

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1833.2017.05.006

水产品中辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷的超高效液相色谱-串联质谱法检测

任传博^{1,2}, 吴蒙蒙³, 王倩⁴, 薛敬林^{1,2}, 张华威^{1,2}, 韩典峰^{1,2}, 田秀慧^{1,2}, 宫向红^{1,2}, 徐英江^{1,2*}

(1. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东 烟台 264006; 2. 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006; 3. 山东省淡水渔业研究院, 山东 济南 250000; 4. 淄博德安环境检测有限公司, 山东 淄博 255000)

摘要: [目的]建立了水产品中辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷3种有机磷农药的检测方法。[方法]样品经酸化乙腈提取, PSA吸附剂分散固相萃取净化, 超高效液相色谱-串联质谱在多反应离子监测模式下检测, 基质匹配外标法定量。结果加标浓度在10~100 μg/kg范围内, 线性相关系数(*R*)大于0.99。3种有机磷农药的平均回收率范围为65.8%~101.0%, RSD范围为11.4%~16.0%。本方法检出限为10 μg/kg, 定量限为20 μg/kg。[结论]该方法可用于水产品中辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷等3种有机磷农药残留的同时测定。[中国渔业质量与标准, 2017, 7(5): 39-44]

关键词: 水产品; 有机磷农药; 辛硫磷; 倍硫磷; 蝇毒磷; UPLC-MS/MS

中图分类号: S91 文献标志码: A 文章编号: 2095-1833(2017)05-0039-06

有机磷类农药(organophosphorus pesticides)被广泛用于农作物种植和中药材栽培过程中病虫害的防治。然而, 农药的使用就好比一把双刃剑, 在实际生产上起到了一定积极作用, 但也存在着一定的安全隐患, 如近年来有机磷农药对土壤与水体环境的污染^[1-2], 以及由此而引起的食品安全问题已引起广泛关注。

目前, 中国使用较多的有机磷农药残留检测方法为气相色谱法及气质联用法^[3-7], 样品基质以植物性或液体为主^[3-43]。动物性基质中有机磷农药残留分析研究报道较少^[14-15], 对于水溶性较强且稳定性较差的辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷在水产品中同时检测的研究更是未见报道。由于水产品基质复杂, 且气相色谱及气质联用不适用于极性大、不易气化的农药残留的检测, 因此本研究采用液质联用法进行检测。QuEChERS方法是近年来国际上最新发展起来的一种用于农产品检测的快速样品前处理技术^[11]。其原理与高效液相色谱(HPLC)和固相萃取(SPE)相似, 都是利用吸附剂填料与基质中的组分相互作用, 吸附杂质, 从而达到除杂净化的目的, 比较适合一些成分复杂样品的前处理。本研究以QuEChERS法的理论为基础, 对前处理方法进行优化, 结合超高效液相色谱-串联质谱检测的方法, 建立了水产品中3种有机

磷农药的多残留检测方法, 实现样品中目标化合物快速分离和准确检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-串联质谱仪(Quattro premier XE, Waters, USA)配有电喷雾离子源(ESI); 分析天平(Sartorius Basic); 超纯水仪(Milli-Q Gradient, Millipore, France); 高速离心机(TGL-40C, 上海安亭科学仪器厂); 超声波清洗器(KQ-600E, 昆山市超声仪器有限公司); 氮吹仪(N-EVAPTM112, Organomation Associates, USA); 漩涡混合器(IKA)。乙酸(优级纯), 甲酸(优级纯), 乙腈(色谱纯), 无水乙酸钠(优级纯), PSA吸附剂(40~60 μm)。3种有机磷标准品(辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷), 均购自德国Dr. Ehrenstorfer GmbH。纯度均不小于98%。结构式见图1。混合标准溶液: 称取适量有机磷标准品, 用乙腈溶解, 配成100 mg/L标准储备溶液, 使用前用流动相稀释至所需质量浓度。

1.2 样品的提取与净化

称取5.00 g样品于50 mL无菌离心管中, 加入乙腈(含1%乙酸)25 mL, 加入无水乙酸钠1 g, 漩涡

收稿日期: 2017-03-29; 接收日期: 2017-06-17

资助项目: 山东省现代农业技术体系藻类产业创新团队项目(SDAIT-26-05); 农业行业标准修订项目(18162130109237093)

作者简介: 任传博(1982-)男, 本科, 工程师, 研究方向为水产品安全与质量, ren0478@sina.com

通信作者: 徐英江, 副研究员, 研究方向为水产品安全与质量, xuyingjiang@yeah.net

混合 2 min, 超声提取 30 min, 然后以 8 000 r/min 离心 10 min; 上清液转移至另一 50 mL 离心管中, 加入 PSA 吸附剂 100 mg, 于漩涡混合振荡仪上振荡 1 min, 以 8 000 r/min 离心 10 min; 将上清液转移至棕

色鸡心瓶中, 于 45 °C 下旋转蒸干, 加入乙腈-水(3:7, V/V) 溶液(含 0.1% 甲酸) 1 mL 使溶解, 加入 20 mg PSA, 旋涡 1 min, 转移至 15 mL 离心管中以 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液上机检测。

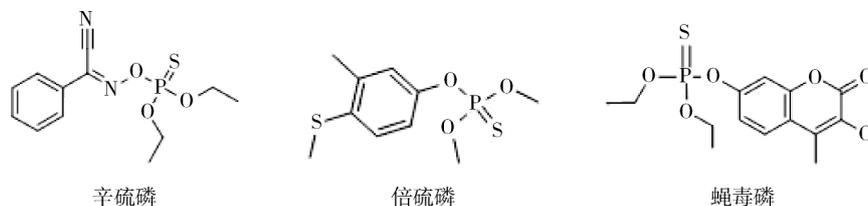


图 1 3 种有机磷农药结构式

Fig. 1 Structural formulas of 3 organophosphorus pesticides

1.3 液相色谱条件

色谱柱为 ACQUITY™ UPLC HSS C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 色谱柱温度为 40 °C; 流动相 A

为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸溶液; 流速为 0.25 mL/min; 进样量为 10 μL。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 3 种有机磷农药液相梯度洗脱程序表

Tab. 1 Programs of gradient elution for 3 organophosphorus pesticide

时间/min Time	流速/(mL · min ⁻¹) Flow rate	体积分数/% Volume-volume percentage	
		φ(A)	φ(B)
0.00	0.25	5	95
1.00	0.25	5	95
2.00	0.25	95	5
4.00	0.25	95	5
4.50	0.25	5	95
5.00	0.25	5	95

注: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸溶液。

1.4 质谱条件

配制 3 种有机磷农药自动优化液(均为 1 μg/mL), 采用蠕动泵进样方式(20 μL/min), 自动优化, 优化的质谱条件如下所示: 正离子(EI⁺) 电离; 电离电

压为 2.50 kV; 锥孔电压为 30 V; 离子源温度为 40 °C; 锥孔反吹气流速为 50 L/h; 脱溶剂气温度为 400 °C; 脱溶剂气流速为 700 L/h; 氩气流速为 0.12 mL/min; 其他参数见表 2。

表 2 3 种有机磷农药在正电离子喷射模式的 UPLC-ESI-MS/MS 仪器参数

Tab. 2 UPLC-MS/MS parameters for 3 organophosphorus pesticides in positive electrospray ionization mode

化合物 Compound	母离子(m/z) Parent ion	子离子(m/z) Daughter ion	锥孔电压/V Cone voltage	碰撞能量/eV Collision energy
辛硫磷	299.0	129.0*, 153.0	22, 22	13, 7
倍硫磷	279.1	169.1, 247.1*	36, 36	16, 13
蝇毒磷	363.0	307.0*, 289.0	32, 32	16, 24

注: * 代表定量离子。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的确定

2.1.1 光照的影响

本研究在实验过程中发现辛硫磷在光照下易分解,而蝇毒磷与倍硫磷对光照敏感度不高,详见图2。因此实验过程中需要进行避光操作。

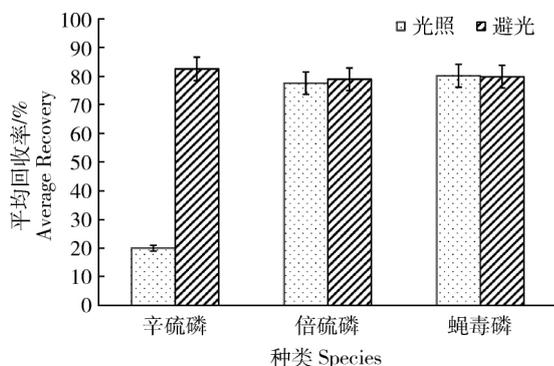


图2 光照对辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷回收率的影响($n=3$)

Fig. 2 Effects of illumination on the recovery of phoxim, fenthion and coumaphos

2.1.2 提取溶剂的选择

辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷的极性较强,辛硫磷在酸性条件下稳定,参考相关的标准和文献^[11-13],本研究对比了乙腈、乙酸乙酯、酸化乙腈(含1%乙酸)、酸化乙酸乙酯(含1%乙酸)的提取效率,结果发现采用酸化乙腈3种目标物平均回收率均能满足要求,故确定酸化乙腈作为提取溶剂(图3)。

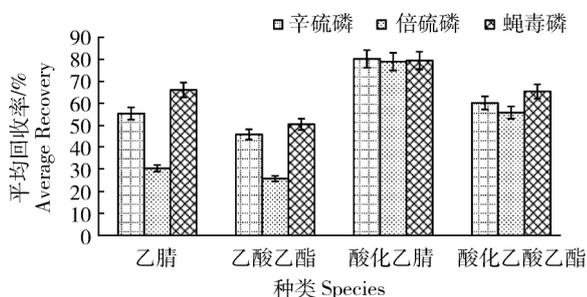


图3 不同萃取剂对回收率的影响($n=3$)

Fig. 3 Effects of different extraction solvents on recovery

2.1.3 净化条件的选择

实验对比了 C_{18} 吸附剂、PSA吸附剂、正己烷和凝胶色谱净化对目标物回收率的影响,结果见图4。 C_{18} 吸附剂对倍硫磷有吸附,会严重影响回收率;正己烷

净化对蝇毒磷的回收率影响比较大;凝胶色谱的平均回收率虽然比较好,但是显著增加了样品前处理时间和成本;而PSA吸附剂净化效果满足实验要求,因此本研究采用PSA吸附剂进行净化操作。

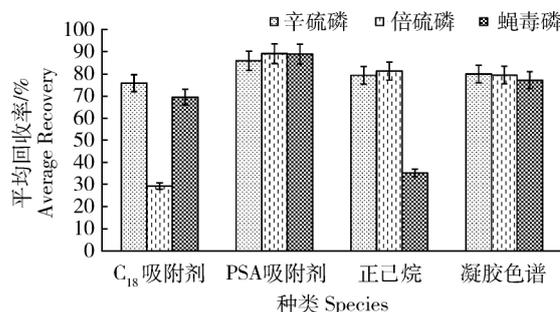


图4 不同净化剂对回收率的影响($n=3$)

Fig. 4 Effects of different decontaminants on recovery

2.1.4 定容液的选择

定容液能影响目标物的峰形和响应值,从而影响定量结果的准确性。本研究发现定容液中不添加甲酸对辛硫磷和倍硫磷回收率影响比较大,采用乙腈-水(3:7, V/V)溶液(含0.1%甲酸)作为最终定容液,3种目标物均得到较好的峰形和响应值。但是倍硫磷的稳定性比较差,实验结果显示100 $\mu\text{g/L}$ 的倍硫磷溶液隔天进样的响应值下降30%左右,因此在样品前处理完成后应及时上机检测。

2.2 液相色谱条件的确定

流动相中,有机相对比了甲醇和乙腈,水相对比了超纯水、0.1%甲酸溶液、5 mmol/L乙酸铵和含有0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液,发现流动相中的酸度对蝇毒磷在质谱的上响应和峰型有比较大的影响,采用乙腈和0.1%甲酸溶液时,分离效果和响应值达到最佳。

2.3 基质效应的研究

基质是指在化学分析中除分析物以外的组分。基质效应现象于1993年首先被Tang等^[16]发现,基质效应是指样品基质中的某些共提取物组分对待测物浓度或质量测定准确度的影响。用一种简单的比值法来评价基质效应:绝对基质效应 = $B/A \times 100\%$,其中A为纯溶剂中待测物的响应值,B为空白样品基质中添加相同含量待测物的响应值。若绝对基质效应大于100%,则表明离子增强,反之则表明离子抑制。一般要求绝对基质效应控制在85%~115%之间^[17]。

在液相色谱串联质谱法中,产生基质效应的原因

也是待测组分与非待测组分之间的竞争关系。带电雾滴在气化形成气态离子时,由于基质中非挥发组分束缚住了挥发组分的离子化,阻止其进一步离子化,使得待测组分的离子化效率降低,即离子化的效率和进入喷雾源的基质有关系^[18-20]。还有人认为基质中高浓度的非待测物质,使得带电雾滴的黏度和表面张力都增强,溶剂挥发的效率降低,阻止更小带电液滴的形成,进而影响待测组分的离子化效率,从而影响待测组分定量的准确度^[19-21]。

取 5.00 g 空白样品于 50 mL 离心管中,按“1.2”方法制得空白基质液,取混合标准工作储备液 100 μL ,分别以含 0.1% 甲酸的乙腈-水溶液(3:7, V/V)及空白基质液为溶剂配制相同浓度的 3 种农药混合溶液,通过测定各农药在空白基质液中的平均响应值($B, n=3$)和在含 0.1% 甲酸的乙腈-水溶液(3:7, V/V)中的平均响应值($A, n=3$)的比值来计算绝对基质效应。如图 5 所示,草鱼、海参、大菱鲆和对虾样品基质中 3

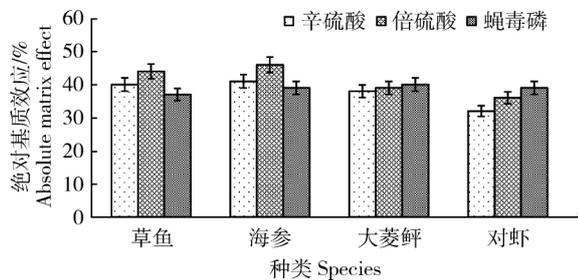


图 5 4 种样品基质中 3 种有机磷农药在 UPLC-MS/MS 分析中的基质效应($n=3$)

Fig. 5 Matrix-effects of 3 organophosphorus pesticides in four samples during UPLC-MS/MS analysis

种农药均存在抑制效应。由于基质效应的产生原因复杂,因而难以根本清除基质效应的影响。目前用以清除或补偿基质效应的方法有基质净化法、同位素内标法、空白基质匹配标准溶液等^[22]。为了能较好地减小基质效应的影响,本实验采用基质匹配标准溶液进行校正。

2.4 标准曲线的绘制

分别用相应的基质溶液配制一系列标准工作溶液 50、100、200、300 和 500 $\mu\text{g/L}$,在优化色谱和质谱条件下进行测定,基质标准溶液色谱图(50 $\mu\text{g/L}$)见图 6,由图 6 可发现辛硫磷基线噪音较蝇毒磷与倍硫磷要高,但信噪比都要大于 10。3 种有机磷农药的线性方程、线性范围和相关系数见表 3,3 种有机磷农药的线性相关系数均大于 0.99。

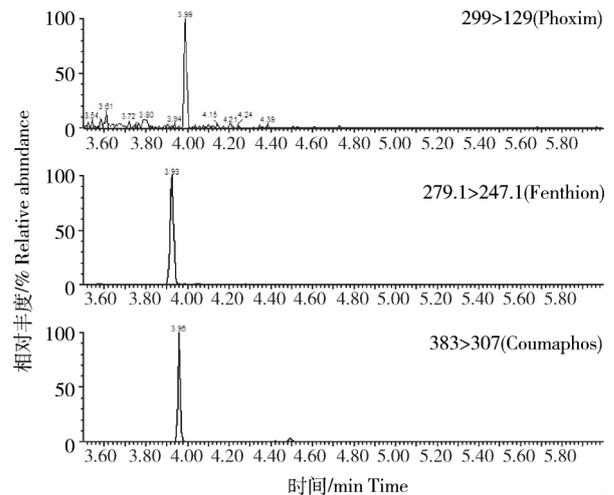


图 6 3 种有机磷农药(50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)选择离子流图

Fig. 6 Selected ions chromatogram of 3 organophosphorus pesticides (50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) in MRM mode

表 3 3 种有机磷农药的线性方程、线性范围和相关系数

Tab. 3 Linear equations, linearity ranges and correlation coefficients for 3 organophosphorus pesticides

化合物 Compound	线性方程 Linear equations	线性范围/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) Linearity range	相关系数 Correlation coefficient
辛硫磷	$Y = 120.741X + 369.296$	50 ~ 500	0.996
倍硫磷	$Y = 1971.74X + 3342.58$	50 ~ 500	0.993
蝇毒磷	$Y = 2276.2X + 5630.79$	50 ~ 500	0.998

2.5 检出限、回收率及变异系数

以 3 种有机磷农药在 4 种水产品基质中的信噪比大于 3 时作为检出限,本方法的检出限均为 10 $\mu\text{g/kg}$;以 3 种有机磷农药在 4 种水产品基质中的信噪比大于

10、回收率在 70% ~ 120% 时为定量限,本方法的定量限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。实验采用草鱼、海参、大菱鲆和对虾作为空白样品,添加有机磷农药分别为 20、50 和 100 $\mu\text{g/kg}$,回收率及相对标准偏差情况见表 4。

表4 3种有机磷农药回收率及变异系数

Tab.4 Recoveries and relative standard deviations for 3 organophosphorus pesticides

n=3

化合物 Compound	基质 Matrix	20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$		50 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$		100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	
		平均回收率/% Average Recovery	相对标准 偏差/% RSD	平均回收率/% Average Recovery	相对标准 偏差/% RSD	平均回收率/% Average Recovery	相对标准 偏差/% RSD
辛硫磷	草鱼	98.2	11.9	96.0	13.1	91.4	11.7
	海参	89.7	13.4	91.5	14.2	87.6	14.9
	大菱鲆	92.3	11.9	85.1	11.8	85.5	12.6
	对虾	74.1	14.5	94.9	14.9	87.8	12.3
倍硫磷	草鱼	90.2	12.2	92.6	15.5	76.8	11.9
	海参	65.8	15.8	94.9	15.7	79.6	15.7
	大菱鲆	93.1	15.5	73.2	14.8	89.4	13.1
	对虾	95.0	16.0	100.0	14.0	72.1	12.6
蝇毒磷	草鱼	72.2	13.4	69.3	13.3	84.2	15.0
	海参	77.0	12.5	87.1	14.4	83.9	13.7
	大菱鲆	79.0	11.4	68.5	14.4	88.4	11.4
	对虾	73.9	12.7	81.9	14.3	101.0	13.0

2.6 市售动物源性样品检测情况

考虑到样品基质的多样性,本实验对某市农贸市场销售的草鱼、海参、大菱鲆和对虾4个批次20个样品进行采样分析,未发现这3种农药残留情况。有机磷农药不是渔业生产的投入品,水产品中有机磷农药残留的来源主要是环境污染,或是由于环境突发事件引起,因此市售样品没有检出有机磷农药是正常的。

3 结论

本研究建立了水产品中辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷3种有机磷农药的超高效液相色谱串联质谱测定方法。样品经PSA吸附杂质后旋转蒸发浓缩,ACQUITYTM UPLC HSS C₁₈色谱柱分离,多反应监测模式下定性及定量分析,外标法定量。由于水产品基质对辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷有很强的抑制效应,因此采用了相应的基质标准曲线定量。方法检出限为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在20、50和100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平加标,平均回收率为65.8%~101.0% 相对标准偏差在16.0%以内。该方法灵敏度高、操作简单高效,适用于水产品中3种有机磷农药的定量及确证分析。

参考文献:

[1] 熊强,焦立新,王圣瑞,等.滇池沉积物有机磷垂直分

布特征及其生物有效性[J].环境科学,2014,35(11):4118-4256.

[2] 张晓军,李绪录,许春玲,等.深圳湾及邻近水域溶解有机磷的分布和来源及其生物利用率[J].环境科学研究,2017,30(2):232-239.

[3] 兰子尧,林野,赵松华,等.气相色谱法测定蔬菜中9种有机磷农药的残留量[J].贵州医药,2016,40(4):378-379.

[4] 杨英桂,马玉花,田种存.气相色谱法测定蔬菜中多种有机磷农药残留量方法的研究[J].青海大学学报(自然科学版),2014,32(6):46-51.

[5] 郑丽卿,崔锦良,司文会.气相色谱法测定大米中有机磷类农药残留[J].农产品质量安全,2016(4):45-51.

[6] 宋鑫,王芹,杭学宇.气相色谱-质谱法检测蔬菜中有机磷类农药残留[J].国际检验医学杂志,2016,37(3):340-341.

[7] 杜艳,马萍,张建玲.气质联用法同时测定青稞中11种有机磷农药[J].粮油食品科技,2017,25(1):48-50.

[8] 李家春,伍静玲,秦建平,等.基于QuEChERS法-超高效液相色谱-串联质谱法的5种中药材中35种有机磷农药残留量的快速分析[J].药物分析杂志,2016,36(1):122-128.

[9] 张冬冬,孙佳鹏,张忠宝,等.液相色谱-串联质谱法测定人参中辛硫磷残留量[J].吉林农业科技学院学报,2015(2):12-14.

[10] 罗梅梅,朱晓丹,贺敏,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测韭菜中4种杀虫剂残留[J].农药,2014,53

- (11): 821-824.
- [11] 唐林,王银辉,汤有宏,等. 基于 UPLC-MS-MS 检测白酒中辛硫磷含量及安全评估[J]. 酿酒, 2016, 43(1): 68-70.
- [12] 韩天玮,李君,徐丽莉. 气相色谱法测定水中有机磷农药和阿特拉津[J]. 仪器仪表与分析监测, 2011, 27(2): 34-36.
- [13] 孙涛,周晓龙,王建梅. 气相色谱法测定牛初乳中甲胺磷、马拉硫磷、倍硫磷的残留[J]. 现代科学仪器, 2016(1): 74-75.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1776—2006 进出口动物源食品中9种有机磷农药残留量检测方法气相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局发布, SN/T 0123—2010 进出口动物源食品中有机磷农药残留量检测方法气相色谱质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [16] Tang L, Kebarle P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the desorbed solution[J]. Anal Chem, 1993, 65(24): 3654-3668.
- [17] Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3019-3030.
- [18] King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, et al. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization[J]. J Am Soc Mass Spectr, 2000, 11(11): 942-950.
- [19] 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.
- [20] 贾彦波,王清清,宋海峰. 高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MSn)分析生物样品时的基质效应研究[J]. 军事医学, 2011, 35(2): 149-152.
- [21] Antignac J P, Wasch K D, Monteau F, et al. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis[J]. Anal Chim Acta, 2005, 529(1/2): 129-136.
- [22] 于建华,朱梅华,吉绍长,等. 色谱法测定多种农药残留的基质效应研究进展[J]. 广东化工, 2017, 44(3): 101-104.

Detection of phoxim, fenthion and coumaphos in aquatic products by UPLC-MS/MS

REN Chuanbo^{1,2}, WU Mengmeng³, WANG Qian⁴, XUE Jinglin^{1,2}, ZHANG Huawei^{1,2},
HAN Dianfeng^{1,2}, TIAN Xiuhui^{1,2}, GONG Xianghong^{1,2}, XU Yingjiang^{1,2*}

(1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Marine Ecology Restoration, Yantai 264006, China; 3. Shandong Freshwater Fisheries Research Institute, Jinan 250000, China; 4. Zibo Dean Environment Monitoring Co., Ltd, Zibo 255000, China)

Abstract [Aim] A method was developed for determining simultaneously of phoxim, fenthion and coumaphos residues in aquatic products. [Method] The samples were extracted with acidic acetonitrile, cleaned up using PSA adsorbent, detected quantitatively by UPLC-MS/MS with external standard method by matrix-match standard solution. [Result] At the spiked level of 10 ~ 100 µg/kg, the linear correlation coefficient (*R*) is greater than 0.99, the average recoveries of the 3 organophosphorus pesticides were ranged from 65.8% to 101.0% with 11.4% ~ 16.0% relative standard deviations. The detection limit of these three pesticides was 10 µg/kg and the quantitation limit was 20 µg/kg. [Conclusion] The method was simple and reliable, and could meet the requirement of 3 organophosphorus pesticide residue analysis. It could be applied to determine simultaneously phoxim, fenthion and coumaphos in aquatic products. [Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(5): 39-44]

Key words: aquatic product; phoxim; fenthion; coumaphos; UPLC-MS/MS

Corresponding author: XU Yingjiang, xuyingjiang@yeah.net