

亲水作用色谱结合超高效液相色谱-三重四级杆质谱法检测蔬菜水果中 8 种高极性农药残留

金玉娥, 徐骞, 薛黎明, 乐孙阳, 熊丽蓓, 唐艳, 万静宜, 汪国权

上海市疾病预防控制中心化学品毒性检定所, 上海 200336



DOI 10.11836/JEOM21439

摘要:

[背景] 高极性农药在我国的产量和用量均占世界第一, 需要一个速度快、通量大、准确度高的方法来测定食品中该类农药残留。

[目的] 利用超高效液相色谱-三重四级杆质谱, 建立蔬菜水果中 8 种高极性农药(矮壮素、百草枯、野燕枯、灭蝇胺、霜霉威、草甘膦、氨甲基膦酸和草铵膦)残留的检测方法。

[方法] 通过比较多种类型亲水作用色谱柱及对流动相 pH 值和缓冲液浓度的优化, 实现 8 种农药有效色谱保留和分离。基于色谱条件下高极性农药的质谱优化, 建立目标物的多反应监测(MRM)通道。在样品前处理中对基质含水量、提取溶剂、净化方式进行优化, 采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱的 MRM 模式检测, 同位素内标法定量。以加标回收率评价方法的准确度, 相对标准偏差评价方法的精密度。将所建立的方法应用于 57 件市售蔬菜水果样本的检测, 考察方法的适应性和了解高极性农药的残留状况。

[结果] 对电喷雾源正离子模式(ESI^+)检测, 选择 Sielc Obelisc R 为色谱柱, 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液(pH=3±0.05)和乙腈做流动相; 对电喷雾源负离子模式(ESI^-)检测, 选择 Shodex Asahipak NH2P-50 2D 为色谱柱, 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(pH=11±0.05)和乙腈做流动相, 可以获得较好的色谱分离和峰形; 在对样品含水量标化, 以 2% 酸化甲醇为提取溶剂, C18 分散固相萃取净化的最优化条件下, 矮壮素、百草枯、野燕枯、灭蝇胺、霜霉威 5 种农药在 1.00~100 μg·L⁻¹ 浓度范围内, 草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦 3 种农药在 5.00~500 μg·L⁻¹ 浓度范围内线性良好(相关系数 > 0.999), 方法的检出限为 0.002~0.010 mg·kg⁻¹, 定量限为 0.005~0.025 mg·kg⁻¹。在低、中、高 3 个浓度(定量限、2 倍定量限和 5 倍定量限)加标水平下, 方法的回收率在 85.3%~113.2% 之间, 相对标准偏差范围为 1.5%~9.5%(n=6)。57 件市售蔬菜水果样品中检出的农药有矮壮素、灭蝇胺和霜霉威, 有 1 份豇豆样品的灭蝇胺残留量超过了最大残留限量。

[结论] 本研究建立的亲水作用色谱结合超高效液相色谱-三重四级杆质谱, 同位素内标定量的方法具有简单、稳定、易操作的特点, 适用于大批量蔬菜水果中 8 种高极性农药残留的快速筛查和定量检测, 可为高极性农药的残留监测和风险评估提供技术保障。

关键词: 蔬菜; 水果; 亲水作用色谱; 超高效液相色谱-三重四级杆质谱法; 高极性农药; 农药残留

Determination of eight high polar pesticide residues in vegetables and fruits by hydrophilic interaction liquid chromatography combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry JIN Yu'e, XU Qian, XUE Liming, LE Sunyang, XIONG Libei, TANG Yan, WAN Jingyi, WANG Guoquan (Division of Chemical Toxicity and Safety Assessment, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract:

[Background] The production and consumption of high polar pesticides in China are the largest in the world. Therefore, it is urgent to develop a method with fast analysis, large flux, and high accuracy to determine the residues of these pesticides in food.

[Objective] To establish a method for the determination of eight highly polar pesticides [chloromequat, paraquat, difenzoquat, cyromazine, propamocarb, glyphosate, (aminomethyl)-phosphonic acid, and glufosinate] in vegetables and fruits by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

基金项目

上海市科学技术委员会项目(19142201900)

作者简介

金玉娥(1977—), 女, 学士, 副主任技师;

E-mail: jinyue@scdc.sh.cn

通信作者

汪国权, E-mail: wangguoquan@scdc.sh.cn

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-09-20

录用日期 2022-04-19

文章编号 2095-9982(2022)06-0701-07

中图分类号 R15

文献标志码 A

补充材料

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21439

►引用

金玉娥, 徐骞, 薛黎明, 等. 亲水作用色谱结合超高效液相色谱-三重四级杆质谱法检测蔬菜水果中 8 种高极性农药残留 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(6): 701-707.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21439

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Guoquan, E-mail: wangguoquan@scdc.sh.cn

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2021-09-20

Accepted 2022-04-19

Supplemental material

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21439

► To cite

JIN Yu'e, XU Qian, XUE Liming, et al. Determination of eight high polar pesticide residues in vegetables and fruits by hydrophilic interaction liquid chromatography combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(6): 701-707.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21439

[Methods] After comparing various types of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) columns, and optimizing pH value and buffer concentration of mobile phase, effective chromatographic retention and separation of selected eight pesticides were achieved. Based on the optimization of mass spectrometry under chromatographic conditions, a multiple reaction monitoring (MRM) channel of target compounds was established. In the sample pretreatment, through optimization of water content, extraction solvent, and purification method, a final MRM mode of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was used for detection, and the isotope internal standard method was used for quantification. The accuracy and the precision of the method were evaluated using recovery and relative standard deviation. The established method was applied to detect 57 samples of retail vegetables and fruits to investigate the adaptability of the proposed method and the residual levels of selected high polar pesticides.

[Results] For positive ion electrospray ionization (ESI^+) detection, we chose SIELC Obelisc R as chromatographic column, and $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ammonium formate solution ($\text{pH}=3\pm 0.05$) and acetonitrile as mobile phase; for negative ion electrospray ionization (ESI^-) detection, we chose Shodex Asahipak NH2P-50 2D as chromatographic column, and $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ammonium acetate solution ($\text{pH}=11\pm 0.05$) and acetonitrile as mobile phase to obtain good chromatographic separation and peak shape. Under the optimal conditions of sample water content standardization, using 2% acidified methanol as extraction solvent, and C18 dispersed solid phase extraction purification, the linearity ranges of five analytes (chlormequat, paraquat, difenzoquat, cyromazine, and propamocarb) and three analytes [glyphosate, (aminomethyl)phosphonic acid, and glufosinate] were $1.00\text{--}100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $5.00\text{--}500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (both correlation coefficients > 0.999) respectively, the detection limits were $0.002\text{--}0.010 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and the limits of quantification (LOQ) were $0.005\text{--}0.025 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. At three spiked levels (LOQ, 2LOQ, and 5LOQ), the recoveries were in the range of 85.3%–113.2%, and the relative standard deviations were 1.5%–9.5% ($n=6$). Three target pesticides (chlormequat, cyromazine, and propamocarb) were detected in 57 samples of retail vegetables and fruits, and the residue of chlormequat in cowpea exceeded the maximum residue limit.

[Conclusion] The established method of HILIC combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and isotopic internal standard quantification has the characteristics of simplicity, stability, and easy operation, which is suitable for rapid screening and quantitative detection of selected eight high polar pesticide residues in large quantities of vegetables and fruits, and provides technical support for monitoring and risk assessment of high polar pesticide residues.

Keywords: vegetables; fruits; hydrophilic interaction liquid chromatography; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; highly polar pesticides; pesticide residues

除草剂和植物生产调节剂是一类因含有氨基、羧基、羰基、酰氯等基团而具有极高性的农药,虽然品种不多,但产量和用量均占世界第一,其中以草甘膦为代表的除草剂更是我国使用量最多的农药之一^[1-2]。此类农药长期低剂量暴露对环境和人体健康的危害已成为一个重大问题,如植物生产调节剂矮壮素因急性毒性和对动物繁殖的不良影响,已被美国国家职业安全与健康研究所列为疑似内分泌干扰物质^[3]。百草枯中毒后临床无特效解毒手段,肺纤维化伴呼吸衰竭是中毒后期死亡的主要原因,死亡率可高达 80%^[4],是公共卫生突发中毒检测特别关注的有毒化学品。因此,急需要一个速度快、通量大、准确度高的方法来测定该类高极性农药残留。

由于高极性农药在化学结构和理化性质上的特殊性,在已有的检测方法中普遍存在采用衍生方法带上发色基团,改变化合物的结构性和挥发性,从而解决分离与检测的问题。由于采用了衍生方法,导致前处理存在过程烦琐、稳定性欠佳、条件不易控制等缺点,且不能实现多组分的同时分析。而常规的反相色谱因极性化合物的极性功能基团易与流动相形成偶极矩作用,即被“溶剂化”,导致不能被色谱柱有效保留,难以实现准确定量。对高极性农药的测定通常采用离

子交换^[5-6]、离子对色谱^[7-8]、亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)^[9-11]等模式进行,前两种方法由于离子对试剂与质谱的不兼容性,以及离子交换对检测灵敏度的影响,不适宜液质联用分析;HILIC 是互补于反相色谱的一种技术,它通过高比例有机相和低水含量的流动相与极性固定相的组合,可实现分析物按极性由小到大的顺序梯度洗脱,显著提高对高极性物质的保留度,同时还因对质谱响应的改善性、与样品制备液的兼容性、与反相色谱的正交选择性以及与液质联用技术的高匹配性等优点,成为高极性农药残留分析的首选。

本研究通过对 HILIC 色谱柱的选择、样品基质含水量的调整、提取溶剂和净化方式的优化,建立蔬菜水果中 8 种高极性农药的超高效液相色谱-三重四级杆质谱结合内标法定量的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Infinity 1290 超高效液相色谱仪(美国安捷伦),Q-Trap 6500+ 三重四级杆串联质谱仪(美国 AB Sciex),TGL-21M 高速台式离心机、TG16 微量离心机(中国上海卢湘仪),Genius3 涡旋混匀器(德国 IKA),YMT-2500

多管涡旋混合仪(中国上海熙扬), Seven Excellence 多参数测试仪(瑞士 Mettler-Toledo), Milli-Q 超纯水系统(德国 Merck), 微量可调移液枪(德国 Eppendorf), Sielc Obelisc R 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 5 μm; 美国 Sielc), Shodex Asahipak NH2P-50 2D 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 5 μm; 日本昭和), Shiseido PC HILIC 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 5 μm; 日本资生堂), Waters BEH HILIC 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm; 美国沃特世), Waters BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm; 美国沃特世), 乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶(ethylenediamine-N-propylsilylated silica gel, PSA; 中国上海安谱), 石墨化炭黑(graphitized carbon black, GCB; 中国上海安谱), 十八烷基硅烷键合硅胶(octadecylsilane bonded silica gel, C18; 日本 Chromatorex), 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA), 甲酸、氨水、甲酸铵、乙酸铵(液相色谱-质谱级, 中国上海安谱)。

标准品: 矮壮素、百草枯、灭蝇胺、霜霉威、草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦(纯度为 99.4%、81.57%、99.18%、97.4%、98.61%、91.1%、99.04%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH), 用甲醇配制成质量浓度(后称浓度)1.00 mg·mL⁻¹ 的单标储备液, 于 4 °C 冰箱内避光保存, 有效期为 6 个月; 野燕枯(浓度为 100 μg·mL⁻¹, 中国麦考林)。

同位素标准品: 矮壮素-D4、霜霉威-D7(纯度为 98.4%、98.1%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH), 百草枯-D8、灭蝇胺-D4、氨甲基膦酸-13 C, 15 N、草铵膦-D3(纯度为 98%、93%、96%、95%, 加拿大 TRC), 野燕枯-13 C6、草甘膦-13 C2, 15 N(纯度为 99.6%、99.8%, 中国 ANPEL), 用甲醇配制成 1.00 mg·mL⁻¹ 的单标储备液, 于 4 °C 冰箱内避光保存, 有效期为 6 个月。

1.2 仪器条件

1.2.1 条件优化 取各目标化合物的合适浓度, 以针泵方式连续进样, 确定每种农药的(准)分子离子峰、定性定量离子、碰撞能量和离子源参数等。对电喷雾源正离子模式(positive ion electrospray ionization, ESI⁺)分析的矮壮素、百草枯、野燕枯、灭蝇胺和霜霉威 5 种农药, 比较 3 种 HILIC 色谱柱 [Shiseido PC HILIC (2.1 mm×150 mm, 5 μm)、Waters BEH HILIC (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、Sielc Obelisc R (2.1 mm×150 mm, 5 μm)], 3 种流动相 pH 值(3、4、5)和 3 种甲酸铵缓冲液浓度(10、20、50 mmol·L⁻¹)对色谱分离的影响; 对电喷雾源负离子模式(negative ion electrospray ionization, ESI⁻)分析的草甘膦、氨甲基膦酸和草铵膦 3 种农药,

比较 2 种 HILIC 色谱柱 [Waters BEH Amide (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 和 Shodex Asahipak NH2P-50 2D (2.1 mm×150 mm, 5 μm)], 3 种流动相 pH 值(10、10.5、11)及 3 种乙酸铵缓冲液浓度(5、10、20 mmol·L⁻¹)对色谱分离的影响。

1.2.2 矮壮素、野燕枯、百草枯、灭蝇胺、霜霉威的测定 色谱柱: Sielc Obelisc R (2.1 mm×150 mm, 5 μm); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 流动相 A: 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液(pH=3±0.05); 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: t=0 min, 90%B; t=2.5 min, 90%B; t=3.5 min, 15%B; t=5.5 min, 15%B; t=5.6 min, 90%B; t=16 min, 90%B; 进样体积: 5 μL; 离子源及离子化模式: ESI⁺; 离子源温度: 500 °C; 离子化电压: 5 500 V; 气帘气: 40 psi; 碰撞气为中等强度; 喷雾气: 50 L·min⁻¹; 辅助加热气: 50 L·min⁻¹; 扫描方式: 多反应监测(multi reaction monitoring, MRM)。见表 1。

1.2.3 草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦的测定 色谱柱: Shodex Asahipak NH2P-50 2D (2.1 mm×150 mm, 5 μm); 流速: 0.4 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C; 流动相 A: 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(pH=11±0.05); 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: t=0 min, 80%B; t=2 min, 80%B; t=2.1 min, 20%B; t=4.4 min, 20%B; t=4.5 min, 80%B; t=8.5 min, 80%B; 进样体积: 10 μL; 离子源及离子化模式: ESI⁻; 离子源温度: 500 °C; 离子化电压: -4 500 V; 气帘气: 40 psi; 碰撞气为中等强度; 喷雾气: 50 L·min⁻¹; 辅助加热气: 50 L·min⁻¹; 扫描方式: MRM。见表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理 将市售的蔬菜水果, 包括叶菜类(白菜、韭菜、芹菜等)13 种, 果菜类(黄瓜、豇豆、番茄等)15 种, 根茎类(土豆、洋葱、百合等)4 种, 花菜类(西兰花、松花菜)2 种, 核果类(樱桃、杨梅、油桃等)7 种, 浆果类(葡萄、蓝莓、猕猴桃等)5 种, 仁果类(苹果、香梨)2 种, 橘果类(褚橙)1 种, 分别取代表性样品约 500 g, 样品的取样部位按照 GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》的规定执行, 将其切碎后, 用组织捣碎机将样品加工成浆状, 充分混匀, 放入聚乙烯瓶中待用。

称取上述制备好的样品 10 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 塑料离心管中, 添加去离子水使称取的 10 g 样品中的水分含量调整到约 10 mL。选择低含水量(低于 80%)的蔬果基质, 比较其通过添加不同去离子水调节样品含水量(60%~120%)对提取效率的影响。加入 100 μL 混合内标中间液和 10 mL 提取液, 振荡涡旋 1 min,

于多管涡旋混合仪上振荡提取 5 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min(离心半径 6.2 cm)。比较欧盟检测方法^[12]推荐的甲酸/甲醇提取液体系, 不同甲酸含量(0%、0.5%、1%、2%和 4%)对 8 种农药提取效率的影响。取 2 mL 上清液加入含 100 mg 净化剂的离心管中, 涡旋混匀 1 min, 静置 5 min。考察样品用 3 种净化剂(PSA、

C18 和 GCB)处理后对目标物的吸附影响。取出上层清液, 矮壮素、野燕枯、百草枯、灭蝇胺、霜霉威 5 种农药用乙腈按 5 倍稀释, 草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦 3 种农药用乙腈按 2 倍稀释, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min(离心半径 8.3 cm), 上清液进超高效液相色谱-三重四级杆质谱分析。

表 1 8 种农药及其内标的加合方式、保留时间和 MRM 质谱参数

Table 1 Addition mode, retention time, and MRM conditions of 8 pesticides and internal standards

序号	化合物名称	离子化模式	保留时间/min	加合方式	母离子m/z	子离子m/z	去簇电压/V	碰撞能量/eV
1	野燕枯	ESI ⁺	2.2	M ⁺	249.0	193.1 ⁺ , 130.0	80	38, 50
2	野燕枯-13 C6	ESI ⁺	2.2	M ⁺	255.3	198.9	80	34
3	灭蝇胺	ESI ⁺	3.2	[M+H] ⁺	167.1	107.9 ⁺ , 125.2	50	30, 25
4	灭蝇胺-D4	ESI ⁺	3.2	[M+H] ⁺	171.0	85.9	50	21
5	霜霉威	ESI ⁺	4.3	[M+H] ⁺	188.9	102.1 ⁺ , 144.1	40	22, 38
6	霜霉威-D7	ESI ⁺	4.3	[M+H] ⁺	196.1	103.0	40	24
7	矮壮素	ESI ⁺	4.7	M ⁺	122.0	58.1 ⁺ , 63.0	60	42, 27
8	矮壮素-D4	ESI ⁺	4.7	M ⁺	126.1	58.0	60	35
9	百草枯	ESI ⁺	5.5	M ⁺ , [M ²⁺ -CH ₃] ⁺	186.0, 170.9	170.9 ⁺ , 155.1	100	30, 37
10	百草枯-D8	ESI ⁺	5.5	M ⁺	193.8	178.9	100	36
11	氨甲基膦酸	ESI ⁻	3.7	[M-H] ⁻	110.0	62.9 ⁺ , 78.8	-40	-29, -34
12	氨甲基膦酸-13 C,15 N	ESI ⁻	3.7	[M-H] ⁻	112.1	62.9	-40	-38
13	草铵膦	ESI ⁻	3.8	[M-H ₂ O] ⁻	180.0	63.1 ⁺ , 94.9	-40	-42, -23
14	草铵膦-D3	ESI ⁻	3.8	[M-H ₂ O] ⁻	183.1	63.0	-40	-49
15	草甘膦	ESI ⁻	3.9	[M-H] ⁻	168.0	63.1 ⁺ , 149.9	-20	-31, -13
16	草甘膦-13 C2,15 N	ESI ⁻	3.9	[M-H] ⁻	171.1	62.8	-20	-37

[注] *: 定量离子对。m/z: 质荷比。

1.3.2 标准溶液配制 取适量各单标储备液, 分别配制成含矮壮素、百草枯、野燕枯、灭蝇胺、霜霉威浓度为 2.00 μg·mL⁻¹ 和草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦浓度为 10.0 μg·mL⁻¹ 的标准中间液, 含矮壮素-D4、百草枯-D8、野燕枯-13 C6、灭蝇胺-D4、霜霉威-D7 浓度为 2.00 μg·mL⁻¹ 和草甘膦-13 C2,15 N、氨甲基膦酸-13 C,15 N、草铵膦-D3 浓度为 10.0 μg·mL⁻¹ 的内标中间液。

1.3.3 工作曲线配制 精确吸取一定量的标准工作液和内标工作液, 用 90%乙腈溶液(含 1%甲酸)配制成矮壮素、百草枯、野燕枯、灭蝇胺和霜霉威浓度为 1.00、2.00、5.00、10.0、20.0、50.0、100 ng·mL⁻¹(含同位素内标 20.0 ng·mL⁻¹), 草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦浓度为 5.00、10.0、25.0、50.0、100、250、500 ng·mL⁻¹(含同位素内标 100 ng·mL⁻¹)的工作曲线。以各化合物标准浓度为横坐标, 化合物与其相应内标的峰面积比值为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

2 结果

2.1 质谱条件的优化

8 种目标物及内标的加合方式、MRM 监测离子对、

碰撞能量的优化结果见表 1。在溶液中以二价阳离子双电荷联吡啶离子结构存在的百草枯(相对分子质量 186.3), 在 ESI⁺全扫描模式下, 得到复杂的偶数和奇数电性, 出现 3 种类型的准分子离子峰, 分别是质荷比(m/z)93 的双电荷阳离子 M²⁺、m/z 186 的自由基阳离子 M⁺和 m/z 185 的单电荷阳离子 [M²⁺-H]⁺, 以及源内裂解产生 m/z 171 的碎片离子 [M²⁺-CH₃]⁺(见补充材料图 S1)。为提高百草枯定性可靠性和获得足够高的质谱响应, 提高检测的专一性和灵敏度, 本方法采用 M⁺(m/z 186)和 [M²⁺-CH₃]⁺(m/z 171)作为母离子, 及其相应的碎片离子构成 MRM 检测通道。

2.2 色谱条件的优化

对 ESI⁺检测的 5 个化合物, 当使用 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵缓冲液、pH 为 3 时, 在 Shiseido PC HILIC 柱上百草枯呈现较强保留, 保留时间在 10 min 以后, 峰形矮胖, 响应差; 在 Waters BEH HILIC 柱上, 5 个化合物的保留时间较合适, 在 1.1~3.7 min, 但百草枯色谱峰脱尾达 1 min, 将缓冲盐浓度提高到 50 mmol·L⁻¹ 并改变洗脱程序, 脱尾现象得不到明显改善; 在相同条件下 Sielc Obelisc R 柱上 5 个化合物在 2.2~5.5 min 内依次

分离,且色谱峰对称峰形优异。

对ESI⁺源检测的3个化合物,在Waters BEH Amide柱上,色谱保留时间较理想在4.7~5.2 min,但草甘膦及氨甲基膦酸色谱峰拖尾严重;在Shodex Asahipak NH2P-50 2D柱上,当使用5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵缓冲液及调节流动相pH为11时,3个化合物在3.7~3.9 min内得到色谱分离,峰形良好。综合以上优化结果,本方法选择Sielc Obelisc R和Shodex Asahipak NH2P-50 2D作为分离色谱柱。

2.3 样品含水量的优化

在7份加标水平为0.05 mg·kg⁻¹空白百合基质样中,添加不同量去离子水考察基质含水量对提取效率的影响,结果(图1)发现随着水分含量的增加,目标物的绝对回收率都有不同程度的提高并趋于稳定,特别是ESI⁺源检测的3个酸性化合物有显著的提升,草甘膦随含水量从60%增加到120%时,提取绝对回收率从44.9%提高到92.5%,在含水量达到或大于100%时,回收率的变化不大,在90.6%~92.5%之间。为提高本方法的共享性,将蔬果基质分为含水量高于80%和低于80%两类,分别加入2 mL或4 mL的去离子水,使样品基质水分含量标化到约100%,提高目标物的提取效率,从而达到高灵敏度检测。

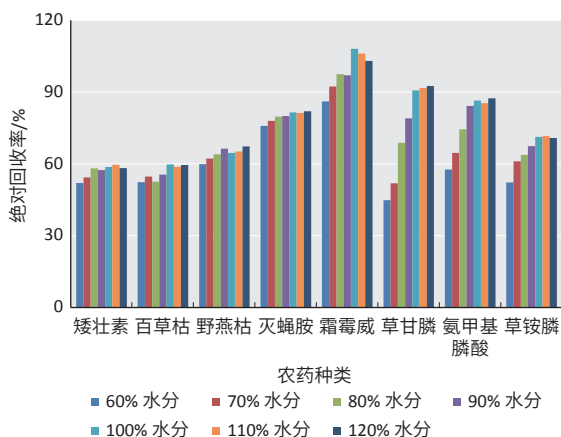


图1 百合基质中8种农药在不同水分含量时的提取效率

Figure 1 Extraction efficiencies of 8 pesticides with different water content in lilyum

2.4 提取溶液的优化

考察加标浓度为0.05 mg·kg⁻¹的花椰菜和橙在5种不同甲酸/甲醇提取液时8种农药的绝对回收率,橙基质的结果(图2)显示,随着甲酸含量的提高,草甘膦和草铵膦绝对回收率呈现出先上升后下降的趋势,其中草甘膦的绝对回收率从0%甲酸时的89.0%上升到1%甲酸时的104%,后下降至4%甲酸时的81.6%;其他化合物的绝对回收率都呈现一定的上升趋势,改善最明

显的是百草枯,从36.2%提高到75.8%。综合各化合物的绝对回收率结果,选用2%甲酸/甲醇作为本方法的提取溶液。

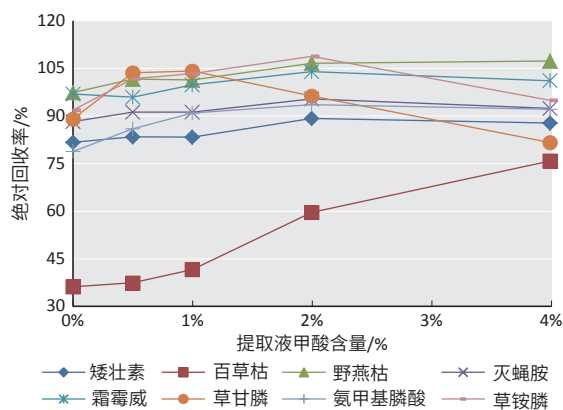


图2 橙基质中8种农药在不同甲酸含量提取液时的提取效率

Figure 2 Extraction efficiencies of 8 pesticides with different formic acid content in orange

2.5 净化方法的优化

对空白番茄基质加标提取液用净化剂PSA、C18和GCB处理后对处理前各目标物的峰面积比值计算回收率。结果(图3)发现,样品用碱性的PSA净化后,酸性目标物草甘膦、氨甲基膦酸和草铵膦的回收率仅为8.52%、30.1%和14.2%,显示PSA对目标物有强烈吸附;GCB对百草枯和野燕枯有明显吸附,净化后的回收率为63.4%和65.7%;C18则仅对草甘膦、氨甲基膦酸和草铵膦有微弱吸附,回收率分别为82.8%、88.5%和83.3%,其他化合物净化后的回收率均大于90%,因此本方法选择C18作为分散固相萃取的净化剂。

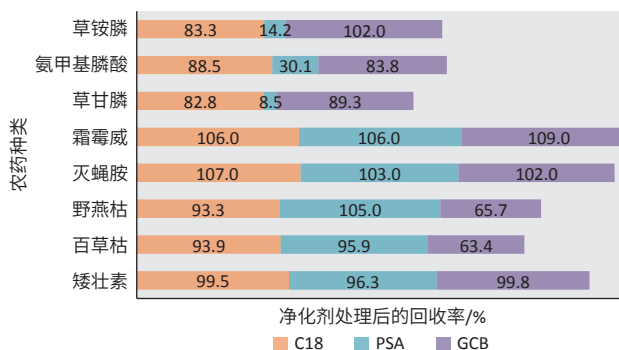


图3 3种净化剂处理后对8种农药的吸附影响

Figure 3 Adsorption effects of 3 kinds of purifying agents on 8 pesticides

2.6 方法学结果

2.6.1 工作曲线线性方程、检出限和定量限 本方法采用溶剂工作曲线结合内标法定量,以空白基质加标按“1.3.1”进行处理并进样分析,以3倍信噪比对应浓度作为检出限,以10倍信噪比对应浓度作为定量限。

8 种农药组分的线性方程、相关系数、检出限、定量限见表 2, 相关系数均大于 0.999。

表 2 8 种农药测定的相关系数、检出限及定量限
Table 2 Correlation coefficients, limits of detections, and limits of quantitation of 8 pesticides

农药名称	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	线性方程	相关系数	检出限/ (mg·kg ⁻¹)	定量限/ (mg·kg ⁻¹)
矮壮素	1.00~100	Y=0.050 4X+0.005 0	0.999 1	0.002	0.005
百草枯	1.00~100	Y=0.062 6X+0.022 6	0.999 8	0.002	0.005
野燕枯	1.00~100	Y=0.115 4X+0.014 5	0.999 9	0.002	0.005
灭蝇胺	1.00~100	Y=0.031 3X+0.004 5	0.999 9	0.002	0.005
霜霉威	1.00~100	Y=0.189 0X+0.050 8	0.999 6	0.002	0.005
草甘膦	5.00~500	Y=0.024 6X+0.006 2	0.999 7	0.010	0.025
氨甲基膦酸	5.00~500	Y=0.016 2X+0.025 4	0.999 7	0.010	0.025
草铵膦	5.00~500	Y=0.024 9X+0.010 7	0.999 7	0.010	0.025

2.6.2 回收率和精密度 在 4 种空白基质(番茄、土豆、苹果、橙子)中进行 3 种浓度水平的加标: 定量限、2 倍定量限和 5 倍定量限, 即形成矮壮素、百草枯、野燕枯、灭蝇胺和霜霉威加标含量为 0.005、0.010、0.025 mg·kg⁻¹, 草甘膦、氨甲基膦酸和草铵膦加标含量为 0.025、0.050、0.125 mg·kg⁻¹ 的加标样品, 每个浓度添加水平重复测定 6 次, 以评估本方法准确性和重现性, 结果见补充材料图 S2。8 种农药在 4 种基质中的平均回收率在 85.3%~113.2%之间, 相对标准偏差在 1.5%~9.5%之间($n=6$), 结果显示本方法回收率高, 精密度良好, 可以用于蔬菜水果中 8 种高极性农药残留的准确定量。

2.7 样品测定

采用所建立的方法对市售的 38 件蔬菜和 19 件水果样品进行监测, 检出的农药有矮壮素、灭蝇胺和霜霉威, 9 份检出混合农药残留, 15 份检出单种农药残留, 1 份豇豆样品的灭蝇胺残留量超过了最大残留限量。8 种高极性农药的检测结果见表 3。

表 3 57 件市售蔬菜水果样品的检测结果
Table 3 Detection results of 57 retail vegetable and fruit samples

分类	样品 数量/件	产地 数量/个	检出情况			检出浓度/(mg·kg ⁻¹)		最大残 留限量/ (mg·kg ⁻¹)
			检出农药	件数	检出率/%	最小值	最大值	
蔬菜	38	14	矮壮素	13	34.2	4.3×10 ⁻³	0.6	1
			灭蝇胺	7	18.4	2.9×10 ⁻³	1.2	0.1~20
			霜霉威	8	21.1	3.6×10 ⁻³	2.6	0.2~100
水果	19	16	矮壮素	3	15.8	3.7×10 ⁻³	1.2	—
			霜霉威	2	10.5	6.6×10 ⁻³	5.6×10 ⁻²	2~5

3 讨论

百草枯化合物的电离机理复杂, 在其 ESI⁺质量扫描图中发现的 3 种类型的(准)分子离子峰, 与文献[13–16]报道一致, 其中 m/z 185 处的单电荷阳离子, 根据 Song 等^[16]推测由 m/z 93 处的双电荷阳离子与流动相中铵盐相互作用脱质子重排产生; 而 m/z 186 处的自由基阳离子则由 m/z 93 处的双电荷阳离子还原形成, 还原剂可能是阴离子、缓冲液组成部分或电喷雾过程中产生的电子, 多种可能的电离机理决定了百草枯这一化合物 MRM 检测通道选择的多样性。

在色谱柱的选择上, HILIC 色谱柱种类较多, 体现在固定相填料上有未衍生化的硅胶或杂化颗粒, 酰胺、氨基、二醇等。本研究中 ESI⁺模式检测的 5 个化合物, 尽管都属于高极性化合物, 但是极性跨度较大, 特别是百草枯化合物, 在硅胶衍生键合相色谱柱(Shiseido PC HILIC)和未衍生杂化颗粒色谱柱(Waters BEH HILIC)上, 都无法得到理想的色谱分离, 呈现出强保留与峰拖尾现象, 只有使用极端缓冲盐浓度(>100 mmol·L⁻¹)才能有所改善, 但势必将增加检测设备的负荷和后期的维护成本。在硅胶键合离子基团和长疏水链混合填料的色谱柱(Sielc Obelisc R)上, 因同时存在亲水作用、离子交换和反相多种分离机理, 5 个化合物均得到理想保留并合适的洗脱, 且色谱峰峰形对称, 流动相缓冲盐浓度适中, 显著提高了系统的适用性。而 ESI⁺模式测定的 3 个化合物, 极性跨度较小, 在单一 HILIC 色谱柱上即可实现分离。但在键合酰胺基的色谱柱(Waters BEH Amide)上, 草甘膦及氨甲基膦酸色谱峰拖尾严重, 推测酰胺官能团具有的氢原子受体和供体位点增强了酸性化合物的保留; 在聚合物键合氨基基填料的氨基柱(Shodex Asahipak NH2P-50 2D)上, 高 pH 值(pH=11)流动相作用下, 促进了缓冲盐的电离, 增强了离子强度, 加速了色谱峰的洗脱, 使目标物峰形对称尖锐, 且仪器响应更佳。

本次实验在 57 件市售蔬菜水果中共检出 24 份农药残留, 检出率 42.1%; 其中 38 件蔬菜检出 19 件有农药残留, 检出率 50.0%; 19 件水果检出 5 件有农药残留, 检出率 26.3%, 蔬菜中农药的检出率明显高于水果。在检测的 8 种极性农药中, 蔬菜水果样品中检出率最高的农药均为矮壮素, 在番茄、茭白中的检出浓度与文献[17–18]值相近。同时, 此次检测结果与 GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》相比, 只有一件豇豆样品中的灭蝇胺检出浓度

为 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 超过了豇豆中 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的最大残留限量。这一结果与文献 [19] 中食品抽查发现的同类超标样品 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 检出值高度相似, 可见豇豆种植中灭蝇胺的使用已成为常态, 应尽快引起相关食品安全监管部门的重视。

本研究建立了 HILIC 结合超高效液相色谱-三重四级杆质谱, 同位素内标法定量, 测定蔬菜水果中 8 种高极性农药残留的分析方法。该方法优化了欧盟高极性农药检测方法的提取溶剂, 精简了已有标准的净化方法, 选用了适合强极性化合物分析的 HILIC 色谱柱, 具有简单、稳定、易操作的特点, 灵敏度能满足国家卫生标准中最大残留限量的要求, 该方法能为蔬菜水果类农副产品中高极性农药的残留监测和风险评估提供技术保障。

参考文献

- [1] 夏永鹏, 孙文均. 草甘膦农药生殖毒性的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2020, 37(12): 1230-1238.
- XIA YP, SUN WJ. Study advances on reproductive toxicity induced by glyphosate[J]. J Environ Occup Med, 2020, 37(12): 1230-1238.
- [2] 鲁晶, 杨学春. 草甘膦对环境的影响研究进展[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(8): 71-75.
- LU J, YANG XC. Research progress on environmental impact of glyphosate[J]. Anhui Agric Sci Bull, 2017, 23(8): 71-75.
- [3] 肖泳, 吴海智, 袁列江, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中矮壮素残留[J]. 色谱, 2020, 38(2): 218-223.
- XIAO Y, WU HZ, YUAN LJ, et al. Determination of chlormequat chloride residues in animal derived foods by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2020, 38(2): 218-223.
- [4] 孟宇珍, 龚铎, 李文越, 等. 液相色谱-三重四级杆质谱法同时检测生物检材中百草枯及其代谢物[J]. 刑事技术, 2022, 47(1): 49-57.
- MENG YZ, GONG D, LI WY, et al. Liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry simultaneously detecting paraquat and metabolites in biological samples[J]. Forensic Sci Technol, 2022, 47(1): 49-57.
- [5] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 离子色谱-三重四级杆质谱法同时测定血浆和尿液中百草枯和敌草快[J]. 色谱, 2020, 38(11): 1294-1301.
- ZHANG XY, CAI XX, ZHANG XY, et al. Simultaneous determination of paraquat and diquat in plasma and urine by ion chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2020, 38(11): 1294-1301.
- [6] 魏丹, 国明, 陶星名, 等. 在线大体积进样柱切换-离子色谱法测定茶叶中的微量敌草快和百草枯农药残留[J]. 农药, 2019, 58(1): 57-60.
- WEI D, GUO M, TAO XM, et al. Determination of low level dipaquat and paraquat residues in tea by on-line column-switching ion chromatography[J]. Agrochemicals, 2019, 58(1): 57-60.
- [7] 雷卓青, 黄晓亮, 李福森, 等. 高效液相色谱法测定急性百草枯中毒家兔尿液中的毒物含量[J]. 中国工业医学杂志, 2019, 32(1): 63-64.
- LEI ZQ, HUANG XL, LI FS, et al. Determination of urinary paraquat by HPLC in acute paraquat poisoned rabbit[J]. Chin J Ind Med, 2019, 32(1): 63-64.
- [8] 王永静, 彭怡, 赵晓晓, 等. 大鼠血浆中百草枯浓度的高效液相色谱法测定及毒代动力学研究[J]. 中南药学, 2018, 16(7): 963-966.
- WANG YJ, PENG Y, ZHAO XX, et al. Determination of paraquat in the plasma of rats by HPLC and its pharmacokinetics[J]. Cent South Pharm, 2018, 16(7): 963-966.
- [9] 赖建辉, 孙金影, 蔡志斌, 等. 高效液相色谱-串联质谱法快速测定食物中毒样品中的百草枯和敌草快[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(3): 1119-1124.
- LAI JH, SUN JY, CAI ZB, et al. Rapid determination of paraquat and diquat in food poisoning samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(3): 1119-1124.
- [10] SAVINI S, BANDINI M, SANNINO A. An improved, rapid, and sensitive Ultra-High-performance liquid chromatography-high-resolution orbitrap mass spectrometry analysis for the determination of highly polar pesticides and contaminants in processed fruits and vegetables[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(9): 2716-2722.
- [11] 黄何何, 吴媛, 徐敦明. 液相色谱-串联质谱法测定水果中8种极性农药残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(20): 5333-5339.
- HUANG HH, WU Y, XU DM. Determination of 8 kinds of polar pesticides residues in fruits by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(20): 5333-5339.
- [12] ANASTASSIADES M, WACHTLER A K, KOLBERG D I, et al. Quick method for the analysis of highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC- or IC-MS/MS measurement[R]. Fellbach: EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides Single Residue Methods, 2021.
- [13] HAO CY, ZHAO XM, MORSE D, et al. Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides[J]. J Chromatogr A, 2013, 1304: 169-176.
- [14] WUNNAPUK K, MEDLEY GA, LIU X, et al. Simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for quantification of paraquat in plasma and urine: Application to experimental and clinical toxicological studies[J]. J Chromatogr B, 2011, 879: 3047-3052.
- [15] LEE XP, KUMAZAWA T, FUJISHIRO M, et al. Determination of paraquat and diquat in human body fluids by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2004, 39(10): 1147-1152.
- [16] SONG XB, BUDDE WL. Capillary electrophoresis-electrospray mass spectra of the herbicides paraquat and diquat[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 1996, 7(9): 981-986.
- [17] 覃国新, 劳水兵, 李慧玲, 等. 一步式提取净化/超高效液相色谱-串联质谱法测定水生蔬菜中矮壮素和灭蝇胺[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3619-3624.
- QIN GX, LAO SB, LI HL, et al. Determination of chlormequat and cyromazine residues in aquatic vegetables by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with extraction and purification on one step[J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(11): 3619-3624.
- [18] 邱世婷, 韩梅, 侯雪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测蔬菜中23种植物生长调节剂[J]. 分析测试学报, 2018, 37(6): 660-668.
- QIU ST, HAN M, HOU X, et al. Rapid detection of 23 plant growth regulators in vegetables by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Instrum Anal, 2018, 37(6): 660-668.
- [19] 刘少伟, 阮赞林. 灭蝇胺超标豇豆[J]. 质量与标准化, 2018(8): 37.
- LIU SW, RAN ZL. The content of cyromazine in cowpea exceeded the standard[J]. Qual Stand, 2018(8): 37.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)