实验技术
Experimental technique

基于 QuEChERS EMR-Lipid 技术结合气相色谱 - 串联质谱测定陈皮中 153 种农药残留

陆颖[1a]，徐骞[2a]，付强强[3a]，刘桐[2b]，蔡恩茂[1b]，王文静[2b, 3b]

1. 上海市长宁区疾病预防控制中心 a. 理化检验科 b. 主任办公室，上海 200051
2. 上海市疾病预防控制中心 a. 化学品毒性检定所 b. 慢性非传染性疾病与伤害防治所，上海 200336
3. 同济大学附属杨浦医院 a. 全科医学科 b. 临床与转化医学中心，上海 200090

摘要：

[背景] 陈皮作为常用中药材，存在不容忽视的农药残留问题。目前陈皮中多农药残留的检测方法很少。

[目的] 基于新型除脂净化技术 QuEChERS EMR-Lipid 建立陈皮中 153 种农药残留的气相色谱 - 串联质谱（GC-MS/MS）快速检测和准确定量方法。

[方法] 样品先用酸化乙腈提取，经过 QuEChERS EMR-Lipid 前处理技术净化浓缩，以 VF-1701MS 石英毛细柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）为分离柱，电子轰击电离源，采用气相色谱 - 串联质谱法测定，以基质匹配校准曲线内标法进行定量。

[结果] 153 种农药在 0.05~5 mg·kg^{-1} 范围内均有良好的线性关系（r > 0.997），在 0.05、0.20、0.80 mg·kg^{-1} 加标浓度下的平均回收率为 71.3%~126.9%，相对标准偏差为 1.1%~13.0%，方法的检出限为 0.000 1~0.014 8 mg·kg^{-1}，定量限为 0.000 3~0.048 9 mg·kg^{-1}。

[结论] 基于 QuEChERS EMR-Lipid 建立的 GC-MS/MS 方法适用于陈皮中多农药残留的快速测定及准确定量。本方法也可为基质类似中药的农药残留检测方法提供借鉴。

关键词：陈皮；多农药残留；气相色谱 - 串联质谱法；QuEChERS；EMR-Lipid

Determination of 153 pesticide residues in *Pericarpium Citri Reticulatae* by GC-MS/MS with QuEChERS EMR-Lipid approach

LU Ying[1a], XU Qian[2a], FU Qiangqiang[3a], LIU Tong[2b], CAI Enmao[1b], WANG Wenjing[2b, 3b] (1.a.Physical and Chemical Analysis Laboratory b.Director Office, Changning District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200051, China; 2.a.Division of Chemical Toxicity and Safety Assessment b.Division of Chronic Non-communicable Diseases and Injury, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 3.a.Department of General Practice b.Clinical and Translational Medicine Center, Yangpu Hospital, Tongji University, Shanghai 200090, China)

Abstract:

[Background] As a common traditional Chinese medicinal material, *Pericarpium Citri Reticulatae* (PCR) has pesticide residue problems that cannot be ignored. At present, there are few methods for testing hundreds of pesticide residues in PCR.

[Objective] This study aims to establish a method for simultaneous determination of 153 kinds of pesticide residues in PCR by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) combined with a novel lipid removal approach, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) enhanced matrix removal (EMR)-Lipid.

[Methods] The samples were extracted with acidified acetonitrile through QuEChERS EMR-Lipid approach. GC-MS/MS analysis was performed on a VF-1701MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm) capillary column with electron impact source. Internal standard method for the matrix-matched calibration curve was used for quantification.

[Results] The calibration curves for selected 153 pesticides exhibited good linearity (r > 0.997) in the range of 0.05-5 mg·kg^{-1}. The average recovery rates at 0.05, 0.20, and 0.80 mg·kg^{-1} spiked levels were in the range of 71.3%-126.9%, and the relative standard deviations were in the range of 1.1%-13.0%. The limits of detection and the limits of quantification were 0.000 1-0.014 8 mg·kg^{-1} and 0.000 3-0.048 9 mg·kg^{-1}, respectively.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21035

作者简介
陆颖（1982—），女，本科，主管技师；
E-mail：yinzru@163.com

通信作者
王文静，E-mail：wwjcdc@sina.com

伦理审批 不需要
利益冲突 无申报
收稿日期 2021-01-22
录用日期 2021-03-01

文章编号 2095-9982(2021)07-0789-05
中图分类号 R11
文献标志码 A

▸引用
陆颖，徐骞，付强强，等. 基于 QuEChERS EMR-Lipid 技术结合气相色谱 - 串联质谱测定陈皮中 153 种农药残留 [J]. 环境与职业医学，2021，38（7）：789-793.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21035

Funding
This study was funded.

Correspondence to
WANG Wenjing, E-mail: wwjcdc@sina.com

Ethics approval Not required
Competing interests None declared
Received 2021-01-22
Accepted 2021-03-01

▸To cite
LU Ying, XU Qian, FU Qiangqiang, et al. Determination of 153 pesticide residues in *Pericarpium Citri Reticulatae* by GC-MS/MS with QuEChERS EMR-Lipid approach[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(7): 789-793.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21035

[Conclusion] The GC-MS/MS with QuEChERS EMR-Lipid approach is suitable for rapid and accurate detection of multiple pesticide residues in PCR. The method can also provide a reference for the determination of pesticide residues in traditional Chinese medical plants with similar matrix.

Keywords: *Pericarpium Citri Reticulatae*; multiple pesticide residues; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS; EMR-Lipid

陈皮是芸香科植物橘及其栽培变种的干燥成熟果皮，作为中药饮片和复方制剂的原料，药用历史悠久，在国内外需求量很大。但在其原植物橘中，出现滥用农药导致的农残超标问题[1]，影响陈皮的质量安全，危害人群健康。因此，建立高通量、快速灵敏的陈皮基质中农药残留检测方法，在保障陈皮安全使用方面具有重要意义。

农药多残留快速检测方法是开展中药材风险评估的主要筛查技术。目前，农药多残留检测方法主要有气相色谱-串联质谱法（gas chromatography-tandem mass spectrometry，GC-MS/MS）[2]、液相色谱-串联质谱法（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）[3]，其中结合QuEChERS（Quick，Easy，Cheap，Effective，Rugged，Safe）前处理技术的GC-MS/MS检测方法由于操作简单、有机溶剂用量少、分析效率高而应用最广。

陈皮中含大量的挥发油、色素和生物碱等物质，其中挥发油占总质量的2%~4%左右[4]，使得前处理存在净化效率低、基质效应大等困难。有研究报道采用固相萃取小柱-LC-MS/MS和QuEChERS-GC-MS/MS分别测定陈皮中农药残留[5]，此研究无法通过一种检测手段完成对多农残的分析，实验步骤多、耗时长。此外，所涉及农药的数量最多几十种，限制了方法的实用性。增强型脂质吸附材料（enhanced matrix removal，EMR）可以去除基质中脂类干扰且不造成分析物损失[6]，常用于肉类样品前处理方法中，还没有在中药材中使用的报道。本研究首次将新型净化材料EMR用于QuEChERS前处理方法中，针对性除去中药材基质中油脂成分，采用基质匹配标准溶液校准和内标法降低基质干扰，建立GC-MS/MS快速测定陈皮中多种农药残留的检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

7890A-7000气相色谱-三重四级杆质谱联用仪（美国Agilent），5810R高速离心机（德国Eppendorf），AG204电子天平（瑞士Mettler），Buchi Syncore平行浓缩仪（瑞士Buchi）。

内标环氧七氯（纯度≥95%，德国Dr. Ehrenstorfer），153种农药混标套装（4组，每组质量浓度均为50 mg·L^{-1}，北京振翔BePure），乙酸乙酯（色谱纯，德国Merck），乙腈（色谱纯，德国Merck），EMR净化管（美国Agilent），十八烷基键合硅胶吸附剂（C18，中国安谱CNW），N-丙基乙二胺（primary secondary amine，PSA，美国Supelco），石墨化碳黑（graphitized carbon black，GCB，美国Supelco）。

1.2 方法

1.2.1 净化条件优化 在空白陈皮基质中添加0.1 mg·kg^{-1}混合标准溶液，考察1 mL上述溶液中加入不同质量的PSA（25、50、75、100 mg）和GCB（5、10、20、50、100 mg）的农药回收率，以验证其净化效果。在GC-MS/MS仪器SCAN模式下，分别比较经EMR除脂、C18除脂以及不除脂处理后的空白基质溶液。在空白陈皮基质中添加0.1 mg·kg^{-1}混合标准溶液，除不添加PSA和GCB外均按照“1.2.2”处理，考察EMR对待测农药的回收率的影响。

1.2.2 前处理方法的建立 将陈皮样品粉碎后过50目筛，称取2 g于50 mL离心管中，加入10 mL超纯水浸泡30 min，再加入15 mL 1%乙酸-乙腈、6 g无水硫酸镁、1.5 g醋酸钠及1颗陶瓷均质子，4 500 r·min^{-1}离心3 min（离心半径为12.3 cm）。每毫升上述提取液中加入150 mg无水硫酸镁、50 mg PSA及10 mg GCB于15 mL离心管中涡旋振荡，4 500 r·min^{-1}离心3 min（离心半径为12 cm）。移取5 mL乙腈层至经过5 mL水活化的EMR萃取管中漩涡混合，4 500 r·min^{-1}离心3 min（离心半径为12 cm）。取2 mL上清液氮吹至近干，分别加入20 μL内标溶液和980 μL乙酸乙酯稀释待测。

1.2.3 色谱条件 色谱柱：VF-1701MS（30 m×0.25 mm×0.25 μm）。升温程序：初始温度40 °C，保持1 min；40 °C ·min^{-1}升至120 °C，保持0 min；5 °C ·min^{-1}升至300°C，保持3 min。进样口温度：280°C；载气：氦气（纯度≥99.999%）；柱流量：1.0 mL·min^{-1}，不分流进样，

进样体积1.0 μL。

1.2.4 质谱条件 取153种农药的混合标准溶液经GC-MS/MS SCAN Q3模式运行，辅以美国国家标准与技术研究院（National Institute of Standards and Technology，NIST）数据库确定目标化合物及其保留时间，选择质量数相对更大、丰度更高的特异性离子为母离子，进行子离子扫描，选择最佳定性、定量离子对和最优碰撞能量。

电离方式：电子轰击电离源；离子源温度：300℃；传输线温度：280℃；离子化能量70 eV；溶剂延迟：3 min；碰撞气为氮气，载气为氦气；数据采集方式：动态多反应监测（dynamic multiple reaction monitoring，dMRM）模式。

1.2.5 基质匹配标准溶液制备及性能指标检测 将4组农药标准品用乙酸乙酯稀释成质量浓度为1.0 mg·L^{-1}的153种农药混合标准溶液。将环氧七氯内标用乙酸乙酯溶解并稀释成质量浓度为5.0 mg·L^{-1}的内标储备液。选取不含目标农药残留的陈皮样品（空白陈皮），按照“1.2.2”步骤处理得空白基质溶液。吸取适量的上述混合标准溶液和内标储备液，配制质量浓度系列为5.0、10.0、50.0、100.0、500 μg·L^{-1}的基质匹配混合标准工作溶液。

取2 g空白陈皮基质添加农药混合标准溶液后按“1.2.2”方法前处理，以各定量离子信噪比的3倍计算检出限（limits of detection，LOD），信噪比的10倍计算定量限（limits of quantification，LOQ）。分别在0.05、0.20、0.80 mg·kg^{-1}三组添加水平下进行6次平行检测，计算平均回收率和精密度。通过待测物在基质与纯溶剂标准点比值来考察基质效应对实验结果的影响。

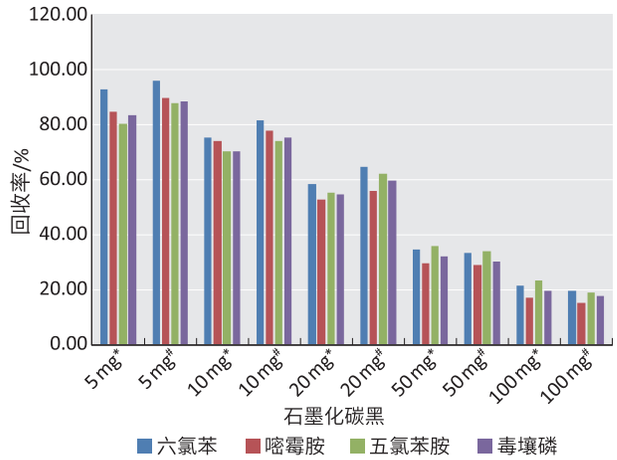
1.3 方法应用

为验证方法的实用性，利用所建立的方法对市售12批次陈皮样品进行农药残留分析。

2 结果

2.1 前处理方法的优化

2.1.1 PSA和GCB用量对农药回收率的影响 添加25 mg PSA时，153种农药回收率为71.6%~138.5%；添加量为50~100 mg时，回收率在73.4%~128.7%之间。添加5 mg GCB时，净化液颜色较深，色素去除率低；添加量为10 mg GCB时，农药的回收率为70.1%~81.6%；当添加量增加到20 mg GCB时，农药的回收率为54.6%~64.8%。图1为不同用量GCB下的六氯苯、嘧霉胺、五氯苯胺、毒壤磷经两次平行测定的回收率结果。因此确定每毫升样品中PSA和GCB的添加量为50 mg和10 mg。

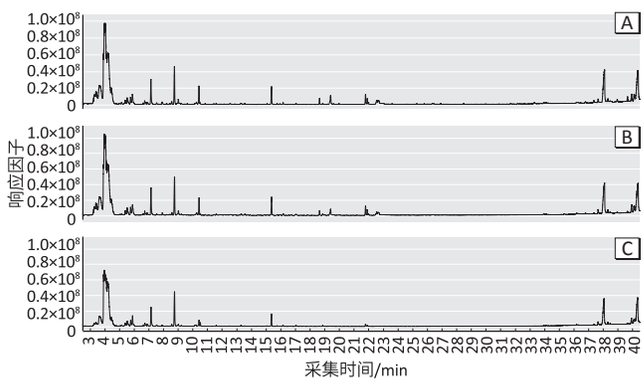


[注] *和#分别表示两次平行测定结果。

图1 不同量的石墨化碳黑对平面结构农药吸附后的回收率

Figure 1 Recovery rates of planar pesticides adsorbed by different amounts of graphitized carbon black

2.1.2 EMR对净化效果的影响 与未经净化直接进样的空白基质溶液（图2A）和经过C18除脂后的空白基质溶液（图2B）相比，经过EMR除脂后的空白基质溶液（图2C）在10~23 min之间基质信号有明显降低，而且杂质峰更少。



[注] A：未经净化直接进样；B：经过C18除脂；C：经过EMR除脂。

图2 采用不同除脂方法得到的空白基质全扫描色谱图

Figure 2 Full scan chromatogram of blank matrix by different degreasing methods

2.1.3 EMR对待测农药的回收率的影响 153种农药的回收率为70.7%~129.3%。

2.2 色谱条件的优化

两种色谱柱均有较高响应者，其中VF-1701MS色谱柱对六六六、滴滴涕、菊酯类同分异构化合物分离效果好，而这些物质在HP-5MS色谱柱上分离度不理想。因此选择VF-1701MS色谱柱作为本实验的色谱分

离柱，优化后的色谱条件同“1.2.3”。

2.3 dMRM 方法的建立

根据获得的参数信息建立 dMRM 检测方法，优化后的 GC-MS/MS 质谱条件见补充材料 http://www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21035。陈皮中 153 种农药在 GC-MS/MS 上的总离子流图见图 3。

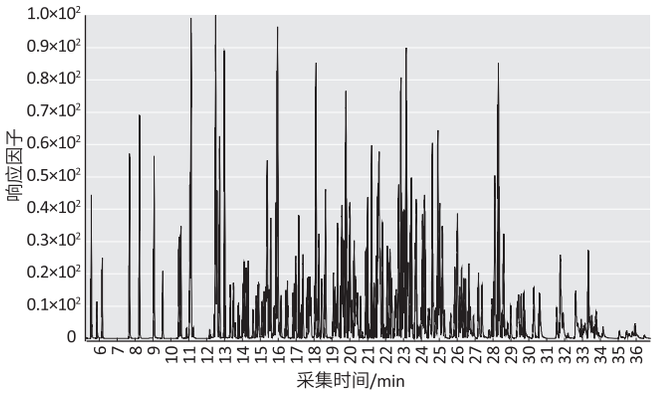


图 3 153 种农药在 GC-MS/MS 上的总离子流图

Figure 3 Total ion currents of 153 pesticides on GC-MS/MS

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围和相关系数 采用内标法定量，结果显示，153 种农药在 0.005~0.50 mg·L^{-1} 范围内呈良好的线性关系（r>0.997）。

2.4.2 检出限和定量限 当取样量为 2.0 g 时，153 种农药的 LOD 为 0.000 1~0.014 8 mg·kg^{-1}，LOQ 为 0.000 3~0.048 9 mg·kg^{-1}。

2.4.3 准确度和精密度 153 种农药平均回收率在 71.3%~126.9% 之间，相对标准偏差范围为 1.1%~13.0%（n=6）（见补充材料 http://www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21035）。本实验方法具有较好的准确度和精密度，满足陈皮中多农残分析的要求。

2.4.4 基质效应（matrix effect，ME） 在 0.1 mg·kg^{-1} 添加水平下，153 种农药中有 122 种农药其 ME>50%，具有强烈的基质增强效应；12 种农药的 ME 在 20%~50% 之间，具有较弱的基质增强效应；17 种农药的 ME 在 -20%~20% 之间，属于无基质效应；乙烯菌核利的 ME 在 -50%~-20%，有较弱的基质抑制效应；氯苯胺灵的 ME<-50%，有强烈的基质抑制效应。

2.5 实际样品检测

总批次检出率为 50%，6 批次阳性样品中共检出 12 种农药残留，大部分为杀菌剂；其中抑霉唑的检出率和残留量最高。见表 1。

表 1 陈皮中农药的检出结果

Table 1 Detection of pesticide residues in *Pericarpium Citri Reticulatae*

序号	化合物名称	浓度 / (mg·kg^{-1})	种类	限值 [a]/ (mg·kg^{-1})
1	丙环唑	0.127	杀菌剂	0.3
2	联苯菊酯	0.013	杀虫剂	0.05
3	三唑醇	0.079	杀菌剂	0.2
4	丙溴磷	0.258	杀虫剂	0.2
5	氯氟氰菊酯	0.277	杀虫剂	0.2
6	氯氰菊酯	0.07	杀虫剂	0.3
7	多效唑	0.037	杀菌剂	—
8	抑霉唑	0.127~0.768	杀菌剂	5
9	戊唑醇	0.465	杀菌剂	2
10	哒螨灵	0.024	杀螨剂	2
11	腈苯唑	0.019~0.021	杀菌剂	0.5
12	苯醚甲环唑	0.094~0.437	杀菌剂	0.2

[注] a：限值参考 GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》。

3 讨论

由于中药陈皮基质成分复杂，在进行多农药残留检测时，经净化氮吹浓缩后，待测液有明显橘黄色黏稠液滴仍无法吹干，影响结果测定的准确性。为解决这一问题，本研究首次将 EMR 加入 QuEChERS 前处理方法中并加以优化。通过观察 EMR 净化后样品的外观颜色，发现提取液油脂和色素含量少于 C18 净化和未经净化的，且色谱杂质峰数量比后两者有所减少。PSA、GCB 都是经典的 QuEChERS 吸附剂。PSA 主要作用是去除基质中极性的有机酸。从结果看出，PSA 的添加降低了回收率大于 130% 的农药数量，说明其对基质增强效应有降低作用；但随着 PSA 添加量的增加，回收率没有明显变化。GCB 对色素吸附能力很强，但亦容易吸附具有平面结构的化合物，本实验中六氯苯、嘧霉胺、五氯苯胺、毒壤磷这 4 种平面性较强的农药随着 GCB 用量增大回收率降低。基于净化效果和农药的回收率两方面考虑，采用 QuEChERS EMR-Lipid 净化技术是陈皮样品农药残留检测前处理步骤中较优的净化方式。

153 种农药中绝大多数在 GC-MS/MS 上呈现出基质增强效应，这类农药具有极性强、热稳定差等特点，如抑霉唑、溴氰菊酯、甲胺磷等。因此采用基质匹配标准溶液进行校正，经校正后可有效消除基质效应带来的影响。此外，定量检测采用在基质匹配标准溶液和样品溶液中同时加入内标物环氧七氯，通过内标法校正待测目标农药，进一步提高检测结果的准确度。

在陈皮样品中检测出较高浓度的杀菌剂，其原因是在柑橘贮藏前会对其进行防腐保鲜，即将采摘后的

柑橘浸入防腐保鲜药液中，常用的防腐保鲜药为抑霉唑、苯醚甲环唑、异菌脲等，与此次测定的结果相符。参考GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中柑橘的限量要求，本次市售陈皮中检出的丙溴磷、氯氟氰菊酯、苯醚甲环唑的残留量高于限值，推测其原因是陈皮干制后水分流失导致其浓度变高。

本研究通过优化净化方法和色谱质谱参数，建立dMRM模式下GC-MS/MS检测陈皮中153种常用农药残留检测的方法，具有复杂基质一次性提取、快速净化、准确定量、高效测定等优点，可为农药残留检测方法的完善提供参考依据，同时也可为基质类似中药的农药残留方法提供借鉴。

参考文献

[1] 熊颖，李纯，任晋，等. QuEChERs-气相色谱-串联质谱法测定陈皮31种禁用农药残留[J]. 中药新药与临床药理，2020，31(5)：590-595.
XIONG Y，LI C，REN J，et al. Determination of 31 forbidden pesticide residues in citri reticulatae pericarpium by QuEChERs-GC-MS/MS[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol，2020，31(5)：590-595.

[2] SHABEER T P A，GIRAME R，UTTURE S，et al. Optimization of multi-residue method for targeted screening and quantitation of 243 pesticide residues in cardamom（*Elettaria cardamomum*）by gas chromatography tandem mass spectrometry（GC-MS/MS）analysis[J]. Chemosphere，2018，193：447-453.

[3] ISSA M M，TAHA S M，EL-MARSAFY A M，et al. Acetonitrile-Ethyl acetate based method for the residue analysis of 373 pesticides in beeswax using LC-MS/MS and GC-MS/MS[J]. J Chromatogr B，2020，1145：122106.

[4] 李尚科，李跑，杜国荣，等. 陈皮组成成分及检测方法研究进展[J]. 中国果菜，2019，39(10)：36-39，52.
LI S K，LI P，DU G R，et al. Progress in composition and determination methods of pericarpium citri reticulatae[J]. China Fruit Veg，2019，39(10)：36-39，52.

[5] 李纯，熊颖，顾利红，等. 广陈皮中71种禁限用农药残留测定分析[J]. 药物分析杂志，2020，40(5)：843-853.
LI C，XIONG Y，GU L H，et al. Analysis and determination of 71 forbidden and restricted pesticide residues in Citri reticulatae 'Chachi'[J]. Chin J Pharm Anal，2020，40(5)：843-853.

[6] ARCE-LÓPEZ B，LIZARRAGA E，FLORES-FLORES M，et al. Development and validation of a methodology based on Captiva EMR-lipid clean-up and LC-MS/MS analysis for the simultaneous determination of mycotoxins in human plasma[J]. Talanta，2020，206：120193.

（英文编辑：汪源；责任编辑：汪源）

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》出版伦理声明

《环境与职业医学》遵循出版道德委员会（Committee on Publication Ethics，COPE）的指导方针调查和处理不当行为的指控或怀疑。

对于作者：①所投稿件必须是作者的原创作品，之前不得以印刷或在线形式发表，或同时投给其他出版物，如文中使用先前发表的资料（如图、表格）需要提供相关的归属权和许可证明；②作者应保证所投稿件不存在任何学术不端行为，学术不端行为定义见CY/T 174—2019《学术出版规范 —— 期刊学术不端行为界定》；③所有作者在投稿时需签署“利益冲突声明”，声明是否存在实际或潜在的利益冲突。

对于编辑与审稿人：编辑和审稿人必须公开任何实际或潜在的竞争性利益，包括所有被合理视为与审稿有关的经济利益或非经济利益；有关竞争性利益和其他道德问题的更详细信息，请参阅COPE指导方针。