

王多娇,周 玮,颜春荣,等. 快速 SPE-UPLC-MS/MS 同时测定茶叶中的 5 种农药残留[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):280-282.

# 快速 SPE-UPLC-MS/MS 同时测定 茶叶中的 5 种农药残留

王多娇<sup>1</sup>, 周 玮<sup>2</sup>, 颜春荣, 徐春祥<sup>1</sup>

(1. 江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏南京 210008; 2. 江苏省产品质量监督检验研究院食品检测中心, 江苏南京 210006)

**摘要:**建立了同时快速分析茶叶中 5 种农药残留的方法。茶叶经粉碎后,乙腈提取,低温离心后,取乙腈层过 Cleanert NANO CARB 净化柱,采用超高压液相色谱-串联质谱法分离、测定。结果表明灭多威、多菌灵、噻虫嗪、吡虫啉在 2~50  $\mu\text{g/L}$ 、杀螟丹在 10~200  $\mu\text{g/L}$  范围内呈良好的线性关系,不同浓度(1、2、5、10 倍定量限浓度)回收率为 82.9%~106.0%,相对标准偏差( $n=5$ )小于 15%,灭多威、多菌灵、噻虫嗪、吡虫啉和杀螟丹的定量限分别为 3.0、1.0、5.0、5.0、20.0  $\mu\text{g/kg}$ 。本方法简便、快速、重现性好,适用于茶叶中多种农药残留的测定。

**关键词:**茶叶;农药残留;Cleanert NANO CARB 固相萃取柱;超高压液相色谱-串联质谱;前处理

**中图分类号:** TS207.5<sup>+</sup>3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0280-03

茶叶是我国的传统饮料,但是农药残留问题影响了人们对茶叶的消费信心,甚至阻碍了茶叶出口贸易,研究茶叶中农药残留检测方法对于茶叶质量安全具有重要意义。目前,茶

叶中农药残留的分析检测方法主要有气相色谱法<sup>[1]</sup>、气相色谱-质谱联用法<sup>[2-5]</sup>、液相色谱-质谱联用法<sup>[6-9]</sup>,气相色谱-质谱联用法仅在应用于有机氯的分析时相对于液相色谱-质谱联用法有一定的优势<sup>[10]</sup>,且气相色谱法分析周期较长,而液相色谱-串联质谱法具有灵敏度高、特异性强、适于高通量检测的特点。样品的前处理方法主要有基质固相分散法<sup>[2,9]</sup>、凝胶色谱净化<sup>[3]</sup>、有机溶剂提取或采用有机溶剂提取后经固相萃取小柱净化<sup>[1,4,7]</sup>等。凝胶色谱净化法主要用于去除大分子量的物质如油脂、蛋白等,前处理时间较长、溶剂消耗量大,在茶叶的农残分析中应用不多;固相萃取法

收稿日期:2014-06-11

基金项目:江苏省质量技术监督局资助项目(编号:KJ112505)。

作者简介:王多娇(1985—),女,江苏丰县人,硕士,助理工程师,主要从事食品安全检测。E-mail: dodocpu@163.com。

通信作者:颜春荣,硕士,工程师,主要从事食品安全检测技术研究。E-mail: chryan2@hotmail.com。

离率为 17.6%。在大连市开发区农副产品批发市场,沙门氏菌表现出了很高的污染率,其他时间在其他农贸市场采集的样品未出现被沙门氏菌污染情况。沙门氏菌是引发食源性疾病最常见的致病菌之一,本研究结果表明,应对市场流通的鲜肉产品引起高度重视。本研究中分离样品污染沙门氏菌的主要原因有 2 个:其一,农贸市场环境为沙门氏菌的生长创造了良好条件,未经消毒而使用的工具污染鲜肉;其二,生猪在宰杀前已经感染沙门氏菌。从 68 份市场猪肉中分离 12 株沙门氏菌,可见市场猪肉污染十分严重,应该加强猪肉屠宰、运输、加工、贮存及销售等环节的管理,防止病原菌污染。

猪源沙门氏菌显示了很高的耐药性,至少可以耐受 1 种抗菌药物,有的甚至可以耐受 6~7 种抗菌药物,虽然耐药率较低,但是沙门氏菌的多重耐药已经成为普遍现象。沙门氏菌的高耐药性不止表现在食品、畜禽上,还会通过食物链传递到人类,使人产生对抗生素的耐药性,从而加大对食源性疾病的治疗难度,因此应加强对食品和药品的监测。

## 参考文献:

- [1] Yang B W, Qu D, Zhang X L, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella serovars* in retail meats of marketplace in Shaanxi, China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141 (1/2): 63-72.

- [2] 张 华. 动物性产品中沙门氏菌的危害及控制措施[J]. 中国动物保健, 2004(6): 8-10.
- [3] 马国柱, 王安礼, 刘长宏, 等. 2002 年陕西省食品中食源性致病菌监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(6): 489-491.
- [4] 张 芳, 马国柱, 潘 立, 等. 陕西省 2002—2006 年食源性致病菌污染状况[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(2): 222-224.
- [5] 张秀丽, 廖兴广, 郝宗宇, 等. 2006—2007 年河南省生肉食品中沙门氏菌的主动监测及其 DNA 指纹图谱库的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(7): 1545-1548.
- [6] 杨保伟, 曲 东, 申进玲, 等. 陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 788-796.
- [7] 杨保伟, 张秀丽, 曲 东, 等. 2007—2008 陕西部分零售畜禽肉沙门氏菌血清型和基因型[J]. 微生物学报, 2010, 50(5): 654-660.
- [8] 刘华伟, 马立农, 郭蔼光, 等. 畜禽及环境中沙门氏菌的 PCR 快速检测与控制[J]. 家畜生态学报, 2005, 26(2): 59-62.
- [9] 刘 渠, 刘衡川, 李灶平, 等. 食品中沙门氏菌的耐药性研究[J]. 现代预防医学, 2004, 31(3): 330-332.
- [10] 陈弟诗, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪霍乱沙门氏菌的分离与鉴定以及 PCR 检测方法的建立[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(20): 6020-6023.
- [11] 关文英, 申志新, 张淑红, 等. 河北省食品中沙门氏菌的耐药性研究[J]. 现代预防医学, 2006, 33(10): 1761-1763.
- [12] 王 娟, 曲志娜, 赵思俊, 等. 禽源大肠杆菌和沙门氏菌耐药性研究[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(5): 64-65.

中,常用的小柱主要有石墨化碳柱、石墨化碳氨基复合柱或 Cleanert TPT 茶叶专用柱,需要经过活化、上样、淋洗和洗脱的步骤,方法较繁琐、回收率相对较低;基质固相分散法具有快速、简便的特点,回收率较高,但过滤头式 SPE 柱前处理更为简单。本研究采用过滤头式 SPE 柱,结合超高效液相色谱的快速和串联质谱的高灵敏度特点,建立了同时测定茶叶中灭多威、多菌灵、噻虫嗪、吡虫啉和杀螟丹的方法,方法具有简便、快速的特点,易于推广使用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

市售茶叶。

灭多威(纯度 98.0%)、吡虫啉(纯度 99.0%)、多菌灵(纯度 99.5%)、杀螟丹(纯度 98.0%)、噻虫嗪(纯度 98.5%)标准品,购于 Dr. Ehrenstorfer 公司;乙腈为色谱纯,冰醋酸为分析纯,水为超纯水;1 mL 过滤头式 SPE 柱(IC-NN1510-C 型,天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

Agilent Technologies 1290 Series 超高压液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司),AB API 4000 plus 串联四极杆质量分析仪(美国 AB SCIEX 公司);Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司);ZD-2 型调速多用振荡器(江苏省金坛市国胜实验仪器厂)。

### 1.2 方法

1.2.1 样品前处理 称取 100 g 茶叶,用粉碎机粉碎,四分法取样,精确称取 5.00 g 左右茶叶粉末于 50 mL 离心管中,加 10 mL 水润湿,准确加入 10 mL 含 1% 冰醋酸的乙腈溶液、2 g 氯化钠,涡旋 3 min,在 4 ℃ 下 10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上层清液 1 mL 用注射器推入 Cleanert NANO CARB 净化柱,流出的净化液用进样小瓶收集,供 LC-MS/MS 分析测定。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (2.1 mm×100 mm,粒径 1.8 μm);流动相:组分 A 为 0.1% 甲酸水溶液,组分 B 是乙腈,梯度洗脱,0→1.0 min(98% A)→2.0 min(80% A)→4.0 min(30% A)→4.1 min(98% A)→6.0 min(98% A);流速:0.2 mL/min;柱温:25 ℃;进样量:10 μL。

1.2.3 质谱条件 离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描;检测方式:MRM 模式;喷雾电压:5 500 V;离子源温度:600 ℃;碰撞气压力:0.082 8 MPa;雾化气压力:0.448 MPa;气帘气压力:0.082 8 MPa;辅助气压力:0.345 MPa;5 种农药残留的质谱分析参数见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理方法的优化

多菌灵、吡虫啉、噻虫嗪、灭多威及杀螟丹这几种农药在乙腈中溶解性均较好,因而选择乙腈作为提取溶剂。茶叶基质较干,加水润湿,可以去除一部分水溶性杂质,提高乙腈的提取效率<sup>[8]</sup>;氯化钠和离心可以促使水和乙腈分层。但是在试验过程中发现,用乙腈配制的杀螟丹标准溶液随放置时间延长会发生降解,因为杀螟丹在酸性条件下稳定,pH 值>9 时即发生降解,其他 4 种农药在酸性条件下亦比较稳定,因而

表 1 5 种农药的质谱分析参数

农药名称	母离子 ( <i>m/z</i> )	子离子( <i>m/z</i> , 定量离子/定性离子)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (V)
多菌灵	192.2	160.0/132.0	70	25/43
吡虫啉	256.2	175.1/209.0	61	24/21
噻虫嗪	291.9	211.1/181.1	62	17/31
灭多威	163.1	88.1/106.1	46	13/13
杀螟丹	238.3	150.0/73.0	28	12/42

配制标准溶液的乙腈及作为提取溶剂的乙腈均需加入 1% 的冰醋酸。文献中关于茶叶中杀螟丹残留的检测多为将其转化为沙蚕毒素来测定,通过测定沙蚕毒素的量,换算为杀螟丹的含量<sup>[9,11]</sup>,直接测定杀螟丹的方法报道不多<sup>[12-13]</sup>;但是通过测定沙蚕毒素来间接测定杀螟丹含量的方法,不仅溶剂消耗多、耗时长,而且如何确定杀螟丹完全转化为沙蚕毒素未见报道,考虑到酸性条件下杀螟丹会以稳定的杀螟丹盐酸盐的形式存在,因而本试验采用酸化后直接测定杀螟丹的方法。

茶叶中富含色素(如叶绿素、胡萝卜素、叶黄素与花青素等)和茶多酚等,是农药残留分析测定时的主要干扰物质。NANO CARB 为一种新型净化材料——碳纳米材料,比普通的石墨化碳黑比表面积大,载样能力强,可以有效去除色素,同时相对于含石墨化碳黑(GCB)和 *N*-丙基乙二胺(PSA)的方法,减少了 GCB 对平面结构农药和 PSA 对杀螟丹<sup>[13]</sup>的吸附作用,相对于传统样品前处理方法,本方法回收率高,且检测时间短,有机化学试剂用量少,可以满足大批量样品快速检测的要求。

### 2.2 色谱及质谱条件的优化

多菌灵、吡虫啉、噻虫嗪、灭多威及杀螟丹极性均较强,适于采用 ESI 源正离子模式进行检测。以流动注射方式对上述几种农药标准溶液进行全扫描,确定其母离子,优化去簇电压(DP)及碰撞能量(CE),得到不同的子离子,选择响应好、稳定的离子对为其定量及定性离子对,所获得质谱参数见表 1。

流动相的组成不仅会影响待分析物的分离度和峰形,在质谱为检测器时,还会影响到待分析物的灵敏度。文献中农药的流动相一般为酸性,其中甲酸可以提高农药的离子化效率,本试验比较了 0.1% 甲酸水-甲醇和 0.1% 甲酸水-乙腈流动相体系,发现 0.1% 甲酸水-乙腈,体系下各色谱峰分离度更好,故选择 0.1% 甲酸水-乙腈作为流动相。图 1 为各待测组分混合标准溶液 MRM 色谱图。

### 2.3 方法的验证

2.3.1 标准曲线和定量限 茶叶为基质的农药残留测定,存在一定的基质效应<sup>[8]</sup>,一般可以采用同位素内标、减少取样量或采用基质匹配标准曲线来降低基质对定量的干扰。本试验采用基质标准曲线进行定量的方式,以尽量减少基质效应干扰。以空白茶叶样品的提取液作为稀释溶液,配成混合系列标准溶液,其中灭多威、多菌灵、噻虫嗪、吡虫啉的浓度范围为 2~50 μg/L,杀螟丹的浓度范围为 10~200 μg/L,以待测组分峰面积(*y*)为纵坐标、待测组分的浓度(*x*, μg/L)为横坐标进行线性回归,线性关系良好。以信噪比(*S/N*)为 3 确定方法的检出限、信噪比(*S/N*)为 10 确定方法的定量限,结果见表 2。

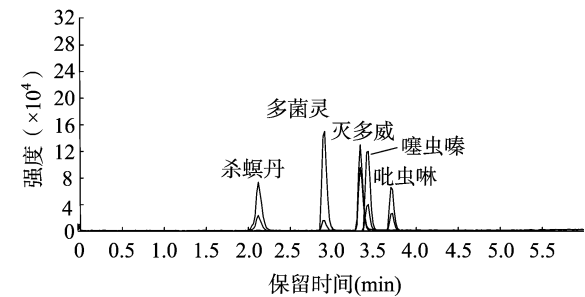


图1 混合标准溶液MRM色谱图

2.3.2 精密度和回收率试验 用空白茶叶样品进行添加回收率和精密度试验,样品中添加1、2、5、10倍定量限 (limit of

表3 5种农药添加回收率和精密度测定结果 (n=6)

农药名称	LOQ		2LOQ		5LOQ		10LOQ	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
灭多威	87.1	8.81	90.2	7.35	95.3	8.56	98.7	6.38
多菌灵	88.8	8.49	93.2	7.08	97.6	5.12	100.8	4.75
噻虫嗪	86.4	8.62	89.5	7.94	94.5	4.57	99.3	4.26
吡虫啉	90.6	7.88	95.3	6.43	98.8	4.36	105.4	5.95
杀螟丹	82.9	9.01	84.7	8.21	89.9	8.12	92.8	7.78

2.4 实际样品分析

应用本试验所建立的方法,对 10 份样品进行分析,结果见表 4。可见,样本中检出频次较多的农药依次为多菌灵、噻

虫嗪和吡虫啉,但都在法规要求的限量范围内,杀螟丹和灭多威未见检出。

表4 实际样品中 5 种农药残留测定值

农药名称	测得值 (μg/kg)									
	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10
灭多威	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
多菌灵	11.3	16.5	ND	ND	ND	ND	ND	7.4	ND	ND
噻虫嗪	ND	ND	ND	ND	ND	8.7	ND	ND	ND	9.6
吡虫啉	13.1	ND	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND
杀螟丹	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注:“ND”表示未检出。

3 结论

本研究建立了乙腈提取、过滤头式 SPE 柱净化,结合超高压液相色谱-串联四极杆质谱同时快速测定茶叶中 5 种农药残留的方法。该方法操作步骤简单,前处理时间短、消耗有机溶剂少,获得了较满意的回收率,适用于大批量样品的快速检测;采用串联质谱分析测定,可同时实现定性判定和定量测定,方法具有较好的重现性,可满足实际检测工作的需要。

参考文献:

[1] 蒋永祥,叶 丽,汤淼荣. 茶叶中 7 种有机磷农药残留量的同时测定[J]. 分析实验室,2007,26(1):97-101.  
[2] 陈晓水,边照阳,杨 飞,等. 对比 3 种不同的 QuEChERS 前处理方式在气相色谱-串联质谱检测分析烟草中上百种农药残留中的应用[J]. 色谱,2013,31(11):1116-1128.  
[3] 蒋俊树,赵 彬,周 莉. 气相色谱-质谱法测定茶叶中 36 种农药残留[J]. 食品科学,2009,30(14):276-280.  
[4] 陈红平,刘 新,汪庆华,等. 气相色谱-质谱法同时测定茶叶中 72 种农药残留量[J]. 食品科学,2011,32(6):159-164.  
[5] 许秀莹,施海燕,王鸣华. 气相色谱-质谱联用测定大米中 6 种烟

表2 5种农药的线性方程和检出限、定量限				
农药名称	线性方程	相关系数 (r)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
灭多威	y = 2 780x + 1 350	0.991	1.0	3.0
多菌灵	y = 8 170x + 3 720	0.996	0.3	1.0
噻虫嗪	y = 851x + 4 320	0.992	1.5	5.0
吡虫啉	y = 1 530x - 968	0.991	1.5	5.0
杀螟丹	y = 624x + 526	0.990	7.0	20.0

quantification, LOQ) 浓度下的标准溶液,混匀,然后按本方法进行提取、净化和测定,其回收率和精密度见表 3。从表 3 可以看出,本方法回收率为 82.9%~106.0%,4 个添加水平的相对标准偏差为 4.26%~9.01%。

碱类农药残留[J]. 质谱学报,2012,33(2):99-103.  
[6] GB/T 23205 茶叶中 448 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].  
[7] 刘 冰,赵红霞. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定茶叶中 18 种农药残留[J]. 分析实验室,2013,32(10):77-83.  
[8] 贾 玮,黄峻榕,凌 云,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定茶叶中 290 种农药残留组分[J]. 分析测试学报,2013,32(1):9-22.  
[9] 王连珠,周 昱,黄小燕,等. 基于 QuEChERS 提取方法优化的液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中 51 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 色谱,2013,31(12):1167-1175.  
[10] Alder L, Greulich K, Kempe G, et al. Residue analysis of 500 high priority pesticides; better by GC-MS or LC-MS/MS[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2006, 25:838-865.  
[11] 吴 刚,虞慧芳,鲍晓霞,等. 茶叶中杀螟丹残留的气相色谱分析方法研究[J]. 中国食品学报,2006,6(5):129-132.  
[12] 吴 刚,虞慧芳,鲍晓霞,等. 气相色谱-微池电子捕获检测器分析茶叶中杀螟丹的残留[J]. 色谱,2007,25(2):288-289.  
[13] 陈红平,刘 新,王川丕,等. 亲水作用色谱-串联质谱法测定茶叶中杀螟丹农药残留量[J]. 分析测试学报,2013,32(5):619-624.