

[13] 毛丹, 许勇, 张道广, 等. HPLC 法测定粮谷中的呕吐毒素 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12):2207-2208.

[14] 李迎梅, 孙晓红, 刘彤, 等. 高效液相色谱检测食品中黄曲霉毒素含量[J]. 中国卫生标准管理, 2014, 5(1):93-94.

[15] 余传霖. 现代医学免疫学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1998: 725-726.

[16] VERHEIJEN R, OSSWALD I K, DIETRICH R, et al. Development of a one step strip test for the detection of ( dihydro) streptomycin residues in raw milk [ J]. Food and Agricultural Immunology, 2000, 12(1): 31-40.

[17] WANG Y, WANG L, ZHANG J, et al. Preparation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Paragonimiasis skrjabini* [ J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92034.

[18] 徐剑宏, 祭芳, 陆琼娴, 等. 谷物真菌毒素的控制策略[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 642-646.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定竹笋中百草枯的残留

纪律, 李启, 雷永良, 徐峻卿  
(丽水市疾病预防控制中心, 浙江 丽水 323000)

**摘 要:****目的** 运用超高效液相色谱-串联质谱联用技术,建立竹笋中百草枯残留的检测方法。**方法** 样品用甲醇-0.1 mol/L 盐酸溶液(1:1, V/V)提取后,经 Oasis WCX 固相萃取柱(60 mg/3 ml)净化,采用 UPLC BEH HILIC 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm)分离,正离子多反应监测模式监测,外标法定量。**结果** 百草枯在 10~500 μg/L 范围内具有良好线性关系,相关系数为 0.998 2,检出限为 2 μg/kg,定量限为 5 μg/kg。进行 5、50 和 200 μg/kg 三个浓度的样品加标试验,回收率为 82.2%~104.8%,相对标准偏差为 8.3%~10.9%。**结论** 该方法简便、灵敏、准确,适合于竹笋中百草枯的检测。

**关键词:**超高效液相色谱-串联质谱;百草枯;竹笋;食品污染物;农药

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)03-0312-04  
DOI:10.13590/j.cjfh.2017.03.012

Determination of paraquat residues in bamboo shoots by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Ji Lyu, Li Qi, Lei Yong-liang, Xu Jun-qing  
(Lishui Center for Disease Prevention and Control, Zhejiang Lishui 323000, China)

**Abstract: Objective** To establish a detection method for paraquat residues in bamboo shoots by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted with methanol-0.1 mol/L hydrochloric acid solution (1:1, V/V). After cleaned up with Oasis WCX solid phase extraction columns (60 mg/3 ml), samples were separated in UPLC BEH HILIC column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm). The analytes were detected with mass spectrometer in multiple reaction monitoring mode with external standard. **Results** It showed good linearity with the correlation coefficients of 0.998 2 in the range of 10-500 μg/L. The limit of detection was 2 μg/kg and the limit of quantitation was 5 μg/kg. Under 5, 50 and 200 μg/kg spiked levels, the recoveries ranged from 82.2% to 104.8% with the relative standard deviation (RSD) of 8.3%-10.9%. **Conclusion** The results indicated that this method was simple, rapid, sensitive and suitable for the determination of paraquat residues in bamboo shoots.

**Key words:** Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; paraquat; bamboo shoots; food contaminants; pesticide

百草枯(paraquat),化学名称为1-1-二甲基-4-4-联吡啶阳离子盐,是一种快速灭生性除草剂,具有广谱速效和触杀作用,对绿色植物有很强的破坏作用,在农业中被广泛推广<sup>[1]</sup>,目前在全球范围内使用的国家和地区超过120个。由于百草枯对人毒性较高<sup>[2]</sup>,是导致人类急性中毒死亡率最高的除草剂,因此,20世纪80年代后期,许多国家已经开始禁止使用百草枯。我国自2016年7月1日停止百草枯在国内的销售和使用。尽管如此,百草枯中毒现象仍有发生,而在实际的农业生产过程中,仍旧存在以百草枯作为除草剂而大量使用的现象。

竹笋是中国传统佳肴,食用和栽培历史极为悠久。百草枯对竹笋的杂草危害起到了控制作用,但由于其残留在不同生长阶段的竹笋中,给食品安全带来隐患,给人类健康带来潜在的威胁,因此,建立快速、高效的检测方法至关重要。

目前,百草枯的检测方法主要有气相色谱法、液相色谱法和质谱法等<sup>[3-4]</sup>。其中,气相色谱法仪器普遍、灵敏度较高,很早就开始被应用于百草枯的检测,但存在百草枯沸点高、难裂解气化、前处理操作繁琐等缺点;液相色谱法是百草枯检测最常用的方法,目前主要有反向色谱法和依托于亲水作用色谱柱法,主要优点在于可以保留碱性化合物,无需使用离子对试剂<sup>[5]</sup>,但其存在灵敏度不高、定性能力差等缺点。超高效液相色谱-串联质谱技术作为近年来得到广泛应用的技术,具有高灵敏度、痕量检测和准确定性等特点<sup>[6]</sup>,成为检测分析的重要手段。本试验基于超高效液相色谱-串联质谱法,在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》<sup>[7]</sup>方法的基础上,进一步优化色谱条件,建立高灵敏度的竹笋中百草枯残留的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

随机采集丽水市农贸市场30份新鲜竹笋样品。

1.1.2 主要仪器与试剂

UPLC/Xevo TQ-S超高效液相色谱-串联质谱仪(配有电喷雾电离源)、Oasis WCX固相萃取柱(60 mg/3 ml)均购自美国Waters,超纯水机,涡旋混匀器,固相萃取仪,高速离心机,氮吹仪。

百草枯标准溶液(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)、甲醇(LC-MS级)、甲酸(LC-MS级)均

购自德国Merck。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

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℃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、20、50、100、200、500 μg/L的标准系列溶液。

1.2.2 样品前处理

称取5 g(精确到0.01 g)均匀样品,置于50 ml具塞离心管中,加入25 ml 甲醇-0.1 mol/L盐酸溶液(1:1,V/V),均质提取1 min,4 000 r/min离心5 min,取上层溶液至50 ml容量瓶中,用水定容至刻度。准确移取10 ml提取液,用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至(7.0±0.1),10 000 r/min离心5 min,待净化。

将上述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)洗脱,收集洗脱液于15 ml刻度离心管中,洗脱液经45℃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,供超高效液相色谱-串联质谱仪测定<sup>[7]</sup>。

1.2.3 仪器条件

色谱:Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),柱温30℃,流速0.4 ml/min,流动相为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:正离子模式(ESI+)扫描,离子源温度150℃,脱溶剂气温度350℃,脱溶剂气流量800 L/h,反吹气流量150 L/h,毛细管电压3.5 kV。质谱参数见表1。

表1 质谱参数

Table 1 Mass parameters					
名称	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	锥孔电压 /V	碰撞电压 /eV	驻留时间 /s
百草枯	185.1	170.1*	40	22	0.05
	171.1	77.0	45	40	0.05

注:\*表示定量离子

2 结果

2.1 前处理方法的考察

目前,SN/T 0293—2014<sup>[7]</sup>的前处理方法为甲醇-盐酸(1:1,V/V)溶液提取两次,合并提取液。竹笋中杂质含量较少<sup>[8]</sup>,本试验对比了一次提取和二次提取的加标回收率,每个加标水平进行3次平行

测试,其平均结果见表 2。可以看出,一次提取的回收率低于二次提取,但仍能达到 80% 以上。由此可见,在样品数量多且检测要求不高的情况下,可用一次提取进行方法的简化。

表 2 不同提取次数的加标回收率( $n=3$ )  
Table 2 Recoveries of different extraction times

加标量/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	一次提取回收率/%	二次提取回收率/%
20	80.3	91.5
100	85.7	103.3
500	82.8	96.2

### 2.2 色谱条件的优化

选取常用的 UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )、UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )、UPLC BEH HILIC 色谱柱(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )和 CORTECS UPLC HILIC 色谱柱(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.6  $\mu\text{m}$ )进行比较。由于百草枯分子具有较强的极性<sup>[9]</sup>,在  $\text{C}_{18}$  和 T3 柱上保留时间短,分离效果不佳。此后,在 HILIC 柱的基础上,进一步比较了 BEH 柱和 CORTECS 柱,发现百草枯在 CORTECS 柱上的保留效果更佳,但其流动相中甲酸铵的浓度需达到 150 mmol/L 才能有较好的峰形和信号响应值,考虑到盐溶液对质谱的影响,故最后仍然选择了 UPLC BEH HILIC 柱。

在 SN/T 0293—2014<sup>[7]</sup> 的方法中,流动相采用的是甲酸-乙腈溶液。在本试验中,采用甲酸-乙腈溶液与甲酸铵-乙腈溶液进行对比,发现甲酸铵-乙腈溶液作为流动相时,百草枯的灵敏度和分离效果都更好,这与其他文献报道<sup>[10]</sup> 相符。在此基础上,首先对流动相甲酸铵水溶液的浓度进行了优化,分别选择了 10、50、100 和 150 mmol/L 四个浓度进行比较。结果显示,甲酸铵浓度越高,出峰越快,信号强度越强,拖尾现象减少。在 10 mmol/L 的条件下,峰形拖尾十分严重,150 mmol/L 的条件下,出峰时间过早,且高浓度的甲酸铵溶液对色谱柱损伤较大,容易导致盐析,故选择了 50 mmol/L 的甲酸铵水溶液进行进一步的优化。百草枯为碱性化合物,流动相的酸度会影响其保留时间<sup>[11-12]</sup>,结果显示,用甲酸调节流动相酸度使 pH 值降低后,百草枯的出峰时间延迟,拖尾现象减少,峰形改善,但过低的 pH 值不利于色谱柱的保护<sup>[13]</sup>,建议 pH 值选择在 3.5~4.5 之间。在此酸度条件下,可进一步降低甲酸铵浓度,在保证百草枯峰形和检出的情况下,最终选择流动相为 20 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈(4:6, V/V),pH=3.7。

### 2.3 质谱条件的优化

根据百草枯的化学结构,选择在 ESI+ 模式下

离子化。百草枯分子极不稳定,容易在电离时发生源内裂解,产生母离子不同的离子对。在参考了相关文献<sup>[14-15]</sup> 的情况下,选定 5 对离子对进行比较,分别为  $m/z$  185.1 > 170.1、185.0 > 169.7、185.0 > 158.1、171.1 > 77.0、171.0 > 154.9。在比较了不同离子对的信号强度后,最终选择了强度最好的两个离子对  $m/z$  185.1 > 170.1 和 171.1 > 77.0,其中  $m/z$  185.1 > 170.1 强度最大,故作为定量离子。在选定离子对的条件下,对离子源温度、锥孔电压、碰撞能量、毛细管电压等参数条件进行了优化,选择出在仪器可承受范围内离子强度最好的条件。

### 2.4 基质效应

为考察竹笋的基质效应,以空白竹笋为基体,按照 1.2.2 方法进行前处理,提取空白基质液配制标准曲线,与以溶剂配制的标准曲线作对比。结果显示,溶剂标准曲线的斜率为 107.295,基质标准曲线的斜率为 115.574,其斜率比值为 1.08,有一定的基质增强作用。一般认为,2 种曲线的斜率比值在 0.8~1.2 之间,则认为基质效应较低<sup>[16]</sup>,可直接用标准工作曲线进行定量分析。

### 2.5 线性范围和检出限

在选定的仪器条件下,按 1.2.1 中配制的标准系列溶液进行测定,标准多反应监测(MRM)色谱图见图 1。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,计算回归方程: $y=107.295x+1784.638$ , $r=0.9982$ ,线性关系良好。根据 3 倍信噪比( $S/N$ )确定百草枯的检出限(LOD)为 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,10 倍信噪比( $S/N$ )确定定量限(LOQ)为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

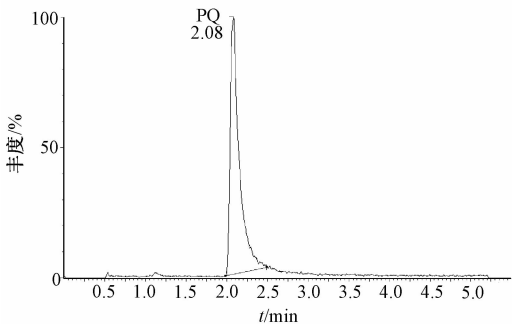


图 1 百草枯标准物质 MRM 色谱图  
Figure1 MRM chromatogram of paraquat standard

### 2.6 回收率和精密度

采用空白竹笋样品进行回收率和精密度试验。样品分别添加百草枯标准溶液,制成 5、50、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三个浓度水平,每个浓度进行 6 次平行试验,回收率在 82.2%~104.8% 之间,相对标准偏差(RSD)在 8.3%~10.9% 之间,符合试验对回收率和精密度的

要求,见表 3。竹笋加标回收 MRM 色谱图见图 2。

表 3 竹笋中百草枯的回收率和精密度 ( $n=6$ )

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of paraquat in blank bamboo

加标量/( $\mu\text{g/kg}$ )	平均回收率/%	RSD/%
5	82.2	10.9
50	104.8	8.3
200	92.5	9.4

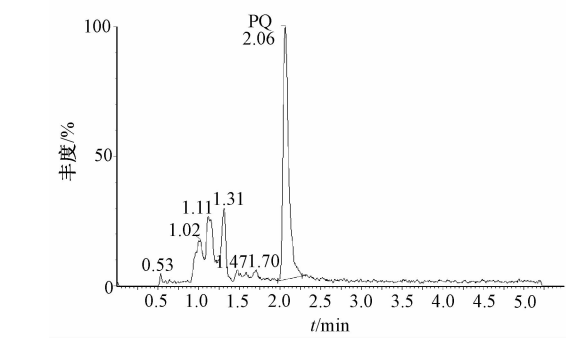


图 2 竹笋加标回收 MRM 色谱图

Figure 2 MRM chromatogram of a bamboo sample spiked with paraquat

2.7 实际样品的检测

利用本方法对 30 份竹笋样品进行检测,其中有 2 份检测出百草枯残留,检测浓度分别为 7.4 和 9.2  $\mu\text{g/kg}$ 。

3 小结

本试验建立了超高效液相色谱-串联质谱法测定竹笋中百草枯残留量的方法。对 SN/T 0293—2014<sup>[7]</sup>中的前处理方法进行了考察,并在流动相中用甲酸铵代替甲酸,优化了流动相的酸度,改善峰形,增加保留时间。该方法分析速度快、灵敏度高、前处理简单,能满足实际工作的需求。在采集的 30 份竹笋样品中有 2 份样品检出百草枯残留,但含量较低,有关部门仍应该加强对百草枯的监督和管理。

参考文献

[ 1 ] 陈珊珊,邓晓,刘景坤,等. 百草枯检测方法的研究进展[J]. 农药,2014,53(1): 4-6.

[ 2 ] 磨静佳,张剑锋,李浩. 百草枯中毒导致急性肺损伤的原理和预防措施[J]. 检验医学与临床,2016,13(14): 1958-1960.

[ 3 ] 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.

[ 4 ] PAIXAO P, COSTA P, BUGALHO T, et al. Simple method for determination of paraquat in plasma and serum of human patients by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 2002, 775(1): 109-113.

[ 5 ] 毕思远,李金峰,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.

[ 6 ] 钟冬莲,丁明,汤富彬,等. 高效液相色谱-串联质谱同时测定毛竹笋中 4 种内源性植物激素[J]. 分析化学,2013,41(11): 1739-1743.

[ 7 ] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 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:SN/T 0293—2014[S]. 北京: 中国标准出版社,2014.

[ 8 ] 丁明,钟冬莲,汤富彬,等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱联用测定竹笋中残留的 7 种杀虫剂农药[J]. 色谱,2013,31(2): 117-121.

[ 9 ] 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.

[ 10 ] 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.

[ 11 ] 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.

[ 12 ] 张宏文,殷志扬,刘强辉,等. 离子对反相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 ] 覃东立,吴松,郑敏,等. 高效液相色谱法测定渔业水域中百草枯和敌草快[J]. 分析试验室,2013,32(2): 54-57.

[ 14 ] 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]. 分析试验室,2014,33(5): 537-541

[ 15 ] 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.

[ 16 ] 刘进玺,秦珊珊,冯书惠,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食用菌中农药多残留的基质效应[J]. 食品科学,2016,37(18): 171-177.