

灵芝中17种农药的QuEChERS-气相色谱-质谱联用快速检测技术

崔丽丽, 闫梅霞, 逢世峰, 周春元, 王英平*

(中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112)

摘要: 建立改进的QuEChERS提取和净化方法, 结合气相色谱-质谱联用法测定灵芝中17种农药残留的检测方法。干燥的灵芝粉加水浸润后, 经乙腈均质提取, 正丙基乙二胺、 MgSO_4 净化去杂, 结合气相色谱-质谱检测系统, 电子电离源, HP-5毛细管柱分离, 程序升温, 离子扫描模式检测。在优化条件下17种杀菌剂在一定质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数大于0.98, 方法检出限($R_{\text{SN}}=3$) 在0.002~0.022 mg/kg之间, 定量限($R_{\text{SN}}=10$) 在0.007~0.072 mg/kg之间, 方法的平均回收率为71.10%~119.55%, 相对标准偏差为0.47%~20.05%。本方法具有操作简单快捷、灵敏度高优点。

关键词: QuEChERS; 气相色谱-质谱联用法; 灵芝; 农药

Simultaneous Determination of Seventeen Pesticide Residues in *Ganoderma tsugae* by Modified QuEChERS Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry

CUI Lili, YAN Meixia, PANG Shifeng, ZHOU Chunyuan, WANG Yingping*

(Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

Abstract: In this study, a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) sample pretreatment method coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was established to determine 17 pesticide residues in *Ganoderma tsugae*. A total of 1.0 g of dry *G. tsugae* powder was mixed with 10 mL of water, and then extracted by homogenization with acetonitrile. The extract was cleaned up with *n*-propyl ethylenediamine (PSA) and MgSO_4 to remove the interferences from co-extractives. The separation was accomplished on an HP-5 capillary column and programmed heating was carried out. The target compounds were detected by electron impact ionization in the single ion monitoring (SIM) mode. Under the optimum conditions, the method showed a good linear relationship for all these pesticides in certain concentration ranges, with correlation coefficients greater than 0.98. Moreover, the limits of detection (LODs) ($R_{\text{SN}}=3$) were 0.002–0.022 mg/kg, the limits of quantitation (LOQs) ($R_{\text{SN}}=10$) were 0.007–0.072 mg/kg. The average recoveries of this method were in the range of 71.10%–119.55% with relative standard deviations (RSDs) between 0.47% and 20.05%. In comparison with previous methods, the new procedure has the characteristics of simple sample preparation and higher sensitivity.

Keywords: QuEChERS; gas chromatography-mass spectrometry; *Ganoderma tsugae*; pesticides

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180411-139

中图分类号: S567.31

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 12-0326-06

引文格式:

崔丽丽, 闫梅霞, 逢世峰, 等. 灵芝中17种农药的QuEChERS-气相色谱-质谱联用快速检测技术[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 326-331. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180411-139. <http://www.spkx.net.cn>

CUI Lili, YAN Meixia, PANG Shifeng, et al. Simultaneous determination of seventeen pesticide residues in *Ganoderma tsugae* by modified QuEChERS combined with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science, 2019, 40(12): 326-331. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180411-139. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-04-11

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2016-ISAPS); 吉林省省级医药健康产业发展专项(20180311021YY)

第一作者简介: 崔丽丽(1984—)(ORCID: 0000-0002-8818-147X), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为药用植物资源与质量评价。E-mail: cbscui@126.com

*通信作者简介: 王英平(1967—)(ORCID: 0000-0003-2040-9607), 男, 研究员, 博士, 研究方向为药用植物资源。E-mail: yingpingw@126.com

灵芝属于担子菌纲、多孔菌科、灵芝属,是一种非常名贵的食药大型真菌,具有重要经济和药用价值,在我国应用已有2 000多年的历史。全世界已报道种类200余种^[1],中国药典中收录入药为赤芝(*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.))或紫芝(*Ganoderma sinense* Zhao (Xu et Zhang))干燥子实体^[2]。在我国东北地区灵芝种类分布减少,松杉灵芝(*Ganoderma tsugae*)是东北地区最常见种类^[1]。随着中医药产业健康发展,灵芝需求量增加。目前,栽培灵芝逐渐成为灵芝的主要来源。灵芝的栽培方式有袋料栽培、段木栽培、仿野生林下栽培等^[3]。灵芝在制种期和栽培期有多种病菌和杂菌导致病害发生,侵染性病害主要为青霉菌污染率高达80%~90%,灵芝害虫也多达16种^[4-12]。为降低病虫害稳定产量提高经济产值,药剂防治是必要措施之一。引起食用菌农药残留的因素有病虫害防治过程中化学农药的使用,也有水土中残留农药的污染,或是栽培料中残留^[13-17]。目前主要研究集中于灵芝栽培技术和有效成分研究,在农药检测上报道有限。随着国际贸易增加和对食品安全关注,重金属和农药残留已成为必检项目,GB 2763—2016《食品中农药最大残留限量》中规定我国食用菌农药残留指标有21项,涉及26种农药,其中有19项为最大残留限量,有2项为临时限量^[18]。我国是世界食用菌产量大国,我国食药食用菌类产品出口美国、日本、韩国和欧盟等发达国家地区,由于生产方式和标准指标差异等原因,食药食用菌出口贸易原因受到扣留或召回,2011—2016年被召回或扣留595批次,其中农残超标引起的有219批次,占37%^[19-20]。而且已有研究发现灵芝等食用菌对农药具有富集性^[21-23],农药检测结果极易存在假阴性。因此,加强农药残留检测方法和农药合理使用技术研究,这不仅有利于食用菌产品的出口贸易,更关乎我国的食品安全和环境保护。

食用菌农药提取净化的前处理方法常见的有均质提取、超声提取、加速溶剂萃取、固相萃取净化、凝胶渗透色谱净化及QuEChERS技术,常用分析技术有气相色谱法、高效液相色谱法及串联质谱法^[24]。灵芝的农药残留限量和检测方法国内外均没有明确的规定,已报道相关研究:陆继伟等^[25]采用冰浴超声提取、凝胶渗透色谱净化、气相色谱法测定灵芝中24种有机磷农药残留,王怀豫等^[26]用中国药典方法检测灵芝中有机氯类农药,刘志风等^[27]采用高速分散提取、弗罗里硅土层析柱石油醚洗脱净化、气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用法检测15种农药。QuEChERS是农药残留检测的AOAC官方方法和英国国家标准方法EN 15662-2008^[28-29],现已广泛应用在蔬果^[30]、食用菌^[31]及中草药^[32]等各类食品药品中的农药残留检测

中。本研究利用QuEChERS方法原理建立集萃取和净化为一体的新型前处理方法,结合GC-MS检测系统,用于灵芝中农药多种残留快速提取检测,不仅能够有效缩短前处理时间,提高检测效率,而且有机溶剂用量显著降低,使得农残分析更环保,保障了检测人员身体健康。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试样品灵芝子实体由延边大阳参业有限公司提供,经过自然干燥后取不少于200 g试样,置于高速粉碎机中粉碎、混匀,装入聚乙烯塑料袋中保存。

乙腈、丙酮、正己烷(均为色谱纯) 美国Fisher公司;水为GB/T 6682规定的一级水;0.22 μm有机相微孔滤膜、净化试剂盒64501、64504、64512(N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA))、MgSO₄、C₁₈填料) 北京迪马科技有限公司。

农药标准物质:α-六六六(C₆H₆Cl₆, 纯度99.5%, CAS No.319-84-6), β-六六六(C₆H₆Cl₆, 纯度99.5%, CAS No.319-85-7), γ-六六六(C₆H₆Cl₆, 纯度99.5%, CAS No.58-89-9), δ-六六六(C₆H₆Cl₆, 纯度98.1%, CAS No.319-84-6), 六氯苯(C₆Cl₆, 纯度99.5%, CAS No.118-74-1), p,p'-DDD(C₁₄H₁₀Cl₄, 纯度98.1%, CAS No.72-54-8), o,p'-DDT(C₁₄H₉Cl₅, 纯度99.5%, CAS No.789-02-6), p,p'-DDT(C₁₄H₉Cl₅, 纯度98.9%, CAS No.50-29-3), p,p'-DDE(C₁₄H₈Cl₄, 纯度99.5%, CAS No.72-55-9), 噻菌环胺(C₁₄H₁₅N₃, 纯度100%, CAS No.121552-61-2), 腐霉利(C₁₃H₁₁Cl₂NO₂, 纯度100%, CAS No.32809-16-8), 五氯硝基苯(C₆Cl₅NO₂, 纯度99.5%, CAS No.82-68-8), 二嗪磷(C₁₂H₂₁N₂O₃PS, 纯度100%, CAS No.333-41-5), 醚菌酯(C₁₈H₁₉NO₄, 纯度99%, CAS No.143390-89-0), 异菌脲(C₁₃H₁₃Cl₂N₃O₃, 纯度98.6%, CAS No.36734-19-7), 丙环唑(C₁₈H₁₉NO₄, 纯度99.5%, CAS No.60207-90-1), 噻菌酯(C₂₂H₁₇N₃O₅, 纯度99.5%, CAS No.131860-33-8), 乙霉威(C₁₄H₂₁NO₄, 纯度99.5%, CAS No.87130-20-9), 苯醚甲环唑(C₁₉H₁₇C₁₂N₃O₃, 纯度99.5%, CAS No.119446-68-3), 甲霜灵(C₁₅H₂NO₄, 纯度99.5%, CAS No.57837-19-11)。

1.2 仪器与设备

7890A-5975C型GC-MS联用仪 美国安捷伦科技有限公司;天平(感量为0.001 g和0.000 1 g) 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;TGL-16M高速离心机 湖南湘仪离心机有限公司;T25均质器 德国IKA公司;Vortex-Genie涡旋混合器 美国Scientific Industries公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱：HP-5石英毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）或相当者；程序升温：初始柱温120 ℃保持1 min，10 ℃/min升到260 ℃，保持10 min；载气为氮气（纯度≥99.999%），流速1.0 mL/min，尾吹气流量20 mL/min，不分流进样，进样体积为1 μL。

1.3.2 质谱条件

电子电离源；电子能量70 eV；进样口温度250 ℃，检测器温度280 ℃，离子源温度200 ℃；单离子扫描模式（single ion monitoring, SIM）；溶剂延迟时间10 min。

1.3.3 标准溶液配制

精密称取50 mg各标准物质丙酮溶解配制成质量浓度500 μg/mL储备液，贮存于-20 ℃。

精密吸取适量的储备液于25 mL容量瓶中正己烷定容，配成1 μg/mL混合标准工作液。

1.3.4 样品液制备

称取粉碎均匀试样1.0 g（精确到1 mg），加入10 mL纯水浸泡30 min，加入20 mL乙腈，高速匀浆均质提取2 min（10 000 r/min），加入6 g NaCl高速涡旋振荡混匀1 min，以5 000 r/min离心5 min，取上清液4 mL，加入含有150 mg PSA、900 mg MgSO₄净化包（No.64504），高速涡旋1 min混匀，以5 000 r/min离心5 min，取上清液上机检测。

1.4 数据分析

通过色谱分析仪器GC-MS获得数据使用Excel 2006进行数据分析和图像处理。

2 结果与分析

2.1 色谱质谱条件确定

选择对弱极性化合物分离较好的毛细管柱色谱柱HP-5，通过Scan模式扫描，确定农药的保留时间，选择定性定量离子，建立SIM离子监测方法，每种农药选择一个定量离子，2个定性离子，按照保留时间顺序分段检测。每种农药的保留时间及定量、定性离子见表1。

表1 农药的质量分析参数

Table 1 Mass spectrometric parameters for pesticides

农药	保留时间/min	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)
α-六六六	11.48	181	183 219
六氯苯	11.73	284	286 282
β-六六六	12.73	181	183 219
γ-六六六	12.68	181	183 219
五氯硝基苯	12.852	237	249 295
二噁磷	13.416	137	179 199
δ-六六六	13.758	181	183 219
甲霜灵	15.597	206	249 132

续表1

农药	保留时间/min	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)
乙霉威	16.83	225	267 124
啉菌环胺	17.875	224	225 210
腐霉利	18.78	283	285 96
p,p'-DDE	20.306	246	248 316
o,p'-DDT	20.61	235	165 237
醚菌酯	20.956	206	116 131
p,p'-DDD	21.881	235	165 237
丙环唑	23.061 (23.282)	173	175 259
p,p'-DDT	23.143	235	237 165
异菌脲	24.78	314	316 187
苯醚甲环唑	31.78 (31.916)	323	265 325
啉菌酯	33.163	344	388 345

2.2 样品前处理条件优化

2.2.1 提取条件确定

表2 灵芝样品不同前处理的回收率

Table 2 Recoveries of pesticides from *G. tsugae* with different pretreatments

农药	回收率/%			
	振荡+萃取盐+ 净化包64507	均质+萃取盐+ 净化包64507	均质+ 净化包64507	均质+ 净化包64501
α-六六六	0.76	2.73	29.78	60.83
γ-六六六	3.51	8.03	27.37	62.76
β-六六六	2.30	6.54	26.86	69.57
δ-六六六	9.61	2.88	80.96	42.86
五氯硝基苯	3.29	14.89	35.52	80.32
腐霉利	2.86	21.42	15.29	66.87
p,p'-DDE	0.11	4.33	27.28	67.00
o,p'-DDT	0.83	8.80	36.47	111.29
p,p'-DDD	0.05	7.45	31.34	71.86
p,p'-DDT	2.80	14.34	23.56	57.48
甲霜灵	24.62	50.28	104.18	57.79
醚菌酯	1.77	3.76	31.97	89.76
啉菌环胺	0.77	41.51	30.59	103.88
乙霉威	0.78	22.30	43.53	120.70
丙环唑1	1.15	19.06	78.60	87.00
丙环唑2	1.03	30.02	91.27	76.34
六氯苯	0.28	12.10	30.80	66.59
异菌脲	1.11	11.39	44.35	111.55
苯醚甲环唑1	0.61	2.95	21.11	87.47
苯醚甲环唑2	0.45	1.35	42.68	84.89
啉菌酯	0.08	20.02	40.75	77.00
二噁磷	3.17	14.12	28.57	80.23

注：萃取盐成分为4 g MgSO₄、1 g NaCl、1 g TSCD、0.5 g DHS，净化包No.64507成分为25 mg PSA、25 mg C₁₈、150 mg MgSO₄，净化包No.64501成分为50 mg PSA、150 mg MgSO₄。

QuEChERS法中常用的提取溶剂有乙腈、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等，乙腈因其最适宜于萃取极性范围较宽的多种农药，且萃出物中杂质含量较低^[33]，因此是目前使用最广泛的提取溶剂。根据农药的溶解性和稳定性，同时参照EN15662^[28]和AOAC^[29]的QuEChERS方法，也选择乙腈作为提取溶剂。本实验提取方法主要考察振荡

提取和高速均质提取, 结果发现大部分农药均质提取效果好于振荡提取。前处理包括提取和净化两个步骤, 实验中加入萃取盐包(4 g MgSO_4 、1 g NaCl 、1 g TSCD 和0.5 g DHS)和净化包64507, 但是添加回收率很低, 分析可能原因: 一是加入萃取盐产生大量热量造成热不稳定农药的分解, 二是净化包64507中含有 C_{18} , C_{18} 主要用于去除非极性杂质效果良好^[34], 然而有机氯农药正是属于非极性较强的化合物, 因此 C_{18} 吸附对回收率产生很大影响。均质提取时改加氯化钠促进分层, 净化使用不含 C_{18} 的64501, 半数农药回收率提高至70%~120%范围内(表2), 由此可见在灵芝中农药检测前处理时尽量减少对农药的分解和吸附, 灵芝本身对农药和重金属的富集特性^[15-16], 极易导致农药提取不充分而影响检测结果准确性。

2.2.2 净化条件筛选

2.2.2.1 净化剂筛选

QuEChERS方法中常用的净化剂有PSA、十八烷基硅烷(C₁₈)、石墨化炭黑(graphitized carbon black, GCB)、无水MgSO₄等^[35]。农残检测时净化效果极大地影响检测仪器和检测结果,考察64501、64504、64512和64565四种净化试剂盒的净化效果(图1)。随着PSA和MgSO₄量提高,如有机氯类 α -六六六、 β -六六六、 δ -六六六、*p,p'*-DDT、腐霉利、五氯硝基苯等多数农药的回收率明显提高,而含有Carb和C₁₈会吸附部分农药导致收率有所降低。本实验选择净化试剂盒64504作净化剂,回收率相对较高,在农残检测规定的70%~120%之间农药17种,异菌脲、乙霉威和苯醚甲环唑的回收率高于120%,分析原因可能是灵芝的基质增强效应所致,可以采用灵芝基质液配制农药标准液。

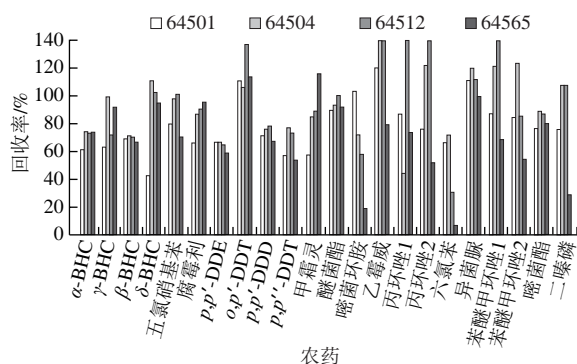


图1 不同净化试剂盒处理后灵芝中农药回收率

Fig. 1 Recoveries of pesticides from *G. tsugae* with different purification kits

2.2.2.2 提取液净化体积筛选

固定量的净化剂对不同体积提取液的净化效果不同, 因此要确定提取液的最佳上样净化体积, 比较2、4、8 mL提取液上样净化效果。按照设想体积越小净化效果越好, 农药回收率也高, 然而实验结果(图2)表明随着净化的提取液体积增加大部分农药回收率增加, 但是净化后溶液颜色随上样体积增加而加深, 说明净化剂的含量虽然能保证净化效果, 对仪器的污染也在增加。因此本实验选择吸取4 mL提取液净化, 既能够保证净化效果, 又最大程度地降低对仪器污染。

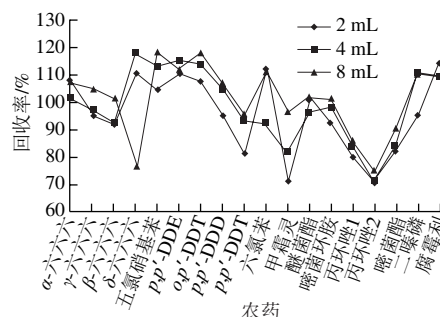


图2 不同净化液体积对灵芝中农药回收率影响

Fig. 2 Recoveries of pesticides from *Ganoderma tsugae* with different volumes of extract sample

2.3 方法学验证

2.3.1 标准曲线和检出限

表 3 17 种农药线性回归方程和相关系数
Table 3 Calibration equations, linearity ranges and correlation coefficients for 17 pesticides

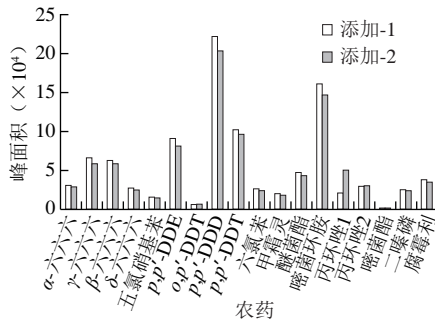
化合物	线性方程	相关系数 r	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
α -六六六	$y=6.75 \times 10^4 x + 2.43 \times 10^3$	0.996	0.005	0.017
β -六六六	$y=1.42 \times 10^5 x + 2.97 \times 10^2$	0.996	0.013	0.043
γ -六六六	$y=1.43 \times 10^5 x + 2.73 \times 10^3$	0.996	0.013	0.042
δ -六六六	$y=4.95 \times 10^4 x - 8.783 \times 10^2$	0.995	0.004	0.015
五氯硝基苯	$y=3.18 \times 10^4 x - 1.22 \times 10^3$	0.991	0.013	0.043
二噁磷	$y=4.71 \times 10^4 x - 7.55 \times 10^2$	0.994	0.022	0.072
甲霜灵	$y=7.98 \times 10^4 x - 9.71 \times 10^1$	0.995	0.003	0.011
噻菌环胺	$y=3.30 \times 10^5 x - 5.78 \times 10^3$	0.995	0.004	0.014
腐霉利	$y=7.66 \times 10^4 x + 1.94 \times 10^3$	0.997	0.002	0.007
p,p' -DDE	$y=2.01 \times 10^5 x + 8.76 \times 10^3$	0.995	0.003	0.009
o,p' -DDT	$y=1.09 \times 10^4 x + 1.51 \times 10^3$	0.993	0.016	0.054
醚菌酯	$y=9.02 \times 10^4 x - 6.86 \times 10^3$	0.990	0.006	0.021
p,p' -DDD	$y=4.22 \times 10^5 x - 1.063 \times 10^4$	0.994	0.002	0.007
丙环唑1	$y=3.76 \times 10^4 x - 4.40 \times 10^3$	0.984	0.007	0.024
丙环唑2	$y=5.94 \times 10^4 x - 5.53 \times 10^3$	0.988	0.004	0.013
p,p' -DDT	$y=1.72 \times 10^5 x - 1.44 \times 10^4$	0.989	0.009	0.029
噻菌酯	$y=9.70 \times 10^4 x - 6.183 \times 10^3$	0.991	0.01	0.032
六氯苯	$y=6.43 \times 10^4 x + 4.73 \times 10^3$	0.996	0.002	0.008

分别精密吸取各农药标准物质储备液配制成0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mg/L系列的标准工

作液，按选定的实验方法进行测试，经选择离子定量扫描，以峰面积（y）为纵坐标、以质量浓度（x）为横坐标作标准曲线，得各农药的线性回归方程和相关系数。以定量离子信噪比 R_{SN} 为3为样品检出限， R_{SN} 为10为定量限。表3表明，17种杀菌剂线性关系良好，相关系数大于0.98，方法检出限在0.002~0.022 mg/kg之间，定量限在0.007~0.072 mg/kg之间。

2.3.2 仪器精密度实验结果

添加农药混合标准溶液使之添加量为0.5 mg/kg的灵芝样品，经过前处理后，GC-MS上样，每个样品连续测试5针，提取定量离子获得每种农药的峰面积，计算标准偏差，实验设置2个平行。结果表明仪器精密度良好，90%农药相对标准偏差（relative standard deviation, RSD）在1.06%~7.53%之间，噻菌酯、丙环唑稍高，在10.26%~19.70%之间（图3）。



添加1、2是两个平行。

图3 GC-MS仪器精密度实验结果

Fig. 3 Results of instrumental precision of GC-MS

2.3.3 方法的准确性

表4 松杉灵芝中农药的添加回收率和RSD (n=3)

Table 4 Recoveries and RSDs of pesticides from spiked

G. tsugae (n = 3)

农药	添加0.05 mg/kg		添加0.10 mg/kg		添加0.50 mg/kg	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
α-六六六	119.55	1.58	107.32	5.56	98.87	1.04
γ-六六六	74.60	10.08	73.75	4.63	87.74	1.65
β-六六六	71.10	16.61	96.92	10.99	80.13	17.13
δ-六六六	118.21	6.41	93.61	7.89	113.10	15.09
五氯硝基苯	115.66	11.29	86.80	16.58	119.53	17.91
p,p'-DDE	85.56	13.20	80.67	3.98	98.40	2.45
o,p'-DDT	110.47	10.72	100.05	17.09	90.08	11.61
p,p'-DDD	102.29	10.13	107.83	4.56	110.98	7.06
p,p'-DDT	107.26	15.74	116.64	11.06	108.18	1.77
六氯苯	92.75	13.99	82.61	4.89	100.22	15.83
甲霜灵	98.55	17.57	98.12	10.35	118.27	10.45
噻菌酯	116.44	7.21	116.63	7.07	118.71	7.50
噻菌环胺	101.48	8.42	110.80	10.86	115.66	0.47
丙环唑1	107.63	20.05	88.65	3.79	84.30	14.36
丙环唑2	96.68	10.27	73.01	15.11	71.25	15.25
噻菌酯	89.07	17.26	118.64	19.36	115.06	7.38
二噻磷	94.32	17.25	77.40	18.72	110.42	9.78
腐霉利	117.09	11.22	117.93	7.10	110.31	1.97

样品中准确加入一定量混合标准溶液，使添加量分别为0.05、0.1、0.5 mg/kg，按最优条件进行测定，每个添加实验设定3个平行和1个对照，计算加标平均回收率和3次测定的RSD。结果（表4）表明方法准确可行，17种农药回收率范围在71.10%~119.55%，RSD范围为0.47%~20.05%。陆继伟等^[25]采用冰浴超声提取灵芝中二噻磷平均回收率86%，而本实验建立的QuEChERS-GC-MS方法二噻磷平均回收率为94.04%。

3 结论与讨论

QuEChERS法是基于基质固相分散而开发的，主要包括以下步骤：1）待测样品的粉碎和均质处理。2）待测组分的提取：使用有机溶剂和水的混合溶剂溶解样品中的待测组分，并通过液液分配使待测组分集中于上层有机溶剂中。3）待测样品的净化：通过添加净化剂去除待测样品中的脂肪酸、色素、糖类杂质。灵芝子实体因木质化程度高，使用中药粉碎机粉碎后成絮状，有研究表明普通粉碎灵芝多糖等有效成分提取效率低^[36]。本实验通过匀浆机刀头上万转的高速旋转进行均质，充分粉碎木质化的灵芝子实体的组织和细胞使待测组分在样品中的分布更均匀，同时提取时加入盐析剂NaCl，调节极性、减少极性杂质的干扰，利于乙腈对农药的充分提取，并促进液液分配。

常规农残检测方法索氏提取、磺化法净化中国药典规定方法超声波提取、溶剂萃取净化相比，索氏提取的提取效率高于药典超声法^[37]，但索氏提取热回流耗时较长一般需要数小时^[38]。本研究采用改进的QuChERS方法提取和净化样品，利用GC-MS的SIM模式快速检测灵芝中农药多残留，操作简单、检出限低。该方法的平均回收率为71.10%~119.55%，RSD基本小于20%，完全符合农药残留分析的要求，且在40 min内即可完成17种农药多残留分析，整个检测只需20 mL乙腈，具有快速、准确、环保的优点，极大地提高了检测效率，也减少了对环境的污染，保障了检验人员的健康。但最初的实验设计是预建立六六六、DDT、五氯硝基苯、甲霜灵、噻菌酯、噻菌环胺等20种农药多残留同时检测方法，但在实验中异菌脲、苯醚甲环唑和乙霉威3种农药的添加回收率高于120%，分析原因可能与灵芝基质效应有关。课题组拟开展灵芝基质效应在农药残留检测中影响研究。

参考文献：

[1] 吴兴亮, 戴玉成, 林龙河. 中国灵芝科资源及其地理分布[J]. 贵州科学, 2004(2): 27-33; 4.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 174-175.

- [3] 周周, 余梦瑶, 江南, 等. 我国灵芝栽培研究近况及其未来发展趋势探讨[J]. 中国食用菌, 2017, 36(4): 5-7.
- [4] 万鲁长, 曹德强, 解思泌, 等. 灵芝常见病虫害及其防治研究[J]. 食用菌, 1994(增刊1): 37-38.
- [5] 蒋时察, 周仲刚, 殷志龙. 灵芝病虫害调查及其主要病虫害防治[J]. 食用菌, 1996(1): 34-35.
- [6] 孙平. 灵芝病虫害的发生与防治技术[J]. 植物医生, 2001, 14(5): 21.
- [7] 陈文杰, 张瑞青, 张晓芳. 灵芝的无公害病虫害防治技术探讨[J]. 食用菌, 2007, 29(6): 59-61.
- [8] 汪义平. 灵芝病虫害种类调查[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(1): 136-137. DOI:10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2009.01.035.
- [9] 李现合, 杜适普, 王亚光, 等. 袋栽灵芝常见的生理性病害及防治方法[J]. 食用菌, 2011(5): 58.
- [10] 解宜林. 安徽灵芝病害调查与防治[J]. 中国食用菌, 2013(6): 45-47. DOI:10.13629/j.cnki.53-1054.2013.06.004.
- [11] 曹美桃. 灵芝的无公害病虫害防治技术探讨[J]. 农家科技旬刊, 2016(10): 161.
- [12] 于延申. 灵芝竞争性杂菌发生与综合防治措施[J]. 吉林蔬菜, 2017(9): 26. DOI:10.16627/j.cnki.cn22-1215/s.2017.09.015.
- [13] 罗佳. 食用菌农药残留问题与解决办法[J]. 中国农学通报, 2007(23): 284-289.
- [14] 黎志银. 食用菌重金属、农药的吸收规律与残留研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010: 61.
- [15] 康文斌. 食用菌栽培料农药残留情况调查及对子实体安全生产的影响研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011: 25-53.
- [16] 杨慧, 赵志辉, 王瑞霞, 等. 食用菌中农药残留安全及风险预测[J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 105-110. DOI:10.16488/j.cnki.1005-9873.2011.03.007.
- [17] 管道平, 胡清秀. 食用菌农药残留限量与产品质量安全[J]. 中国食用菌, 2008, 27(2): 3-6.
- [18] 国家食品药品监督管理总局. 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 10-225.
- [19] 董娇, 邵丽梅. 国内外食用菌农药残留限量标准比较分析[J]. 中国食用菌, 2017, 36(5): 1-5. DOI:10.13629/j.cnki.53-1054.2017.05.001.
- [20] 邹永生, 董娇, 李洁实, 等. 新农药残留限量标准对食用菌标准的影响分析[J]. 中国食用菌, 2013, 32(2): 53-54. DOI:10.13629/j.cnki.53-1054.2013.02.004.
- [21] 曲明清. 三种食用菌中农药残留及富集研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2006: 20.
- [22] 张晓柠. 灵芝对四种重金属富集作用的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007: 69.
- [23] 康文斌, 陈剑, 林原, 等. 食用菌菌丝对农药富集能力的研究[J]. 食用菌, 2011(3): 27-30.
- [24] 刘军虎, 洪之国, 胡承成. 食用菌农药残留检测方法研究现状探讨[J]. 农产品质量与安全, 2017(4): 80-84.
- [25] 陆继伟, 夏晶, 苗水, 等. GC测定灵芝中24种有机磷农药残留量[J]. 中国药学杂志, 2007(3): 227-231.
- [26] 王怀豫, 郭晓蕾, 朱龙平, 等. 不同产地灵芝中重金属和有机氯类农药残留含量比较[J]. 中药材, 2011, 34(11): 1672-1674. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2011.11.006.
- [27] 刘志风, 徐靖, 李建森, 等. GC-MS与GC-MS/MS在灵芝农药残留分析中的应用[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(5): 20-23. DOI:10.13728/j.1673-6427.2015.05.007.
- [28] The Standards Policy and Strategy Committee. Food of plant origin-determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method. British standard: EN 15662-2008[S]. British: The Standards Policy and Strategy Committee, 2008.
- [29] Association of Official Analytical Chemists. Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: AOAC official method 2007.01[S]. 2007.
- [30] 张雪莲, 张耀海, 焦必宁. 气相色谱-串联质谱法结合QuEChERS方法快速检测柑橘中52种农药多残留[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 152-155.
- [31] 钟志铭, 黄子敬, 符靖雯. QuEChERS结合PTV-GC-MS/MS测定食用菌中多种农药残留[J]. 分析试验室, 2016(6): 648-653. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2016.0151.
- [32] 谢景丽, 李凌云, 刘新艳, 等. 改进的QuEChERS-液相色谱串联质谱法快速测定中草药中147种农药残留[J]. 农产品质量与安全, 2016(2): 65-69.
- [33] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER D, et al. Fast easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning, "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(2): 412-431.
- [34] 付文雯, 罗彤, 朱影, 等. QuEChERS-气相色谱-串联质谱测定牛奶中有机氯农药及多氯联苯的分析[J]. 食品科学, 2018, 39(8): 309-313. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201808048.
- [35] 刘远晓, 关二旗, 卞科, 等. QuEChERS法在食品有机污染物检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 294-300. DOI:10.16488/j.cnki.1005-9873.2011.03.011.
- [36] 周帅, 张劲松, 刘艳芳, 等. 不同粉碎程度对灵芝多糖与三萜提取得率的影响[J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 67-70.
- [37] 黄晓会, 薛健. 人参、黄芪、白菊中农药残留提取方法比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 2126-2128.
- [38] 侯彩霞, 全灿, 樊丽华, 等. 毛细管气相色谱法测定人参须中有机氯农药残留[J]. 化学试剂, 2010, 32(11): 997-999. DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2010.11.009.