

气相色谱串联质谱法测定香菇中几种 氨基甲酸酯农药残留量

韩 梅, 侯 雪

(四川省农科院测试中心 四川 成都 610066)

摘 要:建立凝胶渗透色谱净化,气相色谱串联质谱法测定香菇中速灭威、仲丁威、抗蚜威、克百威、三羟基克百威、甲萘威等 6 种氨基甲酸酯类农药残留的方法。样品用乙腈提取,凝胶渗透色谱净化,经毛细管柱(VF-5MS, 30 m×0.25 mm×0.25 μm)分离,采用串联质谱法进行定性定量分析。6 种农药在 0.010~0.500 mg/L 时与峰面积有良好的线性关系($r^2>0.99$),在 3 个添加浓度水平(0.020, 0.040, 0.100 mg/kg)上,农药的平均回收率在 84.0%~123.9%之间,相对标准偏差为 0.3%~7.7%($n=5$),检出限(3 S/N)为 0.046~6.4 μg/kg。该方法操作简单准确、灵敏度高、重现性较好,满足农残分析的需要,可用于检测香菇中 6 种氨基甲酸酯类农药残留。

关键词:凝胶渗透色谱(GPC),气相色谱串联质谱法,氨基甲酸酯农药,香菇

中图分类号:S646.1*2;O657.7*1;O657.63;TS207.5*3 文献标志码:A 文章编号:1674-5124(2013)01-0052-04

Determination of carbamate pesticide residues in Shiitake mushroom by GC-MS/MS

HAN Mei, HOU Xue

(Testing Center, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: A gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method has been developed for determining 6 carbamate pesticide residues, i.e., metolcarb, fenobucarb, carbofuran, pirimicarb, 3-hydroxycarbofuran and carbaryl in Shiitake mushroom samples. Acetonitrile was used for extracting pesticides from samples and the extract was cleaned up by gel permeation chromatography (GPC), and the pesticide residues were identified and quantified using gas chromatography mass spectrometry detector. In the linear range (0.010–0.500 mg/L) of 6 pesticides, the correlation coefficient was higher than 0.99. When the spiked levels were 0.020, 0.040, and 0.100 mg/kg in the samples, the mean recoveries of 6 carbamate pesticides from the Shiitake mushroom were obtained from 84.0%–123.9%, the relative standard deviation values (RSDs) ranged from 0.3% to 7.7% ($n=5$). Under optimized conditions, the limit of detection (LOD) of the pesticides in samples were in the range of 0.046–6.4 μg/kg (3S/N), and the sensitivity, accuracy and precision of this method can meet the requirements of the pesticide residue analysis, so it can be applied to determine 6 carbamate pesticide residues in the Shiitake mushroom.

Key words: GPC; GC-MS/MS; carbamate pesticide; Shiitake mushroom

0 引 言

氨基甲酸酯类农药是一种高效、广谱型杀虫剂,母体结构为含氮合成的氨基甲酸酯衍生物,能抑制

昆虫体内乙酰胆碱酯酶,阻断正常的神经传导,使昆虫中毒死亡^[1]。氨基甲酸酯类农药对食品安全和生态环境存在潜在威胁,许多国家和地区对这类农药残留规定了严格的限量。

目前,氨基甲酸酯类农药的测定方法有很多^[1],主要有气相色谱法(GC)^[2-3]、液相色谱法(LC)^[4]、气相

收稿日期:2012-06-14;收到修改稿日期:2012-08-02

作者简介:韩 梅(1969-),女,四川宜宾市人,副研究员,硕士,主要从事农产品检验工作。

色谱-质谱法(GC-MS)^[5-6]、气相色谱串联质谱法(GC-MS/MS)^[7-8]、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)^[9]等。现在一般的产品标准,包括国家标准与行业标准的检测方法多为气相色谱法、液相色谱法,灵敏度较低,且阳性确证困难,尤其是对基质复杂的样品,不能准确定性、定量。

本方法以食用菌中常规气相色谱法分析中基质干扰最大的香菇为研究对象。香菇是世界第二大食用菌,也是我国特产之一,在民间素有“山珍”之称。香菇在生长、储运过程中,为了防治病虫害,难免会使用化学防治方法,为了保证食品安全,需监测其农药的残留情况。本文采用体积排阻色谱-凝胶渗透色谱(GPC)法对样品进行净化,以除去香菇中氨基酸、多糖类等大分子物质,然后采用气相色谱串联质谱法对抗蚜威等 6 种具有代表性的氨基甲酸酯农药进行测定,建立了香菇中 6 种氨基甲酸酯农药的 GPC 净化及 GC-MS/MS 的检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

气相色谱-质谱联用仪:Varian 450 GC-320 MS/MS(美国 Varian 公司);德国 IKA 高速匀浆机;涡旋混匀器;凝胶渗透色谱仪(美国 J2 Scientific),配有内充 Bio-Beads S-X3 玻璃柱(内充凝胶 22 g, 20 cm×2 cm);旋转蒸发仪(瑞士 Büchi)。

丙酮、乙腈均为色谱纯;乙酸乙酯、环己烷为分析纯;去离子水、氯化钠为分析纯;克百威等 6 种农药标准购于北京中国标准技术开发公司,标样开发部,均为 100 mg/L。

氨基甲酸酯农药标准溶液的配制:准确吸取 100 mg/L 单一标液各 1 mL,置于 50 mL 容量瓶中,用丙酮稀释定容至刻度,此混合储备液浓度为 2.0 mg/L。根据实验需要,用正己烷-丙酮(9:1)稀释成不同浓度的混合标准使用液。

样品来源:市场上的抽检样。

1.2 样品制备

(1)提取净化。准确称取 25.0 g 粉碎试样放入匀浆机中,加入 50.0 mL 乙腈,在匀浆机中高速匀浆 2 min 后,用滤纸过滤或抽滤,滤液收集到装有 5~7 g 氯化钠的 100 mL 具塞比色管或具塞量筒中,收集滤液 40~50 mL,盖上塞子,剧烈震荡 1 min,在室温下静置 60 min,使乙腈相和水相分层。

(2)浓缩。吸取 10.00 mL(相当于 5 g 样品)乙腈溶液,在 40℃水浴旋转蒸发至近干,准确加入乙酸乙酯+环己烷(1:1)10.0 mL 的混合溶剂溶解残渣,用 0.45 μm 有机系滤膜过滤后移入 10 mL 样品瓶中,供凝胶净化。

(3)GPC 净化。流动相为环己烷+乙酸乙酯(1:1),流速为 4.7 mL/min,进样量为 5.0 mL,收集 8~20 min 流出的组分于旋蒸瓶中,40℃蒸发至近干,用正己烷-丙酮(9:1)准确定容到 2.5 mL,供质谱测定。

1.3 标准系列制备方法

分别吸取一定量的混合标准储备液(2.0 mg/L)于 10 mL 容量瓶中,用正己烷-丙酮(9:1)稀释定容至刻度,配成 0.010, 0.040, 0.100, 0.200, 0.500 mg/L 等一系列的标准使用液。

1.4 农药色谱条件

气相色谱条件:色谱柱为 VF-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样口(1079)温度 60℃保持 1.0 min,以 200℃/min 升到 250℃,保持 10 min,再以 200℃/min 降到 60℃;PTV 进样方式:不分流进样,进样量 5.0 μL。柱温 50℃保持 3 min,以 25℃/min 升至 150℃,不保持,再以 10℃/min 升温至 260℃,保持 2 min。载气:高纯氮气(99.999%),恒流 1.2 mL/min。

质谱条件:电子轰击离子源(EI);电子轰击能 70 eV;离子源温度 230℃;传输温度 280℃,溶剂延迟 7 min。碰撞气(氩气)为 1.5 mTorr。各组分的保留时间、母离子、特征碎片离子、碰撞电压、驻留时间见表 1。

表 1 6 种氨基甲酸酯农药的分析参数

序号	农药名称	保留时间/ min	m/z	碰撞能量/ eV	驻留时间/ s
1	速灭威	9.41	165/107	15	0.100
			165/108	12	0.100
2	仲丁威	10.741	121/77	20	0.100
			150/121	10	0.100
3	克百威	12.042	164/149	10	0.100
			221/164	10	0.100
4	抗蚜威	13.006	238/166	10	0.100
			166/96	5	0.100
5	三羟基克百威	13.558	237/137	20	0.100
			237/180	8	0.100
6	甲萘威	13.733	201/144	10	0.100
			144/115	25	0.100

2 结果与讨论

2.1 提取方法的选择

本法前处理提取方法参照标准方法 NY/T 761-2008^[4]。实验表明,乙腈在提取农残方面比乙酸乙酯更具有优势^[9]。(1)乙腈的饱和蒸气压较乙酸乙酯更低,因此挥发性更小一些。(2)使用乙腈能保证较高的提取效率,能提取的农残种类范围更广。(3)较之丙酮、乙酸乙酯等萃取溶剂,用乙腈萃取,共萃物更少,在提取这一步就减少了部分干扰。因此,本实验采用乙腈提取。

2.2 净化方法的选择与优化

香菇中含有丰富氨基酸、蛋白质、多种矿物质和多糖等营养成分,在气相色谱测定中会产生大量的干扰成分,采用柱层析等净化方法也不能有效地将干扰杂质除去,同时农药成分有可能损失,且操作步骤繁杂。但是选用中性、多孔的 Bio-Beads SX-3 作为 GPC 柱填料,使用自动化 GPC 系统不仅能进行有效地分离净化,而且还大大节约了时间和溶剂^[1]。本实验选用体积比为 1:1 的乙酸乙酯-环己烷溶液作为流动相,流速为 4.7 mL/min,按 1.2(3)方法分时间段收集样品,分别检测各段流出液中组分的含量,发现 8 min 以前的收集液中未检出农药,三羟基克百威在 8 min 就开始流出,其他的农药在 9 min 后开始流出,18 min 以后的收集液中未检出农药。考虑到凝胶色谱柱有可能有拖尾情况出现,于是在农药流出的时间段后多收集 2 min;因此,最后确定样品过凝胶柱净化的收集时间为第 8~20 min,共收集 13 min 流出液。

2.3 GC-MS/MS 方法的建立

香菇基质成分比较复杂,含有大量的易挥发性物质,即使是经过净化后的样品,应用气相色谱和单级质谱法分析时,都会发生严重的干扰现象,所以要准确地定性定量需结合高选择性的 MS/MS 技术,以提高检测的准确性和灵敏度。为此,需要对待测目标农药的色谱条件进行一系列参数设置和优化,选择合适的特征离子。本实验先通过色谱分离来确定 6 种农药组分的保留时间。比如确定了速灭威保留时间为 9.41 min,然后通过对 6 种农药组分进行单级质谱扫描来确定每种农药组分的主要碎片离子,一般是选择分子离子或相对丰度较大、高质量端的一级碎片离子,且能产生较强响应的子离子的碎片离子作为母离子^[12],其他响应较强的碎片离子作为子离子。比如速灭威的分子离子为 165(m/z),选它作为母离子,其他响应较强的离子有 108(m/z)、107(m/z)可作为子离子,然后应用子离子扫描模式(MS/MS)分别对选定的母离子进行二次轰击,获得其子离子谱图,组成多反应监测通道。最后分别在不

同的碰撞能量(5~50 V)下对多反应监测方法进行优化,选择能使监测到的子离子产生最强响应的碰撞能量作为最终碰撞能量,从而得到优化后的多反应监测条件,结果见表 1。

2.4 方法的线性关系和检出限

称取不含农药的香菇空白样品,采用上述的提取净化条件,经 GPC 净化后旋转蒸发至近干,用正己烷-丙酮(9:1)定容,配成了基质空白溶液。按 1.3 的方法,将 2.0 mg/L 的 6 种农药的混合标准溶液稀释定容,配制成质量浓度分别为 0.010, 0.040, 0.100, 0.200, 0.500 mg/L 的系列标准溶液,按照 1.4 色谱分析条件对上述一系列标准工作溶液与空白样品进行测定,以各氨基甲酸酯组分的峰面积(y)对质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)绘制标准曲线。以每种农药最低质量浓度点定量离子的响应值与空白样品中噪声响应的 3 倍外推法计算检出限(LOD),方法的线性关系、检出限结果见表 2。从表 2 中的数据看出,在 10~500 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内,该方法的线性关系良好,相关系数均大于 0.99,6 种农药目标物的检出限为 0.046~6.4 $\mu\text{g/kg}$,可以满足定量分析的要求。

2.5 加标回收率及相对标准偏差

向空白样品定量添加上述 6 种农药的混合标准溶液,添加浓度分别为 20, 40, 100 $\mu\text{g/kg}$,添加后按照“1.2”节所述步骤进行提取、浓缩、净化和测定,用优化后的 EI-MS/MS 参数平行分析 5 次,加标回收率和相对标准偏差见表 2。加标回收谱图及空白谱图见图 1 和图 2。从表 2 可以看出,添加水平为 20, 40, 100 $\mu\text{g/kg}$ 时,6 种目标物在样品中的平均回收率为 84.0%~123.9%,相对标准偏差(RSD, $n=5$)为 0.30%~7.7%,不大于 15%,符合痕量残留分析。从空白与样品总离子流图(图 1 与图 2)来看,虽然有杂峰,但比气相色谱干扰小的多,不干扰目标离子,所以采用母离子与子离子的 GC-MS/MS 多反应监测模式可以增强定性结果的可靠性,且由于本底值大大降低,定量时检测的灵敏度可以得到较大的提高。采用本方法所得到的基质谱图中杂质峰少,对 6 种农药目标物均无明显干扰现象,从而在根本上解决了

表 2 6 种氨基甲酸酯的线性方程、相关系数(r^2)、方法检出限(LOD)、平均回收率与相对标准偏差($n=5$)

序号	农药名称	线性方程	相关系数 r^2	LOD(S/N=3)/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	20 $\mu\text{g/kg}$		40 $\mu\text{g/kg}$		100 $\mu\text{g/kg}$	
					回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
1	速灭威	$Y=6.5861\times10^4x+2.8276\times10^4$	0.9999	0.055	118.8	4.2	105.9	1.4	116.2	3.6
2	仲丁威	$Y=1.4184\times10^5x+6.1430\times10^5$	0.9994	0.046	120.2	3.2	116.6	2.9	123.9	0.3
3	克百威	$Y=1.3301\times10^5x+1.6212\times10^5$	0.9999	1.8	121.8	2.2	103.9	1.7	110.9	3.3
4	抗蚜威	$Y=2.0921\times10^5x-3.4789\times10^6$	0.9973	2.0	120.7	3.0	106.1	0.5	121.1	2.1
5	三羟基克百威	$Y=1.1770\times10^5x-1.2016\times10^5$	0.9999	6.4	105.1	2.3	88.8	1.3	84.0	7.7
6	甲萘威	$Y=2.1923\times10^5x+1.9144\times10^5$	0.9998	2.1	120.9	2.9	99.5	1.5	103.0	1.4

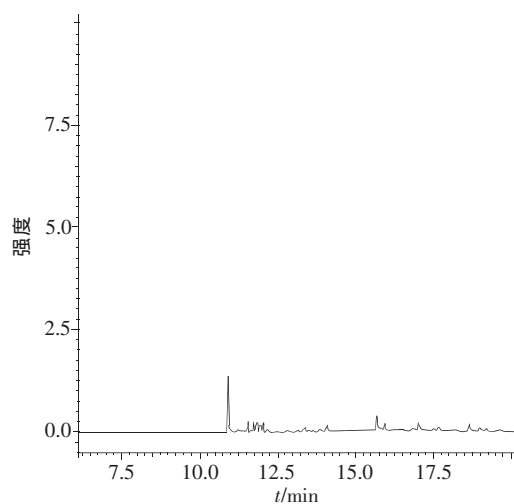
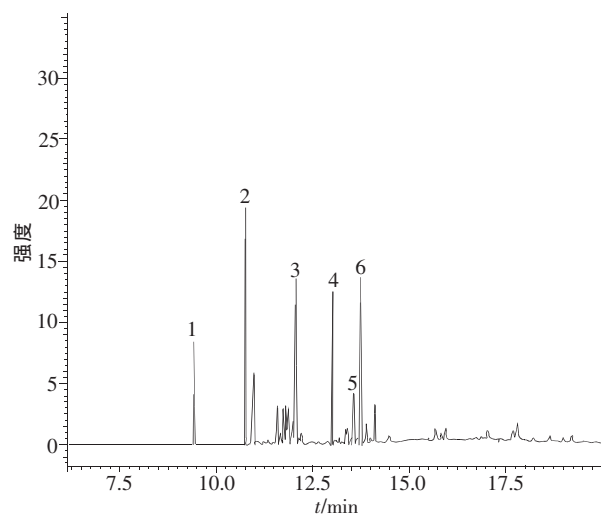


图 1 空白香菇样品的总离子流图

1.速灭威;2.仲丁威;3.克百威;4.抗蚜威;
5.三羟基克百威;6.甲萘威。

基质成分非常复杂的香菇中农残检测工作易出现的干扰问题。

3 结束语

本文建立了乙腈提取、凝胶渗透色谱净化、气相色谱-串联质谱法检测香菇样品中 6 种氨基甲酸酯类农药残留的方法,较好地排除了香菇样品中基质的干扰,减少了本底值,降低了方法检出限。此外,前处理方法省时省力,且自动化程度较高,提取效率也比较满意,净化的溶剂毒性较小,在过小柱时避免使用毒性大的甲苯、二氯甲烷等洗脱溶剂。本方法可应用于食用菌中基质干扰大的香菇类样品中氨基甲酸酯类农药残留的快速、简便定性定量分析。

参考文献

- [1] 张帆,李忠海,王利兵,等.食品中氨基甲酸酯类农药残留的检测方法研究进展[J].中国食物与营养,2010(2):64-66.
- [2] GB/T 104—2003 植物性食品中氨基甲酸酯类农药残留量的测定[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [3] 王会锋,冯书惠,贾斌.香菇中 40 种农药残留量的气相色谱法测定[J].食品科学,2010,31(20):335-341.
- [4] NY/T 761—2008 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定[S].北京:中国标准出版社,2008.

图 2 香菇空白样品加标回收的总离子流图

- [5] GB/T 23216—2008 食用菌中 503 种农药及相关化学品残留量的测定气相色谱-质谱法[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [6] 吕燕,赵健,杨挺,等.气相色谱质谱法检测蔬菜中多效唑的残留[J].中国测试,2010,36(4):57-59.
- [7] 陈红平,刘新,汪庆华.气相色谱-串联质谱检测水果、蔬菜中抗蚜威、甲霜灵和克螨特残留量[J].质谱学报,2010,31(4):220-223.
- [8] 于胜良,杨桂朋,付萌.凝胶渗透色谱净化-气相色谱/串联质谱分析蘑菇中的 36 种农药残留[J].色谱,2007,25(4):581-585.
- [9] 杨如箴,王金花,张蓉,等.凝胶渗透色谱净化超高效液相色谱-串联质谱法检测甘草及其提取物中的 11 种氨基甲酸酯类农药残留色谱[J].色谱,2010,28(8):769-775.
- [10] 易盛国,侯雪,韩梅,等.气相色谱-串联质谱法测定生姜中 25 种农药残留量[J].理化检验-化学分册,2012,48(3):1-5.
- [11] 刘永梅,王志华,储晓刚.凝胶渗透色谱技术在农药残留分析中的应用[J].分析测试学报,2005,24(2):123-127.
- [12] 赵洋,戚晓霞.气相色谱-串联质谱法测定皮革和纺织品中的富马酸二甲酯[J].色谱,2010,28(1):54-58.