液相色谱-串联质谱法测定葱属蔬菜中的噻虫嗪、多菌灵等5种农药的残留量

丁葵英， 许文娟， 郭礼强， 田国宁， 宫小明
（潍坊出入境检验检疫局，山东 潍坊 261041）

摘要： 建立了葱属蔬菜（洋葱、大葱和韭菜）中噻虫嗪、噻虫胺、吡虫啉、多菌灵和虫酰肼5种药物残留量的液相色谱-质谱联用法（LC-MS/MS）检测方法。样品用正己烷饱和的乙腈提取，用QuEChERS方法净化，在正离子模式（ESI+）下，经分时段多反应监测（MRM）模式测定目标化合物，外标法定量。结果表明：5种农药在10~200 μg/L的范围内线性关系较好（r^2>0.99）；在5、10、50 μg/kg 3个添加水平下，平均回收率在77.3%~104.1%之间；5种农药的定量限（LOQ）均满足国际限量要求。该方法灵敏度高、重现性好、定量准确，可用于葱属蔬菜中上述5种农药残留的日常检测。

关键词： 液相色谱-质谱联用；葱属蔬菜；农药残留
中图分类号：S 482　**文献标志码：**A　**文章编号：**1673—1689(2016)04—0424—05

Determination of 5 Pesticide Residues in Allium Vegetables by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

DING Kuiying, *XU Wenjuan*, *GUO Liqiang*, *TIAN Guoning*, *GONG Xiaoming*
(Weifang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weifang 261041, China)

Abstract: A method using liquid chromatography tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) for the analysis of thiamethoxam, carbendazim, clothianidin, imidacloprid and tebufenozid in allium vegetables was established. The target compounds were extracted by acetonitrile saturated with hexane and then purified with the QuEChERS method. Five different pesticides were quantified by external standard method with determination in the mode of electrospray positive ionization (ESI+) and multiple reaction monitoring (MRM). The calibration curves of five pesticides displayed good linearity within the concentration of 10 to 200 μg/L and the squared correlation coefficients (r^2) were larger than 0.99. The average recoveries ranged from 77.3% to 104.1% at three spiked levels of 5, 10, 50 μg/kg. The limits of quantitation (LOQs) for all samples met the international limited standard. This method is sensitive and accurate with good reproducibility, which is suitable for the routine assay of the studied pesticide residues in allium vegetables.

Keywords: liquid chromatography-tandem mass spectrometric, allium vegetables, pesticide residues

收稿日期： 2014-12-03
基金项目： 山东出入境检验检疫局基金项目（SK201284，SK201420）。
作者简介： 丁葵英（1982—），女，山东荷泽人，理学硕士，工程师，主要从事农兽药残留检测。E-mail：dky818@163.com

吡虫啉(imidacloprid)和噻虫嗪及其代谢物噻虫胺为第二代烟碱类广谱杀虫剂,具有良好的胃毒、触杀活性、强内吸传导性和渗透性,对多种蔬菜中的害虫有效[1];多菌灵(carbendazim)是一种苯并咪唑类杀菌剂,在防治病虫害方面具有高效、低毒、广谱、内吸性等特点,但其残效期长[2];虫酰肼(tebufenozide)是美国罗姆-哈斯公司在抑制食肼基础上开发的昆虫生长调节剂[3]。5种农药作为杀菌、杀虫剂和昆虫生长调节剂在葱属蔬菜上应用十分广泛,但由于其残留对人体存在危害,我国及主要贸易国家和地区已经制定了其在蔬菜中的最高残留限量标准[4]。因此,为了保障葱属产品安全和出口经济的发展,建立这5种农药残留的高效、准确的分析方法具有重要意义。

目前,关于蔬菜中多菌灵、虫酰肼、吡虫啉和噻虫嗪及代谢物噻虫胺残留量的单样检测方法较多的是高效液相色谱法[6-7],虽然高效液相色谱法在分析农兽药残留中具有较好的效果[8],但随着农药残留限量要求越来越低,高效液相色谱法在灵敏度、定量限等多方面越来越不能满足要求。同时,液相色谱串联质谱法在农残检测中的应用越来越普遍,蔬菜中上述5种农药残留的液相色谱串联质谱法也分别有报道[9-12],但未见采用此种方法同时测定该5种化合物的报道。葱属蔬菜(青葱、大葱、洋葱等)是一类较为特殊的蔬菜,含有大量不易除去的杂质,干扰农药残留测定结果。液-质联用作为确证检测方法,其准确度和灵敏度较高,能很好的去除基质干扰。因此,作者采用QuEChERS方法进行样品净化,液相色谱-串联质谱法定性和定量分析。该方法操作简单、灵敏度高、定量限低,能满足国内外对这5种农药的限量要求,可有效保障葱属蔬菜及其制品的安全,促进对外经济贸易的发展。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

乙腈(色谱纯):美国Fisher公司产品;正己烷(色谱纯):德国Mer产品);甲酸(色谱纯):美国Tedia产品;氨水(分析纯):天津科密欧产品;无水硫酸镁(分析纯):天津市光复精细化工研究所产品,用前在500 ℃马弗炉内烘5 h,200 ℃时取出冷却备用);中性氧化铝:上海五四化学试剂有限公司产品,石墨炭黑粉、C18和氨丙基粉均购于Agela technologies inc公司。

液相色谱-串联质谱仪(Agilent 6430),配有电喷雾离子源:美国Agilent公司产品;冷冻离心机5810R:德国Eppendof公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 标准储备液(100 mg/L):准确称取10 mg(精确至0.01 mg)噻虫嗪、噻虫胺、吡虫啉、多菌灵和虫酰肼固体标准品,分别置于10 mL小烧杯中,用乙腈溶解后转移至100 mL容量瓶中,定容至刻度线,存储期6个月。

中间工作液:取上述各标准储备液1 mL于100 mL容量瓶中,用乙腈定容至刻度,存储期3个月,使用时用乙腈逐级稀释成所需浓度的工作液。

1.2.2 样品前处理 样品先经撕片(洋葱)或者切段(大葱、青葱和韭菜)后混合均匀,再取出部分有代表性的样品,缩分不少于500 g试样,装入清洁容器内,加封后标明标记。准确称取30.00 g(精确到0.01 g)样品,微波消解(中火,70 s)后转移至100 mL塑料离心管中,加入6 g无水硫酸镁,然后加入15 mL正己烷饱和的乙腈,于均质机上高速均质2min,离心,取上清液3 mL于盛有混合粉末(50 mg石墨炭黑粉、200 mg C18和150 mg PSA粉)的10 mL玻璃试管中,涡旋混合2 min,静止分层后取上清液2 mL于另一干净玻璃试管中,氮气吹干后,用1 mL 20:80的乙腈:水溶解,用1 mL注射器吸取上述溶液过0.22 μm的针头过滤器于进样小瓶中待上机测定。

1.3 LC-MS/MS条件

1.3.1 LC条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18(100 mm×2.1 mm,3.5 μm);柱温:40 ℃,进样量5 μL;流动相A:0.1%甲酸水;流动相B:乙腈;梯度洗脱程序:0.0~3.0 min,35.0%~75.0%B;3.0~6.0 min,75%B;6.1~10 min,35%B。流速为0.3 mL/min,运行时间10 min。

1.3.2 MS/MS条件 离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子(ESI^+)模式扫描;检测方式:多反应监测(MRM)方式扫描;毛细管电压:4 000 v;干燥器流速:10 L/min;温度300 ℃。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

实验采用1.0 mg/L的5种化合物的混合标准

溶液在正离子模式下进行母离子全扫描,选择丰度最大的离子作为母离子,确定其分子离子,5 种化合物的母离子扫描如图 1 所示。

由图 1 可知:5 种物质进入一级质谱后,产生带电荷的离子,质谱图上 *m/z* 呈现:192.0,249.8,255.9,292.1,353.0,根据其相对分子质量,确定多菌灵、噻虫胺、吡虫啉、噻虫嗪、和虫酰肼母离子分别为:192.0,249.8,255.9,292.1,353.0,并通过优化毛细管出口电压,使母离子强度最大。在优化所得各分子离子毛细管出口电压条件下,分别以这些离子作为母离子,对其进行全扫描,带电荷的母离子进入二级质谱后,发生断裂或重排等反应产生不同的碎片离子,选择丰度较大、干扰较少的两个碎片离子作为定性和定量离子,其中丰度较高的作为定量离子,优化各碎片离子的碰撞电压,使每种化合物的碎片离子强度达到最大,最终确定的各化合物的参数见表 1。

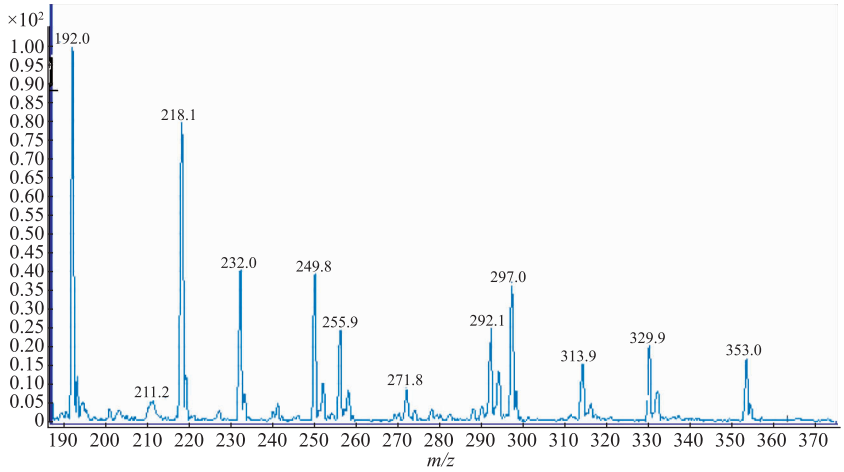


图 1　5 种化合物的母离子扫描图

Fig. 1　Productor scan spectra of 5 compounds

2.2　色谱条件的优化

流动相采用乙腈和体积分数 0.1%的甲酸水,在流动相中加入甲酸,可以为目标化合物提供必需的质子来源,提高离子化效率。用梯度洗脱,不但能提高各化合物的分离度和出峰时间,同时能对仪器进行充分的冲洗,减少仪器干扰,延长其使用寿命。采用表 1 所示的梯度洗脱,可将 5 种目标化合物很好的分离,目标化合物混合标准溶液(10.0 μg/L)的总离子流图(TIC)和提取离子色谱图见图 2。

2.3 前处理条件的优化

提取溶剂不仅影响目标化合物的测定结果,同时对于减少样品杂质对仪器的污染也很重要。虫酰肼、噻虫嗪、噻虫胺和吡虫啉是极性较高的农药,极易溶于甲醇和乙腈;多菌灵不溶于水,所以不考虑使用含水试剂。作者在阴性大葱样品上添加 10、20 μg/kg 的混合标准溶液,对比了乙腈和正己烷饱和的乙腈作为提取溶剂的提取效果,结果表明正己烷饱和的乙腈对各化合物的提取效率远高于乙腈,其中噻虫胺和虫酰肼两种农药,提取效率提高了 20%

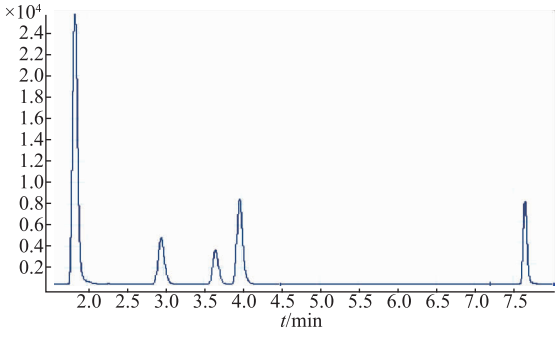


图 2　5 种农药混合标准溶液的总离子流图

Fig. 2　Total ion current chromatogram of the mixed-standard of five pesticides

左右,多菌灵、噻虫嗪和吡虫啉提高 10%。所以,作者选择正己烷饱和的乙腈作为提取试剂,由于提取试剂中加入正己烷降低了基质提取液中的水含量,降低了后续除水的压力,从而提高了目标化合物的提取效率[13]。

作者采用了正己烷饱和的乙腈去除提取液中的脂类非极性杂质,由于葱属蔬菜基质较复杂,提

取液中还含有其它共萃取杂质干扰检测,并对仪器产生一定的污染,因此需要进一步净化处理。在微波消解后,加入6 g无水$MgSO_4$除去基质中的水分,降低上机前的压力,提取后采用改进的QuEChERS方法净化,该净化方法中石墨炭黑粉能很好的去除蔬菜中的色素;C_{18}能去除样品中的油脂、胆固醇、维生素和其他非极性干扰物;PSA具有较强的离子交换能力,能从样品中吸附极性物质,去除样品中有机酸、色素、金属离子和酚类,起到净化的作用,尤其是对于葱、蒜等物质必须通过此步骤先除去部分强极性杂质,同时,根据粉末对目标化合物的吸附,最终确定的净化粉为:50 mg石墨炭黑粉、200 mg C_{18}和150 mg PSA粉。

2.4 基质效应、线性关系、检出限和定量限

大气压喷雾电离离子源质谱分析基质效应较为明显,从而影响样品检测的准确性和重现性,采用对比基质标准曲线与纯溶剂标准曲线斜率的比值来考察基质效应的影响。

配制浓度范围为10~200 μg/L的系列基质标准工作溶液和纯溶剂标准溶液进行同时测定,其质量浓度为10、20、40、80、120、200 μg/L,分别绘制标准曲线,通过计算基质校准曲线斜率与纯溶剂标准曲线斜率的比值来考察方法的基质效应。结果发现:多菌灵的斜率比值为0.56;噻虫嗪的斜率比值为0.89;噻虫胺的斜率比值为0.98;吡虫啉的斜率比值为0.93;虫酰肼的斜率比值为0.62。上述数据表明:吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺3种化合物基质效应相对较弱,而多菌灵和虫酰肼的基质效应较强,这可能与分子结构密切相关。实验中虽尝试改善样品处理方法来减少基质效应,但基质效应都不能完全消除,因此采用阴性基质标准溶液进行定量分析。

5种待测物在阴性洋葱基质中的标准曲线,在10~200 μg/L范围内线性较好,线性方程、相关系数和定量限见表2,以信噪比(S/N)>10确定定量限(LOQ),结果表明:多菌灵和虫酰肼响应值较高,其定量限(LOQ)较低,分别为0.5、1.0 μg/kg;吡虫啉、噻虫胺和噻虫嗪的响应值相对较低,定量限分别为5.0、5.0、2.5 μg/kg。结果见表1。

表1 5种目标化合物的基质标准曲线、相关系数和定量限

Table 1 Linear equations, correlation coefficients and LOQs of the five pesticides

化合物	线性方程	R^2	定量限/(μg/kg)
多菌灵	y=4 821.03x–61.14	0.997	0.5
噻虫胺	y=323.41x–681.23	0.999	5.0
吡虫啉	y=485.67x–974.10	0.999	5.0
噻虫嗪	y=312.50x–66.71	0.996	2.5
虫酰肼	y=2 203.45x–17 247.53	0.996	1..0

2.5 方法的回收率、精密度和重复性

综合考虑各农药的定量限,在阴性洋葱样品中添加5、10、50 μg/kg 3个水平的工作液进行回收率和精密度实验,重复测定6次,采用基质标准计算回收率和相对标准偏差,如表2所示。结果表明,5种农药在3个添加水平下,其平均回收率均在77.3%~104.1%之间,相对标准偏差小于10%,说明该方法具有较好的准确性和重复性。

表2 3个添加水平下5种农药的平均回收率和相对标准偏差(RSD)

Table 2 Recoveries and RSDs of the five pesticides in three spiked levels %

添加水平/(μg/kg)	多菌灵		噻虫胺		吡虫啉		噻虫嗪		虫酰肼	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
5	96.0	6.9	84.0	8.9	100.5	7.6	89.6	4.8	93.9	2.6
10	84.9	7.6	79.4	9.5	90.3	6.0	85.4	7.3	100.3	6.4
50	93.4	5.1	77.3	6.2	104.1	4.0	91.2	4.2	97.4	3.5

2.6 实际样品检测

按相同的样品处理方法对企业报检的一批洋葱样品共24个,进行了提取、净化,在相同的色谱条件下进行5种药物残留量的检测。结果,检出噻虫嗪阳性样品一个,其含量为110 μg/kg,其他样品中5种药物残留均未检出。

3 结 语

研究了基质较为复杂的葱属蔬菜中的噻虫嗪、噻虫胺、吡虫啉、虫酰肼和多菌灵的残留量检测方法,对样品进行了提取、净化,优化了液相色谱-串联质谱检测条件,实现了5种农药同时检测,方法回收率在77.3%~104.1%之间,相对标准偏差小于10%,灵敏度和准确性较高,定量限较低,满足出口葱属蔬菜中5种农药的限量要求,适合葱属蔬菜中多种农药残留的定性和定量分析。

参考文献:

[1] 谢文,钱 艳,丁慧瑛,等. 液相色谱-电喷雾电离三级四极杆质谱法测定茶叶中6种烟碱类农药残留[J]. 分析化学,2009,37(4):495-499.
XIE Wen,QIAN Yan,DING Huiying,et al. Determination of six neonicotinoid pesticides residues in tea samples using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. **Analytical Chemistry**,2009,37(4):495-499.(in Chinese)

[2] 吴永江,朱炜,程翼宇. 液-质联用法测定铁皮石斛和西洋参及制剂中多菌灵残留[J]. 分析化学,2006,34(2):235-238.
WU Yongjiang,ZHU Wei,CHENG Yiyu. Determination of carbendazim residue in dendrobium candidum Wall.ex Lindl,Panax Quinquefolium and their preparations by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. **Analytical Chemistry**,2006,34(2):235-238.(in Chinese)

[3] 周航,王京文,汪万山,等. 虫酰肼和呋喃虫酰肼在土壤中的检测方法及残留动态[J]. 浙江农业学报,2011,23(6):1182-1186.
ZHOU Hang,WANG Jingwen,WANG Wanshan,et al. Detection method and residue dynamic of tebufenozide and furan tebufenozide in soil[J]. **Agriculturae Zhejiangensis**,2011,23(6):1182-1186.(in Chinese)

[4] 食品安全国家标准,食品中农药最大残留限量[S]. 中华人民共和国国家标准,GB 2763-2014.

[5] 郭英娜, 姜茁松, 张敏, 等. 固相萃取富集-高效液相色谱法测定环境水中多菌灵和噻菌灵 [J]. 分析化学,2005,33(3):395-397.
GUO Yingna,JIANG Zhuosong,ZHANG Min,et al. Determination of carbendazim and thiabendazoke in environmental water by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. **Analytical Chemistry**,2005,33 (3):395-397.(in Chinese)

[6] A R Fernandez-Alba,A Valverde,A Agü era,et al. Determination of imidacloprid in vegetables by high-pergormance liquid chromatography with diode-array detection[J]. **Chromatography A**,1996,721(1):97-105.

[7] Hu Y,Yang X,Wang Z,et al. Determination of carbendazim and thiabendazole in tomatoes by solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography and fluorescence detection[J]. 2005,23(6):581-584.

[8] 赵庆喜,薛长湖,徐杰,等. 反相高效液相色谱-柱后衍生法分析检测鱿鱼中的生物胺[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(3):14-19.
ZHAO Qingxi,XUE Changhu,XU Jie,et al. Determination of biogenic amines in squid by reversed phase high-performance liquid chromatography and post-column derivatization[J]. **Food Science and Biotechnology**,2007,26(3):14-19.(in Chinese)

[9] 丁葵英,吕文刚,孙军,等. 分散固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法检测大葱中虫酰肼、涕灭威及其衍生物的农药残留[J]. 分析测试学报,2011,30(3):312-315.
DING Kuiying,LV Wengang,SUN Jun,et al. Determination of tebufenozide,aldicarb-sulfoxide and aldicarb-sulfone in scallion using dispersive solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. **Instrumental Analysis**,2011,30(3):312-315.(in Chinese)

[10] Dé boraTomasini,Maicon R F,Sampaio,et al. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuECHERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. **Talanta**,2012(99):380-386.

[11] Munetomo Nakamura,Yasuko Furumi,Fumiko Watanabe,et al. Determination of carbendazim,thiopjanate,thiophanate-methyl and benomyl residues in agricultural products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. **Food Hyg Saf Sci**,2011,52(3):148-155.

[12] 陈黎, 王金芳, 杜鹏, 等. 韭菜中吡虫啉和啶虫眯残留的微波处理-逆固相分散法净化及液相色谱检测 [J]. 分析化学,2008,36(10):1364-1368.
CHEN LI,WANG Jinfang,DU Peng,et al. Determination of imidacloprid and acetamiprid in leek by reversed phase high performance liquid chromatography with microwave treatment and convenient reverse solid phase dispersion clean-up [J]. **Analytical Chemistry**,2008,36(10):1364-1368.(in Chinese)