

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.11.08

超高效液相色谱-静电轨道阱质谱正负切换同时筛查定量谷物饲料中的 51 种农药残留

吴剑平,张婧,周悦榕,严凤*,潘娟

(上海市兽药饲料检测所,上海 201103)

[收稿日期] 2018-01-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 11-0047-12 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了超高效液相色谱-静电轨道阱质谱法检测谷物饲料中的 51 种农药残留物的检测方法和目标化合物的质谱数据库。谷物饲料样品经 0.1 mol/mL HCl : 甲醇 = 1 : 3 提取,高速离心,稀释后进样分析。采用 Thermo Synchronis C18 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)作为固定相,0.1% 甲酸和 0.1% 甲酸乙腈作为流动相进行梯度洗脱。质谱采用正负切换离子扫描,一对母离子和子离子的精确质量数进行定性,以母离子的响应强度积分面积进行定量分析。51 种农药残留在最优化条件下分离良好,在定量范围内均线性良好(线性相关系数 $r \geq 0.99$),回收率也可达到 50.61% ~ 109.49%,相对标准偏差(RSD)小于 9.1%。本方法具有简便、快速、灵敏、准确等特点,适用于谷物饲料中同时筛查和定量农药残留化合物。

[关键词] 静电轨道阱质谱;正负切换;农药残留化合物;同时筛查和定量

Synchronous Screening and Quantitation of 51 Pesticides Residue in Grain Feed by Ultra Performance Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry with Positive and Negative Switching Mode

WU Jian-ping, ZHANG Jing, ZHOU Yue-rong, YAN Feng*, PAN Juan

(Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China)

Corresponding author: YAN Feng, E-mail: yan508@163.com

Abstract: To screen and quantify 51 pesticides residue in grain feed synchronously, an ultra performance liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry method and the target compounds data base were established. Grain feed was extracted by 0.1 mol/mL HCl : menthanol = 1:3. The extraction was high speed centrifuged and purified by acid then diluted to inject. Thermo Synchronis C18 column (150 mm×2.1 mm, 3 μm) was chosen to be the solid phase and 0.1% formic acid combined with 0.1% formic acid acetonitrile were chosen to be the liquid phase to achieve the grad elution. The mass spectrometer was operated using positive and negative switching scan mode.

基金项目:沪农青字(2016)第 2-5 号

作者简介:吴剑平,畜牧师,从事兽药与饲料质量检测分析研究。

通讯作者:严凤。E-mail: yan508@163.com

One pair of parent ion and daughter ion were chosen to achieve the qualification and the response of the parent ion was used to achieve the quantitation. Under the optimal conditions, 51 pesticides were separated well, Good linearity was obtained in their respective quantitative range (correlation coefficients $r \geq 0.99$). The average recoveries were in the range of 50.61% ~ 109.49% and the relative standard deviations (RSD) were lower than 9.1%. The method was proved to be convenient, economical, sensitive and accurate. The research was proved to be effective for the screening and quantitation of 51 pesticides residue in grain feed.

Key words: orbitrap mass spectrometry; positive and negative switching mode; pesticides residue; synchronous screening and quantitation

随着现代畜牧业养殖技术的不断进步发展,饲料的质量安全越来越受广大养殖户的重视。2018 年欧洲发生的鸡蛋中发现氟虫腈农药残留事件再次将饲料中的农药残留问题推到了风口浪尖。我国目前已发布的针对农药残留进行监管的主要法规公告,其中于 2013 年 3 月正式实施的《中国食品安全国家标准:食品中农药最大残留限量》(GB 2763-2016),规定了 322 种农药在 10 大类食品中的 2293 项农药最大残留限量,成为我国农药残留食品安全市场监管的唯一强制性国家标准。虽然其对于谷物、油料作物、蔬菜、水果等食品中的农药残留监管十分有力,而对作为畜牧业重要投入品的饲料中的农药残留并没有明确规定,既没有提出受监管的种类,也没有提出相应的限量标准。目前国内对水果、蔬菜和谷物中多种农药残留检测方法研究较多^[1-3],而关于饲料中多种农药残留的检测方法却相对较少^[4-5]。当今检测食品中多种农药残留的方法手段日趋多样化,主要有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)和色谱质谱联用法、生物传感器法和酶联免疫法这五大类。气相色谱结合 FPD 或 ECD 检测器同时检测多种农药残留具有灵敏度高和特异性好的特点^[6-7],但是,对于一些热不稳定和高沸点化合物就难以检测。液相色谱-串联质谱法可以较好的弥补这一缺点,同时也具有高灵敏度和高特异性的优点^[8-9],有报道采用液相色谱-串联四级杆质谱法检测蔬菜水果中 65 种农药残留^[10],其检测灵敏度可达到 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。静电轨道阱质谱(Orbitrap Mass)作为高分辨率质谱,相比串联四级杆质谱具有更高的质量精确度,同时也具

有较高的灵敏度和较宽的线性范围,在多残留分析中可以兼顾较多质量数接近的化合物的定性准确性和浓度差别较大的化合物的定量精密性^[11-13]。

1 材料与方法

1.1 仪器 Ultimate 3000 双三元超高效液相色谱、Excalibur 控制软件、Trace Founder 数据处理软件、Mass Frontier 化合物结构推断软件、四极杆串联静电轨道阱质谱带 HESI 电离喷雾源(Q Exactive)、高速冷冻离心机(Allegra X-22R, BECKMAN COULTER);AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;水浴控温氮吹仪(N-EVAP,上海安谱公司)。

1.2 材料、药品与试剂 2,3,5-混杀威(2,3,5-Trimethacarb),3,4,5-混杀威(3,4,5-Trime-thacarb),涕灭威(Aldicarb),涕灭威亚砷(Aldicarb-sulfoxide),灭害威(Aminocarb),恶虫威(Bendio-carb),丁酮威(Butocarboxim),丁酮威亚砷(Butocarboxim sulfoxide),丁酮砷威(Butoxycarboxim),甲萘威(Carbaryl),克百威(Carbofuran),3-羟基克百威(Carbofuran-3-hydroxy),乙硫苯威(Ethiofencarb),仲丁威(Fenobucarb),呋霜灵(Furathiocarb),异丙威(Isoprocarb),灭梭威(Methiocarb),灭多威(Methomyl),速灭威(Metolcarb, MTMC),灭杀威(Xylylcarb, MPMC),杀线威(Oxamyl),抗蚜威(Pirimicarb),猛杀威(Promecarb),残杀威(Propoxur),特草灵(Terbucarb),硫双威(Thiodicarb),久效威(Thiofanox),灭除威(XMC),乙霉威(Diethofencarb),苯硫威(Fenothiocarb),涕灭威砷(Aldicarb Sulfone),2,4,5-三氯苯氧乙酸(2,4,5-Trichloro-phenoxy-Acetic acid, 2,4,5-T),2,4-二氯苯氧乙

酸((2,4-Dichlorophenoxy-Acetic acid, 2,4-D), 2-萘氧乙酸(2-Naphthyloxyacetic Acid), 4-氯苯氧基乙酸(4-Chlorophenoxyacetic acid), 三氟羧草醚(Acifluorfen), 苯草醚(Aclonifen), 溴苯腈(Bromoxynil), 调果酸(Cloprop), 二氯吡啶酸(Clopyralid), 环丙酸酰胺(Cyclanilide), 2,4-滴丙酸(2,4-Dichlorprop racemate), 氯氟吡氧乙酸(Fluroxypyr), 氟磺胺草醚(Fomesafen), 赤霉素(Gibberellic acid), 碘苯腈(Ioxynil), 2-甲基-4-氯苯氧乙酸(2-Methyl-4-Chlorophenoxy Acetic Acid, MCPA), 2-甲基-4-氯苯氧丁酸(2-Methyl-4-Chlorophenoxy-g-Butyric Acid, MCPB), 2-甲基-4-氯苯氧丙酸(Mecoprop), 鱼藤酮(Rotenone), 绿草定(Triclopyr) (50 μg/mL, Bepure®, 北京振翔科技有限公司); 乙腈、甲酸(色谱纯, Merk, 德国); 去离子水(自制, 电阻率 ≥ 18 MΩ · cm); 高纯氮、高纯氩(纯度均为

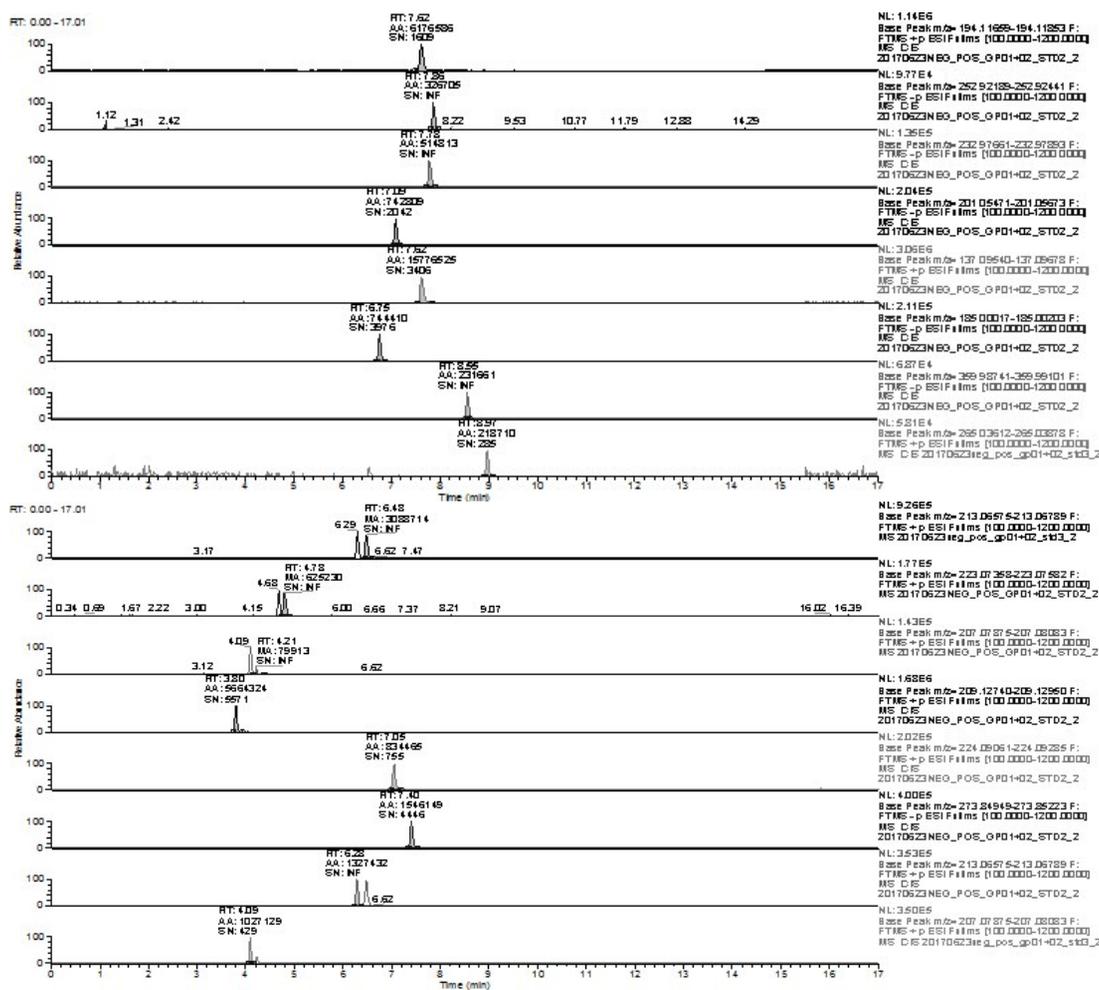
99.999%, 上海佳杰特种气体公司)。

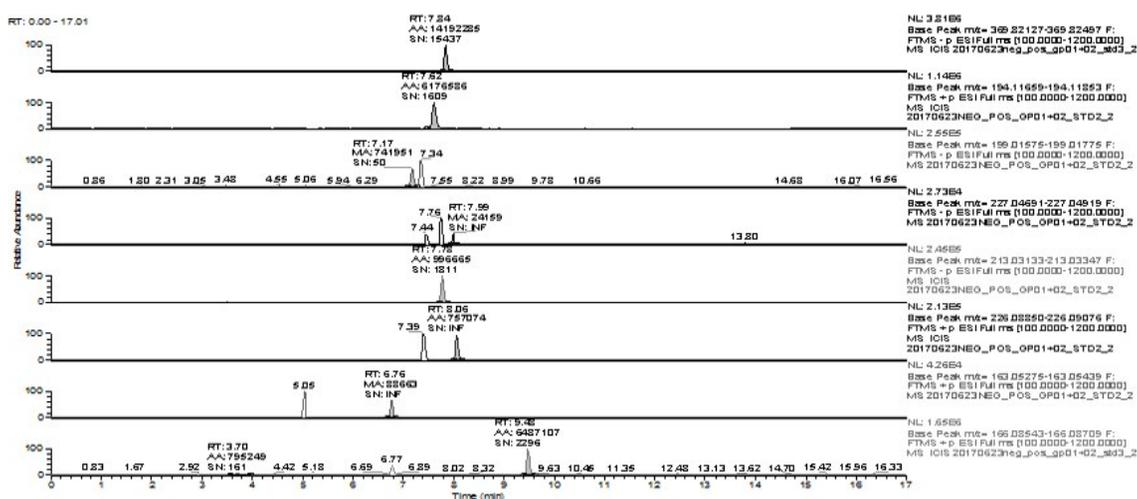
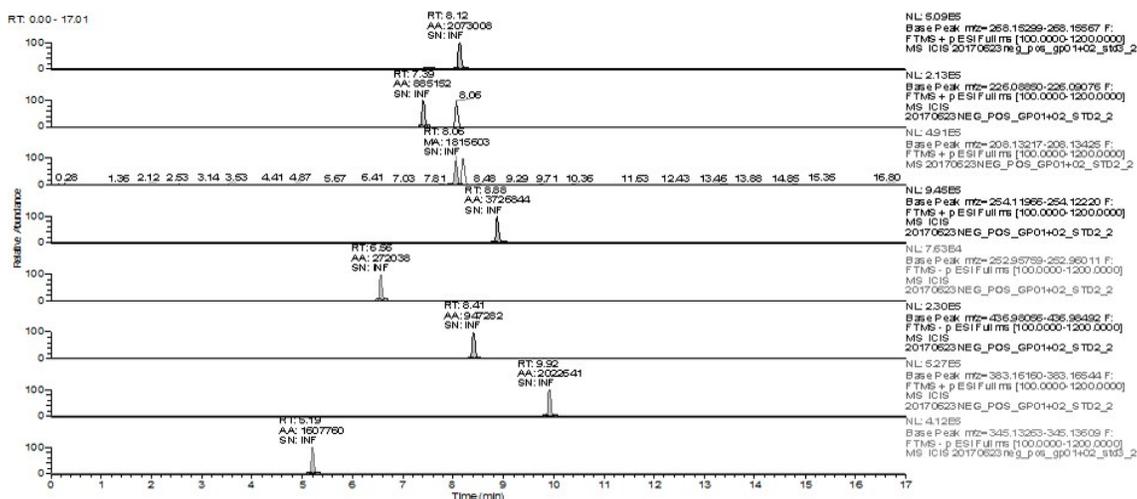
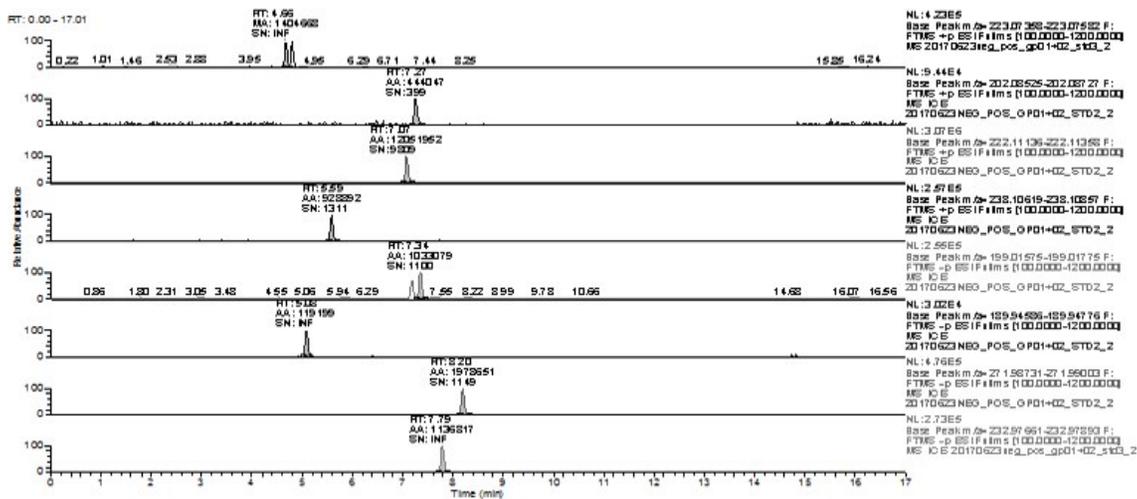
1.3 色谱条件 色谱柱: Syncronis C18 150 mm × 2.1 mm 3 μm, 柱温: 30 °C, 流速: 0.3 mL/min, 进样量: 10 μL, 流动相: A 为 0.1% 甲酸, B 为 0.1% 甲酸乙腈, 采用梯度洗脱程序如表 1, 所得典型特征离子质量色谱(XIC)图如图 1 所示。

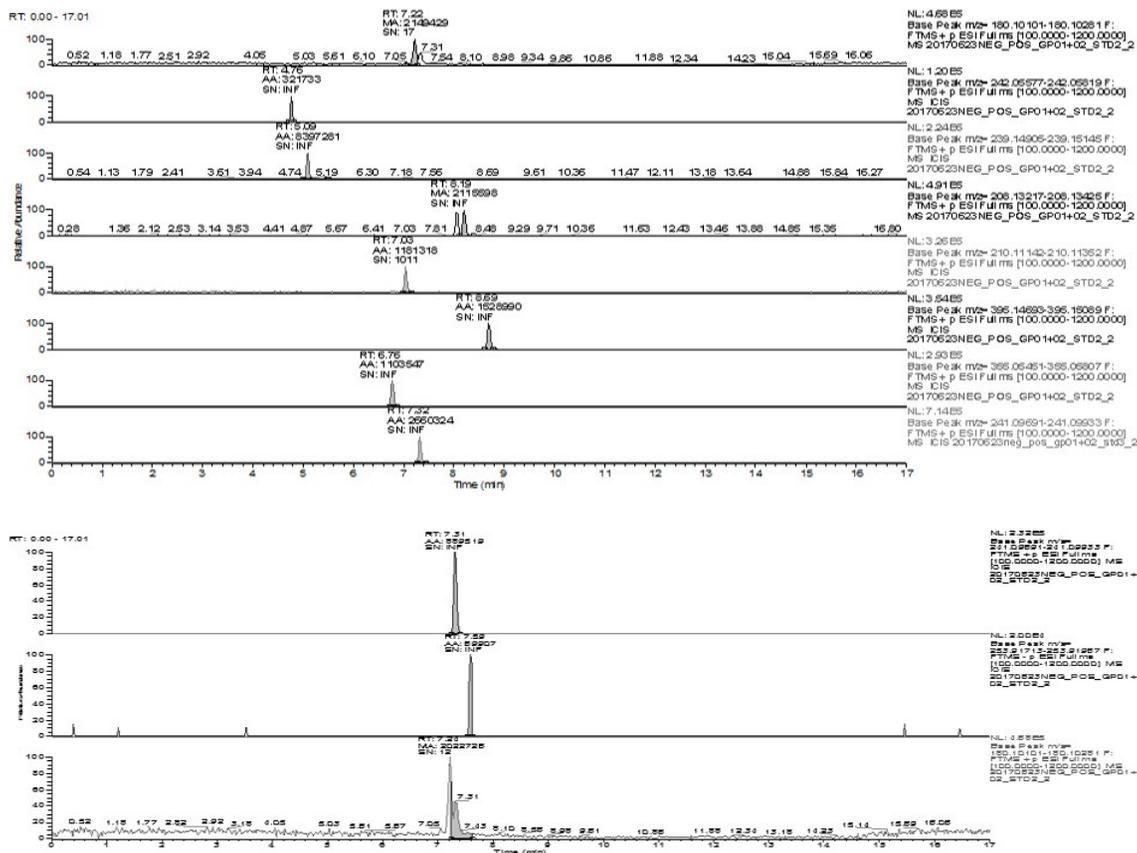
表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Procedure of gradient elution

Time /min	Flow rate / (mL · min ⁻¹)	A/%	B/%
0.00		95	5
1.00		95	5
8.00	0.3	5	95
13.00		5	95
13.10		95	5
17.00		95	5







* 以上通道按表 2 中化合物从上至下顺序依次一一对应排列

图 1 样品添加定量限浓度典型 XIC 图

Fig 1 Typical XIC of sample with LOQ concentration

1.4 质谱条件 使用 Thermo Fisher 公司的 Q Exactive 四级杆静电轨道阱质谱带 HESI 电离喷雾源质谱检测器对 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 51 种农药标准溶液进行建库优化, 兼顾各目标化合物优化后的质谱条件为: 选择正负离子切换模式, 正电压 3200 V, 负电压 2600 V, 鞘气 (Sheath gas) 压力 344 kPa, 辅助气 (Aux gas) 流速 5 L/min, 吹扫气 (Sweep gas) 流速 0.3 L/min, 碰撞气压力 0.2 Pa, 毛细管 (Capillary tube) 温度 325 $^{\circ}\text{C}$, 辅助气加热 (Aux gas heater temperature) 温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 离子透镜射频电压 (S-lens RF voltage) 50.0 V; 扫描模式为全扫描加目标物二级离子碎片扫描模式, 一级母离子扫描范围为 100~800 M/Z, 母离子扫描分辨率为 70000, 静电轨道阱离子捕获器门限值 (AGC Target) 为 3×10^6 , 最大注入捕获器

时间 (Maximum inject time) 为 100 ms, 二级碎片离子扫描分辨率为 17500, 二级碎片离子捕获器门限值 (dd-MS2 AGC Target) 为 1×10^5 , 最大注入捕获器时间 (dd-MS2 Maximum inject time) 为 50 ms, 同时最大响应离子 (Top N) 选取 5 个, 动态排除时间 (Dynamic exclusion time) 5 s, 数据处理软件提取离子质量精度 5 ppm, 精确至小数点后 5 位 (表 2)。

1.5 前处理条件 准确称取谷物饲料样品 4.00 g, 加入 5.00 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液振荡湿润 2 min, 再加入 15 mL 甲醇, 振荡 2 min 后室温下超声 15 min, 然后 8000 r/min 转速下离心 5 min, 取上层清液 0.5 mL, 加入 0.1% 甲酸 0.5 mL 混匀后 14000 r/min 离心 3 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。

表 2 51 种农残化合物母离子和子离子

Tab 2 Parent ion and Daughter ion of 51 Pesticides

Compound	Formular	Adduct	RT	Parent ion	Daughter ion	S/N of LOQ
2,3,5-Trimethacarb	C11H15NO2	+H	7.63	194.11756	137.09610	1609
2,4,5-T	C8H5Cl3O3	-H	7.86	252.92315	194.91657	>10000
2,4-D (2,4-PA)	C9H8Cl2O3	-H	7.77	232.97777	160.95576	>10000
2-Naphthoxyacetic acid	C12H10O3	-H	7.07	201.05572	143.04924	2042
3,4,5-Trimethacarb	C9H12O	+H	7.63	137.09609	122.07268	3406
4-Chlorophenoxyacetic acid	C8H7ClO3	-H	6.75	185.00110	126.99450	3976
Acifluorfen	C14H7ClF3NO5	-H	8.56	359.98921	194.98246	>10000
Aclonifen	C12H9ClN2O3	+H	9.01	265.03745	248.03430	285
Aldicarb	C7H14N2O2S	+Na	6.48	213.06682	89.04242	>10000
Aldicarb sulfone	C7H14N2O4S	+H	6.47	223.07470	86.06004	>10000
Aldicarb-sulfoxide	C7H14N2O3S	+H	4.78	207.07979	89.04243	>10000
Aminocarb	C11H16N2O2	+H	4.09	209.12845	137.08352	5571
Bendiocarb	C11H13NO4	+H	7.06	224.09173	123.04406	755
Bromoxynil	C7H3Br2NO	-H	7.38	273.85086	78.91750	4446
Butocarboxim	C7H14N2O2S	+Na	6.29	213.06682	75.02630	>10000
Butocarboxim sulfoxide	C7H14N2O3S	+H	4.08	207.07979	75.02630	429
Butoxycarboxim	C7H14N2O4S	+H	4.67	223.07470	86.06055	>10000
Carbaryl	C12H11NO2	+H	7.26	202.08626	145.06479	399
Carbofuran	C12H15NO3	+H	7.09	222.11247	123.04406	9809
Carbofuran-3-hydroxy	C12H15NO4	+H	5.57	238.10738	163.07536	1311
Clopyralid	C9H9ClO3	-H	7.34	199.01675	141.01030	1100
Cyclanilide	C6H3Cl2NO2	-H	5.09	189.94681	143.86420	>10000
Dichlorprop racemate	C11H9Cl2NO3	-H	8.2	271.98867	143.86420	1149
Diethofencarb	C9H8Cl2O3	-H	7.77	232.97777	160.95575	>10000
Ethiofencarb	C14H21NO4	+H	8.14	268.15433	124.03930	>10000
Fenobucarb	C11H15NO2S	+H	7.42	226.08963	107.04914	>10000
Fenothiocarb	C12H17NO2	+H	8.06	208.13321	95.04914	>10000
Fenothiocarb	C13H19NO2S	+H	8.9	254.12093	72.04508	>10000
Fluroxypyr	C7H5Cl2FN2O3	-H	6.54	252.95885	194.95279	>10000
Fomesafen	C15H10ClF3N2O6S	-H	8.41	436.98274	194.98240	>10000
Furathiocarb	C18H26N2O5S	+H	9.93	383.16352	149.05971	>10000
Gibberellic acid	C19H22O6	-H	5.19	345.13436	143.08560	>10000
Ioxynil	C7H3I2NO	-H	7.83	369.82312	126.90390	5437
Isoprocarb	C11H15NO2	+H	7.63	194.11756	95.04914	1609
MCPA	C9H9ClO3	-H	7.17	199.01675	126.99450	50
MCPB	C11H13ClO3	-H	7.98	227.04805	141.01030	>10000
Mecoprop	C10H11ClO3	-H	7.76	213.03240	141.01030	1811
Methiocarb	C11H15NO2S	+H	8.07	226.08963	121.06479	>10000
Methomyl	C5H10N2O2S	+H	5.03	163.05357	88.02155	>10000

续表

Compound	Formular	Adduct	RT	Parent ion	Daughter ion	S/N of LOQ
Metolcarb(MTMC)	C9H11NO2	+H	9.49	166.08626	109.06479	2296
MPMC(Xylylcarb)	C10H13NO2	+H	7.23	180.10191	123.08044	17
Oxamyl	C7H13N3O3S	+H	4.75	242.05698	72.04439	>10000
Pirimicarb	C11H18N4O2	+H	5.11	239.15025	72.04439	>10000
Promecarb	C12H17NO2	+H	8.2	208.13321	109.06479	>10000
Propoxur	C11H15NO3	+H	7.05	210.11247	111.04406	1011
Rotenone	C23H22O6	+H	8.7	395.14891	213.09080	>10000
Terbucarb	C17H27NO2	+H	9.5	278.21146	109.06501	>10000
Thiodicarb	C10H18N4O4S3	+H	6.78	355.05629	88.02206	>10000
Thiofanox	C9H18N2O2S	+H	7.31	241.09812	57.06988	>10000
Triclopyr	C7H4Cl3NO3	-H	7.58	253.91840	195.91240	>10000
XMC	C10H13NO2	+H	7.34	180.10191	95.04955	12

2 结果与分析

2.1 线性定量范围的确定 将 51 种农药残留先用甲醇配制成 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准贮备液,再将空白谷物饲料按 1.5 项样品前处理方法获得空白样品基质溶液,用此溶液将标准贮备液分别稀释成 1、2、5、10、20、50、100、500 ng/mL 标准曲线工作溶液,按 1.3 项与 1.4 项的仪器方法上机检测,将检测结果进行线性回归,获得各目标化合物的标准曲线,结果见表 3。实验结果表明,在 1~500 ng/mL 区间内 37 种化合物的 $R^2>0.99$ ($R>0.995$),14 种化合物的 $R^2>0.98$ ($R>0.99$),线性良好。

2.2 检测限与定量限的确定 选择 20 个空白样品,按优化条件进行处理后上机测定,取与标准品图谱中相同保留时间的噪音信号平均值,以信噪比 $S/N\geq 3$ 为检出限 (LOD), $S/N\geq 10$ 为定量下限 (LOQ),确定该方法对的检出限与定量限,国外有相关规定对不在其肯定列表目录中的农残化合物一律要求不得高于 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的限量^[14],因此,本方法在结合信噪比和实际检测需要的情况下选择 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 作为方法检测限,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 作为方法定量限,其检测限处各化合物信噪比见表 2,实际样品检测限处 XIC 图谱见图 1。实验结果表明,检测限附近峰型良好,定性准确。

2.3 基质效应的考察 为验证方法基质效应,选取不同种类空白谷物饲料 6 批,按 1.5 项前处理方法进行操作,将其空白溶液中分别加入 1 倍定量限的 51 种农药残留,其回收率结果在 50%~120% 之间, $RSD<10\%$,证明该前处理方法处理后的样品溶液还是有一定的基质效应影响,但是,考虑到农药残留物质种类繁多,性质差异较大,作为一个多残留物质同时筛查和定量的方法,很难在兼顾到每一种目标物的同时完全消除基质效应的影响,因此,采用基质标准溶液定量,这可以在很大程度上减少基质效应影响,将其控制在可接受的范围内。

2.4 方法准确度与精密度实验 为验证方法精密度与准确度,采用标准添加法使用 6 批不同谷物饲料,每批称取等量 6 份,6 份一组分三组,分别加入 1 倍定量限、2 倍定量限、5 倍定量限的 51 种农残化合物,所得结果如表 4 所示。实验结果表明,该方法检测谷物饲料中 51 种农残化合物时回收率结果在 50.61%~109.49% 之间, $RSD<10\%$,证明该方法具有较高的准确度与精密度。

2.5 方法选择性的验证 选择 20 个空白样品,按优化条件进行处理后上机测定,未发现假阳性结果,表明该方法的选择性良好。

表 3 51 种农药残留标准曲线

Tab 3 Standard curve of 51 Pesticides

Compound	Y-Intercept	Slope	R ²	Compound	Y-Intercept	Slope	R ²
2,3,5-Trimethacarb	4.32×10 ⁷	3.26×10 ⁶	0.9954	Fenothiocarb	1.87×10 ⁷	1.70×10 ⁶	0.9945
2,4,5-T	8.18×10 ⁴	1.64×10 ⁵	0.9995	Fenothiocarb	7.31×10 ⁶	1.03×10 ⁶	0.9941
2,4-D (2,4-PA)	-9.85×10 ⁵	2.92×10 ⁵	0.9992	Fluroxypyr	-3.42×10 ⁵	1.59×10 ⁵	0.9990
2-Naphthoxyacetic acid	-1.24×10 ⁶	4.27×10 ⁵	0.9994	Fomesafen	2.40×10 ⁵	3.72×10 ⁵	0.9997
3,4,5-Trimethacarb	1.33×10 ⁸	8.03×10 ⁶	0.9928	Furathiocarb	1.48×10 ⁸	6.03×10 ⁶	0.9889
4-Chlorophenoxyacetic acid	-4.73×10 ⁵	3.78×10 ⁵	0.9996	Gibberellic acid	-3.39×10 ⁵	3.32×10 ⁵	0.9998
Acifluorfen	9.74×10 ⁴	9.63×10 ⁴	0.9986	Ioxynil	2.36×10 ⁷	1.41×10 ⁶	0.9854
Aclonifen	1.05×10 ⁵	4.05×10 ⁴	0.9989	Isoprocarb	4.32×10 ⁷	3.26×10 ⁶	0.9954
Aldicarb	1.95×10 ⁷	8.59×10 ⁵	0.9923	MCPA	-1.20×10 ⁶	3.68×10 ⁵	0.9991
Aldicarb sulfone	9.39×10 ⁶	2.71×10 ⁵	0.9863	MCPB	1.10×10 ⁴	1.13×10 ⁴	0.9965
Aldicarb-sulfoxide	3.21×10 ⁶	9.54×10 ⁴	0.9865	Mecoprop	1.48×10 ⁵	4.81×10 ⁵	0.9989
Aminocarb	4.85×10 ⁷	4.48×10 ⁶	0.9966	Methiocarb	2.21×10 ⁶	3.26×10 ⁵	0.9833
Bendiocarb	4.74×10 ⁶	3.91×10 ⁵	0.9968	Methomyl	6.69×10 ⁶	2.11×10 ⁵	0.9869
Bromoxynil	4.76×10 ⁶	4.08×10 ⁵	0.9932	Metolcarb (MTMC)	5.39×10 ⁷	2.68×10 ⁶	0.9862
Butocarboxim	1.94×10 ⁷	1.01×10 ⁶	0.9836	MPMC (Xylylcarb)	9.87×10 ⁶	1.01×10 ⁶	0.9967
Butocarboxim sulfoxide	1.50×10 ⁷	3.76×10 ⁵	0.9972	Oxamyl	3.36×10 ⁶	2.75×10 ⁵	0.9922
Butoxycarboxim	1.05×10 ⁷	3.06×10 ⁵	0.985	Pirimicarb	5.19×10 ⁷	8.67×10 ⁶	0.9984
Carbaryl	5.04×10 ⁶	1.79×10 ⁵	0.9924	Promecarb	2.93×10 ⁷	3.86×10 ⁵	0.9839
Carbofuran	1.95×10 ⁸	8.43×10 ⁶	0.9886	Propoxur	1.19×10 ⁷	6.91×10 ⁵	0.9925
Carbofuran-3-hydroxy	1.26×10 ⁷	6.69×10 ⁵	0.9881	Rotenone	7.18×10 ⁵	5.43×10 ⁵	0.9994
Clopyralid	-1.28×10 ⁵	7.00×10 ⁵	0.9996	Terbucarb	3.17×10 ⁷	1.65×10 ⁶	0.9872
Cyclanilide	2.01×10 ⁶	6.42×10 ⁵	0.9989	Thiodicarb	5.79×10 ⁶	1.19×10 ⁶	0.9989
Dichlorprop racemate	-9.85×10 ⁵	2.92×10 ⁵	0.9992	Thiofanox	1.38×10 ⁷	7.10×10 ⁵	0.9869
Diethofencarb	8.31×10 ⁴	5.91×10 ⁵	0.9998	Triclopyr	-2.24×10 ⁵	4.50×10 ⁴	0.9979
Ethiofencarb	1.16×10 ⁷	5.24×10 ⁵	0.9853	XMC	2.53×10 ⁶	4.03×10 ⁵	0.9960
Fenobucarb	5.11×10 ⁶	9.57×10 ⁵	0.9977				

表 4 51 种农残化合物准确度和精密密度

Tab 4 Accuracy and precision of 51 Pesticides in Grain feed

Compounds	20 μg/kg	RSD sr/%	40 μg/kg	RSD sr/%	100 μg/kg	RSD sr/%
	Recovery/% (n=6)	(n=6)	Recovery/% (n=6)	(n=6)	Recovery/% (n=6)	(n=6)
Butocarboxim sulfoxide	50.61	7.2	68.21	5.3	58.80	6.2
2,3,5-Trimethacarb	97.81	6.3	96.69	4.5	90.55	5.1
3,4,5-Trimethacarb	109.49	7.1	105.33	6.3	92.82	5.8
Aldicarb	56.68	6.8	59.48	4.1	60.74	3.9
Aldicarb sulfone	52.70	7.0	61.27	4.9	50.87	6.2
Aldicarb-sulfoxide	50.61	5.8	58.21	6.6	58.80	4.1
Aminocarb	58.08	8.2	66.26	4.8	69.32	5.0
Bendiocarb	71.79	4.3	73.45	3.9	83.78	5.1
Butocarboxim	55.78	5.8	69.73	4.2	59.44	4.8

续表

Compounds	20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Recovery/% ($n=6$)	RSD sr/% ($n=6$)	40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Recovery/% ($n=6$)	RSD sr/% ($n=6$)	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Recovery/% ($n=6$)	RSD sr/% ($n=6$)
Butoxycarboxim	57.53	4.9	51.27	3.2	55.79	5.1
Carbaryl	57.29	6.6	65.17	7.3	55.41	5.4
Carbofuran	78.11	6.0	78.44	5.3	81.41	4.8
Carbofuran-3-hydroxy	82.38	4.5	80.47	3.9	72.85	6.0
Diethofencarb	97.85	4.9	96.74	5.2	77.52	6.9
Ethiofencarb	90.51	5.3	89.26	4.6	80.50	6.1
Fenobucarb	61.70	7.2	63.63	6.3	67.48	5.8
Fenothiocarb	104.09	6.9	103.33	7.1	59.01	7.6
Furathiocarb	97.58	4.9	84.14	5.7	57.74	6.2
Isoproc carb	97.81	7.2	96.69	6.3	90.55	4.2
Methiocarb	92.61	5.8	93.78	7.1	64.08	5.2
Methomyl	58.65	6.9	66.52	5.8	63.61	4.3
Metolcarb (MTMC)	100.72	5.8	109.48	7.1	54.25	6.3
Xylylcarb (MPMC)	65.89	6.4	79.79	3.9	79.14	5.8
Oxamyl	70.64	7.2	60.52	8.9	53.55	6.4
Pirimicarb	95.71	4.9	81.85	6.7	71.45	5.8
Promecarb	61.70	5.3	64.41	6.9	57.48	5.1
Propoxur	89.43	4.1	87.34	3.7	91.65	4.9
Terbucarb	106.19	6.8	96.88	4.9	57.97	5.6
Thiodicarb	77.53	5.9	67.11	6.3	63.40	4.2
Thiofanox	72.58	3.9	76.97	5.2	79.81	6.1
XMC	65.11	6.9	63.31	4.3	61.47	3.7
2,4,5-T	68.2	6.3	72.5	7.6	62.5	5.0
2,4-D (2,4-PA)	64.8	4.2	63.8	6.4	70.7	6.4
2-Naphthylxyacetic acid	66.1	6.1	64.5	8.9	69.8	5.5
4-Chlorophenoxyacetic acid	76.9	8.8	80.7	8.4	74.1	5.0
Acifluorfen	74.6	7.0	79.7	9.1	88.2	7.0
Aclonifen	72.1	9.1	87.3	7.6	70.9	6.9
Bromoxynil	67.5	8.5	73.7	8.8	88.8	4.5
Clopyralid	66.1	9.2	80.4	5.0	89.8	7.9
Cyclanilide	75.6	9.4	69.6	6.4	77.9	5.6
Dichlorprop racemate	76.4	9.5	61.1	5.5	70.7	3.6
Fenothiocarb	60.9	9.2	63.0	5.0	64.0	7.5
Fluroxypyr	72.0	7.6	71.2	7.0	74.4	8.5
Fomesafen	78.5	6.4	74.1	6.9	67.9	9.6
Gibberellic acid	67.0	8.9	73.8	4.5	75.4	6.7
Ioxynil	61.0	8.4	68.1	7.9	69.3	10.3
MCPA	79.5	9.1	77.6	5.6	78.9	6.3
MCPB	70.8	7.6	63.2	3.6	73.3	4.2
Mecoprop	74.2	8.8	74.8	7.6	69.2	6.1
Rotenone	64.6	5.0	70.7	9.4	71.1	8.0
Triclopyr	74.8	6.4	71.2	8.9	65.5	7.3

3 讨论与结论

3.1 前处理方法的研究 尝试了多种前处理方法,包括固相萃取柱法、分散固相萃取法和直接萃取后稀释进样法,发现无论是固相萃取柱法还是分散固相萃取法都会产生对某些化合物的歧视效应,因为多残留检测面对的目标化合物的范围广泛,性质差异也较大,最后还是选择直接萃取后稀释法作为本方法前处理方法。尝试了 0.1 mol/L 盐酸溶液:甲醇=1:3,1:1,3:1 以及 0.1 mol/L 盐酸溶液:乙腈=1:3,1:1,3:1 的提取 1 倍定量限、2 倍定量限、5 倍定量限的 51 种农残化合物的效率,主要

考察对象为回收率均值和标准偏差,并将其中回收率结果在均值的 $\pm 40\%$ 以外的数据定义为乖离数据,统计其个数,实验结果见表 5。通过这三项指标,发现使用 0.1 mol/L 盐酸溶液:甲醇=1:3 和 1:1 以及 0.1 mol/L 盐酸溶液:乙腈=1:3 的回收率均值均达到了 70% 以上,结合对各化合物回收率的相对标准偏差比较可知,使用 0.1 mol/L 盐酸溶液与甲醇组成的提取剂均具有更小的相对标准偏差,而统计乖离数据个数也佐证了 0.1 mol/L 盐酸溶液:甲醇=1:3 具有更小的歧视效应,因此,选择该条件作为前处理方法。

表 5 谷物饲料中 51 种农残化合物提取效率研究

Tab 5 Research on Extraction Efficiency of 30 Carbarmates in grain feed

	0.1 mol/L HCl : Methanol			0.1 mol/L HCl : Acetonitrile		
	1 : 3	1 : 1	3 : 1	1 : 3	1 : 1	3 : 1
Average Recovery/%	74.44	75.62	59.39	78.59	64.00	50.38
RSD/%	20.9	41.97	41.52	24.35	34.88	53.84
Number of Deviation	7	9	15	11	9	16

3.2 定性与定量方法的研究 根据欧盟相关规定^[15],以识别分 (identification points, IPs) 为基础进行化合物的定性分析,对于不同法规要求的残留物,确证所需的 IPs 也各不相同,A 类(违禁)需满足 4IPs,B 类(限用)满足 3IPs,农药残留适用违禁物质 A 类,因此,需要 4IPs 来进行确证;不同的技术所获得的 IPs 也不同,静电轨道阱质谱作为高分辨质谱获得的一个母离子有 2.0IPs,相对应的一个子离子有 2.5IPs,因此,选出一对合适的母离子与子离子就可以确证一个农残化合物。按照此原则和 1.3~1.4 项的仪器方法,对目标农药残留药物进行了标品的进样并建库分析,获得最合适的目标物母离子精确质量数、保留时间以及其二级碎片离子的全扫描图谱,结合 Mass Frontier 所推断的子离子找出丰度最高的子离子和母离子一起作为确证所需的定性离子。51 种农药残留的保留时间、母离子精确质量数和子离子精确质量数相结合可作为定性依据,具体信息见

表 2。定量时用一级母离子的精确质量数对总离子流图进行提取色谱图,对目标物的色谱峰进行积分,通过曲线校准或单点校准进行定量分析。

3.3 区分同分异构体的研究 方法中涉及的目标化合物包含多对同分异构体,比如丁酮威亚砒和涕灭威亚砒,丁酮威砒和涕灭威砒,丁酮威和涕灭威,灭除威和灭杀威等,它们具有相同的分子组成,因此,即使静电轨道阱质谱拥有高达 140000 分辨率的质量精度也无法区分这些化合物,但是,多残留筛查过程中不可排除这些化合物同时存在的可能,因此,经过实验验证可采用三种不同方法解决这一问题。其一,通过质谱前端的液相部分对元素组成相同但分子结构差异较大的化合物采用优化梯度洗脱条件,增加色谱分离度的办法,使同分异构体目标化合物的保留时间有较大差异,从而实现分离定性,例如本方法中丁酮威亚砒和涕灭威亚砒等;其二,通过质谱源区对同分异构体目标化合物母离子带电行为的

差异,分别检测其不同的加合物形式进行区分,例如丁酮威和涕灭威,丁酮威砒和涕灭威砒这两对化合物经过单标进样后发现涕灭威和丁酮威砒在 ESI+离子源作用下难以获得+H 的母离子,而主要以+Na 离子形式存在,而丁酮威和涕灭威砒母离子则主要以+H形式存在,因此,在保留时间接近难以区分时,检测不同形式的母离子加合物也可以起到区分同分异构体的目的;其三,有些同分异构体化合物保留时间非常接近,母离子加合物形式也相同,那只能通过单标进样后分析其所产生的特征碎片离子的差异进行区分,灭除威和灭杀威就是一例。

本研究建立了超高效液相色谱-静电轨道阱质谱法检测谷物饲料中的 51 种农药残留物的检测方法和目标化合物的质谱数据库。谷物饲料样品经 0.1 mol/mL HCl : 甲醇 = 1 : 3 提取,高速离心,经稀释后进样分析。实验结果表明,51 种,农残化合物分离良好,在定量范围内均线性良好(线性相关系数 $r \geq 0.99$),回收率也可达到 50.61% ~ 109.49%,相对标准偏差(RSD)小于 9.3%。本方法具有简便、快速、灵敏、准确等特点,适用于谷物饲料中同时筛查和定量农残化合物。

参考文献:

- [1] 黄海泉,荣德福,蔡曹盛,等. 进口粮食农药残留检测技术的研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2012, 271(2): 130-153.
Huang H Q, Rong D F, Cai C S, *et al.* Advance in Detection Technologies of Pesticide Residues in Imported Grains [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2012, 271(2): 130-153.
- [2] 刘宝峰,刘罡一,马又娥,等. 高效液相色谱-串联质谱法检测蔬菜水果中 65 种农药残留方法研究[J]. 科技通报, 2010, 26(1): 93-99.
Liu B F, Liu G Y, Ma Y Y, *et al.* Study on Determination of Multi-Residues for 65 Pesticides in Vegetables and Fruits Using Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry [J]. Bulletin of Science and Technology. 2010, 26(1): 93-99.
- [3] 陈树兵,单正军,胡秋辉. 食品中农药残留检测的样品前处理技术[J]. 食品科学, 2004, (12): 152-155.
Chen S B, Dan Z J, Hu Q H. Review on Sample Preparation Techniques of Pesticide Residue Determinations in Foods [J]. Science of Food. 2004, 12 :152-155.
- [4] 吴剑平,周悦榕,张 婧,等. 超高效液相色谱-静电轨道阱质谱同时筛查定量饲料中的 31 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(11): 1363-1369.
Wu J P, Zhou Y R, Zhang J, *et al.* Synchronous Screening and Quantitation of 30 Carbamate Pesticides Residue in Feed by Ultra Performance Liquid Chromatography- Orbitrap Mass Spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36 (11): 1363 - 1369.
- [5] Joann Gramt, Carol A. Rodgers, Clark D. Determination of Chlorantraniliprole Residues in Crops by Liquid Chromatography Coupled with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Chikering [J]. Journal of AOAC International, 2010, 93: 1293- 1301.
- [6] 张卫锋,洪振涛,李嘉静. 气相色谱法测定咸鱼中的敌百虫和敌敌畏[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(6): 14-16.
Zhang W F, Hong Z T, Li J J. Determination of Trichlorfon and Dichlorovos Pesticide Residues in Salt Fish by Gas Chromatography [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2007, 41(6): 14-16.
- [7] 张 芬,张新忠,罗逢健,等. QuEChERS 净化 GC/ECD 测定茶叶与土壤中噻虫嗪、虫螨腈及高效氯氟氰菊酯残留[J]. 分析测试学报, 2013, 32(4): 393- 400.
Zhang F, Zhang X Z, Luo F J, *et al.* Residue Analysis of Thiamethoxam, Chlorfenapyr and Lambda-cyhalothrin in Tea and Soil by GC /ECD after QuEChERS Clean-up Instrum [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(4): 393- 400.
- [8] 吴剑平,张 鑫,顾 欣,等. 分散液相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法检测猪尿中盐酸赛庚啶残留量的研究[J]. 分析测试学报, 2013, 32(7): 834-839.
Wu J P, Zhang X, Gu X, *et al.* Determination of Cyproheptadine Hydrochloride in Swine Urine by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction /Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(7): 834-839.
- [9] 樊雯娟. 分散相萃取-高效液相色谱联用技术在果蔬农残中的研究与应用[D]. 新疆: 石河子大学, 2010.
Fan W J. Derermination of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by Dispersive Extraction /High Performance Liquid Chromatography [D]. Xinjiang: Shihezi University, 2010.
- [10] 王小飞. 土壤中 65 种农药残留检测技术的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.

- Wang X F. Study on Determination of 65 Pesticides Residues in Soil[D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2013.
- [11] 孙雷,王亦琳,叶妮,等.猪肉中 92 种兽药残留的 UPLC-Qtrap 高通量筛查和定量方法的研究[J].中国兽药杂志,2017,51(9):36-42
- Sun L, Wang Y L, Ye N, *et al.* The Study on High-throughput Screening and Quantitative Method for 92 Veterinary Drugs Residues in Pig Muscle by UPLC-Qtrap[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2017,51(9):36-42.
- [12] 宓捷波,毕玉国,赵孔祥,等.葡萄酒中 10 种多酚类物质的高效液相色谱-四极杆/静电场轨道高分辨质谱测定方法研究[J].分析测试学报,2015,34(11):1227-1232.
- Mi J B, Bi Y G, Zhao K X, *et al.* Studies on Determination of 10 Polyphenols in Wine by HPLC-Quadrupole/Electrostatic Field Orbitrap HRMS [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015,34(11):1227-1232.
- [13] 柳菡,张亚莲,丁涛,等.高效液相色谱-四极杆/静电场轨道高分辨质谱用于葡萄酒中 111 种农药残留的定性筛查与定量分析[J].分析测试学报,2014,33(5):489-498.
- Liu H, Zhang Y L, Ding T, *et al.* Screening and Quantification of 111 Pesticide Residues in Wines by High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole/Electrostatic Field Orbitrap High-resolution Mass Spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(5): 489-498.
- [14] 日本农业化学品“主动列表”制度最终通报.日本厚生劳动省通报标准[S].
- G/SPS/N/JPN/145. The Final Draft of the Active List System of Agricultural Chemicals in Japan[S].
- [15] 欧盟委员会关于分析法和结果说明的表现结果的 96/23/EC 号理事会指令的实施决议,内容与欧洲经济区(EEA)相关;通报文件编号 C(2002)3044). 欧盟委员会标准[S].
- 2002/657/EC. Commission Decision Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, Text with EEA Relevance; Notified under Document Number C(2002)3044) [S].

(编辑:侯向辉)