

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定人全血中5种氨基甲酸酯类农药

万超超¹, 任昕昕^{2*}, 程芳彬¹, 吕昱帆¹, 郑佳佳³, 何洪源¹

(1. 中国公安大学, 北京 100038; 2. 公安部物证鉴定中心, 北京 100038;
3. 泰安市公安局 刑事科学技术研究所, 泰安 271000)

摘要:采用QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定人全血中的灭多威、速灭威、残杀威、甲萘威、异丙威等5种氨基甲酸酯类农药。在1.00 mL全血样品中添加10 ng氘代灭多威作为内标物,加入2.00 mL乙腈和30 mg NaCl进行萃取,取上清液经复合吸附剂(150 mg无水MgSO₄-25 mg N-丙基乙二胺-25 mg C₁₈)净化后,采用ZORBAX Eclipse Plus C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)分离,以5 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液[含0.1%(体积分数)甲酸]和甲醇为流动相进行梯度洗脱,在电喷雾离子源正离子模式下电离,多反应监测模式下检测,以内标法定量。5种氨基甲酸酯类农药的质量浓度在一定范围内呈线性,检出限(3S/N)为0.10~0.50 μg·L⁻¹,测定下限(10S/N)为0.50~0.75 μg·L⁻¹。对空白全血样品进行加标回收试验,5种氨基甲酸酯类农药的回收率为87.5%~103%,测定值的相对标准偏差(*n*=6)为2.8%~7.9%。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; QuEChERS; 氨基甲酸酯类农药; 全血

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2018)12-1383-06

氨基甲酸酯类农药在我国作为杀虫剂、杀菌剂及除草剂被广泛使用。然而,该类农药用于农业生产的同时,也会对人类和环境产生危害。由于该类农药具有抑制胆碱酯酶的作用,人体摄入后会导致乙酰胆碱在体内过度蓄积,从而引发瞳孔缩小、流涎、呕吐等症状,甚至会造成呼吸抑制而死亡^[1]。近年来,因误服氨基甲酸酯类农药或使用此类农药投毒或自杀的中毒案事件时有发生,文献[2]报道了60例急性重度氨基甲酸酯类农药中毒病例。因此,快速检测人体血液中氨基甲酸酯类农药具有重要意义,不仅有利于在突发性事件中快速查明中毒原因,也能为相关案件的侦破提供线索和证据。

目前,测定血液中氨基甲酸酯类农药的方法主要有气相色谱法^[3]、气相色谱-质谱法^[4]、液相色谱-串联质谱法^[5]等。常用的前处理方法主要有沉淀蛋白法^[6]、液液萃取法^[7]以及固相萃取法^[8],其中沉淀

蛋白和液液萃取法缺乏净化过程,残余基质过多,影响后续的检测分析;固相萃取法操作流程相对复杂,费时费力。文献[9]报道了QuEChERS样品前处理方法,该方法基于液液萃取法和分散固相萃取法而建立,同时兼具提取和净化过程,其具有快速、简单、廉价、高效、可靠、安全等优点,能有效去除样品中复杂基质的干扰。经过近年来的不断发展和完善^[10-11],QuEChERS法已广泛应用于食品和环境中农药残留^[12-13]、兽药残留^[14-15]以及真菌毒素^[16-17]等的检测,但在生物样品分析中的应用尚处于起步阶段。在生物样品中氨基甲酸酯类农药检测方面,文献[18]报道了应用QuEChERS方法提取豚鼠血液及脑组织中灭多威和涕灭威,该方法采用美国Restek公司用于食品中多残留农药分析的商品化Q-sep QuEChERS萃取包及净化管(AOAC 2007.01),对QuEChERS方法在生物样品中的应用进行了有益探索。但由于生物样品分析在检材取样量、基质种类等方面与食品等有很大不同,QuEChERS方法在应用于生物样品分析时,萃取剂、盐析剂、吸附剂的使用仍需进行针对性的优化改进。

收稿日期: 2018-07-08

基金项目: 公安部技术研究计划(2018JSYJC10); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2018JB013)

作者简介: 万超超,硕士研究生,主要研究方向为毒物分析

* 通信联系人。renxinxin2008@126.com

本工作对人全血中灭多威、速灭威、残杀威、甲萘威以及异丙威等5种氨基甲酸酯类农药的QuEChERS样品前处理方法进行了系统优化,并结合超高效液相色谱-串联质谱法,建立了一种简便、快速、准确测定全血中5种氨基甲酸酯类农药的方法。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

LC-30AD型液相色谱仪;Qtrap[®] 5500型三重四极杆串联质谱仪;Milli-Q Direct纯水系统;Biofuge Primor型高速离心机。

单标准储备溶液:分别称取适量(精确至0.1 mg)5种氨基甲酸酯类农药标准品,用甲醇溶解配制成质量浓度为1.000 g·L⁻¹的单标准储备溶液,于-20℃保存。

混合标准储备溶液:分别移取1.00 mL单标准储备溶液,置于50 mL容量瓶中,用甲醇定容配制成各氨基甲酸酯类农药的质量浓度均为20.0 mg·L⁻¹的混合标准储备溶液,于-20℃保存,使用时用甲醇逐级稀释配制成所需质量浓度的混合标准溶液。

灭多威(纯度99.9%)、速灭威(纯度99.0%)、残杀威(纯度99.0%)、甲萘威(纯度98.0%)、异丙威(纯度98.5%)等5种氨基甲酸酯类农药标准品。内标氘代灭多威纯度为94.2%。N-丙基乙二胺(PSA)、C₁₈吸附剂、乙腈为色谱纯;NaCl纯度为99.0%;无水MgSO₄为分析纯。

1.2 仪器工作条件

1) 色谱条件 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm);柱温40℃;流动相A为含0.1%(体积分数,下同)甲酸的5 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液,B为甲醇;流量0.4 mL·min⁻¹。梯度洗脱程序:0~0.2 min时,B为10%;0.2~4.0 min时,B为10%~90%;4.0~5.0 min时,B为90%;5.0~5.1 min时,B为90%~10%;5.1~5.5 min时,B为10%。进样体积1 μL。

2) 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),离子源温度500℃;正离子模式扫描;多反应监测(MRM)模式;离子化电压5500 V;气帘气压172 kPa;喷雾气压345 kPa;辅助加热气压345 kPa。5种氨基甲酸酯类农药以及内标氘代灭多威的其他质谱采集参数见表1,其中“*”为定量离子。

表1 5种氨基甲酸酯类农药及氘代灭多威的质谱参数

Tab. 1 MS parameters of five carbamate pesticides

and methomyl-D3

氨基甲酸 酯类农药	保留时间 t/ min	质荷比 m/z		去簇电压/ 碰撞电压/ eV	
		母离子	子离子	V	eV
灭多威	2.37	162.9	88.0*	40	12
			106.1		13
速灭威	3.53	166.0	109.1*	40	15
			94.1		40
残杀威	3.66	210.0	168.0*	40	10
			153.1		10
甲萘威	3.80	202.1	145.1*	40	14
			127.1		37
异丙威	3.99	194.1	137.0*	45	11
			152.1		10
氘代灭多威	2.35	165.9	88.0*	40	12
			105.9		14

1.3 试验方法

移取1.00 mL全血样品,置于15 mL离心管中,加入10 ng氘代灭多威,振荡均匀,再加入2.00 mL乙腈和30 mg NaCl,振荡5 min后,以8 000 r·min⁻¹转速离心5 min,将上清液转移至另一15 mL离心管中,加入150 mg无水MgSO₄、25 mg PSA和25 mg C₁₈,涡旋15 s后,以8 000 r·min⁻¹转速离心5 min,取上清液经0.22 μm有机系滤膜过滤,滤液转移至进样瓶中,在仪器工作条件下进行测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

为使结构类似的5种氨基甲酸酯类药物能够有效分离,试验选用ZORBAX Eclipse Plus C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),同时考察了6种流动相:水-甲醇;0.1%甲酸溶液-甲醇;5 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液(含0.1%甲酸)-甲醇;水-乙腈;0.1%甲酸溶液-乙腈;5 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液(含0.1%甲酸)-乙腈。试验结果表明:以乙腈作为有机相时,尽管5种氨基甲酸酯类农药可以实现良好的分离,但是响应值远低于以甲醇作为流动相时的响应值;而使用5 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液(含0.1%甲酸)(A相)和甲醇(B相)作为流动相时,氨基甲酸酯类农药具有较好的响应值与峰形(见图1)。

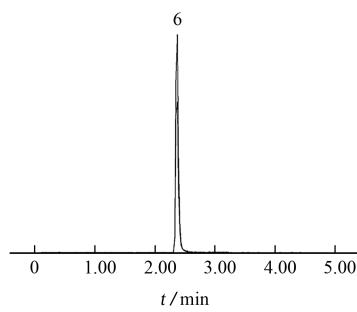
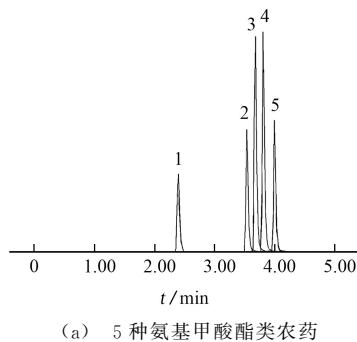


图 1 5种氨基甲酸酯类农药和氯代灭多威混合标准溶液($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed standard solution ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) of the five carbamate pesticides and methomyl-D3

2.2 质谱条件的优化

选择 ESI⁺ 电离模式, 使用针泵连续进样 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5 种氨基甲酸酯类农药的混合标准溶液以及氯代灭多威标准溶液, 首先进行一级质谱扫描, 获得目标化合物的准分子离子 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 即母离子, 然后进行二级质谱扫描获得目标化合物的子离子。据此获得多反应监测(MRM)离子对信息, 优化碰撞能量和去簇电压等参数。优化后的质谱参数见表 1。

2.3 萃取条件的优化

乙腈和甲醇作为 QuEChERS 样品前处理方法中常用的萃取溶剂, 不仅可以从全血样品中萃取出氨基甲酸酯类农药, 还可以对全血产生沉淀蛋白作用。通过试验比较发现: 甲醇作为萃取溶剂时, 不但萃取出目标物, 而且也萃取出全血中过多的杂质, 且沉淀蛋白效果不佳导致基质效应明显。而乙腈作为萃取溶剂时, 能够保证氨基甲酸酯类农药回收率较高的同时, 产生显著的沉淀蛋白效果, 有效降低基质效应。因此, 试验采用乙腈作为萃取溶剂。

考虑到氨基甲酸酯类农药在碱性条件下易水解, 在酸性或中性条件下稳定的性质, 试验对比了乙腈与含 1% 甲酸的乙腈溶液作为萃取溶剂时的情况。结果表明: 加入含 1% 甲酸的乙腈溶液于全血中, 经振荡离心后, 上层溶液较为浑浊, 沉淀蛋白效果不佳。

试验比较了全血样品与乙腈体积比为 1:1, 1:2, 1:3 等 3 种情况下的沉淀蛋白效果, 结果表明: 当全血样品与乙腈体积比为 1:2 或 1:3 时, 沉淀蛋白效果均较好。出于环保和节约的角度, 试验选择全血样品与乙腈体积比为 1:2。

2.4 盐析条件的优化

在 QuEChERS 样品前处理方法的萃取过程中, 可以通过添加无机盐以促使有机相与水相分层, 还可以提高待测组分的萃取效率。常用的盐析剂包括 NaCl、无水 MgSO₄ 等, 经试验比较, NaCl 对血液与乙腈的分层效果更加显著, 试验采用 NaCl 作为萃取过程中的盐析剂, 并进一步考察了 NaCl 的用量(0, 10, 30, 50, 70 mg)对 5 种氨基甲酸酯类农药回收率的影响, 结果见图 2。

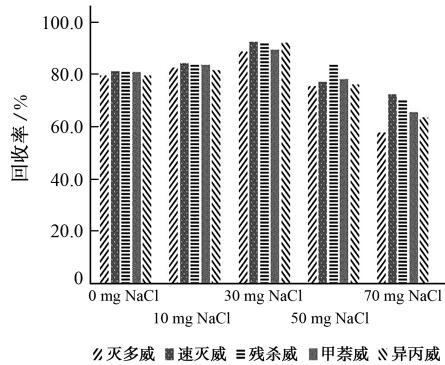


图 2 NaCl 用量对氨基甲酸酯类农药回收率的影响

Fig. 2 Effect of amount of NaCl on the recovery of the carbamate pesticides

由图 2 可知: 在一定范围内, 随着 NaCl 用量的增加, 氨基甲酸酯类农药的回收率有所增大; 但超过该范围, 回收率会随着 NaCl 用量的增加而减小。在以 30 mg NaCl 作为盐析剂时, 5 种目标化合物的回收率最优, 为 88.9%~92.6%。

2.5 净化条件的优化

2.5.1 吸附剂及其用量

QuEChERS 方法常用的吸附剂主要有 C₁₈、PSA 等。C₁₈ 能有效去除脂类、甾醇以及非极性杂质; PSA 能有效去除有机酸、金属离子及极性色素。因此, 可以根据生物样品的不同和药物或毒物的种

类来选择适合的净化剂。试验比较了3种吸附剂组合(150 mg无水MgSO₄、25 mg PSA和25 mg C₁₈;150 mg无水MgSO₄和50 mg PSA;150 mg无水MgSO₄和50 mg C₁₈)对氨基甲酸酯类农药回收率的影响,结果见图3。

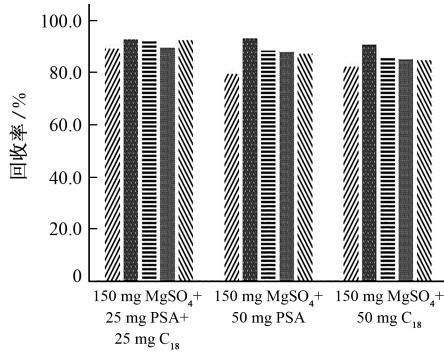


图3 不同吸附剂对氨基甲酸酯类农药回收率的影响

Fig. 3 Effect of different adsorbents on the recovery of the carbamate pesticides

由图3可知:当吸附剂组合为150 mg无水MgSO₄、25 mg PSA和25 mg C₁₈时,5种氨基甲酸酯类农药的回收率总体相对较高,因此试验选用该吸附剂组合。

2.5.2 净化过程中是否添加无水MgSO₄

在净化过程中通过添加适量的无水MgSO₄可以去除上清液中多余的水分,在一定程度上可以影响回收率。因此,试验对净化过程中是否添加无水MgSO₄进行了研究。试验结果表明,在净化过程中

添加无水MgSO₄有助于提高目标化合物的回收率(见图4)。

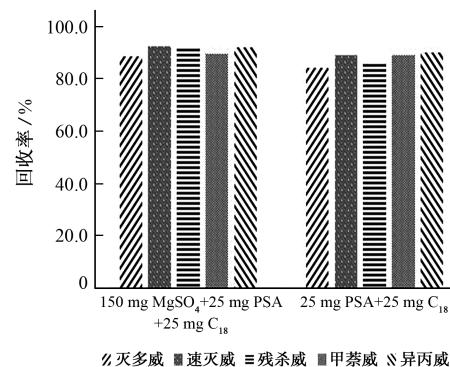


图4 净化过程中添加无水MgSO₄对氨基甲酸酯类农药回收率的影响

Fig. 4 Effect of added anhydrous MgSO₄ in cleanup step on the recovery of the carbamate pesticides

2.6 工作曲线、检出限和测定下限

采用空白全血样品为基质配制5种氨基甲酸酯类农药与内标的质量浓度为1.0, 5.0, 10, 20, 50, 100 μg·L⁻¹的混合标准溶液系列,以目标物与内标的质量浓度之比(*x*)为横坐标、目标物与内标的峰面积之比(*y*)为纵坐标绘制工作曲线,5种目标物的质量浓度在一定范围内呈线性,线性范围、线性回归方程以及相关系数见表2。

以3倍信噪比对应质量浓度作为检出限(3S/N),10倍信噪比对应质量浓度作为测定下限(10S/N),结果见表2。

表2 线性参数、检出限和测定下限

Tab. 2 Linearity parameters, detection limits and lower limits of determination

农药	线性范围 <i>p</i> / (μg·L ⁻¹)	线性回归方程	相关系数	检出限 <i>p</i> / (μg·L ⁻¹)	测定下限 <i>p</i> / (μg·L ⁻¹)
灭多威	0.75~100	$y = 9.52 \times 10^{-1}x + 3.73 \times 10^{-3}$	0.997 3	0.50	0.75
速灭威	0.75~100	$y = 1.79 x + 2.88 \times 10^{-2}$	0.996 3	0.50	0.75
残杀威	0.50~100	$y = 2.68 x + 2.42 \times 10^{-1}$	0.996 5	0.10	0.50
甲萘威	0.50~100	$y = 2.4 x + 4.48 \times 10^{-3}$	0.996 9	0.10	0.50
异丙威	0.50~100	$y = 1.21 x + 2.44 \times 10^{-2}$	0.997 6	0.20	0.50

2.7 基质效应、精密度和回收试验

取空白全血样品,在1.0, 10, 50 μg·L⁻¹的浓度水平下进行加标回收试验,每个浓度水平进行6次平行进样,考察该方法的回收率、基质效应以及精密度。结果表明:5种氨基甲酸酯类农药在3个加标水平下的回收率为88.6%~103%,基质效应为

90.8%~111%,测定值的相对标准偏差(RSD)为2.8%~7.9%(见表3)。

2.8 稳定性试验

取空白全血样品,在1.0, 10, 50 μg·L⁻¹的加标水平下,进行稳定性考察。将样品分别在4 °C和-20 °C下放置1, 5, 10, 15, 20 d。试验结果表明:在

表3 精密度和回收试验结果($n=6$)Tab. 3 Results of tests for precision and recovery($n=6$)

农药	加标量 ρ / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 / %	基质效应 / %	RSD / %
灭多威	1.0	88.6	104	4.4
	10	88.9	98.7	4.9
	50	92.8	93.7	3.9
速灭威	1.0	87.5	95.7	3.6
	10	92.6	99.4	5.2
	50	95.7	90.8	4.9
残杀威	1.0	103	111	5.5
	10	92.3	99.0	7.9
	50	95.3	95.5	4.1
甲萘威	1.0	90.2	94.5	4.3
	10	89.6	98.6	2.8
	50	96.1	94.5	2.9
异丙威	1.0	89.9	97.4	4.7
	10	92.1	100	5.4
	50	99.0	95.7	3.1

4 ℃下放置20 d后,5种农药分解至起始量的29.8%~77.4%;而置于-20 ℃下冷冻20 d内,全血样品中5种氨基甲酸酯类农药的稳定性良好。

2.9 实际样品分析

本工作建立的测定全血中氨基甲酸酯类农药的QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法可成功应用于实际案例中。2017年11月,江西省萍乡市某村居民住宅内发生一起农药中毒死亡案件。经公安机关调查,王某可能死于氨基甲酸酯类农药中毒。应用本工作建立的方法对死者血液进行检验,成功检出异丙威,质量浓度为0.18 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

本工作针对全血中5种氨基甲酸酯类农药,对QuEChERS样品前处理方法的萃取溶剂、盐析试剂以及净化条件等多方面进行了系统优化,并结合超高效液相色谱-串联质谱进行检测分析。方法不仅具有高回收率以及低基质效应等优点,而且操作简便、灵敏度高、准确可靠,适用于疑似氨基甲酸酯类农药中毒案事件中血液样品的分析。

参考文献:

- [1] 孙洪涛.氨基甲酸酯类农药中毒30例临床病例分析及抢救体会[J].中外医疗,2010,29(14):43-43.
- [2] 叶兴辉,林淑苗,肖文,等.活性炭甘露醇治疗急性重度氨基甲酸酯类农药中毒的临床效果[J].健康研究,2016,36(2):205-206.

- [3] 蔡玉刚,苏晓虹,王运波.气相色谱法测定生物检材中的灭多威成份[J].广东公安科技,2009,17(2):21-22.
- [4] 应剑波,谢伟宏,程建波,等.微波萃取-GPC净化-GC/MS法检验血中氨基甲酸酯和沙蚕毒素类农药[J].质谱学报,2009,30(1):47-50.
- [5] 王媛,刘华良,朱宝立.高效液相色谱-串联质谱法测定血浆中的氨基甲酸酯类农药[J].中国卫生检验杂志,2016,26(3):320-322.
- [6] 李鹏,柏泽新,夏侯秋锦,等.UPLC-MS/MS检测人血中18种有机磷及氨基甲酸酯类农药[J].中国法医学杂志,2017,32(1):51-54.
- [7] LIU S, PLEIL J D. Human blood and environmental media screening method for pesticides and polychlorinated biphenyl compounds using liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis [J]. Journal of Chromatography B, 2002,769(1):155-167.
- [8] 李文海,朱鲁生.固相萃取GC/MS分析血中10种常见农药和杀鼠药[J].中国法医学杂志,2009,24(4):269-271.
- [9] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, ŠTAJNBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce[J]. Journal of AOAC International, 2003,86(2):412-431.
- [10] GONZÁLEZ-CURBELO M Á, SOCAS-RODRÍGUEZ B, HERRERA-HERRERA A V, et al. Evolution and applications of the QuEChERS method [J]. TrAC-Trends in Analytical Chemistry, 2015,71:169-185.
- [11] SCHMIDT M L, SNOW N H. Making the case for QuEChERS-gas chromatography of drugs[J]. TrAC-Trends in Analytical Chemistry, 2016,75:49-56.
- [12] 符靖雯,林玉婵,黄梅花,等.QuEChERS萃取结合GC-ECD测定甜玉米中多种有机氯及拟除虫菊酯类农药残留[J].理化检验-化学分册,2017,53(9):1036-1041.
- [13] WANG X C, SHU B, LI S, et al. QuEChERS followed by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish [J]. Talanta, 2017,162:90-97.
- [14] 张晓强,张波,方萍,等.QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鱼肉中22种磺胺类药物残留[J].理化检验-化学分册,2015,51(3):369-374.
- [15] ARIAS J L O, SCHNEIDER A, BATISTA-ANDRADE J A, et al. Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-resi-

- dues of veterinary drugs in different types of milk[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 1243-1253.
- [16] MYRESIOTIS C K, TESTEMPASIS S, VRYZAS Z, et al. Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method [J]. Food Chemistry, 2015, 182: 81-88.
- [17] 陈建彪,董丽娜,刘娇,等.QuEChERS 在食品中真菌毒素检测的研究进展[J].食品科学, 2014, 35(11): 286-291.
- [18] DEARMOND P D, BRITTAINE M K, PLATOFF J G E, et al. QuEChERS-based approach toward the analysis of two insecticides, methomyl and aldicarb, in blood and brain tissue [J]. Analytical Methods, 2015, 7(1): 321-328.

Simultaneous Determination of Five Carbamate Pesticides in Human Whole Blood by QuEChERS-Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WAN Chaochao¹, REN Xinxin^{2*}, CHENG Fangbin¹, LÜ Yufan¹, ZHENG Jiajia³, HE Hongyuan¹

(1. People's Public Security University of China, Beijing 100038, China;

2. Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China;

3. Institute of Criminal Science and Technology, Public Security Bureau of Tai'an, Tai'an 271000, China)

Abstract: QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was applied for the simultaneous determination of five carbamate pesticides (methomyl, metolcarb, propoxur, carbaryl and isoprocarb) in human whole blood. 10 ng of methomyl-D3 as an internal standard was added into 1.00 mL of whole blood sample, and the mixture was extracted with 2.00 mL of acetonitrile and 30 mg of NaCl. The supernatant was cleaned up with a composite adsorbent containing 150 mg of anhydrous MgSO₄, 25 mg of N-(n-propyl) ethylenediamine and 25 mg of C₁₈, then the analytes were separated on a ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) using a mixture of methanol and 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate solution containing 0.1% (φ) formic acid as mobile phases for gradient elution. Electrospray positive ionization source was used. Analysis was practised under multiple reaction monitoring mode. Internal standard method was used for quantification. The linear relationships were found with the mass concentration of the five carbamate pesticides in defined ranges. The detection limits (3S/N) were in the range of 0.10—0.50 μg·L⁻¹ and the lower limits of determination (10S/N) were in the range of 0.50—0.75 μg·L⁻¹. Tests for recovery were made by standar addition method to blank sample, giving results between 87.5% and 103%, and RSDs (*n*=6) were in the range of 2.8%—7.9%.

Keywords: ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS; carbamate pesticide; whole blood