doi: 10.3969/j.issn.1004－4957.2017.01.007

超高效液相色谱－串联质谱法测定蔬菜和水果中腈吡螨酯残留量

崔淑华[1*]，程　刚[1]，李瑞娟[2]，李正义[1]，王　宇[1]，张雪琰[1]，赵　峰[1]

(1. 山东出入境检验检疫局　检验检疫技术中心，山东　青岛　266002；2. 山东省农业科学院植物保护研究所，山东　济南　250100)

摘　要： 建立了蔬菜和水果中腈吡螨酯残留量的超高效液相色谱－串联质谱(UPLC－MS/MS)分析方法。样品经乙腈均质提取，混合使用乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)和 C_{18} 两种基质分散净化剂净化，净化液过膜后直接进行 UPLC－MS/MS 检测。通过考察腈吡螨酯在不同果蔬样品中的基质效应发现，采用 UPLC－MS/MS 检测蔬菜和水果中腈吡螨酯残留量时，腈吡螨酯在不同种类样品中存在不同程度的基质减弱效应，采用空白基质溶液稀释标准建立校正的标准曲线外标法定量以消除基质效应。结果表明，腈吡螨酯在 0.05～10 μg/L 浓度范围内具有良好的线性关系，相关系数不低于 0.999 6。在 0.000 05～2 mg/kg 范围内进行加标回收率实验，平均回收率为 81.1%～99.3%，相对标准偏差为 4.7%～9.3%，方法的定量下限为 0.043 μg/kg，检出限为 0.013 μg/kg。

关键词： 超高效液相色谱－串联质谱(UPLC－MS/MS)；蔬菜；水果；腈吡螨酯；残留量

中图分类号： O657.63；F767.2　　**文献标识码：** A　　**文章编号：** 1004－4957(2017)01－0042－05

Determination of Cyenopyrafen Residues in Fruits and Vegetables by UPLC－MS/MS

CUI Shu-hua[1*], CHENG Gang[1], LI Rui-juan[2], LI Zheng-yi[1], WANG Yu[1], ZHANG Xue-yan[1], ZHAO Feng[1]

(1. Inspection and Quarantine Technology Center of Shandong Exit－Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 2. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agriculture, Jinan 250100, China)

Abstract: A method of ultra performance liquid chromatography－tandem mass spectrometry(UPLC－MS/MS) was developed for the determination of cyenopyrafen residues in fruits and vegetables. The analytes were extracted from the samples using acetonitrile, and purified by dispersion solid phase extration using C_{18} and PSA as solid phase, then analyzed by UPLC－MS/MS. The matrix-induced weakening effect was observed in the analysis of cyenopyrafen by UPLC－MS/MS in serval samples including of cucumber, apple and onion. The interference of matrix was reduced by the matrix-matched calibration standards curve. The linear ranges of cyenopyrafen in different matrices ranged from 0.05 μg/L to 10 μg/L with correlation coefficients not less than 0.999 6. The recoveries of cyenopyrafen in cucumber, grape, apple and scallion samples at spiked levels of 0.000 05－2 mg/kg were in the range of 81.1%－99.3%, with relative standard deviations(RSDs) of 4.7%－9.3%. The limit of quantitation was 0.043 μg/kg and the limit of detection was 0.013 μg/kg.

Key words: ultra performance liquid chromatography－tandam mass spectrometry(UPLC－MS/MS); vegetables; fruits; cyenopyrafen; residues

害螨是危害果蔬及蔬菜的主要有害生物之一，对果树、蔬菜的危害十分广泛与猖獗。害螨个体小，繁殖极快，在最适的条件下，1 头雌成螨 1 个月繁殖极限可高达上万头，且其适应性强，易产生抗药性，防治难度大[1]。害螨为害果树后，常引起叶片退绿或变灰白而失去光泽，果实受害后表皮粗糙，会出现龟裂状网纹，失去诱人的色泽，果质品味下降，严重时引起落叶、落花、落果，减少收成，导致树势减弱，影响次年的开花结果；成、若螨为害蔬菜时，吸食蔬菜嫩叶和幼果汁液，叶片被害后皱

收稿日期：2016－08－20；修回日期：2016－09－21
基金项目：山东出入境检验检疫科研项目(SK201425)
* 通讯作者：崔淑华，高级工程师，研究方向：食品安全，Tel：0532－86767935，E－mail：cuishuh@163.com

缩易落叶，进而影响蔬菜产量及品质。另外，害螨还能传播多种植物病毒病，每年由于害螨危害导致的瓜果蔬菜的损失日益增加[2-3]。腈吡螨酯(Cyenopyrafen)是2009年由日产化学公司研制的新型吡唑类杀螨剂，主要用于防治果树、蔬菜和青辣椒的红蜘蛛等害螨，具有较好的速效性和持效性。该药为触杀型杀螨剂，通过扰乱琥珀酸脱氢酶抑制线粒体的效能，阻碍电子传递，破坏氧化磷酸化过程而达到杀害螨虫的目的，与现有杀虫剂无交互抗性，具有很好的应用前景[4]。

随着腈吡螨酯的登记、推广和使用，作为我国蔬菜、水果主要出口市场的韩国、日本等国家对其制定了残留限量标准。韩国规定腈吡螨酯在茄子中的最大允许残留量(MRL)为2.0 mg/kg；日本规定腈吡螨酯在多种蔬菜和水果中的MRL为0.02～5.0 mg/kg[5]；同时，作为我国蔬菜和水果主要出口市场的欧盟、日本等国家规定若田间使用农药未在该国家登记，没有制定相应的残留限量标准时，出口至其国家的食品农产品均实行0.01 mg/kg的“一律标准”。现阶段，国内外对蔬菜和水果中腈吡螨酯残留量测定方法的研究很少，国外关于腈吡螨酯残留量的分析方法中，一种方法是采用QuEChERS进行前处理，PTV – GC/TOFMS对其进行检测[6]，另一种方法是采用NH_2柱净化，HPLC – DAD检测[7]；国内仅检索到笔者申请的专利[8-10]，其余未见关于果蔬中腈吡螨酯残留量检测方法的报道。PTV – GC/TOFMS仪器在我国检测机构中应用较少，而采用HPLC – DAD对农药进行检测时，存在抗干扰能力弱，不能进行准确定性等缺点。LC – MS/MS因具有多种优点，已成为农药残留分析中最有利的检测仪器，尚未见采用LC – MS/MS对腈吡螨酯检测的研究报道。因此，研究建立LC – MS/MS分析检测果蔬中腈吡螨酯残留量的检测方法具有较大意义。

QuEChERS前处理方法已成为现阶段应用最广泛的检测方法，该方法简便快捷，但由于不同农药的性质不同，并不是所有农药均可使用PSA等基质固相分散萃取剂净化，具体农药需通过回收率试验验证。本文参照QuEChERS前处理技术的分散固相萃取技术，采用混合吸附剂净化，建立了UPLC – MS/MS测定蔬菜和水果中腈吡螨酯残留量的检测方法。该方法填补了果蔬中腈吡螨酯残留量检测方法的空白，将建立的检测方法应用于实际样品检测，并取得了满意结果。

1　实验部分

1.1　仪器与试剂

Agilent 1290 – 6460液相色谱 – 串联质谱仪(配ESI离子源，美国Agilent Technologies公司)；3K 15型离心机(德国Sigma公司，配2 mL转子)；ULTRA – TURRAX T – 18 basic型均质器(IKA公司，德国)；Milli-Q超纯水器(Millipore公司，美国)；Vortex3000型旋涡混合器(德国Wiggens公司)。

腈吡螨酯标准品(分子量：393.52，浓度为100 μg/mL，德国Sigma公司)；乙腈、甲醇、乙酸铵(色谱纯，德国Merke公司)；氯化钠、无水硫酸镁(分析纯，国药集团化学试剂有限公司，用前在450 ℃烘5 h，200 ℃时取出冷却备用)；十八烷基键合相硅胶(C_{18})净化剂、乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)净化剂(Agela Technologies公司)；QuEChERS分散固相萃取管(15 mL离心管中装150 mg PSA、900 mg无水硫酸镁，美国Agilent Technology公司)；QuEChERS分散固相萃取管(15 mL离心管中装150 mg C_{18}、900 mg无水硫酸镁，美国Agilent Technology公司)；QuEChERS分散固相萃取管(15 mL离心管中装150 mg PSA、45 mg石墨炭黑(Carb)粉末、855 mg无水硫酸镁，美国Agilent Technology公司)；QuEChERS分散固相萃取管(15 mL离心管中装150 mg PSA，150 mg C_{18}和900 mg无水硫酸镁，美国Agilent Technology公司)。

将100 μg/mL腈吡螨酯标准储备溶液用乙腈配制成浓度为10 μg/mL的标准中间溶液，准确移取上述标准中间液，以乙腈逐级稀释，得到0.05，0.1，0.2，0.5，1，2，5，10 μg/L系列纯溶剂标准工作溶液；取空白样品按样品前处理过程进行处理，得到空白基质提取净化液，用该基质溶液稀释标准中间液，配制成0.05，0.1，0.2，0.5，1，2，5，10 μg/L系列基质标准工作溶液。

1.2　样品前处理

将大蒜掰瓣去皮，蒜苔、洋葱、韭菜等切成适当块形(4 cm^2)或条状(2 cm)。称取样品80 g于自封袋塑料袋内，放入微波炉内高火微波处理90 s后立即取出，冷却，粉碎制样[11]。其余果蔬样品取可食用部分，直接粉碎并混合均匀，准确称取10 g(精确至0.01 g)样品，置于50 mL离心管中，准确加

入 20 mL 乙腈溶液，均质提取 1 min，加入 4 g 无水 $MgSO_4$，1 g NaCl，立即涡旋混匀后，以 7 000 r/min 离心 5 min。吸取 2.0 mL 上层有机相转移至装有 100 mg C_{18}，50 mg PSA 和 300 mg 无水 $MgSO_4$ 粉末的离心管中，加入后立即将其涡旋混匀 2 min，7 000 r/min 离心 5 min，取上清液过 0.22 μm 滤膜于进样小瓶中，待 UPLC－MS/MS 测定。

1.3 仪器分析条件

色谱柱：Eclipse plus C_{18}柱(100 mm×2.1 mm，1.8 μm)；流动相：A 为乙腈，B 为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液，梯度洗脱程序：初始为 5% A，保持 0.5 min，0.5～2.0 min，A 线性增加至 95%，保持 3.5 min；5.5～5.6 min 回到初始状态，保持 8 min；流速：0.2 mL/min；进样体积：5 μL；柱温：30 ℃。

电喷雾离子源(ESI)；正离子扫描多反应监测(MRM)模式检测；雾化器压力：275.9 kPa；干燥气温度：350 ℃；干燥气流速：6.0 L/min；鞘气温度：350 ℃；鞘气流速：10.0 L/min；毛细管电压：+3 500 V；监测离子对(母离子/子离子)：定量离子为 *m/z* 394.2/310.2，定性离子为 *m/z* 394.2/254.1；毛细管出口电压/碎裂电压为 110 V；碰撞能量：定量离子碰撞能量为 25 eV，定性离子的碰撞能量为 35 eV。

2 结果与讨论

2.1 仪器条件的确定

采用 1 mg/L 的待测化合物的标准溶液以流动注射的方式分别用 ESI^+ 和 ESI^- 模式进行全扫描(SCAN 模式)，发现腈吡螨酯在 ESI^+ 模式下的信号强度比 ESI^- 模式下高 1 个数量级，因此选择采用 ESI^+ 模式，在此模式下确定了腈吡螨酯母离子为 *m/z* 394.2。用 0.1 mg/L 混合标准溶液，在 SIM 模式下分别对毛细管出口电压(Fragmentor 值)进行优化，研究发现 Fragmentor 为 110 V 时，腈吡螨酯的响应值最高。在 Product 模式下扫描发现母离子产生的响应最高的 2 个子离子为 *m/z* 310.2 和 254.1。在 MRM 模式下，分别确定 *m/z* 394.2 产生 *m/z* 310.2 和 254.1 的碰撞能量(CE 值)为 25 eV 和 35 eV，由于 *m/z* 394.2/310.2 时响应值更大，选择其作为定量离子，*m/z* 394.2/254.1 作为定性离子。

考察了分别以乙腈和甲醇作为有机流动相时对腈吡螨酯分离效果的影响，发现甲醇条件下的腈吡螨酯响应值为乙腈条件下的 70% 左右，分别采用 0.1% 甲酸和 5 mmol/L 乙酸铵作为水相流动相时，腈吡螨酯的出峰情况变化不大，因此，本研究选用乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵为分析流动相，并采用“1.3”梯度洗脱程序对化合物进行色谱分析。同时比较了几种不同色谱柱的分离效果，结果显示 Eclipse plus C_{18}柱(100 mm×2.1 mm，1.8 μm)的保留时间及分离度均较理想。因此，选择该柱作为分析柱。在上述优化色谱－质谱条件下，对黄瓜、苹果和洋葱混合空白样品进行腈吡螨酯加标实验，MRM 色谱图见图 1。从图 1 可看出，样品基质不干扰腈吡螨酯的测定。

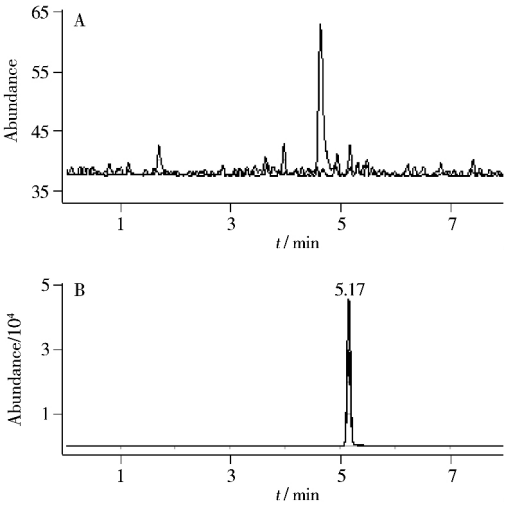

图 1 在黄瓜、苹果和洋葱空白混合样品(A)及空白溶液加标 10 μg/kg 腈吡螨酯后(B)的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of blank mixture solution of cucumber, apple and onion sample(A), and blank mixture spiked with 10 μg/kg cyenopyrafen(B)

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂的选择 进行 QuEChERS 前处理时，为解决碱敏感农药(抑菌灵、百菌清)的降解问题，通常采用酸化乙腈来提取，但加入乙酸等酸性溶液会对 PSA 的净化效果产生影响。由于本研究中腈吡螨酯对酸和碱均不敏感，为使 PSA 达到最佳的净化效果，实验选择乙腈作为提取溶剂。

2.2.2 基质分散净化剂的选择 基质分散净化常用的净化剂有乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)、十八烷基硅胶键合相(C_{18})和石墨化炭黑(Carb)，其中 PSA 常用于去除各种有机酸、部分色素以及蛋白质、糖类。C_{18}是一种非极性吸附剂，可以吸附高分子量的非极性干扰物质，且对样品中的蛋白、脂质物质、

部分维生素、色素和甾醇等杂质有一定的吸附作用。Carb 主要用于去除类甾体、叶绿素等色素[12]。各种净化剂在去除杂质的同时也可能对目标化合物产生吸附，为选择最佳的净化剂种类和用量，需进行优化试验。

将 6 mL 20 μg/L 腈吡螨酯标准溶液分别经装有不同种类的基质分散固相萃取剂的 4 种 QuEChERS 分散固相萃取管涡旋净化，填装的基质分散固相萃取剂分别为：①150 mg PSA；②150 mg C_{18}；③150 mg PSA + 150 mg C_{18}；④150 mgPSA + 45 mg Carb，处理后的回收率分别为 98.7%，99.3%，94.5% 和 67.9%。由此可见，在实验剂量下 PSA 和 C_{18} 对腈吡螨酯不产生吸附，Carb 对腈吡螨酯产生了较大的吸附作用，因此对样品中残留的腈吡螨酯进行净化时，不能选择 Carb 作为净化剂。本研究分别使用①150 mg PSA，②150 mg C_{18} 和③150 mg PSA + 150 mg C_{18} 对不含有腈吡螨酯的阴性洋葱样品提取液进行净化，用该净化液配制系列标准溶液，进样后获得的校准曲线分别为：$y = 10\ 923x - 6\ 892.6$，$y = 12\ 318x - 3\ 297.5$ 和 $y = 16\ 069x + 6\ 487.6$，从校准曲线的斜率可知共同使用 PSA 和 C_{18} 作为基质分散固相萃取剂时，样品基质减弱效应最小。因此，本研究选用 PSA 和 C_{18} 作为基质分散固相萃取剂。

进一步考察 PSA 和 C_{18} 的加入量对净化效果的影响，结果显示：每毫升提取液中 PSA 添加量超过 25 mg 时，回收率会降低；每毫升提取液中 C_{18} 添加量不超过 50 mg，则不会对腈吡螨酯产生吸附。因此，本研究选择在每毫升提取液中加入 25 mg PSA 和 50 mg C_{18} 进行基质固相分散净化。

2.2.3　辛辣蔬菜的微波处理　在蔬菜的农药残留检测中，大蒜、洋葱、韭菜和蒜苔等辛辣蔬菜为一类特殊的复杂样品，这类蔬菜富含硫基及多种杂原子，在被粉碎时，其内含的活性酶物质在与空气中的氧接触后，会促使蔬菜释放出大量具有特殊辛辣气味的有机硫化合物[11]。使用 LC - MS/MS 检测时，虽然 MRM 监测模式能很好地排除这些有机硫化合物对腈吡螨酯的影响，但依然会对化合物的离子化产生影响。本文采用朱莉萍等[11]使用的微波处理方法对洋葱样品进行了处理，结果表明，在该微波条件下腈吡螨酯不会降解，且可获得较好的加标回收率和精密度。

2.3　样品基质效应的考察

本研究对 LC - MS/MS 分析时的基质效应进行了考察：取一定量的阴性黄瓜、苹果和洋葱样品，分别经乙腈提取，PSA 和 C_{18} 基质分散固相萃取净化后，获得相应的空白基质溶液，配制相应的基质标准系列工作溶液，并与用乙腈配制的纯溶剂系列标准工作溶液进样分析得到各自的基质标准曲线，根据基质效应 = 基质匹配校准曲线斜率/纯溶剂标准曲线斜率，若斜率比接近 1，则表明基质效应越小[13-14]。结果显示，黄瓜、苹果、洋葱和经微波处理后洋葱中腈吡螨酯的基质效应结果分别为 0.756，0.784，0.305 和 0.638，未经微波处理的洋葱的基质效应最强，而经微波处理后其基质效应减弱，但仍存在较强的基质减弱效应，在黄瓜、苹果等基质较干净的样品中也存在一定的基质减弱效应。因此，为保证实验结果的准确性和可靠性，本研究选择以空白样品提取净化液配制基质标准溶液，使标样和样品溶液具有同样的离子化条件，从而消除样品基质效应。

2.4　方法的线性范围

将“1.1”配制的 0.05 ~ 10 μg/L 系列标准工作溶液，在选定的色谱条件和质谱条件下进行测定，以峰面积为纵坐标（y），其对应的浓度为横坐标（x，μg/L）绘制校准曲线，结果显示，腈吡螨酯在 0.05 ~ 10 μg/L 浓度范围内具有良好的线性关系，几种不同基质的相关系数均大于 0.999 0。

2.5　方法的检出限与定量下限

方法检出限（LOD）以空白样品基质稀释标准曲线上的最低浓度出峰时，取信噪比 $S/N = 3$ 和样品处理过程的稀释倍数（该方法的稀释倍数为 2 倍）计算得出，定量下限（LOQ）是以空白样品基质稀释标准曲线上的最低浓度出峰时，取信噪比 $S/N = 10$ 和样品处理过程的稀释倍数计算得出。通过上述计算方法，得出腈吡螨酯在黄瓜、苹果和洋葱混合基质中的方法检出限为 0.013 μg/kg，定量下限为 0.043 μg/kg。

2.6　方法的回收率与精密度

在不含腈吡螨酯的阴性苹果、葡萄、黄瓜和洋葱样品中添加 0.000 05，0.005，0.01，2.0 mg/kg 4 个浓度水平的混合标准溶液，待农药添加 30 min 后按“1.2”步骤进行样品前处理，“1.3”方法进行

仪器分析检测，对于洋葱样品，应将标准溶液均匀添加在 80 g 样品中，微波消解后再进行前处理。2 mg/kg 添加浓度的样品待测液测定前，需用乙腈将净化液中腈吡螨酯稀释至其线性范围内，同时，阴性样品空白溶液也需用乙腈进行同程度稀释后配制标准曲线，测定后，将测定浓度与农药理论添加浓度进行比较，得到农药加标回收率，每个加标水平平行测定 6 次，得其相对标准偏差，结果见表 1。由表 1 可知，腈吡螨酯在苹果、葡萄、黄瓜和洋葱中的加标回收率为 81.1%～99.3%，相对标准偏差(RSD)为 4.7%～9.3%，说明本方法的回收率较高，重复性好。

表 1 样品中腈吡螨酯的平均回收率和精密度实验结果

Table 1 Mean recoveries and precisions of cyenopyrafen in sample at 3 different levels

Sample	Fortified level(mg/kg)	Average recovery(%)	RSD(%)
Apple	0.000 05，0.005，0.01，2.0	85.7，93.5，92.8，99.3	6.4，7.9，5.9，5.2
Grape	0.000 05，0.005，0.01，2.0	88.4，84.3，86.2，91.0	8.7，9.3，8.2，6.6
Cucumber	0.000 05，0.005，0.01，2.0	90.7，81.1，88.3，92.8	7.5，6.6，7.0，4.7
Onion	0.000 05，0.005，0.01，2.0	83.9，86.8，90.6，97.4	8.6，6.5，6.1，4.7

2.7 实际样品检测

按照本方法对市售菠菜、甘蓝、草莓、苹果、黄瓜、小葱等 23 批农贸市场销售的蔬菜和水果进行腈吡螨酯检测，均未检出腈吡螨酯。

3 结 论

本文在优化样品前处理和仪器条件的基础上，建立了 UPLC－MS/MS 测定蔬菜和水果中腈吡螨酯残留量的检测方法。该方法采用改良 QuEChERS 方法进行样品前处理，基质匹配标准溶液外标法进行定量，操作简便快捷，结果准确可靠，应用于实际蔬菜和水果样品中腈吡螨酯残留量的检测分析，取得了良好效果。

参考文献:

[1] Zhi J R. *J. Mountain Agric. Biol.*(郅军锐. 山地农业生物学报)，**2004**，23(3)：260－265.

[2] Feng Q. *Plant Doctor*(丰泉. 植物医生)，**2000**，13(4)：28.

[3] Hong X Y，Cheng N H. *J. Plant Protect.*(洪晓月，程宁辉. 植物保护学报)，**1999**，26(2)：177－184.

[4] Zhao P，Yan Q X，Li X. *Agrochemicals*(赵平，严秋旭，李新. 农药)，**2012**，51(10)：749－751.

[5] Qian W J. *Pesticide Market News*(钱文娟. 农药市场信息)，**2013**，(24)：34.

[6] Ju K，Kwon H，Park B J，Kim C S，Jin Y D，Lee J B，Yun S H，Son K A，Hong S M，Im G J. *Korean J. Pestic. Sci.*，15(4)：401－416.

[7] Cho R L，Ji H H，Jong S L，Kyu S L. *Korean J. Pestic. Sci.*，**2011**，15(42)：97－103.

[8] Cui S H. China Patent(崔淑华. 中国专利)，ZL 201410026918.3. 2015－09－02.

[9] Inspection and Quarantine Technology Center of Shandong Exit－Entry Inspection and Quarantine Bureau. China Patent(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心. 中国专利)，ZL 201410841487.6. 2014－04－23.

[10] Inspection and Quarantine Technology Center of Shandong Exit－Entry Inspection and Quarantine Bureau. China Patent(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心. 中国专利)，ZL 201410843022.4. 2015－04－08.

[11] Zhu L P，Lu R X. *J. Anhui Agric. Sci.*(朱莉萍，陆瑞祥. 安徽农业科学)，**2012**，40(9)：5355－5356，5503.

[12] Cui S H，Xu M L，Qian J L，Duan H，Liu J F，Lin L M，Wang K Y. *Chin. J. Anal. Chem.*(崔淑华，许美玲，钱家亮，段浩，刘金峰，林黎明，王开运. 分析化学)，**2011**，39(12)：1836－1840.

[13] Rajski L，Lozano A，Uclés A，Ferrer C，Fernández－Alba A R. *J. Chromatogr. A*，**2013**，1304：109－120.

[14] Wang L Z，Huang X Y，Chen Y，Lin Z X，Wang G F，Zhou Y. *J. Instrum. Anal.*(王连珠，黄小燕，陈泳，林子旭，王根芳，周昱. 分析测试学报)，**2014**，33(10)：1102－1108.