

液相色谱-串联质谱法测定果蔬中10种酰胺类农药的残留量

黄超群^{1*}, 谢文¹, 于卓然², 付馨慰³, 李慧思³, 楼成杰¹

(1. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 杭州 310016; 2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135;
3. 浙江工业大学, 杭州 310014)

摘要: **目的** 建立果蔬中甲草胺、乙草胺、异丙甲草胺、敌草胺、啶酰菌胺、环酰菌胺、甲霜灵、吡螨胺、唑虫酰胺和炔苯酰草胺残留量测定的液相色谱-串联质谱方法。**方法** 样品经乙腈提取, 固相萃取净化, 采用C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm)分离, 以0.1%甲酸-5 mmol/L 乙酸铵混合溶液-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 串联质谱测定, 外标法定量。**结果** 10种酰胺类农药在2.0~50 μg/L浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.99, 定量限均为0.01 mg/kg, 方法的回收率范围为71%~98%, 相对标准偏差均不大于9.5%。**结论** 本方法可用于同时检测果蔬中10种酰胺类农药残留量。

关键词: 果蔬; 酰胺类农药; 固相萃取; 液相色谱-串联质谱法

Determination of 10 amide pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HUANG Chao-Qun^{1*}, XIE Wen¹, YU Zhuo-Ran², FU Xin-Wei³, LI Hui-Si³, LOU Cheng-Jie¹

(1. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China;
2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China;
3. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of alachlor, acetochlor, metolachlor, napropamid, boscalid, fenhexamid, metalaxyl, tebufenpyrad, tolfenpyrad, and propyzamide in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Ten amide pesticides were extracted from samples with acetonitrile, cleaned up by solid-phase extraction, separated on a C₁₈ column using 0.1% formic acid-5 mmol/L ammonium acetate solution-methanol as mobile phase, and then determined by tandem mass spectrometry. An external standard method was used for quantitative analysis. **Results** The calibration curves for all amide pesticides were linear in the range of 2.0~50 μg/L, the correlation coefficient was more than 0.99, and the limit of quantitation for all amide pesticides was 0.01 mg/kg. The recoveries were between 71% and 98% with relative standard deviations no more than 9.5%. **Conclusion** This method is suitable for the determination of 10 amide pesticides in fruits and vegetables at the same time.

KEY WORDS: fruits and vegetables; amide pesticides; solid-phase extraction; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 浙江检验检疫局科技计划项目(ZK201307)

Fund: Supported by Science and Technology Project of Zhejiang Inspection and Quarantine Bureau (ZK201307)

*通讯作者: 黄超群, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: hcq@ziq.gov.cn

*Corresponding author: HUANG Chao-Qun, Engineer, Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China. E-mail: hcq@ziq.gov.cn

1 引言

酰胺类农药,主要包括除草剂和杀菌剂。酰胺类除草剂在近代农田化学除草剂中占据重要地位,仅次于有机磷农药而位居世界第二,其应用作物种类与使用面积均居除草剂的前列^[1]。但是,实验研究表明,酰胺类除草剂通过一系列酶反应会生成具有致癌作用的二烷基脲亚胺,其在作物上的残留受到人们广泛关注。同时,酰胺类杀菌剂是近年发展很快且应用前景最广的一类新型农药,主要应用于蔬菜、水果、粮食等农作物的耕种期的杀菌和收获储藏期的防霉^[2],虽然其毒性比杀虫剂、除草剂类农药小,但由于其使用量越来越大,酰胺类杀菌剂及其代谢物的残留问题已成为环境和食品安全等方面关注的热点。为此,各个组织、国家和地区均对果蔬中酰胺类农药的最大残留量有着严格的规定,如对于甲霜灵,欧盟规定在果蔬中最大残留限量为0.05~2 mg/kg^[3],日本肯定列表规定的残留限量为0.05~4 mg/kg;美国40CFR 联邦法规规定限量为0.1~15 mg/kg^[4];香港《食物内除害剂残余规例》规定甲霜灵在果蔬中限量为0.05~10 mg/kg^[5]。我国食品安全国家标准 GB 2763-2014 中规定^[6],甲霜灵在各类果蔬中最大残留量为0.05~5 mg/kg。

目前,已有报道采用气相色谱法^[7,8]、气相色谱-质谱法^[9-12]、液相色谱法^[1]、液相色谱-质谱法^[2]对某一种或几种酰胺类除草剂或杀菌剂进行检测,采用液相色谱-串联质谱法^[13]对其测定的较少。至今尚未有采用液相色谱串联质谱对果蔬中多种酰胺类除草剂和杀菌剂同时进行检测的报道。液相色谱串联质谱法灵敏度高,抗干扰性好,本文旨在建立一种采用液相色谱串联质谱测定果蔬中10种酰胺类农药的检测方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Thermo TSQ Quantum 液相色谱-串联四极杆质谱仪,配电喷雾电离源(ESI)(美国 Thermo Fisher 公司);Surveyor 液相色谱系统(美国 Finnigan 公司);Sorvall Legend mach1.6/R 低速台式离心机和 Micro 17R 微量离心机(美国 Thermo Fisher 公司);固相萃取装置(美国 Supelco 公司);涡旋混匀器(德国 IKA 公

司);超纯水净化系统(美国 Millipore 公司);AE260 电子天平(瑞士 Mettler 公司)。

甲醇、乙腈、甲苯、乙酸铵(色谱纯,西班牙 Scharlab 公司);甲酸(色谱纯,美国 TEDIA 公司);Carb-NH₂ 固相萃取柱(500 mg/500 mg/6 mL, 中国 Agela 公司);乙二胺-N-丙基甲硅烷(PSA)填料(美国 Supelco 公司);C₁₈-H(17 %)填料(北京振翔工贸有限责任公司);NaCl(分析纯,上海试四赫维化工有限公司);0.22 μm 滤膜。

炔苯酰草胺、甲草胺、乙草胺、敌草胺、甲霜灵、异丙甲草胺、环酰菌胺、吡螨胺、啉酰菌胺和唑虫酰胺标准物质(德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH)。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

Thermo C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, i.d., 粒径 3.5 μm); 流动相: 甲醇(A)和0.1 %甲酸-5 mmol/L 乙酸铵混合溶液(B)梯度洗脱; 洗脱程序为: 0~1.00 min, 70%A; 1.01~4.00 min, 70%~95%A; 4.01~9.00 min, 95%A; 9.01~10.00 min, 95%~70%A; 10.01~14.00 min, 70%A; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL。

2.2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 监测方式: 多反应监测; 电喷雾电压: 3200 V; 离子化温度: 300 °C; 毛细管温度: 350 °C; 雾化气、气帘气为高纯氮气; 碰撞气为氦气; 碰撞气压力: 0.2 Pa; 鞘气流速: 6.5 L/min; 辅助气流速: 5.0 L/min。10种酰胺类农药其余多反应监测条件见表1。

2.2.3 样品的提取与净化

准确称取10 g 已均质样品(精确至0.01 g)于50 mL 离心管中,加入20 mL 乙腈和2~3 g NaCl, 涡旋混匀, 离心。准确移取1.0 mL 上层清液, 转移至 Carb-NH₂ 固相萃取柱, 接收流出液, 再用20 mL 乙腈-甲苯溶液(3:1, v:v)洗脱, 接收。接收液浓缩, 1.0 mL 乙腈定容, 过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

3 结果与讨论

3.1 质谱条件的优化

采用10种(浓度均为10 μg/mL)酰胺类农药标准溶液在电喷雾正离子模式下进行母离子全扫描, 确定分子离子峰[M+H]⁺, 调节喷雾电压、离子化温度、透镜补偿等参数, 随后进行子离子扫描, 优化碰撞能量, 每个物质选择两个子离子, 响应值较高的子离子

作为定量离子, 另一个作为辅助定性离子。优化后的参数见表 1。10 种酰胺类农药混合标准溶液的定量离子色谱图见图 1。

3.2 流动相的选择

由于电喷雾质谱的离子化是在溶液状态中电离, 因此流动相的组成除了影响目标化合物的分离外, 还会直接影响到目标化合物的离子化效率。实验中, 比较了不同水相、有机相对于灵敏度的影响, 结果如图 2 所示。可以看出, 采用 0.1%甲酸-5 mmol/L 乙酸铵混合溶液和甲醇作为流动相所得到的离子化效率较其他几种流动相高。因此, 采用 0.1%甲酸-5 mmol/L 乙酸铵混合溶液作为本方法的流动相。

3.3 净化方法的选择

实验中对于果蔬中酰胺类农药测定的净化方法, 比较了固相萃取及目前最常用的 QuEChERS 方法。两种方法回收率变化不大, 均能满足要求。就净化效

果而言, 采用 Carb-NH2 固相萃取柱净化的方法能去除更多杂质, 效果要优于 QuEChERS 法(图 3)。因此本实验采用固相萃取法对样品进行净化。

3.4 基质效应及方法线性、检出限

根据欧盟、日本等国家或组织的限量法规, 选取蚕豆、白菜和葡萄作为研究对象, 考察了三者的基质效应。通过比较经前处理净化后空白基质配制的标准溶液与甲醇配制的标准溶液的峰面积, 发现三者的基质对于被测物的峰面积影响很小, 采用空白基质配制标准溶液中化合物的峰面积为甲醇配制标准溶液的 89%~103%, 基质效应不显著。因此, 用三者的回收实验对方法考察时, 直接采用甲醇配制的标准溶液。10 种酰胺类农药在 2.0~50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好, 线性相关系数为 0.9956~0.9998, 定量限均为 0.01 mg/kg, 完全能满足检测需要。

表 1 10 种酰胺类农药多反应监测条件
Table 1 Multiple reaction monitoring conditions of 10 amide pesticides

化合物	离子对 m/z	碰撞能量/eV	透镜补偿/V
炔苯酰草胺	256.0/189.9*	12	87
	256.0/172.9	22	
甲草胺	269.9/237.9*	7	78
	269.9/162.0	18	
乙草胺	269.9/224.0*	5	78
	269.9/148.0	16	
敌草胺	271.9/170.9*	16	98
	271.9/129.0	14	
甲霜灵	280.1/220.1*	11	97
	280.1/192.1	15	
异丙甲草胺	284.1/252.1*	11	86
	284.1/176.1	21	
环酰菌胺	302.1/97.1*	22	120
	302.1/143.0	31	
吡螨胺	333.9/116.8*	35	102
	333.9/144.9	25	
啉酰菌胺	343.0/307.1*	16	110
	343.0/271.1	29	
唑虫酰胺	384.1/197.0*	23	140
	384.1/169.1	35	

*定量离子对

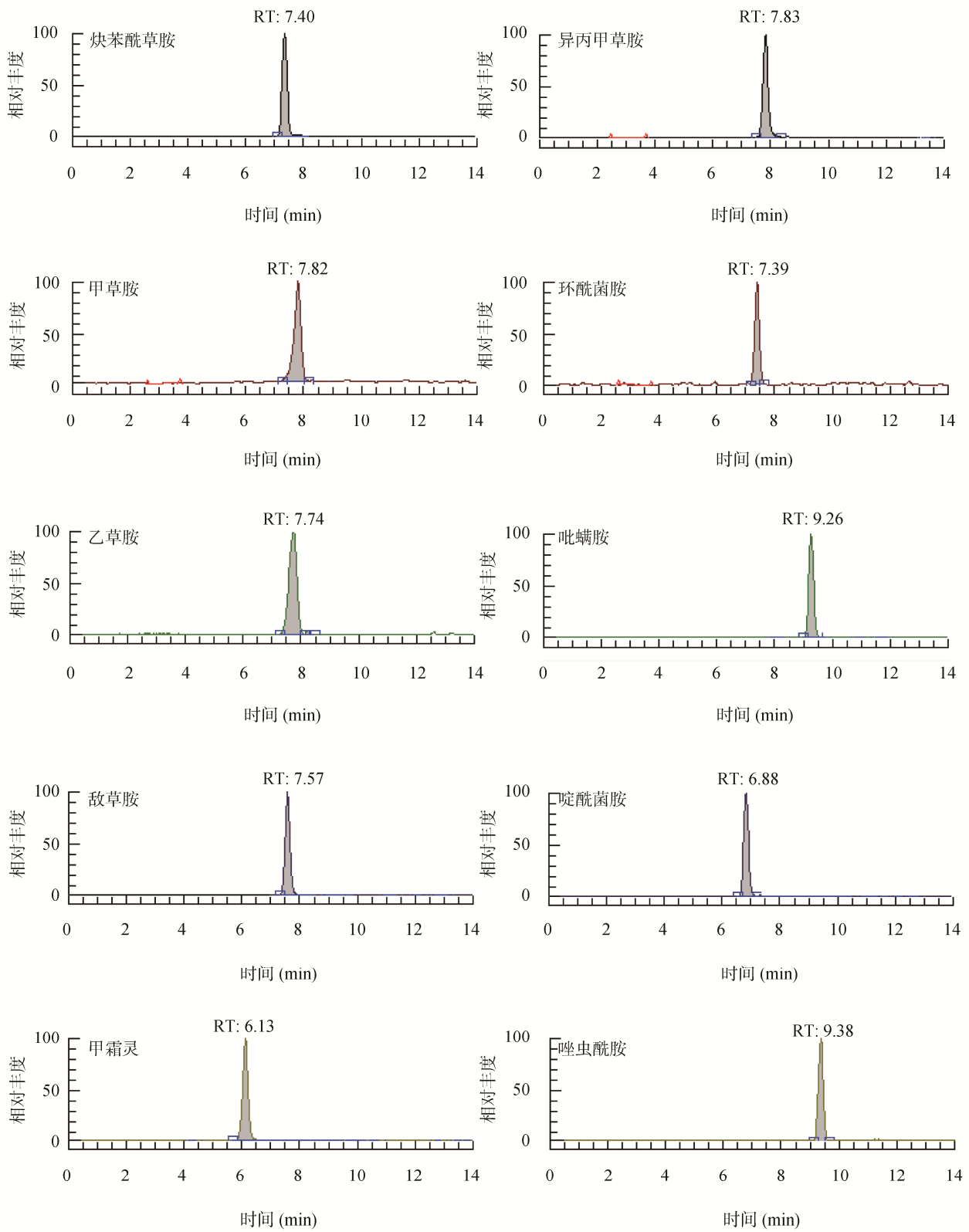


图 1 10 种酰胺类农药定量离子色谱图(浓度: 5.0 $\mu\text{g/L}$)
Fig. 1 Chromatograms of 10 amide pesticides (Concentration: 5.0 $\mu\text{g/L}$)

3.5 方法回收率及精密度

以豆、白菜和葡萄基质进行回收率试验, 对方法的回收率及精密度进行考察。酰胺类农药的加标水平分别为 0.01、0.02、0.10 mg/kg, 每个水平进行 6 次平行实验, 所得回收率及精密度数据见表 2, 满足农药残留分析的要求^[14,15]。

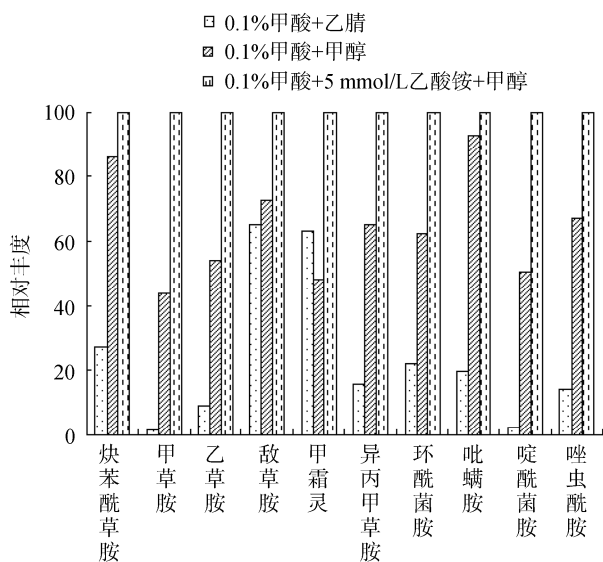


图 2 流动相条件对于被测物峰面积影响
Fig. 2 Impact of mobile phase conditions on measured peak area

4 结 论

本文建立了液相色谱-串联质谱法测定果蔬中 10 种酰胺类农药残留量的方法, 该方法灵敏度高、重现性好, 可进行准确的定性定量分析, 不仅可以满足当前国际上对果蔬中这 10 种酰胺类农药最大残留限量的要求, 保证果蔬的顺利出口, 同时也可农产品领域的农药残留检测提供了技术依据。

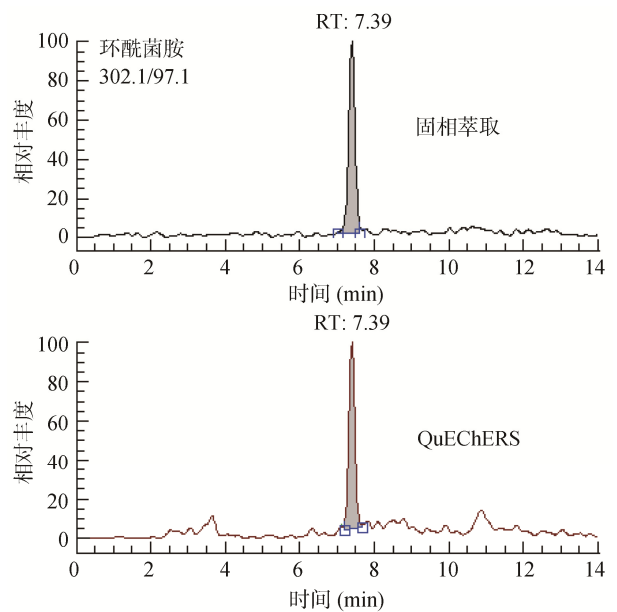


图 3 净化方法的选择
Fig. 3 The choice purification method

表 2 回收率及精密度测定结果(n=6)
Table 2 The measured results of recovery and precision (n=6)

化合物	基质	添加水平/ (mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
炔苯酰草胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	85, 87, 87	5.7, 4.1, 1.6
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	92, 87, 82	2.1, 3.1, 3.2
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	78, 80, 79	7.0, 6.2, 3.2
甲草胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	90, 85, 89	9.5, 5.4, 2.5
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	92, 93, 87	7.1, 6.2, 5.1
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	82, 87, 83	6.2, 4.0, 4.7
乙草胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	82, 78, 81	5.0, 2.6, 1.7
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	90, 86, 81	2.5, 4.1, 3.2
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	82, 79, 80	3.6, 3.4, 3.1
敌草胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	90, 85, 84	6.1, 4.1, 2.5
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	91, 87, 82	8.0, 6.1, 5.7
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	80, 84, 79	4.1, 3.6, 2.5

续表 2

化合物	基质	添加水平/ (mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
甲霜灵	豆	0.01, 0.02, 0.10	82, 82, 90	5.1, 2.6, 4.3
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	95, 92, 87	1.6, 2.1, 4.1
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	89, 95, 92	2.8, 3.0, 1.9
异丙甲草胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	77, 72, 83	4.2, 1.0, 2.1
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	89, 84, 76	5.0, 2.1, 2.0
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	84, 83, 87	1.1, 1.7, 2.0
环吡菌胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	71, 75, 80	3.7, 4.1, 5.3
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	91, 82, 81	4.3, 3.4, 5.0
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	85, 97, 92	7.5, 6.3, 2.4
吡螨胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	85, 79, 80	8.7, 5.0, 8.3
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	91, 88, 82	6.3, 3.4, 5.1
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	78, 76, 83	6.2, 5.3, 4.2
啶吡菌胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	82, 92, 95	3.5, 4.2, 5.3
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	98, 94, 92	3.1, 4.2, 4.0
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	86, 86, 89	1.2, 4.1, 5.1
唑虫酰胺	豆	0.01, 0.02, 0.10	85, 95, 98	3.5, 3.1, 2.8
	白菜	0.01, 0.02, 0.10	91, 94, 92	5.3, 3.1, 4.0
	葡萄	0.01, 0.02, 0.10	90, 88, 95	6.2, 5.1, 4.4

参考文献

[1] 李建中, 储晓刚, 蔡会霞, 等. 高效液相色谱法同时测定大豆中 12 种酰胺类除草剂的残留量[J]. 色谱, 2006, 24(6): 585-588.
Li JZ, Chu XG, Cai HX, *et al.* Simultaneous determination of residues of 12 amide herbicides in soybeans by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2006, 24(6): 585-588.

[2] 王云凤, 王伟, 秦洪健, 等. 液相色谱-质谱法测定果蔬中 10 种酰胺类杀菌剂残留量[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1): 113-116.
Wang YF, Wang W, Qin HJ, *et al.* Determination of 10 amides in fruits and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometer [J]. Food Res Develop, 2010, 31(1): 113-116.

[3] Regulation No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC.

[4] Federal Regulation Part 180 Tolerances and Exemptions for Pesticide Chemical Residues in Food [Z].

[5] 香港. 食物内除害剂残余规例[S].
Hongkong. Regulation of pesticide residues in food [S].

[6] GB 2763-2014 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量 [S].
GB 2763-2014 National food safety standard—Maximum residue limits for pesticides in food [S].

[7] 谢丽琪, 蓝芳, 林黎, 等. 毛细管气相色谱法测定粮谷及油籽中酰胺类除草剂的残留[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 310-313.
Xie LQ, Lan F, Lin L, *et al.* Determination of multiple acetanilide herbicide residues in cereals and oil seeds by capillary gas chromatography [J]. Food Sci, 2008, 29(2): 310-313.

[8] 周瑶敏, 熊艳, 袁林峰, 等. 分散固相萃取法快速测定大米中的酰胺类除草剂[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(8): 113-115.
Zhou YM, Xiong Y, Yuan LF, *et al.* QuEChERS and gas chromatography determination of amid herbicides in rice [J]. J Chin Cereal Oil Assoc, 2010, 25(8): 113-115.

[9] SN/T 1737.1-2006 除草剂残留量检测方法 第 1 部分: 气相色谱串联质谱法测定粮谷及油籽中酰胺类除草剂残留量[S].
SN/T 1737.1-2006 Determination of herbicide residues—Part 1: multiple acetanilide herbicide residues in cereals and oils seeds determined by gas chromatography-mass spectrometry method

- [S].
- [10] SN/T 0712-2010 进出口粮谷和大豆中 11 种除草剂残留量的测定 气相色谱-质谱法[S].
- SN/T 0712-2010 Determination of 11 herbicide residues in cereals and soybean for import and export—GC-MS method [S].
- [11] 谢丽琪, 蓝芳, 林黎, 等. 气相色谱-质谱法同时测定粮谷及油籽中多种酰胺类除草剂残留量[J]. 分析测试学报, 2007, 26(3): 365–367.
- Xie LQ, Lan F, Lin L, *et al.* Simultaneous determination of multiple acetanilide herbicide residues in cereals and oil seeds by capillary gas chromatography [J]. J Instrum Anal, 2007, 26(3): 365–367.
- [12] SN/T 3143-2012 出口食品中苯酰胺类农药残留量的测定 气相色谱-质谱法[S].
- SN/T 3143-2012 Determination of phenylamide pesticides residues in foods for export — Gas chromatography-mass spectrometry [S].
- [13] 陈小龙, 李正翔, 曹赵云, 等. 液相色谱-串联质谱法测定蔬菜和水果中 6 种新型酰胺类杀菌剂的残留量[J]. 色谱, 2013, 31(10): 954–960.
- Chen XL, Li ZX, Cao ZY, *et al.* Determination of six novel amide fungicides in vegetables and fruits by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2013, 31(10): 954–960.
- [14] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
- GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories—Chemical testing of food [S].
- [15] SANCO/12571-2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed [Z].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



黄超群, 工程师, 主要研究方向为农药残留分析。
E-mail: hcq@ziq.gov.cn