离子模式下形成 $[M+H]^+$ 母离子。依据电喷雾电离的机理,以利于化合物去质子化的乙腈为有机相,同时在流动相中加入适量的乙酸铵,可改善该类化合物在负离子模式下的离子化效率。实验结果表明,加入5 mmol/L乙酸铵能有效地提高目标化合物的响应值。图1为7种农药的典型谱图。

2.2 样品前处理条件的比较和优化

本文所检测的7种化合物多属于弱极性或中等极性,常用的提取溶剂涉及甲醇、乙腈、乙酸乙酯等。本文分别采用甲醇、丙酮、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷和丙酮-正己烷(1:1, v/v)等溶剂对竹笋中7种农药残留提取效果进行比较,结果如图2所示,丙酮与乙腈的提取回收率较之其他溶剂相对较高,但丙酮提取的杂质较乙腈多,且有大量水难以除去,从而导致其重复性较差。综合考虑,本实验采用乙腈作为提取溶剂。

比较了PSA、佛罗里硅土、氨基、PestCarb和C18固相萃取小柱对竹笋提取液的净化效果。通过添加

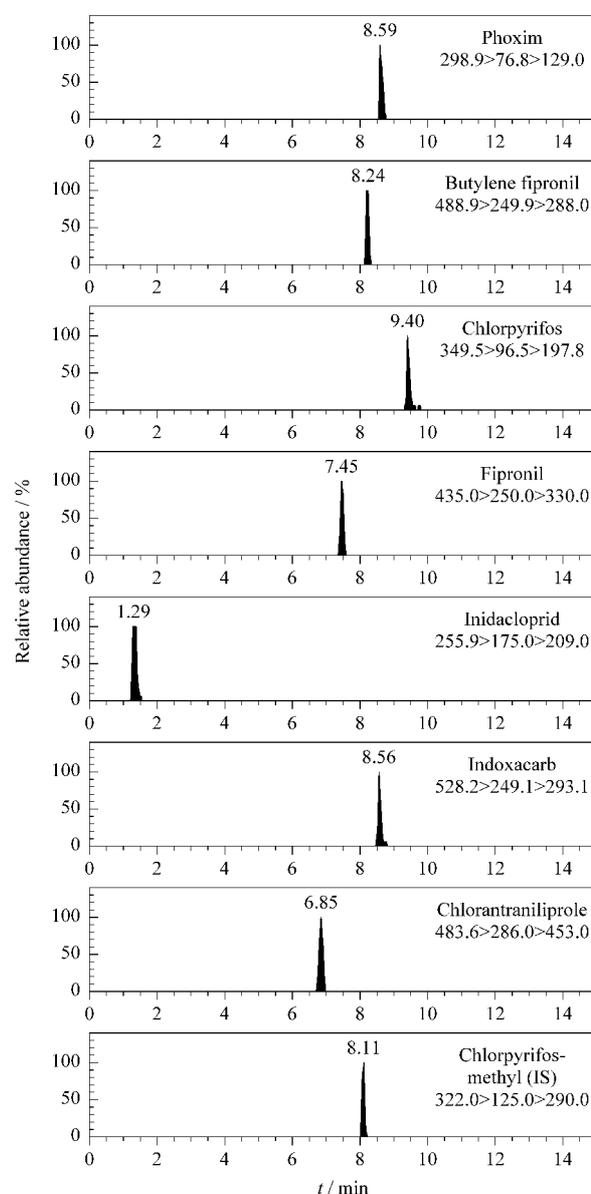
图 1 7 种农药混合标准溶液(20 $\mu\text{g/L}$)和内标的 MRM 谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of a mixed solution of the seven pesticide standards (20 $\mu\text{g/L}$) and internal standard (IS)

回收率比较净化效果,结果如图3所示。C18和PestCarb固相萃取小柱去除杂质的效果最佳,但农

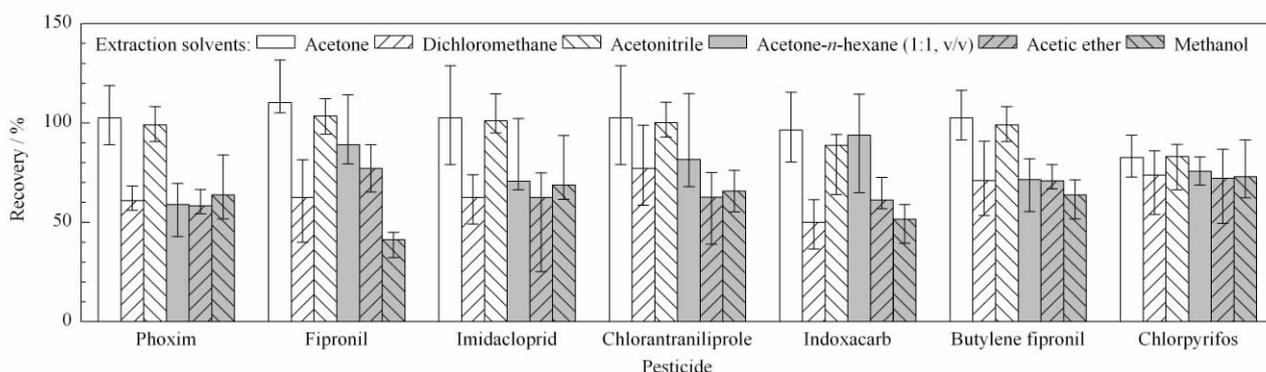


图 2 不同提取溶剂对 7 种农药提取效果的比较

Fig. 2 Comparison of the extraction effects of different extraction solvents for the seven pesticides

药的损失也较大; 由于竹笋中色素等杂质含量较少, PSA 固相萃取小柱、佛罗里硅土固相萃取小柱

和氨基固相萃取小柱因相对吸附能力较小, 回收率与不过柱的样品相当(回收率均大于 85%)。通过比较过柱后样品的总离子流图, 发现经过 PSA 处理后的样品, 其谱图基线平稳, 目标物色谱峰的平均信噪比(S/N) 高于其他小柱处理的样品。因此本实验采用 PSA 固相萃取小柱净化提取液。

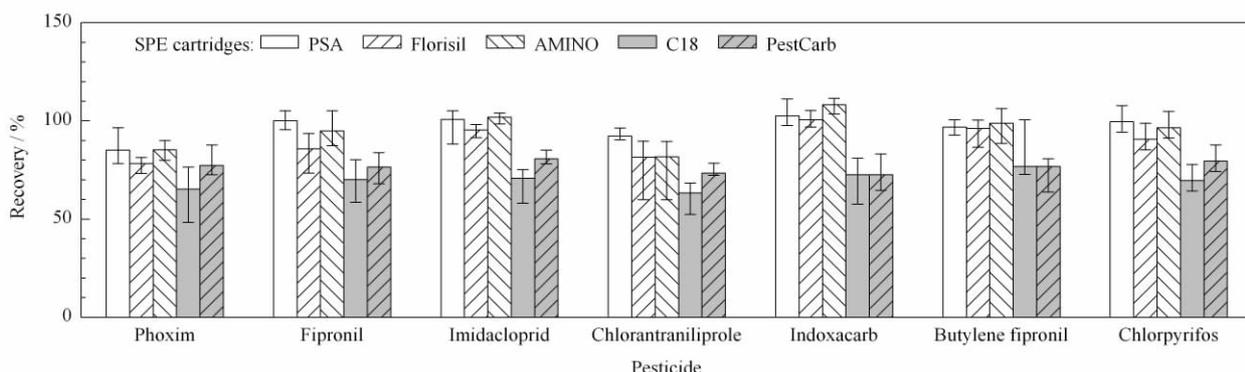


图 3 不同固相萃取柱对 7 种农药净化效果的比较

Fig. 3 Comparison of the clean-up effects of different SPE cartridges for the seven pesticides

2.3 基质效应的消除

尽管样品在经过乙腈提取和固相萃取后得到了良好的净化, 但仍无法完全消除其基质效应。基质效应主要是由于基质成分和目标化合物在电喷雾离子源进行离子化时相互竞争的结果, 包括基质增强效应和基质抑制效应。在液相色谱-质谱定性、定量分析中, 基质效应影响仪器的灵敏度和重复性, 是影响可靠性及准确定量的重要因素。因而在建立 HPLC-MS/MS 检测方法时应考虑基质效应的影响并采取措施进行消除, 以保证结果的准确可靠。试验结果表明, 竹笋基质对 7 种化合物均有不同程度的基质干扰。为了消除基质效应, 除了改进样品的净化手段外, 最佳方法是使用同位素内标(理化性质与目标物几乎一致), 但同位素内标较难获得且价格不菲; 其次是采用离子化能量相近的同系物作

为内标, 但对于多种非同系物农药同时测定时, 也较难找到如此理想的内标物。本方法采用配制基质匹配单一内标标准溶液的方法, 较好地消除了基质影响, 结果完全能满足残留检测的要求。

2.4 工作曲线和检出限

准确吸取 7 种化合物混合标准储备液适量, 用空白竹笋基质溶液稀释配制质量浓度分别为 0.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0 和 100.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液(含 20 $\mu\text{g/L}$ 内标溶液)。按浓度由低到高的顺序进样, 在选定的色谱条件和质谱条件下测定, 建立基质匹配内标校准曲线, 进行线性回归计算。内标法可以校正前处理、检测中目标物的损失与干扰^[16]。以基质匹配标准工作溶液中目标农药的质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$) 为横坐标, 目标农药与内标物的定量离子对峰面积比(Y) 为纵坐标绘制标准曲

线得到的线性方程结果见表 2。7 种农药在 10.0 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 范围内的线性关系良好, 相关系数 $r > 0.9900$ 。以 3 倍信噪比 ($S/N = 3$) 和 $S/N = 10$ 对应

的目标农药浓度分别为方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 得到的 LOD 为 0.02 ~ 0.5 $\mu\text{g/kg}$, LOQ 为 0.08 ~ 1.5 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 2 7 种农药的基质匹配标准曲线、相关系数、检出限 (LOD, $S/N = 3$) 及定量限 (LOQ, $S/N = 10$)

Table 2 Regression equations, correlation coefficients (r), limits of detection (LOD, $S/N = 3$) and limits of quantification (LOQ, $S/N = 10$) of the seven pesticides

Compound	Linear range/($\mu\text{g/L}$)	Regression equation	r	LOD/($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/($\mu\text{g/kg}$)
Butylene fipronil	10 - 100	$y = 39.04x + 40.07$	0.9950	0.1	0.3
Chlorpyrifos	10 - 100	$y = 19.02x + 6.500$	0.9949	0.5	0.7
Chlorantraniliprole	10 - 100	$y = 166.5x - 22.83$	0.9994	0.1	1.5
Fipronil	10 - 100	$y = 439.9x - 142.0$	0.9983	0.02	0.3
Imidacloprid	10 - 100	$y = 240.2x - 50.18$	0.9988	0.3	0.3
Indoxacarb	10 - 100	$y = 184.8x + 378.1$	0.9967	0.2	1.0
Phoxim	10 - 100	$y = 53.70x + 16.95$	0.9900	0.05	0.08

y : peak area ratio of the quantitative precursor/product ion of the analyte and the internal standard; x : mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

2.5 精密度和准确度

以不含目标分析物的样品进行精密度和加标回收率试验。为考察该方法的准确性, 将每种样品取 3 份, 分别添加不同体积的标准溶液, 按照 1.3.1 节进行样品前处理, 在 1.3.2 节的色谱条件和质谱条件下测定, 计算样品加标回收率。结果如表 3 所示。该方法相对标准偏差 (RSD) 均在 3.5% ~ 11.0%, 样品的回收率均在 76.0% ~ 102.6%, 数据表明该方法的精密度和回收率都比较好, 均符合残留检测有关标准和法规的要求。

表 3 空白竹笋样品中 7 种化合物的添加回收率和精密度 ($n = 6$)

Table 3 Recoveries and precisions of the seven pesticides spiked in a blank bamboo shoot sample ($n = 6$)

Pesticide	Spiked/($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/%	RSD/%
Butylene fipronil	4	81.5	8.0
	8	96.5	4.9
	32	95.6	4.9
Chlorpyrifos	4	80.0	7.9
	8	82.5	7.2
	32	86.3	7.5
Chlorantraniliprole	4	80.0	5.9
	8	87.5	5.2
	32	91.3	3.5
Fipronil	4	81.0	6.9
	8	86.0	5.0
	32	93.3	5.5
Imidacloprid	4	76.0	11.0
	8	80.0	9.7
	32	84.3	9.5
Indoxacarb	4	79.0	9.9
	8	81.5	3.2
	32	94.3	4.5
Phoxim	4	76.0	9.4
	8	87.8	7.5
	32	102.6	5.5

2.6 样品分析

为验证方法的可靠性, 对市场采购的雷竹笋、毛竹笋和麻竹笋进行了测定, 结果均未检出 7 种杀虫剂。

3 结语

本实验建立了高效液相色谱-串联质谱法快速检测竹笋中 7 种杀虫剂残留的方法。采用乙腈提取, 在质谱的正、负离子模式下 15 min 内完成分离检测, 7 种杀虫剂的检出限为 0.02 ~ 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法灵敏度高、准确性好, 而且简单、快速, 能在短时间内检测大量样品, 具有较高的实用价值。

参考文献:

- [1] Xu T S, Wang H J. Main Pests of Bamboo in China. Beijing: China Forestry Publishing House (徐天森, 王浩杰. 中国竹子主要害虫. 北京: 中国林业出版社), 2004: 26
- [2] Song J H, Chen K. Forest Pest and Disease (宋军华, 陈昆. 中国森林病虫害), 2010 (Suppl): 36
- [3] Yang Y J, Zhang Z J, Gao L M, et al. Agrochemicals (杨瑶君, 张知锦, 高立明, 等. 农药), 2008, 47(11): 826
- [4] Guo Z W, Chen S L, Xiao J H. Environment Chemistry (郭子武, 陈双林, 萧江华. 环境化学), 2008, 27(1): 87
- [5] Xu X F, Liu Y K, Cai S Y, et al. Journal of Bamboo Research (徐晓芳, 刘颖坤, 蔡莎艺, 等. 竹子研究汇刊), 2011, 30(4): 40
- [6] He J M. Journal of Yibin University (何建梅. 宜宾学院学报), 2009, 9(12): 83
- [7] Yang Y J, Gao L M, Wang S F, et al. Chinese Journal of Pesticide Science (杨瑶君, 高立明, 汪淑芳, 等. 农药学报), 2008, 10(4): 495
- [8] Wang J, Yue Y D, Tang F, et al. Journal of Instrumental Analysis (王进, 岳永德, 汤锋, 等. 分析测试学报), 2011, 30(2): 161
- [9] GB/T 23204-2008
- [10] GB/T 23205-2008
- [11] Rodrigues A M, Ferreira V, Cardoso V V, et al. J Chromatogr A, 2007, 1150: 267
- [12] Tian H. Chemosphere, 2011, 83: 349
- [13] Xie W, Han C, Qian Y, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 4426
- [14] Walorczyk S, Drozdzyński D, Gnusowski B. Talanta, 2011, 85: 1856
- [15] European Commission Decision 2002/657/EC
- [16] Yang Z, Li X Q, Wang J, et al. Chinese Journal of Chromatography (杨总, 李秀琴, 王娟, 等. 色谱), 2011, 29(9): 927