

QuEChERS 法和 UPLC-MS-MS 法快速测定棉籽中的马拉硫磷

卜庆状, 王建忠, 李广, 郭春景, 林秋君 (辽宁省农业科学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要 [目的] 建立超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS-MS)对棉籽中马拉硫磷的检测方法。[方法] 棉籽样品经乙腈提取, 正交试验优化 QuEChERS 净化方法, 正离子多反应监测(MRM)模式测定。[结果] 该方法在 0.01~1.00 mg/L 线性关系良好, 相关系数为 0.999 9, 最低检出量为 2 μg/kg, 最低检出浓度为 10 μg/kg, 加标回收率 82.29%~90.64%, 相对标准偏差在 5.25%~14.64%。[结论] 该方法简便、快速、准确、灵敏, 节省有机溶剂, 环境友好, 适合大批量棉籽中马拉硫磷的检测需要。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法; QuEChERS 法; 棉籽; 马拉硫磷

中图分类号 S481+.8 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)12-0067-03

Using QuEChERS and UPLC-MS-MS Method to Rapidly Determine Malathionin in Cotton-seed

BU Qing-zhuang, WANG Jian-zhong, LI Guang et al (Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract [Objective] A method was developed for determination of malathion in cotton-seed by using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. [Method] The samples were extracted by acetonitrile, the QuEChERS purification method was optimized by orthogonal array design and the positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode was used. [Result] The results showed that the linear ranges of malathion were 0.01-1.00 mg/L and the correlation coefficient was 0.999 9. The minimum detectable quantity and minimum detectable concentration were 2 μg/kg and 10 μg/kg respectively. The average recoveries were in the range of 82.29%-90.64%. The relative standard deviations were between 5.25% and 14.64%. [Conclusion] The method is proved to be simple, fast, accurate, sensitive, saving organic solvents, suitable for mass detection of actual needs.

Key words Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS; Cotton-seed; Malathion

马拉硫磷是一种广泛应用于农业的高效、触杀性有机磷杀虫剂, 对人畜毒性较低, 代谢速度较快, 代谢毒性较小, 残效期短。近年来, 马拉硫磷广泛应用于防治水稻、棉花、小麦、蔬菜上的多种害虫^[1-2]。目前, 我国用于马拉硫磷的提取和净化的方法主要为固相萃取法(SPE)。固相萃取法操作步骤繁琐、耗材昂贵、有机溶剂使用量较大^[3], 而且固相萃取对油料中农药残留还存在净化效果差、回收率低等问题^[4]。笔者选用 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 前处理方法, 该方法诞生于美国, 具有快速简便、价格低廉、高效、环境友好等优点。目前有 200 余种农药可使用此方法进行分析, 包括含脂肪的介质体系^[5-8]。马拉硫磷的分析方法主要为气相色谱法(GC)^[9]、高效液相色谱法(HPLC)^[10]、高效液相色谱质谱联用法(HPLC-MS)^[11]、气相色谱质谱联用法(GC-MS)^[12]。在实验室具体分析过程中发现, 气相色谱与液相色谱虽然灵敏度较高, 但是由于提取和净化的问题, 造成色谱图背景干扰多, 很容易误判和漏判。一级质谱虽然选择性比较强, 但是同时也牺牲了灵敏度, 而且在基质复杂的样品中, 电离碎片也比较复杂, 也会出现假阳性的问题。

棉籽是棉花的副产品, 也是一种重要的原材料, 可用来制作棉籽油、棉饼、棉籽壳和油脚等产品^[13-14]。棉籽油的商业价值和营养价值较高, 但是由于油脂特性, 很容易造成农药残留。目前, GB 2763—2014 中并未对棉籽及制品中马拉硫磷的最大残留限量做出规定^[15]。笔者针对棉籽中马拉硫磷残留情况, 建立一种快速、安全、简便、准确的检测方法, 为棉籽及其制品中马拉硫磷最大残留限量的制定提供技术和

理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料 供试样品为市售棉籽。主要仪器: Waters UPLC-Xevo-TQ 超高效液相色谱-串联质谱仪, 美国 Waters 公司; 中佳 HC-3514 高速离心机, 安徽中科中佳科技有限公司; 鼎昊源 RS-1 涡旋混合器, 北京鼎昊源科技有限公司; 帕恩特超纯水机, 北京湘顺源科技有限公司; 0.22 μm 针头过滤器、50 mL 聚丙烯塑料离心管, 新康医疗器械有限公司。

主要试剂: 氯化钠, 分析纯, 上海国药集团; 乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)、单官能团 G₁₈ 键合相(C₁₈)、石墨化碳黑(GCB)、硅胶键合氨丙基(NH₂)粉, 天津博纳艾杰尔科技有限公司; 甲醇、乙腈、甲酸, 均为色谱纯, 北京迪马科技有限公司; 试验用水为超纯水; 农药标准品(纯度>97%), 农业部环境质量监督检验测试中心(天津)提供。

1.2 样品处理方法 准确称取粉粹的棉籽样品 5 g, 加入 10 mL 水、10 mL 乙腈、5 g NaCl 于 50 mL 具塞离心管中, 涡旋提取 5 min, 加入自制 QuEChERS 净化包, 剧烈振荡 2 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 待测。

1.3 分析条件 色谱条件: Acquity BEH RP₁₈ 柱(2.1 mm × 100 μm × 1.7 μm); 柱温 30℃; 进样量 5 μL; 流速 0.45 mL/min; 流动相 A 为甲醇-0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈。梯度洗脱条件: 0~0.25 min, 90%~5% A; 0.25~5.00 min, 5%~90% A。

质谱条件: 电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺), 离子源温度 110℃, 毛细管电压 3.0 kV, 脱溶剂气温度 380℃, 雾化气流量 550 L/h, 锥孔反吹气流量 50 L/h, 扫描方式为多反应监测(MRM)模式。

1.4 试验方法

1.4.1 标准曲线的绘制。准确称取 50.0 mg 马拉硫磷标准

基金项目 农业部财政专项项目(GJFP201700103)。

作者简介 卜庆状(1985—), 男, 辽宁营口人, 研究实习员, 硕士, 从事农业质量标准与检测技术研究。

收稿日期 2017-03-08

品,用色谱纯甲醇稀释定容至 50 mL,配制成 1.0 mg/mL 的马拉硫磷标准储备液,再用基质逐级稀释成 0.01、0.02、0.05、0.10、0.50、1.00 mg/L 的工作液,以峰面积为纵坐标,样品浓度为横坐标,绘制标准曲线,求得线性回归方程及相关系数,按照 3 倍信噪比(S/N)计算最低检出限(LOD)。

1.4.2 添加回收率。将不含马拉硫磷的棉籽空白样品,分别按照设置的添加水平 0.01、0.10、1.00 mg/kg 进行标样添加,然后按照“1.2”的样品处理方法进行处理,再按照“1.3”的分析条件进行分析,计算各添加水平的回收率和各添加水平 5 次重复样品检测值的相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化 在 ESI 源中选择正离子扫描模式,对马拉硫磷的质谱条件进行优化,分别采用 MS1 Scan 和 Intel-listart 自动调谐优化,然后手动调节对自动调节结果进行验证。将响应强度大的离子设为定量离子,响应强度弱的离子设为定性离子,确定最佳质谱条件。棉籽中马拉硫磷质谱条件见表 1。

表 1 棉籽中马拉硫磷质谱条件

Table 1 MS condition of malathion in cotton-seed

保留时间 Retention time//min	定性定量离子对 Qualitative and quantitative ion pair(m/z)	锥孔电压 Cone voltage//V	碰撞能量 Collision energy//eV
3.92	330.83/98.87 *	20	22
	330.83/126.87		18

注: * 表示为定量离子对

Note: * stands for quantitative ion pair

2.2 流动相的选择 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS-MS)的流动相一般包括甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水。通过预试验发现,在相同的梯度洗脱条件和质谱条件下,甲醇-0.1%甲酸水作为流动相时,马拉硫磷的离子化效果较好,总离子流图尖锐,峰型对称,离子强度响应值较大。所以,选择甲醇-0.1%甲酸水溶液作为流动相。

2.3 提取剂的选择 选择乙腈、丙酮、1%醋酸乙腈作为提取剂,通过预试验比较发现,乙腈的提取效果最好,回收率较高,本底干净,乙腈对农药还具有较强的溶解性,而且可以减少样品基质中蜡质、脂肪和一些亲脂性色素的提取量^[16],比较适合作为棉籽类含油脂较高样品的提取剂。

2.4 吸附剂种类和用量选择 由于棉籽样品油脂含量较高,目前市面上常用的 QuEChERS 分散固相萃取试剂盒不能满足净化需要,所以选择了自配试剂盒的方式对 QuEChERS 方法进行优化。选择常用的 GCB、PSA、 C_{18} 、 $MgSO_4$ 吸附剂,其中 GCB 用于去除色素类杂质,PSA 用于去除极性杂质(特别是对脂肪酸去除能力较强), C_{18} 用于去除非极性杂质, $MgSO_4$ 可以吸附有机相中的水分。4 因素 3 水平正交试验,设计见表 2,结果见表 3。从表 3 可以看出,影响提取净化效果的因素排序由大到小依次为 PSA、 C_{18} 、GCB、 $MgSO_4$,最佳配比为 $A_2B_2C_3D_1$,即 10 mg GCB、50 mg PSA、50 mg $MgSO_4$ 、50 mg

C_{18} 。

表 2 吸附剂种类和用量优化正交试验因素水平设计

Table 2 Factor and level of orthogonal test for adsorbent types and dosage optimization mg

水平 Level	因素 Factor			
	GCB(A)	PSA(B)	C_{18} (C)	$MgSO_4$ (D)
1	5	25	15	50
2	10	50	30	100
3	15	75	50	150

表 3 吸附剂种类和用量优化 $L_9(4^3)$ 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test for adsorbent types and dosage optimization

试验号 No.	因素 Factor				回收率 Recovery rate//%
	GCB(A)	PSA(B)	C_{18} (C)	$MgSO_4$ (D)	
1	1	1	1	1	62.10
2	1	2	2	2	82.02
3	1	3	3	3	72.09
4	2	1	2	3	65.13
5	2	2	3	1	96.15
6	2	3	1	2	70.94
7	3	1	3	2	73.21
8	3	2	1	3	79.54
9	3	3	2	1	70.78
K_1	72.07	66.81	70.86	76.34	
K_2	77.41	85.90	72.64	75.39	
K_3	74.51	71.27	80.48	72.25	
R	5.34	19.09	9.62	4.09	

2.5 线性关系 使用棉籽基质配制 0.01、0.02、0.05、0.10、0.50、1.00 mg/L 的马拉硫磷标准工作液,以进样浓度(x , mg/L)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线。结果表明,在 0.01 ~ 1.00 mg/L 范围内,马拉硫磷的响应值与其质量浓度线性良好,线性方程为 $y = 581\ 319.82x + 622.54$,相关系数(r)为 0.999 9。棉籽中马拉硫磷标准曲线见图 1,马拉硫磷总离子流图见图 2。

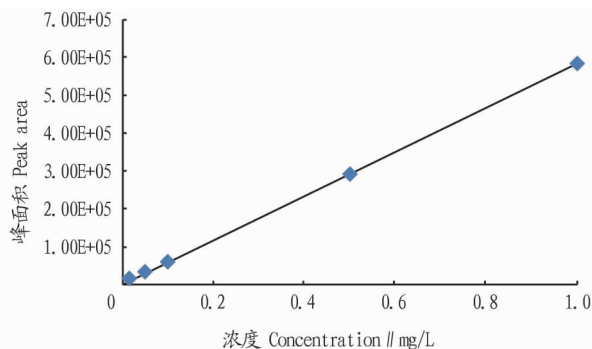


图 1 棉籽中马拉硫磷标准曲线

Fig. 1 Standard curve of malathion in cotton-seed

2.6 检出限和定量限 按 3 倍信噪比条件计算马拉硫磷的最小检出量为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。根据添加回收率试验,马拉硫磷在棉籽中的最低检出浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.7 添加回收率和精密度 在空白棉籽样品中添加 0.01、0.10、1.00 mg/kg 3 种浓度的马拉硫磷标准溶液, 每种重复 5 次, 结果见表 4。

从表 4 可以看出, 在线性范围内, 优化的 QuEChERS 净化方法得到了较好的添加回收率和精密度, 3 种浓度的平均回收率为 82.29% ~ 90.64%, RSD 在 5.25% ~ 14.64%。

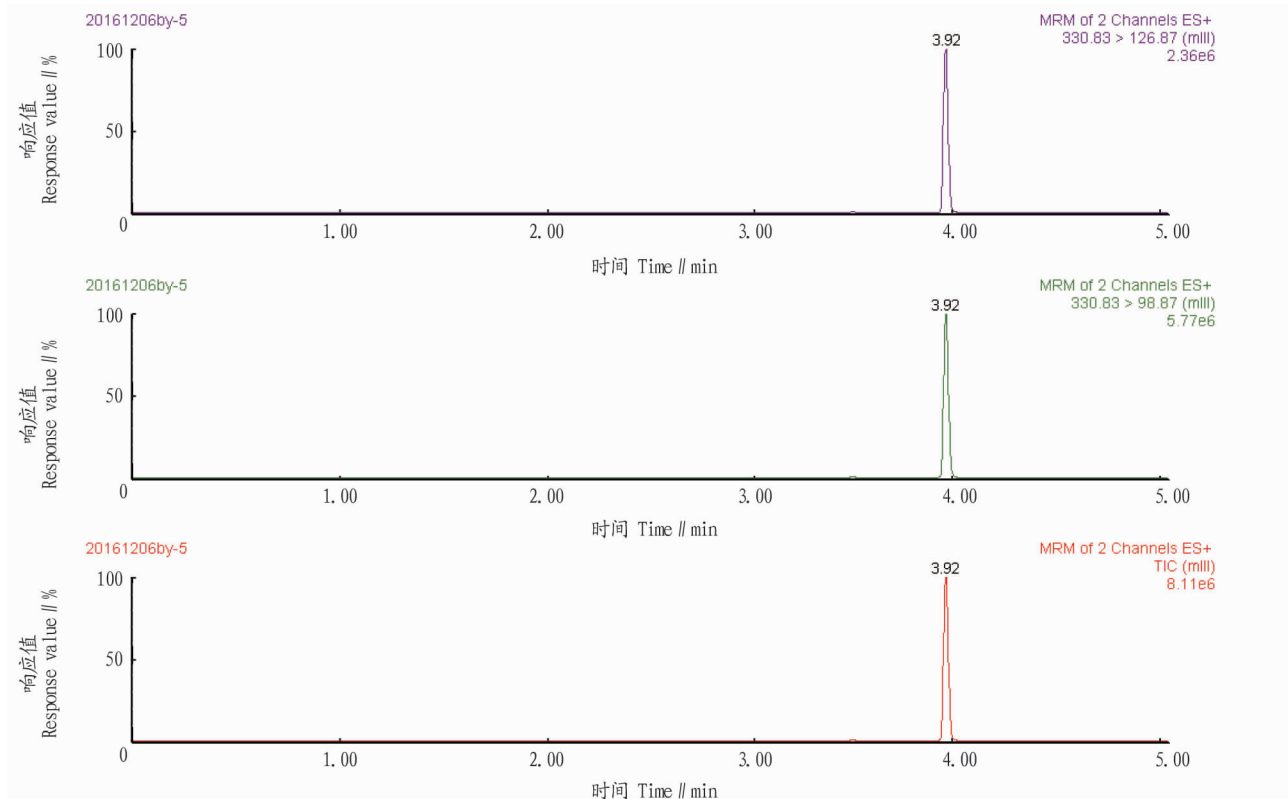


图 2 棉籽中马拉硫磷总离子流

Fig. 2 Total ion current of malathion in cotton-seed

表 4 棉籽马拉硫磷中加标回收率和精密度

Table 4 Recovery and precision of malathion in cotton-seed

添加浓度 Additive concentration mg/kg	回收率 Recovery rate // %					平均值 Mean %	RSD %
	重复 1 Repetition 1	重复 2 Repetition 2	重复 3 Repetition 3	重复 4 Repetition 4	重复 5 Repetition 5		
0.01	61.88	83.92	103.11	80.21	82.35	82.29	14.64
0.10	96.15	96.32	88.91	85.74	86.09	90.64	5.25
1.00	93.21	76.19	92.05	88.71	75.54	85.14	8.63

3 结论

该研究采用乙腈提取、正交试验 QuEChERS 净化, 超高效液相色谱-串联质谱法进行测定, 建立了棉籽中马拉硫磷残留的检测方法。该方法简便、节省溶剂、环境友好、检测速度快、回收率高, 适合大批量棉籽中马拉硫磷残留的检测, 应用前景广阔。

参考文献

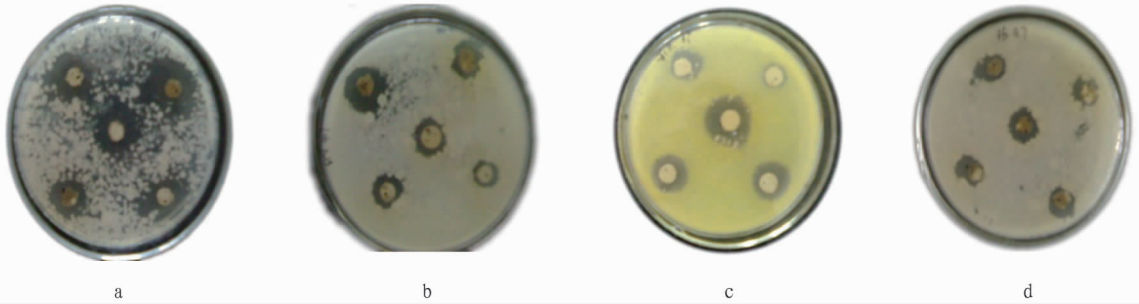
[1] 傅强, 杨仁斌, 王钟, 等. 马拉硫磷在柑桔和土壤中的残留消解动态[J]. 农药学报, 2008, 10(4): 487-490.
 [2] 俞慧红. 气相色谱法测定大米中马拉硫磷的不确定度评定[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(35): 148-150.
 [3] 郭春景, 李娜, 王建忠. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定 8 种蔬菜中 114 种农药残留[J]. 质谱学报, 2014, 35(3): 279-288.
 [4] 宋丹阳, 宫兆晶, 李培武, 等. 我国油料中农药残留限量与检测技术现状与发展趋势[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(3): 375-379.
 [5] 胡西洲, 程运斌, 胡定金. QuEChERS 法测定蔬菜中有机磷类农药多残

留分析[J]. 中国测试技术, 2006, 32(3): 132-133.
 [6] LEHOTAY S J, DE KOK A, HIEMSTRA M, et al. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection[J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(2): 595-614.
 [7] LEHOTAY S J, MASTOVSKÁ K, YUN S J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes[J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(2): 630-638.
 [8] 洪萍, 徐陆妹, 楼冰冰, 等. QuEChERS 方法及其在农药残留分析中的应用进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(4): 756-758.
 [9] 唐建设, 项丽. 固相萃取-气相色谱法测定水样中马拉硫磷残留[J]. 环境监测管理与技术, 2005, 17(5): 27-28.
 [10] 牛古丹, 俞志刚, 李晓霞. 固相萃取-高效液相色谱法测定果蔬中农药马拉硫磷残留量[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(10): 1166-1168.
 [11] 俞志刚, 刘波, 姜兆华. SPE-HPLC-MS 定量法测定果蔬中农药马拉硫磷残留量[J]. 分析实验室, 2008, 27(10): 10-14.
 [12] 张洪非, 胡清源, 唐翎岭, 等. 气相色谱-质谱法分析烟草中 29 种有机磷农药残留[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(S1): 9-13.

(下转第 72 页)

2.1.2 米糠油对细菌的抑制效果。由图4可知,米糠油对白色念珠球菌、纳豆芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等细菌均有一定的抑制作用。但对不同的细菌菌种,米糠

油的抑菌效果不同。对白色念珠球菌的抑制效果要优于对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及纳豆芽孢杆菌的抑菌效果。



注:a.“米糠油”抑制白色念珠球菌效果图;b.米糠油抑制纳豆芽孢杆菌效果图;c.米糠油抑制金黄色葡萄球菌效果图;d.米糠油抑制枯草芽孢杆菌效果图

Note:a. The inhibitory effect of “the rice bran oil” on *Candida albicans*; b. The inhibitory effect of “the rice bran oil” on *Bacillus natto*; c. The inhibitory effect of “the rice bran oil” on *Staphylococcus aureus*; d. The inhibitory effect of “the rice bran oil” on *Bacillus subtilis*

图4 米糠油对细菌的抑制效果

Fig.4 The inhibitory effect of the rice bran oil on bacteria

以上试验结果表明,米糠油对真菌和细菌都有抑制作用,并且米糠油的对真菌的抑菌效果要优于对细菌的抑菌效果。这对后期选取浓度梯度试验的代表性菌种奠定了基础。

2.2 不同浓度的米糠油和足爽脚净王抑制青霉作用由表1可知,米糠油和足爽脚净王都对青霉具有抑制效果。

表1 “米糠油”和足爽脚净王对青霉的抑制效果

Table 1 The inhibitory effect of “the rice bran oil” and Zushuang Jiaojingwang on *Penicillium fungi*

样品 Sample	浓度 Concentration %	青霉 Inhibitory effect on <i>Penicillium fungi</i>
米糠油 The rice bran oil	2	+
	5	+
	10	+
	20	+
	30	+
	对照(CK)	-
足爽脚净王 Zushuang Jiaojingwang	2	+
	5	+
	10	+
	20	+
	30	+
	对照(CK)	-

注:“+”表示有抑菌效果;“-”表示没有抑菌效果

Note:“+” indicates inhibitory effect;“-” indicates no inhibitory effect

3 结论与讨论

该试验结果表明,无菌水对真菌和细菌没有抑制作用,米糠油对真菌和细菌都有抑制作用。在对真菌几个菌种的抑制效果中,对青霉的抑制效果最佳;在对细菌几个菌种的抑制效果中,对白色念珠球菌的抑制效果最佳。米糠油对真

菌的抑制效果优于对细菌的抑制效果。米糠油和足爽脚净王均对青霉有抑菌效果。

米糠在 200 ~ 500 °C 高温下加热能裂解成一种棕黄色油样液体^[8],民间用燃烧法从米糠中得到的棕黄色油样液体应该是米糠热裂解的产物,应是多种成分的混合物,但混合物中具体含有何种有效成分,对人类致病真菌的抑菌效果和抑制机理如何,是否有快速、高效的制备方法可以替换民间的制备方法以获取更多的米糠油,提高米糠油的提取率等方面在国内外未见详细报道。民间利用米糠治疗疾病的偏方已广泛流传,今后如能将其中有效的偏方进行科学的研究,使之规范化、科学化、安全化,再进一步地研制开发出能够商品化的药物投放市场,满足更多患者的需要,造福于社会,在带来社会效益的同时,又能带来一定的经济效益。

参考文献

- [1] 周显青,杨继红,张玉荣. 国内外米糠资源利用现状与发展[J]. 粮食加工,2014,39(5):24-29.
- [2] 王高林,马传国,王德志. 米糠油生产应用技术[J]. 中国油脂,2008,33(3):17-21.
- [3] 龚院生,姚惠源,杭敏. 米糠水溶性提取物中 γ -谷维醇的富集和米糠保健饮料工艺研究[J]. 食品科学,2001,22(3):47-49.
- [4] 唐传核. 米糠油来源生育三烯酚生理功能作用[J]. 粮食与油脂,2000(2):35-36.
- [5] 王炜华,黄丽,刘成梅,等. 米糠膳食纤维对强化大米质构的影响[J]. 食品与机械,2011,27(3):16-19.
- [6] 罗志刚,杨连生,高群玉. 米糠功能成分的研究与开发[J]. 粮油加工与食品机械,2003(12):50-52.
- [7] 张宏光,赵桂琴. 谷糠油对皮肤致病真菌抑制试验研究[J]. 岭南皮肤性病科杂志,2004,11(3):270.
- [8] 罗婕,戴玉春,刘敏. 两种我国常见生物物质的热解特性研究[J]. 株洲师范高等专科学校学报,2006,11(5):45-47.

(上接第69页)

- [13] 唐金泉,宋卫国,黄隽辉. 棉籽精深加工新技术与新工艺[J]. 中国油脂,2007,32(10):32-35.
- [14] 李志强,唐金泉,顾东. 棉籽的营养价值与加工利用[J]. 中国畜牧杂志,2005,41(2):47-48.

- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中最大农药残留限量:GB 2763—2014[S]. 北京:中国标准出版社,2014.
- [16] 张玉婷,李娜,邵辉,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人参、黄芪中多种除草剂残留量[J]. 分析试验室,2011,30(8):27-32.