2014 年 5 月 分 析 试 验 室 Vol. 33 No. 5
第 33 卷 第 5 期 Chinese Journal of Analysis Laboratory 537 ~541

DOI: 10. 13595/j. cnki. issn1000-0720. 2014. 0124

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

李 捷，杨 方*，卢声宇，刘正才，王 彦，蓝锦昌，江锦彬，陈言贵
（福建出入境检验检疫局，福州 350001）

摘 要：建立了同时检测茶叶中敌草快和百草枯残留的超高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱法。试样中的农药残留采用乙腈 - 体积分数 2% 甲酸溶液（3∶7，*V/V*）提取，提取液经强阳离子交换固相萃取柱净化，Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC（2. 1 mm ×50 mm，1. 7 μm）柱分离，多反应监测（MRM）正离子扫描方式质谱检测，外标法定量。方法对茶叶中敌草快和百草枯的检出限分别为 5. 0 μg/kg 和1. 5 μg/kg，在定量限、2 倍定量限和 MRL 3 个添加水平的平均回收率为 80. 3% ~94. 8%，相对标准偏差为 4. 0% ~10%。

关键词：敌草快；百草枯；超高效液相色谱 - 串联质谱法；残留；茶叶
中图分类号：O657. 63 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-0720(2014)05-0537-05

敌草快（1，1′- 亚乙基 - 2，2′- 联吡啶二溴盐）与百草枯（1，1′- 二甲基 - 4，4′- 联吡啶二氯盐）是优良的联吡啶类内吸性触杀灭生性除草剂，广泛用于去除茶园、果园中的杂草。这两种化合物结构稳定，有可能在茶叶等农作物中残留并给人体或环境带来危害，各国对此制定了最大残留限量（MRL），如日本规定敌草快和百草枯在茶叶中的 MRL 值均为 0. 3 mg/kg；欧盟和国际食品法典委员会（CAC）也分别规定了茶叶中百草枯的最大残留限量为 0. 1 mg/kg 和 0. 2 mg/kg。

目前常用的敌草快和百草枯检测方法有气相色谱质谱联用法[1]、液相色谱法[2,3]、毛细管电泳法[4]和液相色谱 - 质谱联用法[5,6]。本文采用超高效液相色谱串联质谱法，敌草快和百草枯标准品的检出限分别为 0. 5 μg/kg 和 0. 1 μg/kg，分析单个样品时间 6 min，具有灵敏度高、特异性强、分析速度快的优点，适合这两种农药的检测。现有文献报道主要针对环境样品（水或土壤）或者蔬菜水果，而茶叶基体复杂，色素含量高，并有大量酚类物质及生物碱，对质谱的雾化电离有着较强的抑制作用。本文采用酸化乙腈水溶液提取，Oasis MCX 固相萃取柱净化，建立了茶叶中同时检测敌草快和百草枯的超高效液相色谱 - 串联质谱检测方法，方法选择性好，抗干扰能力强，无需采用基质匹配校准曲线定量，回收率和精密度均能满足残留检测的要求。

1 实验部分

1. 1 实验仪器、试剂与材料

UPLC/Quattra Premier 超高效液相色谱 - 质谱联用仪（美国 Waters 公司），配有电喷雾电离（ESI）源；涡旋振荡器；高速离心机；SPE 净化仪。

甲酸、甲醇、乙腈（色谱纯）；乙酸铵（优级纯）；氨水（体积分数为 25% ~28%）；水为超纯水；Waters Oasis MCX 固相萃取柱（60 mg，3 mL），用前分别以 5 mL 水和 5 mL 甲醇活化。

敌草快（CAS）、百草枯（CAS）标准品（德国 Sigma 公司），分别配制成 100 μg/mL 的标准贮备液，于 4℃ 保存，使用时以 *V*（乙腈）)∶*V*（甲醇）∶*V*（乙酸铵）=65∶25∶10 缓冲液（2. 5 mol/L）稀释成适当浓度的标准工作溶液，现用现配。

1. 2 样品前处理

称取 5. 00 g 样品，加入 3 mL 水浸润 5 min 后再加入 25 mL 乙腈 - 体积分数 2% 甲酸溶液（3∶7，*V/V*）涡旋提取 5 min，18000 r/min 离心5 min，取出

收稿日期：2013-09-22
基金项目：福建省科技攻关重点项目（2012Y6001）和福建省自然基金项目（2012J01060）资助
E-mail：jerry0401410@163. com

上清液，再加入 25 mL 乙腈－体积分数 2% 甲酸溶液（3∶7，V/V）重复提取一次，离心后合并上清液，定容至 50 mL，取 10 mL 过 Oasis 强阳离子固相萃取柱，分别以 5 mL 甲酸溶液（2∶98，V/V）、水、甲醇、氨水－甲醇溶液（5∶95，V/V）淋洗，5 mL 氨水－甲醇－乙酸铵缓冲液（2.5 mol/L）（2.5∶95∶2.5，V/V）洗脱并收集，45 ℃氮吹至近干后以乙腈－甲醇－乙酸铵缓冲液（2.5 mol/L）（65∶25∶10，V/V）定容至 10.00 mL，混匀后过 0.22 μm 有机滤膜，待测。

1.3 仪器条件

1.3.1 **色谱条件** 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH HILIC 柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）；柱温35 ℃；进样量 5 μL；流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵缓冲液－体积分数 0.2 % 甲酸，B 为乙腈；梯度洗脱，起始比例 A 为 10 %，并维持至 1 min，1～2 min，A 由 10 % 升至 50 %，并维持至 3.5 min，4 min 后恢复至起始比例平衡系统至 6 min；流速 0.30 mL/min。

1.3.2 **质谱条件** 电离方式：电喷雾电离源（ESI）；扫描方式：多反应监测（MRM），正离子模式；电离电压：3.0 kV；锥孔电压：30 V；离子源温度：110 ℃；脱溶剂气温度：350 ℃；锥孔反吹气流速：45 L/h；脱溶剂气流速：800 L/h。质谱检测参数见表 1。

表 1　敌草快和百草枯的检测参数

Tab. 1　Mass parameters for detection of diquat and paraquat

被测物	保留时间 t/min	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压 E/V	碰撞能量 CE/eV	驻留时间 t/s
敌草快	2.19	183.1	157.1*	30	15	0.10
			130.1		30	0.10
百草枯	2.89	171.0	154.9*	30	25	0.10
			77.2		30	0.10

*：定量离子

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

作为碱性离子型化合物，敌草快和百草枯均易溶于酸性水溶液而不易溶于乙腈等有机试剂中，但是实验中发现单纯的酸性水溶液对茶叶中的这两种农药的提取率并不高，回收率均不超过 40%，而通过加入一定比例的乙腈得到的混合溶剂可以显著提高目标农药的回收率，本文比较了不同比例的乙腈－体积分数 2% 甲酸水溶液的提取效率（图 1），发现

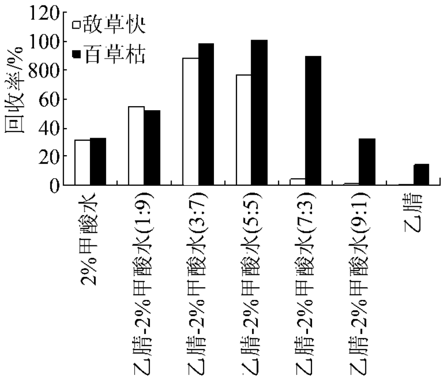

图 1　各种不同提取剂对绿茶中敌草快和百草枯的回收率比较

Fig. 1　Comparison of recoveries with different extraction reagents for diquat and paraquat in green tea

乙腈－体积分数 2% 甲酸水溶液（3∶7，V/V）和乙腈－体积分数 2% 甲酸水溶液（5∶5，V/V）对茶叶中的敌草快和百草枯的提取回收率均超过 80%，但是乙腈－体积分数 2% 甲酸水溶液（3∶7，V/V）提取的色素较少，有利于后续净化，故选为提取试剂。

2.2 净化方式的选择

敌草快和百草枯在酸性溶液中主要以离子形式存在，故可以采用离子交换固相柱净化，在比较了 Oasis MCX（强阳离子交换柱）和 WCX（弱阳离子交换柱）两种萃取柱的净化效果后，发现用 WCX 净化，虽然百草枯的回收率超过 90%，但是敌草快的回收率却为 0；而用 MCX 净化时，由于敌草快和百草枯的 pKa 都大于 10，MCX 柱填料与这两种农药均有很强的相互作用力，可以用氨水－甲醇溶液（5∶95，V/V）淋洗柱子去除大部分弱碱性色素等杂质，却不会造成目标物的损失，达到较好的净化效果，最终目标物采用离子强度更大洗脱能力更强的氨水－甲醇－乙酸铵缓冲液（2.5 mol/L）（2.5∶95∶2.5，V/V/V）实现了较完全洗脱，故选用 MCX 净化，其洗脱曲线见图 2。

由于洗脱试剂使用了一定量的乙酸铵，如果用乙腈比例较高的溶液定容，会因为盐析作用而产生分层现象；如果单纯用甲醇溶液或者乙腈比例较低

的溶液定容,则峰形较宽、拖尾严重。实验中通过调整乙腈 - 甲醇 - 乙酸铵缓冲液(2.5 mol/L)的比例,最终选用乙腈 - 甲醇 - 乙酸铵缓冲液(2.5 mol/L)(65:25:10,V/V/V)为定容液。

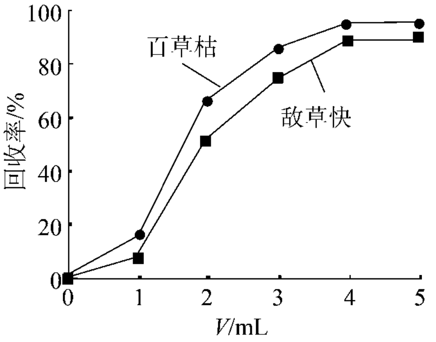

图 2　敌草快和百草枯的标准溶液在 MCX 小柱上的洗脱曲线

Fig. 2　Elution curves of diquat and paraquat on a MCX column

2.3　检测条件的优化

由于敌草快和百草枯极性较强,在反相色谱柱上的保留时间极短,难以有效分离。本实验选用 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC(2.1 mm × 50 mm,1.7 μm)亲水型色谱柱进行分析,实现了敌草快和百草枯在色谱柱上较好的保留与分离。

用蠕动泵以流动进样的方式对 0.1 mg/L 的敌草快和百草枯的标准溶液进行母离子扫描,在比较了电离模式后,发现在正离子电离条件下敌草快与百草枯灵敏度较高,故选用正离子模式扫描;再对母离子施加一定的碰撞能量,使其产生特定的子离子。

选取丰度较强且干扰较小的两对子离子,以 MRM 模式优化各质谱参数。在本操作条件下,茶叶中添加 MRL 水平的敌草快和百草枯的 MRM 色谱图见图 3 所示,空白茶叶样品谱图见图 4 所示。

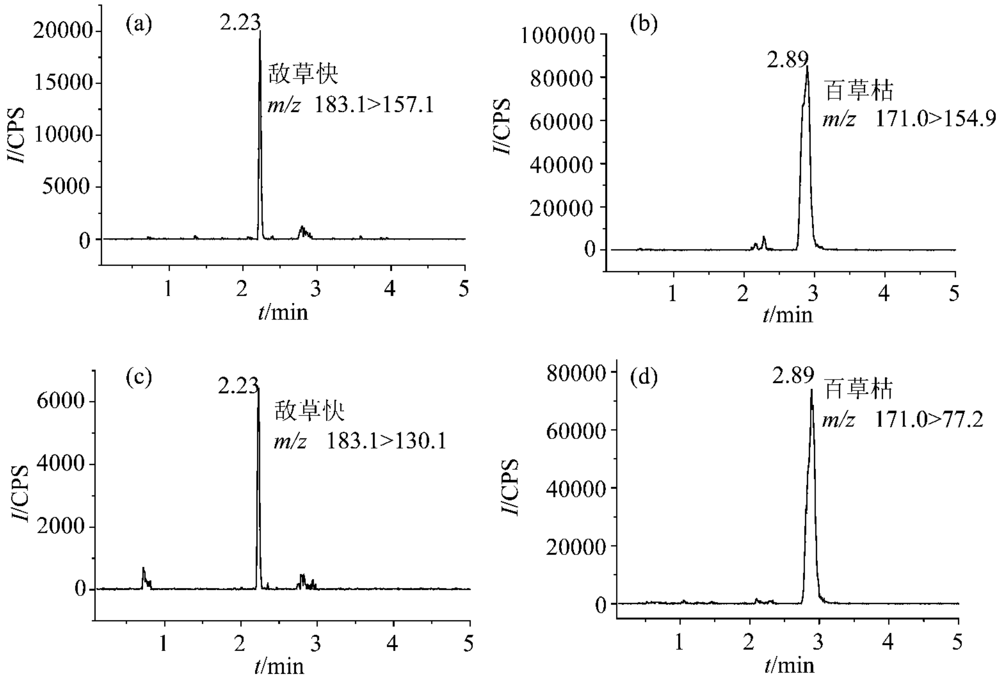

图 3　绿茶中的 0.3 mg/kg 的敌草快和百草枯的添加回收 MRM 谱图

Fig. 3　The MRM chromatograms of a green tea sample spiked with diquat and paraquat at 0.3 mg/kg

2.4　基质效应的考察

液相色谱 - 质谱方法的开发和确证过程中需要对基质效应做出评价。本实验以空白绿茶、红茶、乌龙茶为基体,按 1.2 节所述方法进行前处理,定容前加入标准品,通过配制 2,5,10,20,50 μg/L 6 个浓度点的基质匹配校准曲线和标准工作曲线,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标作图。一般认为,基质匹配校准曲线和标准工作曲线斜率比值在 85% ~115% 之间不存在明显的基质效应,可以直接用标准工作曲线定量[7]。实验结果表明,在绿茶、红茶、乌龙茶中敌草快和百草枯的基质匹配校准曲线的斜率为标准工作曲线斜率的 85% ~ 105%,故本文采用标准工作曲线来进行定量,敌草快和百草枯在茶叶基质中的基质匹配校准曲线与标准工作曲线的斜率比值见表 2。

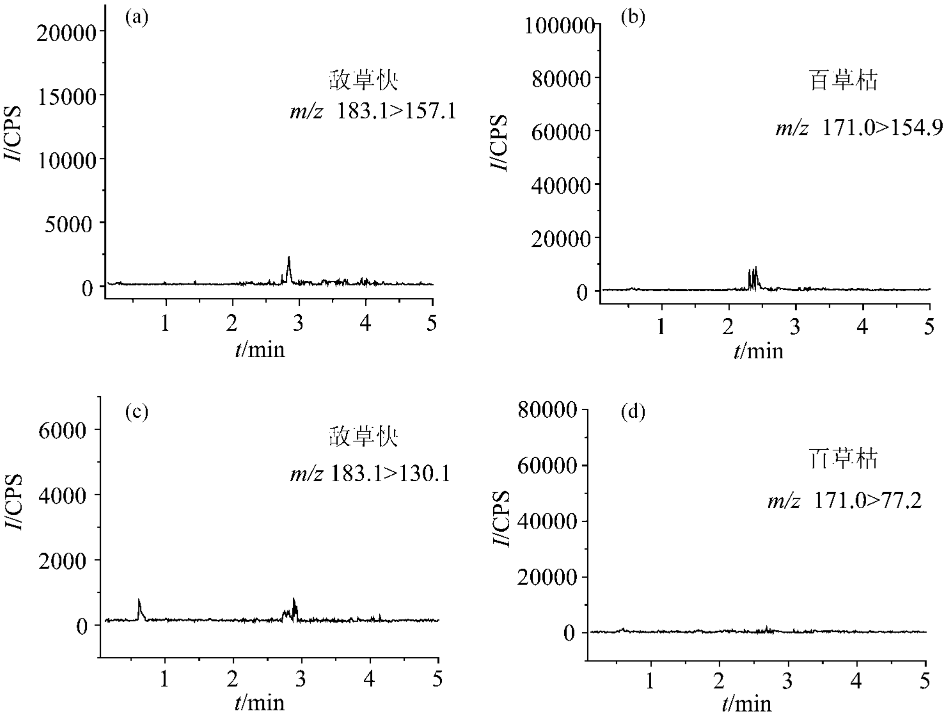

图 4 空白绿茶样品 MRM 谱图

Fig. 4 The MRM chromatograms of a blank green tea sample

表 2 敌草快和百草枯的标准工作曲线与茶叶基质匹配校准曲线的斜率比值

Tab. 2 The slope ratios of the matrix curves to standard curves for diquat and paraquat

化合物	绿茶/%	红茶/%	乌龙茶/%
敌草快	104.2	92.1	94.5
百草枯	96.0	85.9	88.7

2.5 线性关系、方法检出限及回收率、精密度试验

方法的检出限(LOD)定义为产生 3 倍信噪比(S/N = 3)的化合物的质量浓度,定量限(LOQ)定义为产生 10 倍信噪比(S/N = 10)的化合物的质量浓度。选取一系列较低质量浓度的敌草快和百草枯的混合标准溶液,按 1.2 节的方法进行前处理和 1.3 节的仪器条件进行分析检测,测得本方法对敌草快和百草枯的检出限(LOD)分别为 5.0 和 1.5 μg/kg,定量限(LOQ)分别为 20.0 和 5.0 μg/kg。敌草快在 2 ~ 50.0 μg/L范围,百草枯在 0.5 ~ 50.0 μg/L 范围内峰面积与样液浓度呈线性相关。敌草快的回归方程为 $y = 83.164x + 13.317$,相关系数 0.9988;百草枯的回归方程为 $y = 1739.69x - 419.55$,相关系数 0.9995。以空白绿茶、红茶、乌龙茶样品作为基质,分别添加相当于定量限、2 倍定量限、MRL 水平的标准品,按所上述方法进行分析检测,采用标准工作曲线外标法定量,每个加标水平平行测定 6 次,加标回收率与精密度见表 3。由表 3 可知,本法的准确度与精密度均能满足植物源性食品中农药残留检测的需要。

表 3 空白茶叶(绿茶、红茶和乌龙茶)中敌草快和百草枯的加标回收率和精密度(n = 6)

Tab. 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of diquat and paraquat spiked in blank tea (green tea, black tea and olong tea) (n = 6)

化合物	加标量 w/(μg/kg)	绿茶		红茶		乌龙茶	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
敌草快	20	88.5	4.4	82.9	6.8	86.4	5.3
	40	90.3	4.0	85.4	5.3	86.6	7.3
	300	87.8	6.2	83.2	6.3	83.3	6.8
百草枯	5	93.2	8.2	80.3	7.3	83.2	7.7
	10	94.8	6.3	82.5	6.9	82.7	9.9
	300	90.1	9.2	83.0	8.7	81.9	8.7

2.6　方法的应用

用本文建立的方法对 5 份红茶,10 份乌龙茶、10 份绿茶样品进行检测,其中 1 份绿茶样品检出百草枯,含量为 11.2 μg/kg。其他均未检出。

参考文献

[1] Rafael Menck de Almeida, Mauricio Yonamine. J Chromatogr B, 2007, 853: 260

[2] Raquel Rial-Otero, Beatriz Cancho-Grande, Concepcion Perez-Lamela, *et al*. J Chromatogr Sci, 2006, 44 (9): 539

[3] 朱光艳,秦冬梅,龚　勇. 农药科学与管理,2008, 29(7): 11

[4] Zhou Q X, Mao J L, Xiao J P, *et al*. Anal Methods, 2010, 2: 1063

[5] Maria A, Aramendia V, Borau, Fernando Lafont, *et al*. Food Chem, 2006, 97 (1): 181

[6] 薄海波. 色谱,2011, 29(2): 180

[7] Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. Anal Chem, 2003,75: 3019

Determination of diquat and paraquat residues in tea by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

LI Jie, *YANG Fang**, *LU Sheng-yu*, *LIU Zheng-cai*, *WANG Yan*, *LAN Jin-chang*, *JIANG Jin-bin* and *CHEN Yan-gui* (Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001), Fenxi Shiyanshi, 2014, 33(5): 537 ~ 541

Abstract: A method of ultra - performance liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry was developed for the determination of diquat and paraquat residues in tea. The residues were extracted by acetonitrile - water solution (containing 2% formic acid) (3 : 7, *V/V*), and then cleaned - up by mixed cation exchange solid phase extraction cartridges. The compounds were separated on the Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) column and detected by mass spectrometry under multiple reaction mode (MRM). The limits of detection of diquat and paraquat for tea were 5.0 μg/kg and 1.5 μg/kg, respectively. The average recoveries and the relative standard deviations at three concentration levels of LOQ, 2 times of LOQ and MRL ranged from 80.3% to 94.8% and 4.0% ~ 10%, respectively. The method was sensitive and selective without interference and suitable for the determination of diquat and paraquat residues in tea.

Keywords: Diquat; Paraquat; Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Residues; Tea