

实验技术与方法

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定苦水玫瑰中
6种氨基甲酸酯类及3种烟碱类杀虫剂

张琳, 骆姗, 侯言东, 李拥军, 孙建云, 谢迎春

(甘肃省疾病预防控制中心, 甘肃 兰州 730020)

摘要:目的 建立 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱同时测定苦水玫瑰中 6 种氨基甲酸酯类及 3 种烟碱类杀虫剂的方法。方法 苦水玫瑰样品粉碎后乙腈超声提取, 经过 QuEChERS 分离净化后通过 C_{18} 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m), 以含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵-乙腈溶液进行梯度洗脱, 采用电喷雾电离正离子 (ESI+) 多反应监测 (MRM) 模式检测, 外标法定量。结果 9 种农药在 0.01~0.50 μ g/mL 浓度范围内线性相关系数 (r) > 0.990, 加标回收率为 76.3%~102%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.3%~9.0% ($n=6$), 方法检出限和定量限分别为 0.001 6~0.003 2 和 0.005 4~0.010 mg/kg。结论 本方法可以快速、简单、准确的同时检测苦水玫瑰中 6 种氨基甲酸酯类和 3 种烟碱类杀虫剂, 适用于日常苦水玫瑰的检测。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱; 苦水玫瑰; 氨基甲酸酯; 烟碱; 杀虫剂

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)05-0514-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.05.008

Determination of 6 kinds of carbamate pesticides and 3 kinds of chloronicotinyl pesticides in Chinese Kushui rose by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS

ZHANG Lin, LUO Shan, HOU Yandong, LI Yongjun, SUN Jianyun, XIE Yingchun

(Gansu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Gansu Lanzhou 730020, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination of 6 kinds of carbamate pesticides and 3 kinds of chloronicotinyl pesticides in Chinese Kushui rose by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) coupled with QuEChERS. **Methods** After extracted by acetonitrile, the Chinese Kushui rose was cleaned by QuEChERS. The target compounds were separated by C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m) using 10 mmol/L ammonium acetate solution (0.1% formic acid) with acetonitrile as mobile phase for gradient elution, and analyzed by MS/MS system with electrospray ionization (ESI+) under multi-reaction monitoring mode and quantified by external standard method. **Results** All the 9 kinds of pesticides showed good linear relationships in range of 0.01-0.50 μ g/mL, and the correlation coefficients were above 0.990, the recoveries at different spiked levels for all target compounds in blank matrices were 76.3%-102%, and the relative standard deviation (RSD) were 1.3%-9.0% ($n=6$). The limits of detection and quantification of the method were 0.001 6-0.003 2 and 0.005 4-0.010 mg/kg. **Conclusion** The method was suitable for rapid screening and analysis of 9 pesticide residues in Chinese Kushui rose with the advantage of accuracy, rapidity, simplicity and high sensitivity.

Key words: QuEChERS; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer; Chinese Kushui rose; carbamate; chloronicotinyl; pesticides

苦水玫瑰是钝齿蔷薇和我国传统玫瑰的自然杂交种 (*Rosa Setate*×*Rosa Rugosa*), 因原产于甘肃省

永登县苦水镇地区而得名, 有近 200 年栽培历史, 是集营养与保健于一身的药食两用滋补佳品^[1-2]。玫瑰种植过程的主要病虫害有白粉病、黑斑病、灰霉病、蚜虫、蓟马、蛴螬、甜菜夜蛾等^[3-4]。而吡虫啉、啉虫脒等烟碱类杀虫剂能有效防治同翅目、鞘翅目、双翅目和鳞翅目类害虫, 同时可杀灭对有机磷农药等传统杀虫剂有抗药性的害虫, 具有高效、持

收稿日期: 2020-08-06

作者简介: 张琳 女 主管技师 研究方向为理化检验 E-mail: 1810585324@qq.com

通信作者: 谢迎春 女 主管技师 研究方向为理化检验 E-mail: 86318740@qq.com

效期长、对哺乳动物毒性低等特点,且与常规农药无交互抗性。氨基甲酸酯类杀虫剂由于具有快速降解、低生物积累等特征而被广泛应用于种植生产中。在云南省玫瑰花地方标准中将克百威、涕灭威列入禁止使用的目录^[4]。在苦水玫瑰食用产品大力开发的趋势下仍然缺乏对苦水玫瑰卫生学评价的研究,尤其是农药残留方面。所以本试验研究了苦水玫瑰干花和干花蕾中氨基甲酸酯类和烟碱类杀虫剂的检测。

目前用于杀虫剂残留的检测方法主要包括高效液相色谱(HPLC)法、毛细管电泳(CE)法和气相色谱(GC)法等^[5-8],这些方法检测步骤繁琐,灵敏度也不尽如人意^[9-12],且这几类杀虫剂的热稳定性较差,采用GC法检测时容易发生分解,采用CE法进行分离分析时常需要结合在线富集方式来提高检测灵敏度。本试验采用QuEChERS技术对苦水玫瑰中的9种杀虫剂(6种氨基甲酸酯类和3种烟碱类)残留进行净化和分离,经超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)对其进行快速分离分析,同时对影响提取效率和色谱分离效率的因素进行了系统的考察,包括提取方法的对比、流动相种类和比例等。本试验为同时检测苦水玫瑰中不同样品中多种类型的杀虫剂残留提供一种快速、准确、灵敏的分析方法,为实现苦水玫瑰的药食同源提供科学数据的有力支撑,为苦水玫瑰更好地推向市场提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

采集永登县和兰州新区两大苦水玫瑰主产区当年产苦水玫瑰干花与干花蕾以及市售定型包装玫瑰干花蕾共60份。

1.1.2 主要仪器与试剂

XEVO-TQ UPLC-MS/MS 仪(美国 Waters), PL303 分析天平, Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore), 涡旋振荡器。

克百威(carbofuran, CAS: 1563-66-2)、三羟基克百威(3-hydroxycarbofuran, CAS: 16655-82-6)、异丙威(isoprocarb, CAS: 2631-40-5)、灭多威(methomyl, CAS: 59669-26-0)、涕灭威(aldicarb, CAS: 116-06-3)、涕灭威砒(aldicarb sulfone, CAS: 1646-88-4)、吡虫啉(imidacloprid, CAS: 138261-41-3)、啶虫脒(acetamiprid, CAS: 135410-20-7)、氯虫苯甲酰胺(chlorantraniliprole, CAS: 500008-45-7)标准物质(纯度>98%,质量浓度为10 mg/L)均购自德国 Dr.

Ehrenstorfer。标准储备液(1.0 mg/mL)用乙腈配制,贮存于0~4℃的冰箱中,用5%乙腈水溶液(含0.1%甲酸的10 mmol/L乙酸铵)稀释标准储备液至适当浓度的标准工作液。QuEChERS提取净化包(德国 CNW), 0.22 μm 针头式通用滤膜(美国 Waters), 乙腈、甲酸、乙酸铵均为 HPLC 级。试验用水为符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》规定的一级水。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

将苦水玫瑰样品,经四分法缩分后,粉碎待用。准确称取2.5 g均质样品,提前加入5 mL纯水湿润样品,加入10 mL乙腈,涡旋混匀后超声30 min,加入2 g Na₂SO₄和0.5 g NaCl,涡旋混匀,于8 000 r/min离心5 min(离心半径8.3 cm),上清液备用。吸取上清液约1.5 mL于加有净化包(250 mg Na₂SO₄, 400 mg N-丙基乙二胺, 250 mg C₁₈吸附剂)的塑料离心管中,涡流混匀10 s后于8 000 r/min离心5 min(离心半径10.0 cm)。取上清液0.5 mL,加水0.5 mL混匀,过0.22 μm滤膜后UPLC-MS/MS测定。

1.2.2 仪器条件

色谱: Waters BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 柱温35℃; 流量0.3 mL/min; 进样量5 μL; 流动相A为乙腈, B为含0.1%(体积分数)甲酸的10 mmol/L乙酸铵溶液。梯度洗脱程序: 0~10 min时, A由5%升至40%; 11 min时, A为95%; 13 min时, A为95%; 14 min时, A为5%; 15 min时, A为5%。

质谱: 电喷雾离子源(ESI+); 离子源温度为300℃; 电喷雾电压为3.5 kV, 鞘气流量40 arb; 辅助气流量10 arb; 多反应监测(MRM)模式扫描, 监测离子对和其他质谱参数见表1。

表1 9种化合物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of 9 kinds of pesticides

| 名称 | 保留时间 /min | 母离子 /(m/z) | 离子对 /(m/z) | 锥孔电 压/eV | 碰撞能 量/V |
|--------|--------------|---------------|---------------------------|-------------|------------|
| 吡虫啉 | 1.70 | 256.0 | 175.0 [*] /209.0 | 22 | 17 |
| 啶虫脒 | 1.82 | 223.0 | 126.0 [*] /56.0 | 17 | 22 |
| 氯虫苯甲酰胺 | 3.31 | 482.0 | 451.0 [*] /286.0 | 18 | 18 |
| 涕灭威砒 | 4.49 | 223.1 | 86.0 [*] /148.0 | 20 | 30 |
| 灭多威 | 7.41 | 163.1 | 88.1 [*] /106.1 | 30 | 35 |
| 三羟基克百威 | 7.41 | 238.0 | 163.0 [*] /181.0 | 20 | 30 |
| 克百威 | 12.03 | 222.1 | 123.1 [*] /165.1 | 35 | 35 |
| 涕灭威 | 10.04 | 208.1 | 89.1 [*] /116.2 | 25 | 35 |
| 异丙威 | 12.79 | 194.1 | 95.1 [*] /137.1 | 30 | 35 |

注: * 为定量离子对

2 结果与分析

2.1 仪器方法的建立和优化

将9种标准品配制成0.2 μg/mL的标准溶液

以20 μL/min的流速注入质谱,自动调谐优化,9种杀虫剂MRM色谱图见图1,每个化合物得到特征离子对以及最优碰撞能量和碰撞电压见表1。

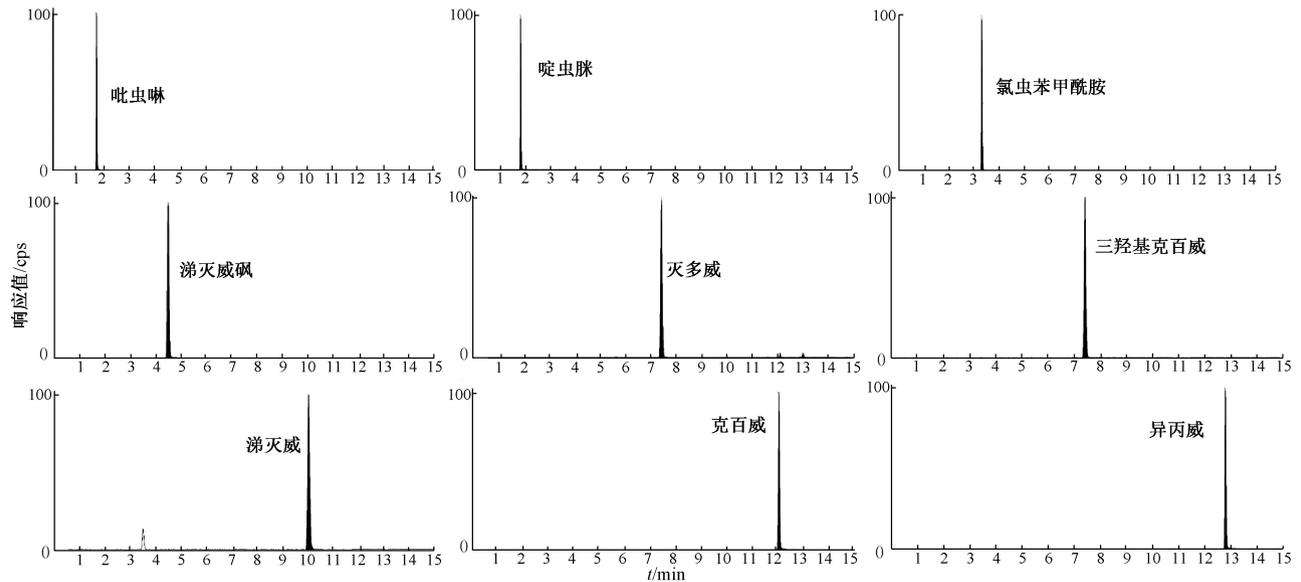


图1 9种杀虫剂MRM色谱图

Figure 1 MRM chromatogram of 9 kinds of pesticides compounds

本试验比较了0.1%甲酸溶液、含0.1%甲酸的10 mmol/L 乙酸铵、甲醇、乙腈作为流动相对化合物检测灵敏度的影响,见图2。试验过程中,在同等仪器条件下,甲酸可以增加正离子目标物质的响应值,选择甲酸-乙酸铵-乙腈体系作为流动相时,乙酸铵溶液对部分目标物质的色谱峰形具有改善作用。综合考虑下,最终确定使用含0.1%甲酸的10 mmol/L 乙酸铵-乙腈作为洗脱流动相。

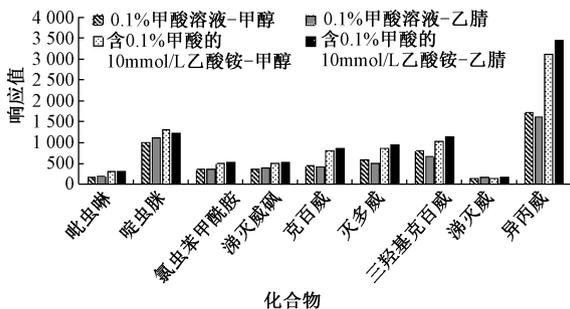


图2 流动相对9种化合物检测灵敏度的影响

Figure 2 Effect of mobile phase on the sensitivity of 9 kinds of pesticides

2.2 提取条件的优化

本试验选择乙腈为提取液,因为乙腈具有较好的穿透能力,能同时对极性和非极性农药残留具有较好的提取效率^[10,13],适合多残留农药的提取,被广泛应用于QuEChERS方法对蔬菜、水果中农药残留的检测。故本试验比较了摇床提取和超声提取两种方式在不同时间(15、30、45 min)下的提取效

果。结果表明,室温下提取30 min的回收率较提取15 min有明显提升,且超声提取的提取率也优于摇床提取;时间延长至45 min,提取效果并无明显提高,见图3。故最佳试验条件选择室温超声提取30 min。

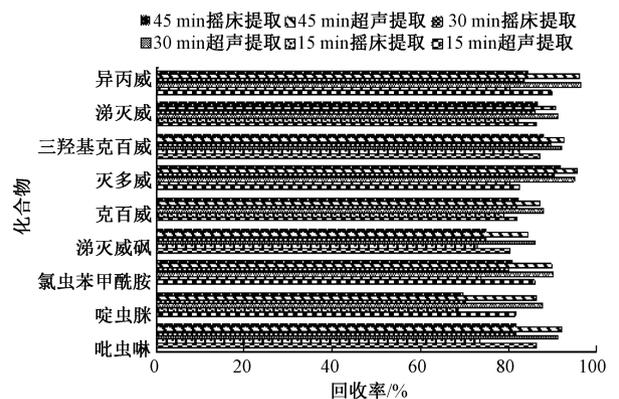


图3 提取条件对测定回收率的影响(n=3)

Figure 3 Effect of extraction method on recoveries of pesticides

2.3 净化方法的考察

净化是农药残留检测的重要技术环节,QuEChERS方法中常以PSA、C₁₈、石墨化碳黑(GCB)作为吸附剂用于分散固相萃取。本试验根据全国食品化学污染物风险监测工作手册^[8]中的方法直接选用安谱实验室定制的分散固相萃取纯化管,为进一步考察苦水玫瑰析出色素等基质因素对试验的影响,又选择了一组含有GCB的纯化管(250 mg Na₂SO₄,400 mg PSA,250 mg C₁₈,7.5 mg GCB),但大多数目标物提取率并无明显提升,因此

本试验采用了未添加 GCB 的净化方式。

2.4 9 种杀虫剂的线性范围及定量限

在 UPLC-MS/MS 法中由于共萃取组分之间存在电离竞争,经常出现基质效应,导致信号抑制或增强,而基质效应会影响定量结果的准确性,通常采用同位素内标校正法或基质匹配标准曲线校正法。本试验中针对 9 种杀虫剂在 0.010~0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内做基质匹配曲线。选择空白

样品一份,经过 1.2.1 中提取和净化等前处理步骤得到上清液过膜备用,将得到的上清液用试验用水等倍稀释,作为配制曲线的基质液,上机后线性关系良好,相关系数(r)均大于 0.990。将定量限浓度值重复进样检测,得出定量限的相对标准偏差(RSD)在 4.5%~17%之间,方法检出限和定量限分别为 0.001 6~0.003 2 和 0.005 4~0.010 mg/kg ,见表 2。

表 2 9 种杀虫剂线性范围、线性方程、相关系数、检出限、定量限

Table 2 Linear rangers, standard curves, LODs, LOQs of the 9 pesticides

| 名称 | 线性范围 /($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 线性方程 | r | 检出限 /(mg/kg) | 定量限 /(mg/kg) | 定量限 $RSD/\%$ |
|--------|--------------------------------------|-----------------------|-------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 吡虫啉 | 0.010~0.50 | $y=321.08x+1248.81$ | 0.997 | 0.003 2 | 0.010 | 5.3 |
| 啶虫脒 | 0.010~0.50 | $y=431.45x+1805.69$ | 0.996 | 0.003 2 | 0.010 | 4.5 |
| 氯虫苯甲酰胺 | 0.010~0.50 | $y=172.77x+252.81$ | 0.998 | 0.003 2 | 0.010 | 7.6 |
| 涕灭威砒 | 0.010~0.50 | $y=100.38x+332.42$ | 0.993 | 0.003 2 | 0.010 | 16 |
| 克百威 | 0.010~0.50 | $y=3327.60x+23943.50$ | 0.996 | 0.003 2 | 0.010 | 8.2 |
| 灭多威 | 0.010~0.50 | $y=767.37x+563.11$ | 0.996 | 0.001 6 | 0.005 4 | 5.2 |
| 三羟基克百威 | 0.010~0.50 | $y=492.50x+3932.71$ | 0.995 | 0.003 2 | 0.010 | 9.2 |
| 涕灭威 | 0.010~0.50 | $y=100.38x+332.43$ | 0.998 | 0.003 2 | 0.010 | 17 |
| 异丙威 | 0.010~0.50 | $y=4169.47x+19992.70$ | 0.999 | 0.001 6 | 0.005 4 | 16 |

2.5 精密度与回收率

通过向空白样品中添加低、中、高三个浓度水平的混合标准溶液进行加标回收试验,使空白样品中的 9 种杀虫剂浓度分别在 0.08、0.40、1.60 mg/kg 水平,每个水平做 6 个平行,按照 1.2.1 进行提取和净化等前处理步骤后进行 UPLC-MS/MS 的分析,用基质匹配曲线进行外标法定量,计算得到加标回收率范围在 76.3%~102%之间, RSD 范围在 1.3%~9.0%之间,具体结果见表 3。

表 3 方法的回收率和精密度($n=6$)

Table 3 Recoveries and $RSDs$ for 9 pesticides

| 化合物 | 添加水平 /(mg/kg) | 回收率 /% | RSD /% |
|--------|------------------------------------|-----------|-------------|
| 吡虫啉 | 0.08, 0.40, 1.60 | 78.2~96.1 | 2.3~5.4 |
| 啶虫脒 | 0.08, 0.40, 1.60 | 87.3~95.0 | 1.7~9.0 |
| 氯虫苯甲酰胺 | 0.08, 0.40, 1.60 | 80.8~102 | 3.2~5.5 |
| 涕灭威砒 | 0.08, 0.40, 1.60 | 77.2~102 | 5.0~6.4 |
| 克百威 | 0.08, 0.40, 1.60 | 80.5~92.8 | 4.3~5.3 |
| 灭多威 | 0.08, 0.40, 1.60 | 86.2~94.7 | 1.3~3.7 |
| 三羟基克百威 | 0.08, 0.40, 1.60 | 76.3~95.0 | 2.9~6.1 |
| 涕灭威 | 0.08, 0.40, 1.60 | 82.1~96.8 | 3.2~5.4 |
| 异丙威 | 0.08, 0.40, 1.60 | 83.3~99.7 | 3.5~4.9 |

2.6 基质效应

在 UPLC-MS/MS 检测农药残留的过程中,由

于共萃取组分之间存在电离竞争,经常出现基质效应,导致信号抑制或增强,基质效应会对分析方法的重复性、灵敏度、准确度等产生影响。在使用 ESI 源时更为突出,主要表现为对目标化合物的离子抑制作用^[14-15],通常采用同位素内标校正法或基质匹配标准曲线校正法。当基质匹配标准曲线斜率和溶剂标准曲线斜率之比 k 值在 0.9~1.1 之间,基质效应不明显,当 k 值大于 1.1 为基质增强效应,小于 0.9 为基质减弱效应^[16]。常采用配制基质匹配标准曲线、加入分析保护剂、盐析等方法降低基质效应的影响。根据表 4 中 9 种杀虫剂的基质匹配曲线与溶剂标准曲线,可知杀虫剂在苦水玫瑰基质中各有不同程度的基质效应,基质效应改变了回归方程的斜率及截距。从 k 值的结果看出,9 种杀虫剂中涕灭威砒、灭多威的基质效应最为明显,其余基质效应均在 20%之内。正由于基质效应的存在,本试验利用基质匹配标准曲线校准法来有效的补偿基质效应带来的影响。

2.7 样品检测结果

本次采集到 60 份玫瑰样品,其中干花和干花蕾各 30 份,均未检出上述 6 种氨基甲酸酯类和 3 种烟碱类杀虫剂,说明样品中不存在这些杀虫剂残留的污染。

表4 9种杀虫剂的基质效应
Table 4 Matrix effect of 9 pesticides

| 化合物 | 溶剂标准曲线 | r | 基质匹配曲线 | r | k值 |
|--------|--------------------------|-------|---------------------------|-------|------|
| 吡虫啉 | $y = 352.80x + 1443.25$ | 0.999 | $y = 321.08x + 1248.81$ | 0.997 | 0.91 |
| 啶虫脒 | $y = 501.69x + 1654.23$ | 0.999 | $y = 431.45x + 1805.69$ | 0.996 | 0.86 |
| 氯虫苯甲酰胺 | $y = 187.80x + 805.69$ | 0.999 | $y = 172.77x + 252.81$ | 0.998 | 0.92 |
| 涕灭威砒 | $y = 135.64x + 642.73$ | 0.995 | $y = 100.38x + 332.42$ | 0.993 | 0.74 |
| 克百威 | $y = 3502.74x + 1793.48$ | 0.998 | $y = 3327.60x + 23943.50$ | 0.996 | 0.95 |
| 灭多威 | $y = 983.80x + 361.71$ | 0.998 | $y = 767.37x + 563.11$ | 0.996 | 0.78 |
| 三羟基克百威 | $y = 593.37x + 2319.45$ | 0.999 | $y = 492.50x + 3932.71$ | 0.995 | 0.83 |
| 涕灭威 | $y = 104.56x + 256.81$ | 0.998 | $y = 100.38x + 332.43$ | 0.998 | 0.96 |
| 异丙威 | $y = 4388.91x + 8937.54$ | 0.998 | $y = 4169.47x + 19992.70$ | 0.999 | 0.95 |

3 小结

本试验通过对苦水玫瑰样品前处理方法、提取剂和 UPLC-MS/MS 条件优化,建立了可以同时检测苦水玫瑰样品中 6 种氨基甲酸酯类和 3 种烟碱类杀虫剂的方法。本方法利用基质固相分散样品制备试剂盒,采用乙腈提取,得到了较好的提取效果。同时利用定性定量离子对进行确证,通过 MRM 进行信号采集,该试验整合了两类杀虫剂检测的方法,且快速、简便、灵敏、准确,为苦水玫瑰食用安全性评价及苦水玫瑰产品上市检测提供基础研究,并且大大提高了检测工作效率。

参考文献

[1] 于长青,赵煜,徐琼,等. 对苦水玫瑰产业发展的思考[J]. 甘肃科技,2002,20(8):14-15,23.
 [2] 仲婕. 玫瑰花的新药用价值[J]. 中国医药科学,2011,16(4):9-11.
 [3] 代文琼,刘杰,丁绪杰. 食用玫瑰花栽培技术[J]. 中国农业信息,2016,28(5):58-59.
 [4] 云南省质量技术监督局. 食用玫瑰生产技术规程:DB53/T 671—2015[S]. 北京:中国标准出版社,2015.
 [5] 张帆,李忠海,王利兵,等. 食品中氨基甲酸酯类农药残留的检测方法研究进展[J]. 中国食物与营养,2010,16(2):64-67.
 [6] 李晓颖,张红医,常巧英,等. 气相色谱-四极杆飞行时间质谱准确鉴定常见水果蔬菜中的农药残留[J]. 色谱,2014,32(3):268-277.
 [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 20769—2008[S]. 北

京:中国标准出版社,2008.
 [8] 杨大进,李宁. 2014 年全国食品化学污染物风险监测工作手册[M]. 北京:中国标准出版社,2014:89-94.
 [9] 中华人民共和国农业部. 植物性食品中氨基甲酸酯类农药残留的测定 液相色谱-串联质谱法:NY/T 1679—2009 [S]. 北京:中国标准出版社,2009.
 [10] 李晓东,赵颖,杜姗姗,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测蔬菜中 17 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 化学分析计量,2018,27(1):13-17.
 [11] MEKONEN S, AMBELU A, SPANOGHE P. Pesticide residue evaluation in major staple food items of Ethiopia using the QuEChERS method: a case study from the Jimma Zone [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2014, 33 (6): 1294-1302.
 [12] 黄雪,黄超群,楼成杰,等. 改进的石墨烯分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定茶叶中 15 种氨基甲酸酯类农药的残留量[J]. 食品安全质量检测学报,2017,8(5):1552-1554.
 [13] 高阳,徐应明,孙扬,等. QuEChERS 提取法在农产品农药残留检测中的应用进展[J]. 农业资源与环境学报,2014,31(2):110-117.
 [14] BILEHAL D C, CHETTI M B, SUNG D D, et al. Reversed-phase UPLC method for the determination of monocrotophos, thiram, carbendazim, carb aryl, and imidacloprid pesticides in mango and pomegrante by QuEChERS method [J]. Journal of Liquid Chromatography Related Technologies, 2014, 37(12):1633-1643.
 [15] 达晶,王钢力,曹进,等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定植物性食品中 30 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 色谱,2015,33(8):830-837.
 [16] European Commission Health & Consumer Protection Directorate Directorate. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed: No. SANCO/12571/2013 [S]. York, United Kingdom: The Food and Environment Research Agency, 2014.