

## 茶叶中的农药多残留分析：在QuEChERS方法萃取后优化净化流程，进行UPLC-MS/MS和GC-MS/MS分析

Michael S. Young、Kim Van Tran和Jeremy C. Shia  
沃特世公司，美国马萨诸塞州米尔福德

### 应用优势

- 使用QuEChERS法快速萃取干茶叶中的农残
- 对样品进行简单、快捷的dSPE净化，再进行UPLC-MS/MS分析；减少仪器维护时间
- UPLC-MS/MS分析之前直接对酸性农药样品进行SPE净化
- GC-MS/MS分析前直接对样品进行SPE净化，可延长色谱柱使用寿命，减少进样口所需的维护过程
- 在GC-MS/MS分析应用中采用大气压电离法

### 沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® I-Class

Xevo® TQ-S质谱仪

APGC

ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱

DisQuE™ 试剂盒 (用于QuEChERS萃取和dSPE净化)

Sep-Pak® PSA/石墨化碳萃取柱 (用于GC-MS分析)

Oasis® MAX萃取柱 (用于酸性农药分析的净化环节)

经LCMS认证的样品瓶

带Quanpedia™ 数据库的MassLynx® V4.1数据系统

### 关键词

QuEChERS, 农药, SPE, 茶叶, LC-MS/MS, GC-MS/MS

### 引言

使用QuEChERS法可以简化、加快农药分析中的样品制备，尽管该方法可有效用于对水果、蔬菜等产品的农残分析，但在分析干的物品（如茶叶）时，仍面临着各种挑战。对干物品进行农残分析时，不仅需在QuEChERS萃取前在样品中加适量水进行溶胀，在处理树脂含量高的叶状物（如茶叶）时还需要进行针对性的净化后进行LC-MS和GC-MS分析。

本应用案例介绍了用于干茶叶农药多残留分析的QuEChERS萃取和SPE净化法。首先向茶叶样本加水进行溶胀，然后使用DisQuE试剂按照CEN QuEChERS方法萃取。取三份萃取液进行后续分析。对第一份进行dSPE净化，然后进行UPLC-MS/MS分析碱性/中性农药；对第二份使用SPE萃取柱进行净化，然后进行GC-MS分析碱性/中性农药；对第三份进行SPE净化，然后进行LC-MS/MS分析不适于使用PSA（乙二胺-N-丙基硅烷）净化的酸性农药。下表列出的是使用这三种净化法从干的红茶中提取出的农药的回收率。

## 实验

### UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> 1.7 µm, 2.1 × 100 mm
进样体积:	5 µL
温度:	45 °C
流动相A:	10 mM醋酸铵水溶液 (pH值为5.0)
流动相B:	10 mM醋酸铵甲醇溶液
流速:	0.45 mL/min
梯度:	初始条件为10%的流动相B保持0.25 min, 到12.25 min时以线性梯度增加至99%, 保持至13.0 min, 到13.1 min时降回10%, 保持并重新平衡系统直至17 min

### UPLC的MS条件

仪器:	Waters® Xevo TQ-S
离子模式:	ESI+, ESI-
毛细管电压:	3.0 kV
提取电压:	3.0 V
源温度:	150 °C
锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气温度:	500 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
碰撞气流速 (氩气):	0.18 mL/min

表1列出了本研究中所用的LC-MS/MS锥孔和碰撞参数以及MRM通道。

### GC条件

仪器:	Agilent 7890
色谱柱:	J&W DB% MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm
进样体积:	2 µL, 不分流
流速:	2.0 mL/min氦气 (恒定气流)
程序升温:	80 °C 的初始温度保持0.5 min, 然后以12 °C/min的速度升至300 °C, 并保持10 min

### APGC的MS条件

仪器:	Waters Xevo TQ-S
模式:	API正离子
电晕电流:	2.2 µA
源温度:	150 °C
探头温度:	450 °C
锥孔气流速:	170 L/h
辅助气流速:	250 L/h
喷雾器气体:	4.0 Bar
碰撞气流速 (氩气):	0.18 mL/min

表2列出了用于此研究的GC-MS/MS锥孔和碰撞参数, 以及MRM通道。

LC-MS/MS (dSPE净化)

农药	MRL ppb (EU)	RT min	MRM m/z	(锥孔电压 V, 碰撞能量 eV)	回收率% (n=6) @ 10, 100 ppb (% RSD)	
高灭磷	50	1.35	184.1 > 125.1 (8,18)	184.1 > 143.0 (8,8)	LOQ	101 (11)
啉虫脒	100	4.03	223.0 > 126.0 (30,20)	223.0 > 56.1 (30,15)	96 (7)	101 (2)
联苯三唑醇	100	9.81	338.1 > 70.1 (30,8)	338.1 > 99.1 (30,16)	107 (47)	87 (16)
胺甲萘	50	6.40	202.0 > 145.0 (30,10)	202.0 > 127.0 (30,26)	84 (23)	112 (11)
唑酮草酯	20	9.27	412.0 > 346.0 (30,24)	412.0 > 266.0 (30,18)	108 (11)	114 (3)
四螨嗪	50	9.72	303.0 > 138.0 (30,18)	303.0 > 102.0 (30,33)	94 (10)	97 (6)
噻虫胺	70	10.97	250.0 > 169.0 (30,12)	250.0 > 132.0 (30,17)	89 (40)	111 (9)
二嗪磷	50	9.50	305.1 > 169.0 (30,22)	305.1 > 96.9 (30,35)	108 (6)	103 (2)
敌敌畏	20	5.82	221.0 > 109.0 (30,22)	221.0 > 79.0 (30,34)	101 (8)	107 (5)
伏虫脲	100	9.10	311.1 > 158.1 (30,18)	311.1 > 141.0 (30,35)	115 (20)	107 (3)
乐果	50	3.82	230.1 > 125.0 (30,20)	230.1 > 199.0 (30,10)	105 (18)	109 (3)
敌草隆	100	9.82	233.0 > 72.1 (30,30)	233.0 > 46.3 (30,14)	83 (15)	110 (6)
甲氰菊酯	2000	11.14	350.1 > 125.0 (30,14)	350.1 > 97.0 (30,34)	74 (6)	80 (5)
唑螨酯	100	11.18	422.2 > 138.1 (30,32)	422.2 > 366.1 (30,18)	90 (10)	92 (5)
吡虫啉	50	3.50	256.1 > 209.1 (30,16)	256.1 > 175.1 (30,19)	97 (10)	105 (11)
马拉硫磷	500	8.34	331.0 > 127.0 (30,12)	331.0 > 99.0 (30,24)	98 (10)	107 (5)
久效磷	50	2.95	224.1 > 127.1 (30,16)	224.1 > 98.0 (30,12)	98 (7)	105 (5)
双苯氟脲	10	10.31	493.0 > 158.0 (30,19)	493.0 > 141.0 (30,40)	100 (21)	92 (6)
伏杀硫磷	50	9.74	367.9 > 181.9 (30,14)	367.9 > 110.9 (30,42)	90 (9)	95 (12)
吡菌胺酯	50	9.68	388.1 > 163.0 (30,25)	388.1 > 193.9 (30,12)	91 (11)	105 (2)
吡丙醚	50	10.67	322.1 > 227.1 (30,14)	322.1 > 96.0 (30,14)	95 (8)	90 (3)
西玛津	50	5.84	202.0 > 96.0 (30,26)	202.0 > 124.0 (32,22)	92 (30)	107 (4)
多杀菌素A	50	10.97	732.6 > 142.0 (40,35)	732.6 > 98.1 (40,50)	102 (7)	92 (3)
多杀菌素D	50	1.36	746.5 > 142.0 (40,38)	746.5 > 98.1 (40,48)	101 (13)	85 (5)
螺甲螨酯	50000	10.97	371.1 > 273.1 (30,10)	371.1 > 255.1 (30,24)	111 (19)	70 (8)
噻虫啉	10000	4.60	253.0 > 126.0 (30,20)	253.0 > 90.1 (30,27)	99 (14)	101 (5)
噻虫嗪	20000 (20 US)	2.71	292.0 > 211.0 (30,13)	292.0 > 181.0 (30,22)	110 (23)	108 (4)
三唑磷	20	8.62	314.1 > 161.9 (30,18)	314.1 > 118.9 (30,35)	101 (5)	112 (3)
(Oasis MAX小柱SPE净化)						
2,4-D	100	2.09	219.0 > 124.8 (15,25)	219.0 > 160.8 (15,20)	73 (5)	73 (4)

表1. LC-MS/MS回收率数据。

GC-MS/MS (PSA/carbon小柱净化)

农药	MRL ppb (EU)	RT min	MRM m/z	(锥孔电压 V, 碰撞能量 eV)	回收率% (n=6) @ 10, 100 ppb (% RSD)	
高灭磷	50	5.18	183.8 > 94.8 (10,20)	183.8 > 142.8 (10,10)	66 (9)	59 (9)
联苯菊酯	100	15.97	242.8 > 122.9 (20,10)	242.8 > 154.9 (20,10)	91 (8)	71 (10)
联苯三唑醇	100	17.63	337.9 > 98.8 (20,10)	337.9 > 268.9 (20,10)	86 (9)	78 (13)
唑草酮	20	14.86	411.7 > 276 (20,30)	411.7 > 301.8 (20,30)	101 (17)	93 (11)
甲基毒死蜱	100	10.96	321.6 > 124.7 (35, 20)	321.6 > 289.6 (35,10)	63 (14)	76 (11)
溴虫腈	50000	14.05	408.7 > 270.8 (20,20)	408.7 > 378.7 (20,10)	98 (10)	93 (12)
氟氯氰菊酯	100	18.81	433.7 > 126.8 (15,30)	433.7 > 190.8 (15,10)	101 (6)	91 (20)
氯氰菊酯	500	18.67	415.8 > 126.8 (25,25)	415.8 > 190.8 (25,10)	78 (16)	89 (18)
三氯杀螨醇	20000	16.06	352.6 > 281.7 (20,20)	352.6 > 316.6 (20,10)	65 (67)	88 (2)
二嗪磷	50	9.99	304.9 > 168.9 (20,20)	304.9 > 276.9 (20,10)	98 (16)	79 (9)
敌敌畏	20	5.17	220.8 > 108.9 (20, 10)	220.8 > 144.8 (20, 10)	87 (9)	77 (17)
溴氰菊酯	5000	20.42	505.6 > 252.7 (20,20)	505.6 > 280.7 (20,10)	63 (47)	88 (23)
乙硫磷	3000	14.44	384.6 > 142.7 (10,20)	384.6 > 170.8 (10,10)	90 (10)	90 (13)
乙螨唑	15000	16.13	359.9 > 140.8 (35,30)	359.9 > 303.8 (35,20)	77 (14)	71 (11)
硫丹	30000	13.17	406.5 > 252.6 (10,20)	406.5 > 288.6 (10,10)	145 (7)	101 (18)
甲氰菊酯	2000	16.11	349.9 > 96.8 (25,30)	349.9 > 124.8 (25, 10)	94 (7)	81 (10)
氰戊菊酯	50	19.54	419.8 > 124.8 (10,40)	419.8 > 166.8 (10,10)	72 (14)	86 (16)
高效氯氟氰菊酯	1000	16.76	449.8 > 196.8 (15,20)	449.8 > 224.8 (15,10)	61 (20)	40 (11)
马拉硫磷	500	11.67	330.8 > 126.8 (15, 10)	330.8 > 210.8 (15,20)	57 (33)	97 (30)
久效磷	5	8.88	223.8 > 97.8 (25, 10)	223.8 > 126.8 (25, 10)	85 (6)	74 (17)
克螨特	5000	15.17	230.8 > 80.8 (20, 20)	230.8 > 162.8 (20,10)	94 (21)	107 (28)
胺丙畏	100 (US)	9.78	281.9 > 137.8 (10,20)	281.9 > 194.8 (10,10)	101 (16)	88 (5)
吡丙醚	50	16.67	321.9 > 95.8 (10,20)	321.9 > 184.8 (10,20)	89 (10)	80 (10)
苯醚菊酯	50	16.45	350.9 > 182.8 (20,40)	350.9 > 248.8 (20,20)	69 (22)	72 (7)
伏杀硫磷	50	16.62	367.7 > 124.8 (15,20)	367.7 > 181.8 (15,20)	80 (8)	71 (11)
苜蓿菊酯	200	15.46	338.9 > 170.9 (25,10)	338.9 > 292.9 (25,10)	36 (22)	53 (16)
氟乐灵	50	8.76	335.9 > 235.8 (30,10)	335.9 > 251.8 (30, 20)	96 (14)	124 (24)

表2. GC-MS回收率数据。

## 样品制备

### QuEChERS萃取

将2 g干茶叶和10 mL水加入50 mL离心管中，浸泡、溶胀30分钟。然后加入10 mL乙腈，封盖，涡旋10秒，再充分振荡1分钟。然后加入DisQuE试剂，按照CEN QuEChERS方法萃取，充分振荡1分钟。以4000 RPM（相对离心力3250 × g）离心样品5分钟，然后收集上清。取上清液进行SPE净化。

### dSPE净化和LC-MS分析 碱性/中性农药

将1 mL QuEChERS萃取液置于2 mL DisQuE dSPE净化管（150 mg MgSO<sub>4</sub>/25 mg PSA/25 mg C<sub>18</sub>，[部件号186004832](#)）中，加入7 mg石墨化碳黑（GCB），涡旋10秒，然后振荡1分钟。以1000 RPM（相对离心力13400 × g）离心样品4分钟，收集上清液。取200 µL上清液加入LC-MS认证的样品瓶中，然后使用LC-MS的流动相A稀释至1 mL。

### SPE净化和GC-MS分析碱性/中性农药

使用10 mL丙酮/甲苯（3:1）稀释1 mL QuEChERS萃取液。然后将Sep-Pak PSA/carbon萃取柱安装到真空萃取装置上，并装好收集管。将200 mg无水MgSO<sub>4</sub>加到萃取柱筛板的上部。让全部稀释萃取液通过萃取柱并收集萃取液，然后使用2 mL丙酮/甲苯（3:1）对萃取柱进行洗脱，并收集洗脱液，与前面得到的萃取液合并。挥干至0.5 mL以下，然后加入2 mL甲苯再挥干至0.5 mL。

### SPE净化和LC-MS分析酸性农药

用2 mL水稀释1 mL QuEChERS萃取液，然后使用2%氨水溶液（数滴）调pH值7.5-8.5。向Oasis MAX萃取柱（3cc, 60 mg）加入1 mL甲醇和1 mL水，使其流过萃取柱。将稀释后的QuEChERS萃取液以3 mL/分钟的流速通过萃取柱。用1 mL 1%氨水溶液和2 mL甲醇对萃取柱进行淋洗。放置收集管，使用3 mL 97:5:2的甲基叔丁基醚/甲醇/甲酸洗脱萃取柱。将洗脱液挥干后使用流动相（80:20 A/B）复溶。

## 结果与讨论

本项研究的回收率数据是通过比较样品制备前后基质中样品的峰值得到，并已列在表1和表2。

除吡虫啉外，其它农药的LC-MS基质效应（在100 ppb测得）均在35%以下（吡虫啉为45%）。

实验证明，QuEChERS法能够有效提取茶叶中的多种农药残留。在操作过程中，我们根据色谱分析方法及农药化学性质的不同，采用了不同的净化方法（dSPE、SPE）。dSPE净化法适用于中性和碱性农药的分析，但不适用于酸性农药的分析，因为使用PSA吸附剂净化样品时会吸附酸性农药。因此我们采用了一种优化的方法来净化样品，并成功分析出酸性农药2,4-D。另外，由于dSPE净化法在GC-MS分析中不适用，我们采用了更严格的通过式净化方法（carbon/PSA萃取柱）来净化样品。下文将具体介绍本项研究所用的QuEChERS流程和净化方法。

## QuEChERS萃取

本研究使用了改良的QuEChERS方法。在加入乙腈和QuEChERS盐之前，首先将干燥的茶叶样品与水混合，达到平衡。根据下面的讨论可知，与醋酸盐缓冲萃取液（AOAC QuEChERS）相比，采用柠檬酸盐缓冲萃取液（CEN QuEChERS）进行后续的净化步骤更为有效，因此本研究选用CEN方法。但是，由于QuEChERS对多种深色天然茶叶组分也具有十分高效的萃取效果，使得随后的色谱分析会受到干扰。因此进一步的净化十分重要。图1所示为红茶QuEChERS萃取的典型示例。

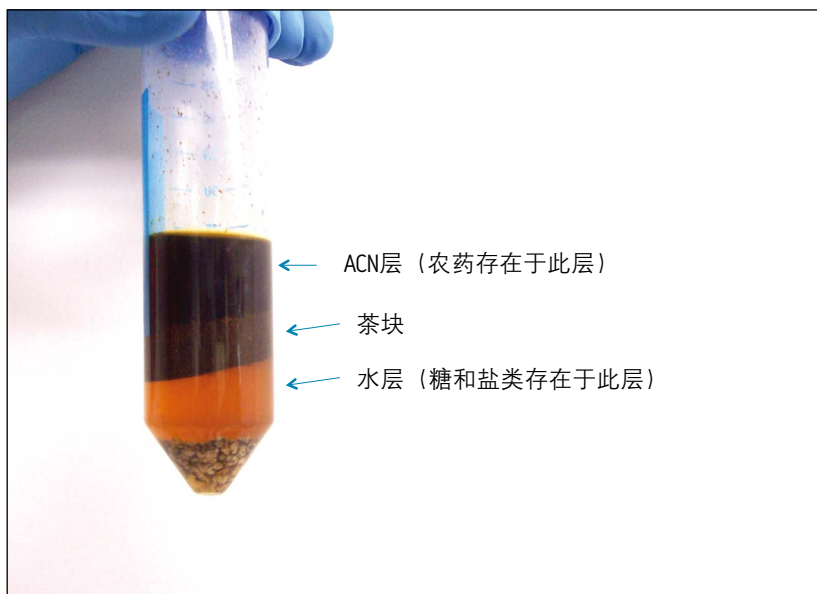


图1. 离心后利用DisQuE产品进行CEN QuEChERS萃取的茶叶样品。

## dSPE净化

在进行GC或LC分析之前通常会对QuEChERS萃取物进行分散固相萃取（dSPE）。对于红茶而言，这种净化方法不足以实现重现性良好的GC-MS分析。对于LC-MS分析而言，选择dSPE净化是可接受的。本研究对C<sub>18</sub>、PSA（硅基伯胺-仲胺）和GCB（石墨化碳黑）的用量进行了优化，以实现高回收率和最佳净化效果。对于未使用dSPE净化的LC-MS分析而言，分析约20个样品后便需要进行常规维护（锥孔清洗）。而使用dSPE净化后，分析100多个样品后才需要进行常规维护。

## 2,4-D的SPE净化 (Oasis MAX)

2,4-D的SPE净化方法十分高效，可去除大多数茶叶干扰成分。为优化净化程序，本研究采用MTBE（甲基叔丁基醚）作为主要的洗脱溶剂，并以甲酸和甲醇作为改良剂。虽然甲酸/甲醇（不含MTBE）能够有效洗脱2,4-D，但分析物中会出现共流出的茶叶酸成分。借助MTBE洗脱剂，保留的茶叶酸会留在小柱上，不与分析物共流出。图2所示为使用Oasis MAX小柱的典型QuEChERS茶叶样品萃取液净化图，图中与未经净化处理的样品进行了对比。



## GC-MS的SPE净化 (Sep-Pak PSA/carbon)

GC-MS的SPE净化方法十分高效，可在GC-MS分析之前去除QuEChERS萃取液中的全部有色成分。实验中，首先在SPE小柱上加载1 mL QuEChERS萃取液，然后用10 mL丙酮/甲苯进行洗脱。但是，如果在上样之前以10 mL丙酮/甲苯溶液对1 mL QuEChERS萃取液进行稀释，可获得更好的净化效果。对于未使用SPE净化的GC-MS分析而言，在分析较少的样品后就需要对进样口和色谱柱进行维护。使用dSPE净化后，可分析上百个样品后再进行维护。图3所示为QuEChERS萃取液的Sep-Pak PSA/carbon净化图。



图3. GC-MS分析中利用Sep-Pak PSA/carbon小柱对QuEChERS茶叶萃取液进行净化。左图所示为样品流经小柱的净化过程，右图样品瓶为两种净化结果。

## 结论

- 改良的QuEChERS方法可有效回收干燥茶叶中的多种农药
- dSPE为LC-MS/MS分析提供了适用的净化操作方法
- 基于PSA/carbon小柱的SPE净化方法对使用APGC的GC-MS/MS分析极为有效
- 使用Oasis MAX小柱的净化方法对于2,4-D的LC-MS鉴定极为有效



# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY、Sep-Pak、Oasis、MassLynx和Xevo是沃特世公司的注册商标。DisQuE和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年沃特世公司。印制于中国  
2013年11月 720004819ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司  
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866  
上海：021 - 6156 2666  
广州：020 - 2829 6555  
成都：028 - 6554 5999  
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676  
[www.waters.com](http://www.waters.com)