

基于 QuEChERS-超临界流体色谱-串联质谱法的茶叶中甲胺磷及乙酰甲胺磷对映体拆分及定量

王丽 (北京市食品检验研究院(北京市食品安全监控和风险评估中心), 北京 100094)

摘要 采用 QuEChERS 法提取, 在以 Chiral-Pak IC-3 为色谱柱的超临界流体色谱上拆分, 大气压化学电离后串联四极杆质谱法测定。结果表明, 茶叶中 (+)-甲胺磷、(+)-乙酰甲胺磷的检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均回收率为 70.53%~110.61%, 相对标准偏差(RSD)为 2.92%~13.30%。该方法能够有效拆分和定量甲胺磷和乙酰甲胺磷对映异构体。

关键词 QuEChERS; 超临界流体色谱-串联质谱; 茶叶; 甲胺磷; 乙酰甲胺磷; 对映异构体

中图分类号 TS 272 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)11-0156-07

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.11.038



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Separation and Quantification of Methamidophos and Acephate Enantiomer in Tea Based on QuEChERS-Supercritical Fluid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WANG Li (Beijing Institute of Food Inspection and Research (Beijing Food Safety Monitoring and Risk Assessment Center), Beijing 100094)

Abstract Extraction was performed by QuEChERS method, separated on supercritical fluid chromatography using Chiral Pak IC-3 as the chromatographic column, and determined by atmospheric pressure chemical ionization followed by tandem quadrupole mass spectrometry. The result showed that the detection limit of (+)-methamidophos and (+)-acephate in tea was 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the limit of quantification was 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries were 70.53%~110.61% and RSD were 2.92%~13.30%. This method can effectively separate and quantify methamidophos and acephate enantiomer.

Key words QuEChERS; Supercritical fluids chromatography-tandem mass spectrometry; Tea; Methamidophos; Acephate; Enantiomer

手性是指物质本身立体空间结构左右对称呈镜像, 如同人的左右手, 相似却不能重叠, 是自然界本质属性之一^[1]。受生产技术、成本及实际使用等条件的约束, 目前世界上有近 25% 的商用农药具有对映异构体^[1], 而在我国这一比例估计超过 40%^[2]。在农药中手性对映异构体常表现出不同的生物活性, 一种对映体具有高靶标活性的同时, 另一种可能是低效或无效的。另一方面多数手性农药其中一个对映体比其外消旋体显示出更强的急性毒性, 且与其余对映体的急性毒性存在显著差异^[3]。如腈菌唑的 (+)-对映体的抗菌活性是 (-)-对映体的 1.79~1.96 倍, 同时其毒性也更大^[4]; 多效唑的杀菌活性 (2R, 3R)-(+)-对映体高于 (2S, 3S)-(-)-对映体, 但对植物生长调节活性则恰好相反; 不同锐劲特的对映体在网纹水蚤体内所表现出的急性毒性^[5] 和生殖毒性^[6] 也不同。目前, 为保护环境和人体健康, 很多国家和地区立法限定外消旋农药的使用, 要求必须使用具有正向活性的单一异构体, 减少低活性异构体的使用^[7-8]。

甲胺磷和乙酰甲胺磷是高效的有机磷杀虫剂, 其分子结构中均包含 1 个磷原子手性中心, 分别有 2 个对映异构体。根据 Bertolazzi 等^[9] 的研究, (+)-甲胺磷具有潜在的神经毒性, 而 (-)-甲胺磷则无法引起神经损伤。乙酰甲胺磷、甲胺磷的 (+)-对映体对家蝇的毒性较 (-)-对映体更大^[10]。 (+)-甲胺磷对大型蚤的毒性是 (-)-甲胺磷的 7 倍, 而在体外牛细胞试验中, (-)-甲胺磷对乙酰胆碱酯酶的抑制作用比 (+)-甲胺磷强 8.0~12.4 倍^[11]。由于甲胺磷毒性强烈, 2008 年我国就停止对其生产使用, 而乙酰甲胺磷虽可使用,

但在植物体内会转化成甲胺磷^[12]。在我国现行有效的食品中农药残留限量标准中, 甲胺磷、乙酰甲胺磷在茶叶中的最大残留限量均为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 但标准仅针对外消旋体含量制定, 因此, 研究毒性不同的对映体的识别和定量分析技术, 有利于更科学地评估其使用过程中的安全性。

近年来, 手性农药的拆分及定量分析技术逐渐发展, 伴随手性固定相的不断开发, 包括液相色谱^[13-15]、气相色谱^[16-17]、毛细管电泳^[18] 等分离技术被运用在手性化合物拆分工作中, 有报道使用手性液相色谱^[19] 和气质联用法^[20] 对甲胺磷或乙酰甲胺磷进行了对映体拆分。超临界流体色谱作为一种新型的分离方法, 在手性化合物拆分上有独特的优势^[21-22], 目前, 已在包括有机磷类^[23]、拟除虫菊酯类^[24]、砒亚胺类^[25-26]、三唑类^[27-28]、苯氧羧酸类^[29] 等手性农药的对映体拆分中得到了应用, 但鲜见采用超临界流体色谱对甲胺磷或乙酰甲胺磷进行对映体拆分的相关报道。该研究建立了基于 QuEChERS 前处理技术、超临界流体色谱(SFC)分离、串联质谱法检测的茶叶中甲胺磷、乙酰甲胺磷对映体拆分及定量检测的技术方法, 以期对映体活性研究奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 试剂药品 甲胺磷外消旋体 (CAS10265-92-6, 纯度 99%), 购自德国 Dr. Erenstofer 公司; 乙酰甲胺磷外消旋体 (CAS30560-19-1, 纯度 98%), 购自美国 USP 公司; 甲醇、异丙醇、乙腈、乙醇和甲酸均为色谱纯, 购自美国 thermo Fisher 公司; 二氧化碳 (纯度 99.99%)、高纯氮 (纯度 $\geq 99.999\%$)、高纯氩 (纯度 $\geq 99.999\%$), 购自北京亚南气体公司; QuEChERS 试剂包, 购于美国安捷伦科技; 试验用水来自 Milli-Q 纯化水系统, 电阻率 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

1.2 仪器设备 岛津超临界色谱-串联质谱仪 (Nexera

UC),配有 LC-30ADSF 二氧化碳输送泵、LC-20ADXR 四元溶剂输送泵、SFC-30A 背压调节单元、SIL-30AC 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱、CBM-20A 系统控制器,购自日本岛津公司。LCMS-8050 三重四极杆质谱仪,配有大气压化学电离源,使用高纯氮气作雾化气和干燥气,高纯氦气为碰撞气,购自日本岛津公司。操作软件为岛津 Labsolution v. 5. 82 SP1。Thermo X1R 高速冷冻离心机,购自美国赛默飞世尔科技。水平振荡器,购自德国 IKA 公司。旋转蒸发器,购自日本东京理化株式会社。

1.3 色谱条件 色谱柱为 Daicel Chiral-pak IC-3 SFC 柱(3.0 mm×150 mm, 3 μm);流动相 A 为超临界二氧化碳, B 为异丙醇;梯度洗脱:0~4.0 min 10%~42% B, 4.0~6.0 min 42% B, 6.0~6.5 min 42%~10% B, 6.5~10.0 min 10% B;流速 2 mL/min,柱温 20 ℃;背压 10 MPa,进样体积 1 μL,自动进样器温度 10 ℃,洗针溶液为乙腈。

1.4 质谱条件 甲胺磷对映体的质谱参数为母离子 142.0 (m/z), Q1 预四级杆电压-12 V,子离子 94.2/125.2 (m/z), Q3 预四级杆电压-15/-20 V,碰撞能量-15/-18 eV;乙酰甲胺磷对映体的质谱参数为母离子 183.7 (m/z), Q1 预四级杆电压-14 V,子离子 143.2/125.2 (m/z), Q3 预四级杆电压-25/-20 V,碰撞能量-11/-18 eV;添加剂为 1% (V:V) 甲酸甲醇溶液,以流速 0.2 mL/min 在进入质谱前与色谱馏出液混合。采用大气压化学电离源,正离子模式,多反应监测模式采集。离子驻留时间 50 ms,雾化气流速 3 L/min,干燥气流速 5 L/min,碰撞气压力 270 kPa,离子传输管温度 150 ℃,加热模块温度 200 ℃,接口温度 300 ℃。

1.5 标准溶液的配制 准确称取甲胺磷、乙酰甲胺磷外消旋体各 10.0 mg 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,得到浓度为 10 mg/mL 的外消旋体溶液。由于外消旋体为摩尔比 1:1 的对映体混合物,因此在溶液中(+)-甲胺磷、(-)-甲胺磷、(+)-乙酰甲胺磷和(-)-乙酰甲胺磷的浓度均为 5 mg/mL。使用前根据需要用异丙醇稀释。

1.6 样品前处理 茶叶样品均购自本地市场,并保存于干燥通风的室温环境中。样品经粉碎后,称取 2.0 g,置于 50 mL 旋盖离心管中,加入 20 mL 水充分浸润 2 h 以上,加入 20 mL 乙腈、4 g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠和 0.5 g 倍半水合柠檬酸氢二钠,剧烈振荡 1 min,在水平振荡器上以 300 r/min 的转速振荡 15 min 以混合均匀。8 000 r/min 离心 10 min,取 12 mL 上层清液,置于含 1 200 mg MgSO₄、400 mg C₁₈、400 mg N-丙基乙二胺(PSA)、45 mg 石墨化炭黑(GCB)的净化管中,涡旋振荡 5 min,取 10 mL 上清液,于 40 ℃ 下旋蒸至近干,加入 1.0 mL 异丙醇溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,上机测定。

2 结果与分析

2.1 对映体拆分条件的优化 保留因子(k_1 、 k_2)、分离因子(α)及分离度(R_s)均用来评价不同色谱条件下对映体拆分的效果。若需要在色谱系统上达到良好的分离度 R_s ,则需要评估所选用色谱系统中目标化合物的 k_1 、 k_2 值及 α 值,其中

k_1 、 k_2 值更多与色谱系统的固定相、流动相及温度等条件相关。因此在对映体拆分的优化过程中,对固定相、流动相(改性剂)的选择以及有可能影响化合物色谱保留的 SFC 背压和柱温条件进行研究。

选择了 Chiral-pak IC-3[3.0 mm×150 mm, 3 μm, 固定相纤维素-三(3,5-二氯苯基氨基甲酸酯), Daicel]、Chiral-pak AD-H[4.6 mm×250 mm, 5 μm, 固定相直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯), Daicel]、Chiral-pak ID-3(3.0 mm×150 mm, 3 μm, 固定相直链淀粉-3-氯苯基氨基甲酸酯, Daicel) 3 款手性色谱柱及一款常规反相色谱柱 CAPCELL PAK MGIII C₁₈(2.0 mm×150 mm, 3 μm, 固定相 C₁₈, Shiseido) 作为对比。流动相总流速设置为 2 mL/min,分别使用甲醇、乙腈、异丙醇、乙醇作为改性剂,改性剂梯度比例根据不同色谱柱进行调整以达到合适的保留时间(1.5~6.5 min)。对比了甲胺磷对映体和乙酰甲胺磷对映体在相应色谱条件下的分离度 R_s 。

表 1 为各柱在不同改性剂条件下的保留因子、分离因子及分离度。在常规反相柱(MGIII)上,使用甲醇、乙醇和乙腈作为改性剂时化合物在柱上无保留,且在部分改性剂(异丙醇)条件下甲胺磷和乙酰甲胺磷的对映体不能有效分离($R_s < 1$)。在使用手性固定相的情况下,在以直链淀粉-3-氯苯基氨基甲酸酯为固定相的 ID-3 柱以及以直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)为固定相的 AD-H 柱上,甲胺磷对映体均不能有效分离。在 IC-3 柱上使用甲醇、乙醇作为改性剂时,乙酰甲胺磷对映体也不能得到分离,对比使用乙腈和异丙醇的情况(图 1),在乙腈作为改性剂时,色谱基线较高,杂质峰明显,虽分离度比使用异丙醇时略有提高,但依然不能达到后续工作的要求;在异丙醇作为改性剂时,两对映体达到有效分离, R_s 均不低于 1.5,同时基线平稳,无明显干扰峰。因此,选择 IC-3 手性柱作为分离介质,异丙醇作为 SFC 改性剂。

在确定了色谱固定相和流动相之后,对同样能够影响色谱保留时间的 SFC 背压及柱温也进行了优化,二者在 SFC 色谱中对超临界二氧化碳(scCO₂)的状态起关键作用,进而影响目标物质的保留和选择性。该研究对比了不同背压压力(10、12、15 MPa)及不同柱温(15、20、30、40、50 ℃)的组合对保留和分离的影响。从表 2 可以看出,在不同背压条件下,不论柱温如何,目标对映体的保留时间变化不明显,同时分离度也没有改变。另一方面,对比不同柱温发现,随着柱温的下降,乙酰甲胺磷对映体的分离度不断增加,在 20 ℃ 时,分离度达到 4.0,柱温继续下降至 15 ℃,分离度不再增加。这可能是由于二氧化碳的超临界点为 31.1 ℃、7.29 MPa,在 SFC 系统中,若柱温低于 31 ℃,柱内 CO₂ 是以液态存在,对目标化合物的溶解度下降,此时,对对映体的选择性主要依靠异丙醇与固定相的相互作用,因此分离度增加,在 20 ℃ 以下,柱内 CO₂ 已经达到稳定的液态状态,此时,CO₂ 仅作为流动相载体存在,不具有任何色谱洗脱能力,因此温度继续下降,对映体的保留时间和分离度也不再改变;当柱温高于 31 ℃ 时,柱内 CO₂ 以超临界流体的状态存在,对

表 1 不同色谱柱、改性剂条件下化合物的分离参数

Table 1 Separation parameters of compounds under different chromatographic columns and modifier conditions

色谱柱 Chromatographic column	改性剂 Modifier	甲胺磷对映体 Methamidophos enantiomer				乙酰甲胺磷对映体 Acephate enantiomer			
		k_1	k_2	α	R_s	k_1	k_2	α	R_s
AD-H	甲醇	16.38	16.73	1.02	0.96	14.96	17.25	1.15	5.37
	乙醇	17.35	17.49	1.01	0.41	15.58	15.85	1.02	3.76
	异丙醇	16.74	16.74	1.00	—	14.27	14.66	1.03	1.25
	乙腈	未出峰	未出峰	—	—	未出峰	未出峰	—	—
IC-3	甲醇	7.94	8.41	1.06	1.55	7.81	7.81	1.00	—
	乙醇	10.33	11.10	1.07	2.23	9.78	9.78	1.00	—
	异丙醇	15.98	17.10	1.07	1.87	16.09	18.57	1.15	3.61
	乙腈	22.65	23.45	1.04	1.62	18.91	21.24	1.12	4.93
ID-3	甲醇	5.04	5.04	1.00	—	5.10	5.74	1.12	1.30
	乙醇	5.70	5.70	1.00	—	5.11	5.72	1.12	1.15
	异丙醇	8.38	8.38	1.00	—	7.68	7.97	1.04	1.01
	乙腈	17.08	17.08	1.00	—	14.57	16.22	1.11	3.73
MGⅢ	甲醇	0	0	—	—	0	0	—	—
	乙醇	0	0	—	—	0	0	—	—
	异丙醇	2.93	2.93	1.00	—	2.93	2.93	1.00	—
	乙腈	0	0	—	—	0	0	—	—

注：“未出峰”表示化合物在该条件下无法洗脱；“—”表示无法计算。

Note: “No peak” indicates that the compound cannot be eluted under this condition; “—” indicates that it cannot be calculated.

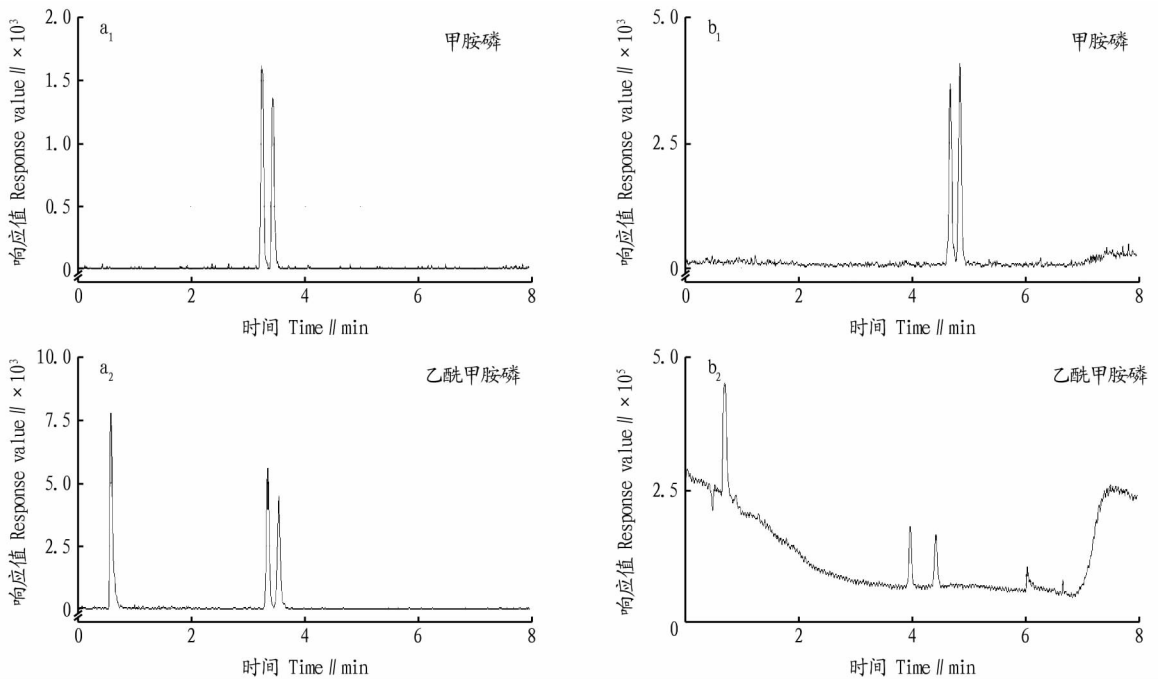


图 1 IC-3 柱使用异丙醇 (a) 和乙腈 (b) 改性剂的谱图对比

Fig. 1 Comparison of spectra of IC-3 column using isopropanol (a) and acetonitrile (b) modifiers

表 2 不同背压和柱温对化合物保留时间及分离度的影响

Table 2 Effects of different backpressure and column temperature on the retention time and resolution of compounds

柱温 Column temperature/ $^{\circ}\text{C}$	对映体 化合物 Enantiomer compound	10 MPa		12 MPa		15 MPa	
		保留时间 Retention time//min	分离度 Resolution	保留时间 Retention time//min	分离度 Resolution	保留时间 Retention time//min	分离度 Resolution
15	甲胺磷	(+)3.287/(-)3.537	1.938	(+)3.441/(-)3.673	1.854	(+)3.455/(-)3.681	1.903
	乙酰甲胺磷	(+)3.255/(-)3.804	4.003	(+)3.422/(-)3.996	3.866	(+)3.436/(-)4.017	3.954
20	甲胺磷	(+)3.451/(-)3.677	1.954	(+)3.461/(-)3.697	1.987	(+)3.461/(-)3.703	2.025
	乙酰甲胺磷	(+)3.444/(-)4.008	3.995	(+)3.460/(-)4.030	4.075	(+)3.458/(-)4.033	4.152
30	甲胺磷	(+)3.327/(-)3.532	2.011	(+)3.296/(-)3.505	2.084	(+)3.278/(-)3.486	2.119
	乙酰甲胺磷	(+)3.386/(-)3.711	2.903	(+)3.358/(-)3.664	2.968	(+)3.309/(-)3.611	2.806
40	甲胺磷	(+)3.465/(-)3.465	2.093	(+)3.244/(-)3.436	2.074	(+)3.214/(-)3.405	2.077
	乙酰甲胺磷	(+)3.372/(-)3.578	2.033	(+)3.332/(-)3.523	2.035	(+)3.286/(-)3.477	2.206
50	甲胺磷	(+)3.414/(-)3.434	2.086	(+)3.202/(-)3.373	2.086	(+)3.166/(-)3.344	2.163
	乙酰甲胺磷	(+)3.362/(-)3.477	1.325	(+)3.309/(-)3.411	1.200	(+)3.266/(-)3.354	1.129

甲胺磷和乙酰甲胺磷的溶解度增加,流动相对目标化合物的洗脱能力增强,出峰加快,导致保留时间提前,分离度降低。

2.2 对映体洗脱顺序的确定 确定了色谱条件后,使用柱后接收的方式,利用标准品进样,制备得到了浓度大于 1 μg/mL 的单体化合物样品,并使用在线旋光检测器对其旋光度进行分析,判断每个洗脱峰的手性构型。在 SFC 系统中,在同一离子通道中,对映异构体的洗脱顺序为(+)-甲胺磷早于(-)-甲胺磷,(+)-乙酰甲胺磷早于(-)-乙酰甲胺磷。

2.3 质谱条件的优化 在电离源的选择上,对比了使用电喷雾电离源和大气压化学电离源时目标化合物的响应情况,结果如图 2 所示,可见两对对映体在 APCI 源电离下响应均明显高于 ESI 源。为了提高目标对映体在质谱内的响应,同时又不影响 SFC 的色谱分离效果,采用了柱后补偿的方式,加入一定量的添加剂,以促进目标化合物电离,增强响应。由于甲胺磷和乙酰甲胺磷均包含有含 N 基团,在源内易形成正离子,故对比了不同酸性浓度的添加剂对目标物质谱响应的影响。在 0.2 mL/min 的流速下,在柱后分别添加 0.1%、0.5%、1.0%、2.0% 的甲酸甲醇溶液,从图 3~4 可以看出,随着甲酸甲醇溶液浓度升高,对映体的质谱信号呈上升趋势,在 1.0% 时达到最大值,之后,酸度继续提高,对质谱信号的增强效果不明显。

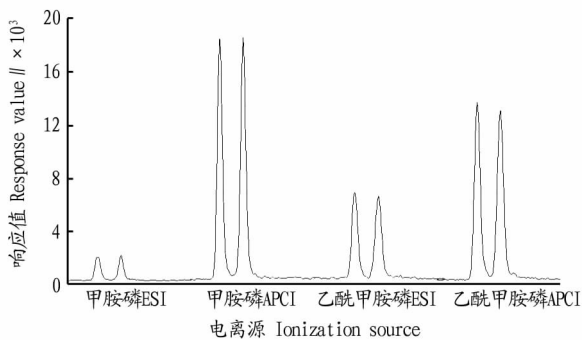


图 2 不同电离源对甲胺磷和乙酰甲胺磷定量离子响应的影响
Fig.2 Effect of different ionization sources on the quantitative ion response of methamidophos and acephate

表 3 不同离子源温度参数下各化合物定量离子的响应峰面积 (n=3)

Table 3 Response peak area of quantitative ions for various compounds under different ion source temperature parameters

离子传输管温度 Ion transfer tube temperature//℃	加热模块温度 Heating module temperature//℃	接口温度 Interface temperature//℃	(+)-甲胺磷 (+) - methamidophos	(-)-甲胺磷 (-) - Methamidophos	(+)-乙酰甲胺磷 (+) - acephate	(-)-乙酰甲胺磷 (-) - Acephate
150	150	300	29 679*	23 779	27 664*	22 568
150	150	350	17 072	26 653	17 955	27 360*
150	150	400	12 110	18 687	13 039	17 446
150	200	300	22 208*	27 775*	21 655*	26 064*
150	200	350	13 430	21 032	13 582	20 017
150	200	400	11 192	17 523	11 619	16 733
150	250	300	18 943	24 362	17 474	23 732
150	250	350	10 767	19 514	10 767	17 749
150	250	400	9 752	16 257	9 814	15 775
200	150	300	23 597*	23 394	21 872*	21 791
200	150	350	16 071	27 783*	16 484	23 724

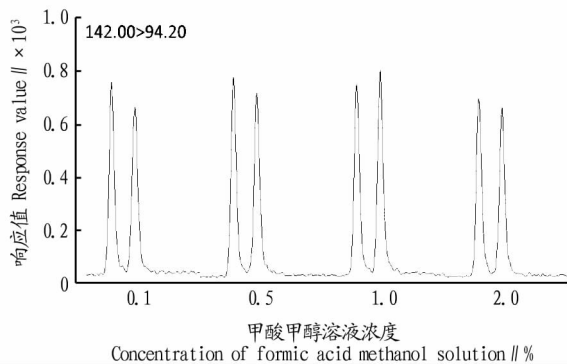


图 3 不同添加剂对甲胺磷定量离子响应的影响

Fig.3 Effect of different additives on quantitative ion response of methamidophos

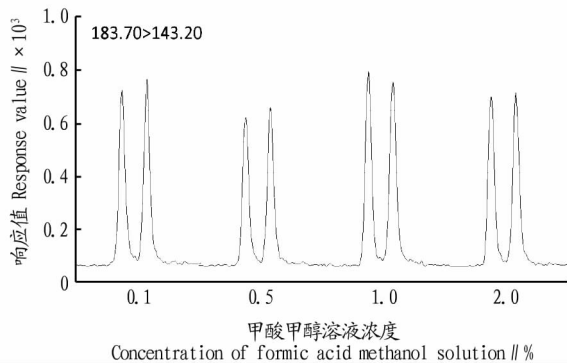


图 4 不同添加剂对乙酰甲胺磷定量离子响应的影响

Fig.4 Effect of different additives on quantitative ion response of acephate

使用单针进样的方式对接口温度、离子传输管温度和加热模块温度进行 3 因素 3 水平正交试验优化,其中接口温度为 300、350、400 ℃,离子传输管温度为 150、200、250 ℃,加热模块温度为 150、200、250 ℃。优化试验重复 3 次,计算 3 次试验平均值来进行结果分析,确保离子源参数优化的准确性。从表 3 可以看出,接口温度 300 ℃、离子传输管温度 150 ℃、加热模块 200 ℃ 的组合是最优化的离子源参数。

续表 3

离子传输管温度 Ion transfer tube temper- ature/°C	加热模块温度 Heating module temper- ature/°C	接口温度 Interface temper- ature/°C	(+)-甲胺磷 (+) - metha- midophos	(-)-甲胺磷 (-) - Metham- idophos	(+)-乙酰甲胺磷 (+) - acephate	(-)-乙酰甲胺磷 (-) - Acephate
200	150	400	10 607	17 674	9 077	18 118
200	200	300	21 015	26 006	19 941	25 038 *
200	200	350	12 400	20 202	12 574	20 025
200	200	400	10 043	17 822	8 963	17 745
200	250	300	17 260	28 661 *	16 906	24 708
200	250	350	11 025	17 841	11 025	19 044
200	250	400	9 436	14 622	8 933	14 272
250	150	300	20 040	22 710	20 704	20 020
250	150	350	15 485	21 627	14 318	22 095
250	150	400	12 168	17 059	11 119	17 934
250	200	300	17 274	21 306	17 283	20 115
250	200	350	13 157	16 677	14 047	15 154
250	200	400	10 267	14 354	10 463	15 644
250	250	300	14 073	21 132	15 024	20 163
250	250	350	11 937	15 474	11 200	16 877
250	250	400	8 463	13 076	8 424	14 521

注: * 为响应峰面积前 3 名。

Note: * represents the top 3 response peak areas.

2.4 样品前处理方法的选择及优化 QuEChERS 法已经被证实为农产品中农药残留前处理的首选方法,该研究根据前期报道,也采用了 QuEChERS 法作为前处理技术。针对茶叶基质,其主要含有丰富的黄酮、少量淀粉、氨基酸、挥发性物质、有机酸、微量的其他化学成分(如咖啡因、色素)以及有可能被人为或污染而含有的农药残留及污染物等,为了去除这些干扰杂质,对前处理过程中提取剂及净化手段进行了优化。

该试验选择了 4 种不同配比的脱水剂,分别为 Original (4 g MgSO₄+1 g NaCl)、CEN(4 g MgSO₄+1 g NaCl+1 g Na₃Cit+0.5 g 2Na₂HCit·1.5H₂O)、Vet(4 g Na₂SO₄+1 g NaCl)、AOAC(6 g MgSO₄+1.5 g NaAC),对比了使用乙腈为提取溶剂的情况下不同脱水剂对提取效率的影响,结果如图 5 所示。从图 5 可以看出,使用 CEN 前处理的样品回收率高于其他 3 者。这可能是因为含有柠檬酸缓冲盐的存在,改变了饱和盐溶液的 pH,促使甲胺磷及乙酰甲胺磷对映体电离平衡向分子方向移动,从而使更多的目标物溶解进入乙腈提取液中。

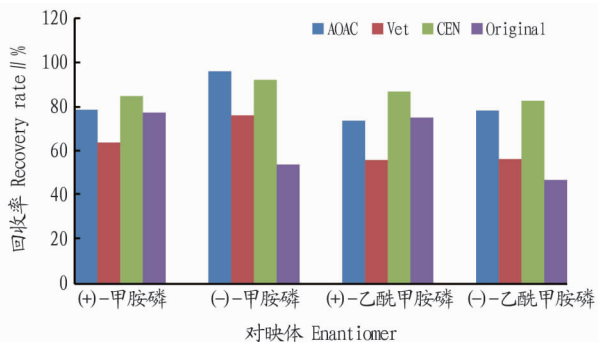


图 5 不同脱水剂对提取效率的影响

Fig. 5 Effect of different dehydrant on extraction efficiency

在 QuEChERS 法中,净化剂的选择对于去除杂质、提高目标化合物色谱峰的信噪比至关重要。C₁₈、PSA、GCB 是最为常见的净化吸附剂^[30]。该试验选择 5 种不同配比的净化吸附剂,分别为 ALN(750 mg MgSO₄+150 mg PSA+150 mg C₁₈+150 mg 中性氧化铝)、GCB(200 mg GCB)、GCB+C₁₈(900 mg MgSO₄+150 mg GCB+150 mg C₁₈)、0029(1 200 mg MgSO₄+400 mg PSA+400 mg C₁₈+45 mg GCB)、High Pigment(900 mg MgSO₄+150 mg PSA+45 mg GCB),对比不同净化吸附剂对目标物回收率的影响,结果如图 6 所示。从图 6 可以看出,使用 0029(1 200 mg MgSO₄+400 mg PSA+400 mg C₁₈+45 mg GCB)作为净化吸附剂,4 种对映体的回收率均最高。有研究表明,PSA 对茶多酚、叶绿素有净化作用,GCB 对咖啡因有净化作用^[31],都能够将茶叶中有较大影响的干扰物去除,因此,0029 吸附剂达到了更好的净化效果,从而降低了基质效应,得到了更好的回收率。这也与 Andrade 等^[32]的研究结果相一致。

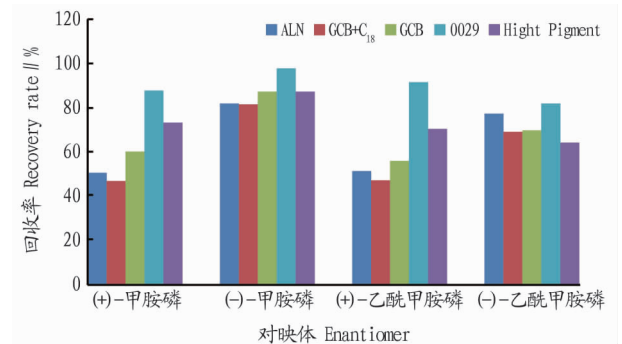


图 6 不同净化吸附剂对回收率的影响

Fig. 6 Effect of different purification adsorbents on recovery rate

2.5 方法验证 茶叶中甲胺磷和乙酰甲胺磷对映体经由 QuEChERS 法提取,在以 Chiral-Pak IC-3 为色谱柱的超临界

流体色谱上拆分,大气压化学电离后串联四极杆质谱法测定。对该定量方法的基质效应、线性、灵敏度、回收率和精密度等指标进行了考察。

2.5.1 基质效应。使用空白茶叶基质,按“1.6”方法进行样品提取、得到空白基质溶液。使用空白基质溶液和异丙醇分别配制浓度为 2、5、10、20、50、100 ng/mL 的系列基质标准溶液和标准溶液。由茶叶中各对映体的基质效应^[33]情况(图 7)可知,由于茶叶中基质对电离的干扰较大,4 种异构体均表现为基质抑制效应,其中 (+)-甲胺磷、(+)-乙酰甲胺磷和 (-)-乙酰甲胺磷的基质效应超过 40%,基质效应明显,在测定中可选择基质加标准曲线法定量。

2.5.2 标准曲线及灵敏度。配制浓度分别为 5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的基质加标准溶液,以甲胺磷和乙酰甲胺磷对映体的响应峰面积为纵坐标、对应浓度为横坐标绘制工作曲线。以 3 倍信噪比计算方法检出限 (LOD),以 10 倍信噪比计算方法定量限 (LOQ)。(+) - 甲胺磷、(-) - 甲胺磷、

(+) - 乙酰甲胺磷、(-) - 乙酰甲胺磷的线性方程、决定系数、线性范围、检出限及定量限结果见表 4。从表 4 可以看出,各对映体在 5~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 线性关系良好,茶叶中 4 种对映体的检出限和定量限分别为 5 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。图 8 为检出限浓度下加标样品的提取离子流图。

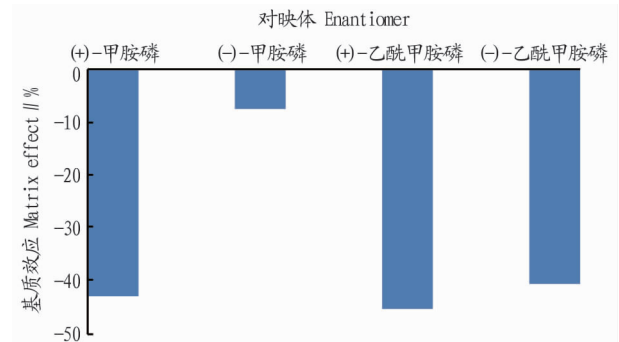


图 7 茶叶中各对映体的基质效应

Fig. 7 Matrix effect of each enantiomer in tea

表 4 各对映体的线性方程、决定系数、线性范围、最大残留限量、检出限及定量限

Table 4 Linear equation, determination coefficient, linear range, maximum residue limit, detection limit and quantification limit of each enantiomer

对映体 Enantiomer	线性范围 Linear range $\mu\text{g}/\text{kg}$	线性方程 Linear equation	决定系数 Determination coefficient (R^2)	最大残 留限量 MRL $\mu\text{g}/\text{kg}$	检出限 LOD $\mu\text{g}/\text{kg}$	定量限 LOQ $\mu\text{g}/\text{kg}$
(+) - 甲胺磷 (+) - methamidophos	5~200	$y = 242.54x + 750.85$	0.998 0	25	5	10
(-) - 甲胺磷 (-) - methamidophos	5~200	$y = 234.06x + 647.15$	0.998 9	25	5	10
(+) - 乙酰甲胺磷 (+) - acephate	5~200	$y = 522.61x - 514.01$	0.998 1	50	5	10
(-) - 乙酰甲胺磷 (-) - acephate	5~200	$y = 321x + 752.34$	0.996 6	50	5	10

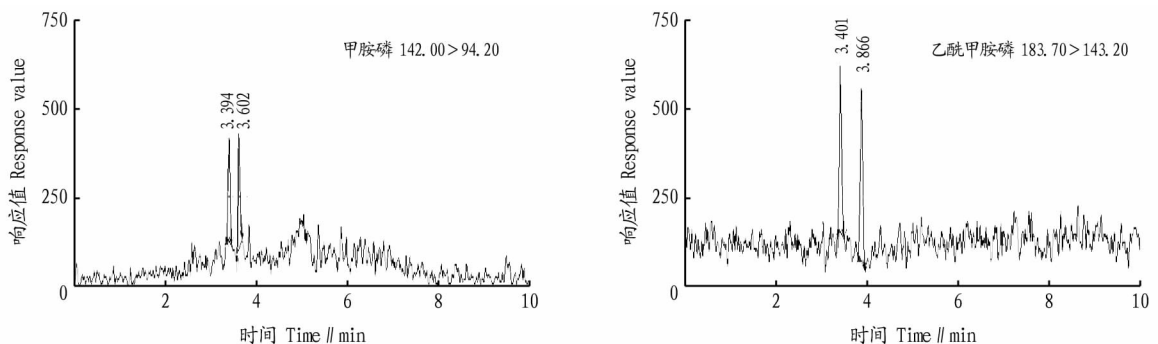


图 8 茶叶中添加检出限浓度加标样品提取离子流图

Fig. 8 Extraction ion flow diagram of spiked samples with detection limit concentration added to tea leaves

2.5.3 回收率与精密度。取空白茶叶样品,根据 GB/T 27404—2008 的要求,甲胺磷和乙酰甲胺磷均为有最大残留限量 (MRL) 的化合物,在 GB 2763—2016 中,茶叶中甲胺磷外消旋体的 MRL 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,外消旋体是对映体的等摩尔混合物,因此对于各对映异构体,可看作 MRL 为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,同样,茶叶中乙酰甲胺磷的外消旋体 MRL 为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,对映体 MRL 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。制备浓度分别为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (定量限点)、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (甲胺磷 MRL 点)、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (乙酰甲胺磷 MRL 点) 3 个不同浓度水平的加标样品,在优化后的条件下测定目标化合物,每个浓度水平平行测定 6 次,结果如表 5 所示。由表 5 可知,使用所建立的方法对茶叶中甲胺磷及乙酰甲胺磷对映体进行定量测定,平均回收率为 70.53%~110.61%,

相对标准偏差 (RSD) 为 2.92%~13.30%。

2.6 实际样品测定及方法对比 购入市售茶叶 15 份,涵盖绿茶、花茶、红茶等主要干制茶,按“1.6”方法对样品进行测定。其中某一绿茶样品检出 (+) - 乙酰甲胺磷 21.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、(-) - 乙酰甲胺磷 19.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其离子流色谱图见图 9,通过阳性样品的离子流色谱图可以看出,乙酰甲胺磷对映体在茶叶上的残留并不会随着时间的变化而互相转化,按外消旋体进行判别则此绿茶中乙酰甲胺磷的残留量为 41.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在后续工作中对乙酰甲胺磷对映体的毒性进行进一步研究,可以开展单一对映体农药的使用推广,并进一步针对每种对映体规范限量。

表5 回收率及精密度试验

Table 5 Recovery rate and precision test

单位:%

对映体 Enantiomer	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	回收率 Recovery rate	RSD	回收率 Recovery rate	RSD	回收率 Recovery rate	RSD
(+)-甲胺磷(+)-methamidophos	78.89	10.00	74.27	8.03	70.53	4.62
(-)-甲胺磷(-)-methamidophos	79.35	13.30	73.71	8.40	72.77	5.58
(+)-乙酰甲胺磷(+)-acephate	91.87	8.41	110.61	4.16	94.83	2.92
(-)-乙酰甲胺磷(-)-acephate	103.57	11.87	105.57	7.66	93.22	3.65

上述阳性样品的检出值与使用 GB 中气相色谱法所得到的结果(外消旋体残留量)进行了对比,气相色谱法所得到的结果为 39.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。由此可见,所建立的 SFC 方法不仅试

验的环境友好度更高、稳定性更好,同时能在检出值无明显差别的情况下分离对映异构体。

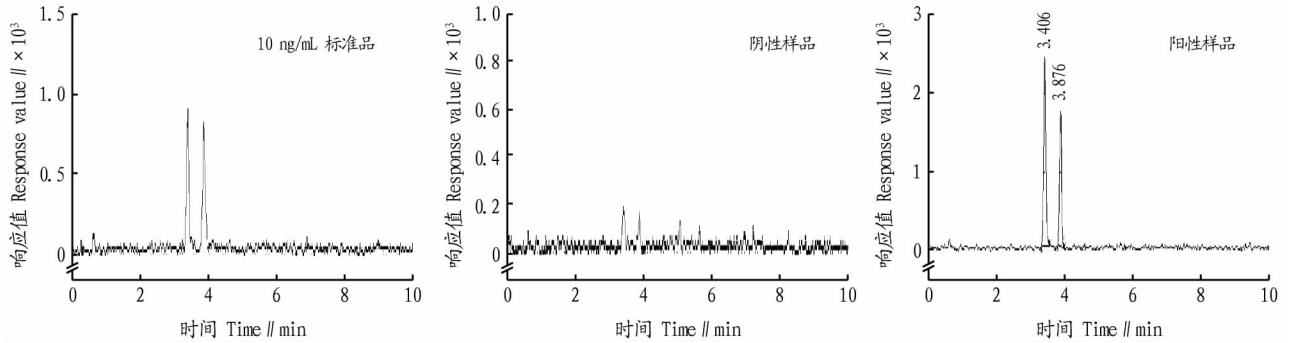


图9 标准品、阴性样品及阳性样品的乙酰甲胺磷提取离子流色谱图

Fig. 9 Ion flow chromatography of acetyl methamidophos extraction for standard, negative and positive samples

3 结论

本研究建立了一种简单、快速、可靠的基于超临界流体色谱-串联质谱法的茶叶中甲胺磷、乙酰甲胺磷对映体拆分及定量检测方法。优化了不同色谱柱、改性剂、柱温和背压等色谱条件,两对对映体达到有效分离,基线平稳,并优化了质谱条件以保证方法灵敏度。在基于 QuEChERS 法的前处理技术中经优化选择了 CEN(4 g MgSO_4 + 1 g NaCl + 1 g Na_3Cit + 0.5 g $2\text{Na}_2\text{HCit} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 作为脱水剂,0029(1 200 mg MgSO_4 + 400 mg PSA + 400 mg C_{18} + 45 mg GCB) 为净化吸附剂。经方法确认,方法检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,满足已经制定的 MRL 检测的需求。同时线性、回收率、精密度等指标均满足相关方法学考察的要求。通过实际样品测试及对比,该方法在检测速度、准确度及环境友好度上具有优势,并且能够有效拆分和定量甲胺磷和乙酰甲胺磷对映异构体,为进一步研究提供方法参考。

参考文献

[1] WILLIAMS A. Opportunities for chiral agrochemicals[J]. *Pestic Sci*, 1996, 46(1): 3-9.

[2] ZHOU Y, LI L, LIN K D, et al. Enantiomer separation of triazole fungicides by high-performance liquid chromatography[J]. *Chirality*, 2009, 21(4): 421-427.

[3] SMITH S W. Chiral toxicology: It's the same thing...only different[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 110(1): 4-30.

[4] SUN M J, LIU D H, QIU X X, et al. Acute toxicity, bioactivity, and enantioselective behavior with tissue distribution in rabbits of myclobutanil enantiomers[J]. *Chirality*, 2014, 26(12): 784-789.

[5] OVERMYER J P, ROUSE D R, AVANTS J K, et al. Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and freshwater non-targets[J]. *J Environ Sci Health Part B*, 2007, 42(5): 471-480.

[6] WILSON W A, KONWICK B J, GARRISON A W, et al. Enantioselective

chronic toxicity of fipronil to *Ceriodaphnia dubia*[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2008, 54(1): 36-43.

[7] SCHMITT P, GARRISON A W, FREITAG D, et al. Application of cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography to the separations of selected neutral pesticides and their enantiomers[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 792(1/2): 419-429.

[8] BUERGE I J, POIGER T, MÜLLER M D. Enantioselective degradation of metalaxyl in soils: Chiral preference changes with soil pH[J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(12): 2668-2674.

[9] BERTOLAZZI M, CAROLDI S, MORETTO A, et al. Interaction of methamidophos with hen and human acetylcholinesterase and neuropathy target esterase[J]. *Arch Toxicol*, 1991, 65(7): 580-585.

[10] MIYAZAKI A, NAKAMURA T, KAWARADANI M, et al. Resolution and biological activity of both enantiomers of methamidophos and acephate[J]. *J Agric Food Chem*, 1988, 36(4): 835-837.

[11] LIN K D, ZHOU S S, XU C. Enantiomeric resolution and biotoxicity of methamidophos[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(21): 8134-8138.

[12] UPADHAY N, KUMAR V, KUMAR V. Extraction, UV-visible, FTIR, NMR spectroscopic study of Acephate and effect of pH[J]. *Int J Environ Sci*, 2013, 3(6): 1849-1856.

[13] KABLER A K, CHEN S M. Determination of the 1'S and 1'R diastereomers of metolachlor and S-metolachlor in water by chiral liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC/MS/MS)[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(17): 6153-6158.

[14] ZHANG H, WANG X Q, QIAN M R, et al. Residue analysis and degradation studies of fenbuconazole and myclobutanil in strawberry by chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(22): 12012-12017.

[15] ELLINGTON J J, EVANS J J, PRICKEIT K B, et al. High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of organophosphorus pesticides on polysaccharide chiral stationary phases[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 928(2): 145-154.

[16] LIU W P, GAN J J. Determination of enantiomers of synthetic pyrethroids in water by solid phase microextraction-enantioselective gas chromatography[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(4): 736-741.

[17] WU C W, ZHANG A P, LIU W P. Risks from sediments contaminated with organochlorine pesticides in Hangzhou, China[J]. *Chemosphere*, 2013, 90(9): 2341-2346.

全保护提供了宝贵的经验,笔者基于以上经验提出以下建议:①增强水库的“山-水-林-田-湖-草”一体化功能;②配套水库周边的生态环境基础设施,保障环境治理设施的正常运行,减少污水排放和垃圾排放,防止生态环境退化;③推动区域畜禽粪便还田工作,实现畜禽粪便减量化;④建立市、区、县三方合作,共筑生态安全防线,全面保障水库生态安全;⑤成立专门的流域生态保护部门,配套水库保护法律和法规,制订水库环境保护与管理模式;⑥提高公众参与度,共同推动辽宁朝阳阎王鼻子水库健康、稳定、持续发展。

参考文献

- [1] 肖笃宁,陈文波,郭福良.论生态安全的基本概念和研究内容[J].应用生态学报,2002,13(3):354-358.
- [2] 王丽婧,郑丙辉.水库生态安全评估方法(I):IROW 框架[J].湖泊科学,2010,22(2):169-175.
- [3] BARNETT J. Environmental security [C]//KITCHIN R,THRIFT N. International encyclopedia of human geography. Oxford: Elsevier, 2009: 553-557.
- [4] 张远,高欣,林佳宁,等.流域水生态安全评估方法[J].环境科学研究,2016,29(10):1393-1399.
- [5] 吴计生,梁团豪,吕军.松花江流域主要河湖水生态现状评价[J].中国水土保持,2019(2):37-40.
- [6] 马玲玲,周林飞,张婷婷,等.基于压力-状态-响应模型的大伙房水库水源地安全评价研究[J].沈阳农业大学学报,2018,49(1):114-120.
- [7] BLINN D W,BAILEY P C E. Land-use influence on stream water quality and diatom communities in Victoria, Australia: A response to secondary salinization[J]. Hydrobiologia,2001,466(1/2/3):231-244.
- [8] VERHOEVEN J T A,ARHEIMER B,YIN C Q,et al. Regional and global concerns over wetlands and water quality[J]. Trends in ecology evolution, 2006,21(2):96-103.
- [9] HOORMAN J,HONE T,SUDMAN T,Jr,et al. Agricultural impacts on lake and stream water quality in Grand Lake St. Marys, Westen Ohio[J]. Wa-

ter,air,and soil pollution,2008,193(1/2/3/4):309-322.

- [10] SOLOMON K R,SIBLEY P. New concepts in ecological risk assessment: Where do we go from here? [J]. Marine pollution bulletin,2002,44(4): 279-285.
- [11] SOLOVJOVA N V. Synthesis of ecosystemic and ecoscreening modelling in solving problems of ecological safety [J]. Ecological modelling, 1999, 124(1):1-10.
- [12] ZUO W,ZHOU H Z,ZHU X H,et al. Integrated evaluation of ecological security at different scales using remote sensing:A case study of Zhongxian County,the Three Gorges Area,China[J]. Pedosphere,2005,15(4): 456-464.
- [13] 王玲玲,张斌.基于 DPSIR 模型的丹江口库区生态安全评估[J].环境科学与技术,2012,35(S2):340-343.
- [14] 邓地娟,王静雅,谢强,等.鲁班水库生态安全状态评估研究[J].四川环境,2021,40(3):156-163.
- [15] 江文渊,张征云,张彦敏,等.于桥水库流域生态安全评估研究[J].环境科学导刊,2018,37(4):68-72.
- [16] 张松,郭怀成,盛虎,等.河流流域生态安全综合评估方法[J].环境科学研究,2012,25(7):826-832.
- [17] 李亚男.湖库生态安全综合评估:以浙江省六大重点水库为例[D].杭州:浙江大学,2014.
- [18] 李祚泳,丁晶,彭荔红.环境质量评价原理与方法[M].北京:化学工业出版社,2004.
- [19] SAATY T L. Fundamentals of decision making and priority theory with the analytic hierarchy process[M]. Pittsburgh:RWS Publications,2000.
- [20] 赵鸣雁.水资源问题的多准则方法研究[D].大连:大连理工大学,2006.
- [21] 许树柏.实用决策方法:层次分析法原理[M].天津:天津大学出版社,1988.
- [22] 杨光华,包安明,陈曦,等.新疆博斯腾湖湿地生态质量的定量评价[J].干旱区资源与环境,2009,23(2):119-124.
- [23] 段文秀,朱广伟,刘俊杰,等.水源地区型水库生态安全评价方法探索[J].中国环境科学,2020,40(9):4135-4145.
- [24] 喻立,王健力,李昌晓,等.基于 DPSIR 与 AHP 的宁夏沙湖湿地健康评价[J].西南大学学报(自然科学版),2014,36(2):124-130.

(上接第 162 页)

- [18] JARMAN J L,JONES W J,HOWELL L A,et al. Application of capillary electrophoresis to study the enantioselective transformation of five chiral pesticides in aerobic soil slurries[J]. J Agric Food Chem,2005,53(16): 6175-6182.
- [19] QIU J,DAI S H,ZHENG C M,et al. Enantiomeric separation of triazole fungicides with 3- μm and 5- μm particle chiral columns by reverse-phase high-performance liquid chromatography[J]. Chirality,2011,23(6):479-486.
- [20] PAN R,CHEN H P,WANG C,et al. Enantioselective dissipation of acephate and its metabolite, methamidophos, during tea cultivation, manufacturing, and infusion[J]. J Agric Food Chem,2015,63(4):1300-1308.
- [21] WANG X Y,ZHANG H,XU H,et al. Direct chiral determination of acephate and its metabolite methamidophos in vegetables using QuEChERS by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Anal Methods,2013,6(1):133-140.
- [22] NELANDER H,ANDERSSON S,OHLÉN K. Evaluation of the chiral recognition properties as well as the column performance of four chiral stationary phases based on cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) by parallel HPLC and SFC [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218 (52): 9397-9405.
- [23] WILLIAMS K L,SANDER L C,WISE S A. Comparison of liquid and supercritical fluid chromatography for the separation of enantiomers on chiral stationary phases [J]. J Pharm Biomed Anal,1997,15(11):1789-1799.
- [24] WEST C,CIESLIKIEWICZ-BOUET M,LEWINSKI K,et al. Enantiomeric separation of original heterocyclic organophosphorus compounds in supercritical fluid chromatography[J]. Chirality,2013,25(4):230-237.
- [25] NISHIKAWA Y. Supercritical fluid chromatographic separation of synthe-

tic pyrethroids on packed columns and capillary columns[J]. Anal Sci, 1992,8(6):817-822.

- [26] CHEN Z L,DONG F S,XU J,et al. Stereoselective separation and pharmacokinetic dissipation of the chiral neonicotinoid sulfoxaflor in soil by ultraperformance convergence chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem,2014,406(26):6677-6690.
- [27] DEL NOZAL M J,TORIBIO L,BERNAL J L,et al. Separation of alendazole sulfide enantiomers by chiral supercritical-fluid chromatography [J]. J Biochem Biophys Methods,2002,54(1/2/3):339-345.
- [28] LIU A,DONG F S,XU J,et al. Stereoselective determination of tebuconazole in water and zebrafish by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem,2015,63(28):6297-6303.
- [29] TORIBIO L,DEL NOZAL M J,BERNAL J L,et al. Chiral separation of some triazole pesticides by supercritical fluid chromatography[J]. J Chromatogr A,2004,1046(1/2):249-253.
- [30] QI P P,WANG X Y,ZHANG H,et al. Rapid enantioseparation and determination of isocarboxiphos enantiomers in orange pulp, peel, and kumquat by chiral HPLC-MS/MS[J]. Food Anal Methods,2015,8(2):531-538.
- [31] CHEN H P,YIN P,WANG Q H,et al. A modified QuEChERS sample preparation method for the analysis of 70 pesticide residues in tea using gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Anal Methods, 2014,7(8):1577-1587.
- [32] ANDRADE G C R M,MONTEIRO S H,FRANCISCO J G,et al. Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and dynamic multiple reaction monitoring method for determining multiple pesticide residues in tomato[J]. Food Chem,2015,175:57-65.
- [33] ANASTASSIADES M,LEHOTAY S J,STAJNBAHER D,et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce[J]. J AOAC Int,2003,86(2):412-431.