

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定蔬菜中 7 种氨基甲酸酯类农药残留

邓立刚, 李增梅, 郭长英, 赵善仓, 王玉涛, 毛江胜

(农业部食品质量监督检验测试中心(济南), 山东省食品质量与安全检测技术重点实验室, 山东 济南 250100)

摘 要: 建立蔬菜中氨基甲酸酯类农药残留的超高效液相色谱-串联质谱联用的确证方法。样品经乙腈提取后, 氨基柱净化, 采用 UPLC-MS/MS 正离子模式下选择多反应监测(MRM)扫描测定。7 种氨基甲酸酯类农药在 5 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.9977 ~ 0.9999。在 0.01 ~ 0.10 mg/kg 添加范围内, 回收率范围在 72.1% ~ 110.2% 之间, 相对标准偏差为 1.7% ~ 9.4%, 方法的最低检出限为 0.5 ~ 8.0 $\mu\text{g/kg}$ ($R_{\text{SN}}=10$)。该方法操作简单、灵敏、准确度高, 完全可满足蔬菜中多种氨基甲酸酯类农药残留量的测定及确证工作的需要。

关键词: 氨基甲酸酯; 超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS/MS); 蔬菜; 农药

Determination of Carbamate Residues in Vegetables by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

DENG Li-gang, LI Zeng-mei, GUO Chang-ying, ZHAO Shan-cang, WANG Yu-tao, MAO Jiang-sheng

(Center of Food Quality Inspection and Testing, Ministry of Agriculture, Shandong Key Laboratory of Testing Technique for Food Quality and Safety, Jinan 250100, China)

Abstract: A simultaneous determination method for 7 kinds of carbamate residues in vegetables was developed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The samples was extracted with acetonitrile and cleaned-up by NH_2 solid phase extraction (SPE) cartridges. The analytes were quantified by UPLC-MS/MS in a positive ion multiple reaction mode (MRM). An excellent linear relationship for 7 carbamate residues was observed in the concentration range of 5 - 200 $\mu\text{g/L}$ with the regression coefficients of 0.9977 - 0.9999. The average recovery rate of 7 carbamate residues in vegetables at the spiked level of 0.01 - 0.10 mg/kg was in the range of 72.1% - 110.2% with relative standard deviation of 1.7% - 9.4%. This developed method revealed a detection limit range of 0.5 - 8.0 $\mu\text{g/kg}$ ($R_{\text{SN}} = 10$). Therefore, this developed method is characteristics of simple operation, high sensitivity and precision, which can meet the requirements for simultaneous determination of carbamate pesticide residues in vegetables for inspection and confirmation.

Key words: carbamate; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); vegetables; pesticide

中图分类号: TQ450.2; TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)06-0221-04

氨基甲酸酯类农药(carbamate pesticides)是以甲酸酯为前体化合物开发的一类广谱杀虫剂, 具有易分解、残留期短、高效、选择性强等特点^[1-2]。作为高毒有机氯农药的替代品, 氨基甲酸酯类农药被世界广泛应用, 它是通过抑制乙酰胆碱酯酶的活性而引起神经递质乙酰胆碱的积累, 造成神经功能的紊乱, 其在蔬菜上的过量残留或长期暴露在环境中会对人们的身体健康造成一定的危害^[3-4]。国际上对氨基甲酸酯在蔬菜上的残留限量

(MRL)制定较为严格的限量要求。

对于氨基甲酸酯的残留检测方法已有许多报道, 主要是气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-荧光法(HPLC-FLD)、液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)等^[5-16], 但氨基甲酸酯极性较强、热稳定性较差, 采用 GC 分析较困难, 目前应用最为广泛的检测方法是 HPLC-FLD 方法, 该方法灵敏度高, 选择性强, 但是在实测样品中, 由于基质不同, 个别蔬菜种类有

收稿日期: 2010-05-20

基金项目: 山东省科技攻关项目(2009GG20001021)

作者简介: 邓立刚(1978—), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为农产品质量安全检测。E-mail: deng_ligang@163.com

较强干扰,无法做出进一步的确证。本实验探讨蔬菜中涕灭威亚砷、涕灭威砷、灭多威、3-羟基克百威、涕灭威、克百威和甲萘威7种农药的残留分析,以期对蔬菜中多种氨基甲酸酯类农药的分析确证工作提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白菜、黄瓜、芹菜 市售。

甲醇、乙腈(色谱纯) 美国 Merck 公司;二氯甲烷(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;醋酸铵(优级纯) 德国 Sigma 公司;氨基甲酸酯类标准品储备液(1000 $\mu\text{g/mL}$) 农业部环境质量监督检验测试中心。

1.2 仪器与设备

ACQUITY Ultra Performance LC 超高效液相色谱系统、Micromass Quattro Ultima TMPT 质谱仪(配有电喷雾离子源(ESI)及 Masslynx 4.0 数据工作站) 美国 Waters 公司;WERLE T25BS2 型高速分散匀浆机 德国 IKA 公司;Laborata 4000 型旋转蒸发器 德国 Heidolph 公司;JNC N-EVAPTM112型氮吹仪 美国 Organomation 公司;AccuBOND Amino 500mg/6mL Cartridge 固相萃取小柱。

1.3 样品前处理

称取试样 25.0g(精确至 0.1g)样品于广口瓶中,准确加入 100mL 乙腈,高速匀浆 1min,过滤至盛有 5g 氯化钠的具塞量筒中,剧烈振荡,静置 20 min 至分层,准确吸取乙腈相 20mL 于圆底烧瓶中,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发至近干,加入 2.0mL 二氯甲烷-甲醇溶液(98:2, V/V)溶解,待净化。

1.4 样品净化

将 10mL 二氯甲烷-甲醇溶液(98:2, V/V)预洗氨基固相萃取柱,待溶剂液面流至吸附填料表面时,立即加入样品浓缩液,20mL 离心管收集洗脱液,用 2.0mL 二氯甲烷-甲醇溶液(98:2, V/V)洗涤圆底烧瓶,转移至固相萃取柱,重复 2 次。将收集的洗脱液置氮吹仪上,氮吹蒸发至近干,用甲醇-1mmol/L 醋酸铵溶液(60:40, V/V)定容至 2.0mL,0.2 μm 滤膜过滤,待测。

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of mobile phase

时间/min	流速/(mL/min)	流动相体积配比/%		梯度变化曲线
		甲醇	1mmol/L 醋酸铵	
0	0.25	3	97	—
2.00	0.25	3	97	6
4.50	0.25	42	58	5
7.00	0.25	58	42	4
8.00	0.25	3	97	1
9.00	0.25	3	97	1

色谱柱:ACQUITY UPLC[®]BEH C₁₈ 柱(50mm $\times$ 2.1mm, 1.7 μm);柱温:40 $^{\circ}\text{C}$, 样品室温度 10 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:10.0 μL ;流速:0.25mL/min;流动相:醋酸铵(1mmol/L)-甲醇,梯度洗脱程序见表 1,整个分析流程为 9min。

1.5.2 质谱条件

大气压电喷雾离子源(ESI),正离子模式;毛细管电压 3.2kV;离子源温度 110 $^{\circ}\text{C}$;锥孔气流量 75L/Hr;脱溶剂气温度 400 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气流量 450L/Hr;光电倍增器电压 650V;碰撞室真空度 1.08×10^{-3} (mbar);质量分析器真空度: 2.90×10^{-5} (mbar)。定性离子对、定量离子对、碰撞电压和锥孔电压等质量条件参数详见表 2。

表 2 氨基甲酸酯类农药的 MRM 条件

Table 2 MRM parameters for the determination of carbamate pesticide residues

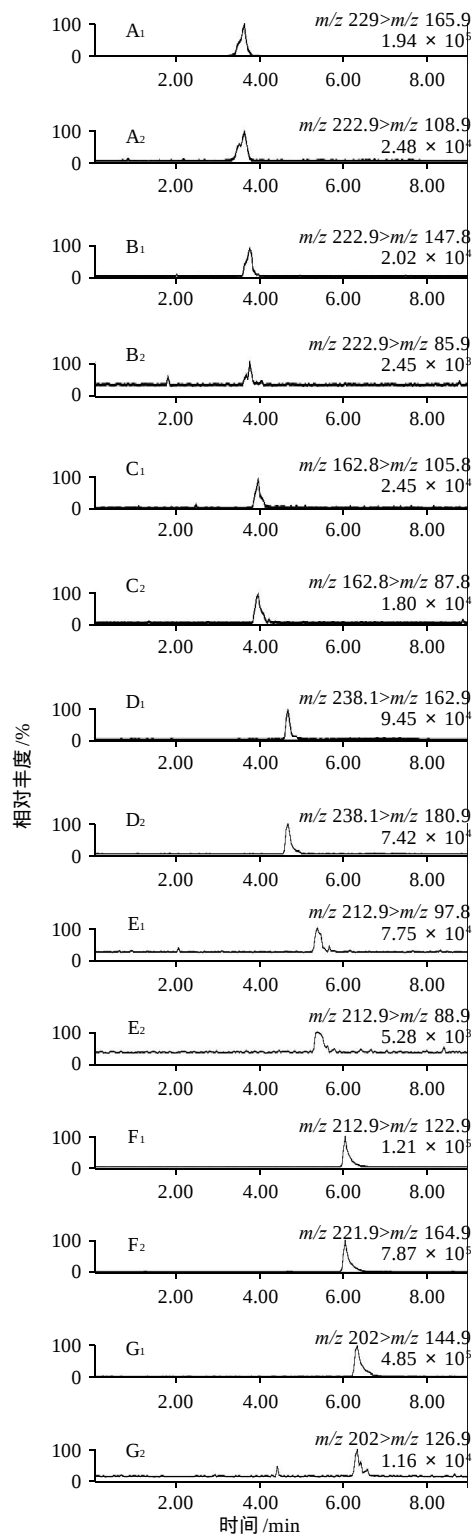
农药化合物	母离子 (m/z)	保留 时间/min	子离子 (m/z)	停顿 时间/s	锥孔 电压/V	碰撞能 量/eV
涕灭威亚砷	229.0	3.63	165.9*	0.1	40	17
			108.9			9
涕灭威砷	222.9	3.76	147.8*	0.1	45	7
			85.9			11
灭多威	162.8	3.96	105.8*	0.1	40	7
			87.8			7
3-羟基克百威	238.1	4.67	162.9*	0.1	45	11
			180.9			11
涕灭威	212.9	5.38	97.8*	0.1	45	10
			88.9			10
克百威	221.9	6.05	122.9*	0.1	45	17
			164.9			9
甲萘威	202.0	6.34	144.9*	0.1	40	5
			126.9			17

注:*.定量离子。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择

氨基甲酸酯类药物的 HPLC 分离通常采用 C₁₈ 等反相柱,本实验分别对反相分离柱进行比较,柱 1 为 Waters SunfireTM C₁₈(2.1mm $\times$ 100mm, 3.5 μm)、柱 2 为 Waters Atlantis[®] dC₁₈(2.1mm $\times$ 50mm, 3 μm)、柱 3 为 Waters ACQUITY UPLC[®]BEH C₁₈(2.1mm $\times$ 50mm, 1.7 μm)进行比较,氨基甲酸酯类药物在柱 3 既可以得到相对较好的分离度,又可显著提高质谱的灵敏度,而且缩短了分析时间,节省试剂使用量,降低污染,故选择 Waters ACQUITY UPLCBEHC₁₈ 柱作为分离柱,结果见图 1。



A. 涕灭威亚砷; B. 涕灭威砷; C. 灭多威; D. 3-羟基克百威; E. 涕灭威; F. 克百威; G. 甲萘威。

图1 氨基甲酸酯标准品色谱图

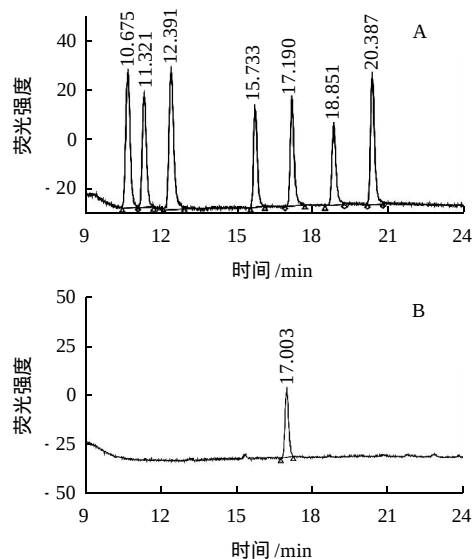
Fig.1 Chromatograms of standard carbamates

2.2 流动相的选择

在纯水-甲醇组成的流动相中,农药的加合离子峰含有 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 或 $[M+NH_4]^+$,当向水相中加入

1mmol/L 醋酸铵时,各种农药加合离子峰迅速提高,在电喷雾离子源 ESI⁺ 方式下,对于各种农药加合离子丰度比较发现,涕灭威亚砷 $[M+Na]^+>[M+NH_4]^+$ 、涕灭威砷 $[M+H]^+$ 、灭多威 $[M+H]^+>[M+Na]^+$ 、3-羟基克百威 $[M+H]^+>[M+NH_4]^+>[M+Na]^+$ 、涕灭威 $[M+Na]^+>[M+NH_4]^+>[M+H]^+$ 、克百威 $[M+H]^+>[M+Na]^+>[M+NH_4]^+$ 、甲萘威 $[M+NH_4]^+>[M+H]^+>[M+Na]^+$,故选择甲醇-1mmol/L 醋酸铵溶液体系作为流动相,选取加合离子峰丰度较高且稳定的准分子离子峰作为母离子。

2.3 提取条件的研究



A. 涕灭威; B. 杂质峰。

图2 氨基甲酸酯标准品和白菜样品图谱

Fig.2 Chromatograms of standard carbamates and cabbage sample determined by HPLC-FLD

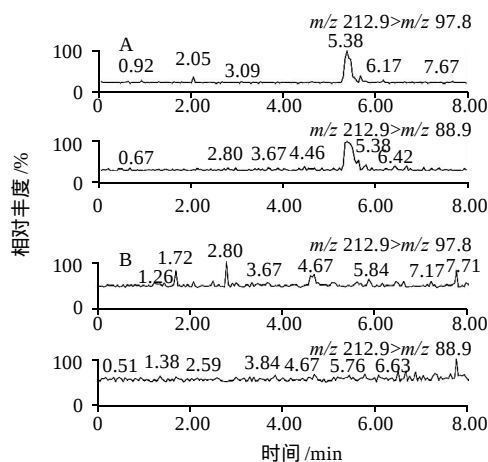


图3 涕灭威标准品 A 和白菜样品 B 色谱图

Fig.3 Chromatograms of aldicarb standard and cabbage sample determined by UPLC-MS/MS

参照我国农业部标准 NY/T 761—2008《蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯》,使用氨基甲酸酯柱后衍生方法,方法具有一定的选择性,

且灵敏度能够满足日常检测要求,但是对于不同的样品基质,个别蔬菜类别的样品会产生干扰,造成假阳性,图2为液相色谱柱后衍生荧光法测定白菜样品的图谱,通过保留时间定性,样品中含有涕灭威疑似峰,图3为质谱法测定该白菜样品的色谱图,未发现涕灭威峰,结果表明,该样品不含涕灭威残留,质谱法测定结果更加可靠。

2.4 样品定溶液的确定

样品的定溶液会影响到药物在色谱柱中的分离行为和离子化的效率,分别选用不同比例的甲醇-水、乙腈-水、甲醇-1mmol/L 醋酸铵溶液,乙腈-醋酸铵溶液作为溶剂体系作为样品的定溶液,实验结果表明,使用甲醇-1mmol/L 醋酸铵(60:40, V/V)水溶液作为样品定溶液,各种农药化合物的丰度较其他定溶液均有不同程度的增高,且峰形变好,故选择甲醇-1mmol/L 醋酸铵(60:40, V/V) 水溶液作为最佳的样品定溶液。

2.5 线性关系、回收率、精密度和检出限

用甲醇-1mmol/L 醋酸铵溶液(60:40, V/V)将标准储备液稀释成0.5~200 μg/L 一系列的标准溶液,作为标准工作液,在上述仪器条件下,注射个系列的标准工作溶液,以各组分质量浓度 X (μg/L)为横坐标,以各组分定量离子的色谱峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归计算,7种农药化合物在5~200 μg/L 范围内线性关系良好,相关系数为0.9977~0.9999。方法的最低检出限在0.5~8 μg/kg($R_{SN}=10$),结果见表3。

表3 线性方程、相关系数和检出限

Table 3 Linear equations, correlation coefficients and detection limits

农药	线性范围/(μg/L)	线性方程	相关系数 r	检出限/(μg/kg)
涕灭威亚砷	5~200	$Y=2524.76X + 14584.7$	0.9993	1.0
涕灭威砷	5~200	$Y=308.275X - 511.843$	0.9994	6.0
灭多威	2~200	$Y=266.064X + 255.158$	0.9995	5.0
3-羟基克百威	0.5~200	$Y=1286.73X - 2809.02$	0.9992	1.0
涕灭威	5~200	$Y=92.274X - 229.196$	0.9977	8.0
克百威	0.1~200	$Y=1827.41X - 3608.46$	0.9991	0.5
甲萘威	0.5~200	$Y=8143.26X + 6480.38$	0.9999	1.0

对空白样品在0.01、0.05、0.1mg/kg 3个水平上进行的添加,每个平行重复6次,考察方法的回收率和精密度,按照本方法进行提取净化并测定。添加量、平均回收率和精密度,结果见表4。实验数据表明,在0.01~0.10mg/kg 添加范围内,在甘蓝中回收率为72.1%~110.2%,实验室内测定的精密度(以相对标准偏差(RSD)表示)为1.7%~9.4%,其各项指标符合农药残留痕量分析要求。

2.6 实际样品测定

应用本方法检测蔬菜抽查样品150批,结果克百威超标样品4个,检出灭多威2批,但没有超过限量范围,合格率为97.3%。

表4 空白样品的回收率

Table 4 Recovery rates of carbamate pesticide residues in spiked blank

农药	添加 0.01mg/kg		添加 0.05mg/kg		添加 0.1mg/kg	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
涕灭威亚砷	74.3	5.4	82.7	6.5	78.8	5.4
涕灭威砷	83.5	7.8	89.1	3.6	76.4	2.9
灭多威	110.2	2.5	102.0	4.2	97.5	1.7
3-羟基克百威	78.9	3.6	86.7	5.4	78.9	7.5
涕灭威	103.2	9.4	92.4	8.0	99.4	5.1
克百威	98.7	4.9	91.2	2.5	103.5	3.8
甲萘威	72.1	3.4	79.5	6.7	82.7	4.7

3 结 论

本实验建立超高效液相色谱-串联质谱联用法测定蔬菜中7种氨基甲酸酯类农药残留,甲醇-1mmol/L 醋酸铵溶液梯度洗脱,在质谱的正离子模式下监测,最低检出限在0.5~8.0 μg/kg 之间,方法准确、选择性高,完全可以满足蔬菜中7种氨基甲酸酯类农药残留量的测定以及确证工作的需要。

参 考 文 献:

- [1] 翟德业,魏善明,周围,等. 蔬菜中氨基甲酸酯类农药残留的固相微萃取分离和HPLC法检测[J]. 应用化学, 2009, 26(4): 498-500.
- [2] 陈笑梅,胡贝贝,刘海山. 高效液相色谱-串联质谱法测定粮谷中9种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 分析化学, 2007, 35(1): 106-110.
- [3] 庞国芳,方晓明,余建新,等. 农药兽药残留现代分析技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 198-212.
- [4] 李崇瑛,白亚之,钮松召,等. 食品中氨基甲酸酯农药残留的分析方法[J]. 分析科学学报, 2007, 23(6): 723-728.
- [5] 刘潇威,买光照,李凌云,等. NY/T 761—2008 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [6] 屈天尧,王德海,吴晓波,等. 气相色谱法快速检测粮谷中的有机磷类、有机氮类和氨基甲酸酯类农药残留[J]. 农药科学与管理, 2009, 30(6): 36-40.
- [7] LIU Min, HASHI Y, SONG Yuanqun, et al. Simultaneous determination of carbamate and organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1097(1/2): 183-187.
- [8] JANSSON C, PIHLSTRÖM T, OSTERDAHL B G, et al. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1023(1): 93-104.
- [9] YANG S S, SMETENA I. Determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in tobacco using high performance liquid chromatography with post column reaction and fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 1994, 664(2): 289-294.
- [10] ARGAUER J, ELLER K I, IBRAHIM M A, et al. Determining propoxur and other carbamates in meat using HPLC fluorescence and gas chromatography/Ion trap mass spectrometry after supercritical fluid extraction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(10): 2774-2778.
- [11] 王静,潘荷芳,刘铮铮,等. 地表水中氨基甲酸酯农药及代谢物的快速、灵敏分析方法研究[J]. 中国环境监测, 2009, 25(4): 11-15.
- [12] 陈剑刚,赵倩铃,连宗衍,等. 高效液相色谱-质谱法分析测定水中氨基甲酸酯[J]. 分析化学, 2005, 33(8): 1167-1170.
- [13] 吴刚,王华雄,俞春燕,等. 加速溶剂萃取-GPC液相色谱柱后衍生化测定动物源性食品中多种氨基甲酸酯类农药残留量[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(5): 409-412.
- [14] 杨秀敏,王志,王春,等. 中空纤维液相微萃取-高效液相色谱法测定水中残留的氨基甲酸酯类农药[J]. 色谱, 2007, 25(3): 362-366.
- [15] 石杰,刘婷,刘惠民,等. 液相色谱串联质谱法测定烟草中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量[J]. 化学通报, 2010(1): 63-70.
- [16] 李志伟,梁丹,张建夫. 氨基甲酸酯类农药残留分析方法的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(5): 691-695.