

QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定 牛奶中氨基甲酸酯类农药残留量

薛荣旋*, 黄 诚, 温伊蕾, 丘福保
(中山市疾病预防控制中心, 中山 528403)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定牛奶中5种氨基甲酸酯类农药的方法。**方法** 样品经乙腈提取、氮吹浓缩、QuEChERS 净化, 高效液相色谱-串联质谱法测定, 采用外标法定量。**结果** 5种氨基甲酸酯类农药在2.00~200 µg/kg 范围内线性关系良好($r>0.999$); 方法检出限为0.50~3.00 µg/kg, 定量限为1.50~10.00 µg/kg; 加标水平为0.010~0.050 mg/kg时, 回收率为83.6%~108%, 相对标准偏差为1.6%~15.6%。**结论** 该方法简便快捷、灵敏度高, 适用于牛奶中氨基甲酸酯类农药的检测。

关键词: QuEChERS; 氨基甲酸酯; 高效液相色谱-串联质谱法; 牛奶

Determination of carbamate pesticides residues in milk by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XUE Rong-Xuan*, HUANG Cheng, WEN Yi-Lei, QIU Fu-Bao

(Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, Zhongshan 528403, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 5 kinds of carbamate pesticides residual in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by acetonitrile, concentrated by nitrogen blowing, purified by QuEChERS, determined by HPLC-MS/MS, and quantified by external standard method. **Results** Five carbamate pesticides had good linear relationships in the range of 2.00–200 µg/kg ($r>0.999$). The limits of detection were 0.50–3.00 µg/kg, and the limits of quantitation were 1.50–10.00 µg/kg. When the standard levels were 0.010–0.050 mg/kg, the recoveries were 83.6%–108%, and the relative standard deviation were 1.6%–15.6%. **Conclusion** This method is accurate, sensitive and suitable for the simultaneous analysis of carbamate pesticides in milk.

KEY WORDS: QuEChERS; carbamate; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; milk

0 引 言

氨基甲酸酯类农药是针对有机氯和有机磷农药的缺点而开发出的一种新型广谱杀虫、杀螨、除草剂, 具有效用高、残留期短的优点, 在农业、林业和牧业等方面得到

了广泛的应用。然而随着使用量和范围的扩大, 该类农药残留对人类健康和环境造成的危害越来越受到关注^[1-2]。

我国在 GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量标准》^[3]中规定生乳类中涕灭威及其代谢物总和的最大残留量为 0.01 mg/kg, 欧盟规定奶和奶制

*通信作者: 薛荣旋, 副主任技师, 主要研究方向为食品中农药和兽药残留测定。E-mail: 121759896@qq.com

*Corresponding author: XUE Rong-Xuan, Associate Chief Technician, Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, No.70, Changjiang Road, East District, Zhongshan 528403, China. E-mail: 121759896@qq.com

品中涕灭威的最大残留量为 0.01 mg/kg^[4], 日本肯定列表^[5]规定奶中涕灭威砒最大残留量为 0.02 mg/kg, 我国农业部第 250 号公告^[6]禁止在食品动物中使用克百威。在 2019 年召开的“健康中国乳品助力”专家研讨会上, 中国农业大学教授任发政认为, 牛奶是最适合人类的营养来源之一, 也是合理膳食中极为重要的组成部分。因此, 需要建立牛奶中氨基甲酸酯类农药分析方法。

目前国内外对氨基甲酸酯类农药残留分析报道有中药^[7]、果蔬^[8-10]、饮料^[11]等, 但在动物源性食品中氨基甲酸酯类农药残留分析^[12-15]的研究较少, 商检行业推荐性标准^[14]和国家食品安全标准^[15]对动物源性食品采用高效液相色谱-串联质谱法检测, 牛奶提取液的净化方式均为 C₁₈ 固相萃取小柱。近年来 QuEChERS 净化体系广泛应用于检测蔬果中各类农药残留测定分析, 是农产品检测的快速样品前处理技术。QuEChERS 净化体系具有试剂用量少、快速等优点, 克服固相萃取小柱净化过程中有机溶剂用量大、时间长等缺点。

本研究采用 QuEChERS 前处理技术, 结合高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中克百威、3-羟基克百威、涕灭威、涕灭威砒、涕灭威亚砒 5 种氨基甲酸酯类农药的残留量, 以期对相关检测和日常监管工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

AB Sciex 4000 QTRAP 型高效液相色谱-串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); 3-30K 超型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); N-EVAPTM 112 型氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司)。

标准品: 克百威(CAS: 1563-66-2, 含量 100 mg/L)、3-羟基克百威(CAS: 16655-82-6, 含量 100 mg/L)、涕灭威(CAS: 116-06-3, 含量 100 mg/L)、涕灭威砒(CAS: 1646-88-4, 含量 100 mg/L)、涕灭威亚砒(CAS: 1646-87-3, 含量 100 mg/L)(上海安普公司)。

甲酸(色谱纯, 德国 CNW 公司); 乙腈(色谱纯, 德国默克股份两合公司); 甲酸铵(优级纯, 美国 ROE SCIENTIFIC 公司); 无水硫酸镁、PSA、C₁₈、GCB(博纳艾杰尔科技公司); 氯化钠、无水硫酸钠(分析纯, 广州化学试剂厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液及试剂配制

标准储备溶液: 准确吸取各标准液 1000 μ L, 用乙腈配制浓度为 10.00 μ g/mL 的混合溶液, 4 $^{\circ}$ C 下避光保存。取适量标准工作液用 0.1% 甲酸水配成标准系列曲线, 临用时配制。

0.1% 甲酸水: 吸取 1.00 mL 甲酸后超纯水定容至

1000 mL。

0.01 mol/L 甲酸+6 mmol/L 甲酸铵溶液: 准确称取 38.7 mg 甲酸铵, 溶解于超纯水中, 加入 380 μ L 甲酸, 超纯水定容至 1000 mL。

1.2.2 样品前处理

称取 5.00 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 2.5 g 氯化钠和 10 mL 乙腈, 于涡旋混合器上混合 30 min, 在 4 $^{\circ}$ C 下 8000 r/min 离心 5 min, 取 5.00 mL 上清液氮吹浓缩至 1.00 mL, 待净化。

将上述提取液加入净化剂中(50 mg PSA+50 mg C₁₈), 涡旋混匀 1 min 后, 10000 r/min 离心 5 min, 取 200 μ L 上清液和 800 μ L 0.1% 甲酸水混匀后上机检测。

1.2.3 仪器条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 样品温度: 15 $^{\circ}$ C; 进样体积: 5 μ L; 流速为 0.35 mL/min; 流动相为 A: 0.1% 甲酸水, B: 乙腈。梯度洗脱: 0~2.0 min, 5% B 液线性增加至 20%; 2.1~4.0 min, B 液保持 20%; 4.1~6.0 min, B 液线性增加至 95%, 6.1~7.5 min B 液保持 95%; 7.6~8.0 min, 线性降至 5%。

离子化模式: 电喷雾电离正离子模式 (electronic spray ion, ESI+); 质谱扫描方式: 多反应离子监测(multiple reaction monitoring, MRM); 气帘气压力(curtain gas, CUR) 30 psi; 喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 550 $^{\circ}$ C; 雾化气压力 GS1: 40 psi; 辅助加热气压力 GS2: 50 psi; 碰撞气: Medium。5 种目标化合物的定性定量离子以及对应的碰撞能量(collision energy, CE)、去簇电压 (declustering potential, DP)见表 1。

2 结果与分析

2.1 净化体系的选择

由于高效液相色谱-串联质谱仪的灵敏度较高, 通常对氨基甲酸酯类农药的处理都比较简单。仪器灵敏度的提高会造成基质效应的升高, 在前处理条件中, 一般需要经过净化处理以减低样品的基质效应, 提高方法的灵敏度和准确性。标准溶液总离子流图见图 1。

QuEChERS 净化法利用吸附剂填料与基质中的杂质相互作用, 从而达到除杂净化的目的。近年来常被广泛应用于农产品的快速样品前处理净化, 具有分析速度快、操作简单等优点。QuEChERS 法中常用的吸附剂有 PSA、C₁₈、GCB 等, PSA 和 C₁₈ 可以去除基质中的脂肪、有机酸、糖类和酚类等; GCB 对色素和基质中某些平面对称结构物质有吸附作用。在实验过程中, 采用 4 种 QuEChERS 体系组合: 体系 1 含 50 mg PSA; 体系 2 含 50 mg C₁₈; 体系 3 含 50 mg PSA 和 50 mg C₁₈; 体系 4 含 50 mg PSA、50 mg C₁₈

和 7.5 mg GCB。

研究中分别采用这 4 个体系对纯牛奶中克百威、3-羟基克百威、涕灭威及其代谢物提取效率进行研究。结果表明, 在 0.05 mg/kg 的加标浓度下 QuEChERS 体系 3 的回收率表

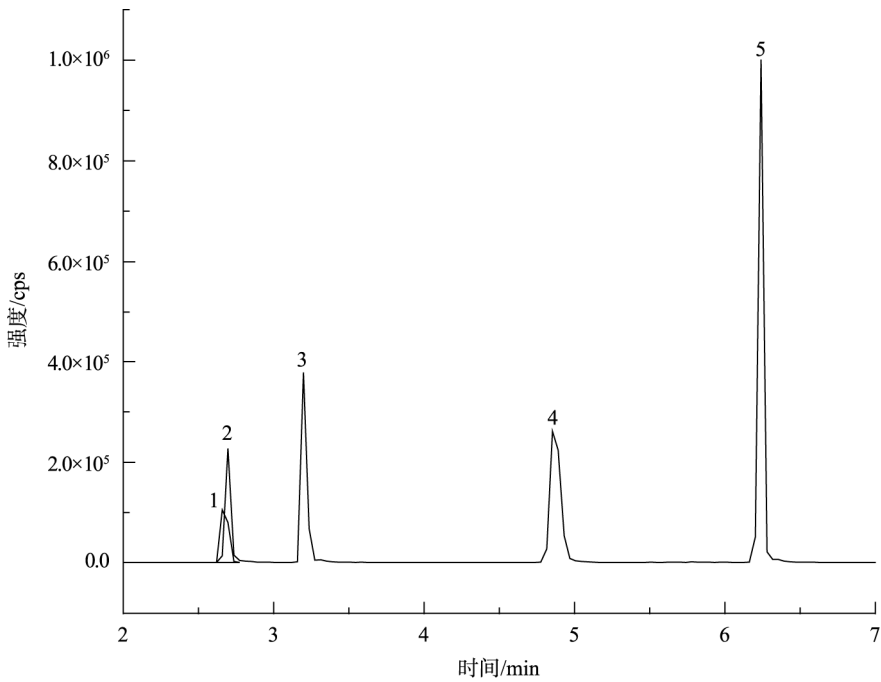
现最优, 5 种氨基甲酸酯类农药的回收率为 93.6%~113%。QuEChERS 体系 1、2、3 净化后, 3-羟基克百威的回收率均低于 90%, 其他农药的回收率影响差异不大, 因此本研究采用的净化剂组合为 PSA 和 C₁₈用量各为 50 mg。

表 1 5 种氨基甲酸酯类农药质谱参数

Table 1 Mass spectrometric parameters for 5 kinds of carbamate pesticides

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV	去簇电压/eV
克百威	222.2	165.1*	16	30
		123.2	29	30
3-羟基克百威	255.1	220.0*	15	30
		181.1	22	30
涕灭威	207.0	131.9*	10	30
		89.0	19	30
涕灭威砒	240.1	86.0*	27	30
		148.0	19	30
涕灭威亚砒	224.0	132.0*	15	30
		88.9	25	30

注: *为定量离子。



注: 1: 涕灭威; 2: 涕灭威亚砒; 3: 涕灭威砒; 4: 3-羟基克百威; 5: 克百威。

图 1 5 种氨基甲酸酯类农药混合标准溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of standard solution mixed with 5 carbamate pesticides

2.2 流动相的优化

在流动相中加入少量的酸能够改善正离子模式中目标物的离子化效率,本研究比较了 0.1%甲酸溶液-乙腈、0.1%甲酸溶液-甲醇、0.1 mol/L 甲酸+6 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈等不同的流动相。结果表明 0.1%甲酸溶液-乙腈响应值较 0.1%甲酸溶液-甲醇高,分离效果较好;但对比 0.01 mol/L 甲酸+6 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈,0.1%甲酸溶液-乙腈检测的目标物灵敏度较低,且随着流动相中酸度的提高,质谱图中基线噪音逐渐升高,质谱图碎片峰较多。因此考虑流动相中降低甲酸浓度,加入少量甲酸铵增强流动相的极性,缓冲流动相 pH 值。结果表明,0.01 mol/L 甲酸+6 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈流动相洗脱程序色谱峰分离良好,灵敏度能够满足分析要求。

2.3 线性范围与检出限、定量限

采用 1.2.3 仪器方法条件分析后,以各目标组分的浓度与对应的峰面积绘制标准曲线,根据 3 倍信噪比和 10 倍信噪比分别确定方法检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ),结果见表 2。从表 2 可以看出 5 种氨基甲酸酯类农药在 2.00~200 µg/kg 浓度范围内具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.999, LOD 为 0.50~3.00 µg/kg, LOQ 为 1.50~10.00 µg/kg,方法的灵敏度满足痕量分析的要求。

2.4 方法回收率与精密度

在已知空白纯牛奶样品中添加不同浓度的 5 种氨基甲酸酯类农药,添加水平参照实验室质量控制规范要求,按照优化后的方法进行实验,每个浓度做 6 个平行样,测定不同浓度下的加标平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs),结果见表 3。从表 3 可以看出,5 种氨基甲酸酯类农药在 0.010~0.050 mg/kg 的加标水平下,平均回收率为 83.6%~108%,相对标准偏差为 1.6%~15.6%,方法的准确度和精密度满足农药残留分析的要求,可应用于牛奶中 5 种氨基甲酸酯类农药残留的检测分析。

2.5 基质效应的评价

在最优化的条件下,分别将 2.00、20.0、200 µg/kg 3 个浓度水平的混合标准溶液加入到空白样品中,按 1.2.2 实验条件进行样品的前处理后,采用液相色谱-串联质谱仪进行测定。基质效应(matrix effects, ME)主要通过测定分析物在同浓度的加标空白基质提取液和纯溶剂标准溶液中的离子信号强度,通过计算二者的比值进行评价。

公式为 $ME(\%)=(B/A-1)\times 100\%$ 。
式中 B 为基质标准曲线斜率,A 为溶剂标准曲线斜率。其中 ME > 50%为强基质效应;20%~50%为中等基质效应;0%~20%为弱基质效应。结果表明,在本研究条件下,5 种氨基甲酸酯类农药的基质效应均<20%,说明存在基质效应,但影响不大。

表 2 5 种氨基甲酸酯类农药线性方程、相关系数、检出限及定量限
Table 2 Linear equations, correlation coefficients (r), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of 5 carbamate pesticides

组分	线性范围/(µg/kg)	线性方程	相关系数	检出限/(µg/kg)	定量限/(µg/kg)
克百威	2.00~200.00	$Y=119000X+106000$	0.9994	0.50	1.50
3-羟基克百威		$Y=47800X+31700$	0.9992	1.00	3.00
涕灭威		$Y=24500X+46700$	0.9991	3.00	10.00
涕灭威砒		$Y=34600X+25500$	0.9993	1.00	3.00
涕灭威亚砒		$Y=43000X+39100$	0.9990	1.00	3.00

表 3 5 种氨基甲酸酯农药的加标回收率及相对标准偏差(n=6)
Table 3 Recoveries and relative standard deviations of 5 kinds of carbamate pesticides (n=6)

农药组分	加标浓度/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
克百威	0.010	84.4	15.6
	0.020	96.4	5.2
	0.050	107	8.2
3-羟基克百威	0.010	92.6	2.4
	0.020	101	1.6
	0.050	101	3.9

表 3(续)

农药组分	加标浓度/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
涕灭威	0.010	95.6	3.5
	0.020	97.5	2.9
	0.050	105	6.5
涕灭威砒	0.010	89.4	4.3
	0.020	108	3.4
	0.050	103	2.2
涕灭威亚砒	0.010	83.6	5.9
	0.020	91.3	4.4
	0.050	96.3	3.2

2.6 实际样品的检测

应用所建立的方法在超市随机购买了不同牌子一共 8 份纯牛奶样品进行检测, 结果均未检出上述 5 种氨基甲酸酯类农药残留。

3 结 论

本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法同时定性定量检测牛奶中克百威、3-羟基克百威、涕灭威、涕灭威砒、涕灭威亚砒的方法。采用改进的 QuEChERS 方法进行前处理, 可有效去除有机酸、脂肪等杂质, 方法的检出限和定量限均满足痕量残留分析的要求。本方法前处理简单、耗时少、成本低, 可用于牛奶中 5 种氨基甲酸酯类农药残留的快速检测。

参考文献

- [1] 隋海霞, 刘兆平, 张磊. 毒理学关注阈值方法在农药活性成分转化产物慢性膳食风险评估中的应用[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(6): 569–572.
- SUI HX, LIU ZP, ZHANG L. Application of toxicological concern threshold method in chronic dietary risk assessment of pesticide active ingredient conversion products [J]. Chin J Pre Med, 2013, 47(6): 569–572.
- [2] SANDHYA M, ZHANG WP, LIN ZQ, *et al.* Carbofuran toxicity and its microbial degradation in contaminated environments [J]. Chemosphere, 2020, 259: 127419.
- [3] GB 2763—2019 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量标准[S].
- GB 2763—2019 National food safety standard-Maximum limits for pesticide residues in food [S].
- [4] Pesticides EU-MRLs Regulation (EC) No 396/2005 [EB/OL]. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.Current.MRL&language=EN>.
- [5] Maximum residue limits (MRLs) list of agricultural chemicals in foods. [EB/OL]. <http://db.ffcr.or.jp/front/>.
- [6] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第 250 号[Z]. 2003–11–20.
- Ministry of Agriculture. No. 250 Bulletin of the ministry of agriculture of the people's republic of the people's republic of China [Z]. 2003–11–20.
- [7] 董冰岩, 沈璐璐, 章海啸. 超高效液相色谱法测定陈皮、蒲公英根中 2 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 农药, 2020, 59(4): 281–283.
- DONG BY, SHEN LL, ZHANG HX. Determination of two carbamate pesticides residues in *Pericarpium citri* Reticulatae and dandelion root by UPLC [J]. Agrochemicals, 2020, 59(4): 281–283.
- [8] 杭宇宇, 吴珺玮, 宋鑫, 等. QuEChERS 提取-超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中氨基甲酸酯类农药的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2020, 56(1): 60–63.
- HANG XY, WU JW, SONG X, *et al.* Determination of carbamate

pesticides residues in vegetables by UPLC-MS/MS with QuEChERS extraction [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2020, 56(1): 60–63.

- [9] 褚乾梅, 黄大明, 朱梦洁, 等. 液质联用法测定果蔬中氨基甲酸酯类农药残留[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(21): 163–166.
- CHU QM, HUANG DM, ZHU MJ, *et al.* Determination of carbamate pesticides in vegetables and fruits by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. Hubei Agric Sci, 2019, 58(21): 163–166.
- [10] 丁润梅, 吴冰, 田大年. QuEChERS-气相色谱-质谱联用法测定温棚蔬菜中 7 种氨基甲酸酯及 5 种拟除虫菊酯农药残留[J]. 现代预防医学, 2018, 45(17): 94–98.
- DING RM, WU B, TIAN DN. Determination of 7 carbamates and 5 pyrethroids pesticide residues in greenhouse vegetables by QuEChERS-GC-MS [J]. Mod Prev Med, 2018, 45(17): 94–98.
- [11] ALINA D, HANA D, JAN F, *et al.* Simultaneous determination of three carbamate pesticides using vortex-assisted liquid-liquid microextraction combined with HPLC-ampereometric detection [J]. Microchem J, 2019, 150: 107071.
- [12] 张帆, 黄志强, 张莹, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 20 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 色谱, 2010, 4(28): 348–355.
- ZHANG F, HUANG ZQ, ZHANG Y, *et al.* Determination of 20 carbamate pesticides in food by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 4(28): 348–355.
- [13] 钟水桥, 梁美艳. EMR-Lipid-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中多种氨基甲酸酯类农药残留量[J]. 现代食品, 2020, (6): 170–172.
- ZHONG SQ, LIANG MY. Determination of multiple carbamate pesticide residues in pork by EMR-Lipid-UPLC-MS/MS [J]. Mod Food, 2020, (6): 170–172.
- [14] SN/T 2560–2010 进出口食品中氨基甲酸酯类农药残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法[S].
- SN/T 2560–2010 Determination of carbamate pesticides residues in foodstuffs for import and export-LC-MS/MS method [S].
- [15] GB 23200.90–2016 食品安全国家标准 乳及乳制品中多种氨基甲酸酯类农药残留量的测定 液相色谱-质谱法[S].
- GB 23200.90–2016 National food safety standard-Determination of multiple carbamate pesticides residues in milk and dairy products Liquid chromatography-mass spectrometry [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



薛荣旋, 副主任技师, 主要研究方向为食品中农药和兽药残留测定。
E-mail: 121759896@qq.com