

超高效液相色谱-串联质谱法测定土壤中 5 种有机磷农药

叶琰 (实朴检测技术(上海)股份有限公司, 上海 201108)

摘要 [目的]建立土壤中 5 种有机磷农药残留的三重四级杆液相色谱-质谱联用分析方法。[方法]采用 0.1% 甲酸-乙腈溶液作为提取液, 比较了 PSA/C₁₈ 或 PEP 净化方式, 然后以超高效液相色谱-串联质谱仪在多反应监测模式(MRM)下, 进行定量与定性分析检测。[结果]5 种有机磷农药线性范围均在 0.01~50.00 ng/mL, 相关系数均大于 0.995。方法的平均回收率在 82.1%~109.9%, RSD 为 0.48%~1.34%, 方法检出限为 0.01 μg/kg。[结论]此方法灵敏度高、净化效果好、快速、高效, 可用于土壤中该类型有机磷农药残留的分析测定。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法; 有机磷农药; 固相萃取; 土壤

中图分类号 X 833 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)24-0188-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.24.053

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Determination of Organophosphorus Pesticides in Soil by UPLC Triple-quadrupole Mass Spectrometry

YE Yan (Shanghai SEP Analytical Services Co., Ltd., Shanghai 201108)

Abstract [Objective] A method was established for the analysis of 5 organophosphorus pesticide residues in soil by triple four-pole liquid chromatography-mass spectrometry. [Method] 0.1% formate-acetonitrile solution was used as the extraction solution. After PSA/C₁₈ or PEP purification, the residue was detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometer under multi-reaction monitoring mode (MRM). [Result] The linear range of 5 organophosphorus pesticides was 0.01-50.00 ng/mL, and the correlation coefficient was greater than 0.995. The average recovery rate of the method was 82.1%-109.9%, the RSD was 0.48%-1.34%, and the detection limit of the method was 0.01 μg/kg. [Conclusion] This method has high sensitivity, good purification effect, high speed and high efficiency, and can be used for the determination of organophosphorus pesticide residues in soil.

Key words UPLC-MS/MS; Organophosphorus pesticide; SPE; Soil

有机磷类农药自问世以来, 因为其高效、快速、广谱等特点, 一直在农药中占有很重要的位置, 对世界农业的发展起了很重要的作用^[1]。有机磷农药大都属于磷酸酯类或硫代磷酸酯类化合物, 大部分有机磷农药不溶于水, 而溶于有机溶剂, 在中性和酸性条件下稳定, 不易水解, 在碱性条件下易水解而失效^[2]。随着这些有机磷类农药的广泛被使用, 暴露出了很多问题, 如高残留、毒性强等, 尤其在环保意识日益增强的今天, 其暴露的问题也引起了人们的高度重视^[3]。研究表明, 有机磷农药中毒不仅会使乙酰胆碱酯酶失活, 还有可能改变人体内线粒体呼吸链中的呼吸作用和产能过程中酶的活性, 抑制免疫系统功能, 导致组织细胞和 DNA 损伤^[3]。作为典型的酶毒剂, 有机磷农药可以通过消化道摄入, 也可以通过皮肤、黏膜、呼吸道吸收而引发中毒^[4]。有机磷农药在农作物病虫害防治领域具有广泛的应用, 对人、动物和环境产生的危害不容忽视。目前检测方法主要有气相色谱法^[5]、气相色谱法-质谱法^[6]、液相色谱法^[7]、液相色谱-串联质谱法^[8]、酶抑制法^[9]、电化学法^[10]、免疫化学法^[11]等。质谱联用技术在目前仪器分析技术中使用极为广泛, 这种技术充分发挥了色谱优良的分离能力以及质谱准确度和定量特点, 通过选择合适的样品前处理方法和定量手段就可以对多种有机磷农药残留同时进行准确地定性、定量分析, 尤其是对于环境中一些低浓度、强极性和受热易分解的有机磷农药, 检测效果较好。美国 EPA 538 和 EPA 600/R-04/126E 建立了液相色谱-串联质谱法分别测定饮用水与环境水样中的甲胺磷和乙酰甲胺磷, 我国关于 5 种农药分析主要集中在牛

奶^[12]、蔬菜^[13]和水果^[14]等食物样品的测定, 常用检测方法多为气相色谱法和气相色谱质谱联用法等, 目前还未建立相关的土壤的检测规范与标准。该试验研究了土壤中甲胺磷、乙酰甲胺磷、氧化乐果、敌百虫、辛硫磷 5 种农药残留分析的样品前处理方法和质谱检测条件, 以期土壤中有机磷农药检测标准建立提供參考。

1 材料与方法

1.1 标准品及试剂 甲胺磷、乙酰甲胺磷、氧化乐果、敌百虫、辛硫磷, 浓度 100 μg/mL (国家环保标准物质中心); 甲醇、乙腈均为 HPLC 级(美国 Thermofisher 公司); 甲酸 LC-MSMS 级(国药试剂公司); 超纯水(美国 Millipore 公司); N-丙基乙二胺(PSA, 40~63 μm, 6 nm)、C₁₈ 吸附剂(德国 CNW 公司); 固相萃取柱: 填料为二乙烯苯和 N-乙基吡咯烷酮共聚物(PEP, 500 mg/6 mL, 天津艾杰尔), C₁₈ (500 mg/6 mL, 天津艾杰尔), PetiCarb/NH₂ (500 mg/500 mg, 6 mL, 天津艾杰尔); 其他未注明的试剂均为国药分析纯。

1.2 仪器设备 Xevo TQ-S micro 三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 2.1 mm×100 mm, 粒径为 1.7 μm; 超声波清洗器、漩涡混合器、水浴氮吹仪、离心机等其他实验室常规设备。

1.3 标准溶液配制 分别准确吸取标准溶液, 用乙腈-水稀释成 1 mg/L 混合标准溶液, 4℃ 保存, 准确吸取混合标准溶液用水配制成浓度分别为 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、50.00 ng/mL 的系列标准溶液。

1.4 样品前处理 准确称取 2.0 g 土壤试样(准确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中, 加入一定量 0.1% 甲酸-乙腈提取液, 加入 3~5 g 氯化钠, 剧烈振荡涡旋 1 min, 超声提取 30 min, 每间隔 10 min 剧烈振荡涡旋 1 min, 提取后 8 000 r/min 离心 5 min, 取

作者简介 叶琰(1979—), 女, 山东烟台人, 助理研究员, 硕士, 从事化学分析与检测方法研究。

收稿日期 2020-05-06

上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后,待净化。

固相萃取净化:依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 超纯水活化固相萃取柱,保证小柱柱头浸润。取 5 mL 提取液加 45 mL 水混匀后,在自然重力作用下通过固相萃取柱,用真空泵抽干,待小柱干燥后用 5 mL 乙腈-0.1% 甲酸混合溶剂以约 3 mL/min 的流速洗脱小柱,收集洗脱液,35 ℃ 水浴氮吹至近干,准确加入 1 mL 初始流动相,超声或涡旋至完全溶解,经 0.22 μm 滤膜后,待测。

PSA/C₁₈填料净化:取 5 mL 提取液加入装有 150 mg PSA、150 mg C₁₈的离心管中,涡旋 1 min,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后,待测。

按同一操作方法做空白试验。待测物含量过高时,用初始流动相适当稀释至线性范围内进行测定。

1.5 液相色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm,粒径为 1.7 μm)。流动相 A 为 5 mmol/L 甲酸铵-乙腈,流动相 B 为 5 mmol/L 甲酸铵-水,梯度洗脱。

1.6 质谱条件 电喷雾电离源正离子模式 ESI(+)。碰撞气为氩气;脱溶剂气为 N₂。化合物的监测离子对(*m/z*)、锥孔电压、碰撞能质谱参数见表 1。

表 1 5 种农药的质谱分析条件

农药 Pesticides	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	子离子 Product ion (<i>m/z</i>)	锥孔电压 Cone hole voltage V	碰撞能 Collision energy V
甲胺磷 Methamidophos	142.1	94.0 [*] /125.0	38/38	16/12
乙酰甲胺磷 Acephate	184.1	95.0/143.0 [*]	20/20	24/8
氧化乐果 Omethoate	214.0	125.2/183.1 [*]	20/20	18/10
敌百虫 Trichlorfon	258.9	109.3 [*] /223.0	32/32	18/8
辛硫磷 Phoxim	299.1	77.4 [*] /129.2	20/20	34/14

注: * 定量离子
Note: *.Quantitative ion

2 结果与分析

2.1 前处理条件优化 5 种有机磷农药具有一定极性,且在碱性介质中不稳定,因此提取剂中均加入 0.1% 甲酸。不同文献报道的提取溶剂有所不同,该试验分别考察了 0.1% 甲酸-乙腈、0.1% 甲酸-水、0.1% 甲酸-丙酮和 0.1% 甲酸-乙酸乙酯 4 种提取溶剂对 5 种有机磷农药的提取效率影响。试验采用样品加标的方式进行,结果表明(图 1),0.1% 甲酸-水和 0.1% 甲酸-乙酸乙酯对辛硫磷提取效果较差,0.1% 甲酸-丙酮提取效率较高,但提取的共提物较多,杂质干扰较大。因此最终选择 0.1% 甲酸-乙腈作为提取溶剂。

2.2 净化条件优化 试验分别对 PEP、C₁₈、PetiCarb/NH₂ 固相萃取柱以及 150 mg PSA/150 mg C₁₈ 填料净化效果进行比较,结果表明,C₁₈、PetiCarb/NH₂ 固相萃取柱回收率均不高;PEP 和 PSA/C₁₈ 填料的净化效果较理想,回收率在 91.2%~109.6%,其中 C₁₈ 主要吸除脂肪等非极性杂质,PSA 主要吸附脂肪酸、有机酸、碳水化合物等极性杂质。因此,试验采用 150 mg PSA/150 mg C₁₈ 填料对样品进行净化,对于复杂基质土壤样品 PEP 固相萃取更优。

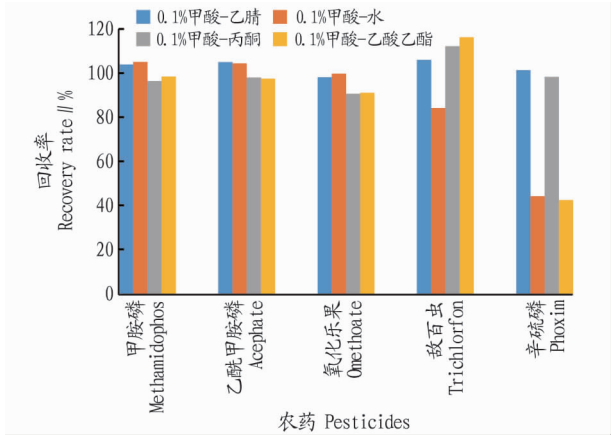
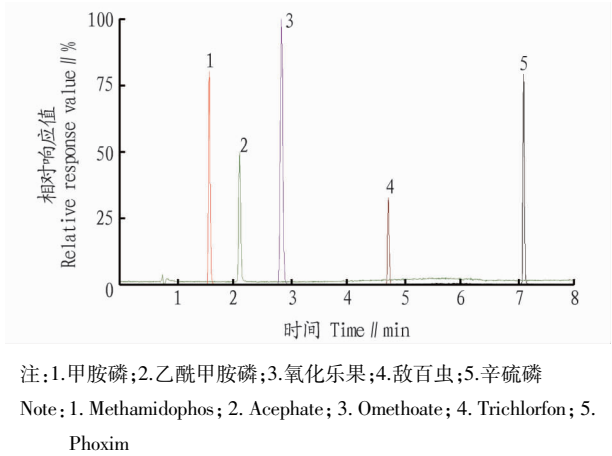


图 1 不同提取溶剂的萃取效果

Fig.1 Extraction effect of different solvents

2.3 色谱质谱条件优化 试验考察了乙腈-水(甲酸)、乙腈-水、乙腈-水(甲酸铵)3 种流动相体系,结果表明,当采用乙腈-水(甲酸)作为流动相时,辛硫磷的出峰效果较好,但极性较大的氧化乐果、甲胺磷、乙酰甲胺磷的色谱峰出现了较为严重的溶剂效应,且基线噪音较大。当采用乙腈-水作为流动相时,离子化响应值较低。因此,采用乙腈-水(甲酸铵)作为流动相体系,为保证整个流动相体系 pH 稳定,在有机相中加入甲酸铵。

将 5 种标准物质溶液稀释为 1 μg/mL 的标准溶液,对每个化合物进行质谱参数的优化,包括母离子和子离子、毛细管电压、脱溶剂温度、气体流量、锥孔电压、碰撞能量。试验结果表明,5 种农药在 ESI 源正离子模式下均容易获取 H⁺,优化各离子质谱参数使特征碎片离子的强度达到最大。优化后 5 种有机磷农药多离子反应检测总离子流图如图 2 所示。



注: 1. 甲胺磷; 2. 乙酰甲胺磷; 3. 氧化乐果; 4. 敌百虫; 5. 辛硫磷
Note: 1. Methamidophos; 2. Acephate; 3. Omethoate; 4. Trichlorfon; 5. Phoxim

图 2 5 种有机磷农药多离子反应检测总离子流图

Fig.2 Total ion flow diagram of 5 kinds of organophosphorus pesticides multi-ion reaction detection

2.4 标准曲线与检出限 取所配制的系列标准溶液,按上述色谱质谱条件测定定量离子峰面积(*Y*)与浓度(*X*)进行线性回归分析,结果见表 2。

2.5 回收率与精密度试验 取某农药场地土壤样品,添加 5 种农药标准溶液,按照上述色谱质谱分析测定条件,分别测

定 7 次,计算回收率和其相对标准偏差(RSD)。从表 3 可以看出,5 种农药平均回收率为 82.1%~109.9%,RSD 为 0.48%~1.34%,表明该方法的回收率和精密度良好。

表 2 线性回归参数和检出限

Table 2 The linear regression parameters and limit of detection				
农药 Pesticides	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 LOD μg/kg	
甲胺磷 Methamidophos	$Y=61\ 208.5X+17.719\ 0$	0.999	0.01	
乙酰甲胺磷 Acephate	$Y=52\ 834.4X+14.374\ 2$	0.999	0.01	
氧化乐果 Omethoate	$Y=95\ 101.2X+30.038\ 5$	0.999	0.01	
敌百虫 Trichlorfon	$Y=25\ 808.4X+33.466\ 2$	0.995	0.01	
辛硫磷 Phoxim	$Y=47\ 196.7X+193.774\ 0$	0.998	0.01	

表 3 样品加标回收率和精密度试验

Table 3 Sample recovery rate and precision test			
农药 Pesticides	加标量 Spiked amount μg/kg	回收率 Recovery rate // %	RSD %
甲胺磷 Methamidophos	0.5	106.5	1.34
乙酰甲胺磷 Acephate	0.5	107.0	1.25
氧化乐果 Omethoate	0.5	100.3	0.70
敌百虫 Trichlorfon	0.5	109.9	0.80
辛硫磷 Phoxim	0.5	82.1	0.48

2.6 样品定量分析 对农药场地土壤样品进行了定量分析,结果表明,甲胺磷、乙酰甲胺磷、氧化乐果、辛硫磷均未检出,敌百虫浓度为 0.5 μg/kg,加标回收率为 98.2%,能满足土壤中甲胺磷、乙酰甲胺磷、氧化乐果、辛硫磷、敌百虫同时测定的要求。

3 结论

该研究采用超高效液相色谱-串联质谱法对土壤中的甲胺磷、乙酰甲胺磷、氧化乐果、辛硫磷、敌百虫进行同时测定。用 0.1%乙腈超声提取,以乙腈(甲酸铵)和水(甲酸铵)梯度洗脱,ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱分离柱,实现了二者的分

离,正离子模式下 MRM 定量测定,同时有效降低基质对目标物质的影响。该方法快速方便准确,能满足土壤中甲胺磷、乙酰甲胺磷、氧化乐果、辛硫磷、敌百虫同时测定的要求,为土壤中有有机磷农药液质检测提供参考。

参考文献

[1] SATOH T, HOSOKAWA M. Organophosphates and their impact on the global environment[J]. Neurotoxicology, 2000, 21(1/2): 223-227.

[2] 吴昭阳,李政一,刘效兰,等.有机磷农药检测方法的应用与研究进展[J].北京工商大学学报(自然科学版),2004,22(4):15-19.

[3] 丁浩东,万红友,秦攀,等.环境中有机磷农药污染状况、来源及风险评估[J].环境化学,2019,38(3):463-479.

[4] 于笑霞,王立新,田俊阁,等.血液灌流对有机磷农药清除的作用[J].中华急诊医学杂志,2005,14(4):282-285.

[5] YI X H, HUA Q, LU Y T. Determination of organophosphorus pesticide residues in the roots of *Platycodon grandiflorum* by solid-phase extraction and gas chromatography with flame photometric detection[J]. Journal of AOAC International, 2006, 89(1): 225-231.

[6] ZHAO L, MA Z H, PAN L G, et al. MISPE combined with GC/MS for analysis of organophosphorus pesticides from environmental water sample[J]. Advanced materials research, 2011, 239/240/241/242: 3216-3220.

[7] ZHANG L J, CHEN F, ZHANG W H, et al. Analysis of six organophosphorus pesticide residues in apples and pears using cloud-point extraction coupled with HPLC-UV[J]. Journal of AOAC International, 2014, 97(4): 1202-1205.

[8] 兰韬,初侨,郝东宇,等. Sin-QnEChERS 结合 UPLC-MS/MS 同时检测茶叶中 10 种有机磷农药残留[J]. 质谱学报, 2019, 40(3): 268-279.

[9] 邱朝坤,刘晓宇,任红敏,等.酶抑制法检测蔬菜中有机磷农药残留[J].食品与机械,2010,26(2):40-42.

[10] 薛瑞,康天放,鲁理平.层层自组装纳米金与乙酰胆碱酯酶电化学传感器检测有机磷农药[J].分析测试学报,2012,31(8):940-944.

[11] KOLOSOVA A Y, PARK J H, EREMIN S A, et al. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of the organophosphorus pesticide parathion-methyl[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(5): 1107-1114.

[12] SANGHI R, PILLAI M K K, JAYALEKSHMI T R, et al. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India[J]. Human & experimental toxicology, 2003, 22(2): 73-76.

[13] 赵蕾,张媛媛,李轶,等.同时测定蔬菜中 15 种有机磷农药的残留方法[J].食品研究与开发,2019,40(16):113-118.

[14] SAWYER L D, THE LUKE, et al. Method for determining multipesticide residues in fruits and vegetables: Collaborative study[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1985, 68(1): 64-71.

(上接第 163 页)

[15] 黄勇,田汉卿,邓乔华,等.不同间作模式下板蓝根产量及经济效益分析[J].现代中药研究与实践,2012(4):9-11.

[16] 宁川川,王建武,蔡昆争.有机肥对土壤肥力和土壤环境质量的影响研究进展[J].生态环境学报,2016,25(1):175-181.

[17] 中国土壤学会农业化学专业委员会.土壤农业化学常规分析方法[M].北京:科学出版社,1983.

[18] 李哲,郭凯,胡雪艳,等.气相色谱-质谱法评价 NaCl 胁迫对椒样薄荷精油产量和品质的影响[J].环境化学,2014,33(10):1802-1805.

[19] 客绍英.松蓝组培快繁体系的建立及四倍体株系选育和品质鉴定[D].北京:北京林业大学,2010.

[20] WANG W J, HE H S, ZU Y G, et al. Addition of HPMA affects seed germination, plant growth and properties of heavy saline-alkali soil in north-eastern China; Comparison with other agents and determination of the mechanism [J]. Plant & soil, 2011, 339(1/2): 177-191.

[21] 尚晓阳.控盐施肥对中度 and 重度滨海盐化潮土养分盐分和作物产量的

影响[D].泰安:山东农业大学,2015.

[22] 祝寿泉,王遵亲.盐渍土分类原则及其分类系统[J].土壤,1989(2):106-109.

[23] 刘中良,郑建利,孙哲,等.麦秸、稻壳及菌渣还田对设施菜地的青椒品质及产量的影响[J].中国土壤与肥料,2017(1):98-102.

[24] 李杰,姬景红,李玉影,等.施用改良剂对大庆盐碱土的改良效果研究[J].中国土壤与肥料,2016(2):50-54.

[25] 何尤.旱地保护性耕作及叶片采收对苕蓝产量品质的影响[D].兰州:甘肃农业大学,2009.

[26] 邹尊涛.生物有机肥对盐碱地改良的研究[D].泰安:山东农业大学,2017.

[27] 于秀丽,赵明家.增施生物有机肥对盐碱土壤养分的影响[J].吉林农业大学学报,2013,35(1):50-54,57.

[28] 杨华云,郭世平.薄荷施用钾肥试验初探[J].江苏农业科学,1993(3):54-55.

[29] 李吉进,宋东涛,邹国元,等.不同有机肥料对番茄生长及品质的影响[J].中国农学通报,2008,24(10):300-305.