

改进 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法 同时测定甘草中 86 种农药残留

刘志荣^{1,2}, 张明童^{1,2}, 谢楠^{1,2}, 张平^{1,2}, 马潇^{1,2}, 郭朝晖^{1,2}

(1. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:建立了 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法同时测定甘草中 86 种农药残留, 比较了 9 种不同 QuEChERS 方法的净化效率和回收率, 结果表明, 无石墨化碳黑 (NGCB) QuEChERS 方法效果最佳。在依赖保留时间的多反应监测模式 (scheduled MRM) 下, 采用 UPLC-MS/MS 法对农药进行定量。86 种农药的线性相关系数 (r) 均大于 0.991 3, 检出限为 0.2~9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 3 个 (10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 添加水平下, 86 种农药的回收率为 65.0%~129.4%, 相对标准偏差 (RSD, $n=6$) 为 1.0%~19.3%。采用该方法对市场上收集的 64 批甘草样品进行测定, 检出 17 种农药。该方法可为准确、高效、经济地检测甘草中目标物提供参考。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS); QuEChERS; 农药残留; 甘草

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2020)06-0624-13

doi: 10.7538/zpxb.2019.0116

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Simultaneous Determination of 86 Pesticide Residues in Glycyrrhiza Uralensis by Improved QuEChERS-UPLC-MS/MS

LIU Zhi-rong^{1,2}, ZHANG Ming-tong^{1,2}, XIE Nan^{1,2},

ZHANG Ping^{1,2}, MA Xiao^{1,2}, GUO Zhao-hui^{1,2}

(1. Gansu Provincial Institute of Drug Control, Lanzhou 730070, China;

2. GanSu Tibetan Medicine Examination Engineering Laboratory, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Dried Glycyrrhiza uralensis is popular as a dietary supplement in China, and it is used as an ingredient in spice and herbal medicine in China. To ensure its yields and quality, pesticides have been abused to control insects and diseases. However, the use of pesticides readily leads to pesticide residues, which may pose a potential threat to human health. To ensure that these residues are kept below tolerated levels, the China Pharmacopeia has stipulated maximum residue levels (MRLs) for some pesticides, yet

收稿日期: 2019-08-28; 修回日期: 2019-11-30

基金项目: 甘肃省重点人才项目 (2020); 甘肃省海智计划特色示范项目; 甘肃省药品监督管理局科技资助项目 (2018GSFDA002, 2018GSFDA059, 2019GSMPA019) 资助

作者简介: 刘志荣 (1986—), 男 (汉族), 甘肃兰州人, 工程师, 从事药品质量控制研究。E-mail: 553111058@qq.com

通信作者: 谢楠 (1976—), 男 (汉族), 甘肃兰州人, 高级工程师, 从事药品质量控制研究。E-mail: 7488215@qq.com

网络出版时间: 2020-09-03; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20200902.0836.002.html>

only a few methods are available for evaluation of the broadly contaminated multiclass pesticides in dried *Glycyrrhiza uralensis*. The quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) method, a combination of extraction and purification, has been widely accepted by the international community by virtue of providing high recovery, super efficiency, and good reproducibility. However, because of the complexity of Chinese herbal medicine matrix, QuEChERS method is not suitable for the analysis of multiclass pesticide residues. Therefore, it is urgent to establish an improved QuEChERS method for the analysis of multiple pesticide residues in Chinese herbal medicine. The method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established for simultaneous determination of 86 pesticides residue in *Glycyrrhiza uralensis*. 9 kinds of QuEChERS were compared in terms of purification efficiency and recovery, the best results were achieved with no graphitized carbon black(NGCB). The pesticides were quantified on a UPLC-MS/MS system in scheduled multiple reaction monitoring mode, and identified on the basis of product ion abundance ratios as well as characteristic fragments in enhanced product ion spectra UPLC-MS/MS system. The correlation coefficients of 86 analytes were better than 0.991 3. Detection limits ranged from 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries of 86 pesticides at the spiked levels of 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were range of 65.0%-129.4% with RSDs of 1.0%-20.0%. The proposed method was applied to *Glycyrrhiza uralensis* samples from the Chinese market. 17 pesticides were detected, including carbofuran and thiamethoxam, which exceeded the recommended maximum residue limits in some samples. The established method has advantages of good recovery, economical and a rapid clean-up procedure, showing enhanced product ion scanassisted confirmation to be a useful tool for obtaining reliable results.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); QuEChERS; pesticide residues; *Glycyrrhiza uralensis*

甘草作为调味剂和中药材在中国广泛使用。为确保甘草的产量和质量,常用农药控制甘草种植过程中的病虫害。但是,农药的过度使用会导致农药残留,对人体健康具有潜在威胁。国家食品标准 GB2763—2016 中规定了部分农药在食品中的最大残留限量,然而,目前只有少数分析方法可作为评价甘草中农药多残留的参考方法。因此,开发一种精确、可靠的方法用于检测甘草中农药残留水平是必要的。

样品制备技术是测定样品中痕量级别农药残留的关键,常用的方法有固相萃取(SPE)^[1-2]、凝胶渗透色谱(GPC)^[3]、基质固相分散萃取(MSPD)^[4]、超临界流体萃取(SFE)^[5]、固相微萃取(SPME)^[6]和液-液萃取(LLE)^[7]。其中,部分方法需要大量的有机溶剂(LLE)、特殊的设备(GPC和SFE)、大量劳动(MSPD)或者高

成本(SPE),限制了这些技术在复杂基质样品中的使用。黄晓会等^[8]以乙腈为提取剂,用弗罗里硅土柱净化,采用GC-ECD检测甘草中50种有机氯及拟除虫菊酯农药。戴博等^[9]以丙酮为提取溶剂,采用凝胶渗透色谱(GPC)和氨基-石墨炭固相萃取柱(NH_2 -CARB)结合的方法对提取液进行净化,气相色谱-质谱技术(GC/MS)测定甘草中24种农药残留。杨如箴等^[10]以乙腈超声提取、凝胶渗透色谱(GPC)净化提取液,采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定甘草中11种氨基甲酸酯类农药。这些报道均局限于SPE法和GCP法,检测农药种类也十分有限。

QuEChERS方法集样品萃取与基质净化于一身,是一种操作快速、简洁、粗放、高效,低成本的样品制备技术,准确性和重复性较高,被

广大农药残留检验者认可。在 QuEChERS 方法中,广泛使用 *N*-丙基乙二胺(PSA)作为去除样品中脂肪酸、有机酸、糖和色素的极性吸附剂^[11-12];使用石墨化碳黑(GCB)去除样品基质中的非极性共提取物,例如植物色素^[13-14]。另外,GCB 具有类似石墨的平面六边形结构,对具有平面结构的农药化合物有着较强的吸附性,GCB 的比例会明显影响具有平面结构农药的回收率^[11]。样品制备过程中,为达到理想的基质净化效果,吸附剂种类和搭配比例是关键因素。

本工作以甘草为研究对象,拟采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)比较 QuEChERS 方法中不同吸附剂对 86 种农药回收率的影响,筛选出最佳的前处理方法,并对 64 批甘草样品进行测定。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

QTRAP 5500 型质谱仪:美国 AB SCIEX 公司产品;LC-30AD 型液相色谱仪:日本岛津公司产品;ME 型电子天平:美国 Mettler Toledo 公司产品;高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品。

甲醇、乙腈:色谱纯,德国 Merck 公司产品;无水硫酸镁、氯化钠:优级纯,美国 Sigma-Aldrich 公司产品;*N*-丙基乙二胺(PSA, 40~60 μm)、十八烷基硅烷键合硅胶(C18, 40~70 μm)、石墨化碳黑(GCB, 40~70 μm):天津 Bonna-Agela 公司产品;实验用水:超纯水,由 Milli-Q 纯水系统制备;86 种农药混合标准品(10 mg/L):美国 ChemTek 公司产品,用乙腈-水(1:1, V/V)配制成 500 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液母液,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存;磷酸三苯酯标准品(纯度 99.2%):德国 Dr. Ehrenstorfer 公司产品,用乙腈-水(1:1, V/V)配制成 50 $\mu\text{g/L}$ 的内标溶液,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存;64 批甘草样品:购自甘肃市场;1 批野生甘草样品:购自武威。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:AQUITY UPLC BEH Shield RP18 柱(2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 1.7 μm);流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液(含 10

mmol/L 甲酸铵),B 为乙腈;流速:0.3 mL/min;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;进样量:5 μL ;梯度洗脱程序:0~2 min(5%B),2~14 min(5%~100%B),14~16 min(100%B)。

1.2.2 质谱条件 ESI 离子源,正离子模式;依赖保留时间的多反应监测模式(scheduled MRM),检测窗 1 min;离子源电压:5.5 kV;离子源温度(TEM):550 $^{\circ}\text{C}$;气帘气压力(CUR):241.3 kPa;碰撞气压力(CAD):medium;喷雾器压力(GS1)和辅助加热气压力(GS2):344.7 kPa。

1.3 样品制备

甘草样品经晾干,反复粉碎,过 65 目筛((250 $\pm$ 9.9) μm),称取 2 g(精确至 0.01 g)甘草粉末于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 5 mL 水涡旋混匀,浸润 30 min,然后精密加入 10 mL 乙腈,剧烈振摇 1 min 后,加入 4 g 无水硫酸镁和 1 g 氯化钠,剧烈振摇 1 min,使待测目标成分从水中转移到乙腈中,去除乙腈中的水,以 4 000 r/min 离心 5 min。精密移取 5 mL 上清液于已预先装有 750 mg 无水硫酸镁、200 mg C18 和 200 mg PSA 的 10 mL 离心管中,剧烈振摇 1 min,使上清液净化完全,以 4 000 r/min 离心 5 min。精密移取 3 mL 净化后的上清液于氮吹管中,再精确加入 0.3 mL 磷酸三苯酯内标,涡旋混匀,氮吹至近干,加入 1 mL 乙腈-水(3:2, V/V)混合溶液复溶,涡旋混匀后过 0.22 μm 滤膜,待检测。

2 结果与讨论

2.1 农药种类的选择

《中国药典》2015 版一部^[15]对于甘草只测定了 9 种有机氯类农药,且均采用气相色谱法;《中国药典》2015 版四部通则^[16]农药残留量测定法(0521)第四法为指导方法,没有具体到品种项下;国家食品标准^[17]虽然收录的农药种类较多,但是没有针对甘草的具体方法标准。本研究参考中国农药信息网的注册信息,依据《中国药典》和国家食品标准 GB2763—2016 对中草药中有关农药残留的检测项目,筛选出适合高效液相色谱-串联质谱法测定的中药材生产中常用的 86 种农药,涵盖了《中国药典》2015 版四部通则农药残留量测定法(2341)第四法液质方法农药种类的 50% 以上,其中包括 2 种苯

并咪唑类(BEZs),14 种氨基甲酸酯类(CAMs),4 种新烟碱类(Neonicotinoids),34 种有机磷类(OPPs),10 种唑类(TIZs),1 种拟除虫菊酯类(PYHs),2 种咪唑类(Imidazoles)以及 19 种其他类(others)农药。

2.2 UPLC-MS/MS 条件的优化

本研究采用针泵直接进样方式,对单一标

准品离子对及质谱参数逐个优化。首先通过一级质谱扫描确定待测化合物的母离子,对该母离子进行二级质谱全扫描。选择每个待测化合物质荷比较大、强度较高、干扰较小的 2 个碎片离子作为子离子,其中强度最高的子离子作为定量离子,每种农药的离子对及优化后的去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)列于表 1。

表 1 优化后的每种农药的质谱参数
Table 1 Optimized MS/MS parameters of pesticides

结构分类 Structure category	农药 Pesticides	保留时间 <i>t</i> _R /min	定量离子对 Quantitative ion pair	碰撞电压 1 CE1/V	定性离子对 Qualitative ion pair	去簇电压 DP/V	碰撞 电压 2 CE2/V
BEZs	多菌灵	4.96	192.0/160.0	25	192.0/132.0	80	10
	噻菌灵	5.46	202.0/175.0	37	202.0/131.1	160	13
CAMs	涕灭威	7.11	116.1/89.0	10	116.1/70.0	47	43
	灭多威	4.83	163.0/106.0	13	163.0/88.0	38	39
	速灭威	7.52	166.0/109.1	17	166.0/94.0	46	41
	甲萘威	8.34	202.1/145.0	15	202.1/127.0	54	41
	涕灭威亚砷	3.63	207.0/132.0	10	207.0/89.0	51	16
	猛杀威	9.71	208.1/151.0	23	208.1/109.0	56	40
	残杀威	7.96	210.1/111.0	19	210.1/168.1	110	20
	克百威	8.06	222.1/165.0	17	222.1/123.1	70	13
	涕灭威砷	4.51	223.0/148.0	12	223.0/76.1	63	11
	灭虫威	9.48	226.1/169.1	14	226.1/121.1	130	36
	杀线威	4.69	237.1/90.1	11	237.1/220.1	70	29
	3-羟基克百威	6.10	238.0/181.0	14	238.0/163.0	65	10
	抗蚜威	7.25	239.1/182.1	22	239.1/137.1	130	47
	茚虫威	11.72	528.1/249.0	19	528.1/293.0	160	11
Imidazoles	烯菌灵	8.01	297.1/159.0	30	297.1/255.0	150	24
	咪鲜胺	10.56	376.0/308.0	17	376.0/70.1	65	31
IS	磷酸三苯酯	11.16	327.0/215.0	31	327.0/152.1	181	26
Neonicotinoids	啉虫脒	6.52	223.0/126.0	27	223.0/99.0	70	38
	吡虫啉	6.20	256.1/209.0	23	256.1/175.0	60	7
	噻虫啉	7.10	253.0/126.0	28	253.0/186.0	120	22
	噻虫嗪	5.46	292.0/211.0	18	292.0/181.0	60	11
OPPs	氧化乐果	2.69	214.0/182.9	16	214.0/109.0	56	20
	速灭磷	6.66	225.1/127.0	22	225.1/193.0	100	32
	氧甲拌磷	8.76	245.0/75.0	10	245.0/245.0	100	5
	地虫硫磷	11.41	247.0/109.0	25	247.0/137.0	60	15

续表 1

结构分类 Structure category	农药 Pesticides	保留时间 <i>t</i> _R /min	定量离子对 Quantitative ion pair	碰撞电压 1 CE1/V	定性离子对 Qualitative ion pair	去簇电压 DP/V	碰撞 电压 2 CE2/V
	内吸磷	8.96	259.0/88.9	16	259.0/60.9	60	19
	氧倍硫磷	8.83	263.1/231.0	20	263.1/216.0	117	26
	硫线磷	11.22	271.0/159.0	21	271.0/97.0	83	43
	敌百虫	5.43	274.0/109.0	25	274.0/220.9	32	31
	乙基对氧磷	8.76	276.0/220.0	20	276.0/248.0	120	20
	氧甲拌磷砒	6.76	277.0/183.0	16	277.0/249.0	120	51
	N-去乙基甲基嘧啶磷	9.13	278.0/294.8	25	278.0/245.8	110	26
	氧倍硫磷亚砒	6.10	279.1/264.0	26	279.1/247.0	130	22
	甲拌磷砒	9.35	293.0/171.0	16	293.0/247.0	130	14
	氧丰索磷	6.67	293.1/237.0	21	293.1/265.0	140	33
	氧倍硫磷砒	6.74	295.0/104.1	47	295.0/217.1	120	14
	啗硫磷	10.95	299.1/163.0	33	299.1/271.0	110	26
	辛硫磷	11.56	299.1/77.0	46	299.1/129.0	67	26
	磷胺	7.25	300.1/174.1	19	300.1/277.0	150	12
	杀扑磷	9.55	303.0/145.0	13	303.0/85.0	120	48
	二嗪磷	11.34	305.0/169.0	27	305.0/153.0	80	32
	丰索磷	7.37	309.0/281.0	18	309.0/253.0	120	9
	氧丰索磷砒	8.80	309.1/253.0	23	309.1/281.0	130	20
	除线磷	12.47	314.9/258.9	23	314.9/286.9	43	30
	氯唑磷	10.78	314.0/120.0	22	314.0/162.0	67	47
	保棉磷	9.60	318.0/160.1	9	318.0/132.0	110	25
	亚胺硫磷	9.77	318.0/160.0	16	318.0/133.0	38	19
	苯线磷亚砒	7.18	320.1/233.0	34	320.1/292.1	140	16
	治螟磷	11.46	323.0/170.9	19	323.0/295.0	100	19
	嘧啶磷	12.62	334.1/198.1	28	334.1/306.1	160	28
	苯线磷砒	7.90	336.1/266.0	28	336.1/308.1	160	30
	异硫磷	11.78	346.1/245.0	8	346.1/287.1	60	12
	毒死蜱	12.52	350.0/198.0	29	350.0/97.0	82	28
	毒虫畏	10.76	359.0/155.0	18	359.0/127.0	110	20
	伏杀硫磷	11.55	368.0/182.0	20	368.0/322.0	71	55
Others	除虫脲	10.25	311.0/158.0	21	311.0/141.2	72	13
	杀虫脒	5.65	197.1/46.0	24	197.1/117.0	96	13
	灭螨猛	11.31	235.0/207.0	25	235.0/163.0	60	21
	灭锈胺	10.32	270.1/119.0	32	270.1/228.1	130	21

续表 1

结构分类 Structure category	农药 Pesticides	保留时间 <i>t</i> _R /min	定量离子对 Quantitative ion pair	碰撞电压 1 CE1/V	定性离子对 Qualitative ion pair	去簇电压 DP/V	碰撞 电压 2 CE2/V
PYHs	敌草胺	10.16	272.2/171.1	26	272.2/199.1	140	19
	甲酚噻草胺	9.68	276.1/244.1	20	276.1/168.1	80	49
	联苯肼酯	10.24	301.1/198.1	12	301.1/170.1	81	14
	噻嗪酮	12.53	306.2/201.1	15	306.2/116.1	100	31
	吡丙醚	12.37	322.1/227.1	21	322.1/185.1	90	23
	苯霜灵	10.89	326.2/294.2	14	326.2/208.1	90	10
	抑虫肼	10.77	353.2/133.1	25	353.2/297.2	70	35
	烯草酮	12.00	360.1/164.1	23	360.1/268.1	100	43
	哒螨灵	13.23	365.0/309.0	17	365.0/147.0	110	18
	炔螨特	12.83	368.2/231.2	14	368.2/175.1	60	23
	甲氧虫酰肼	10.28	369.2/149.1	24	369.2/313.2	70	20
	吡氟氯禾灵	11.61	376.1/316.0	25	376.1/288.0	160	35
	百克敏	11.32	388.1/194.1	17	388.1/296.1	80	23
	肟菌酯	11.80	409.1/186.1	25	409.1/206.1	160	23
	氯虫酰胺	9.22	481.9/293.9	20	481.9/450.9	90	47
	丙烯菊酯	12.31	303.2/135.0	12	303.2/169.0	80	23
TIZs	三环唑	6.64	190.0/163.0	29	190.0/136.0	180	15
	噻唑膦	8.39	284.1/104.0	28	284.1/228.0	100	47
	腈菌唑	9.82	289.1/70.0	24	289.1/125.0	130	30
	多效唑	9.37	294.1/125.0	50	294.1/165.0	100	17
	戊唑醇	10.13	308.1/70.0	27	308.1/125.0	150	23
	己唑醇	10.30	314.1/159.0	45	314.1/185.0	110	36
	氟硅唑	10.24	316.1/247.1	25	316.1/165.1	80	20
	苯醚甲环唑	10.98	406.1/251.0	37	406.1/337.0	120	49
	唑螨酯	12.74	422.2/366.1	23	422.2/215.1	100	21
	氟虫腈	10.86	454.0/436.9	15	454.0/367.9	50	32

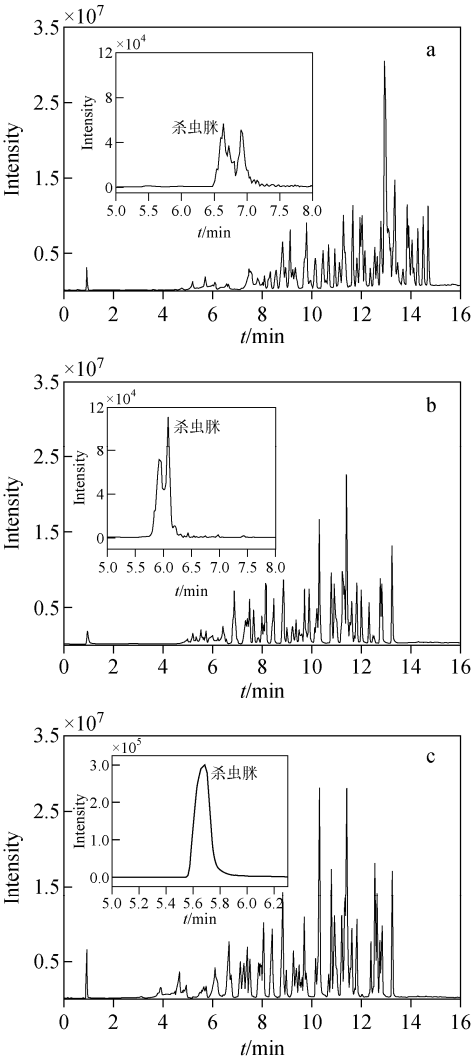
注:IS 表示内标物质

为保证各农药成分具有较好的峰形以及足够的灵敏度,考察了乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液(含 10 mmol/L 甲酸铵)3 种流动相体系,其总离子流图示于图 1。可见,大多数化合物在乙腈相中较甲醇相中具有更好的色谱分辨率和更高的灵敏度,且在乙腈作为流动相时,杀虫脒、吡虫啉、噻虫嗪和氧倍硫磷的峰形明显改善。挥发性酸和挥发性盐的加入不仅促进了大部分农药化合物的离子化,而且抑制了色谱柱填料

中残留化合物的离子化,改善了农药化合物的峰形。选择乙腈-0.1%甲酸水溶液(含 10 mmol/L 甲酸铵)为流动相时,大多数农药化合物的峰形较好、响应较高,但是也有部分农药化合物的响应强度被抑制,例如涕灭威、灭多威。综合考虑,选择乙腈-0.1%甲酸水溶液(含 10 mmol/L 甲酸铵)为流动相。

2.3 QuEChERS 方法优化

在实际样品测试中,复杂基质会污染 UPLC-MS/MS 系统,导致其检测性能下降,并且会增



注：a. 甲醇-0.1%甲酸水溶液；
b. 乙腈-0.1%甲酸水溶液；
c. 乙腈-0.1%甲酸水溶液（含 10 mmol/L 甲酸铵）

图 1 采用不同流动相得到的总离子流图
Fig.1 Total ions chromatograms
obtained with different mobile phases

加仪器维护成本。因此,采用 QuEChERS 法对样品提取净化是必要的。

乙腈具有较宽的溶解度和极性分布范围,以及良好的色谱兼容性,常作为提取溶剂。本实验考察了 5、10、20 mL 乙腈提取溶剂的提取效率,结果示于图 2。可见,在一定范围内,增加提取溶剂的用量,提取效率增加,但当乙腈体积大于 20 mL 时,提取溶剂对目标化合物的提取效率增加不明显,但显著增加了环境负担和提取成本。综合考虑,选择 10 mL 乙腈作为提取溶剂。

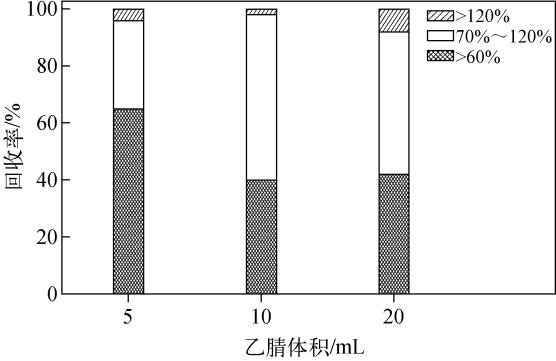


图 2 不同体积的乙腈对提取效率的影响
Fig.2 Effect of acetonitrile with different
volume on extraction efficiency

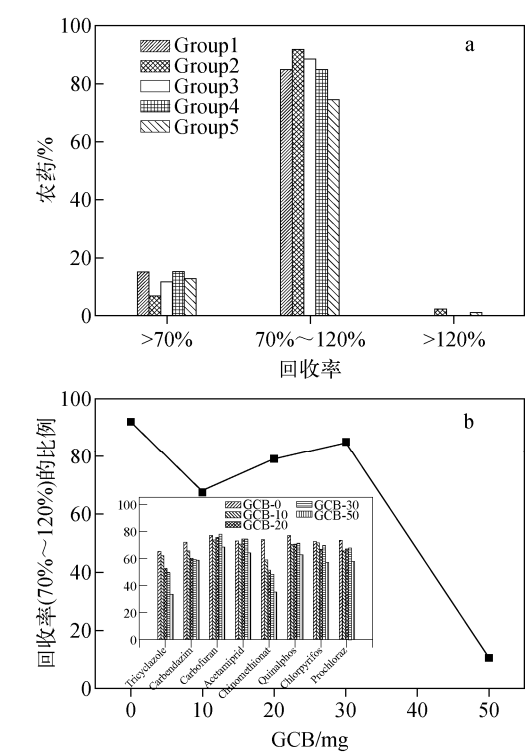
甘草中主要含有多糖、甜味素、有机酸和萜类等杂质^[18-20],为有效去除这些杂质,本实验考察了 9 种吸附剂对这些物质的净化效果,其组成列于表 2。根据文献报道^[17]确定无水硫酸镁的量为 750 mg,实验发现 PSA、C18 都为 200 mg 时,86 种农药化合物的回收率在 70%~120% 之间分布的种类最多,对甘草基质具有较好的净化性能,示于图 3a。这是由于 PSA 中的 2 个氨基基团对甘草基质中的有机酸等酸性物质有较好的吸附效果,但是 PSA 过量会吸附部分显酸性的农药化合物 (OPPs);C18 中的长烷基链能够有效吸附脂溶性成分和大分子物质(多糖、萜类、蛋白质等),但是过多的 C18 会吸附部分脂溶性农药。因此,选择 PSA 和 C18 的量均为 200 mg。

为进一步优化吸附剂组成,在吸附剂中加入了不同比例的 GCB,当吸附剂中不添加 GCB 时,86 种农药的回收率分布在 70%~120% 之间的种类最多,占总数的 95%,示于图 3b。这是由于部分农药化合物具有与 GCB 相似的平面结构,GCB 对这些农药具有一定的吸附,随着 GCB 吸附剂加入量的增加,使得部分农药的回收率呈下降趋势,例如,三环唑、多菌灵、灭螨猛、咪鲜胺、毒死蜱、克百威、啉虫脒、啶硫磷等。另外,GCB 的主要作用是吸附基质中的色素,但是甘草中色素含量相对较少,提取液显棕黄色,经过含不同比例的 GCB 净化包净化后,颜色均呈淡黄色,没有明显区别。因此,选择 2 号组合(无水 MgSO_4 、100 mg PSA、200 mg C18)作为甘草的基质净化方法。

表 2 本实验测定的不同吸附剂组成

Table 2 Different adsorbent composition tested in present study

吸附剂 Absorbents	各组吸附剂组分用量 Amount of each componet in each adsorbent								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
无水 MgSO ₄	750	750	750	750	750	750	750	750	750
PSA	100	200	300	200	200	200	200	200	200
C18	200	200	200	100	300	200	200	200	200
GCB	0	0	0	0	0	10	20	30	50



注:a. PSA 和 C18 用量优化;b. GCB 用量优化

图 3 不同吸附剂组成对提取回收率的影响

Fig. 3 Effect of different adsorbent composition on recovery

2.4 方法学验证

2.4.1 空白样品的确定 将收集的野生甘草按照 1.3 节进行处理,分别将其提取物和 86 种农药混合标准溶液(10 $\mu\text{g/L}$)在优化的 UPLC-MS/MS 条件下进行测定,结果示于图 4。可见,野生甘草没有被 86 种农药化合物污染,而且在相应的保留时间范围内没有干扰,收集的野生甘草可作为空白基质。

2.4.2 基质效应 在 UPLC-MS/MS 分析中,基质效应(ME)是指在 ESI 离子源中干扰成分

同待测成分的离子化竞争,从而引起待测成分信号抑制或增强。为了评估基质效应,分别用空白甘草提取物和溶剂制备一系列浓度的标准混合溶液(1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$)。采用公式 $ME = k_{\text{extract}} / k_{\text{solvent}}$ 评价 ME,其中, k_{extract} 指空白甘草提取物制备的标准溶液的校准曲线斜率, k_{solvent} 指空白溶剂制备的标准溶液的校准曲线斜率。ME 值在 0.8~1.2 之间时,基质效应可以被忽略;ME>1.2 时,表现为基质增强;ME<0.8 时,表现为基质抑制。86 种农药的基质效应分布图示于图 5。在定量结果中,86 种农药中有 66 种农药表现出明显的基质抑制效应,但是杀虫脒、唑螨酯和氟虫腈表现出明显的基质增强效应。为获得准确的定量结果,本实验采用基质匹配标准曲线法减小基质干扰。

2.4.3 线性范围、检出限、定量限和回收率

86 种农药的线性范围、相关系数、定量限、检出限及加标回收率列于表 3。86 种农药化合物的甘草基质标准曲线的浓度范围为 5~500 $\mu\text{g/L}$,以浓度为 x 轴,定量离子对的峰面积为 y 轴绘制标准曲线,化合物的线性相关系数(r)均大于 0.991 3。分别以信噪比(S/N)10:1 和 3:1 为定量限(LOQs)和检出限(LODs),86 种农药化合物的 LOQs 和 LODs 分别为 1~30 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.2~9 $\mu\text{g/kg}$ 。对 10、50、100 $\mu\text{g/kg}$ 3 个水平的农药混合标准溶液基质进行加标实验,计算平均回收率和相对标准偏差(RSDs),每个水平的回收率分别为 65.0%~129.4%、64.3%~107.6%、65.4%~128.5%,RSDs 分别为 1.0%~19.3%、1.0%~16.9%、1.1%~12.4%,均在可接受范围内。

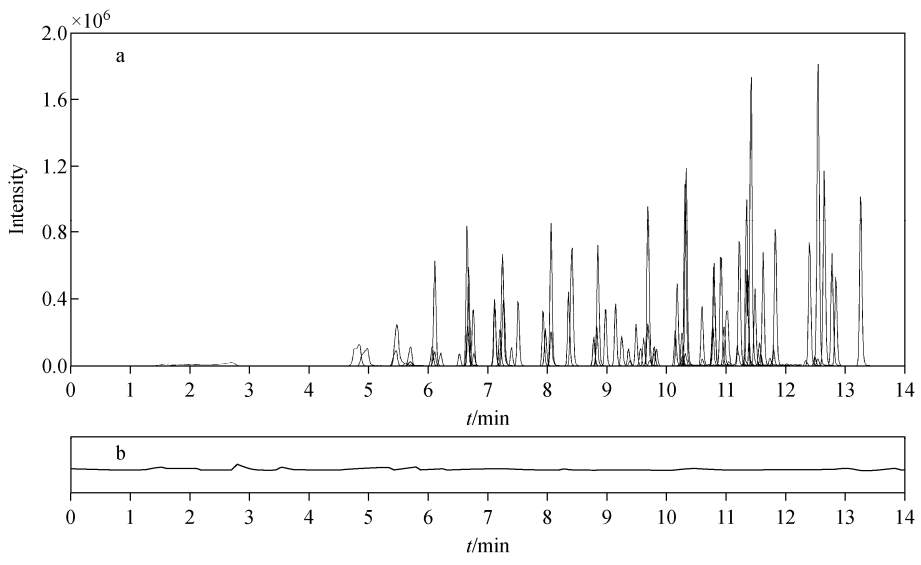


图 4 86 种标准混合溶液(a)和甘草空白基质提取物(b)的 MRM 图

Fig. 4 MRM chromatograms of 86 standard mixtures (a) and blank matrix extract (b) of *Glycyrrhiza uralensis*

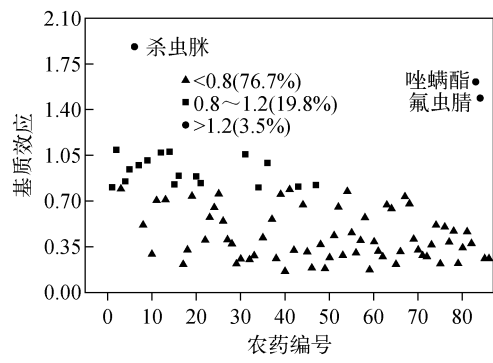


图 5 农药基质效应分布图

Fig. 5 Matrix effect evaluated of pesticides

2.5 实际样品检测

本实验通过筛选出的 QuEChERS 方法对 64 批甘草样品进行前处理,采用 UPLC-MS/MS

法对样品进行测定。从 64 批甘草样品中共检出 17 种农药,其中,克百威检出率为 67%,检出量最高为 26.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;噻虫嗪检出率为 19%,检出量最高为 12.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$;其余农药检出率均低于 10%,且检出量较低。

3 结论

本研究采用 UPLC-MS/MS 法测定甘草药材中 86 种农药,以回收率为考察指标,评估了不同吸附剂组成的 QuEChERS 法对甘草中多农残的提取净化效果。实验结果表明,不添加 GCB 吸附剂的组合较其他组合更出色。该方法经济、高效、准确度高,可为甘草药材中多类别农药残留的例行检测、风险评估等提供依据。

表 3 86 种农药的线性范围、相关系数、定量限、检出限及加标回收率

Table 3 Linear ranges, correlation coefficients (r), LOQs, LODs and spiked recoveries of 86 pesticides

农药 Pesticide ($n=86$)	线性范围 Linear range/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	相关系数 Correlation coefficient (r)	定量限 LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出限 LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery/% (RSDs/%)($n=6$)		
					10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
涕灭威	1~100	0.9998	2	0.6	72.6(10.2)	95.1(3.5)	75.6(1.2)
灭多威	1~100	0.9993	2	0.7	75.5(6.5)	94.1(8.8)	78.5(5.3)
速灭威	1~100	0.9995	2	0.7	76.5(3.3)	95.0(2.2)	75.3(3.3)
三环唑	1~100	0.9994	2	0.6	68.6(2.8)	64.3(1.5)	65.4(2.8)
多菌灵	1~100	0.9918	3	1.0	72.4(5.6)	79.8(7.8)	72.4(3.6)

续表 3

农药 Pesticide (<i>n</i> =86)	线性范围 Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 Correlation coefficient (<i>r</i>)	定量限 LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)	检出限 LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 Recovery/% (RSDs/%)(<i>n</i> =6)		
					10 $\mu\text{g/kg}$	50 $\mu\text{g/kg}$	100 $\mu\text{g/kg}$
杀虫脒	1~100	0.9996	5	2.0	65.5(1.3)	67.1(3.6)	68.8(1.3)
噻菌灵	1~100	0.9996	2	0.8	70.6(2.6)	73.3(2.2)	75.2(2.6)
甲萘威	1~100	0.9977	2	0.5	76.4(3.3)	94.8(1.5)	74.4(3.3)
涕灭威亚砷*	5~500	0.9946	20	6.0	97.6(12)	74.3(5.5)	100.0(2.2)
猛杀威	1~100	0.9998	5	2.0	77.3(1.2)	94.2(3.9)	76.3(1.7)
残杀威	1~100	0.9998	5	1.6	78.7(2.5)	93.6(1.8)	75.8(2.7)
氧化乐果	1~100	0.9942	5	2.0	75.4(1.0)	74.1(3.5)	74.4(3.4)
克百威	1~100	0.9998	2	0.6	73.1(3.7)	95.0(1.2)	77.4(3.7)
涕灭威砷**	5~500	0.9916	30	9.0	85.7(7.1)	78.5(11.1)	104.9(7.1)
啶虫脒	1~100	0.9959	5	2.0	71.3(5.6)	90.5(2.8)	73.2(5.6)
速灭磷	1~100	0.9997	3	0.9	79.3(2.6)	95.2(5.6)	79.8(3.7)
灭虫威	1~100	0.9994	5	1.6	74.0(4.3)	94.1(2.9)	74.5(4.3)
灭螨猛	1~100	0.9995	5	1.5	76.3(3.7)	76.5(7.6)	74.0(3.7)
杀线威**	5~500	0.9914	30	9.0	129.4(19.3)	93.2(16.9)	100.2(10.5)
3-羟基克百威	1~100	0.9993	5	2.0	77.7(1.7)	99.3(2.6)	77.6(1.7)
抗蚜威	1~100	0.9994	2	0.7	79.3(2.2)	95.0(7.2)	80.2(2.2)
氧甲拌磷	1~100	0.9994	5	1.6	78.1(2.3)	99.5(6.7)	87.1(5.5)
地虫硫磷	1~100	0.9998	2	0.8	71.6(3.3)	94.4(1.6)	74.1(3.3)
噻虫啉	1~100	0.9995	5	1.5	76.3(5.5)	89.0(1.9)	79.3(5.5)
吡虫啉	2~200	0.9983	10	3.0	70.6(6.1)	90.4(5.6)	72.6(6.1)
内吸磷	1~100	0.9998	5	1.4	79.7(10.5)	101.3(14.2)	72.4(8.5)
氧倍硫磷	1~100	0.9992	2	0.6	75.6(1.7)	92.9(2.3)	74.2(1.7)
灭锈胺	1~100	0.9993	2	0.6	72.1(9.1)	95.6(1.4)	75.4(5.3)
硫线磷	1~100	0.9985	3	1.0	77.4(1.3)	95.1(2.6)	77.7(1.3)
敌草胺	1~100	0.9993	5	2.0	77.2(1.5)	92.0(4.2)	76.2(1.5)
敌百虫*	5~500	0.9977	20	6.0	74.3(1.6)	93.6(1.6)	77.4(1.6)
对氧磷	1~100	0.9992	5	1.6	79.7(11.6)	94.4(6.6)	83.1(5.7)
甲酚噻草胺	1~100	0.9996	5	1.5	77.4(4.0)	94.1(6.5)	76.9(4.0)
氧甲拌磷砷	2~200	0.9972	10	4.0	74.7(5.4)	100.2(1.4)	75.7(3.0)
N-去乙基甲基嘧啶磷	1~100	0.9988	5	2.0	77.3(2.5)	94.9(1.0)	70.6(2.4)
氧倍硫磷亚砷	1~100	0.9991	2	0.8	78.7(3.8)	91.9(5.6)	78.7(8.7)
噻唑膦	1~100	0.9990	2	0.4	73.3(3.7)	94.2(0.8)	73.7(3.7)
腈菌唑	2~200	0.9994	10	4.0	75.1(3.1)	90.5(2.6)	77.4(1.1)
噻虫嗪	1~100	0.9981	5	2.0	72.3(3.5)	92.8(1.4)	77.0(3.5)
甲拌磷砷	1~100	0.9998	5	1.6	75.5(2.9)	105.0(4.0)	73.9(3.7)
氧丰索磷	2~200	0.9986	10	3.0	100.3(2.4)	88.5(1.3)	102.5(2.5)
多效唑	1~100	0.9995	5	2.0	89.2(1.2)	89.3(1.1)	73.7(1.2)
氧倍硫磷砷	1~100	0.9977	5	1.5	79.3(2.8)	98.9(1.9)	76.5(3.7)
烯菌灵	1~100	0.9995	5	2.0	76.5(5.0)	66.4(5.8)	75.8(5.1)
喹硫磷	1~100	0.9997	5	1.6	70.2(1.2)	93.3(4.5)	70.7(1.2)

续表 3

农药 Pesticide (<i>n</i> =86)	线性范围 Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 Correlation coefficient (<i>r</i>)	定量限 LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)	检出限 LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 Recovery/% (RSDs/%)(<i>n</i> =6)		
					10 $\mu\text{g/kg}$	50 $\mu\text{g/kg}$	100 $\mu\text{g/kg}$
辛硫磷	2~200	0.9994	10	3.0	68.5(3.4)	97.5(8.4)	77.2(3.4)
磷胺	1~100	0.9998	2	0.7	72.2(9.5)	95.2(2.1)	72.2(9.5)
联苯胂酯*	5~500	0.9980	20	6.0	80.2(2.3)	104.7(2.4)	78.6(5.4)
杀扑磷	2~200	0.9998	10	4.0	76.3(3.2)	101.4(5.1)	87.6(3.2)
丙烯菊酯	2~200	0.9992	10	3.0	77.1(3.5)	102.3(6.2)	76.9(3.5)
二嗪磷	1~100	0.9998	3	1.0	69.2(4.6)	99.0(2.3)	70.0(4.6)
噻嗪酮	1~100	0.9996	2	0.6	75.4(1.2)	88.0(1.7)	77.6(1.2)
戊唑醇	1~100	0.9996	5	1.6	72.0(2.1)	81.6(4.0)	73.5(2.1)
丰索磷	1~100	0.9996	2	0.7	71.7(1.0)	96.0(1.2)	77.6(1.0)
氧丰索磷砒	2~200	0.9998	10	3.0	75.9(8.3)	92.1(8.1)	77.5(6.4)
除虫脲	1~100	0.9996	3	1.0	77.2(1.0)	93.0(2.3)	75.6(2.2)
己唑醇	2~200	0.9992	10	3.0	68.8(2.9)	89.9(1.1)	85.4(2.9)
除线磷*	5~500	0.9992	20	6.0	77.7(3.4)	92.5(3.1)	77.7(3.4)
氯唑磷	1~100	0.9997	1	0.2	78.6(2.8)	87.7(6.4)	78.6(2.8)
氟硅唑	2~200	0.9998	10	3.0	75.5(2.4)	92.5(2.2)	75.5(2.4)
保棉磷	2~200	0.9985	10	3.0	73.8(3.9)	107.6(1.7)	73.8(3.9)
亚胺硫磷	2~200	0.9997	10	3.0	75.4(3.9)	91.1(1.8)	75.4(3.9)
苯线磷亚砒	2~200	0.9991	10	4.0	75.3(4.8)	84.0(3.9)	75.3(4.8)
吡丙醚	1~100	0.9996	2	0.7	78.5(1.6)	87.9(3.5)	78.5(1.6)
治螟磷	1~100	0.9994	5	1.7	70.8(6.5)	99.9(10.5)	70.8(9.7)
苯霜灵	1~100	0.9998	2	0.5	76.0(3.2)	95.7(2.9)	76.5(3.2)
嘧啶磷*	5~500	0.9998	20	6.0	73.3(4.1)	94.0(2.2)	73.3(3.2)
苯线磷砒	1~100	0.9998	2	0.7	73.6(2.2)	94.1(3.2)	73.6(3.0)
异硫磷	1~100	0.9997	3	1.0	79.8(2.2)	91.7(5.0)	79.8(2.2)
毒死蜱	2~200	0.9995	10	3.0	76.5(3.6)	90.5(1.2)	76.5(3.6)
抑虫胂	1~100	0.9995	5	2.0	72.8(5.6)	98.2(4.3)	72.8(2.7)
毒虫畏	2~200	0.9993	10	4.0	70.4(5.5)	94.6(4.6)	98.7(4.1)
烯草酮	1~100	0.9997	1	0.3	75.7(1.4)	102.3(5.1)	77.6(5.1)
哒螨灵	2~200	0.9998	10	3.0	65.0(4.0)	87.8(5.5)	110.6(3.0)
伏杀硫磷	1~100	0.9998	2	0.6	65.1(1.7)	92.4(1.6)	125.5(1.7)
炔螨特	1~100	0.9990	1	0.2	76.5(4.7)	92.4(8.9)	98.7(4.7)
甲氧虫酰肼	1~100	0.9995	5	2.0	71.5(1.6)	97.9(4.7)	128.5(1.6)
吡氟氯禾灵	1~100	0.9995	3	1.0	74.3(3.5)	85.7(1.7)	100.8(1.8)
咪鲜胺	1~100	0.9995	2	0.6	73.6(1.1)	91.3(3.2)	99.7(1.1)
百克敏	1~100	0.9996	2	0.5	72.9(1.0)	96.6(3.9)	100.5(1.0)
苯醚甲环唑	1~100	0.9997	2	0.5	73.5(10.5)	92.9(9.2)	111.6(9.7)
肟菌酯	1~100	0.9994	3	0.9	72.4(7.5)	102.3(10.4)	89.4(8.5)
唑螨酯	1~100	0.9952	1	0.3	74.7(4.1)	97.1(3.4)	90.3(4.1)
氟虫腈	2~200	0.9980	10	3.0	99.5(12.1)	103(12.9)	87.2(10.5)
氯虫酰胺	2~200	0.9980	10	3.0	98.5(15.5)	95.5(10.1)	108.4(12.4)
茚虫威	2~200	0.9998	10	3.0	68.5(3.3)	91.3(3.4)	76.5(3.8)

注：* 表示最低加标量为 20 $\mu\text{g/kg}$ ；** 表示最低加标量为 30 $\mu\text{g/kg}$

参考文献:

- [1] LOURENCETTI C, MARCHI M R R D, RIBEIRO M L. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV[J]. *Talanta*, 2009, 77(2): 701-709.
- [2] SHI Z, HU J, LI Q, ZHANG S, LIANG Y, ZHANG H. Graphene based solid phase extraction combined with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for carbamate pesticides analysis in environmental water samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1 355: 219-227.
- [3] LI Y, KELLEY R A, ANDERSON T D, LYDY M J. Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honey bees, pollen, and wax by gas chromatography-quadrupole mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2015, 140: 81-87.
- [4] LI J, LIU D, WU T, ZHAO W, ZHOU Z, WANG P. A simplified procedure for the determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls in edible vegetable oils[J]. *Food Chemistry*, 2014, 151(10): 47-52.
- [5] ISHIBASHI M, ANDO T, SAKAI M, MATSUBARA A, UCHIKATA T, FUKUSAKI E, BAMBATA T. High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1 266(12): 143-148.
- [6] KE Y, ZHU F, ZENG F, LUAN T, SU C, OUYANG G. Preparation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber and its application on organochlorine pesticides determination[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1 300: 187-192.
- [7] DUCA R C, SALQUEBRE G, HARDY E, APPENZELLER B M R. Comparison of solid phase and liquid/liquid extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 955: 98-107.
- [8] PLÁCIDO A, PAÍGA P, LOPES D H, CORREIA M, DELERUE M C. Determination of methiocarb and its degradation products, methiocarb sulfoxide and methiocarb sulfone, in bananas using QuEChERS extraction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(2): 325-331.
- [9] 黄晓会, 薛健, 吴晓波, 佟鹤芳, 庞作正, 薛雯, 程猷. 甘草中 50 种有机氯及拟除虫菊酯农药残留量的分析方法研究[J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(15): 1 204-1 208.
- HUANG Xiaohui, XUE Jian, WU Xiaobo, TONG Hefang, PANG Zuozheng, XUE Wen, CHENG You. Study on analysis method for 50 organochlorine and pyrethroid pesticides in glycyrrhiza[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2011, 46(15): 1 204-1 208(in Chinese).
- [10] 戴博, 金红宇, 张华峰, 马双成. 凝胶渗透色谱-固相萃取净化气相色谱-质谱法检测甘草、黄芪、人参和银杏叶中 24 种农药残留[J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(3): 558-563.
- DAI Bo, JIN Hongyu, ZHANG Huafeng, MA Shuangcheng. GC-MS determination of 24 pesticides in Glycyrrhiza Uralensis, Astragalus Mongolicus, Ginseng and Ginkgo leaf by combined approach of gel permeation chromatography and solid phase extraction purification[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011, 31(3): 558-563(in Chinese).
- [11] 杨如箴, 王金花, 张蓉, 王明林, 黄梅. 凝胶渗透色谱净化超高效液相色谱-串联质谱法检测甘草及其提取物中的 11 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. *色谱*, 2010, 28(8): 769-775.
- YANG Ruzhen, WANG Jinhua, ZHANG Rong, WANG Minglin, HUANG Mei. Determination of 11 carbamate pesticide residues in Glycyrrhizae radix et rhizoma and its extracts using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with gel permeation chromatographic clean-up[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2010, 28(8): 769-775(in Chinese).
- [12] WALORCZYK, STANISTAW. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty[J]. *Talanta*, 2014, 120: 106-113.
- [13] DU G, SONG Y, WANG Y. Rapid simultaneous determination of multiple pesticide residues in traditional Chinese medicines using programmed

- temperature vaporizer injection-fast gas chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2015, 34(23): 3 372-3 382.
- [14] CHEN L, SONG F, LIU Z, ZHENG Z, XING J, LIU S. Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1 225: 132-140.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版,一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版,四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [17] GB/T 2763—2016. 食品中农药最大残留限量[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [18] 刘育辰,陈有根,王丹,高雪岩,郭洪祝,傅欣彤,王文全. 甘草化学成分研究[J]. 药物分析杂志, 2011,31(7):1 251-1 255.
- LIU Yuchen, CHEN Yougen, WANG Dan, GAO Xueyan, GUO Hongzhu, FU Xintong, WANG Wenquan. Studies on chemical constituents on roots of Glycyrrhiza uralensis[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2011, 31(7): 1 251-1 255(in Chinese).
- [19] 周燕,王明奎,廖循,朱绪民,彭树林,丁立生. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析[J]. 分析化学,2004,32(2):174-178.
- ZHOU Yan, WANG Mingkui, LIAO Xun, ZHU Xumin, PENG Shulin, DING Lisheng. Rapid identification of compounds in Glycyrrhiza uralensis by liquid chromatography/tandem massspectrometry[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2004, 32(2): 174-178 (in Chinese).
- [20] DOU X, CHU X, KONG W, YANG Y, YANG M. Carbon nanotube-based QuEChERS extraction and enhanced product ion scan-assisted confirmation of multi-pesticide residue in dried tangerine peel[J]. RSC Advances, 2015, 5: 86 163-86 171.