

快速溶剂萃取 – 超高效液相色谱串联质谱法测定竹笋中的百草枯残留

纪律 徐峻卿 李启 雷永良

丽水市疾病预防控制中心 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 运用快速溶剂萃取和超高效液相色谱串联质谱技术,建立竹笋中百草枯残留的检测方法。方法 选择合适的溶剂和萃取条件,采用甲醇-盐酸快速溶剂萃取提取竹笋中的百草枯,提取液经 Oasis WCX 固相萃取柱净化浓缩后,依次用水和甲醇清洗,乙腈-水-甲酸溶液洗脱,浓缩定容后以 pH=3.7 的 20 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈为流动相,在 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱上进行分离,采用正离子扫描多反应监测模式测定,外标法定量。结果 百草枯在 10 μg/L~500 μg/L 时线性良好,相关系数为 0.998 7,检出限为 2 μg/kg,定量限为 5 μg/kg。回收率为 80.9%~95.6%,相对标准偏差为 7.2%~11.4%。结论 该方法灵敏、准确,可对竹笋中百草枯残留进行快速检测分析。

关键词: 快速溶剂萃取;超高效液相色谱串联质谱;百草枯;竹笋

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2018)01-0018-04

Determination of paraquat residues in bamboo shoots by ultra performance liquid chromatography – triple quadrupole mass spectrometry with methanol – hydrochloric acid accelerated solvent extraction

Ji Lv, XU Jun-qing, LI Qi, LEI Yong-liang

Lishui Center for Disease Control and Prevention, Lishui, Zhejiang 323000, China

Abstract: Objective To establish a detection method for paraquat residues in bamboo shoots by accelerated solvent extraction – ultra performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Methods** Samples were accelerated solvent extracted with methanol – hydrochloric acid. The analytes were cleaned up with Oasis WCX solid phase extraction columns, and eluted with water and methanol successively, and concentrated with acetonitrile – water – formic acid. After separated on a Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC column using mobile phase of 20 mmol/L ammonium formate – acetonitrile (pH = 3.7), paraquat residue in sample solution was detected with mass spectrometer in MRM mode and quantified with external standard curve. **Results** The method had good linearity in the range of 10 μg/L – 500 μg/L, with the correlation coefficient of 0.998 7. The limit of detection was 2 μg/kg and the limit of quantitation was 5 μg/kg. The recoveries of the method ranged from 80.9% to 95.6%, with the relative standard deviations (RSDs) of 7.2% – 11.4%. **Conclusion** The method is rapid, sensitive and suitable for the quick determination of paraquat residues in bamboo shoots.

Key Words: Accelerated solvent extraction; Ultra performance liquid chromatography – triple quadrupole mass spectrometry; Paraquat; Bamboo shoots

百草枯(paraquat),又名对草快、克芜踪,化学名称为 1,1-二甲基-4,4-联吡啶阳离子盐,是一种带双电荷的季铵盐类除草剂,在世界各地被广泛用于控制农作物和水生杂草,其用量仅次于草甘膦。百草枯对动物和人类都有很大的毒性,据报道,每年在欧洲、亚洲、美洲均有大量百草枯致死的案例出现^[1],多为口服误食致死。目前,检测百草枯的方法主要有气相色谱法、液相色谱法和质谱法等^[2],高效液相色谱-质谱联用技术因其高灵敏度、准确定性等特点,成为

目前检测分析百草枯的重要手段。

竹笋作为中国传统美食,具有清热化痰、益气和胃的功效,近年来更因其具有低脂、低糖、多纤维的特点,远销海内外。竹笋出笋期多在春季,而春季也是杂草大量生长的时期。百草枯具有高效、低价的特点,对一年生及多年生杂草均有较好的杀伤作用,因此在竹林中被广泛使用。百草枯直接作用并积累于农田、水域和农作物内,给竹笋的食用安全带来了隐患。

目前,百草枯的提取方法主要为溶剂萃取法和固相萃取法^[3]。溶剂萃取法作为经典的提取方法,应用广泛,但存在有机溶剂用量大、乳化现象时有发生以及重复性较差等缺点。固相萃取法是目前广泛应用于样品中微量百草枯提取的主要方法,其优点在于试剂用量少、可同时完成样品的净化和富集,主要缺点

基金项目:浙江省医药卫生一般研究计划项目(2016KYB339)

作者简介:纪律(1983-),女,本科,主管技师,主要从事理化检验工作。

通讯作者:雷永良, E-mail: ls2123365@126.com

为进口固相萃取小柱成本较高,且不同品牌固相萃取小柱间存在系统差异等。快速溶剂萃取技术(ASE)具有萃取时间短、溶剂用量少、萃取效率高、重复性好等特点,能较大地提高萃取工作效率^[4,5],但其也存在无法完成样品净化的缺陷。

本实验采用快速溶剂萃取结合固相萃取技术提取竹笋中的百草枯,利用超高效液相色谱串联质谱建立了竹笋中百草枯残留的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Xevo TQ-S 超高效液相色谱-质谱仪,配有电喷雾电离源(美国 Waters 公司); ASE 300 快速溶剂萃取仪(美国 Thermo 公司); D11911 超纯水机(美国 Thermo 公司);氮吹仪(美国 Organomation 公司); Oasis WCX SPE 柱(3cc、60 mg,美国 Waters 公司)。百草枯标准溶液(编号: GSB05-2655-2010, 100 mg/L, 溶剂为甲醇,农业部环境保护科研监测所);乙腈(HPLC 级,批号: 100030);甲醇(LC-MS 级,批号: 117534);甲酸(LC-MS 级,批号: BCBQ00-65V);甲酸铵(HPLC 级,批号: 1315008)。

1.2 方法

1.2.1 标准配制 取 100 mg/L 的标准溶液 1 ml,用甲醇定容至 10 ml 容量瓶中,置于 4 °C 冰箱中储存。使用时用 pH = 3.7 的 20 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈(4:6, V/V) 逐级稀释成 10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、500 μg/L 的标准溶液。

1.2.2 样品前处理 将新鲜竹笋样品匀浆混匀后,称取 10 g 竹笋样品与 5 g 硅藻土混匀后置于萃取池中,用 10 ml 萃取液(甲醇-0.1 mol/L 盐酸溶液, 3:7, V/V) 进行萃取,萃取温度: 80 °C; 加热时间: 5 min; 静态萃取时间: 10 min; 淋洗体积: 60%; 压力: 10 MPa; 吹扫时间: 60 s; 循环次数: 2 次。氮气吹扫收集全部提取液。将待净化液全部转移至依次经过 1 ml 甲醇、1 ml 水活化的 Oasis WCX 固相萃取柱中,弃去流出液。依次用 1 ml 水、1 ml 甲醇淋洗萃取柱,最后用 2 ml 乙腈-水-甲酸溶液(88:10:2, V/V/V) 洗脱,收集洗脱液于 15 ml 刻度离心管中,洗脱液经 45 °C 氮吹仪吹干后,用 1.0 ml 流动相振荡溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜后,供液相色谱质谱仪测定^[6]。

1.2.3 仪器条件 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 30 °C; 流速: 0.45 ml/min; 流动相: 20 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈(4:6, V/V), pH = 3.7; 进样体积: 10 μl。质谱条件电离方式: ESI⁺; 扫描方式: 多反应检测(MRM); 毛细管电压: 3.5 kV; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气温度: 350 °C; 反吹气流量: 150 L/hr; 脱溶剂气流量: 800 L/hr; 检测离子对: m/z 185.1 > 170.1 (定量离子) 和 m/z 171.1 > 77.0, 其碰撞能量分别为 22 eV 和 40 eV, 锥孔电压分别为 40 V 和 45 V^[7,8]。

2 结果

2.1 ASE 条件选择 为确定百草枯的最佳萃取条件,分别对萃取溶剂种类、萃取溶剂比例、萃取温度、萃取时间和循环次数进行单因素实验,每个实验均以 100 μg/kg 加标水平的空白竹笋回收率作为考察指标,每个因素水平进行 3 次平行实验。

2.1.1 萃取溶剂 百草枯为碱性离子型化合物,易溶于酸性水溶液而不易溶于有机试剂,但单纯的酸性水溶液提取率并不高,加入适量的有机溶剂可显著提高百草枯的回收率^[9]。分别选取了甲醇、乙腈、水、0.1 mol/L 盐酸溶液、2% 甲酸溶液、甲醇-0.1 mol/L 盐酸溶液(1:1, V/V) 以及 2% 甲酸-乙腈溶液(1:1, V/V) 作为萃取溶剂,结果显示甲醇-0.1 mol/L 盐酸溶液(1:1, V/V) 为萃取溶剂时回收率最高(图 1)。进一步比较了不同比例甲醇-0.1 mol/L 盐酸溶液的提取效率,发现甲醇-0.1 mol/L 盐酸溶液(3:7, V/V) 回收率最高(图 2)。

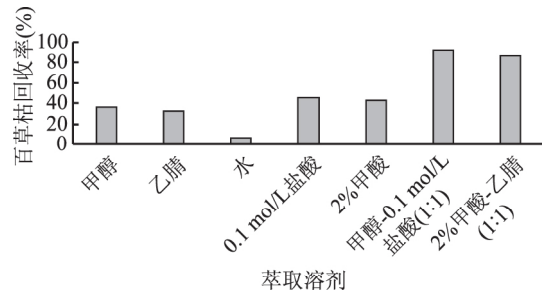


图 1 不同萃取溶剂的百草枯回收率

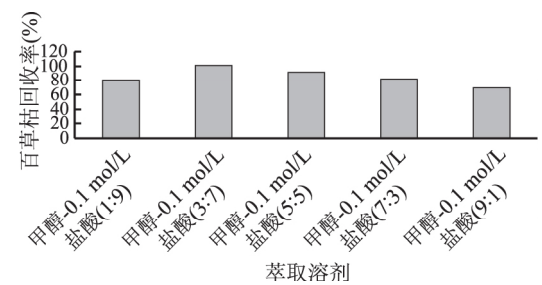


图 2 不同比例甲醇-0.1 mol/L 盐酸溶液的百草枯回收率

2.1.2 萃取温度 温度是快速溶剂萃取的重要参数^[10]。在确定好萃取溶剂后,对萃取温度进行了优化,分别选择了 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 进行提取实验,结果显示,在 80 °C 时回收率趋于平缓(图 3)。出于耗能及安全性考虑^[11],选择 80 °C 为萃取温度。

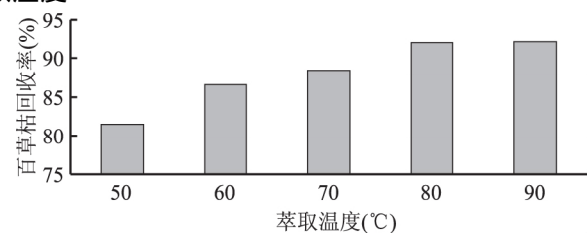


图 3 不同萃取温度的百草枯回收率

2.1.3 萃取时间和循环次数 分别考察了 ASE 的 5 种静态萃取时间对百草枯回收率的影响, 分别是 3 min、5 min、8 min、10 min 和 15 min, 结果显示随着萃取时间的增加, 百草枯的回收率也随之增加, 在 10 min 时趋于稳定(图 4), 故选择静态萃取时间为 10 min。同时, 对循环次数进行了考察, 选择了 1 次、2 次和 3 次, 结果显示, 循环次数增加百草枯的回收率也有所增加, 在循环 2 次的条件下基本能达到较好的提取效果, 继续增加次数影响不大, 考虑到效益和成本问题, 故选择循环次数为 2 次。

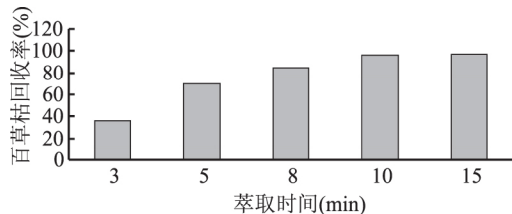


图 4 不同萃取时间的百草枯回收率

2.2 色谱条件选择 百草枯因其自身特性, 很难保留在 C₁₈ 或其他反相 LC 色谱柱上, 运用离子对试剂可提高反相保留时间, 但其后使用质谱仪进行检测时, 会产生显著的离子抑制作用。采用亲水作用的 HILIC 柱, 无需使用离子对试剂即可获得较好的保留效果, 故选用了 UPLC BEH HILIC (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 作为检测色谱柱。目前多数方法均采用甲酸-乙腈溶液为流动相, 在前期的研究中发现, 甲酸铵-乙腈溶液作为流动相对百草枯具有更好的分离效果, 并能提高检测灵敏度。比较了不同浓度 (10 mmol/L ~ 100 mmol/L) 甲酸铵-乙腈溶液对测定的影响。结果显示, 甲酸铵浓度越高, 百草枯的保留时间越短, 峰形越尖锐, 信号强度越大, 但高浓度的甲酸铵会形成盐析, 对色谱柱造成损伤, 故选择甲酸铵浓度为 20 mmol/L。20 mmol/L 的甲酸铵-乙腈溶液作为流动相时峰形有明显拖尾现象, 故对流动相 pH 值进行了优化。百草枯为碱性化合物, 酸性环境能提高百草枯的保留时间^[12-14]。用甲酸调节流动相的 pH 值使之呈酸性, 大大减少了峰形拖尾现象, 基于保护色谱柱的考虑, 最终选择 pH 值为 3.7。

2.3 质谱条件选择 根据化合物的性质及相关文献报道^[15,16], 百草枯在 ESI⁺ 源模式下可离子化, 故选择 ESI⁺ 的 MRM 模式进行百草枯的测定。对于 MRM 技术而言, 关键在于找到具有特异性的母离子和子离子, 百草枯分子极不稳定, 容易在电离时发生源内裂解, 产生不同的母离子^[8], 在对多对离子对进行比较后, 选出了强度较好的 2 对离子对 m/z 185.1 > 170.1 和 m/z 171.1 > 77.0 作为检测离子, 其中 m/z 185.1 > 170.1 强度最大, 故作为定量离子。

2.4 校正曲线和检出限 在选定的色谱和质谱条件下, 按 1.2.1 配制标准系列溶液, 标准 MRM 色谱图见

图 5。同时按 1.2.2 中方法提取空白竹笋样品的基质液, 以同样方法配制标准系列溶液, 用以考察竹笋的基质效应。以百草枯浓度为横坐标, 定量离子对的峰面积为纵坐标, 得出工作曲线, 溶剂配制的标准曲线回归方程为 $y = 110.531x + 1827.128$, $r = 0.9987$, 基质配制的标准曲线回归方程为 $y = 119.552x + 1454.130$, $r = 0.9989$ 。两条曲线线性良好, 其斜率之比为 1.08, 基质效应低, 可直接用溶剂标准曲线作为工作曲线进行定量分析。百草枯的检出限 (LOD) 为 2 μg/kg (S/N = 3), 定量限 (LOQ) 为 5 μg/kg (S/N = 10)。

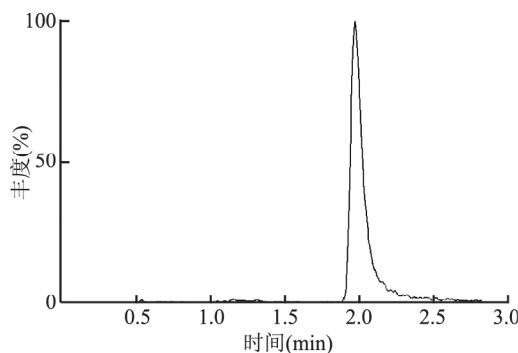


图 5 百草枯标准物质 MRM 色谱图

2.5 精密度和回收率 向空白竹笋中添加 5 μg/kg、100 μg/kg、200 μg/kg 3 个浓度水平的百草枯, 每个浓度进行 6 次平行试验, 得到百草枯的回收率为 80.9% ~ 95.6%, 相对标准偏差 (RSD) 为 7.2% ~ 11.4% (表 1), 空白竹笋加标回收 MRM 色谱图见图 6。

表 1 竹笋中百草枯的回收率和精密度 (n = 6)

加标量 (μg/kg)	测定值 (μg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
5.00	4.05	80.9	11.4
100.00	95.60	95.6	9.9
200.00	186.41	93.2	7.2

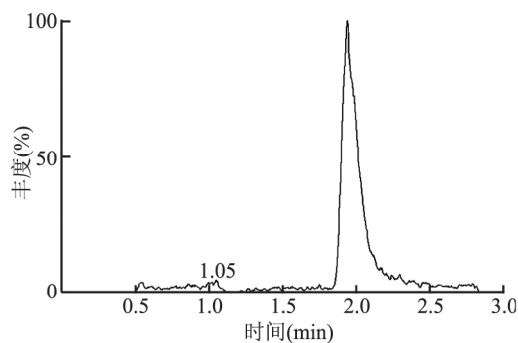


图 6 空白竹笋加标回收 MRM 色谱图

2.6 样品测定 利用本实验方法对丽水市农贸市场采集的 25 份竹笋样品进行检测, 其中有 1 份检测出百草枯残留, 浓度为 8.4 μg/kg。

3 结论

快速溶剂萃取法结合超高效液相色谱串联质谱法检测竹笋中的百草枯,前处理简单,分析速度快,方法灵敏度高,完全能满足实际工作的需要。25份竹笋样品中有1份检出百草枯残留,说明我国虽然自2016年7月1日起停止百草枯在国内的销售和使用,但在实际的农业生产中仍存在用百草枯除草的现象,因此相关部门需加大监管力度和执法范围,保障食品安全。

参考文献

- [1] Dinis - Oliveira RJ, Sarmento A, Reis P, et al. Acute paraquat poisoning: report of a survival case following intake of a potential lethal dose[J]. *Pediatr Emerg Care*, 2006, 22(7): 537-540.
- [2] 唐俊,漆仲华,史陶中,等. 微波提取-高效液相色谱法测定食用菌中百草枯[J]. *食品科学*, 2013, 34(6): 188-191.
- [3] 毕思远,王金峰,王幸幸,等. 除草剂百草枯的检测方法研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(23): 7825-7828.
- [4] 戚荣平,周晓红,孟琪,等. 快速溶剂萃取-离子色谱法测定富营养化水域土壤中的磷酸盐和亚磷酸盐[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(8): 1125-1132.
- [5] 戚荣平,周晓红,何玉芳,等. 快速溶剂萃取-离子色谱法测定湖底沉积物中三聚磷酸盐[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(11): 1543-1545.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 0293-2014 出口植物源性食品中百草枯和敌草快残留量的测定液

相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

- [7] 李启,雷永良,宋瑞强,等. 超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法快速测定生活饮用水中百草枯[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(14): 1995-1999.
- [8] 纪律,李启,雷永良,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定竹笋中百草枯的残留[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(3): 312-315.
- [9] 李捷,杨方,卢声宇,等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定茶叶中敌草快和百草枯残留[J]. *分析实验室*, 2014, 33(5): 537-541.
- [10] 祝子铜,雷美康,彭芳,等. 快速溶剂萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂花粉中氯霉素[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(20): 68-76.
- [11] 周晓红,戚荣平,孟琪,等. 快速溶剂萃取-离子色谱法测定土壤中的6种阴离子[J]. *浙江预防医学*, 2015, 27(7): 754-756.
- [12] 张宏文,殷志扬,刘强辉,等. 离子对反向高效液相色谱法测定百草枯血药浓度[J]. *药学与临床研究*, 2015, 23(6): 558-561.
- [13] 唐俊,漆仲华,史陶中,等. 微波提取-高效液相色谱法测定食用菌中百草枯[J]. *食品科学*, 2013, 34(6): 188-191.
- [14] 叶仕远,叶雪梅,王陈翔,等. HPLC法测定人血浆中百草枯的血药浓度[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(1): 46-48.
- [15] 郑和辉,卞战强,田向红,等. 液相色谱串联质谱法直接进样测定饮用水中的百草枯[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(18): 2602-2608.
- [16] 张征,李馨,李鹏飞,等. 中毒患者血浆中百草枯的LC-MS/MS定量检测方法研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 34(11): 1380-1381.

收稿日期: 2017-07-11

(上接第9页)

3 结论

对国内市场采购的明胶胶囊壳中5种稀土元素的含量进行了测定,结果表明明胶胶囊壳中均检出含有La、Ce、Pr、Nd、Sm,虽含量低但确实存在。目前国家标准对明胶及其他类型可食性包装材料中稀土元素限量无明确的规定。本实验选择了微波消解前处理、ICP-MS法作为分析手段,实现了对明胶胶囊壳中5种稀土元素的测定。该方法具有快速准确、灵敏度高、检出限低、线性范围宽等优点。通过加标回收实验进行方法验证,结果满意。

参考文献

- [1] 商博东,段梦茹,林肖惠,等. 电感耦合等离子体质谱法测定蔬菜中16种稀土元素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(20): 3463-3465.
- [2] 洪小明,杨坚. 国内外可食性包装研究进展[J]. *色谱*, 2011, 29(2): 60-63.
- [3] 林文业,黄一帆,黄文琦,等. 等离子体质谱法测定大米、茶叶中痕量稀土元素[J]. *广东微量元素科学*, 2008, 15(11): 41-45.
- [4] 李崇勇,徐晖,朱瑜. 微波消解-紫外分光光度法测定茶叶中的稀土含量[J]. *福建分析测试*, 2009, 18(3): 69-70.
- [5] 刘玉,陈祖义,王元兴. 钆在小鼠体内的分布与蓄积及对孕酮分泌的影响[J]. *中国稀土学报*, 2001, 19(5): 447-449.
- [6] 李荣昌,杨惠雯,王夔. 低剂量长期饲喂La(NO₃)₃后La在大

鼠骨中的蓄积及骨微结构的改变[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2003, 35(6): 622-624.

- [7] 陈祖义,朱旭东. 稀土元素的骨蓄积性、毒性及其对人群健康的潜在危害[J]. *生态与农村环境学报*, 2008, 24(1): 88-91.
- [8] 程国霞,聂晓玲,王彩霞,等. 电感耦合等离子体质谱法同时测定食品中的16种稀土元素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(11): 1749-1753.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 23199-2008 茶叶中稀土元素的检测电感耦合等离子体发射光谱法和电感耦合等离子体质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [10] 李红,回瑞华,侯冬岩,等. 茶叶中10种元素的ICP/MS法分析[J]. *鞍山师范学院学报*, 2005, 7(6): 52-54.
- [11] 陈光,林立,陈玉红. 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定乳制品的无机砷及其它砷形态[J]. *环境化学*, 2009, 28(4): 608-611.
- [12] 张利明,周伶,张秋萍,等. ICP-MS测定食品包装材料中的微量锑[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(8): 1552-1553.
- [13] 张秀芹,王敏,樊祥,等. 食品接触材料中硼酸盐的ICP-AES法和ICP-MS法比较[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(11): 2423-2425.
- [14] 史潜玉,刘立,柯润辉,等. ICP-MS在食品质量安全领域应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(12): 118-123.
- [15] 刘奋,戴京晶,林奕芝,等. ICP-MS测定食品中多种金属元素[J]. *现代防疫医学*, 2002, 29(1): 43-45.
- [16] 聂刚,李忠宏,杜双奎,等. ICP-MS测定食品原料中微量硒[J]. *中国测试*, 2015, 41(11): 40-43.

收稿日期: 2017-06-01