

文章编号:1000-582X(2011)07-131-06

蜂蜜中多种有机磷农药残留的液相色谱-串联质谱检测

王国民^{1,2}, 李应国^{1,2}, 戴华³, 谢文⁴, 张进忠⁵, 周启明², 李正国¹

(1. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044; 2. 重庆出入境检验检疫局, 重庆市进出口食品安全工程技术研究中心, 重庆 400020; 3. 湖南出入境检验检疫局, 湖南长沙 410082; 4. 浙江出入境检验检疫局, 浙江杭州 310027; 5. 西南大学资源环境学院, 重庆 400716)

摘要:针对敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷为常用的防治蜜蜂天敌或虫害的有机磷农药杀虫剂, 易在蜂蜜中产生残留, 建立了蜂蜜中敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷残留的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)同时测定方法。蜂蜜样品经乙酸乙酯提取、浓缩, 用甲醇溶解残渣, 液相色谱(LC)分离, 电喷雾(ESI)-MS/MS多反应监测(MRM)模式检测, 外标基体曲线定量。3种有机磷农药在20~500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性响应良好, 相关系数均大于0.994; 获得的检出限均为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限均为4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在加标浓度为10~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 平均回收率为78.5%~96.8%, 相对标准偏差为9.1%~13.1%。

关键词:色谱分析; 液相色谱-串联质谱; 有机磷农药; 残留检测; 蜂蜜

中图分类号: TQ453.2

文献标志码: A

Simultaneous determination of multiple organophosphorus pesticides residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry

WANG Guo-min^{1,2}, LI Ying-guo^{1,2}, DAI Hua³, XIE Wen⁴, ZHANG Jin-zhong⁵,
ZHOU Qi-ming², LI Zheng-guo¹

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, P. R. China; 2. Chongqing Import and Export Food Safety Engineering Technology Research Center, Chongqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing 400020, P. R. China; 3. Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha, Hunan 410082, P. R. China; 4. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou, Zhejiang 310027, P. R. China; 5. College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, P. R. China)

Abstract: The trichlorfon, dichlorvos, and coumafos are commonly used as organophosphorus pesticides to control pests or natural enemies of bees, but they easily contaminate the honey. A simultaneous determination method for trichlorfon, dichlorvos and coumafos residues in honey is developed by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Samples are extracted with ethyl acetate and concentrated extracts, and then the residue is dissolved by methanol, and separated by HPLC, detected by electrospray ionization (ESI)-MS/MS with multiple reaction monitoring mode (MRM). It is found that the linear ranges of the three organophosphate pesticides are 20~500 $\mu\text{g}/\text{L}$ with

收稿日期: 2011-03-02

基金项目: 国家认证认可监督管理委员会资助项目(2006B407)

作者简介: 王国民(1965-), 男, 高级工程师, 博士, 主要从事食品检测技术研究。

李正国(联系人), 男, 重庆大学教授, 博士生导师, (E-mail) zhengguoli@cqu.edu.cn。

correlation coefficients over 0.994, the detection limits (LODs) are 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limits of quantification (LOQs) are 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for all of the three pesticides. The average recoveries of the three pesticides in spiked honeies at concentration levels of 10~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ range from 78.5% to 96.8%, and the relative standard deviations are in the range of 9.1%~13.1%.

Key words: chromatographic analysis; liquid chromatography-MS/MS; organophosphate pesticides; residue determination; honey

蜂蜜作为一种天然、营养的保健食品,一直受到人们的喜爱。如果蜜蜂采集了被农药污染的花粉或蜂农使用了农药,可能造成蜂蜜中的农药残留超标,因此蜂蜜中的农药残留问题也引起了人们的广泛关注^[1-6]。敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷等有机磷农药为常用的杀虫剂和驱虫药^[7],除用于农作物害虫和家畜体内外寄生虫的防治外,还可用于防治蜜蜂天敌或蜜蜂群中的寄生螨。由于它们的广泛使用,对其在蜂蜜中的残留越来越受到人们的重视。2006年5月日本实行“肯定列表制度”,规定敌百虫在蜂蜜中的最高残留量为 0.004 mg/kg,敌敌畏和蝇毒磷最高残留量为 0.01 mg/kg。为了保护人体健康,应对进出口检测需求,急需建立简便、快速和灵敏的残留检测方法。

目前,蜂蜜中敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷的残留检测方法主要有气相色谱法^[7-9]和气相色谱-质谱联用法^[10-11]。由于敌百虫受热会分解为敌敌畏,在用前述 2 种方法检测敌百虫时,实际测定的是敌敌畏,不能有效反映蜂蜜中敌百虫和敌敌畏残留的真实情况。近年来,液相色谱-质谱联用技术在检测热不稳定化合物中发挥着重要的作用,并用于蔬菜、水果中多种农药残留的同时检测^[12-14],对于蜂蜜样品中的农药残留虽有采用液相色谱-质谱法进行多残留测定的报道^[15-16],中国也建立了蜂蜜中包括敌敌畏、敌百虫和蝇毒磷在内的 486 种农药及相关化学品残留量测定的液相色谱-质谱法^[17],但这些方法为多残留检测方法,样品处理过程较复杂,且提取过程中使用了毒性较大的二氯甲烷,检测限偏高,不能很好满足快速检测低残留的要求。

为此,笔者研究了蜂蜜样品的前处理方法,优化了液相色谱串联质谱条件,建立了液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷残留的新方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

API 4000 四级杆串联质谱仪(美国 ABI 公司);高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司):包括四元

泵,自动进样器,柱温箱;R-200 旋转蒸发仪(瑞士 Büchi);旋涡 XH-B 混匀器(江苏康健医疗用品有限公司);Z323K 离心机(德国 Hermle);敌百虫(Trichlorfon, CAS 号:52-68-6,分子式: $\text{C}_4\text{H}_8\text{Cl}_3\text{O}_4\text{P}$),敌敌畏(Dichlorvos, CAS 号:62-73-7,分子式: $\text{C}_4\text{H}_7\text{Cl}_2\text{O}_4\text{P}$),蝇毒磷(Coumafos, CAS 号:56-72-4,分子式: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClO}_5\text{PS}$)标准品,均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;甲醇、乙酸乙酯均为 HPLC 级(TEDIA, USA);乙酸铵为优级纯;实验用水为 Milli-Q 超纯水(美国 Millipore 公司)。

1.2 样品提取

称取 5 g 蜂蜜样品(精确到 0.01 g)置于 50 mL 具塞离心管中,加 10 mL 水和 25 mL 乙酸乙酯,旋涡混合器 2 000 r/min 混匀 1 min,3 000 r/min 离心 5 min。将上层乙酸乙酯提取液收集于浓缩瓶中,样品残渣再加入 20 mL 乙酸乙酯,重复上述操作,合并乙酸乙酯提取溶液,在 50℃ 以下水浴减压浓缩至约 3 mL,转移至离心管,用 5 mL 乙酸乙酯分 2 次洗涤,合并洗涤液,用氮气吹干,1.0 mL 甲醇溶解残渣,过 0.45 μm 滤膜后供液相色谱-串联质谱测定。

1.3 高效液相色谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 4.6 mm (i. d.) \times 150 mm, 5 μm (美国 Agilent 公司);流动相:甲醇-乙酸铵溶液(5 mmol/L),梯度洗脱程序见表 1;流速:0.30 mL/min;柱温:40℃;进样量:20 μL 。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 T/min	甲醇 /%	乙酸铵 (5 mmol/L)/%
0	10.0	90.0
5.00	10.0	90.0
10.00	95.0	5.0
18.00	95.0	5.0
18.01	10.0	90.0
25.00	10.0	90.0

1.4 串联质谱仪条件

电喷雾离子源,正离子扫描方式,多反应检测,离子源喷雾器电压(IS)4 800 V,离子源温度(TEM)540 ℃;窗帘气(CUR):25.00 psi,雾化气(GS1):42.00 psi,辅助加热气(GS2):45 psi,碰撞气(CAD):5.00 psi;定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量见表2。

表2 3种有机磷农药的质谱检测条件

农药	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 DP/V	碰撞能量 CE/V	保留时间 RT/min
敌百虫	259.0/127.1	259.0/127.1	63.0	26.5	12.65
	259.0/109.2		63.0	16.0	
敌敌畏	221.3/127.1	221.3/127.1	63.0	25.5	13.61
	223.3/109.2		63.0	25.0	
蝇毒磷	363.3/227.1	363.3/227.1	96.0	25.0	14.93
	363.3/307.1		96.0	36.0	

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

提取有机磷农药一般采用丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙腈等有机溶剂或它们的混合溶剂。提取方法主要有振荡法、均质法、固相萃取法和固相微萃取法等。这里经预实验选用振荡提取法。蜂蜜的黏度大,在提取前需加水降低黏度。蝇毒磷、敌敌畏微溶于水,敌百虫可溶于水,因此在选用提取溶剂时,比较了采用乙酸乙酯、二氯甲烷、乙腈、丙酮-二氯甲烷等组合的提取效果。结果表明采用乙酸乙酯、二氯甲烷对3种有机磷农药均有很好的提取效果。由于

二氯甲烷在下层,转移时不方便,且二氯甲烷的毒性较强,所以选择乙酸乙酯作为提取溶剂。同时,浓缩后的残渣粘度较大,在用甲醇水(1+1, V/V)提取残渣时,不能完全提取分析物,回收率偏低,所以选用纯甲醇提取残渣,以提高回收率。与 GB/T 20771—2008^[17]的前处理方法比较,由于该方法是针对486种残留物质的检测方法,提取溶剂采用了二氯甲烷,提取液经浓缩后再用固相萃取方法净化,处理过程相对复杂。因此,本研究建立的前处理方法更简单、快速,污染更小。

2.2 质谱条件的优化及定性确证离子对选择

采用注射泵直接进样,用正离子扫描方式进行一级质谱分析,确定了敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷的准分子离子峰($M+1$),优化了去集簇电压。对被测物的准分子离子碰撞后,进行二级质谱分析,获得子离子质谱图,优化了碰撞能量,其结果如表2所示。此外,还对离子源温度、雾化气、气帘气和辅助气等参数进行了优化(即多反应监测模式,MRM);窗帘气(CUR):25.00;雾化气(GS1):42.00;辅助加热器(GS2):45.00;IS:4800.00;TEM:540.00;ihe:OFF,CAD:7.00。敌敌畏的准分子离子峰有 m/z 220.9 和 m/z 223.0,主要碎片离子有 m/z 109.3 和 m/z 126.8。敌百虫的准分子离子峰为 m/z 259.1、 m/z 257.0 和 m/z 261.1,主要碎片离子有 m/z 223.1、 m/z 221.2、 m/z 126.9、 m/z 109.4,其中 m/z 223.1 和 m/z 221.2 为敌敌畏的准分子离子峰。蝇毒磷的准分子离子峰为 m/z 363.2,主要碎片离子有 m/z 226.9、 m/z 307.1 和 m/z 334.9。敌敌畏和敌百虫的裂解情况与 Famigliani 等^[14]报道的基本一致,蝇毒磷的可能裂解规律见图1。

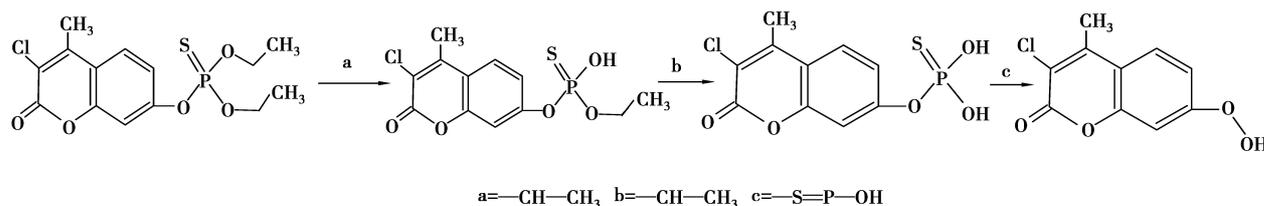


图1 蝇毒磷的可能裂解规律

根据欧盟 EC 657 指令的规定,对于液相色谱-质谱联用法,一个母离子(1.0 识别点)加 2 个特征子离子(2 * 1.5 识别点)可以满足定性确证被分析物 4 个识别点的要求,所以研究中选择 m/z 221.3/

109.2、 m/z 221.3/127.1 和 m/z 223.3/109.2 离子对为敌敌畏的离子对, m/z 259.0/109.2、 m/z 259.0/127.1 和 m/z 256.9/221.2 离子对为敌百虫的离子对, m/z 363.3/307.0、 m/z 363.3/334.9 和

m/z 363.3/227.0 离子对为蝇毒磷的定量/定性离子对。在实际样品检测时发现, m/z 223.3/109.2 和 m/z 256.9/221.2 在最低浓度点时背景有干扰, 所以选择 m/z 221.3/127.1 和 m/z 223.3/109.2 为敌敌畏的定量/定性离子对, m/z 259.0/127.1 和 m/z 259.0/109.2 为敌百虫的定量/定性离子对, m/z 363.3/227.0 和 m/z 363.3/307.0 作为蝇毒磷的定量/定性离子对。而 GB/T 20771—2008 选择 m/z 221.0/109.0 和 m/z 221.0/127.1 作敌敌畏的定量/定性离子对, 选择 m/z 257.0 作为敌百虫的母离子, m/z 257.0/109.2 和 m/z 257.0/127.1 分别

为定量/定性离子对, 本研究选取了敌敌畏的 2 个同位素母离子及各自碰撞后产生的 1 个子离子, 共得到 5 个识别点, 高于 GB/T 20771—2008, 选取敌百虫的同位素母离子避开了样品中杂质的干扰。

2.3 线性范围和检出限

敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷的线性范围见表 3。从表 3 可以看出, 3 种有机磷农药残留的检出限 ($S/N=3$) 均为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$; 明显优于 GB/T 20771—2008^[17] 测定敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷检出限 (分别为: $0.52, 0.18, 2.52 \mu\text{g}/\text{kg}$)。

表 3 3 种有机磷农药的线性范围和检测限

农药	线性范围 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	线性回归方程	相关系数 ($n=5$)	检出限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	定量限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
敌百虫	20~500	$A=3.33 \times 10^7 C+3.49 \times 10^4$	$R=0.999 2$	0.1	4
敌敌畏	20~500	$A=5.27 \times 10^7 C-7.04 \times 10^4$	$R=0.998 5$	0.1	4
蝇毒磷	20~500	$A=2.11 \times 10^8 C+3.8 \times 10^5$	$R=0.994 0$	0.1	4

说明: A 表示定量离子对峰面积(cps); C 表示标准浓度(ng/mL)。

2.4 回收率和重复性

以阴性样品为测试样品, 添加水平分别为 10、20 和 $40 \mu\text{g}/\text{kg}$, 每组 10 个平行样, 3 种有机磷农药的回收率和相对标准偏差(RSD)见表 4。从表 4 可以看出, 敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷的回收率分别为 $93.5\% \sim 96.8\%$ 、 $78.5\% \sim 80.5\%$ 和 $87.5\% \sim 94.3\%$, RSD 均小于 15% 。

表 4 蜂蜜中 3 种有机磷农药添加回收率($n=10$)

农药	添加量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	平均测得量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	平均回收率 /%	相对标准偏差 /%
敌百虫	10	9.37	93.7	12.70
	20	18.70	93.5	9.10
	40	38.70	96.8	11.80
敌敌畏	10	7.85	78.5	9.14
	20	15.90	79.5	9.70
	40	32.20	80.5	12.30
蝇毒磷	10	9.43	94.3	11.80
	20	17.50	87.5	10.40
	40	35.80	89.5	13.10

2.5 基体影响

根据 Sannino 等^[12]的研究, 在 LC-MS/MS 检测中需要考虑样品基体的影响。由于无法找到合适的内标物, 所以采用空白样品按前处理过程制备提取液, 在测定工作曲线时用空白提取液来配制农药标准溶液。空白蜂蜜样品和添加标准品的质谱图如图 2、3 所示。从图 3 可以看出, 敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷能很好地分离, 样品中的杂质不干扰测定, 它们的保留时间分别为 12.65、13.61 和 14.93 min。

2.6 实际样品测定

采用本研究建立的方法对 18 个市售蜂蜜样品进行测定, 结果表明样品中均未检出敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷残留。说明本方法能够满足同时检测蜂蜜中敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷残留的需要。

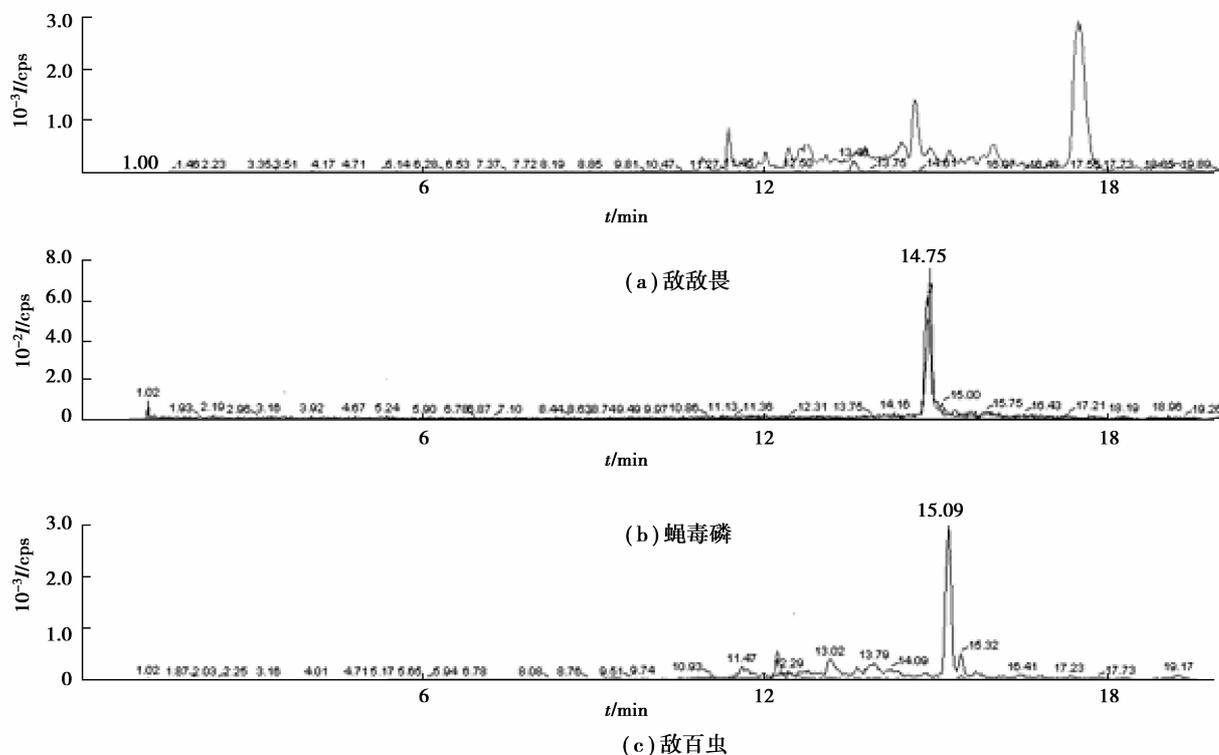


图 2 空白蜂蜜溶液的选择性离子流图

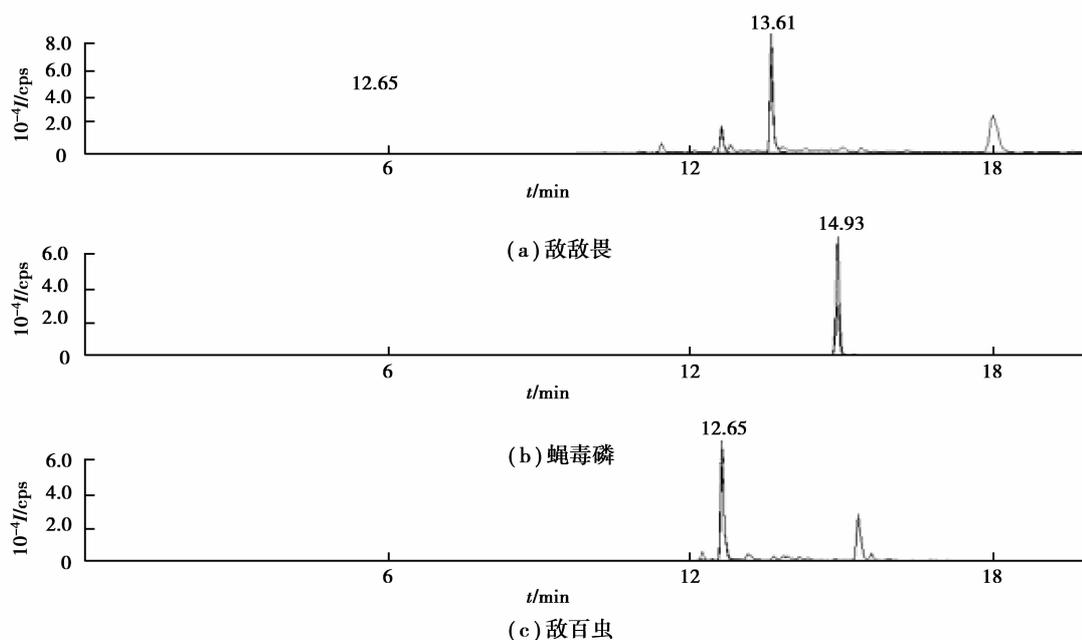


图 3 空白蜂蜜添加标准品选择性离子流图(0.010 mg/kg)

3 结 论

笔者建立了同时测定蜂蜜中敌百虫、敌敌畏和蝇毒磷残留的液相色谱-串联质谱方法。经过优化

质谱条件,降低了方法的测定低限,同时样品提取溶剂采用乙酸乙酯,降低了多残留方法采用二氯甲烷等有机溶剂的毒性对操作者身体健康和环境造成的危害,在实际检测工作中具有应用价值。

参考文献:

- [1] BALAYIANNIS G, BALAYIANNIS P. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 55(3): 462-470.
- [2] CHOUDHARY A, SHARMA D C. Pesticide residues in honey samples from Himachal Pradesh (India)[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 80(5): 417-422.
- [3] SMODIS SKERL M I, VELIKONJA BOLTA S, BASA CESNIK H, et al. Residues of pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 83(3): 374-377.
- [4] DAS Y K, KAYA S. Organophosphorus insecticide residues in honey produced in Turkey[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 83(3): 378-383.
- [5] CHAUZAT M P, CARPENTIER P, MARTEL A C, et al. Influence of pesticide residues on honey bee (*Hymenoptera: apidae*) colony health in France[J]. Environmental Entomology, 2009, 38(3): 514-523.
- [6] YAVUZ H, GULER G O, AKTUMSEK A, et al. Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2009, 168(1/4): 277-283.
- [7] KAMEL A, AL-GHAMDI A. Determination of acaricide residues in saudi arabian honey and beeswax using solid phase extraction and gas chromatography[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2006, 41(2): 159-165.
- [8] JIMÉNEZ J J, BERNAL J L, DEL NOZAL M J, et al. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 829(1/2): 269-277.
- [9] ALBERO B, SANCHEZ-BRUNETE C, TADEO J L. Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection[J]. Journal of AOAC International, 2001, 84(4): 1165-1171.
- [10] ALBERO B, SANCHEZ-BRUNETE C, TADEO J L. Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(19): 5828-5835.
- [11] RIAL-OTERO R, GASPAR E M, MOURA I, et al. Gas chromatography mass spectrometry determination of acaricides from honey after a new fast ultrasonic-based solid phase micro-extraction sample treatment [J]. Talanta, 2007, 71(5): 1906-1914.
- [12] SANNINO A, BOLZONI L, BANDINI M. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1036(2): 161-169.
- [13] GRIMALT S, SANCHO J V, POZO Ó J, et al. Analytical study of trichlorfon residues in kaki fruit and cauliflower samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(4): 1188-1195.
- [14] FAMIGLINI G, PALMA P, TERMOPOLI V, et al. Single-step LC/MS method for the simultaneous determination of GC-amenable organochlorine and LC-amenable phenoxy acidic pesticides [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(17): 7373-7378.
- [15] BLASCO C, FONT G, PICO Y. Solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry applied to the analysis of insecticides in honey[J]. Food Additives and Contaminants, 2008, 25(1): 59-69.
- [16] PANG G F, FAN C L, LIU Y M, et al. Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Additives and Contaminants, 2006, 23(8): 777-810.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 20771—2008 蜂蜜中 486 种农药及相关化学品残留量的测定:液相色谱-串联质谱法[S]. 北京:中国标准出版社, 2009.

(编辑 张 苹)