

QuEChERS/HPLC – MS/MS 法同时测定果蔬中 17 种农药残留

郭保宝¹, 石志格^{1,2}, 刘胜男², 张国庆¹, 韩四海³ (1. 三门峡市检验检疫中心, 河南三门峡 472000; 2. 三门峡出入境检验检疫局, 河南三门峡 472000; 3. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471023)

摘要 [目的]利用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测技术,建立了果蔬中同时测定 17 种农药残留的分析方法。[方法]采用 QuEChERS 前处理方法,用含 1% (V/V) 乙酸的乙腈溶液提取样品,以无水硫酸镁(MgSO₄)作为脱水剂,经 N-丙基乙二胺(PSA)和石墨化碳黑(GCB)混合净化剂净化,C₁₈ 色谱柱分离,高分辨质谱在正离子模式下选用多重反应监测(MRM)扫描测定,基质匹配标准曲线外标法定量。[结果]17 种农药在 1~50 ng/mL 范围内线性关系良好,相关系数均在 0.99 以上。分别对黄瓜、苹果进行 3 个加标水平的回收试验(1.0、2.0、5.0 μg/kg),17 种目标物的回收率为 60.2%~117.7%,相对标准偏差低于 12.8%。检出限(S/N≥3)为 0.2 μg/kg,定量限(S/N≥10)为 1.0 μg/kg。[结论]该方法简单、快速、灵敏、精确,能够同时准确测定果蔬样品中 17 种农药残留。
关键词 QuEChERS; 高效液相色谱-串联质谱; 同时测定; 果蔬; 农药残留
中图分类号 S481+.8 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)26-0087-06

Determination of 17 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by QuEChERS Method Coupled with High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

GUO Bao-bao¹, SHI Zhi-ge^{1,2}, LIU Sheng-nan² et al (1. Sanmenxia Inspection and Quarantine Center, Sanmenxia, Henan 472000; 2. Sanmenxia Entry-Exit Inspection And Quarantine Bureau of P. R. China, Sanmenxia, Henan 472000)

Abstract [Objective] A rapid and effective method was established for the simultaneous determination of 17 pesticide residues in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography tandem mass (HPLC-MS/MS). [Method] Using modified QuEChERS method, the samples was extracted with acetonitrile containing 1% (V/V) acetic acid, purified by a mixed sorbent of MgSO₄, primary secondary amine (PSA) and graphitized carbon black (GCB), separated on a C₁₈ column and analyzed by positive electrospray ionization tandem method. [Result] The results showed that the 17 pesticide residues were linear in the range of 1~50 ng/mL with correlation mass spectrometry under multiple reactions monitoring (MRM) mode. The quantitative analysis was used by external standard coefficients (r) over 0.99. The recoveries at spiked levels of 1.0, 2.0 and 5.0 μg/kg for all target compounds in the samples were in the range of 60.2%~117.7%, with relative standard deviations less than 12.8%. The limits of detection (LOD, S/N≥3) was 0.2 μg/kg; the limits of quantitation (LOQ, S/N≥10) was 1.0 μg/kg. [Conclusion] A simple, rapid, sensitive and accurate method was developed, which was suitable for the determination of 17 pesticide residues in fruits and vegetables simultaneously.
Key words QuEChERS; High performance liquid chromatography tandem mass; Simultaneous determination; Fruits and vegetables; Pesticide residues

随着经济的发展和人民生活质量的提升,食品安全问题越来越受到人们的重视^[1-2]。水果和蔬菜含有大量丰富的维生素、人体必需的矿物质、水分和纤维质等营养物质,可以增强体质,提高免疫力,越来越受到人们的青睐。然而在种植过程中,为了预防病虫害和提高产量,要使用各种不同的农药^[3-4]。据估计,全世界每年因病、虫、草害造成的粮食损失约占总产量的 50%,使用农药可挽回上述损失中的 30%,其效益约为农药使用成本的 4 倍。但使用农药对生态环境、人类生命构成了巨大威胁。随着使用范围的逐渐扩大和使用量的不断增加,农药造成的环境污染和食品安全问题逐渐暴露,农产品农药残留超标现象常有发生。我国已制定了相关法律法规,针对具体的果蔬限制了农药的最大残留限量,而且标准要求越来越严格。因此建立高效、准确、选择性好的果蔬中农药残留检测方法尤为重要。

目前食品检测的前处理方法主要有固相萃取(SPE)^[5-6]、固相微萃取(SPME)^[7-8]、凝胶渗透色谱(GPC)^[9-10]、分子印迹固相萃取(MI-SPE)^[11-12]和 QuEChERS 方法^[13-17]等。QuEChERS 方法是美国农业部 Anastassiades 教授在 2003 年研究开发的一种新型在水果、蔬菜中快

速检测农药残留的前处理方法。QuEChERS 方法与前几种方法相比,具有快速(quick)、简单(easy)、廉价(cheap)、有效(effective)、可靠(rugged)、安全(safe)等特点,是一种在农药残留分析中被广泛采用的样品前处理方法。

目前农药残留检测方法很多,主要有高效液相色谱法^[18-19]、气相色谱法^[20]、气相色谱-串联质谱法^[21]、液相色谱-串联质谱法^[22]。其中液相色谱-串联质谱法具有更高灵敏性、准确度和选择性,是目前多种农药残留分析中更为普遍采用的一种方法。笔者采用 QuEChERS 样品前处理方法,结合高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术,建立了水果蔬菜中 17 种农药残留同时检测的方法。该方法前处理样品简单、快速、溶剂使用量少、污染小,能够有效降低基质干扰,适用范围广,检测结果准确度和精确度高,适用于水果、蔬菜样品中多种农残组分的同时检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及主要试剂。水果、蔬菜样品,市售;甲醇(HPLC-MS 级)、乙腈(HPLC-MS 级),霍尼韦尔公司;无水硫酸镁、乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)粉、石墨化炭黑粉(GCB),购于美国安捷伦公司。17 种农药标准品,购自 Dr. 公司或农业部标准物质中心。标准物质见表 1。

1.1.2 主要仪器设备。6460 液相色谱串联质谱仪,美国安捷伦公司;3-18K 高速冷冻离心机,Sigma 公司;R-210 旋

基金项目 河南省科技攻关计划项目(152102110025)。
作者简介 郭保宝(1984—),男,河南洛阳人,助理农艺师,硕士,从事色谱分析研究。
收稿日期 2017-05-31

转蒸发仪,步琪公司;氮吹仪,上海安谱仪器公司。

表 1 标准物质
Table 1 List of standard materials

序号 No.	中文名称 Chinese name	英文名称 English name	生产厂家 Productor
1	甲胺磷	Methamidophos	农业部标准物质中心
2	氧乐果	Omethoate	Dr. 公司
3	久效磷	Monocrotophos	农业部标准物质中心
4	甲基硫环磷	Phosphfolan-methyl	Dr. 公司
5	吡虫啉	Imidacloprid	Dr. 公司
6	乐果	Dimethoate	Dr. 公司
7	硫环磷	Phosfolan	农业部标准物质中心
8	克百威	Carbofuran	农业部标准物质中心
9	内吸磷	DeMeton	农业部标准物质中心
10	苯线磷	Fenamiphos	Dr. 公司
11	腈菌唑	Myclobutanil	Dr. 公司
12	灭线磷	Ethoprop	Dr. 公司
13	马拉硫磷	Malathion	Dr. 公司
14	氯唑磷	Isazofos	Dr. 公司
15	治螟磷	Sulfotep	农业部标准物质中心
16	地虫硫磷	Fonofos	农业部标准物质中心
17	辛硫磷	Phoxim	Dr. 公司

1.2 标准溶液的配制 准确称取 10 mg(精确至 0.01 mg)固体标准物质于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液,−18 ℃ 保存。使用时根据需要用流动相初始比例配制成所需浓度的标准工作液,用于液相色谱及质谱条件优化。用空白样品基质溶液稀释标准工作液,制备基质匹配标准工作曲线。

1.3 样品前处理方法 称取 2 g(精确至 0.001 g)样品于 50 mL 聚乙烯离心管中,加入 2 mL 超纯水,20 mL 乙腈(含 1% 乙酸),涡旋混匀 5 min。加入 3 g 氯化钠和 2 g 无水硫酸镁,混匀 1 min,以 4 000 r/min 转速离心 5 min。取 15 mL 上清液,加入 100 mg PSA 粉、100 mg GCB 粉(视样品色泽而定)、100 mg 无水硫酸镁,涡旋混匀后,以 4 000 r/min 转速离心 5 min。取 10 mL 上清液,40 ℃ 氮吹至近干,用 1 mL 溶剂复溶后,过 0.22 μm 滤膜上机测试。

1.4 色谱条件 色谱柱:Agilent Poroshell 120 EC − C₁₈(2.7 μm,3.0 mm×100 mm);流动相:A 为 0.1% (V/V)甲酸水溶液,B 为乙腈,梯度洗脱程序见表 2;流速 0.3 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 5 μL。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Mobile phase composition for linear gradient elution			
时间 Time//min	体积分数配比 Volume ration//%		
	流动相 A Mobile phase A	流动相 B Mobile phase B	
0	95	5	
1.0	95	5	
3.0	50	50	
8.0	40	60	
10.0	20	80	
11.0	5	95	
15.0	5	95	
15.1	95	5	
18.0	95	5	

1.5 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子模式,多反应监测(MRM)扫描;干燥气温度 325 ℃,干燥气流速 6 L/min,雾化气压力 310.26 kPa,鞘气温度 350 ℃,鞘气流速 12 L/min;离子喷雾电压 4 000 V;采用分段模式采集:第 1 段为 0~5.5 min,第 2 段为 5.5~7.5 min,第 3 段为 7.5~9.7 min,第 4 段为 9.7~11.0 min,第 5 段为 11.0~13.0 min。定性离子、定量离子、碰撞能量和碎裂电压见表 3,17 种农药标准品的总离子流色谱图见图 1。黄瓜和苹果基质添加 20 μg/kg 混合标准溶液的总离子流色谱图分别见图 2、3。

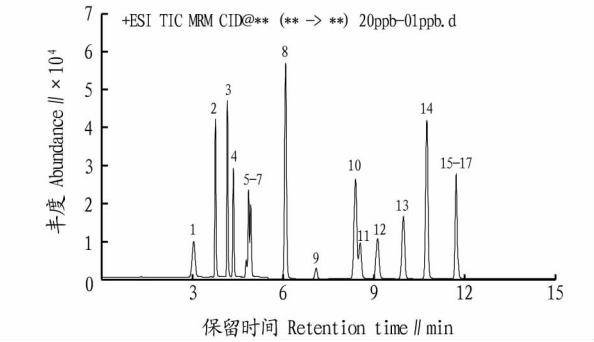
表 3 17 种目标物优化后的质谱条件参数

Table 3 Retention times and mass spectrometric parameters of 17 pesticides

序号 No.	化合物名称 Compound name	保留时间 Retention time//min	碰撞电压 Fragmentor V	母离子→子离子 Precursor ion→Product ion m/z	碰撞能量 Collision energy//eV
1	甲胺磷	3.081	80	142→94 [*]	15
				142→125	10
2	氧乐果	3.730	75	214.1→183 [*]	8
				214.1→155	12
3	久效磷	4.119	80	224→127 [*]	15
				224→193	5
4	甲基硫环磷	4.320	100	228→168 [*]	15
				228→109	30
5	吡虫啉	4.744	85	256→209 [*]	15
				256→175	15
6	乐果	4.821	75	230→171	15
				230→199 [*]	5
7	硫环磷	4.905	100	256→140 [*]	15
				256→228	20
8	克百威	6.075	80	222→165 [*]	10
				222→123	15
9	内吸磷	7.096	70	259→89 [*]	5
				259→61	35
10	苯线磷	8.402	110	304→217 [*]	15
				304→234	15
11	腈菌唑	8.564	115	289→70 [*]	20
				289→125	25
12	灭线磷	9.172	110	243→173 [*]	10
				243→215	10
13	马拉硫磷	10.018	80	331→99	15
				331→127 [*]	10
14	氯唑磷	10.783	100	314→120 [*]	30
				314→162	15
15	治螟磷	11.729	90	323→115	35
				323→171 [*]	15
16	地虫硫磷	11.763	85	247→109 [*]	20
				247→137	5
17	辛硫磷	11.792	75	299→77 [*]	25
				299→129	10

注: * 表示定量离子
Note: * indicates the quantitative ion

1.5.1 定性测定。在相同试验条件下进行样品测定时,如果样品中检出的色谱峰的保留时间与基质标准溶液中某种农药的色谱峰保留时间一致,并且在扣除背景后的样品质谱图中,所选择的离子均出现,并且所选择的离子丰度比与基

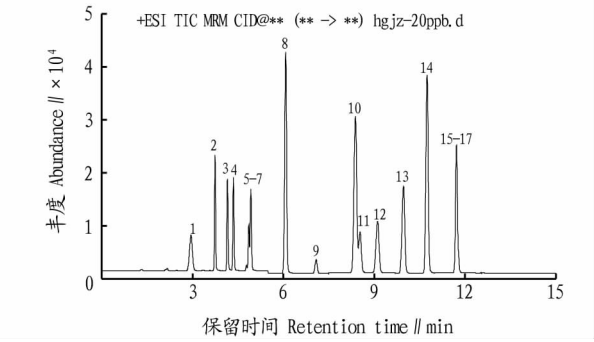


注:1. 甲胺磷;2. 氧乐果;3. 久效磷;4. 甲基硫环磷;5. 吡虫啉;6. 乐果;7. 硫环磷;8. 克百威;9. 内吸磷;10. 苯线磷;11. 腈菌唑;12. 灭线磷;13. 马拉硫磷;14. 氯唑磷;15. 治螟磷;16. 地虫硫磷;17. 辛硫磷

Note: 1. Methamidophos; 2. Omethoate; 3. Monocrotophos; 4. Phosphfolan-methyl; 5. Imidacloprid; 6. Dimethoate; 7. Phosfolan; 8. Carbofuran; 9. DeMeton; 10. Fenamiphos; 11. Myclobutanil; 12. Ethoprop; 13. Malathion; 14. Isazofos; 15. Sulfotep; 16. Fonofos; 17. Phoxim

图 1 17 种农药混合标准溶液(20 ng/mL)的总离子流色谱

Fig.1 TIC chromatogram of 17 kinds of pesticides standard at 20 ng/mL



注:1. 甲胺磷;2. 氧乐果;3. 久效磷;4. 甲基硫环磷;5. 吡虫啉;6. 乐果;7. 硫环磷;8. 克百威;9. 内吸磷;10. 苯线磷;11. 腈菌唑;12. 灭线磷;13. 马拉硫磷;14. 氯唑磷;15. 治螟磷;16. 地虫硫磷;17. 辛硫磷

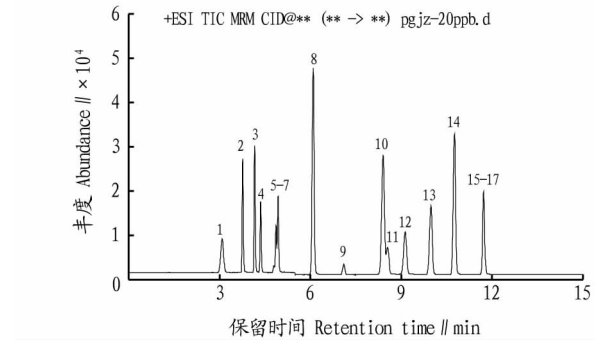
Note: 1. Methamidophos; 2. Omethoate; 3. Monocrotophos; 4. Phosphfolan-methyl; 5. Imidacloprid; 6. Dimethoate; 7. Phosfolan; 8. Carbofuran; 9. DeMeton; 10. Fenamiphos; 11. Myclobutanil; 12. Ethoprop; 13. Malathion; 14. Isazofos; 15. Sulfotep; 16. Fonofos; 17. Phoxim

图 2 添加混合标准溶液(20 μg/kg)的黄瓜样品中 17 种农药的总离子流色谱

Fig.2 TIC chromatogram of 17 kinds of pesticides standard at 20 μg/kg prepared in cucumber sample

质标准溶液的离子丰度比相一致(相对丰度 > 50%, 允许 ± 10% 偏差;相对丰度在 20% ~ 50%, 允许 ± 15% 偏差;相对丰度在 10% ~ 20%, 允许 ± 20% 偏差;相对丰度 ≤ 10%, 允许 ± 50% 偏差),就可判断样品中存在这种农药。

1.5.2 定量测定。采用外标-校准曲线定量测定。为减少基质的影响,采用基质匹配标准工作溶液,并且样品中农药的响应值在仪器的线性范围内。



注:1. 甲胺磷;2. 氧乐果;3. 久效磷;4. 甲基硫环磷;5. 吡虫啉;6. 乐果;7. 硫环磷;8. 克百威;9. 内吸磷;10. 苯线磷;11. 腈菌唑;12. 灭线磷;13. 马拉硫磷;14. 氯唑磷;15. 治螟磷;16. 地虫硫磷;17. 辛硫磷

Note: 1. Methamidophos; 2. Omethoate; 3. Monocrotophos; 4. Phosphfolan-methyl; 5. Imidacloprid; 6. Dimethoate; 7. Phosfolan; 8. Carbofuran; 9. DeMeton; 10. Fenamiphos; 11. Myclobutanil; 12. Ethoprop; 13. Malathion; 14. Isazofos; 15. Sulfotep; 16. Fonofos; 17. Phoxim

图 3 添加混合标准溶液(20 μg/kg)的苹果样品中 17 种农药的总离子流色谱

Fig 3 TIC chromatogram of 17 kinds of pesticides standard at 20 μg/kg prepared in apple sample

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择 该试验比较了采用乙腈和含 1% (体积比)乙酸的乙腈溶液对农药提取效率的影响。对 17 种农药在空白苹果基质中加标回收率进行比对,加标量为 20 μg/kg,结果见表 4。由表 4 可以看出,80% 的目标农药采用乙腈提取与含 1% 乙酸的乙腈溶液的提取效果相当,而甲胺磷和氧乐果采用 1% 乙酸的乙腈提取效率有所增强。综合分析,含 1% 乙酸的乙腈溶液更适合于果蔬样品中多种农药的提取,因此,选择含 1% 乙酸的乙腈溶液作为提取溶剂。

表 4 不同提取溶剂对 17 种农药添加回收率的比较

Table 4 Comparison of the recoveries of 17 kinds of pesticides by different extraction solvents

提取溶剂 Extracting solvent	回收率及满足要求农药个数 Recoveries and the number of pesticides required//个		
	< 70%	70% ~ 120%	> 120%
乙腈 Acetonitrile	7	10	0
1% 乙酸的乙腈 Acetonitrile containing 1% acetic acid	5	12	0

2.2 净化条件的优化 农药残留检测中常用的净化剂有 PSA 和 GCB。PSA 是一种固相吸附剂,在果蔬农残分析的前处理过程中被广泛应用,可以有效去除样品中的金属离子、有机酸等,对样品具有良好的净化作用,但是在去除色素、甾醇、维生素方面的效果不理想;而 GCB 在去除色素、甾醇、维生素等方面的能力较强,但由于其六元环结构会吸附对称结构及平面结构的农药,导致这些结构的农药的回收率降低,所以 GCB 的用量要依据样品色素含量决定,既起到净化作用,又不降低这类农药的回收率^[23-25]。

该试验将水果、蔬菜样品分为两大类:一类是色素含量

较少,提取液呈无色或颜色较浅,如苹果等;一类是色素含量较高,提取液颜色较深,如黄瓜等。通过试验发现,对于色素含量较少的样品,如苹果样品,净化过程中不加入 GCB 也可达到预期效果,不会对目标组分回收率产生影响。对于色素含量较高的样品,以黄瓜样品为例,只加入 PSA,净化效果不好,需加入 GCB 除去大量色素,进而提高回收率。因此,采用空白基质加标回收法进行比较,加标量为 10.0 $\mu\text{g/kg}$,分别考察了 GCB 用量为 20、50、100、200 mg 时对目标组分回收率的影响,结果见图 4。从图 4 可以看出,当 GCB 用量为 100 mg 时,17 种农药的平均回收率超过 80%,且提取液较澄清透明,所以选择 GCB 用量为 100 mg 对样品进行净化。

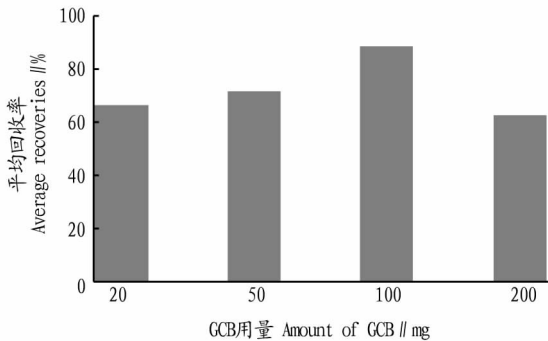


图 4 GCB 用量对 17 种农药平均回收率的影响
Fig. 4 Effect of the amount of GCB on the average recoveries of the 17 pesticides

2.3 基质效应的考察 基质效应是分析农药残留时必须要考虑的问题。由于果蔬基质复杂,经过前处理净化后不能完全除去杂质,基质中杂质和挥发性组分会影响电喷雾接口处目标化合物的离子化效率。这些挥发性的基质组分将雾滴吸引在一起,阻止其裂解成为更小的微滴。根据接口处化合物的离子化和离子蒸发过程中的变化状况,这种竞争可能会阻碍或者增强被分析物质离子的形成,也就是平时所说的基质效应^[26-30]。该试验采用基质标准溶液配制标准曲线,对检测结果进行校正。

该试验通过比对溶剂匹配标准溶液和基质匹配标准溶液的信号差异来考察基质效应。采用 20 ng/mL 的基质匹配标准溶液(苹果基质)与相同浓度溶剂配制标准溶液的峰面积比例差异来考察基质效应,结果见表 5 和图 5。由表 5 可知,17 种农药响应信号都表现出了基质抑制效应。因此该方法采用基质匹配标准溶液作校准曲线来校正基质效应。

表 5 17 种农药在苹果基质提取液中的基质效应
Table 5 Matrix effects of the 17 pesticides in the apple extract

序号 No.	基质效应比 Matrix effects ration	农药种数 The number of pesticides required
1	<0.7	6
2	0.7~1.0	11
3	1.0~1.2	0
4	>1.2	0

2.4 复溶溶剂的考察 一般而言,为了减少溶剂效应并获

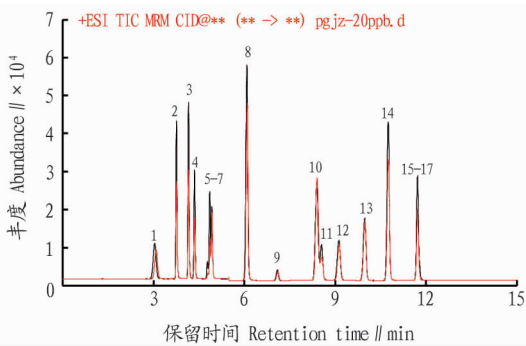


图 5 20 ng/mL 溶剂配标准溶液和基质匹配标准溶液对比
Fig. 5 Comparison of the solvent matched standard solution and matrix matched standard solution of 20 ng/mL

得较好的峰形,液相色谱检测样品前处理时所使用的样品复溶溶剂多为初始流动相或者体积比接近初始流动相的溶剂。试验过程中发现,采用初始流动相(5% 乙腈 + 95% 含 0.1% 甲酸水溶液)作为复溶溶剂时,部分农药峰形不好,且回收率低,影响样品检测。因此,考虑试验中测定的目标农药数目较多,极性差别较大,所以比较了 3 种不同比例的复溶溶剂对试验结果的影响,分别为 5% 乙腈 + 95% 含 0.1% 甲酸水溶液、50% 乙腈 + 50% 含 0.1% 甲酸水溶液、100% 乙腈。试验结果发现,当复溶溶剂选择 5% 乙腈 + 95% 含 0.1% 甲酸水溶液时,甲胺磷和氧乐果等极性较强、出峰时间较早的化合物峰形好,回收率高,而氯唑磷、马拉硫磷、灭线磷、腈菌唑、苯线磷、治螟磷、地虫硫磷和辛硫磷等保留时间靠后的化合物回收率低于 50%。当复溶溶剂选择 50% 乙腈 + 50% 含 0.1% 甲酸水溶液和 100% 乙腈时,对绝大多数目标农药复溶效果较好,回收率高且相对稳定,仅甲胺磷和氧乐果等极性较强的化合物出现溶剂效应,峰形变差且回收率低。原因可能是对于极性较强的化合物,如甲胺磷和氧化乐果等,其在高比例水相中溶解度较好,而在高比例有机相中溶解度变差,且出现溶剂效应,峰形变差、回收率低;极性较弱的化合物在高比例有机相中溶解度更好,回收率比较高且相对稳定。因此综合考虑,检测目标农药甲胺磷和氧乐果时选择复溶溶剂为 5% 乙腈 + 95% 含 0.1% 甲酸水溶液,剩余 15 种目标农药选择 50% 乙腈 + 50% 含 0.1% 甲酸水溶液作为复溶溶剂。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围、检出限和定量限。 分别采用黄瓜空白基质提取液和苹果空白基质提取液作为标准溶液的稀释液,配制 17 种农药的基质匹配校准曲线,在已优化好的液相色谱-质谱条件下进行测定。以各目标化合物的定量离子峰面积为纵坐标,以化合物浓度为横坐标,绘制校准曲线,以定量离子 3 倍信噪比确定方法检出限(LOD),以定量离子 10 倍信噪比确定方法定量限(LOQ),结果见表 6。由表 6 可以看出,17 种农药在 1 ~ 50 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,线性相关系数均大于 0.99。检出限均为 0.2 $\mu\text{g/kg}$,定量限均为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.5.2 回收率和精密度。 用阴性样品加标方法进行回收率和精密度试验。分别对苹果样品和黄瓜样品进行 3 个水平

表 6 17 种农药的线性范围、相关系数、检出限和定量限

Table 6 Linear ranges, correlation coefficients, LOD and LOQ of the 17 pesticides

序号 No.	化合物名称 Compound name	线性范围 Linear ranges//ng/mL		线性方程 linear equation		相关系数 Correlation coefficients		检出限 LOD μg/kg	定量限 LOQ μg/kg
		苹果基质 Apple sample	黄瓜基质 Cucumber sample	苹果基质 Apple sample	黄瓜基质 Cucumber sample	苹果基质 Apple sample	黄瓜基质 Cucumber sample		
1	甲胺磷	1~50	1~50	$y=1\ 918.596\ 0x-408.021\ 6$	$y=1\ 891.888\ 0x+1\ 193.943\ 5$	0.999 3	0.999 7	0.2	1.0
2	氧乐果	1~50	1~50	$y=1\ 788.606\ 4x+1\ 200.610\ 8$	$y=2\ 252.243\ 9x+3\ 734.230\ 4$	0.999 8	0.999 9	0.2	1.0
3	久效磷	1~50	1~50	$y=1\ 453.321\ 4x-443.580\ 1$	$y=2\ 134.603\ 0x+313.057\ 9$	0.999 2	0.999 6	0.2	1.0
4	甲基硫环磷	1~50	1~50	$y=2\ 987.491\ 5x+783.588\ 1$	$y=2\ 786.037\ 0x+593.461\ 0$	0.999 7	0.999 8	0.2	1.0
5	吡虫啉	1~50	1~50	$y=126.251\ 7x-46.949\ 6$	$y=193.425\ 1x+113.385\ 9$	0.999 9	1.000 0	0.2	1.0
6	乐果	1~50	1~50	$y=1\ 558.119\ 7x-29.496\ 6$	$y=2\ 141.326\ 4x+592.465\ 8$	1.000 0	1.000 0	0.2	1 <i>D</i>
7	硫环磷	1~50	1~50	$y=2\ 818.515\ 6x+1\ 697.604\ 7$	$y=3\ 186.865\ 7x+2\ 962.428\ 3$	0.999 7	0.999 8	0.2	1.0
8	克百威	1~50	1~50	$y=7\ 616.427\ 8x+2\ 445.266\ 9$	$y=9\ 498.316\ 6x+7\ 347.147\ 42$	0.999 9	1.000 0	0.2	1.0
9	内吸磷	1~50	1~50	$y=695.794\ 3x-108.114\ 3$	$y=790.156\ 2x-103.738\ 5$	0.999 8	0.999 9	0.2	1.0
10	苯线磷	1~50	1~50	$y=10\ 955.122\ 6x+8\ 797.796\ 0$	$y=8\ 790.379\ 7x+6\ 470.652\ 7$	0.999 4	0.999 7	0.2	1.0
11	腈菌唑	1~50	1~50	$y=2\ 354.465\ 7x-606.253\ 6$	$y=2\ 042.749\ 1x+885.309\ 4$	0.999 9	0.999 9	0.2	1.0
12	灭线磷	1~50	1~50	$y=3\ 366.159\ 0x+1\ 060.070\ 0$	$y=3\ 221.839\ 5x+1\ 087.383\ 9$	0.999 9	1.000 0	0.2	1.0
13	马拉硫磷	1~50	1~50	$y=4\ 957.412\ 0x+3\ 451.391\ 4$	$y=4\ 371.271\ 4x+3\ 030.325\ 0$	0.999 6	0.999 8	0.2	1.0
14	氯唑磷	1~50	1~50	$y=6\ 644.934\ 8x+4\ 206.703\ 8$	$y=5\ 075.538\ 4x+3\ 063.467\ 4$	0.999 7	0.999 9	0.2	1.0
15	治螟磷	1~50	1~50	$y=2\ 351.985\ 2x+3\ 344.147\ 8$	$y=1\ 718.975\ 5x+1\ 130.712\ 9$	0.999 7	0.999 8	0.2	1.0
16	地虫硫磷	1~50	1~50	$y=210.729\ 7x+327.923\ 9$	$y=92.574\ 1x+169.421\ 7$	0.997 5	0.998 7	0.2	1.0
17	辛硫磷	1~50	1~50	$y=191.779\ 1x+343.464\ 8$	$y=126.885\ 6x+86.894\ 9$	0.998 9	0.999 5	0.2	1.0

加标试验,加标浓度选择 LOQ、2LOQ、5LOQ,每个水平平行测定 6 次,计算平均回收率和相对标准偏差(RSD),结果见

表 7。在不同添加水平下,17 种农药回收率在 60.2%~117.7%,相对标准偏差小于 12.8%。

表 7 17 种农药的加标回收率和精密度($n=6$)

Table 7 Recoveries and RSDs of the 17 pesticides($n=6$)

序号 No.	化合物名称 Compound name	加标水平 Spiked concentration μg/kg	苹果基质 Apple sample		黄瓜基质 Cucumber sample	
			平均回收率 Average recoveries %	相对标准偏差 RSD %	平均回收率 Average recoveries %	相对标准偏差 RSD %
1	甲胺磷	1	71.2	3.8	63.2	5.2
		2	64.1	1.6	66.7	0.7
		5	67.5	1.8	67.3	2.8
2	氧乐果	1	66.9	6.3	61.3	5.2
		2	68.0	3.2	69.3	4.0
		5	71.5	2.5	86.9	7.2
3	久效磷	1	92.2	1.8	61.5	1.4
		2	84.2	1.8	74.5	1.7
		5	87.1	0.3	74.9	1.0
4	甲基硫环磷	1	81.5	1.9	68.0	1.7
		2	74.8	1.8	74.3	1.4
		5	78.9	4.2	67.3	1.6
5	吡虫啉	1	83.1	4.0	63.3	12.8
		2	56.3	3.7	72.4	6.1
		5	66.7	4.7	63.3	5.2
6	乐果	1	87.1	1.7	65.3	4.5
		2	65.3	1.5	67.2	2.0
		5	79.5	3.3	72.0	0.7
7	硫环磷	1	85.1	1.8	61.2	2.9
		2	72.4	1.4	66.9	0.7
		5	84.0	0.8	73.8	1.2
8	克百威	1	85.6	1.0	60.2	2.2
		2	73.8	1.3	63.2	0.9
		5	85.9	0.6	73.4	0.4

接下表

续表 7						
序号 No.	化合物名称 Compound name	加标水平 Spiked concentration μg/kg	苹果基质 Apple sample		黄瓜基质 Cucumber sample	
			平均回收率 Average recoveries %	相对标准偏差 RSD %	平均回收率 Average recoveries %	相对标准偏差 RSD %
9	内吸磷	1	60.0	2.0	86.9	2.0
		2	84.3	1.0	84.5	0.9
		5	75.4	1.3	82.0	0.4
10	苯线磷	1	73.7	2.1	62.9	1.2
		2	85.4	2.2	62.9	0.5
		5	81.7	3.0	64.8	1.6
11	腈菌唑	1	75.8	1.8	79.3	1.1
		2	68.3	2.0	73.1	0.9
		5	68.6	2.8	78.6	1.3
12	灭线磷	1	83.4	1.8	62.7	1.1
		2	78.7	1.5	69.0	0.7
		5	79.6	0.8	76.3	0.6
13	马拉硫磷	1	80.9	2.2	61.8	1.2
		2	97.6	1.1	74.5	0.5
		5	95.5	1.2	81.0	0.7
14	氯唑磷	1	93.8	2.8	71.0	2.2
		2	92.4	2.9	76.6	0.6
		5	105.7	0.4	84.2	0.8
15	治螟磷	1	74.8	8.5	69.4	3.6
		2	86.3	6.7	73.2	2.3
		5	85.8	2.3	70.6	1.8
16	地虫硫磷	1	81.6	6.4	60.7	3.1
		2	81.7	7.0	66.3	2.5
		5	99.4	1.8	68.5	1.9
17	辛硫磷	1	75.4	4.3	63.0	7.3
		2	97.2	5.3	69.5	3.3
		5	117.7	4.2	60.7	3.5

2.6 实际样品检测 应用该试验所建立的分析方法,对苹果、梨、生菜、豆角、胡萝卜 5 份样品进行检测,检出目标农药 1 批次。研究表明,该方法可用于果蔬中 17 种农药残留的同时检测。

3 结论

该试验采用 QuEChERS 净化技术与 HPLC - MS/MS 相结合,建立了一种快速、准确测定水果蔬菜中 17 种农药多残留分析方法。考察了不同的提取溶液、净化剂以及基质效应和复溶溶剂对回收率的影响。该方法简单、快速,具有良好的灵敏度、准确度,经方法学确认,适用于果蔬中多种农药残留的同时检测分析。

参考文献

[1] 郑宇鹏,夏英. 食品安全问题研究综述[J]. 中国食物与营养,2006(7): 15 - 17.

[2] 李珊. 食品安全问题研究[J]. 绿色科技,2012(3):207 - 208.

[3] 赵慧芹,张玉星,郭丽娟,等. 药残留现状、危害性及其研究进展[J]. 河北林果研究,2007,22(3):306 - 308.

[4] 朱琨,黄昆. 瓜果蔬菜中农药的残留研究[J]. 广州化工,2013,41(13): 164 - 166.

[5] MUCCIO A D, FIDENTE P, BARBINI D A, et al. Application of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables[J]. Journal of chromatography A, 2006, 1108(1): 1 - 6.

[6] 陈师安. 固相萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定花生中 10 种农药残留[J]. 福建分析测试, 2012, 21(1): 8 - 11.

[7] SIMPLÍCIO A L, BOAS L V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and

fruit juice[J]. Journal of chromatography A, 1999, 833(1): 35 - 42.

[8] BELTRAN J, LOPEZ F J, HERNANDEZ F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis [J]. Journal of chromatography A, 2000, 885(1/2): 389 - 404.

[9] 刘咏梅,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.

[10] 缪琪. 凝胶渗透色谱法在果蔬农残分析中的应用[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2007.

[11] 冯婷,胡玉斐,李攻科. 分子印迹整体柱在样品前处理及色谱分析中的应用[J]. 分析测试学报, 2011, 30(10): 1191 - 1198.

[12] 王芳,李道敏,李兆周,等. 分子印迹技术在食品药品分析检测中的应用[J]. 核农学报, 2015, 29(7): 1358 - 1365.

[13] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and ‘dispersives olid-phase extraction’ for the determination of pesticide residues in produce[J]. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412 - 413.

[14] 胡西洲,程运斌,胡定金. 农药多残留分析中 QuEChERS 方法介绍[J]. 现代农药, 2006, 5(4): 24 - 29, 44.

[15] 林立毅,杨黎忠,严丽娟,等. QuEChERS-TOF-MS/MS 检测食品农产品中残留的未知农药[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(3): 899 - 904.

[16] NGUYEN T D, YU J E, LEE D M, et al. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry[J]. Food chemsitr, 2008, 110(1): 207 - 213.

[17] 李春艳. QuEChERS 法 - 色质联用技术在农药残留检测应用中的研究[D]. 西安:西安理工大学, 2010.

[18] 张文成,宫洪景. 果蔬中农药残留快速检测法研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 752 - 755.

[19] 李海飞,聂继云,李静,等. QuEChERS 方法联合高效液相色谱法测定水果中 5 种农药残留研究[J]. 中国果树, 2015(4): 58 - 60.

导,明显提高了湖羊的产羔率。管峰等^[21]对湖羊的 *BMPR-IB* 基因进行多态性检测发现,该湖羊群体中只检测出 *BB* 基因,因而在湖羊中的基因效应完全一致,所以认为 *BMPR-IB* 基因不是湖羊多胎的主效基因,对该湖羊群体进行选育后仍

然可以提高其产羔率。闫亚东等^[19]认为湖羊 *BMPR-IB* 基因与其他单胎品种差异显著,所以 *BMPR-IB* 基因是导致湖羊多胎性状的主效基因。

表 1 湖羊不同 *BMPR-IB* 基因型频率与产羔数

Table 1 The genotype frequency and litter size of different *BMPR-IB* genotypes of Hu Sheep

<i>BMPR-IB</i> 基因型 <i>BMPR-IB</i> genotype	样本数 Sample size	基因型频率 Genotype frequency	产羔数 Litter size		
			第 1 胎 The first parity	第 2 胎 The second parity	平均值 Mean
AA	2	0.006	1.000 ± 0.000 c	1.500 ± 0.500 b	1.250 ± 0.250 b
AG	18	0.053	1.667 ± 0.140 b	1.944 ± 0.189 a	1.810 ± 0.100 a
GG	322	0.941	1.875 ± 0.040 a	2.062 ± 0.761 a	1.960 ± 0.030 a

注:同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)
Note: Different small letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$)

该试验的样本数为 342 个,将全部样本送交无锡冀和运用生物技术有限公司测序鉴定基因型,结果发现 AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 0.006、0.053 和 0.941。对 *BMPR-IB* 与湖羊产羔数的关系进行了分析,结果发现 AA、AG 和 GG 基因型之间的产羔数存在显著差异,这与吴丽丽等^[22]的研究结果相一致,但与管峰等^[21]的研究结果不一致,这可能是由于参照对象不同。该试验结果表明,*BMPR-IB* 基因可能是湖羊多胎性能的主效基因,可用于对湖羊产羔数的选择。

参考文献

[1] 贾建磊,张利平,丁强,等. 绵羊 *BMPR-IB* 基因第 7 外显子多态性与产羔性状的相关性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016,44(1):7-13.

[2] 杨燕燕. 影响蒙古羊双羔群体繁殖性状候选基因的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.

[3] 殷子惠. 绵羊骨形态发生蛋白受体 *IB Q249R* 突变的检测及其对小尾寒羊产羔数的效应分析[D]. 泰安:山东农业大学,2005.

[4] 史洪才,武坚. 我国对湖羊和小尾寒羊多胎基因的研究[J]. 草食家畜, 2004(4):14-16.

[5] 贾存灵. 小尾寒羊多胎性状主要候选基因及繁殖相关基因表达量研究[D]. 北京:中国农业大学,2005.

[6] 杨华,张永胜,何其宏,等. 中国美利奴羊多胎品系选育中多胎性状分离与 *BMPR-IB* 基因型的相关性分析[J]. 中国草食动物科学,2009,29(1):16-18.

[7] GALLOWAY S M, MCNATTY K P, CAMBRIDGE L M, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner[J]. Nature genetics, 2000, 25(3):279-283.

[8] LAN Z J, GU P, XU X, et al. *GCNF*-dependent repression of *BMP-15* and *GDF-9* mediates gamete regulation of female fertility[J]. Embo journal, 2003,22(16):4070-4081.

[9] LAWSON K A, DUNN N R, ROELEN B A, et al. *Bmp4* is required for the

generation of primordial germ cells in the mouse embryo[J]. Genes & development, 1999,13(4):424-436.

[10] 桑林华,储明星,王金玉,等. 绵羊高繁殖力候选基因 *BMPR-IA* 的研究[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(9):852-857.

[11] 刘昌乙,李晓勇,王纯. 骨形态发生蛋白研究的某些进展[J]. 成都体育学院学报,1995(1):81-85.

[12] 王启贵,钟发刚,李辉,等. 绵羊 *BMPR-IB* 基因多态性与其产羔数的相关研究[J]. 草食家畜,2003(2):20-23.

[13] 朱二勇,史洪才,武坚,等. *BMPR-IB* 基因作为绵羊多胎性能候选基因的研究[J]. 西北农业学报,2006,15(6):20-23.

[14] WILSON T, WU X Y, JUENGEL J L, et al. Highly prolific booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein *IB* receptor (*ALK-6*) that is expressed in both oocytes and granulosa cells[J]. Biology of reproduction, 2001,64(4):1225-1235.

[15] 葛燕,张家骅. 骨形态发生蛋白在动物繁殖上的研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(6):33-37.

[16] SOUZA C J, MACDOUGALL C, MACDOUGALL C, et al. The booroola (*FecB*) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 *B* (*BMPRI1B*) gene[J]. Journal of endocrinology, 2001, 169(2):1-6.

[17] MULSANT P, LECERF F, FABRE S, et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-*IB* is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérimo ewes[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2001,98(9):5104-5109.

[18] 田秀娥,孙红霞,王永军. 3 个绵羊群体 *INHA* 基因的遗传多态性及对产羔数的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010,38(1):23-29.

[19] 闫亚东,储明星,曾勇庆,等. 小尾寒羊和湖羊高繁殖力候选基因 *BM-PR-IB* 的研究[J]. 农业生物技术学报,2005,13(1):66-71.

[20] 王生宝,张英杰,刘月琴,等. 不同绵羊品种 *BMPR-IB* 基因多态性与产羔数的关系研究[J]. 湖南农业科学,2009(12):8-10.

[21] 管峰,艾君涛,刘守仁,等. *BMPR-IB* 和 *BMP15* 基因作为湖羊多胎性候选基因的研究[J]. 家畜生态学报,2005,26(3):9-12.

[22] 吴丽丽,赵晓枫,张立凡,等. 湖羊 *BMPR-IB*、*BMP15* 和 *GDF9* 基因的 *RFLP* 分析[J]. 中国草食动物科学,2011,31(4):9-12.

(上接第 92 页)

[20] 聂鲲,赵建庄. *QuEChERS*-气相色谱法同时测定水果中多种农药残留量[J]. 江西农业大学学报,2016,38(6):1174-1183.

[21] 李云飞,彭云霞,张承聪. 气相色谱-质谱联用仪测定果蔬中 12 种农药残留量[J]. 云南大学学报(自然科学版),2004(S1):176-180.

[22] 吴岩,姜冰,徐义刚,等. *QuEChERS*-液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中 16 种农药残留[J]. 色谱,2015,33(3):228-234.

[23] 李蓉,储大可,张朋杰,等. *QuEChERS*/HPLC-MS/MS 法测定黄瓜、菜心、葡萄、香蕉中 127 种农药残留[J]. 分析测试学报,2015,34(5):502-511.

[24] 宋淑玲,李重九,马晓东,等. 蔬菜中残留农药的石墨化碳黑净化和气相色谱-质谱检测方法[J]. 分析化学,2008,36(11):1526-1530.

[25] KOESUKWIWAT U, LEHOTAY S J, MIAO S, et al. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using *QuEChERS* and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal

of chromatography A, 2010,1217(43):6692-6703.

[26] 周莉,王新全,徐浩,等. 液相色谱-串联质谱法测定叶菜类蔬菜中 16 种农药的基质效应研究[J]. 理化检验(化学分册), 2011,47(12):1398-1401.

[27] VAN EECKHAUT A, LANCKMANS K, SARRE S, et al. Validation of bio-analytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009,877(23):2198-2207.

[28] 刘进玺,秦珊珊,冯书惠,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食用菌中农药多残留的基质效应[J]. 食品科学,2016,37(18):171-177.

[29] 苏萌,艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(2):511-515.

[30] AMATE F C, UNTERLUUGAUER H, FISCHER J R, et al. Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(1):93-97.