超高效液相色谱-串联质谱法测定豇豆中8种农药残留

李 强[1,2,3]， 邱海燕[1,2]， 乐 渊[4]， 夏西亚[1]，
唐良德[1,2]， 曾东强[3]， 付步礼[1,2*]， 刘 奎[1,2*]

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所，海口 571101；2. 农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室，海口 571101；3. 广西大学农业环境与农产品安全重点实验室培育基地，南宁 530005；4. 中国热带农业科学院分析测试中心，海口 571101)

摘要 本文建立了超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS /MS)同时测定豇豆中啶虫脒、阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐、氟啶虫胺腈、灭蝇胺、苯醚甲环唑、吡唑醚菌酯和烯酰吗啉残留量的方法。样品经乙腈提取，采用ACQUITY_UPLC™BEH C18色谱柱分离，应用UPLC-MS /MS正离子扫描进行定性定量分析。结果表明，在0.01～1 μg/mL范围内，8种农药色谱峰面积与浓度均呈线性相关；3个添加水平下，回收率均在90%以上；8种农药在豇豆中的检出限为0.08～1.81 μg /kg，定量限为0.024～0.603 μg/kg。在实际豇豆样品检测中检测到5种农药残留，本方法灵敏度高、速度快，可为检测豇豆中8种农药残留量提供参考。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱； 豇豆； 农药； 残留

中图分类号： O 657.63 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2017196

Analyzation of 8 pesticide residues in cowpea by ultra performance liquid chromatography-tandemmass spectrometry

LI Qiang[1,2,3]， QIU Haiyan[1,2]， LE Yuan[4]， XIA Xiya[1]，
TANG Liangde[1,2]， ZENG Dongqiang[3]， FU Buli[1,2]， LIU Kui[1,2]

(1. *Environment and Plant Protection Institute*, *Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*, *Haikou* 571101, *China*; 2. *Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops*, *Ministry of Agriculture*, *Haikou* 571101, *China*; 3. *Key Laboratory of Agricultural Environment and Agricultural Products Safety*, *Guangxi University*, *Nanning* 530005, *China*; 4. *Analysis & Testing Center*, *Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*, *Haikou* 571101, *China*)

Abstract An analytical method based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to analyze residues of acetamiprid, abamectin, emamectin benzoate, sulfoxaflor, cyromazine, difenoconazole, pyraclostrobin and dimethomorph in cowpea. The samples were homogenized and extracted with acetonitrile, the retention of target compounds was performed on an ACQUITY_UPLC™ BEH C18 column by gradient elution, the qualification and quantification were analyzed by spectrometry with electrospray ionization in positive mode. The results showed that the chromatographic peak area was linearly related to the concentration of pesticides in the range of 0.01－1 μg/ mL. Under the 3 adding levels, the recovery rate is above 90%. The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 0.08－1.81 μg/kg and 0.024－0.603 μg /kg, respectively. 5 pesticides residues were detected in the actual cowpea samples. Taken together, the present study suggest that UPLC-MS /MS method with high sensitivity and high speed can be recommended to be used for the analysis of the residues of 8 pesticides in cowpea.

Key words UPLC-MS/MS; cowpea; pesticides; residue

收稿日期： 2017－05－26 **修订日期**： 2017－07－03
基金项目： 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-32-04)；中央级公益性科研院所基本业务费项目(2016hzs1J007)
* 通信作者 E-mail：fubuli@163.com；lk0750@163.com

豇豆是三亚主要冬种蔬菜之一，三亚优越的环境条件有利于各季节豇豆生长，但同时也使得豇豆上各种病虫害发生猖獗，如苗期根腐病，成株期锈病、煤霉病和炭疽病等，虫害则以斑潜蝇和蓟马为害最严重[1]。据当地情况，大量的杀虫剂如啶虫脒、阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐（甲维盐）、氟啶虫胺腈、灭蝇胺和杀菌剂苯醚甲环唑、吡唑醚菌酯、烯酰吗啉等在豇豆生长过程中需多次重复使用。导致豇豆中农药残留超标的风险很大，豇豆质量安全受到威胁。因此，建立简单、快速、监测项目范围广的农药残留分析技术已成为近年来农残检测的一个发展方向和研究热点[2-5]。

利用超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）同时测定豇豆生产中常用杀虫剂与杀菌剂等残留的报道还很少，虽然有关啶虫脒、阿维菌素、氟啶虫胺腈的检测方法相对多样，如气相色谱法、液相色谱法和液相色谱-串联质谱等，但存在前处理步骤繁琐的弊端[6-9]。吴宇宽等[10]采用高效液相色谱－加热电喷雾串联质谱法建立了同时测定蔬菜、水果中阿维菌素和甲维盐的方法。章虎等[11]采用液相色谱法建立了同时测定稻米中阿维菌素和甲维盐残留的方法。本研究采用 UPLC-MS/MS 方法，首次进行豇豆上 8 种常用农药的最终残留研究，为检测豇豆中 8 种农药残留量提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豇豆样品：分别于 2016 年 12 月 26 日、2017 年 1 月 26 日、2017 年 2 月 26 日在海南省三亚市崖城镇拱北村豇豆种植基地进行采样，3 个批次共 15 个豇豆样品（其中 5 个前期采摘样品、5 个中期采摘样品、5 个后期采摘样品），分别匀浆混匀，－20℃冰箱冷冻保存待测。

标准品：啶虫脒（acetamiprid）、阿维菌素（abamectin）、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐（emamectin benzoate）、氟啶虫胺腈（sulfoxaflor）、灭蝇胺（cyromazine）、苯醚甲环唑（difenoconazole）、吡唑醚菌酯（pyraclostrobin）和烯酰吗啉（dimethomorph）均购自上海安谱科学仪器有限公司。乙腈，美国 Fisher 公司；甲醇（HPLC 级），美国 Fisher 公司；超纯水和甲酸，美国 Sigma-Aldrich 公司。其余试剂均为国产市售分析纯。

1.2 主要仪器设备

H-Class 超高效液相色谱仪（美国 WatersAcquity 公司）、AB SCIEX API4000＋三重四级杆质谱仪（美国 AB SCIEX 公司）、配电喷雾离子源（ESI）与 EB-280-12 电子天平（日本岛津公司）、SB-400 DTY 超声波扫频清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）、Anke TDL-40B 离心机（上海安亭科学仪器厂）、QL-901 旋涡混合器（江苏海门其林医用仪器厂）、Milli-Q 超纯水仪（美国 Millipore 公司）、0.22 μm 有机系滤膜（天津美瑞泰克公司）、超低温冰箱（美国 Kaltis 公司）。

1.3 样品前处理

称取 20 g 已匀浆样品于 50 mL 烧杯中，加入 40 mL 乙腈，匀浆 2 min。倒入装有 5～7 g 氯化钠的具塞量筒中，振摇 2 min，静置 30 min。取 1 mL 上清液于 2 mL 离心管中，加入稀释液（甲醇∶水＝1∶1）1 mL，涡旋 1 min，过 0.22 μm 滤膜，待测。

1.4 基质匹配标准溶液的配制

取豇豆空白样品，按 1.3 节的方法处理，用上清液分别溶解 8 种农药标准品，配制成各农药质量浓度分别为 0.01、0.05、0.1、0.2 和 1.0 μg/mL 的混合标准溶液，涡旋混匀，过 0.22 μm 滤膜，待测。

1.5 检测条件

色谱条件：ACQUITY_UPLC™BEH C18 色谱柱（1.7 μm，2.1 mm×100 mm）；柱温 35℃；进样量 5 μL；流速 0.25 mL/min；运行时间 10 min。梯度洗脱条件见表 1。在此条件下 8 种农药的保留时间见表 2。

表 1 流动相梯度洗脱

Table 1 Gradient elution conditions

时间/min Time	流量/mL·min^{-1} Velocity	流动相 Mobile phase	
		1.0 mmol 乙酸铵溶液/% 1.0 mmol Ammonium acetate	甲醇/% Methanol
0.00	0.25	90	10
1.00	0.25	30	70
3.50	0.25	30	70
4.00	0.25	10	90
8.00	0.25	10	90
8.50	0.25	30	70
9.00	0.25	90	10
10.00	0.25	90	10

质谱条件：离子源为 ESI（＋）；正离子扫描模式；毛细管电压：2 800 V；离子源温度：110℃；去溶剂气温度：350℃；去溶剂气流量：900 L/h；锥孔反吹气流量：50 L/h；碰撞气流速度：0.21 mL/min；多反应监测扫描模式（MRM）。多反应监测（MRM）分析的质谱参数见表 2。

表 2　8 种农药质谱采集参数[1)]

Table 2　Mass spectrum acquisition parameters of 8 pesticides

农药 Pesticide	保留时间/min Retention time	母离子(m/z) Parent ion	锥孔电压/V Cone voltage	子离子(m/z) Daughter ion	碰撞能量/eV Collision energy
氟啶虫胺腈 sulfoxaflor	2.10	279	30	174* 154.5	12 20
灭蝇胺 cyromazine	1.59	167	25	60.2* 108.1	20 20
苯醚甲环唑 difenoconazole	5.21	406	45	251* 337	25 25
吡唑醚菌酯 pyraclostrobin	3.44	388.1	22	163 194*	26 13
啶虫脒 acetamiprid	2.15	223	27	90 125.9*	34 20
阿维菌素 abamectin	6.34	859.6	90	449.2 751.3*	47 41
烯酰吗啉 dimethomorph	5.04	388.1	25	300.9* 165	25 25
甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 emamectin benzoate	7.78	886.4	33	158* 126	34 39

1) * 为定量离子。* Quantitative ion.

1.6　定量方法

在正离子模式测定条件下,分别将豇豆样品溶液和基质匹配混合标准溶液注入液相色谱-串联四极杆质谱仪进行测定。采用外标法定量,以定性离子对为依据进行定性,以定量离子对的峰面积计算样品中待测物的含量。

1.7　标准曲线的绘制和添加回收试验

取 1.4 节配制的混合标准溶液,按 1.5 节的条件测定。以标准溶液的质量浓度(x)为横坐标,以监测离子峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线。向豇豆空白样品中添加 0.01、0.1 和 1 μg/mL 的 3 个水平的 8 种农药混合标准溶液,按照 1.3 节的前处理方法和 1.5 节的条件测定,每个水平重复 5 次,计算添加回收率和相对标准偏差。

2　结果与分析

2.1　提取条件的选择

本试验以乙腈为提取溶剂。采用 QuEChERS 净化方法,简单易行。与传统的前处理方法比,QuEChERS 方法省去了过柱、旋蒸和定容步骤,减少提取过程中农药残留量的损失,检测结果更能反映真实值。

2.2　质谱条件选择

采用 1 mg/kg 浓度的 8 种农药标准溶液单针进样,优化质谱条件。通过一级质谱后,产生稳定的[M+H]离子。确定母离子后,在 SIM 模式下优化各目标化合物的碎裂电压。母离子进入二级质谱,产生不同的离子碎片。在子离子扫描模式下,优化碰撞能量,得到相应的离子碎片。用于母离子定性和定量的优化;优化碰撞能量,使这 2 个特征碎片离子的响应最大,最后得到 8 种化合物相应的 MRM 离子对以及质谱参数。

2.3　色谱条件选择

当流动相中的水相为超纯水时,质谱对检测化合物的灵敏度较低。向水相中加入 1.0 mmol 的乙酸铵溶液则可以极大地提高灵敏度。通过试验最终确定流动相为甲醇和 1.0 mmol 的乙酸铵溶液,可以同时满足 8 种农药的灵敏度和较好的峰形要求。

2.4　线性检验

8 种农药在 0.01～1 μg/mL 添加浓度范围内,色谱峰面积与浓度均呈线性相关,回归方程及相关系数见表 3,说明此方法可以用于豇豆中 8 种农药的定性定量分析,8 种农药混合标准溶液的 MRM 色谱图见图 1。

2.5　检出限、添加回收率和变异系数

根据空白样品的基线噪声值求其平均值,得到样品中啶虫脒、阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐、氟啶虫胺腈、灭蝇胺、苯醚甲环唑、吡唑醚菌酯和烯酰吗啉的检出限分别为 0.36、0.50、0.08、1.8、1.81、1、1、0.09 μg/kg。准确性以添加回收率表示,精密度以同批次样品回收率的变异系数表示。3 组添加水平 8 种农药的添加回收率和变异系数结果见表 4。

表 3 8 种农药的标准曲线方程和决定系数

Table 3 Linear regression equation and determination coefficient of eight pesticides

农药 Pesticide	线性回归方程 Linear equation	决定系数 R^2
氟啶虫胺腈 sulfoxaflor	$Y=1.134\ 6e^4X-3.079\ 23$	0.992 6
灭蝇胺 cyromazine	$Y=4.618\ 8e^5X+6\ 669.49$	0.989 6
苯醚甲环唑 difenoconazole	$Y=5.748\ 5e^6X+3\ 272.39$	0.999 4
吡唑醚菌酯 pyraclostrobin	$Y=6.885\ 4e^6X+2\ 236.73$	0.998 9
啶虫脒 acetamiprid	$Y=4.224\ 8e^6X+17\ 808.3$	0.984 8
阿维菌素 abamectin	$Y=3.198\ 9e^4X+719.258$	0.981 6
烯酰吗啉 dimethomorph	$Y=2.194\ 7e^6X+602.018$	0.999 2
甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 emamectin benzoate	$Y=2.376\ 9e^7X+9\ 856.66$	0.998 6

表 4 不同添加水平下 8 种农药的回收率和变异系数

Table 4 Recoveries and the coefficient of 8 pesticides at three adding levels

农药 Pesticide	0.01 μg/mL		0.1 μg/mL		1 μg/mL	
	平均回收率/% Mean recovery	相对标准偏差/% RSD	平均回收率/% Mean recovery	相对标准偏差/% RSD	平均回收率/% Mean recovery	相对标准偏差/% RSD
氟啶虫胺腈 sulfoxaflor	95.6	8.9	96.3	5.3	94.8	6.1
灭蝇胺 cyromazine	91.8	9.3	93.4	6.1	92.6	6.2
苯醚甲环唑 difenoconazole	96.9	4.5	94.5	4.2	95.2	2.9
吡唑醚菌酯 pyraclostrobin	93.4	4.8	95.6	7.6	96.3	4.1
啶虫脒 acetamiprid	91.8	7.2	92.4	5.6	95.2	5.7
阿维菌素 abamectin	90.6	6.7	94.6	6.6	95.8	6.5
烯酰吗啉 dimethomorph	96.2	5.2	94.9	5.7	95.6	7.4
甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 emamectin benzoate	95.5	4.7	95.0	3.6	96.2	3.6

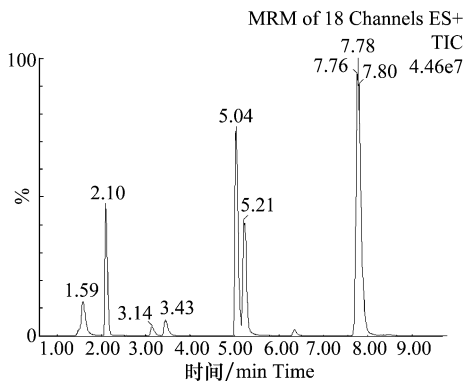


图 1 8 种农药混合标准溶液的 MRM 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard mixtures of 8 pesticides

2.6 实际样品检测结果

检测结果表明，5 个前期样品检测出氟啶虫胺腈、灭蝇胺、啶虫脒、阿维菌素、烯酰吗啉；5 个中期样品检测出灭蝇胺、啶虫脒、烯酰吗啉；5 个后期样品检测出灭蝇胺和啶虫脒。检出量见表 5，其他 3 种农药均未检出。MRM 色谱图见图 2。

表 5 豇豆样品检测结果

Table 5 Determination results of 8 pesticide in cowpea samples

农药 Pesticide	检出量/mg·kg^{-1} Detection quantity		
	前期样品 Preliminary sample	中期样品 Metaphase sample	后期样品 Later sample
氟啶虫胺腈 sulfoxaflor	0.080	—	—
灭蝇胺 cyromazine	0.308	0.574	0.266
苯醚甲环唑 difenoconazole	—	—	—
吡唑醚菌酯 pyraclostrobin	—	—	—
啶虫脒 acetamiprid	0.310	0.210	0.253
阿维菌素 abamectin	0.038	—	—
烯酰吗啉 dimethomorph	0.904	0.148	—
甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 emamectin benzoate	—	—	—

3 结论与讨论

本试验采用改进的 QuEChERS 方法提取和净化样品，利用 UPLC-MS/MS 快速检测豇豆中 8 种农药残留，其色谱峰分离效果好，操作简单，检出限 0.08～1.81 μg/kg，定量限为 0.024～0.603 μg/kg，且在 10 min 内即可完成 8 种农药多残留分析。该

方法平均回收率均在 90%以上,相对标准偏差不大于 10%,完全符合农药残留分析的要求。此外,该方法与现有的国家标准和文献相比,在实际应用中效果更好,更适合大量豇豆样品的检测。

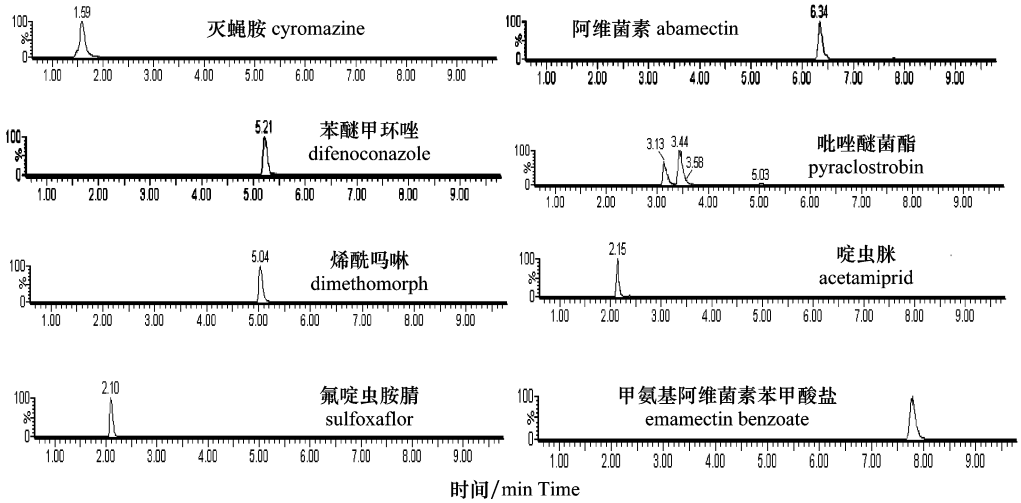


图 2　豇豆中 8 种农药检测 MRM 色谱图

Fig. 2　The test chromatogram of 8 pesticides in cowpea

参考文献

[1] 王爽,许如意,刘勇,等. 海南豇豆主要病虫害的发生及防治技术[J]. 长江蔬菜,2016(19):51-54.

[2] CUNHA S C, LEHOTAY S J, MASTOVSKA K, et al. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives [J]. Journal of Separation Science, 2007, 30(4):620.

[3] XU R, WU J, LIU Y, et al. Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in traditional Chinese medicine by gas chromatography with electron capture detection [J]. Chemosphere, 2011, 84(7):908-912.

[4] JIAN W, XU R, ZHAO R H, et al. Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in fifty traditional chinese medicine by gas chromatography [J]. Journal of Analytical Science, 2011, 27(2):167-170.

[5] PAYÁ P, ANASTASSIADES M, MACK D, et al. Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(6):1697-1714.

[6] 崔淑华,李正义,程刚,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬中氟啶虫胺腈、pyrifluquinazon 和螺虫乙酯残留量[J]. 食品科学,2017. (2017-04-26)[2017-08-11]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20170426.1459.010.html.

[7] 路海燕,李斌,陈忠正,等. 分散固相萃取-HPLC 检测绿茶茶汤中吡虫啉和啶虫脒残留[J]. 食品科学,2013(20):203-206.

[8] 何红梅,赵华,张春荣,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水稻基质中阿维菌素残留量[J]. 分析化学,2012(1):140-144.

[9] 李慧冬,杜红霞,陈子雷,等. 气相色谱法测定甘蓝中啶虫脒残留量[J]. 化学分析计量,2006(6):22-23.

[10] 吴宇宽,赵静,高进,等. 高效液相色谱-串联质谱法检测蔬菜、水果中阿维菌素、甲维盐残留[J]. 湖北大学学报(自然科学版),2013(4):461-464.

[11] 章虎,钱鸣蓉,董程,等. 液相色谱法同时测定稻米中阿维菌素和甲维盐残留[J]. 浙江农业科学,2010(6):1358-1361.

(责任编辑:杨明丽)