

全自动 QuEChERS 样品制备系统结合超高效液相色谱-串联质谱法测定花椒中 20 种农药残留

钟冬莲, 丁明*

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州 311400)

摘要:建立了全自动 QuEChERS 样品制备系统结合超高效液相色谱-串联质谱法测定花椒中 20 种农药残留分析方法。方法利用全自动 QuEChERS 样品制备系统涡旋振荡和离心功能, 将 QuEChERS 方法中样品提取和分散固相萃取净化完美结合; 优化了全自动 QuEChERS 样品制备系统的操作参数, 在多反应监测 (MRM) 模式下检测, 基质外标法定量。从方法学验证角度对全自动 QuEChERS 法和手动 QuEChERS 法进行了比较。结果表明, 该方法中 20 种农药在 0.005-0.2mg/L 浓度范围内呈现良好的线性关系, 相关系数 (R^2) 均大于 0.995, 检出限范围为 0.4~3.0 $\mu\text{g/kg}$, 定量限范围为 1.8~9.6 $\mu\text{g/kg}$, 方法加标回收率为 62.5~111.2%, RSD 小于 11.8% ($n=6$)。该方法验证结果与手动 QuEChERS 法结果对比, 结果无明显差异, 应用该设备进行食用林产品中农药残留检测进行有大大提高检测效率和降低劳动强度。

关键词: QuEChERS; 液相色谱-串联质谱; 农药残留; 花椒

Automated QuEChERS Sample Preparation System Coupled with Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Determination of 20 Pesticide Residues in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim

Zhong Donglian, Ding Ming

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400)

Abstract: An analytical method was developed for the determination of 20 pesticide residues in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. using an automated QuEChERS sample preparation system coupled with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The automated QuEChERS system integrates vortex vibration and centrifugation functions, seamlessly combining the extraction and dispersive solid phase extraction cleanup steps of the QuEChERS method. The operating parameters of the automated system were optimized. Analytes were

detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified by matrix-matched calibration. The automated and manual QuEChERS methods were compared from a methodological perspective. The results showed that the 20 pesticides exhibited good linearity ($R^2 > 0.995$) over a concentration range of 0.005-0.2 mg/L. The limits of detection were in the range from 0.4-3.0 $\mu\text{g/kg}$ and limits of quantification were in the range from 1.8 - 9.6 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries ranged from 62.5% to 111.2% with relative standard deviations (RSD) less than 11.8% ($n=6$) at three spiked levels. No significant differences were observed between the automated and manual QuEChERS methods. The application of the automated system greatly improved the efficiency and reduced the labor intensity of pesticide residue analysis in edible forest products.

Keywords: QuEChERS; pesticide residue; liquid chromatography-tandem mass spectrometry ; *Zanthoxylum armatum* Maxim.

花椒不仅是中国传统的香辛料^[1], 近些年在医药、防腐、防虫、杀菌及工业等方面具有重要的使用价值^[2-4]。近几年来花椒在国内种植面积越来越大, 病虫害状况也日趋严重^[5,6], 但至目前为止仍没在花椒上登记使用的农药品种, 导致农药滥用严重。最新版《食品安全国家标准食品中农药最大残留限量》(GB 2763-2021)^[7], 仅规定花椒中 8 种农药的最大残留限量值 (MRL), 只规定胺苯磺隆、敌敌畏和杀虫畏三种农药为正式限量值, 其它 5 种均为临时限量值。花椒中化学成分复杂^[8,9], 含挥发油、生物碱、酰胺、脂肪酸、木脂素、甾醇等种类丰富的化合物, 这些物质对花椒中农药残留测定产生严重的基质效应, 从而影响农药残留定性定量的稳定性和准确性。因此, 找到一种花椒中农药残留测定既快速又准确的前处理方法十分重要。QuEChERS 作为一种快速高效前处理技术, 极大简化了样品前处理过程, 目前国际国内农药多残留检测的首选前处理方法^[10-14]。传统手动 QuEChERS 方法操作劳动强度大, 且由于人员操作差异会加大实验结果的不稳定性。因此, 本实验采用全自动 QuEChERS 样品制备系统进行样品前处理, 结合双层结构的 QuEChERS 整合管, 利用仪器的三维立体震荡整合离心技术, 实现一次完成提取和净化两个步骤, 操作简便、方便且快捷, 20 种目标农药的加标实验, 得到了满意实验结果。

1 仪器与试剂

Waters I Class/Xevo TQS-micro 超高效液相色谱-串联质谱仪 (配有电喷雾 (ESI) 源及

MassLynx 4.2 工作站, 美国 Waters 公司); Sio-6512 全自动 QuEChERS 样品制备系统、QuEChERS 整合管(北京本立科技公司); CPA225D 分析天平(德国 Sartorius 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

20 种农药农药标准品(纯度 $\geq 98\%$, 北京曼哈格生物科技有限公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Honeywell 公司); 甲酸、甲酸铵(LC-MS 级, 美国 Fisher 公司)

2 实验方法

2.1 手动 QuEChERS 方法

准确称取 2g 花椒样品(精确至 0.01g)置于 50g 离心管中, 加入 10mL 超纯水涡旋混匀, 加入 15mL 乙腈-乙酸溶液(99+1, v/v)及 1 颗陶瓷均质子, 剧烈震荡 1min, 加入 6g 无水硫酸镁、1.5g 乙酸钠, 剧烈震荡 1min 后 4200r/min 离心 5min。定量吸取 1mL 上清液至内含 150mg 无水硫酸镁、50mg C18、50mg PSA 和 25mg GCB 的净化管中, 涡旋混匀 1min, 4200r/min 离心 5min, 吸取上清液过 0.22 μ m 有机滤膜, 供 UPLC-MS/MS 测定。

2.2 全自动 QuEChERS 方法

准确称取 2 g 花椒样品(精确至 0.01g)置于整合管外管(见图 1), 依次加入 10mL 超纯水, 加入 15mL 乙腈-乙酸溶液(99+1, v/v)、ZrO₂ 珠包, 提取剂包。将装有净化剂的内管置于整合管中, 将整合管放入 SiO-6512 主机中, 运行。运行方法为以 1200r/min 振动 5min, 以 4500r/min 离心 6min; 以 1000 振动 5min; 以 4000r/min 离心 5min。程序结束后取出整合管, 准确吸取 1.00 mL 上清液, 过 0.22 μ m 有机滤膜, 供 UPLC-MS/MS 测定。



图 1 自动 QuEChERS 整合管

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3 柱（100mm×2.1mm，1.7μm）；柱温：35℃；流动相：（A）0.01%甲酸-2mmol/L 甲酸铵水溶液和（B）0.01%甲酸-2mmol/L 甲酸铵甲醇溶液；流速：0.3mL/min。梯度洗脱：0~1min，97%A；1~1.5min，97%~85%A，1.5~2.5min，85%~50%A，2.5~5min，50%~2%A，5.0~6.0min，2%A；6.1~8min，97%A；进样体积：1μL。

2.3.2 质谱条件：

离子源：ESI 源，正离子模式；离子源温度：150℃；扫描方式：多反应监测（MRM）模式；脱溶剂气温度：500℃；脱溶剂气流速：900L/h；毛细管电压：0.5kV；锥孔电压：50V；碰撞气：高纯氩气（99.999%）。20 种农药的质谱参数见表 1。

表 1 20 种农药质谱参数

序号	化合物	离子对	锥孔电压（V）	碰撞能量（eV）
1	甲胺磷	142.0>93.9*; 142.0>124.9	8	13;13
2	灭多威	163.0>88.0; 163.0>106.0*	20	10;10
3	速灭威	166.0>94.1; 166.0>109.0*	11	27;12
4	乙酰甲胺磷	183.9>125.0*; 183.9>142.9	10	18;10
5	三环唑	190.0>136.0*; 190.0>163.0	10	25;20
6	多菌灵	192.1>132.1*; 192.1>160.1	10	30;15
7	异丙威	194.1>95.1; 194.1>137.0*	25	15;10
8	杀虫脒	197.1>89.0*; 197.1>117.1	30	40;35
9	霜脲氰	199.1>111.0*; 199.1>128.1	8	24;12
10	嘧霉胺	200.0>82.0; 200.0>107.0*	25	24;24
11	西玛津	202.0>96.0*; 202.0>124.0	40	22;16
12	噻菌灵	202.0>131.0*; 202.0>175.0	15	30;25
13	甲萘威	202.1>127.1*; 202.1>145.1	25	25;10
14	呋虫胺	203.0>113.0; 203.0>129.0*	15	10;10
15	苯噻草酮	203.1>104.0*; 203.1>175.1	10	22;16
16	仲丁威	208.0>94.9; 208.0>152.0*	25	15;10
17	残杀威	210.0>111.0*; 210.0>168.0	15	15;5

18	涕灭威	213.1>89.1*; 213.1>116.1	35	20;11
19	氧乐果	214.1>125.1*; 214.1>183.1	5	20;10
20	克百威	222.1>123.0*; 222.1>165.1	5	20;10

注：*为定量离子对

3 结果与讨论

3.1 提取转速与时间的优化

全自动 QuEChERS 样品制备系统集成了样品提取、离心及净化过程为一体，使其在尽可能短的时间内从复杂的基质中高通量提取农药残留。对第一阶段样品振荡转速和提取时间进行优化，分别选取振荡转速 600、800、1000 和 1200r/min，振荡时间 1、3、5 和 8min，进行实验组合处理（见表 2），分析不同实验组对各目标化合物回收率的影响。结果表明，当振荡转速为 1000r/min，提取时间 5min，回收率结果介于 80~120%之间的农药个数为 16 个，当振荡转速和提取时间继续增加时，回收率并没有显著的提高，因此选择振荡转速为 1000r/min，振荡时间为 5min。

表 2 实验方案设计

分组类别	振荡转速 (r/min)	振动时间 (min)	回收率个数		
			<80%	80~120%	>120%
1	600	1	10	8	2
2	600	2	8	9	3
3	600	5	9	7	4
4	600	8	7	10	3
5	800	1	9	9	2
6	800	3	8	10	2
7	800	5	6	11	2
8	800	8	4	13	3
9	1000	1	7	9	4
10	1000	3	5	13	2
11	1000	5	2	15	3
12	1000	8	1	14	5
13	1200	1	5	11	4

14	1200	3	3	12	5
15	1200	5	2	14	4
16	1200	8	2	15	3

3.2 方法的线性范围、检出限及定量限

以花椒阴性样品为空白基质，制备基质匹配标准溶液，以化合物的质量浓度（mg/L）为横坐标，定量离子对的峰面积为纵坐标建立标准曲线。在本文优化的前处理方法和仪器条件下，以各目标化合物响应为 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)时所对应的含量作为方法的检出限(LOD)和定量限（LOQ）。结果表明，20 种目标农药在各自的线性范围内，呈现良好的线性关系，相关系数（R²）均大于 0.995。20 种农药的检出限范围为 0.4~3.0μg/kg，定量限范围为 1.8~9.6 μg/kg，结果见表 3。

表 3 20 种农药的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限

化合物	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数 R ²	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
甲胺磷	0.005-0.2	y=1.1538e007 x -8540.52	0.9985	1.2	3.4
灭多威	0.005-0.2	y=1.8023×10 ⁶ x + 4377.27	0.9973	2.3	8.0
速灭威	0.005-0.2	y=5.13549×10 ⁶ x + 4998.74	0.9988	2.1	7.6
乙酰甲胺磷	0.005-0.2	y=3.4988×10 ⁷ x + 974.309	0.9998	0.9	4.2
三环唑	0.005-0.2	y=1.92278×10 ⁷ x + 33331.4	0.9979	0.8	2.6
多菌灵	0.005-0.2	y=3.68443×10 ⁷ x + 53484.9	0.9998	1.0	2.8
异丙威	0.005-0.2	y=1.46807×10 ⁷ x + 12261.7	0.9990	0.7	3.1
杀虫脒	0.005-0.2	y=5.92113e×10 ⁶ x + -1237.01	0.9992	1.8	6.4
霜脲氰	0.005-0.2	y=609152 ×10 ⁷ x + 735.292	0.9992	0.6	2.0
啉霉胺	0.005-0.2	y=9.92362×10 ⁶ x + 2096.48	0.9997	2.0	6.5
西玛津	0.005-0.2	y=6.65775×10 ⁶ x + 1761.12	0.9995	2.4	9.6
噻菌灵	0.005-0.2	y=1.80254×10 ⁷ x + 15877.2	0.9996	0.4	1.8
甲萘威	0.005-0.2	y=1.52871×10 ⁶ x + -543.341	0.9999	1.9	5.6
呋虫胺	0.005-0.2	y=1.97336×10 ⁷ x + 8299.92	0.9999	0.8	4.2
苯噻草酮	0.005-0.2	y=2.40412×10 ⁶ x + 5334.5	0.9972	1.0	2.7
仲丁威	0.005-0.2	y=1.92838×10 ⁷ x + 20476.7	0.9994	0.7	2.4

残杀威	0.005-0.2	$y=4.74658 \times 10^6 x + 10282.2$	0.9988	3.0	8.6
涕灭威	0.005-0.2	$y=115410 \times 10^7 x + 131.404$	0.9994	1.1	3.4
氧乐果	0.005-0.2	$y=4.02774 \times 10^7 x + 10291.7$	0.9995	0.8	3.2
克百威	0.005-0.2	$y=2.59342 \times 10^7 x + 52284$	0.9986	1.2	4.1

3.3 回收率与精密度

按照优化后的前处理方法进行添加回收实验，各农药以 1 倍定量限、2 倍定量限和 10 倍的定量限为添标回收水平，每个添加水平做 6 次平行试验。20 种农药的平均回收率范围为 62.5~110.0%、78.5~111.2%和 87.2~111.0%，相对标准偏差均小于 11.8%。结果见表 4。

表 4 20 种农药回收率及相对标准偏差

化合物	添加水平					
	0.01mg/kg		0.05mg/kg		0.1mg/kg	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
甲胺磷	78.4	4.3	90.0	3.0	97.5	2.4
灭多威	88.4	5.2	96.0	1.3	105.0	2.6
速灭威	79.8	2.4	105.0	2.1	111.0	3.4
乙酰甲胺磷	62.5	1.8	87.5	5.4	97.5	2.9
三环唑	79.0	3.0	92.5	3.2	100.5	2.6
多菌灵	84.5	1.4	78.5	2.4	83.0	1.0
异丙威	92.5	2.2	87.5	1.8	89.0	1.2
杀虫脒	90.0	3.0	92.5	2.4	99.0	1.3
霜脲氰	87.5	9.6	91.0	8.8	108.0	5.2
嘧霉胺	78.9	3.5	90.2	2.1	95.4	3.6
西玛津	90.0	4.2	87.9	2.7	93.2	2.3
噻菌灵	92.5	2.8	94.0	1.9	103.5	1.2
甲萘威	110.0	8.6	92.0	7.4	93.0	6.5
呋虫胺	80.2	5.3	102.0	4.2	97.5	3.8
苯噻草酮	85.5	7.6	90.3	5.1	87.2	3.0
仲丁威	83.7	5.3	99.0	3.7	102.8	2.5
残杀威	89.0	6.4	87.5	3.1	90.0	1.4

涕灭威	109.0	11.8	111.2	8.5	108.4	9.4
氧乐果	87.0	4.3	89.3	2.2	98.4	1.7
克百威	78.0	2.8	97.5	1.6	90.0	1.3

4 结论

本文利用全自动 QuEChERS 样品制备系统结合 LC-MS/MS，建立了花椒样品中 20 种农药的分析方法。通过方法学考察和加标回收实验，表明该方法具有良好的回收率和精密度。与手动 QuEChERS 方法相比，全自动 QuEChERS 方法实现化合物提取与净化一步完成，前处理时间大大缩短，显著提升了检测效率。

参考文献:

[1]张萨,蒋文兵,吕永霞,李楠.不同产地花椒挥发性成分分析及开发效益研究[J].中国调味品,2023,48(7):186-189, 195.

[2]Gong Y, Sun W H, Xu T T, Zhang L, Huang X Y, Tan Z H, Di D.Chemical constituents from the pericarps of Zanthoxylum bungeanum and their chemotaxonomic significance[J]. 2021,95(4):104213.

[3]郭晓宏,郭一丹,杜佳铭,刘倩婷,徐怀德,寇莉萍.花椒的营养价值和贮藏保鲜技术研究进展[J].中国果菜, 2022, 42(8):8-17.

[4]王小晶,冯莉,彭,马琦,李梅,徐怀德.不同处理方法对花椒籽种皮黑色素纯化效果的比较研究[J].2019, 35(5):236-243.

[5]吴跃开,罗红,王丽,朱佳敏,杨霞,刘靖.贵州花椒主要病虫害及其应用策略[J].安徽农学通报, 2023,11:96-101.

[6]唐明双,何川,王颖,程明明,辛开斌,黎德富.青花椒病虫害绿色防控关键技术[J].安徽农学通报,2023,12:94-97.

[7]食品安全国家标准食品中农药最大残留限量: GB 2763-2021[S].北京:中国标准出版社, 2021.

[8]杨成峻,陈明舜,刘成梅,周伟,李积华, 陈军.花椒果皮多酚类成分鉴定及降血糖活性[J].食品科学, 2023, 44(2):271-278.

[9]王玉萍,史波林,刘珺琪, 陈琳,黄帅,赵镭, 周先礼.花椒果皮正丁醇部分化学成分研究[J].中草药, 2023, 54(5):1353-1361.

- [10]Elisa Helena da Costa Morais, Carol Hollingworth Collins, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.Pesticide determination in sweet peppers using QuEChERS and LC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2018, 249:77-83.
- [11]Herbert Musarurwa, Luke Chimuka, Vusumzi Emmanuel Pakade, Nikita TawandaTavengwa.Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis [J].Journal of Food Composition and Analysis, 2019, 84:103314.
- [12]Su Y Z, Lu J J, Liu J, Li F, Wang N, Lei H Q, Shen X F.Optimization of a QuEChERS-LC-MS/MS method for 51 pesticide residues followed by determination of the residue levels and dietary intake risk assessment in foodstuffs[J].Food Chemistry, 2024, 434:137467.
- [13]张艳峰,徐鹏,王会利.QuEChERS 技术结合气相色谱-串联质谱法筛查花椒中 115 种农药残留[J].农药学学报, 2020, 22(3):493-503.
- [14]王娇,吴桐,王新全,刘真真,徐浩.QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定中草药中 22 种三唑类农药残留[J].色谱, 2023, 41(4): 330-338.