

QuEChERS-液相色谱-串联质谱联用法测定草莓中毒死蜱及其代谢物

李 杨^{1,2}, 戴 莹³, 马 帅^{1,2}, 王 蒙^{1,2*}, 韩 平^{1,2}, 冯晓元^{1,2}

(1. 北京农业质量标准与检测技术研究中心, 北京 100097; 2. 农业部农产品质量安全风险评估实验室(北京), 北京 100097; 3. 北京市保健品化妆品技术评审中心, 北京 100055)

摘 要: **目的** 建立草莓中毒死蜱及其代谢物残留检测的 QuEChERS-液相色谱-串联质谱联用方法。**方法** 草莓样品用乙腈提取后所得液经过 QuEChERS 法净化去除杂质。采用 5 mmol 乙酸铵水-甲醇流动相体系进行洗脱, C₁₈ 色谱柱进行色谱分离, 电喷雾正负离子模式电离, 多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM), 外标法定量。**结果** 3,5,6-三氯-2-羟基吡啶(3,5,6-trichloro-2-pyridinol, TCP)、毒死蜱、毒死蜱氧和甲基毒死蜱在 1.0~200 µg/L 浓度范围内线性良好, 相关系数均为 0.999, 检出限为 0.008~0.279 µg/kg, 定量限为 0.026~0.926 µg/kg。在 0.010、0.050 和 0.100 mg/kg 3 个浓度水平的平均回收率为 71.33%~99.43%, 相对标准偏差在 1.51%~5.96%之间。**结论** 本方法操作简便, 耗时较短, 准确度与精密度较好, 适应性广, 容易形成标准化操作, 可用于草莓样品中毒死蜱及其代谢物残留的分析。

关键词: 草莓; 毒死蜱; 代谢物; 液相色谱-串联质谱法; QuEChERS

Determination of chlorpyrifos and its metabolites in strawberry using QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Yang^{1,2}, DAI Ying³, MA Shuai^{1,2}, WANG Meng^{1,2*}, HAN Ping^{1,2}, FENG Xiao-Yuan^{1,2}

(1. Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Beijing 100097, China; 2. Risk Assessment Lab for Agro-products(Beijing), Ministry of Agriculture P.R. China, Beijing 100097, China; 3. Beijing Center for Health Food and Cosmetics Evaluation, Beijing, 100055, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of chlorpyrifos and its metabolites in strawberry using QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** The chlorpyrifos and its metabolites in strawberry were extracted by acetonitrile and purified by QuEChERS. The purified liquid was performed on a C₁₈ column with gradient elution program of 5 mmol ammonium acetate water-methanol. The mass spectrometry was carried out with electrospray ion source in positive and negative mode and multiple reaction monitoring (MRM), and quantified by external standard solution. **Results** 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon and chlorpyrifos-methy had good linear relationships in the range of 1.0~200 µg/L, and the correlation coefficients were 0.999. The limits of detection were 0.008~0.279 µg/kg and the limits of

基金项目: 北京市农林科学院青年科研基金(QNJJ201521)、2017 年国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP2017006)

Fund: Supported by Beijing Agriculture and Forestry Academy Youth Research Fund (QNJJ201521) and 2017 National Agricultural Product Quality Safety Risk Assessment Project (GJFP2017006)

***通讯作者:** 王蒙, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全。E-mail: ameng-001@163.com

***Corresponding author:** WANG Meng, Associate Professor, No.9 Middle Road of Shuguang Huayuan, Haidian District, Beijing 100097, China. E-mail: ameng-001@163.com

quantitation were 0.026~0.926 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries at 3 spiked levels (0.010, 0.050 and 0.100 mg/kg) were 71.33%~99.43%, with the relative standard deviations of 1.51%~5.96%. **Conclusion** The established method is simple, convenient, accurate and sensitive, has wide adaptability, and is easy to form standardized operation, which can be used in the analysis of the residues of chlorpyfos and its metabolites in strawberry samples.

KEY WORDS: strawberry; chlorpyfos; metabolites; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS

1 引 言

毒死蜱是一种广谱杀虫剂，也是目前全世界生产和销售最多的杀虫剂之一，中等毒性，具有触杀、胃毒和熏蒸作用，主要用于防治水稻、小麦、棉花、果树、蔬菜上多种咀嚼式和刺吸式口器害虫。至今，毒死蜱在国内登记品种已达到 1800 个，毒死蜱的生产量以 10%呈逐年上升趋势。毒死蜱对神经系统具有毒性作用，在动物体内能够转换为比其本身毒性强 3000 倍的毒死蜱氧^[1]；在水、空气、土壤、植物及动物体内的初级代谢物 3,5,6-三氯-2-羟基吡啶(3,5,6-trichloro-2-pyridi-nol, TCP)比毒死蜱毒性更强，迁移性也更大^[2,3]；而且毒死蜱和 TCP 有可能存在协同效应。我国尚未制定毒死蜱在草莓中最大残留限量标准(maximum residue limit, MRL)，而蔬菜、水果等规定 MRL 值为 0.05~2 mg/kg 。日本和欧盟都规定毒死蜱在草莓中 MRL 值为 0.2 mg/kg 。目前，国内外关于毒死蜱及其代谢物 TCP 的检测方法主要为薄层色谱法、酶联免疫法、液相色谱法、气相色谱法、气质联用、液质联用、拉曼光谱法等^[4-13]。本研究建立 QuEChERS-液质联用测定草莓中的毒死蜱及其代谢物，方法更加简便、快捷、灵敏度高，为草莓安全和风险评价提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

ACQUITY 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Xevo TQ 三重四极杆质谱仪，配有 ESI 电离源(美国 Waters 公司); 3K30 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); 纯水机(美国 Pall 公司); 0.22 μm 微孔过滤膜(美国 Gelman Laboratory 公司); 乙腈(HPLC 级，美国 Fisher 公司); 醋酸铵(瑞士 Buchs 公司); 无水硫酸镁(分析纯，北京化工厂)，使用前马弗炉 500 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 h; PSA 吸附剂填料(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

毒死蜱、甲基毒死蜱、毒死蜱氧、3, 5, 6-三氯-2-吡啶酚(3,5,6-trichloro-2-pyridinol, TCP)4 种对照品(纯度均大于 95%，德国 Dr Ehrenstorfer 公司)。将 4 种对照品分别配成标准储备液，实验时用甲醇配制成混合标准储备液，并用初始流动相配制成不同质量浓度的标准工作液。

2.2 实验方法

准确称取草莓样品 10 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 具塞聚苯乙烯离心管中，加入 10 mL 乙腈溶液，涡旋振荡 1 min，在离心管中加入 4 g 硫酸镁，1 g NaCl，0.5 g 柠檬酸氢二钠，1 g 柠檬酸钠，涡旋振荡 1 min，以 4000 r/min 的转速 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心 5 min，移取上清液。将 1.5 mL 上清液转移至装有 150 mg 硫酸镁和 25 mg PSA 的具塞离心管中，涡旋振荡 1 min，混匀后以 10000 r/min 的转速 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心 5 min，吸取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，装入样品瓶中，待测。

2.3 液相条件

色谱柱：Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)；色谱柱温度：30 $^{\circ}\text{C}$ ；样品室温度：4 $^{\circ}\text{C}$ ；进样体积：5 μL ；流动相 A：甲醇，流动相 B：5 mmol 乙酸铵水，流速为 0.2 mL/min；梯度条件如表 1 所示：

表 1 液相梯度条件表
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
0	0.2	10	90
1	0.2	90	10
3	0.2	98	2
5	0.2	100	0
5.1	0.2	10	90
7	0.2	10	90

2.4 质谱条件

离子源：电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI)；扫描方式：正离子和负离子模式；监测模式：多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM)；毛细管电压：3.5 kV(正离子模式和负离子模式)；雾化气温度：400 $^{\circ}\text{C}$ ；去溶剂气流量：700 L/h；离子源温度：150 $^{\circ}\text{C}$ 。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的选择

由于毒死蜱及其代谢物的性质比较接近，为了获得

好的分离度需要采用梯度洗脱程序。实验考查了水相中无添加、添加甲酸、添加不同比例乙酸铵对各化合物的分离度和灵敏度的影响, 最终确定以 5 mmol 乙酸铵水-甲醇为流动相, 分离度良好, 峰形尖锐。各个化合物的保留时间和总离子流图见图 1, 图中峰保留时间、化合物名称与表 2 相对应。

3.2 质谱方法的选择

根据 4 种化合物电离方式的不同, 分别采用正离子和负离子模式扫描。分别优化锥孔电压和碰撞能量, 使每种化合物的母离子与特征碎片离子的离子对强度达到最大, 将响应值最大的碎片离子设定为定量离子, 次级相应离子设定为定性离子。4 种化合物的质谱参数见表 2。

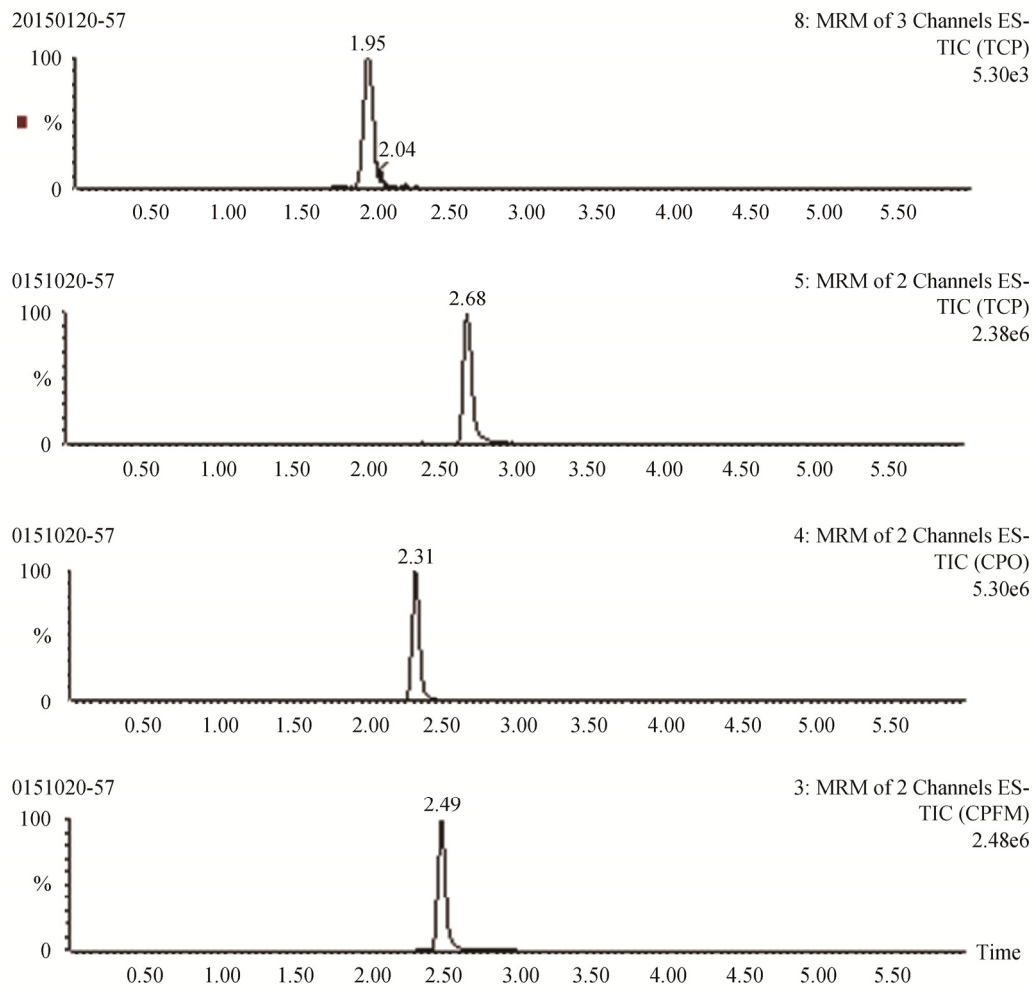


图 1 4 种化合物的总离子流色谱图
Fig. 1 Total ion chromatograms of 4 compounds

表 2 4 种化合物优化的质谱参数
Table 2 Optimized parameters of mass spectrometry of 4 compounds

化合物	保留时间(min)	电离模式	离子对(m/z)	碰撞能量(eV)	锥孔电压(V)
TCP	1.95	ESI ⁻	196 > 35*	15	25
			198 > 37	15	25
毒死蜥	2.68	ESI ⁺	350 > 96.9*	32	27
			350 > 198	20	27
毒死蜥氧	2.31	ESI ⁺	334 > 198*	28	28
			334 > 277.9	18	28
甲基毒死蜥	2.49	ESI ⁺	322 > 125*	20	23
			322 > 289.9	16	23

注: *为定量离子对。

3.3 净化方法的选择

由于草莓中含有柠檬酸、苹果酸、水杨酸、氨基酸以及色素等,而 PSA 是弱阴离子交换剂,能有效吸附糖类物质、茶多酚、脂肪酸及少量色素等极性杂质^[14,15]。本文考察了 C₁₈、PSA、MgSO₄ 3 种净化填料的净化效果,图 2 结果表明加入 PSA+MgSO₄,4 种化合物在草莓基质中的回收率 70%~120%之间,符合要求。

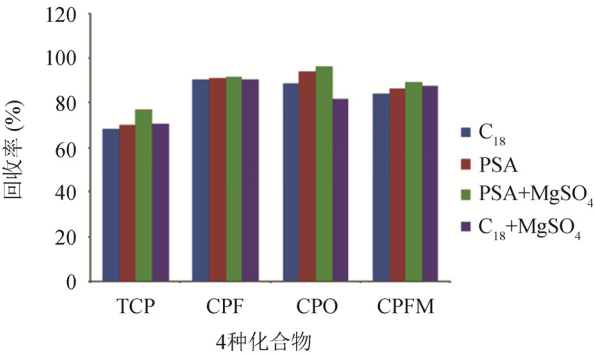


图 2 4 种化合物不同填料的净化效果

Fig. 2 Extraction effect of 4 compounds with different packings

3.4 方法的线性范围与检出限

用甲醇配制 1.0~200 μg/L 系列质量浓度混合标准溶液,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结

果表明:在草莓基质中 4 种化合物在 1.0~200 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好,相关系数均为 0.999,可以满足定量分析要求(见表 3),分别以 3 倍和 10 倍信噪比计算,4 种化合物的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)如表 3 所示

3.5 方法的精密度与准确度

选取经测定不含毒死蜱及其代谢物的草莓样品,分别添加 0.010、0.050 和 0.100 mg/kg 的毒死蜱及其代谢物混合标准溶液,按照所建立的方法进行处理和测定。每个添加水平样品做 6 个平行,测定评价回收率及相对标准偏差 RSD,4 种化合物的回收率均在 70%~100%之间(见表 4),相对标准偏差小于 6%。

3.6 实际样品的测定

从超市购买了不同产地和品种的草莓,测定其中毒死蜱、毒死蜱氧、TCP 和甲基毒死蜱的含量,结果所有样品中均未检出这 4 种目标物。

4 结 论

本文建立了一种以 QuEChERS-液质联用技术法快速检测草莓样品中毒死蜱及其代谢物的方法。建立的方法简单,缩短前处理时间,方法的准确度与精密度较好,适用性广,容易形成标准化操作,可用于草莓样品中毒死蜱及其代谢物残留的分析。

表 3 草莓基质中的线性关系、检出限和定量限
Table 3 Equation, LOD and LOQ of 4 compounds in strawberry

化合物	线性方程	线性范围(μg/mL)	相关系数(r)	检出限(μg/kg)	定量限(μg/kg)
TCP	$Y=3.60X-0.06$	1~100	0.999	0.279	0.926
毒死蜱	$Y=2936.33X+3352.27$	1~200	0.999	0.016	0.052
毒死蜱氧	$Y=7343.49X+3600.40$	1~200	0.999	0.008	0.026
甲基毒死蜱	$Y=3144.69X+487.24$	1~200	0.999	0.047	0.158

表 4 4 种化合物在草莓中的加标回收率及相对标准偏差(n=6)
Table 4 Recoveries and RSDs of 4 compounds in strawberry (n=6)

化合物	浓度	0.010 mg/kg		0.050 mg/kg		0.100 mg/kg	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
TCP		71.33	3.14	77.13	4.97	72.02	5.06
毒死蜱		87.83	5.96	93.17	3.78	94.58	4.90
毒死蜱氧		94.67	3.64	99.43	4.10	98.77	1.85
甲基毒死蜱		93.67	2.36	98.93	1.51	98.68	2.05

参考文献

- [1] 凌云, 王茜, 雍炜, 等. 气相色谱-质谱/质谱法检测蔬菜中的毒死蜱及其代谢物[J]. 色谱, 2009, 27(1): 78–81.
Ling Y, Wang H, Yong W, *et al.* Determination of chlorpyrifos and its metabolite in vegetables using gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2009, 27(1): 78–81.
- [2] 孙宝利, 陕红, 袁志华. 毒死蜱及其主要代谢物 3,5,6-TCP 在土壤中的降解特征及影响因素[J]. 农业环境与发展, 2012, 6: 77–82.
Sun BL, Shan H, Yuan ZH. Degradation characteristics and influencing factors of chlorpyrifos and its main metabolites 3,5,6-TCP in soil [J]. Agro-Environ Dev, 2012, 6: 77–82.
- [3] Baskaran S, Bolan N S, Rahman A, *et al.* Effect of exogenous carbon on the sorption and movement of atrazine and 2,4-D by soils [J]. Soil Res, 1996, 34: 609–622.
- [4] 戴莹, 王纪华, 韩平, 等. 食品中毒死蜱残留量检测技术进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2696–2701.
Dai Y, Wang JH, Han P, *et al.* Recent development of detection methods for chlorpyrifos residues in food [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(7): 2696–2701.
- [5] 孙宝利, 曾希柏. 高效液相色谱法同时测定土壤中毒死蜱残留及其有毒代谢物 3,5,6-TCP [J]. 分析试验室, 2011, 30(8): 19–22.
Sun BL, Zeng XB. Determination of chlorpyrifos residue and its toxic metabolite product 3,5,6-TCP in soil by HPLC [J]. Chin J Anal Lab, 2011, 30(8): 19–22.
- [6] 韩畅, 朱鲁生, 王军, 等. HPLC 测定水体中毒死蜱及其有毒降解产物 TCP [J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(7): 1552–1556.
Han C, Zhu LS, Wang J, *et al.* Residue analysis of chlorpyrifos and its toxic metabolite TCP in water by HPLC [J]. J Agro-Environ Sci, 2009, 28(7): 1552–1556.
- [7] 谢慧, 朱鲁生, 王军, 等. 水体和甘蓝及土壤中毒死蜱残留检测方法 [J]. 环境化学, 2012, 31(8): 1268–1274.
Xie H, Zhu LS, Wang J, *et al.* Determination of chlorpyrifos residues in water, cabbage and soil by GC-FPD [J]. Environ Chem, 2012, 31(8): 1268–1274.
- [8] 吴南村, 张群, 刘春华, 等. 凝胶渗透色谱-固相萃取净化-气相色谱-串联质谱检测白胡椒中的毒死蜱和溴氰菊酯残留 [J]. 农药, 2016, 55(12): 903–905.
Wu NC, Zhang Q, Liu CH, *et al.* Determination of chlorpyrifos and deltamethrin residues in white pepper by combined gel permeation chromatography and solid phase extraction with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Agrochemicals, 2016, 55(12): 903–905.
- [9] 吴岩, 姜冰, 徐义刚, 等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中 16 种农药残留 [J]. 色谱, 2015, 33(3): 228–234.
Wu Y, Jiang B, Xu YG, *et al.* Determination of 16 pesticide residues in fruits and vegetables by QuEChERS-liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2015, 33(3): 228–234.
- [10] 杨宇, 徐田锋, 彭彦昆, 等. 基于拉曼光谱与吸附剂预浓缩联用的毒死蜱农药快速检测方法研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8): 3034–3038.
Yang Y, Xu TF, Peng YK, *et al.* Rapid detection of chlorpyrifos pesticide by raman spectroscopy combined with adsorbent preconcentration pretreatment [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(8): 3034–3038.
- [11] 徐敦明, 陈安良, 余向阳, 等. 超临界流体萃取气相色谱法测定鱼肉中的毒死蜱残留 [J]. 分析化学, 2005, 33(4): 451–454.
Xu DM, Chen AL, Yu XY, *et al.* Determination of chlorpyrifos in fish tissue by supercritical fluid extraction and gas chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2005, 33(4): 451–454.
- [12] 沈燕, 刘贤进, 孙星, 等. 液质联用法检测小麦粉中毒死蜱、甲氧菊酯和啉霉胺残留 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27(6): 1376–1379.
Shen Y, Liu Xian J, Sun X, *et al.* Determination of chlorpyrifos, renpropathrin and pyrimethanil residues in wheat flour by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2011, 27(6): 1376–1379.
- [13] 谭学才, 吴佳雯, 胡琪, 等. 基于石墨烯的毒死蜱分子印迹电化学传感器的制备及对毒死蜱的测定 [J]. 分析化学, 2015, 43(3): 387–393.
Tan XC, Wu JQ, Hu Q, *et al.* Electrochemical sensor for determination of chlorpyrifos based on graphene modified electrode and molecularly imprinted polymer [J]. Chin J Anal Chem, 2015, 43(3): 387–393.
- [14] 董晓倩, 刘松南, 刘蕊, 等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定茶叶中的丁醚脒 [J]. 食品科学, 2017, 38(8): 244–250.
Dong XQ, Liu SN, Liu R, *et al.* Determination of diafenthiuron residue by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry in Tea [J]. Food Sci, 2017, 38(8): 244–250.
- [15] 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].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



李 杨, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。
E-mail: ly20090902@126.com



王 蒙, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全与标准。
E-mail: ameng-001@163.com