

## 高效液相色谱-串联质谱法测定烟草中有机磷农药的残留量

刘莹雯<sup>1</sup>, 丁时超<sup>2</sup>, 杜文<sup>2</sup>, 银董红<sup>1,2</sup>, 刘建福<sup>2</sup>

(1. 湖南师范大学化学化工学院, 湖南长沙 410081; 2. 长沙卷烟厂技术中心, 湖南长沙 410014)

**摘要** :建立了一种基于液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)定量分析微量有机磷农药残留的方法,并应用于烟草中农药残留物的定量检测。采用乙腈超声提取烟草中的有机磷农药残留,以甲醇-水(含0.1%乙酸铵)(体积比为95:5)为流动相,经高效液相色谱分离,以串联质谱在多反应监测(MRM)模式下测定,在2.5 min内完成了甲胺磷、乙酰甲胺磷、乐果、敌百虫、毒死蜱5种常用有机磷农药的定量分析。5种农药在1~200 μg/L内的线性关系良好( $r > 0.998$ ),平均回收率为77%~104%,检出限为1.0~5.0 μg/kg。

**关键词** :液相色谱-串联质谱;多反应监测;有机磷农药残留;烟草

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)02-0174-03 栏目类别 :研究论文

## Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Tobacco by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LIU Yingwen<sup>1</sup>, DING Shichao<sup>2</sup>, DU Wen<sup>2</sup>, YIN Donghong<sup>1,2</sup>, LIU Jianfu<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Technology Center, Changsha Cigarette Factory, Changsha 410014, China)

**Abstract** : A novel and rapid method based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed for determination of organophosphorus pesticide residues (OPs) in tobacco. The OPs were extracted from tobacco samples by acetonitrile under ultrasonication. The extractive was determined by high performance liquid chromatography using methanol-water (containing 0.1% ammonium acetate) (95:5, v/v) as mobile phase. The OPs were detected using a tandem mass spectrometer with electrospray ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The OPs, such as dimethoate, trichlorfon, chlorpyrifos, methamidophos and acephate could be detected quantitatively within 2.5 min. The linear calibration curves were obtained in the entire range (1~200 μg/L) for all the above pesticides ( $r > 0.998$ ). The average recoveries in tobacco obtained were ranged from 77% to 104%. The limits of detection were between 1.0 μg/kg and 5.0 μg/kg.

**Key words** : liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); multiple reaction monitoring; organophosphorus pesticide residues (OPs); tobacco

目前,国内有机磷农药的残留分析主要基于蔬菜、水果、茶叶等基质<sup>[1-8]</sup>,采用的方法主要有气相色谱和液相色谱。然而,这两种分析方法均有其自身的缺陷。国外 Haib 等<sup>[9]</sup>曾用气相色谱法检测烟草中的有机磷农药残留量,国内关于烟草中有机磷农药残留量检测的文献报道较少<sup>[10]</sup>。本文基于液相色谱-质谱-质谱联用技术(LC-MS/MS),建立了一种快速分析烟草中的甲胺磷、乙酰甲胺磷、乐果、敌百虫、毒死蜱5种常用有机磷农药残留的新方法。

该方法简化了预处理过程,在2.5 min内实现了对这5种农药的定量分析,具有灵敏度高(检出限在1.0~5.0 μg/kg)和选择性强等特点,可满足实际应用的需要。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国安捷伦公司),API 3000 质谱-质谱仪(美国应用生物系统

公司), Analyst 1.3.2 系统采集并处理数据, DHA1000-6E 超声仪(美国, Branson 公司)。

乙酰甲胺磷(纯度 99.5%)和甲胺磷(纯度 96.0%)购自 Chem Service 公司;毒死蜱(纯度 98.5%)、乐果(纯度 99.0%)和敌百虫(纯度 95.0%)购自 Labor Dr. Ehrenstorfer(Germany)公司。氘代-4-甲基亚硝氨基吡啶基丁酮(4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone,  $d_4$ -NNK)(纯度 99.0%)购自 CDN Isotopes 公司。甲醇和乙酸铵均为液相色谱纯,购自 DIMA Tech(USA)公司。实验用水为二次蒸馏水(经 Milli-Q 系统纯化)。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件:Inertsil C18 ODS-3 色谱柱(50 mm × 2.1 mm i. d., 3  $\mu$ m, Japan);流动相:甲醇-水(含质量分数为 0.1% 的乙酸铵)体积比为 95:5;流速为 200  $\mu$ L/min,以  $d_4$ -NNK 为内标物进行定量,进样体积为 3  $\mu$ L。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),雾化气流量为 8 mL/min,气帘气流量为 9 mL/min,辅助加热气流量为 7 mL/min,辅助加热气温度为 425  $^{\circ}$ C,碰撞气流量为 9 mL/min,4 种气体均为氮气,电离电压 5.5 kV,正离子模式采集。

### 1.3 标准样品配制

准确称取一定量的各有机磷农药,用甲醇溶解后配成 0.1 ~ 1 g/L 的标准储备液,放于冰箱内冷藏,分析时再配制成标准工作溶液。

### 1.4 样品制备

准确称取烟草粉末 1 g,放入 50 mL 的具塞锥形瓶中,加入 3 mL 乙腈,超声提取 30 min,于 16 000 r/min 离心 3 min,分离出上层清液。重复提取,合并 2 次的提取液约 5 mL,定容至 5 mL。溶液经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后用于分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相的选择

本方法选择流动相时,未考虑共流出物的峰是否分开。这是因为采用 MS/MS 进行定性及定量分析时,通过选定目标物对应的离子对,便可单独分析其中的一种物质,共流出物对单一组分分析没有干扰。所以,实验只需从分析的选择性及灵敏度的角度考虑,选用甲醇-水(含 0.1% 乙酸铵)体系做流动相。采用乙酸铵作为流动相的添加剂目的是在电喷雾离子源条件下促进有机磷农药的离子化,使农药以  $[M+H]^+$  形式存在。实验中考察了流动相中水含量对分析效果的影响,结果表明,随着水含量的增

加,分析时间变长,峰形变宽,出现严重的拖尾现象,且灵敏度降低,而水含量过低时,峰形变窄、对称性好,但灵敏度降低。因此甲醇-水的最佳体积比为 95:5。

### 2.2 质谱条件的建立

用液相色谱法定量分析固体基质中的农药残留时,由于基质成分复杂,如果样品提取后不经净化处理,共流出物会影响所需分析的离子,从而限制仪器获得的信息,继而降低检测器的灵敏度。为了消除干扰,实验采用串联质谱(MS/MS)的多反应监测(MRM)技术。目标物经过液相色谱柱分离后,选择各组分的保留时间,经过一级质谱对相对分子质量进行筛选,然后经过二级质谱对子离子进行筛选。这样,提高了分析物的信噪比,从而去除共流出物的干扰,最大限度地排除未处理干净的“脏”背景,显著提高实际样品的灵敏度和定量分析的准确性。本实验同时分析了甲胺磷、乙酰甲胺磷、乐果、敌百虫、毒死蜱等 5 种有机磷化合物的标准样品,比较了各分析物的单标和混标的信号强度及峰面积,单标和混标的响应值基本一致,表明这 5 种有机磷农药离子间的抑制作用很弱,在实验过程中可以采用 MRM 共同检测。

采用流动注射分析,以不同的锥孔电压进行正负离子扫描,发现在正离子(ESI<sup>+</sup>)模式下有较高的灵敏度,而且能得到丰度较高的准分子离子峰和子离子峰。选择子离子时,以丰度最大的碎片离子作为各化合物的子离子,发现去簇电压(DP)和碰撞电压(CP)对子离子峰的信号及丰度有显著影响。调节各有机磷化合物及内标物的去簇电压和碰撞电压,以子离子的信号最强时所得的去簇电压和碰撞电压值作为最佳实验条件(见表 1)。5 种有机磷农药的分子离子峰及选定的子离子峰见表 1。

表 1 5 种有机磷农药及内标物的质谱分析条件  
Table 1 MS/MS analysis conditions of organophosphorus pesticides and the internal standard of  $d_4$ -NNK

Compound	Parent ion/( <i>m/z</i> )	Daughter ion/( <i>m/z</i> )	DP/V	CP/V
Dimethoate	230	199	64	14
Trichlorfon	257	109	42	24
Chlorpyrifos	350	198	87	30
Methamidophos	142	94	52	19
Acephate	184	143	53	20
$d_4$ -NNK	212	126	47	20

DP: declustering potential; CE: collision potential.

### 2.3 标准曲线和检出限

用甲醇做溶剂配制浓度均为 1 mg/L 的有机磷农药混合标准溶液,然后加入到不含这几种农药的烟草提取液中,配成 1 ~ 200  $\mu$ g/L 8 种不同浓度的

溶液。使用样品基质配制标准溶液,目的是消除基质中其他组分对目标物分析结果的干扰。在“1.2”节所示的分析条件下,测定各化合物的峰面积,绘制标准曲线。结果表明,5种有机磷农药残留在1~200  $\mu\text{g/L}$  这一范围内线性关系良好(相关系数  $r > 0.998$ ),可以满足定量分析的需要,回归方程和相关系数见表2。以信噪比为3确定方法的检出限,烟草中的5种有机磷农药的检出限及最低定量限见表2。可以看出,本方法的检出限低于国际通行最高限量规定或推荐最高限量(0.5~1.0  $\text{mg/kg}$ ),可以满足实际工作的需要。5种化合物的混合标准品及加标样品的总离子流色谱图分别见图1和图2。

表2 5种有机磷农药的标准曲线、检出限及最低定量限

Table 2 Regression equations, detection limits and quantification limits of five organophosphorus pesticides

Pesticide	Regression equation <sup>1)</sup>	$r$	LOD <sup>2)</sup> / ( $\mu\text{g/kg}$ )	LOQ <sup>3)</sup> / ( $\mu\text{g/kg}$ )
Dimethoate	$Y=0.0883X+0.129$	0.9998	2.0	5.0
Trichlorfon	$Y=0.0124X+0.576$	0.9989	3.0	10.0
Chlorpyrifos	$Y=0.00603X+0.0178$	0.9998	5.0	8.0
Methamidophos	$Y=0.0751X+0.174$	0.9999	1.0	4.0
Acephate	$Y=1.33X+0.292$	0.9996	1.0	3.0

1)  $Y$ : peak area ratio of analyte to internal standard;  $X$ : concentration ratio of analyte to internal standard; linear range: 1~200  $\mu\text{g/L}$ ; 2) limit of detection ( $S/N=3$ ); 3) limit of quantification ( $S/N=10$ ).

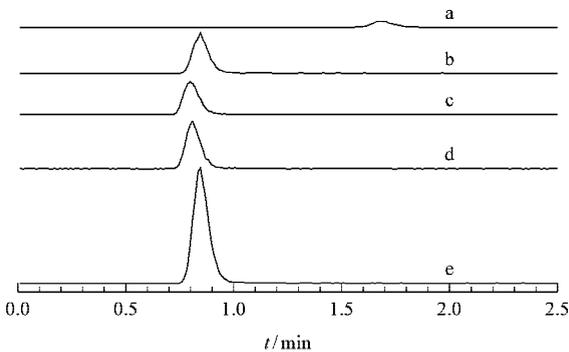


图1 5种有机磷农药标准品(2  $\mu\text{g/L}$ )的总离子流色谱图

Fig.1 The total ion current (TIC) chromatograms of five organophosphorus standards (2  $\mu\text{g/L}$ )

a. chlorpyrifos; b. trichlorfon; c. methamidophos; d. acephate; e. dimethoate.

## 2.4 方法的准确度和精密度

方法的准确度是通过测定化合物在不同浓度下的回收率来评价的。在烟草样品中添加一定量的乐果、敌百虫、毒死蜱、甲胺磷、乙酰甲胺磷标准溶液,然后提取、测定,计算回收率。实验选用10和50  $\mu\text{g/kg}$  2种不同浓度的加标回收实验来考察方法的准确度,计算6次结果的平均值为77%~104%。

方法的精密度以农药含量的相对标准偏差(RSD)来评价。对同一样品(10  $\mu\text{g/kg}$ )平行测定6

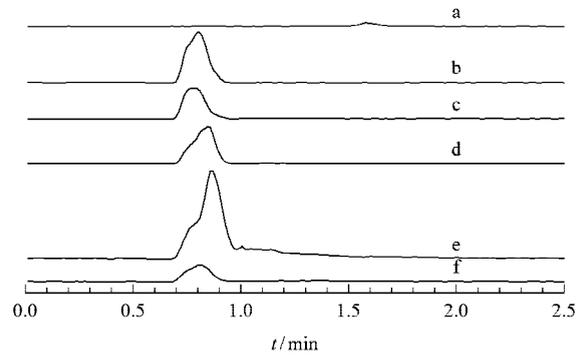


图2 样品中添加5种有机磷农药标准品(20  $\mu\text{g/kg}$ )的总离子流色谱图

Fig.2 TIC chromatograms of tobacco sample fortified with 5 organophosphorus pesticides (20  $\mu\text{g/kg}$ )

a, b, c, d and e are the same as in Fig. 1. f.  $d_4$ -NNK.

次,计算5种化合物含量的RSD,其平均值为3.0%~10.4%。

## 2.5 实际样品的测定

测定了4种不同产地的烟叶样品中5种有机磷农药的含量,结果表明:乐果、甲胺磷以及乙酰甲胺磷未检出,仅一种烟叶样品中含有毒死蜱,含量为1.84  $\mu\text{g/kg}$ ;在4种烟草样品中均含有敌百虫,平均含量为8.26  $\mu\text{g/kg}$ 。

## 参考文献:

- [1] Zhou Yu, Liu Shengli, Zhuang Wuji. Chinese Journal of Chromatography (周昱,刘胜利,庄无忌. 色谱), 1995, 13(3): 208
- [2] Gu Mingsong, Luo Yi. Chinese Journal of Chromatography (顾明松,罗毅. 色谱), 1995, 13(6): 470
- [3] Zhang Ying, Huang Zhiqiang, Li Yongjun. Chinese Journal of Chromatography (张莹,黄志强,李拥军. 色谱), 2001, 19(3): 273
- [4] Yang Yun, Zhang Zhuomin, Li Gongke. Chinese Journal of Chromatography (杨云,张卓晏,李攻科. 色谱), 2002, 20(5): 390
- [5] Pan Changping, Wang Limin, Kong Xiangyu, Jiang Shuren, Qian Chuanfan. Chinese Journal of Chromatography (潘灿平,王丽敏,孔祥雨,江树人,钱传范. 色谱), 2002, 20(6): 565
- [6] Liu Xiaoying, Wu Fei, Wu Hang. Chinese Journal of Biology (刘晓颖,吴飞,吴杭. 生物学杂志), 2004, 21(6): 41
- [7] Zhang Shuiba, Yi Jun, Ye Jianglei, Zheng Wenhui, Cai Xueqin, Gong Zhenbin. Chinese Journal of Chromatography (张水坝,易军,叶江雷,郑文慧,蔡学勤,弓振斌. 色谱), 2004, 22(2): 154
- [8] Zhong Honglan, Xie Li, Huang Huaying. The Journal of Practical Medicine (钟洪兰,谢立,黄华英. 实用医学杂志), 2005, 21(3): 315
- [9] Haib J, Hofer I, Renaud J M. J Chromatogr A, 2003, 1020: 173
- [10] Lü Jing, Li Weige, Zhang Qiao, Zhao Lanzhi, Liang Tianxi, Lou Xiaohua. Chinese Tobacco (吕静,李伟格,张乔,赵兰芝,梁天锡,楼小华. 中国烟草), 1995, (2): 48