

牛肉中 7 种拟除虫菊酯类农药残留的固相萃取 – 超高效液相色谱 – 串联质谱法测定

刘 琪, 孙 雷, 张 骊

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘 要: 建立了牛肉组织中胺菊酯、氰菊酯、溴氰菊酯、氟胺氰菊酯、氰戊菊酯、氟氯苯氰菊酯、氯菊酯 7 种拟除虫菊酯类农药残留的超高效液相色谱 – 串联质谱测定方法, 样品经乙腈提取后, 吹干提取液, 用正己烷溶解, 氟罗里硅土固相萃取柱净化, 经 BEH C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.1% 甲酸的甲醇溶液和 0.1% 乙酸铵溶液为流动相进行洗脱。电喷雾正离子模式 (ESI⁺) 电离, 多反应监测模式 (MRM) 检测, 外标法定量。结果表明, 7 种拟除虫菊酯类农药标准溶液在 10~ 1 000 μg/L 范围内呈良好线性, r^2 均大于 0.998 方法检出限为 5 μg/kg 定量下限为 10 μg/kg 7 种拟除虫菊酯农药在 10~ 50 μg/kg 添加水平内的回收率为 81%~ 116%, 批内、批间 RSD 均小于 15%。该方法具有简便快捷、灵敏度高、定性准确等优点, 能满足食品安全检测有关法规的要求。

关键词: 固相萃取; 超高效液相色谱 – 串联质谱; 拟除虫菊酯; 残留; 牛肉

中图分类号: O657.63; F767.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)10-1048-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.10.011

Simultaneous Determination of 7 Pyrethroids Pesticide Residues in Cattle Muscle by SPE – UPLC – MS/MS

LIU Qi; SUN Lei; ZHANG Li

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract An ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (UPLC – MS/MS) method was established for the simultaneous determination of tetramethrin, cypermethrin, deltamethrin, fluvalinate, fenvalerate, flumethrin, permethrin residues in cattle muscle. The samples were extracted by acetonitrile, cleaned up with Florisil PR solid phase extraction (SPE) column. The separation of pyrethroids pesticide was performed on Waters Acquity UPLC – Premier XE system with BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and the elution solvent of methanol (containing 0.1% formic acid) and water (containing 0.1% ammonium acetate) at a flow rate of 0.3 mL/min. The electrospray was operated under the positive ionization mode and 7 pyrethroids pesticides were identified under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The method was quantified by the external standard method. The calibration curves were linear between the peak areas and the concentrations in the range of 10–1 000 μg/L with correlation coefficients (r^2) more than 0.998. The limit of detection for 7 pyrethroids pesticides were all 5 μg/kg, and the limit of quantitation were 10 μg/kg. The average recoveries for the spiked cattle tissues at three concentrations of 10–50 μg/kg ranged from 81% to 116% and the relative standard deviations for intra- and inter-batch were both less than 15%. The proposed method was easy, sensitive, accurate and could meet the requirements for food safety detection.

Key words SPE; UPLC – MS/MS; pyrethroids; residues; cattle muscle

拟除虫菊酯类农药是仿效天然除虫菊化学结构的合成药物, 在兽医临床上常用作杀虫剂, 易溶于多种有机溶剂, 难溶于水, 具有神经毒性, 严重中毒者可因呼吸、循环衰竭而死亡。该类药物在动物

收稿日期: 2010-04-07 修回日期: 2010-07-15

基金项目: 国家科技支撑计划课题资助项目 (2006BAD31B09)

第一作者: 刘 琪 (1959-), 女, 陕西泾阳人, 副研究员, Tel: 010-62103654 E-mail: liuq@ivdc.gov.cn

上的广泛应用可引起动物性食品中药物残留, 直接或间接对人体产生危害。已报道的该类药物的检测方法有分光光度法、薄层色谱法 (TLC)、气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、免疫分析法、液相色谱 - 质谱联用法 (LC-MS, LC-MS/MS)、气相色谱 - 质谱联用法 (GC-MS, GC-MS/MS) 等^[1-10], 其中气相色谱法和气相色谱 - 质谱联用法的应用最广泛, 但方法耗时、灵敏度较低。具有更高灵敏度和分离能力的超高效液相色谱 - 串联质谱技术的快速发展, 使得该类药物的检测更快速、灵敏, 定性、定量更准确可靠, 且前处理更简单。

由于动物性食品样品的基质复杂, 其提取和净化处理较为困难, 针对动物性食品中拟除虫菊酯类药物残留的检测方法也较少报道, 其中经典的净化处理方法是凝胶色谱法净化^[11], 但处理过程较为繁琐, 而本文采用固相萃取 (SPE) 净化方法, 更为省时、简便、溶剂用量少, 结合超高效液相色谱 - 串联质谱法用于 7 种拟除虫菊酯类农药残留的分析, 结果满意。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

ACQUITY UPLC-Premier XE 液 - 质联用仪 (Waters 公司); AE260 电子天平 (Mettler Toledo 公司); Biofuge Strators 高速冷冻离心机 (贺利氏公司); Organomation Associates 氮吹仪 (Jnc 公司); SR4 旋涡混合器 (KA 公司); 固相萃取装置 (Supelco 公司); 氟罗里硅土固相萃取柱 (1 000 mg/6 mL)。

胺菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、氟胺氰菊酯、氰戊菊酯、氟氯苯氰菊酯、氯菊酯对照品 (纯度均大于 98.0%, Dr. Ehrenstorfer 公司); 甲醇为色谱纯 (Fisher 公司); 乙腈、正己烷、丙酮均为分析纯; 所用水为超纯水。

1.2 标准溶液的配制

分别准确称取适量的上述 7 种拟除虫菊酯农药对照品, 用适量丙酮溶解后, 再用甲醇稀释定容, 分别配成 1 g/L 的标准储备液, -20 °C 保存, 分析时用甲醇稀释成适当浓度的标准工作液。

1.3 仪器分析条件

色谱柱为 BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 相为 0.1% 甲酸甲醇溶液, B 相为 0.1% 乙酸铵溶液; 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL。梯度洗脱程序见表 1。

电喷雾离子源 (ESI+); 毛细管电压为 3.0 kV; 萃取电压为 5.0 V; 预六极杆电压为 0.5 V;

源温为 110 °C; 脱溶剂温度为 350 °C; 脱溶剂气流速为 650 L/h, 锥孔反吹气流速为 50 L/h。多反应监测各药物离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表 2。

表 2 7 种拟除虫菊酯类农药的定性、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

Table 2 Qualitative and quantitative ions, cone voltage and collision energy of 7 pesticides

Pesticide	Qualitative ion(<i>m/z</i>)	Cone voltage		Collision energy		Retention time <i>t</i> /min
		<i>U</i> /V	<i>U</i> /eV	<i>U</i> /eV	<i>U</i> /eV	
Tetramethrin (胺菊酯)	332.4>135.0, 332.4>164.0	20	20	25	25	1.87, 2.04
Cypermethrin (氯氰菊酯)	433.4>126.9, 433.4>191.2	20	30	15	15	3.29, 3.43
Deltamethrin (溴氰菊酯)	523.5>281.2*, 523.5>506.3	25	15	10	10	3.41
Fenvalerate (氰戊菊酯)	437.8>125.1, 437.8>167.0	20	35	15	15	3.61
Permethrin (氯菊酯)	408.5>183.1, 408.5>355.4	15	25	10	10	3.99, 4.41
Flivalinate (氟胺氰菊酯)	503.8>208.2, 503.8>181.1	25	25	15	15	4.08
Flumethrin (氟氯苯氰菊酯)	527.7>239.2, 527.7>267.3	25	25	15	15	4.70

* quantitative ion

1.4 样品前处理

称取牛肉 (2 ± 0.02) g 置 50 mL 离心管内, 加入乙腈 5 mL, 再加入无水硫酸钠 1 g, 涡旋混匀后, 中速振荡提取 5 min, 再以 8 000 r/min 离心 8 min, 取全部上清液至另一离心管中, 用玻璃棒将沉淀物捣散, 重复提取 1 次, 合并两次提取液于 40 °C 下吹至近干, 加入正己烷 2 mL, 涡旋混合 1 min, 超声

10 min 再次涡旋混合, 作为备用液。

氟罗里硅土固相萃取柱分别用 10% 丙酮 - 正己烷溶液 5 mL 和正己烷 5 mL 活化, 取全部备用液过柱, 控制流速为 1 mL/min 收集流出液, 再用 10% 丙酮 - 正己烷溶液 10 mL 以同样速度淋洗柱子并收集, 合并收集液于 40 °C 下氮气吹干。残余物中加入 80% 乙腈水溶液 1.0 mL, 超声 10 min, 充分涡旋混匀, 过 0.2 μm 滤膜后供液相色谱 - 串联质谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

考察了甲醇(含 0.1% 甲酸) - 0.1% 乙酸铵、甲醇 - 0.1% 甲酸、乙腈 - 0.1% 乙酸铵、乙腈 - 0.1% 甲酸 4 种流动相体系对分析效果的影响。结果表明, 采用甲醇(含 0.1% 甲酸) - 0.1% 乙酸铵水溶液作为流动相时, 拟除虫菊酯农药的离子化效率最高, 色谱峰形好, 灵敏度高。

参考文献 [12-17] 建立色谱条件, 实验结果表明, 梯度洗脱的分离效果较好。由于拟除虫菊酯类药物分子结构中含有多个不对称碳原子, 包含多种同分异构体^[15], 同一化合物会出现多个异构体色谱峰, 当个别异构体的色谱峰未能完全分离时, 仍能够满足检测需要。

在优化的色谱条件下, 5.0 min 内完成了对上述几种拟除虫菊酯类农药的分析, 方法快速、灵敏度高、选择性强和重复性好, 适合大量样本的快速检测。

2.2 质谱条件的建立

以不同的锥孔电压进行正负离子扫描, 发现 7 种拟除虫菊酯农药均在正离子模式下分别获得丰度较高的准分子离子峰 $M + H^+$ ($M + 1$) 或溶剂加和物离子峰 $M + NH_4^+$ ($M + 18$) 及其子离子峰。选择丰度最大的母离子及对应的两个响应较强的子离子作为定性离子, 再选其中灵敏度最高、基质干扰最小的子离子作为定量离子, 具体数值见表 2。

2.3 样品前处理条件的确定

2.3.1 提取溶剂的选择 常用的提取拟除虫菊酯类药物的溶剂有乙腈、丙酮以及丙酮 - 石油醚、丙酮 - 正己烷混合溶剂等^[1], 这些溶剂主要针对植物性样品, 对于样品成分更为复杂的动物组织中拟除虫菊酯农药的提取, 文献报道较少。本文通过实验比较了乙腈、丙酮及丙酮 - 正己烷作提取溶剂时对动物性样品中拟除虫菊酯药物的提取效果, 结果表明, 乙腈对动物性样品中的脂肪、色素和内源性物质的提取量最小, 对拟除虫菊酯药物的溶解度很高, 提取效果最好; 而用丙酮和正己烷提取, 则会增加干扰物的提取量。因此, 确定采用乙腈进行提取。将提取液吹干浓缩后, 采用正己烷溶解浓缩物, 可以充分溶解该类药物。然后通过固相萃取方法进行净化。

2.3.2 固相萃取条件的选择 已报道对植物性样品的萃取方法有固相萃取法 (SPE)^[18]、超临界流体萃取法 (SFE)^[19]、凝胶渗透色谱法 (GPC)^[20]、微波萃取法 (MAE)^[21] 及基质固相分散法 (MSPD)^[12]。其中, 固相萃取方法不仅节省大量溶剂, 而且省时, 可减少杂质的引入, 对操作者安全, 重复性好, 也可避免产生液液分配中的乳化现象。拟除虫菊酯药物的固相萃取法使用最多的吸附剂是氟罗里硅土, 也有文献使用 C_{18} 反相固相萃取柱和氧化铝萃取柱^[16]。本文对上述 3 种固相萃取柱进行了比较, 发现氟罗里硅土柱的药物添加回收率较 C_{18} 柱和氧化铝萃取柱高, 而 C_{18} 柱和氧化铝萃取柱之间的差异不显著。氟罗里硅土对亲酯性化合物有特别的吸附作用, 适合于油性杂质的净化, 用低极性的溶剂洗脱氟罗里硅土柱, 对拟除虫菊酯药物的回收率很高。对比了 200 mg/3 mL、500 mg/3 mL 和 1 000 mg/6 mL 3 种规格的氟罗里硅土固相萃取柱的净化结果, 结果表明: 对于 2 g 牛肉组织, 当采用前 2 种规格的柱子时, 净化不理想, 基质杂质多, 干扰和抑制了被测化合物离子的形成和色谱峰的检测, 使用 1 000 mg/6 mL 的氟罗里硅土固相萃取柱时可有效去除样品中杂质的干扰, 达到最佳的净化效果, 且该净化方法简便, 能在短时间内处理大量样品。因此选择用 1 000 mg/6 mL 氟罗里硅土固相萃取柱进行净化。

2.4 方法的线性范围

使用基质匹配标准溶液建立标准曲线对样品进行定量, 可以消除基质中其他组分对目标物的干扰^[13-14]。配制 1Q、5Q、10Q、20Q、50Q、1 000 mg/L 的系列拟除虫菊酯类农药混合对照溶液, 各取 1 mL, 分别溶于由 (2 ± 0.02) g 空白牛肉组织经提取、净化及吹干后的残余物中, 充分混匀, 作为基质

匹配系列混合标准溶液, 过 0.2 μm 微孔滤膜后, 上机测定。以各定量离子的质量色谱峰面积为纵坐标 (y), 对照溶液的质量浓度 (x, μg/L) 为横坐标, 绘制标准曲线。回归方程及相关系数见表 3, 7 种拟除虫菊酯类药物在 10~1 000 μg/L 范围内呈良好的线性关系, r² 均大于 0.998

2.5 方法的灵敏度与精密度

采用空白组织中添加目标化合物的方法, 依据特征离子质量色谱峰信噪比 $S/N > 3$ 为方法检出限, $S/N > 10$ 为方法定量下限, 得出 7 种拟除虫菊酯农药在牛肉样品中的检出限均为 5 μg/kg 定量下限均为 10 μg/kg 7 种拟除虫菊酯类药物的特征离子质量色谱图见图 1。

采用标准添加法, 在空白牛肉中添加 10、20、50 μg/kg 的拟除虫菊酯类农药进行加标回收率实验, 各添加量进行 5 个样品的平行实验, 重复 3 次, 批内、批间相对标准偏差结果见表 3。本方法在空白牛肉中的回收率为 81%~110%, 相对标准偏差均小于 1%。

3 结 论

利用超高效液相色谱 - 串联质谱法 (UPLC - MS/MS) 进行测定, 采用固相萃取 (SPE) 方法对样品进行前处理, 建立了牛肉中 7 种拟除虫菊酯类农药残留量的测定方法, 方法具有较好的灵敏度、准确度和精密度, 线性良好, 能满足我国和欧盟等有关国际组织对于食品安全检测方法和残留限量等相关法规的要求。

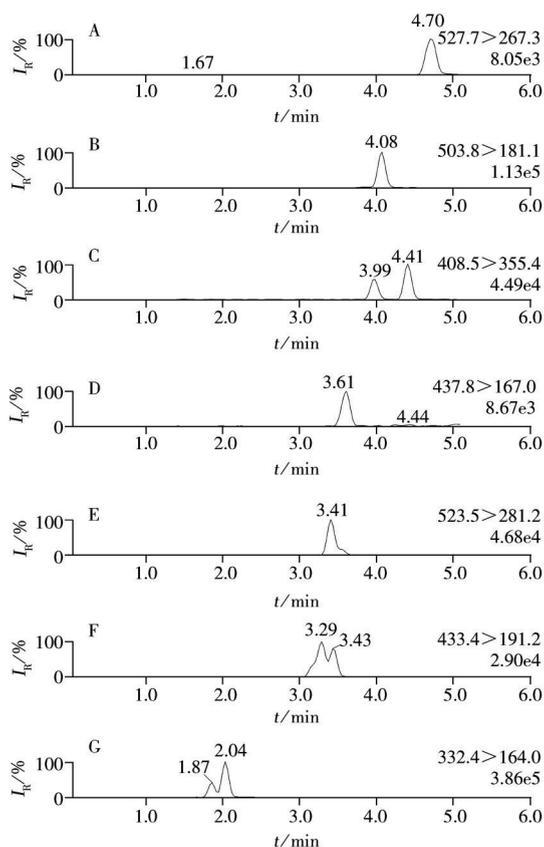


图 1 7 种拟除虫菊酯类农药的特征离子质量色谱图
Fig 1 Characteristic ion mass chromatograms of 7 pesticides
A. flumethrin, B. fluvalinate, C. permethrin, D. fenvalerate, E. deltamethrin, F. cypermethrin, G. tetraethrin

表 3 7 种拟除虫菊酯类农药的回归方程、相关系数、回收率及相对标准偏差 (n = 5)

Table 3 Linear equations, correlation coefficients (r²), spiked recoveries and RSDs of 7 pesticides (n = 5)

Pesticide	Linear equation	r ²	Added w _A / (μg · kg ⁻¹)	Recovery R / %	Intra-RSD s _r / %	Inter-RSD s _r / %
Tetraethrin	y = 923.67x + 11.986	0.999 6	10 20 50	90 116 81	4.6 6.0 9.4	4.0 5.5 8.0
Cypermethrin	y = 219.67x + 658.29	0.999 3	10 20 50	102 111 111	7.5 5.9 6.7	7.8 6.1 6.3
Deltamethrin	y = 257.07x - 717.03	0.999 8	10 20 50	99 107 102	7.3 11.0 6.8	7.6 8.4 5.7
Fluvalinate	y = 599.83x - 1 102.2	0.999 5	10 20 50	89 114 103	9.3 6.4 12.3	8.5 5.7 9.6
Fenvalerate	y = 34.866x - 78.760	0.999 3	10 20 50	98 105 116	10.7 5.8 6.1	9.3 6.0 6.7
Flumethrin	y = 33.922x - 18.627	0.999 4	10 20 50	90 95 88	4.6 13.7 8.2	4.5 12.3 7.9
Permethrin	y = 551.91x + 1 059.2	0.998 4	10 20 50	102 98 88	7.5 14.7 10.0	7.0 11.1 8.2

参考文献:

[1] 骆爱兰, 余向阳, 张存政, 祝树德, 刘贤进. 拟除虫菊酯药物残留分析研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2004, 20 (2): 120-122

[2] 郑军红, 庞国芳, 范春林, 王明林. 液相色谱 - 串联质谱法测定牛奶中 128 种药物残留 [J]. 色谱, 2009, 27 (3): 254-263

[3] CUETS C, DALE W E. Cobrimetric determination of pyrethrins, allethrin and fenethrin [J]. J Anal Chem, 1953, 25 (8): 1367-1369

[4] OVLIVER BH. Cobr specific reagent for identification and semiquantitation of pyrethrin and piperonyl butoxide by thin layer chromatograph [J]. J Ass Off Anal Chem, 1973, 56(4): 915-918

[5] 任荣光. 气相色谱法和薄层色谱法测定生物检材中的甲氰菊酯 [J]. 药物, 1994, 33(2): 12-14

[6] 刘忠. 茶叶中多种拟除虫菊酯药物残留的测定 [J]. 中国卫生检测杂志, 2001, 11(6): 684

- [7] 毕富春, 王文丽, 陈宗庭, 黄润秋. 用毛细管色谱法分析 14 种拟除虫菊酯立体异构体 [J]. 色谱, 1997, 15 (2): 127- 129.
- [8] 白海涛. 气相色谱 - 质谱快速检测虾体中氰戊菊酯 [J]. 预防医学文献信息, 2001, 7(1): 49.
- [9] 佟玲, 李重九. 含硫蔬菜中 50 种农药多残留的气相色谱 - 串联质谱检测技术研究 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(9): 930- 935.
- [10] 余向阳, 骆爱兰, 刘媛, 徐敦明, 刘贤进, 常有宏. 拟除虫菊酯类农药多残留直接竞争 ELISA 建立及初步应用 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(3): 249- 252.
- [11] GB/T 5009 162- 2008 动物性食品中有机氯和拟除虫菊酯农药多组分残留量的测定 [S].
- [12] CHENG J H, LIU M, YU Y, WANG X P, ZHANG H Q, DING L, JIN H Y. Determination of pyrethroids in porcine tissues by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography [J]. Meat Sci, 2009, 82 (4): 407- 412.
- [13] VONDERHEIDE A P, KAUFFMAN P E, HIEBER T E. Development of an analytical scheme for the determination of pyrethroid pesticides in composite diet samples [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(6): 2096- 2104.
- [14] GIL- GARCÍA M D, BARRANCO- MARTÍNEZ D, MARTÍNEZ- GALERA M, PARRILLA- VÁZQUEZ P. Simple rapid solid-phase extraction procedure for the determination of ultra-trace levels of pyrethroids in ground and sea water by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(16): 2395- 2403.
- [15] CHEN T W, CHEN G N. Identification and quantitation of pyrethroid pesticide residues in vegetables by solid-phase extraction and liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(12): 1848- 1854.
- [16] VAZQUEZ P P, MUGHARIA R, GALERA M M. Application of solid-phase microextraction for determination of pyrethroids in groundwater using liquid chromatography with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection [J]. J Chromatogr A, 2008, 1188(2): 61- 68.
- [17] 穆小丽, 蒋腊梅, 杜文. 高效液相色谱 - 串联质谱法分析烟草中拟除虫菊酯农药残留 [J]. 农药, 2009, 48(5): 365- 367.
- [18] 黄德智, 岳勇德, 汤峰. 药物残留分析的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2002, 30(4): 523- 526.
- [19] EHAOTAY S J, AHARONSON N, PFEIL E, IBRAHIM M A. Development of a sample preparation technique for supercritical fluid extraction formulation residue analysis of pesticides in produce [J]. JAOAC Int, 1995, 78(3): 831- 840.
- [20] 王兆基, 李伟安. 快速气相色谱法测定蔬菜中菊酯药物残留量 [J]. 分析化学, 1998, 26(10): 1247- 1250.
- [21] 郝金玉, 黄若华, 王平艳, 邓修. 微波萃取除虫菊酯 [J]. 精细石油化工, 2001, (2): 47- 49.

《分析科学学报》2011 年征订启事

欢迎订阅 欢迎投稿

《分析科学学报》是经国家科技部(原国家科委)批准,国家教育部主管的分析科学领域的综合性学术刊物,1985 年创刊,全国公开发行(刊号 ISSN 1006-6144/CN 42-1338/O),由武汉大学、北京大学、南京大学共同主办。《分析科学学报》主要报道我国在分析科学领域中的新理论、新方法、新试剂、新仪器和新技术,介绍分析科学前沿领域的最新进展和动向。栏目有:研究报告、研究简报、仪器研制与实验技术、综述与评论、技术交流、动态与信息之窗,可供大专院校、科研院所、环保、化工、冶金、药物、医学、商检以及工矿企事业单位中的分析科技人员和管理人员阅读。

本刊自 1995 年起被美国《化学文摘》(CA),美国金属学会《材料信息》(ASM),英国《分析文摘》(AA)以及国内多种文摘期刊和数据库收录;《中国科学引文数据库》自 1997 年起确定本刊为统计源期刊。《分析科学学报》是中文核心期刊、教育部和湖北省优秀科技期刊。《分析科学学报》为双月刊,每逢双月 20 日出版发行,大 16 开本,136 页/期,定价 10.00 元,全年 60.00 元,全国邮局发行,邮发代号 38-202,也可向编辑部订阅。补购本部过刊,请与编辑部联系。编辑部地址:湖北武汉武汉大学化学系;邮政编码:430072 电话:(027)68752248 E-mail: fjkxxb@whu.edu.cn