

QuEChERS-VADLLME-内标法-GC-MS/MS快速测定铁皮石斛中的农药残留

周敏, 朱萌萌, 王珍, 王川丕, 周婷婷, 刘芯成
(绿城农科检测技术有限公司, 浙江 杭州 310052)

摘要: 建立 QuEChERS-涡流辅助分散液-液微萃取 (vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction, VADLLME)-内标法-GC-MS/MS 快速测定铁皮石斛中的农药残留。样品经乙腈溶液提取, 旋涡超声后, 滤液经 N-丙基乙二胺 (N-propyl ethylenediamine, PSA) 吸附剂、 C_{18} 吸附剂净化, 净化后滤液过滤膜后取 1 mL 乙腈作为分散剂, 加水 4 mL, 用 0.1 mL 四氯化碳萃取, 涡旋混匀, 形成乳浊液经离心后吸取下层萃取液, 吹干后加外环氧七氯内标, 再加正己烷定容, 采用气相色谱-串联质谱仪 (gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS) 测定。试验对萃取、富集和净化等影响因素进行优化。试验条件优化后, 各农药的富集倍数可达 47 倍~106 倍, 检出限为 0.353 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 线性范围为 0.002 mg/kg ~0.5 mg/kg , 相关系数为 0.990 5~0.999 9, 平均加标回收率为 77.5 %~97.7 %, 相对标准偏差 0.6 %~8.4 %。

关键词: 涡旋辅助的液液微萃取; 内标法; 气相色谱-串联质谱; 铁皮石斛; 农药残留

Study about Rapid Analysis of Pesticide Residues in *Dendrobium candidum* by Application of Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and QuEChERS and Internal Standard Method Coupled with GC-MS/MS

ZHOU Min, ZHU Meng-meng, WANG Zhen, WANG Chuan-pi, ZHOU Ting-ting, LIU Xin-cheng
(Greentown Agricultural Testing Technology Co., Ltd., Hangzhou 310052, Zhejiang, China)

Abstract: A novel method for the determination of the pesticide residue in *Dendrobium candidum* was developed by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (VADLLME) and QuEChERS and Internal standard coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The samples were extracted by acetonitrile solution and purified by N-propyl ethylenediamine (PSA) adsorbent and C_{18} adsorbent after vortex ultrasound. After purification, 1 mL acetonitrile was used as dispersant after filtrate filtration membrane, water was added to 4 mL, 0.1 mL carbon tetrachloride was extracted and the vortex was mixed, then the emulsion was centrifuged and then centrifuged to absorb the lower extraction liquid. After blow dry, added seven epoxy with internal standard, and constant volume of hexane was added. Determined of GC-MS/MS. The factors affecting extraction, enrichment efficiency and purification were optimized. Under the optimized experimental conditions, the concentration of each pesticide could reach 47 times-106 times, the detection limit was 0.353 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the linear range was 0.002 mg/kg -0.5 mg/kg , the correlation coefficient was 0.990 5-0.999 9, the average recovery rate was 77.5 %-97.7 %, and the relative standard deviation was 0.6 %-8.4 %.

Key words: vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; internal standard method; gas chromatography-tandem mass; *Dendrobium candidum*; pesticide residues

引文格式:

周敏,朱萌萌,王珍,等. QuEChERS-VADLLME-内标法-GC-MS/MS快速测定铁皮石斛中的农药残留[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(16): 135-145

ZHOU Min, ZHU Mengmeng, WANG Zhen, et al. Study about Rapid Analysis of Pesticide Residues in *Dendrobium candidum* by Application of Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and QuEChERS and Internal Standard Method Coupled with GC-MS/MS[J]. Food Research and Development, 2019, 40(16): 135-145

铁皮石斛为兰科石斛属植物,其含有多糖、芪类、生物碱、氨基酸和微量元素等多种成分,具有增强免疫、抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳、降血糖和养阴生津等多种保健功能,是我国传统名贵药材,分布于福建、浙江、广西、云南等地,是国家列为重点保护的药用植物之一。近年来,铁皮石斛人工繁育的关键技术得到了较大突破,并得到迅速的推广和应用,形成了完整的产业链。然而铁皮石斛产业发展的同时也使消费者对其人工栽培过程中可能存在的农药残留问题感到担忧,农药的过度使用会严重影响铁皮石斛及其产品的质量^[1-2]。2015版《中国药典》^[3]虽收录了铁皮石斛的质量标准,但对农药残留问题却未加以严格控制。目前对铁皮石斛农残检测的相关报道较少^[4-5],因此,对铁皮石斛中的多种农药残留量进行检测具有十分重要的意义。

目前,农药多残留的检测方法主要有气相色谱法^[6-7]、液相色谱法^[8-11]、气相色谱^[12]或液相色谱^[13-15]与质谱联用法等,而目前所用的各类前处理提取净化方法文献报道的加速溶剂萃取(accelerated solvent extraction, ASE)、固相萃取(solid phase extraction, SPE)法、凝胶色谱法(gel permeation chromatography, GPC)等,普遍存在繁琐耗时、操作误差偏大,需使用大量对人体和环境有毒或有害的有机溶剂、难以实现自动化等缺点。因此发展省时高效、有机溶剂用量少的样品前处理新技术已成为分析化学研究的热点之一。

QuEChERS(quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)是目前广泛应用于果蔬中农药残留检测的前处理方法之一^[16]。分散液液微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)是 Rezaee 等^[17]于 2006 年首次报道的一种前处理方法,该方法集采样、萃取、浓缩于一体,操作简单、快速、成本低、有机溶剂用量少、对环境友好且富集效率高,在分析领域具有良好的应用前景^[18-21]。本研究将涡旋辅助的分散液相微萃取技术与 QuEChERS 结合,气相色谱-串联质谱仪内标法检测,建立了铁皮石斛中农药残留的快速分析方法。该方法简单、高效、富集效率高,方法的准确度、精密度和灵敏度均符合农药残留分析的要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

铁皮石斛:市售。

乙腈(色谱纯):美国 TIDE 公司;甲醇、丙酮、正己烷(色谱纯):美国 J.T.Baker 公司;氯苯、二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳(分析纯):华东医药公司;氯化钠(分析纯):广东光华科技股份有限公司;C₁₈(500 g)、N-丙基乙二胺(N-propyl ethylenediamine, PSA)(500 g):天津博纳艾杰尔科技有限公司。

内标品:外环氧七氯(纯度≥99.0%):德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

标准品:特丁硫磷、五氯硝基苯、乙烯菌核利、甲基毒死蜱、甲基对硫磷、杀螟硫磷、毒死蜱、三唑酮、对硫磷、二甲戊灵、腐霉利、甲氰菊酯(纯度≥99.5%):德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

TQ8040 气相色谱-串联质谱仪:日本岛津公司;ST16R 离心机:赛默飞世尔公司;BSA2202S 电子天平:德国赛多利斯公司;EUFO-945616 漩涡混合器:TAL-BOYS;KQ5200E 超声波清洗器:昆山舒美超声仪器有限公司;R215 旋转蒸发仪:瑞士 Buchi 公司;MTN-5800 氮吹仪:天津奥特赛恩斯仪器有限公司。

1.2 仪器条件

1.2.1 气相条件

色谱柱:Agilent 安捷伦 VF-5MS 色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);进样口温度:250 °C;柱流量:1.00 mL/min;采用程序升温:起始柱温 80 °C,保持 0 min,以 40 °C/min 升温至 250 °C,保持 0 min,再以 20 °C/min 升温至 290 °C 保持 3.75 min,总用时 10.00 min;进样量:1 μL;进样方式:不分流进样;载气:高纯氦气;碰撞气:高纯氦气,纯度≥99.999 %。

1.2.2 质谱条件

电离方式:EI;色谱-质谱接口温度:280 °C;电离能量:70 eV;离子源温度:230 °C;检测器电压:0.99 kV(+0.4 kV);测定方式:MRM 多重反应监测模式;定量方式:内标法。各农残的定性、定量离子和 MRM 参数见表 1。

表 1 12 种化合物的优化质谱 MRM 参数
Table 1 Optimized mass spectrometry MRM parameters for 12 compounds

编号	农药名称	保留时间/min	定量离子(m/z)	碰撞能量/eV	定性离子(m/z)	碰撞能量/eV	定性离子(m/z)	碰撞能量/eV
1	特丁硫磷	4.105	231.00>174.90*	14	231.00>128.90	26	231.00>202.90	8
2	五氯硝基苯	4.110	294.80>236.80*	16	294.80>264.80	12	294.80>142.90	30
3	乙烯菌核利	4.445	285.00>212.00*	12	285.00>178.00	14	285.00>241.00	4
4	甲基毒死蜱	4.456	285.90>93.00*	22	285.90>270.90	14	285.90>240.90	26
5	甲基对硫磷	4.460	263.00>109.00*	14	263.00>136.00	8	263.00>246.00	6
6	杀螟硫磷	4.471	277.00>260.00*	6	277.00>109.10	14	277.00>228.00	14
7	毒死蜱	4.705	313.90>257.90*	14	313.90>285.90	8	313.90>193.90	28
8	三唑酮	4.710	208.10>181.00*	10	208.10>127.00	14	208.10>111.00	22
9	对硫磷	4.723	291.10>109.00*	14	291.10>137.00	6	291.10>81.00	24
10	外环氧七氯	4.861	352.80>262.90*	14	352.80>281.90	12	352.80>316.90	10
11	二甲戊灵	4.905	252.10>162.10*	10	252.10>191.10	8	252.10>208.10	6
12	腐霉利	5.103	283.00>96.00*	10	283.00>255.00	12	283.00>68.00	24
13	甲氧菊酯	6.198	265.10>210.10*	12	265.10>172.10	14	265.10>89.00	28

注:* 表示定量离子。

1.3 样品前处理

将铁皮石斛样品捣碎后在匀浆机中匀浆,称取 2.00 g 置于 15 mL 带刻度尖底离心管,加入 5.0 mL 乙腈涡旋 30 s,超声提取 15 min,涡旋 30 s 后,于 8 000 r/min 离心 3 min。取上清液 2.0 mL 加入盛有 50 mg PSA、50 mg C₁₈ 粉的塑料离心管中,涡旋 1 min,然后以 8 000 r/min 离心 3 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜待 DLLME 用。

向装有 4 mL 超纯水的 5 mL 尖底具塞玻璃离心管中加入 1 mL 上述净化提取液,然后再加入 100 μL CCl₄,涡旋 30 s,以 8 000 r/min 离心 3 min。用 100 μL 微量注射器取出沉积相装入带有内插管的进样瓶中,氮气吹干,加入 10 μL 20 mg/kg 外环氧七氯,再加入正己烷 90 μL 定容,待 GC-MS/MS 测定。

1.4 工作曲线的绘制

准确称取 2.00 g 匀浆的铁皮石斛样品(不含被测农药组分),称取 8 等份(其中 1 份空白基质样品),各

加入一定体积的农残混合标准溶液,使其终浓度为 0.000 4、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/kg,按 1.3 方法进行前处理后,上机分析做基质标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的优化

2.1.1 QuEChERS 提取剂的选择

QuEChERS 前处理中常用甲醇、乙腈与丙酮作为农药残留的提取剂,在样品中添加一定量标准混合溶液,分别用相同体积的乙腈、丙酮、甲醇提取,结果表明,与甲醇、丙酮相比,乙腈的提取效果优于其他,并且乙腈提取铁皮石斛中色素、蜡质、脂肪等非极性成分的能力相对较弱,更容易通过后续加入吸附剂除去基质的干扰物质,本试验选取乙腈作为 QuEChERS 过程的提取剂。提取剂种类对回收率的影响见图 1。

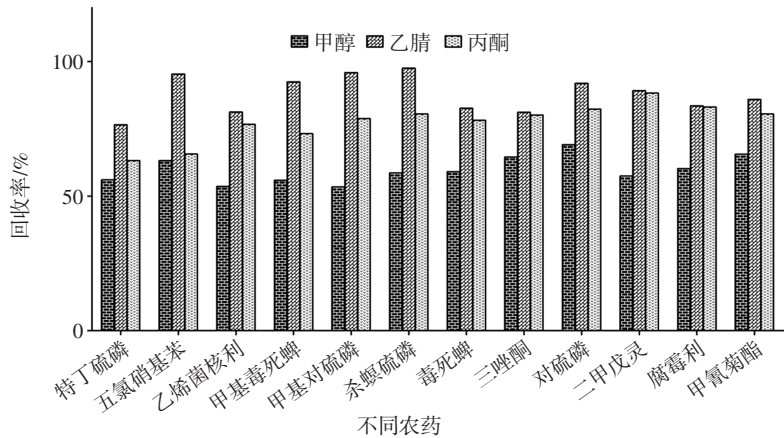


图 1 提取剂对回收率的影响

Fig.1 Effect of extractant on recovery

2.1.1.1 提取时间的选择

在 QuEChERS 阶段,提取时间是影响萃取效率的一个重要因素。提取时间过短,提取剂能对目标物提取不充分;提取时间过长,虽对目标物提取充分,但同时也会萃取出较多的基质杂质且耗时。本试验选取 5 min~25 min 时间来对提取时间进行优化,结果表明,当提取时间由 5 min 增加至 15 min,萃取效率呈逐渐增加的趋势,由 15 min 增加至 25 min,回收率基本保持不变,故 15 min 作为本试验 QuEChERS 过程的最佳提取时间。

2.1.1.2 提取剂体积的选择

提取剂体积也是影响 QuEChERS 过程萃取效率的因素之一。以铁皮石斛为研究对象,准确称量 2.00 g 样品,添加水平为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,分别考察了乙腈体积为 3、5、10、15、20 mL 时对农药残留的提取效果。结果

表明,采用 5 mL 乙腈能达到充分提取目标分析物的目的,同时考虑到样品经过 QuEChERS 过程后还要进 VADLLME 程序,为取得较大的富集因子,本试验选取 5 mL 作为最佳提取剂体积。

2.1.1.3 吸附剂种类和数量的选择

由于铁皮石斛样品基质比较复杂,如蛋白质、脂肪、糖类、色素等成分等,本试验选取了 QuEChERS 常用净化剂 PSA、 C_{18} 两种吸附剂的 4 种组合(25 mg PSA+25 mg C_{18} 、50 mg PSA+50 mg C_{18} 、100 mg PSA+100 mg C_{18} 、150 mg PSA+150 mg C_{18})对铁皮石斛的乙腈提取液进行净化,PSA 能有效去除样品基质中的有机酸、色素和糖类, C_{18} 能有效去除样品基质中的有机酸、脂肪酸、碳水化合物和色素等。结果如图 2。当加入 50 mg PSA 与 50 mg C_{18} 时效果最好,回收率最高,本试验选取 50 mg PSA 与 50 mg C_{18} 作为净化吸附剂。

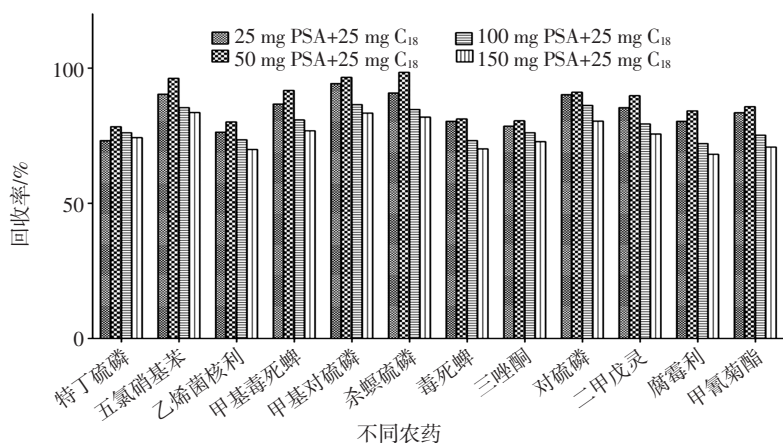


图 2 吸附剂种类和数量对回收率的影响

Fig.2 Effect of the type and amount of adsorbent on recovery

2.1.2 涡旋辅助的液液微萃取(vortex-assisted liquid-liquid microextraction, VADLLME)过程优化

2.1.2.1 萃取溶剂的选择及萃取体积的优化

本试验考察了二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳及

氯苯 4 种氯代有机溶剂作为萃取剂,以适量乙腈(1 mL)为分散剂,以各农药含量计算回收率,按 1.3 方法进行萃取测定,通过比较回收率选择合适的萃取剂,试验结果见图 3。

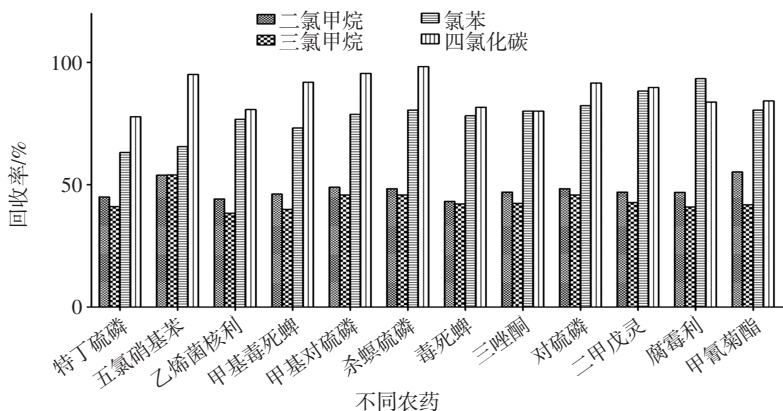


图 3 萃取剂种类对回收率的影响

Fig.3 Effect of extractant species on recovery

由图3可知,四氯化碳与氯苯的萃取效果较好,且两者相当,二氯甲烷的回收率为43.2%~55.2%,三氯甲烷的回收率为38.4%~54.0%,氯苯为63.2%~93.4%,四氯化碳回收率为77.8%~98.3%,虽然四氯化碳与氯苯萃取效果相差不大,但氯苯作为萃取剂时,会有更

多的杂质伴随目标物共同被萃取,因此四氯化碳被选为最佳萃取剂继续下面的试验。

为考虑萃取剂体积对回收率的影响,本试验选取了体积分别为60、80、100、120、140 μL 的四氯化碳。结果如图4所示。

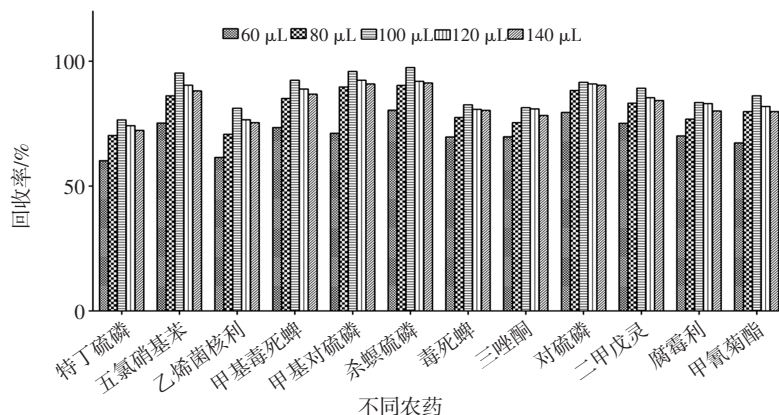


图4 萃取剂体积对回收率的影响

Fig.4 Effect of extractant volume on recovery

由图4可知,当萃取剂体积由60 μL 增加至100 μL 时,所有农药的回收率均变大,然而增加至140 μL 时,回收率没有显著的变化,基本保持不变。故在后续试验中,100 μL 的四氯化碳被选为最佳萃取剂体积。

萃取剂体积减少可以适当的提高农药的富集因子,即提高沉积相中农药的浓度;但是萃取剂体积过小时,不仅会减少沉积相的体积,导致自动进样困难,而且还会造成水相中农药提取不完全而影响提取效率。萃取剂体积与沉积相体积的关系见图5。

2.1.2.2 分散溶剂选择及分散体积的优化

本试验中 QuEChERS 阶段所获取的乙腈提取液同时作为 VADLLME 过程的分散剂,分散剂的体积会对 DLLME 萃取效率产生影响,分散剂体积太小时,不能将萃取剂完全分散到样本溶液中形成乳浊液,而导致萃取效率降低,但分散剂体积过大时,目标分析物

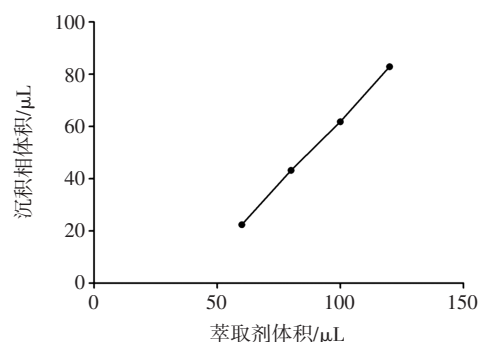


图5 萃取剂体积与沉积相体积的关系

Fig.5 Relationship between extractant volume and sedimentary phase volume

在萃取剂中的分配系数降低,也会导致萃取效率下降。试验以100 μL 四氯化碳为萃取剂,考察了分散剂乙腈的体积(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL)对萃取效果的影响,结果见图6。

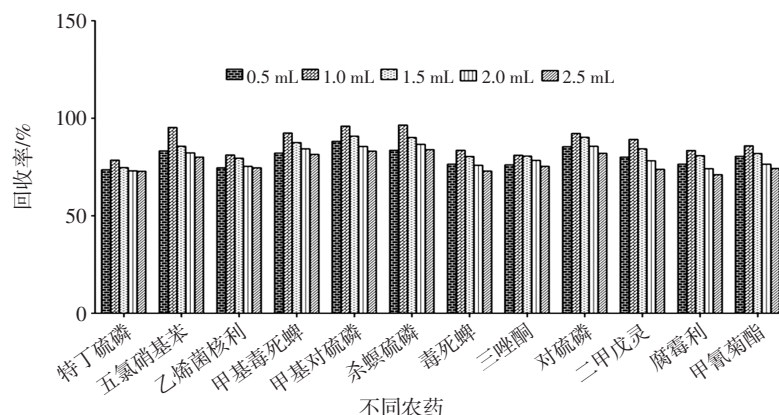


图6 分散剂体积对回收率的影响

Fig.6 Effect of dispersant volume on recovery

由图 6 可知,在 0.5 mL~1.0 mL 范围内,待测物的萃取富集效果随着乙腈体积的增加而增加,在乙腈体积为 1.0 mL 时达到最大值,之后萃取效果随着乙腈用量的增加而降低。原因是随着乙腈用量的增加,待测物在水中的溶解度也随之增大,萃取效率降低。因此

试验中乙腈的最佳用量为 1.0 mL,对于接下来的试验,1.0 mL 的乙腈提取液被确定为最优分散剂体积。

2.1.2.3 萃取时间的选择

萃取时间对回收率的影响见图 7。

本方法中萃取时间是指从样品溶液中注入萃取

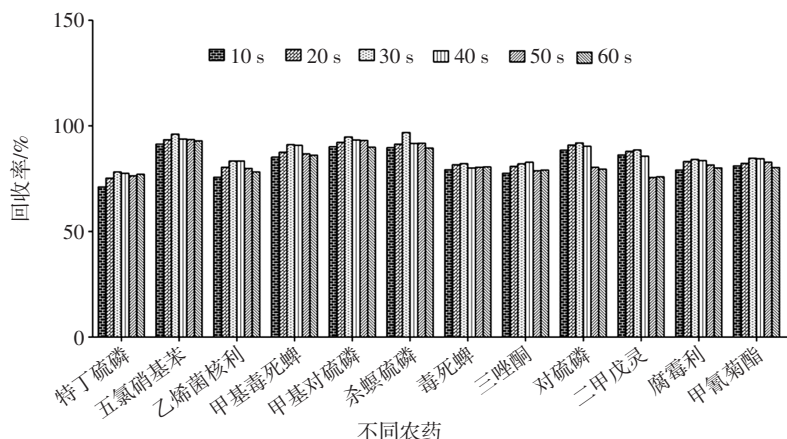


图 7 萃取时间对回收率的影响

Fig.7 Effect of extraction time on recovery

剂和分散剂到混合液开始离心的时间间隔。分别考察了萃取时间为 10、20、30、40、50、60 s 时方法的萃取效率。由图 7 可知,萃取时间 30 s 后萃取效果基本趋于稳定,回收率最高,之后时间增加对萃取效率没有显著地影响,因为在混合液形成乳浊液之后,四氯化碳

被均匀地分散在了水相中与待测物接触面积大,待测物可以快速的由水相转移到有机相并且很快的达到两相平衡。本试验选取萃取时间为 30 s。

2.1.2.4 离心机转速和时间的选择

离心机转速对回收率的影响见图 8。

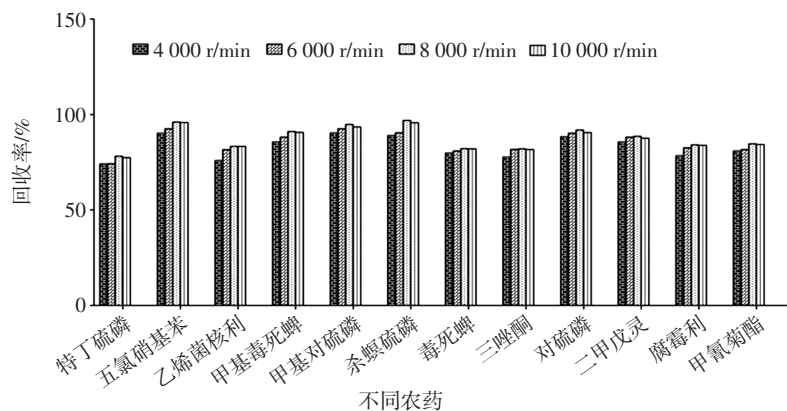


图 8 离心机转速对回收率的影响

Fig.8 Effect of centrifuge speed on recovery

本试验采用塑料离心管离心,通过选用不同转速,观察离心分层效果,结果表明,在 8 000 r/min 转速下离心后,会取得比较好的分层效果,因此本试验最终确定离心机转速为 8 000 r/min。

离心时间对回收率的影响见图 9。

对于离心时间,本试验选择了 8 000 r/min 离心 3、5、10、15 min,结果表明,离心时间并不影响萃取效率。

故离心时间选择 3 min。

2.1.2.5 盐对萃取效果的影响

通过在水相中加入 NaCl(0~10%)的方法考察了盐浓度对萃取效率的影响。随着 NaCl 浓度的增大,12 种农药的回收率变化很小,但是富集倍数显著下降。这是由于离子强度的增加使有机萃取剂在水相中的溶解度减小,最后得到的有机沉积物的体积增加所造

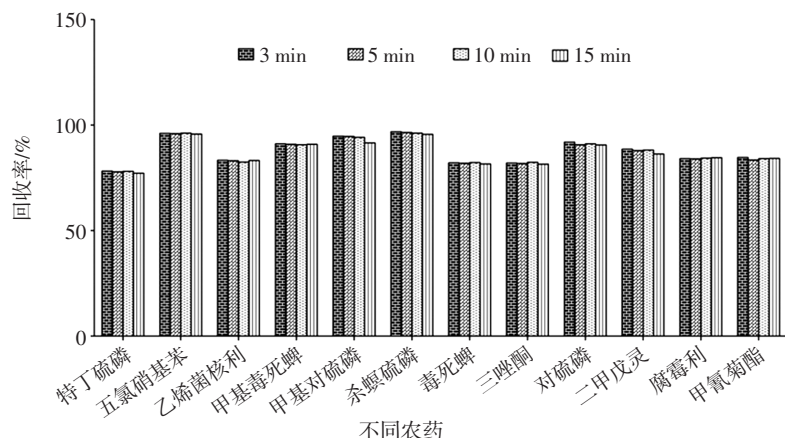


图9 离心时间对回收率的影响

Fig.9 Effect of centrifugal time on recovery

成的。所以本试验不加盐。

2.1.2.6 样品溶液 pH 值的影响

通过在水相中加入磷酸二氢钠或氢氧化钠稀溶

液, 调解待测溶液 pH 值分别为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0, pH 值对回收率的影响见图 10。

由图 10 可知, pH 值为 7.0 时回收率最高, 可能是

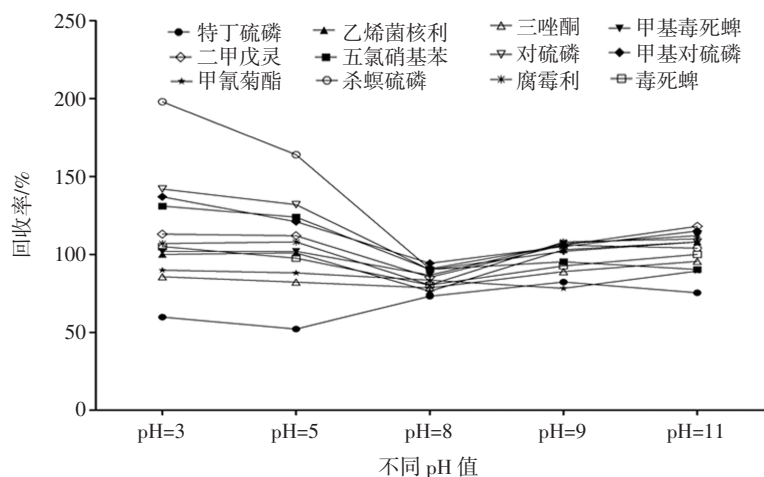


图10 pH 值对回收率的影响

Fig.10 pH to the influence of recovery

过酸或过碱破坏了目标物的分子结构, 回收率不稳定。所以本试验确定样品溶液的 pH 值为 7.0 时为最佳条件。

2.2 质谱条件的优化

选择 MRM 模式下的离子对进行各农药的分析。为了获得最佳的质谱条件, 保证对分析物定量和定性的准确性, 对待测物的母离子、产物离子、碰撞能量等一系列质谱参数进行了优化。一定浓度下的 12 种化合物混标 MRM 色谱图见图 11。

2.3 方法的富集倍数、线性范围、检出限及定量下限

在最优的试验条件下, 对系列浓度的标准溶液进行萃取测定, 12 种农药残留在 0.002 mg/kg~0.5 mg/kg 范围内均具有良好的线性关系, 检出限为 0.353 μg/kg~

1.14 μg/kg ($S/N \geq 3$), 定量下限为 1.06 μg/kg~3.43 μg/kg ($S/N \geq 10$), 富集倍数可以达到 47 倍~106 倍, 可满足实际样品的测定。12 种农药残留的检出限 (limit of detection, LOD)、定量下限 (lower limit of quantitation, LOQ)、线性方程、相关系数及线性范围见表 2。

结果表明, 本方法中 12 种农药残留的检出限远低于现行的《中华人民共和国药典》2015 年版第四部中 2341 农药残留量测定方法检出限。

2.4 方法的回收率

在最优的试验条件下, 选用阴性铁皮石斛样品, 进行不同添加浓度的萃取、测定。对 12 种农药残留添加含量分别为 0.001、0.01、0.05 mg/kg 的铁皮石斛样品平行萃取测定 6 次, 测得铁皮石斛中, 12 种农药的加

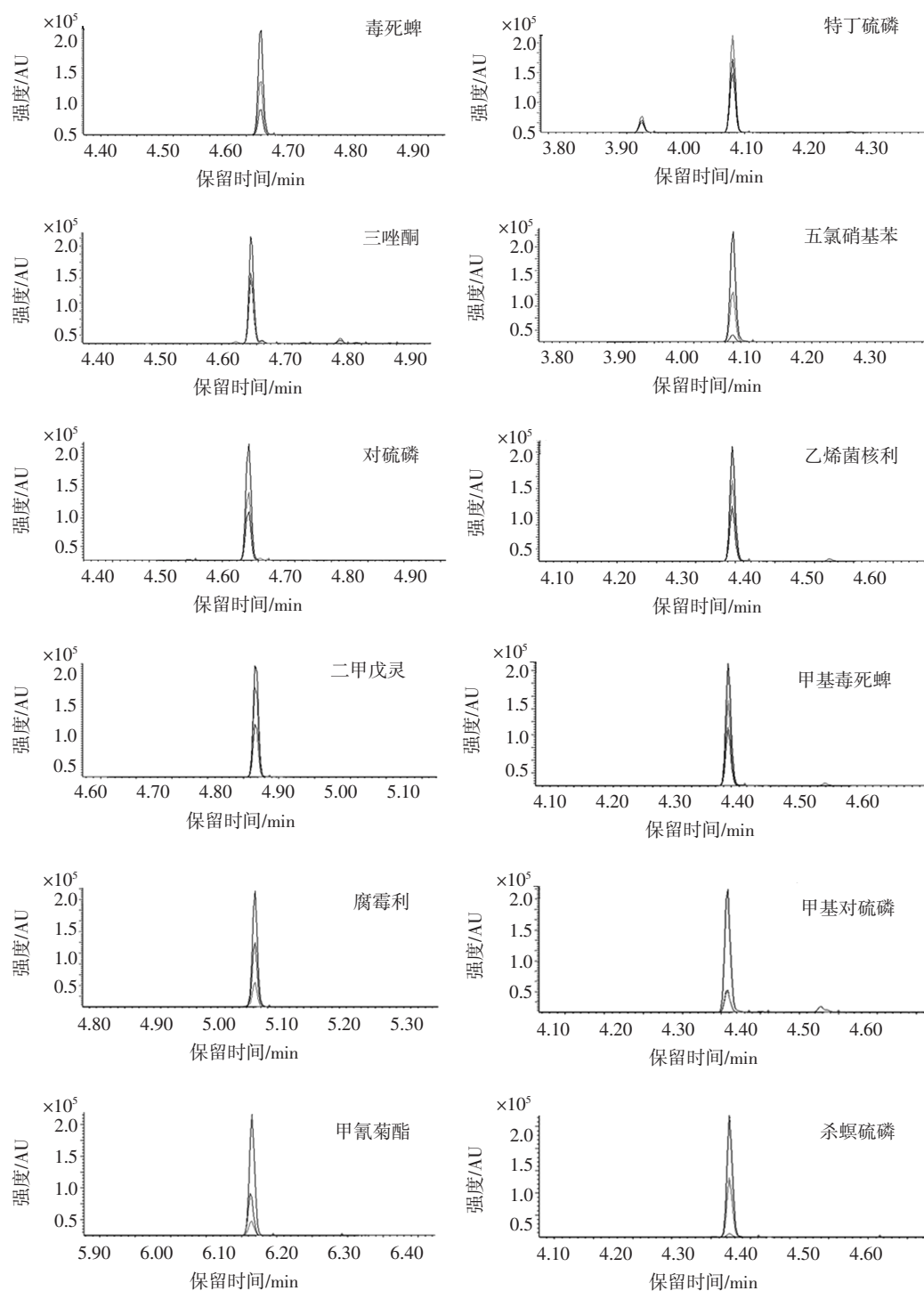


图 11 12 种农药混标的 MRM 色谱图

Fig.11 MRM chromatogram of 12 pesticides mixed

表 2 12 种农药的检出限、定量下限、线性回归方程、相关系数及线性范围

Table 2 LODs, LOQs, regression equation, correlation coefficient and linear equation of 12 kinds of pesticides

序号	化合物	检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量下限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性回归方程	相关系数	线性范围/(mg/kg)
1	特丁硫磷	1.14	3.43	$Y=1\ 236\ 237x+787$	0.992 8	0.004~0.5
2	五氯硝基苯	0.830	2.49	$Y=855\ 581x-2\ 785$	0.997 8	0.003~0.5
3	乙烯菌核利	0.353	1.06	$Y=689\ 329x-5\ 915$	0.995 5	0.002~0.5
4	甲基毒死蜱	0.407	1.22	$Y=3\ 546\ 360x-408$	0.991 8	0.002~0.5

续表 2 12 种农药的检出限、定量下限、线性回归方程、相关系数及线性范围

Continue table 2 LODs, LOQs, regression equation, correlation coefficient and linear equation of 12 kinds of pesticides

序号	化合物	检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量下限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性回归方程	相关系数	线性范围/(mg/kg)
5	甲基对硫磷	1.07	3.21	$Y=6\,458\,255x+8\,004$	0.999 3	0.004~0.5
6	杀螟硫磷	0.977	2.93	$Y=1\,309\,010x-10\,880$	0.990 5	0.003~0.5
7	毒死蜱	0.560	1.68	$Y=628\,902x-3\,317$	0.999 9	0.002~0.5
8	三唑酮	0.527	1.58	$Y=2\,242\,666x-17\,758$	0.999 4	0.002~0.5
9	对硫磷	0.847	2.54	$Y=485\,037x-4\,003$	0.997 6	0.003~0.5
10	二甲戊灵	0.730	2.19	$Y=287\,098x-2\,176$	0.999 7	0.003~0.5
11	腐霉利	0.680	2.04	$Y=155\,161x-1\,164$	0.999 3	0.003~0.5
12	甲氰菊酯	0.670	2.01	$Y=187\,554x+516$	0.994 4	0.003~0.5

标回收率为 77.5 %~97.7 %，相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 0.6 %~8.4 %，试验结果见表 3。铁皮石斛空白基质见图 12。

2.5 与中国药典方法比较

本方法与现行的《中华人民共和国药典》2015 年版第四部中 2341 农药残留量测定方法进行比较,通过

表 3 不含本底样品中各种农药的添加回收率和精密度 (n=6)

Table 3 The rate pesticide of recovery and relative standard deviation of in blank sample (n=6)

序号	化合物	添加浓度					
		0.001 mg/kg		0.01 mg/kg		0.05 mg/kg	
		回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
1	特丁硫磷	77.5	3.6	78.1	1.1	79.7	2.8
2	五氯硝基苯	95.6	8.4	96.2	1.8	93.3	2.2
3	乙烯菌核利	82.7	2.2	82.3	2.7	80.9	3.1
4	甲基毒死蜱	90.1	4.9	91.8	1.6	89.6	2.6
5	甲基对硫磷	93.9	0.6	95.8	1.1	94.8	5.5
6	杀螟硫磷	92.3	6.0	97.7	7.7	93.3	7.4
7	毒死蜱	81.5	2.1	82.3	2.8	83.5	1.4
8	三唑酮	80.2	3.5	81.6	5.2	82.6	2.0
9	对硫磷	89.1	6.1	90.6	4.8	89.8	1.9
10	二甲戊灵	86.5	6.5	89.2	1.9	90.6	1.3
11	腐霉利	84.4	5.4	83.5	2.8	82.4	2.6
12	甲氰菊酯	83.8	0.7	86.2	4.3	85.6	6.4

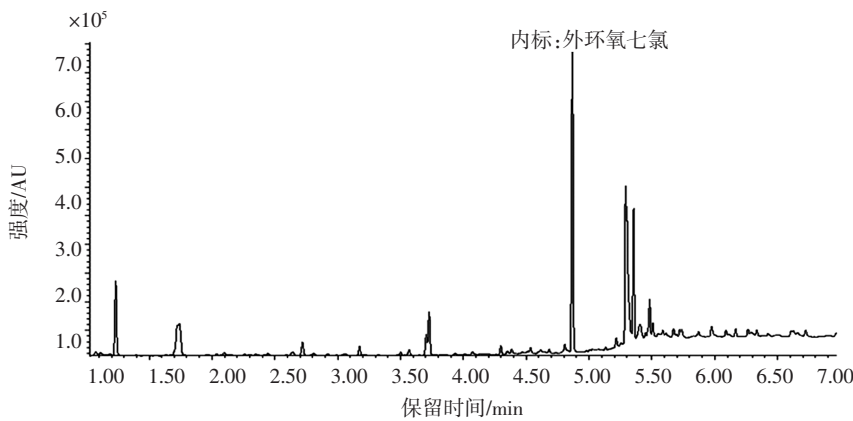


图 12 铁皮石斛空白基质图

Fig.12 Blank matrix of *Dendrobium candidum*

对检出限和空白铁皮石斛样品用 2 种不同方法进行添加回收试验比较可以看出:本试验在方法检出限和回收率上均取得相对较为理想的结果,且前处理方法简单,试剂耗材用量少,对环境友好,完全能够满足日常的铁皮石斛样品的检测工作。具体比较见表 4。

表 4 与中国药典方法 12 种农药检出限和回收率的比较(添加量 0.05 mg/kg)

Table 4 Compared of two method about LODs and Recovery of 12 kinds of pesticides(Added 0.05 mg/kg)

化合物	中国药典方法		本试验方法	
	检出限/ ($\mu\text{g/kg}$)	实测值/ (mg/kg)	检出限/ ($\mu\text{g/kg}$)	实测值/ (mg/kg)
特丁硫磷	5.00	0.039	3.43	0.040
五氯硝基苯	5.00	0.040	2.49	0.047
乙烯菌核利	5.00	0.039	1.06	0.040
甲基毒死蜱	5.00	0.038	1.22	0.045
甲基对硫磷	10.0	0.041	3.21	0.047
杀螟硫磷	10.0	0.039	2.69	0.047
毒死蜱	5.00	0.038	1.68	0.042
三唑酮	10.0	0.045	1.58	0.041
对硫磷	10.0	0.041	2.54	0.045
二甲戊灵	10.0	0.043	2.19	0.045
腐霉利	10.0	0.038	2.04	0.041
甲氰菊酯	5.00	0.036	2.01	0.043

2.6 不同铁皮石斛样品基质的检测

中药材成分复杂,对于农药残留的检测也有一定的影响。本试验对铁皮石斛中农药残留的基质效应进行了研究,使用 PSA 和 C_{18} 小粉净化后结合 GC-MS/MS 采集数据及未净化后样品结合 GC-MS/MS 采集数据,分别使用丙酮溶液和空白基质溶液配置农药混合标准溶液并建立标准曲线,通过比较两组标准曲线的斜率考察基质效应的影响,结果见表 5。

表 5 各农药组分标准曲线斜率的比值

Table 5 Ratios of calibration curve slope of pesticides

序号	化合物名称	标准曲线斜率比值	
		GC-MS/MS	PSA+ C_{18} -GC-MS/MS
1	特丁硫磷	1.111	0.988
2	五氯硝基苯	0.975	0.952
3	乙烯菌核利	1.018	0.944
4	甲基毒死蜱	1.121	0.989
5	甲基对硫磷	1.262	1.021
6	杀螟硫磷	1.169	1.010
7	毒死蜱	1.003	0.963
8	三唑酮	1.080	1.001
9	对硫磷	1.162	1.059
10	二甲戊灵	1.038	0.991
11	腐霉利	1.286	1.000
12	甲氰菊酯	1.106	1.091

由表 5 可知,两组标准曲线斜率的比值分别在 0.975~1.286 和 0.944~1.091 之间,说明使用 PSA 及 C_{18} 小粉净化后结合 GC-MS/MS 方法有效去除了铁皮石斛中的大部分色素和油脂等杂质,从而减少了农药组分的基质效应。为了避免药材本身带来的基质效应,采取基质混合标准品溶液的方法消除和减弱基质效应,同时利用选择离子定量检测也可以大大提高分析方法的选择性,排除一些杂质的干扰。在对不同铁皮石斛样品的检测中发现:虽然铁皮石斛样品基质较为复杂,有几个较大杂质干扰峰,但通过净化、离心、基质标样消除干扰和 GC-MS/MS 联用检测,能基本满足要求。

2.7 样品测定

用本方法检测了各地具有代表性的铁皮石斛样品共 100 批次,发现毒死蜱和五氯硝基苯这 2 个农药有检出,但均未超标,符合使用要求。

3 结论

本研究将涡旋辅助的分散液相微萃取技术与 QuEChERS 结合,气相色谱-串联质谱仪内标法检测,建立了铁皮石斛中农药残留的快速分析新方法。方法优化了前处理,各参数的色谱、质谱条件,且灵敏度高,检出限为 0.353 $\mu\text{g/kg}$ ~1.14 $\mu\text{g/kg}$,方法的准确度(回收率为 77.5%~97.7%),精密度(相对标准偏差为 0.6%~8.4%),均能很好地满足不同铁皮石斛中农药残留的分析要求。目前分散液相微萃取技术还主要用于简单基质成分,而本试验的结果表明,该技术通过与串联质谱联用,用内标法定量,应用于铁皮石斛样品和多种农药残留也可取得满意的结果,这对于拓宽分散液相微萃取技术的应用范围具有指导意义。

参考文献:

- [1] 聂少平,蔡海兰. 铁皮石斛活性成分及其功能研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 356~361
- [2] 陈晓梅,郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70~75
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部: 2015 年版 分辑号: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015
- [4] 王万成,柳敏. QuEChERS-气相色谱分析铁皮石斛中的 6 种有机磷农药残留[J]. 吉林农业, 2017(12): 70~71
- [5] 胡奇杰,朱佳茜,王新财,等. 铁皮石斛饮片中有有机氯及拟除虫菊酯农药多残留检测方法的研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(7): 66~69
- [6] 田海,谭辉华,李雪生,等. 分散液相微萃取-气相色谱法快速测定甘蔗中特丁硫磷残留[J]. 现代农药, 2012, 11(2): 43~46
- [7] 赵文婷,杨中华,魏朝俊,等. 分散液相微萃取测定苹果中灭线磷

- 马拉硫磷和毒死蜱残留[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(9): 1840-1844
- [8] 周建科, 韩朝家, 唐翠苓, 等. 高效液相色谱法测定白葡萄汁中苯甲酰胺类农药[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 169-17
- [9] 贺江, 龙海波. 分散液相微萃取-高效液相色谱法测定水体中毒死蜱残留[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1179-1183
- [10] 智沈伟, 李兴海, 赵尔成, 等. 分散固相萃取-分散液液微萃取/高效液相色谱法测定西瓜中氟唑菌酰胺残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(10): 1265-1268
- [11] 周建科, 唐翠苓, 韩朝家, 等. 分散液液微萃取-液相色谱法测定白葡萄酒中拟除虫菊酯类农药[J]. 中国酿造, 2012, 31(7): 164-166
- [12] 成昊, 张丽君, 张磊, 等. 基质固相分散萃取-分散液相微萃取-气相色谱质谱法测定土壤中拟除虫菊酯类农药[J]. 分析化学, 2015, 43(1): 137-140
- [13] 肖颖, 彭敬东, 张晶, 等. 分散固相萃取分散液液微萃取高效液相色谱/质谱法测定荔枝或香蕉中的三唑类农药残留[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(5): 102-106
- [14] 王东, 侯传金, 赵尔成, 等. 盐析辅助均相液液萃取/分散固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定蜂蜜中新烟碱类农药残留[J]. 分析测试学报, 2015, 34(6): 681-685
- [15] 王潇, 宋维涛, 金海燕, 等. 微波辅助水蒸气法快速萃取西红柿中三唑类农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 1029-1036
- [16] 白宝清, 李美萍, 张生万. QuEChERS-DLLME-高效液相色谱法测定蔬菜中溴虫腈和氟虫腈残留[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 254-258
- [17] Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M R M, et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1116(1): 1-9
- [18] 褚文玮, 张福更. 分散液相微萃取体系研究[J]. 天津化工, 2016, 30(1): 16-18
- [19] 马智玲, 魏长宾, 刘新艳, 等. 分散液液微萃取技术及其在食品安全分析中的应用[J]. 热带作物学报, 2015, 36(2): 432-440
- [20] 曹江平, 解启龙, 周继梅, 等. 分散液液微萃取技术在食品分析中的应用进展[J]. 分析测试学报, 2015, 34(5): 616-624
- [21] 陈曦, 李国林, 林平, 等. 简述分散液相微萃取技术[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(11): 4598-4604

收稿日期: 2018-10-17

欢迎订阅 2020 年《食品研究与开发》

《食品研究与开发》是由天津市食品研究所有限公司和天津市食品工业生产力促进中心主办, 国内外公开发行的食品专业科技期刊, 1980 年创刊, 半月刊, 采用国际流行开本大 16 开。其专业突出, 内容丰富, 印刷精美, 是一本既有基础理论研究, 又包括实用技术的刊物。本刊已被“万方数据库”、“中文科技期刊数据库”、《乌利希期刊指南》、美国《化学文摘》、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、英国《食品科技文摘》(FSTA)等知名媒体收录, 并被列入“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、RCCSE 中国核心学术期刊(A)。主要栏目有: 基础研究、应用技术、检测分析、生物工程、专题论述、食品机械等。

本刊国内统一刊号 CN 12-1231/TS; 国际刊号 ISSN 1005-6521; 邮发代号: 6-197。全国各地邮局及本编辑部均可订阅。从本编辑部订阅全年刊物享八折优惠。2020 年定价: 30 元/册, 全年 720 元。

本编辑部常年办理邮购, 订阅办法如下:

(1) 邮局汇款。地址: 天津市静海区静海经济开发区南区科技路 9 号; 收款人: 《食品研究与开发》编辑部; 邮政编码: 301600。

(2) 银行汇款。开户银行: 工商银行静海支行, 行号: 102110000863。

账号: 0302095119300204171; 单位: 天津市食品研究所有限公司。

《食品研究与开发》编辑部

www.tjfrad.com.cn

E-mail: tjfood@vip.163.com

电话(传真): 022-59525671