

# QuEChERS结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中9种新烟碱类杀虫剂及5种代谢物残留量

林彬彬, 杨志金, 黄旭良, 林小莲  
(厦门市食品药品质量检验研究院, 福建 厦门 361013)

**摘要:** 本研究使用QuEChERS (Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe) 净化结合超高效液相色谱-串联质谱法建立同时测定畜禽肉中新烟碱类杀虫剂及其代谢物残留量的方法。样品经1%乙酸-乙腈提取, 加入盐析剂 (1 g NaCl、4 g无水MgSO<sub>4</sub>) 盐析分层, 上清液用C<sub>18</sub>粉末净化后经XSelect HSS T3 (150 mm×3.0 mm, 2.5 μm) 色谱柱进行分离, 以0.1%甲酸溶液和乙腈为流动相梯度洗脱, 在正离子模式下以多反应监测方式监测, 采用基质匹配法进行外标定量。结果表明: 9种新烟碱类杀虫剂及5种代谢物线性关系良好, 相关系数 $r>0.995$ , 12种目标化合物的定量限为2 μg/kg, 2种化合物的定量限为20 μg/kg, 方法回收率在61.0%~116.7%之间, 相对标准偏差不超过14.81%。该方法前处理步骤简便、回收率优良, 可用于畜禽肉中新烟碱类杀虫剂及其代谢物的快捷、精准检测。

**关键词:** 新烟碱类杀虫剂; 代谢物; 畜禽肉; QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱

## Simultaneous Determination of Nine Neonicotinoid Insecticides and Five Metabolites in Meat by QuEChERS Coupled with Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LIN Binbin, YANG Zhijin, HUANG Xuliang, LIN Xiaolian  
(Xiamen Institute for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361013, China)

**Abstract:** In this study, a method for the simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in meat was established by the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe) pretreatment method followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Samples were extracted with acetonitrile containing 1% acetic acid. After salting-out with 1 g of NaCl and 4 g of anhydrous MgSO<sub>4</sub>, the supernatant was cleaned-up using C<sub>18</sub>. The separation of the analytes was carried out on a XSelect HSS T3 (150 mm × 3.0 mm, 2.5 μm) column by gradient elution with a mobile phase composed of 0.1% formic acid and acetonitrile. The analytes were detected by multiple reaction monitoring (MRM) in the positive ion mode and quantified by the matrix-matched external standard method. The results showed that the calibration curves for all analytes had a good linearity with correlation coefficients ( $r$ ) more than 0.995. The limit of quantitation (LOQ) was 2 μg/kg for 12 target compounds and 20 μg/kg for the two compounds. The recovery rates of the proposed method were in the range of 61.0%–116.7% with relative standard deviations (RSDs) below 14.81%. This method has the merits of simple pretreatment steps and satisfying recovery rates and enables fast and accurate detection of neonicotinoid insecticides and their metabolites in meat.

**Keywords:** neonicotinoid insecticides; metabolites; meat; quick, easy, cheap, effective, rugged, safe; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240519-146

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 24-0273-09

引文格式:

林彬彬, 杨志金, 黄旭良, 等. QuEChERS结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中9种新烟碱类杀虫剂及5种代谢物残留量[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 273-281. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240519-146. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2024-05-19

基金项目: 厦门市市场监督管理局科技项目 (XMSJ202214)

第一作者简介: 林彬彬 (1990—) (ORCID: 0009-0003-8258-8812), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品安全分析与检测。

E-mail: 785093398@qq.com

LIN Binbin, YANG Zhijin, HUANG Xuliang, et al. Simultaneous determination of nine neonicotinoid insecticides and five metabolites in meat by QuEChERS coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2024, 45(24): 273-281. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20240519-146. <http://www.spkx.net.cn>

新烟碱类杀虫剂是在烟碱结构修饰的基础上, 作为烟碱型乙酰胆碱受体的激动剂作用于昆虫中枢神经系统<sup>[1-2]</sup>的一类杀虫剂。由于其杀虫谱广、持效期长, 是目前世界上使用最广泛的杀虫剂<sup>[3-4]</sup>。但是, 近年来新烟碱类杀虫剂及其代谢物在食品中的粮食作物、果蔬<sup>[5]</sup>、蜂蜜<sup>[6]</sup>, 环境中的水<sup>[7]</sup>、土壤<sup>[8-9]</sup>, 甚至于人体的头发<sup>[10]</sup>、尿液<sup>[11]</sup>中被发现, 并可能对人类等哺乳动物产生遗传毒性、神经毒性和生殖毒性<sup>[12]</sup>。GB 2763—2021《食品中农药最大残留限量》规定吡虫啉(dinotefuran, DIN)、啉虫脒(acetamiprid, ACE)、噻虫胺(clothianidin, CLO)、噻虫啉(thiacloprid, THI)、吡虫啉(imidacloprid, IMI)、噻虫嗪(thiamethoxam, THM)在畜禽肉中的最大残留限量为0.01~0.50 mg/kg<sup>[13]</sup>。欧盟在2018年就已禁止THM、CLO和IMI在农业中的施用<sup>[14-16]</sup>。本课题研究包含9种新烟碱类杀虫剂DIN、ACE、氟啶虫酰胺(flonicamid, FLO)、CLO、THI、IMI、烯啶虫胺(nitenpyram, NIT)、THM、氯噻啉(imidaclothiz, IMZ), 而GB 2763—2021规定动物源性食品中的DIN是以DIN与1-甲基-3-(四氢-3-呋喃甲基)脲之和计; IMI是以IMI及其含6-氯-吡啶基的代谢物之和计<sup>[13]</sup>, 同时考虑到在畜禽肉中代谢物比母体更具有移动性和持久性<sup>[11]</sup>, DIN的代谢物UF和IMI含6-氯-吡啶基的代谢物吡虫啉脲(imidacloprid-urea, IMI-urea)、5-羟基吡虫啉(5-hydroxy-imidacloprid, 5-OH-IMI)、烯啶吡虫啉(imidacloprid-olefin, IMI-olefin)、6-氯烟酸(6-chloronicotinic acid, 6-CNA)也被纳入研究范围<sup>[17-18]</sup>。

畜禽肉是指猪、牛、羊、鸡、鸭肉等食品, 是我国膳食结构的重要组成部分, 关系着国民的饮食健康。新烟碱类杀虫剂的使用不仅影响植物源性食品的安全, 也因农药的直接作用或蓄积影响着畜禽肉食品。影响畜禽肉的主要因素包括: 1) 直接使用新烟碱类杀虫剂污染畜禽肉原材料; 2) 通过作物如饲料残留的新烟碱类杀虫剂等富集到畜禽肉食品; 3) 环境中残留的新烟碱类杀虫剂富集转移。因此, 检测畜禽肉中新烟碱类杀虫剂及其代谢物的残留具有重要意义<sup>[19]</sup>。

目前文献报道的常用前处理方法有固相萃取法(solid phase extraction, SPE)<sup>[2-3]</sup>、溶剂萃取法(固液萃取法、液液萃取法)、QuEChERS(Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe)法<sup>[14]</sup>和其他新颖的微型化前处理方法, 如液液微萃取、固相微萃取<sup>[20]</sup>。其中, QuEChERS法具有操作简便、快速高效的特点<sup>[21]</sup>,

是目前比较流行的前处理方法。常用的新烟碱类杀虫剂检测方法包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)<sup>[3,22]</sup>、免疫分析法<sup>[23-24]</sup>和传感器法<sup>[25-26]</sup>, 超高效液相色谱-串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)因具有快速、高效、灵敏度高等优点而被广泛使用。新烟碱类杀虫剂的测定主要集中在蔬菜、水果等植物源性食品中<sup>[26-27]</sup>, 而动物源性食品中以检测蜂产品为主<sup>[3]</sup>, 对于畜禽肉中的新烟碱类杀虫剂研究较少。我国制订的国家标准中已涵盖对畜禽肉中DIN、ACE、FLO、CLO、THM的测定, 且已有文献报道采用QuEChERS-UPLC-MS/MS法能够测定畜禽肉中一种或两种新烟碱类杀虫剂残留量<sup>[19]</sup>, 但目前鲜见对畜禽肉中多种新烟碱类杀虫剂及其代谢物同时测定的文献报道。本研究通过使用QuEChERS-UPLC-MS/MS法, 旨在实现新烟碱类杀虫剂及其代谢物的同时检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉均为市售。

100 µg/mL DIN、ACE、CLO、IMI、NIT、IMZ标准溶液 农业部环境保护科研监测所; 994 µg/mL FLO、100 µg/mL THI、THM、UF、5-OH-IMI标准溶液、IMI-urea、IMI-olefin、6-CNA标准品(纯度99.5%) 北京曼哈格生物科技有限公司; 甲醇、乙腈、乙酸乙酯(均为色谱纯) 德国Merck公司; 甲酸(色谱纯) 美国Fluka公司; 乙酸、无水硫酸镁(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; QuEChERS AOAC(美国AOAC 2007.01方法的萃取盐包)盐析剂(含6 g无水硫酸镁、1.5 g乙酸钠)、QuEChERS EN(欧洲标准化委员会各成员国欧盟EN 15662方法的萃取盐包)盐析剂(含1 g氯化钠、4 g无水硫酸镁、1 g柠檬酸钠二水合物、0.5 g柠檬酸二钠盐倍半水合物) 天津博纳艾杰尔科技有限公司; QuEChERS盐析剂(含1 g氯化钠、4 g无水硫酸镁) 睿科集团(厦门)股份有限公司; *N*-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)、陶瓷均质子 美国Agilent公司; 十八烷基硅烷键合硅胶(C<sub>18</sub>)、碳十八键合硅胶(Z-Sep<sup>+</sup>) 美国Supelco公司。

1.2 仪器与设备

1290超高效液相色谱仪-6500+三重四极杆质谱仪 美国AB SCIEX公司; T18 digital高速分散均质机、Vortex 4 Basic涡旋混合器 德国IKA公司; CF15RN高速冷冻离心机 日本Hitachi公司; Milli-Q超纯水发生器 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: XSelect HSS T3 (150 mm×3.0 mm, 2.5 μm); 柱温35 ℃。流动相A为0.1%甲酸溶液, 流动相B为乙腈; 流速0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~4.0 min, 80%~0% A、20%~100% B; 4.0~7.0 min, 0% A、100% B; 7.0~7.1 min, 0%~80% A、100%~20% B; 7.1~12.0 min, 80% A、20% B。进样量1 μL。

1.3.2 MS条件

离子源: 电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI); 正离子模式; 离子源温度550 ℃; 电喷雾电压5 500 V; 雾化气压力55 psi; 辅助加热气压力60 psi; 气帘气压力35 psi; 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式。其他MS参数见表1。

表1 新烟碱类杀虫剂及其代谢物MS参数与保留时间  
Table 1 MS parameters and retention time of neonicotinoid insecticides and their metabolites

新烟碱类杀虫剂及其代谢物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
DIN	3.57	203.1	129.2*	50	16
			113.2		16
ACE	4.50	223.0	126.0*	65	28
			99.0		60
FLO	4.24	230.0	203.0*	80	22
			148.0		35
CLO	4.34	250.0	169.1*	35	17
			132.0		21
THI	4.82	253.1	126.1*	81	29
			99.1		57
IMI	4.46	256.1	209.0*	45	22
			175.0		27
NIT	3.65	271.1	225.0*	80	15
			99.0		21
THM	4.08	292.0	211.0*	30	16
			181.0		30
IMZ	4.57	262.1	181.1*	57	19
			122.0		36
IMI-urea	3.96	212.0	128.0*	99	23
			126.0		104
5-OH-IMI	6.32	272.5	230.3*	170	26
			189.3		36
IMI-olefin	6.78	254.3	176.3*	170	31
			134.2		39
6-CNA	4.39	158.0	122.0*	70	25
			78.0		35
UF	2.75	159.2	102.1*	22	16
			67.0		30

注: \*.定量离子。

1.3.3 标准溶液的配制

将固体标准品 (IMI-urea、IMI-olefin、6-CNA) 用乙腈配制成100 μg/mL的标准储备液; 将FLO稀释成100 μg/mL的标准储备液; 分别吸取不同体积标准储备液用乙腈稀释成混合标准中间液。将混合标准中间液稀释成梯度标准工作液, 其中DIN、ACE、FLO、CLO、THI、IMI、NIT、THM、IMZ、IMI-urea、5-OH-IMI、IMI-olefin质量浓度分别为0.20、0.50、1.0、5.0、10.0、20.0 μg/L; 6-CNA、UF质量浓度分别为2.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μg/L。

1.3.4 样品的前处理

称取2 g畜禽肉样品于50 mL塑料离心管中, 并在离心管中加入10 mL 1%乙酸-乙腈及1颗陶瓷均质子, 均质、涡旋充分混匀后超声10 min, 加入盐析剂 (1 g NaCl、4 g无水MgSO<sub>4</sub>), 剧烈振荡1 min后8 000 r/min离心5 min, 倒出上清液, 并于残渣中加入10 mL 1%乙酸-乙腈溶液进行2次提取, 涡旋混匀后于8 000 r/min离心5 min, 合并两次上清液, 吸取1.0 mL上清液至净化管 (150 mg无水MgSO<sub>4</sub>、50 mg C<sub>18</sub>), 8 000 r/min离心5 min, 吸取上清液过0.22 μm微孔滤膜, 供UPLC-MS/MS分析。

1.4 数据处理

采用Analyst 1.6.3软件进行数据采集, MultiQuant 3.0.2软件进行定性定量分析, 采用Excel 2016软件进行数据处理及分析, 采用Origin 9.0软件进行图像处理。

2 结果与分析

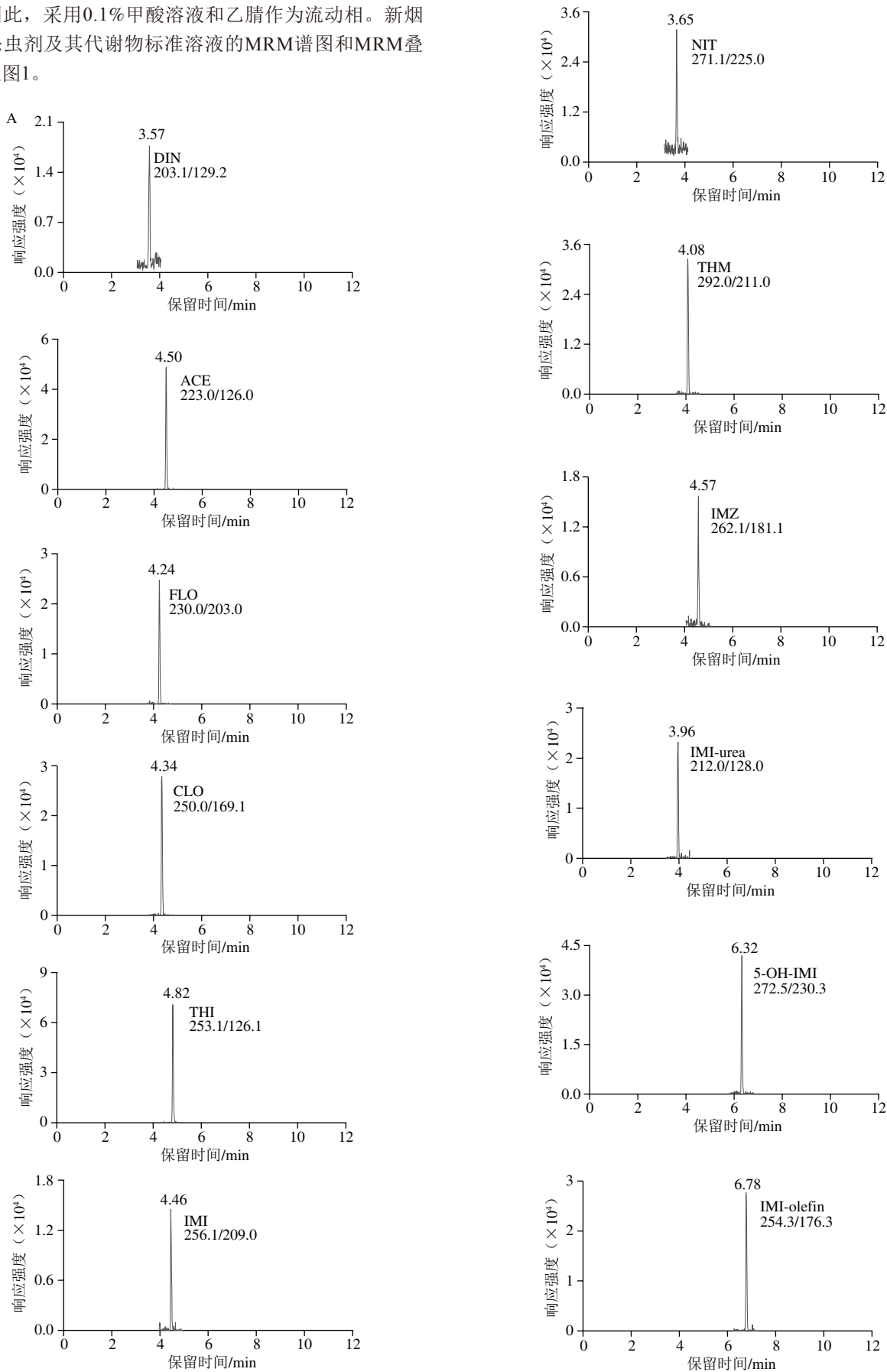
2.1 UPLC-MS/MS条件的优化

2.1.1 色谱条件

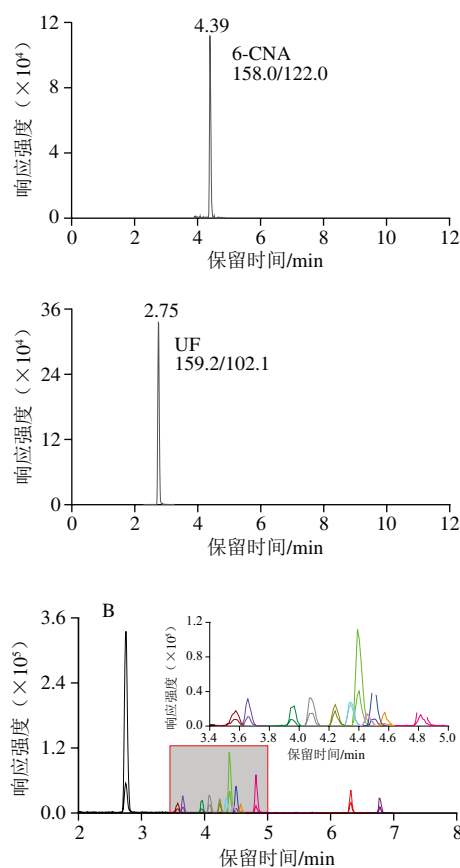
通过比较Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (150 mm×3.0 mm, 2.6 μm) 色谱柱<sup>[11]</sup>、XSelect HSS T3 (150 mm×3.0 mm, 2.5 μm) 色谱柱<sup>[2,28]</sup>对新烟碱类杀虫剂及其代谢物峰形和响应值的影响。结果发现Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub>色谱柱的DIN、NIT色谱峰峰形较差, 峰宽较宽, 响应值较低; XSelect HSS T3色谱柱分离新烟碱类杀虫剂及其代谢物效果好, 峰形尖锐对称, 因此本实验采用XSelect HSS T3色谱柱。

新烟碱类杀虫剂及其代谢物在正离子模式下采集, 水相流动相加酸促进其电离, 提高目标化合物的响应值, 色谱峰峰形较好。甲酸溶液条件下FLO响应值提高了0.32倍, NIT的响应值提高1.6倍。比较乙腈、甲醇两种有机相, 发现同样条件下采用甲醇相对于乙腈, 色谱峰峰宽更宽, UF出现前沿峰, IMI-olefin的定量离子对出现分叉峰, 定性离子对的基线升高, 响应值降低; 而乙腈可以提供更好的电离条件并且目标物的色谱峰形更

窄。因此,采用0.1%甲酸溶液和乙腈作为流动相。新烟碱类杀虫剂及其代谢物标准溶液的MRM谱图和MRM叠加图见图1。







DIN、ACE、FLO、CLO、THI、IMI、NIT、THM、IMZ、IMI-urea、5-OH-IMI、IMI-olefin质量浓度为0.5  $\mu\text{g/mL}$ ；6-CNA、UF质量浓度为5.0  $\mu\text{g/mL}$ 。

图1 新烟碱类杀虫剂及其代谢物定量离子MRM色谱图(A)和MRM叠加图(B)

Fig. 1 Quantitative ion MRM chromatograms (A) and overlapped MRM chromatograms (B) of neonicotinoid insecticides and their metabolites

### 2.1.2 MS条件

将新烟碱类杀虫剂及其代谢物的混合标准工作液不经过液相，通过连续流动注射分析，结果发现，在ESI<sup>+</sup>模式下，新烟碱类杀虫剂及其代谢物主要以[M+H]<sup>+</sup>加合离子形式存在，具有稳定的离子化效率和较好的灵敏度。MS条件优化确定最佳的定量定性离子以及去簇电压和碰撞能量(表1)。

### 2.2 提取溶剂的选择

实验研究了甲醇、乙酸乙酯和不同浓度的乙酸-乙腈<sup>[29]</sup>作为提取溶剂对新烟碱类杀虫剂及其代谢物在猪肉中的提取效果，结果如图2所示。采用甲醇提取，UF的回收率只有39.7%；乙酸乙酯作为提取溶剂，UF、6-CNA的回收率均低于37%。而乙腈具有通用性强、渗透性好的优点<sup>[30]</sup>，能保证目标化合物提取效率的同时，减少油脂和蛋白质等干扰。实验发现使用不同浓度的乙酸-乙腈作为提取溶剂，除了ACE、NIT、5-OH-IMI、IMI-olefin，其余化合物的提取率随着提取溶剂酸度的增强而提高。最终确定以1%乙酸-乙腈溶液作为提取溶剂。

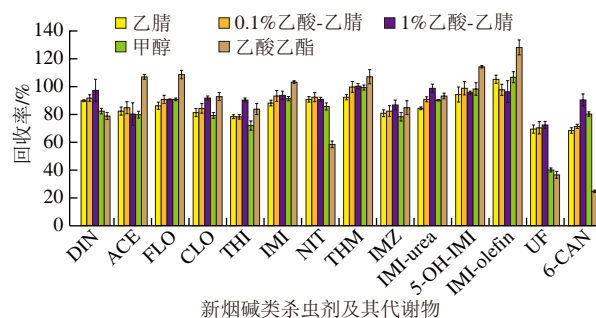


图2 提取溶剂对新烟碱类杀虫剂及其代谢物的提取效果(n=3)

Fig. 2 Effect of extraction solvents on the recoveries of neonicotinoid insecticides and their metabolites (n=3)

### 2.3 盐析剂的选择

猪肉样品经乙酸-乙腈溶液提取后，加入盐析剂促进水相和有机相分离<sup>[11]</sup>。实验对比了提取溶液中不加盐析剂，添加植物源性食品中常用的QuEChERS AOAC盐析剂、QuEChERS EN盐析剂<sup>[31]</sup>以及组合盐析剂(NaCl+无水MgSO<sub>4</sub>)的提取效果，结果发现提取溶液加入盐析剂后离心管出现放热现象，这是因为无水MgSO<sub>4</sub>与畜禽肉中的水分结合所致<sup>[11]</sup>。如图3所示，AOAC盐析剂由于含有乙酸钠而使提取溶液呈碱性，与6-CNA发生反应，导致6-CNA无法回收。EN盐析剂和组合盐析剂相比，EN盐析剂中含有柠檬酸缓冲盐，该缓冲盐导致新烟碱类杀虫剂及其代谢物中除了6-CNA外，其余目标化合物的回收率反而降低。因此实验选用组合盐析剂(1 g NaCl、4 g 无水MgSO<sub>4</sub>)作为盐析剂。

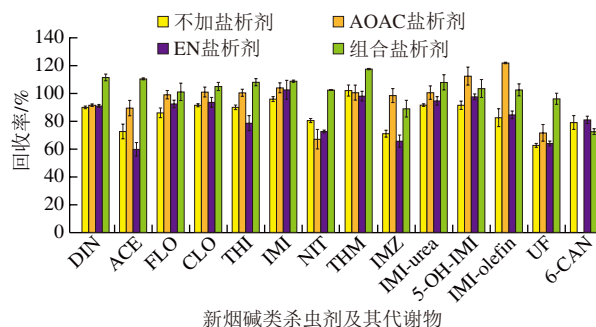


图3 盐析剂对新烟碱类杀虫剂及其代谢物的提取效果(n=3)

Fig. 3 Effect of salting-out agents on the recoveries of neonicotinoid insecticides and their metabolites (n=3)

### 2.4 净化剂的选择及优化

畜禽肉相对于植物源性食品而言，具有高脂肪、高蛋白质含量等特点<sup>[32]</sup>，复杂的基质要求在优化前处理条件时不仅需要考虑到目标化合物的提取效率，还要尽量提高对畜禽肉基质中脂肪和蛋白质等杂质的去除率，减少共萃物的萃取，避免过高的基质效应。实验采用基质分散固相萃取净化的方式降低畜禽肉基质对UPLC-MS/MS测定的影响。常用的分散吸附剂有PSA、C<sub>18</sub>、Z-sep<sup>+</sup><sup>[33]</sup>。PSA是属于弱阴离子交换填料，可吸附有

机酸、糖类和脂类等杂质； $C_{18}$ 对畜禽肉中的脂肪、固醇等非极性干扰物具有良好的净化效果；Z-sep<sup>+</sup>即 $SiO_2$ 键合 $C_{18}$ 和 $ZrO_2$ 两种吸附剂的新型净化材料<sup>[34]</sup>，酸性条件下对脂肪具有良好的去除能力。在固定加入150 mg无水 $MgSO_4$ 的前提下，考察50 mg PSA、50 mg  $C_{18}$ 、50 mg PSA+50 mg  $C_{18}$ 、50 mg Z-sep<sup>+</sup>对样品净化效果的影响，结果如图4所示，PSA分散剂在硅胶上键合乙二胺-N-丙基官能团，可吸附酸性化合物，而6-CNA为酸性化合物，被PSA吸收后导致其回收率低于13.09%，这与王玉丹<sup>[18]</sup>的研究结果一致。在Z-sep<sup>+</sup>分散剂的作用下，NIT、UF、6-CNA的回收率不超过6.86%，可能是Z-sep<sup>+</sup>通过路易斯酸、碱相互作用<sup>[35]</sup>，并与NIT、UF、6-CNA发生反应。因此确定 $C_{18}$ 作为新烟碱类杀虫剂及其代谢物提取的净化分散剂。

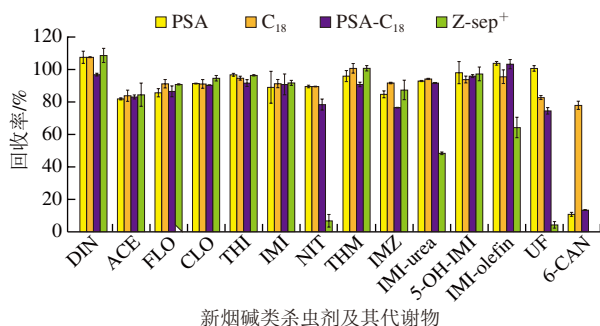


图4 净化剂对新烟碱类杀虫剂及其代谢物的提取效果 ( $n=3$ )

Fig. 4 Effect of clean-up agents on the recoveries of neonicotinoid insecticides and their metabolites ( $n=3$ )

实验进一步考察了 $C_{18}$ 用量(25、50、100、150、200 mg)对样品净化效果的影响，结果如图5所示，NIT、IMI-urea、UF的回收率随着 $C_{18}$ 用量的增加而减少，说明 $C_{18}$ 对NIT、IMI-urea、UF有吸附作用。与用量25 mg相比，用量50 mg时目标化合物各组分的回收率与100%更接近，基质效应(matrix effect, ME)更低，因此选择用量50 mg的 $C_{18}$ 作为净化分散剂。

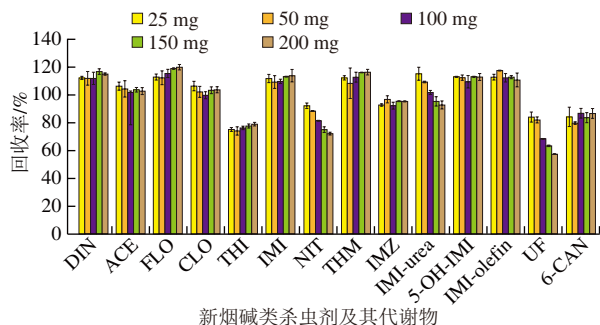


图5  $C_{18}$ 用量对新烟碱类杀虫剂及其代谢物的提取效果 ( $n=3$ )

Fig. 5 Effect of  $C_{18}$  dosage on the recoveries of neonicotinoid insecticides and their metabolites ( $n=3$ )

## 2.5 ME

实验采用以下公式评估畜禽肉中新烟碱类杀虫剂及其代谢物的ME:  $ME = \text{基质匹配标准曲线斜率} / \text{溶剂匹配标准曲线斜率}$ ,  $ME > 1$ 表示基质对新烟碱类杀虫剂及其代谢物的MS响应产生增强效应;  $ME = 1$ 表示新烟碱类杀虫剂及其代谢物没有ME;  $ME < 1$ 为基质对新烟碱类杀虫剂及其代谢物的MS响应产生抑制效应<sup>[36]</sup>。从图6可以看出, 5种畜禽肉中ACE、FLO、CLO、IMI-urea、5-OH-IMI、IMI-olefin、6-CNA的ME集中在0.8~1.2之间, 为弱ME。THI、NIT、IMZ在5种畜禽肉基质中表现为基质抑制效应; IMI、THM表现为基质增强效应。畜禽肉基质对新烟碱类杀虫剂及其代谢物存在ME, 但未见强ME ( $ME \leq 0.5$ 或 $ME \geq 1.5$ ), 说明 $C_{18}$ 对畜禽肉复杂基质中脂肪和蛋白质等杂质的去除率较高, 但是本方法仍需使用基质匹配标准曲线用于数据定量分析。

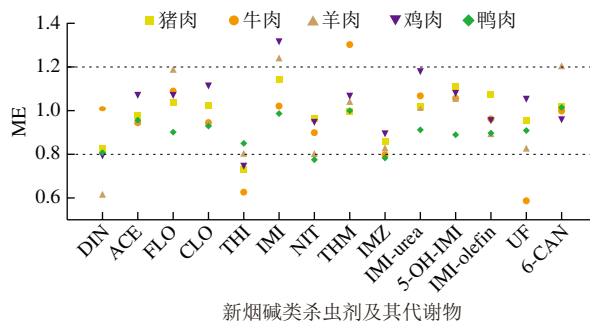


图6 畜禽肉中新烟碱类杀虫剂及其代谢物的ME

Fig. 6 ME of neonicotinoid insecticides and their metabolites in meat

## 2.6 方法学评价

### 2.6.1 线性范围、检出限和定量限

将基质匹配混合标准系列溶液, 设置进样量为1  $\mu\text{L}$ , 浓度从低到高进样并进行UPLC-MS/MS分析。以新烟碱类杀虫剂及其代谢物的定量离子对峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制线性回归方程, 结果表明, 新烟碱类杀虫剂及其代谢物在线性范围内关系良好, 相关系数 $r$ 均大于0.995, 能满足定量分析的要求。以待测化合物定性离子信噪比 $\geq 3$ 确定方法检出限, 以定性离子信噪比 $\geq 10$ 确定方法定量限<sup>[37]</sup>。方法对于DIN、ACE、FLO、CLO、THI、IMI、NIT、THM、IMZ、IMI-urea、5-OH-IMI、IMI-olefin线性范围为0.2~20  $\mu\text{g/L}$ , 检出限为1  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为2  $\mu\text{g/kg}$ ; UF、6-CNA的线性范围为2~200  $\mu\text{g/L}$ , 检出限为10  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为20  $\mu\text{g/kg}$ 。新烟碱类杀虫剂及其代谢物在畜禽肉中的线性方程如表2所示。

表 2 新烟碱类杀虫剂及其代谢物在畜禽肉中的线性方程

Table 2 Calibration equations for the quantitation of neonicotinoid insecticides and their metabolites in meat

新烟碱类杀虫剂及其代谢物	猪肉	牛肉	羊肉	鸡肉	鸭肉
DIN	$y=70\ 810x+51\ 764$	$y=69\ 101x+12\ 781$	$y=56\ 070x+11\ 084$	$y=47\ 769x+10\ 694$	$y=57\ 624x+13\ 168$
ACE	$y=325\ 598x+26\ 248$	$y=213\ 907x+12\ 498$	$y=254\ 390x+21\ 867$	$y=306\ 503x+23\ 353$	$y=231\ 645x+17\ 935$
FLO	$y=118\ 742x+2\ 425$	$y=52\ 077x+1\ 349$	$y=117\ 255x-488$	$y=70\ 449x+2\ 035$	$y=136\ 918x+5\ 434$
CLO	$y=54\ 177x+2\ 377$	$y=36\ 171x+2\ 116$	$y=45\ 976x+4\ 443$	$y=54\ 818x+6\ 146$	$y=44\ 804x+4\ 073$
THI	$y=341\ 771x+13\ 915$	$y=287\ 389x+13\ 847$	$y=319\ 463x+27\ 853$	$y=353\ 358x+58\ 746$	$y=282\ 437x+17\ 546$
IMI	$y=85\ 119x+4\ 797$	$y=34\ 592x+1\ 314$	$y=76\ 252x+6\ 809$	$y=67\ 281x+8\ 093$	$y=72\ 845x+5\ 380$
NIT	$y=173\ 691x+13\ 173$	$y=48\ 111x+7\ 545$	$y=198\ 474x-6\ 825$	$y=73\ 319x+22\ 436$	$y=171\ 863x-1\ 814$
THM	$y=103\ 586x+20\ 867$	$y=43\ 517x+3\ 877$	$y=111\ 754x+27\ 718$	$y=62\ 628x+10\ 673$	$y=97\ 690x+18\ 402$
IMZ	$y=79\ 855x+3\ 724$	$y=55\ 037x+2\ 660$	$y=56\ 267x+3\ 900$	$y=75\ 679x+9\ 968$	$y=60\ 987x+5\ 523$
IMI-urea	$y=121\ 503x+6\ 009$	$y=67\ 678x+5\ 614$	$y=101\ 639x+10\ 114$	$y=109\ 722x+15\ 865$	$y=104\ 200x+13\ 061$
5-OH-IMI	$y=357\ 056x+4\ 328$	$y=329\ 911x+3\ 542$	$y=276\ 370x+13\ 597$	$y=270\ 079x-78$	$y=239\ 894x+12\ 563$
IMI-olefin	$y=189\ 064x+16\ 824$	$y=204\ 117x+20\ 597$	$y=163\ 265x+13\ 871$	$y=155\ 774x+13\ 055$	$y=170\ 017x+15\ 908$
UF	$y=147\ 091x+237\ 542$	$y=146\ 891x-475\ 621$	$y=135\ 621x-229\ 011$	$y=133\ 972x+208\ 613$	$y=139\ 002x+134\ 492$
6-CNA	$y=66\ 641x+29\ 956$	$y=64\ 313x+14\ 281$	$y=66\ 018x+86\ 412$	$y=69\ 501x+20\ 521$	$y=64\ 141x+41\ 189$

2.6.2 方法回收率、精密度

分别称取猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉样品，按照低（样品5 μg/kg，UF、6-CNA为50 μg/kg）、中

（样品10 μg/kg，UF、6-CNA为100 μg/kg）、高（样品50 μg/kg，UF、6-CNA为500 μg/kg）3个添加水平进行加标实验（ $n=6$ ），计算各水平的回收率和相对标准偏差

表 3 新烟碱类杀虫剂及其代谢物在畜禽肉中的回收率和RSD

Table 3 Spiked recovery rates and RSDs of neonicotinoid insecticides and their metabolites in meat

新烟碱类杀虫剂及其代谢物	添加水平/ (μg/kg)	猪肉		牛肉		羊肉		鸡肉		鸭肉	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
DIN	5	73.7	7.77	78.6	11.00	107.0	5.39	72.2	7.02	93.3	6.15
	10	92.7	5.60	92.9	10.85	105.3	4.20	83.6	10.43	97.5	5.94
	50	100.1	3.22	100.2	7.89	106.1	6.97	95.1	3.92	97.3	4.98
ACE	5	87.1	7.56	79.4	9.05	104.9	4.42	88.4	6.56	99.8	8.84
	10	90.3	6.32	80.8	7.69	115.7	3.40	80.2	1.82	93.1	9.43
	50	89.5	10.44	82.3	1.98	103.2	8.17	85.1	3.54	94.3	2.47
FLO	5	88.2	8.49	84.4	9.54	101.0	4.41	107.7	8.06	100.9	8.92
	10	98.7	6.79	94.0	7.68	109.1	2.05	100.4	2.67	93.3	7.39
	50	110.3	5.09	108.4	2.95	109.9	10.23	115.7	2.03	94.9	3.09
CLO	5	91.1	9.26	87.7	3.57	108.1	7.65	87.9	6.73	99.6	6.21
	10	90.6	10.18	81.0	9.74	110.4	5.55	80.8	5.73	89.5	6.80
	50	97.6	4.71	84.2	2.35	102.0	11.27	91.0	5.59	92.3	6.48
THI	5	78.1	11.24	77.3	5.11	111.5	3.63	76.0	6.67	95.2	7.35
	10	80.4	10.25	76.3	9.31	104.8	3.76	72.9	3.47	92.3	7.86
	50	88.1	6.59	83.0	1.31	95.2	13.53	85.4	2.59	87.4	2.40
IMI	5	97.3	11.14	80.3	7.42	104.0	7.94	84.7	9.21	101.7	4.74
	10	88.0	11.00	85.1	9.39	108.9	5.27	79.6	3.24	93.1	6.69
	50	97.1	12.32	89.1	2.93	100.1	12.76	87.2	5.35	94.2	2.13
NIT	5	66.1	3.42	75.1	14.81	111.5	5.96	63.9	5.13	94.2	5.99
	10	77.2	6.47	67.9	5.43	94.5	3.90	61.0	1.40	86.9	6.86
	50	78.3	2.49	66.8	4.72	84.6	8.65	78.1	2.18	81.7	4.12
THM	5	72.5	5.36	92.9	13.03	100.5	3.80	83.2	14.42	106.5	2.54
	10	87.3	6.47	97.7	8.15	113.4	4.21	82.9	4.26	106.6	10.23
	50	99.7	3.60	95.7	4.61	114.8	1.91	87.2	4.39	106.4	1.63
IMZ	5	84.9	5.05	76.0	10.11	108.8	2.17	82.0	13.00	102.6	13.71
	10	90.6	11.00	80.6	10.94	114.1	2.59	75.6	7.66	93.2	5.21
	50	101.1	8.06	88.9	2.74	105.4	4.18	95.7	5.56	93.0	3.19
IMI-urea	5	79.3	12.22	79.6	11.80	110.9	6.58	63.4	6.71	86.8	6.14
	10	83.1	11.67	82.8	9.97	116.0	3.47	65.7	7.72	85.0	9.68
	50	92.8	7.99	93.4	4.70	106.5	3.16	77.6	2.51	88.8	3.29
5-OH-IMI	5	85.7	9.38	90.4	6.38	114.3	3.05	103.4	5.65	104.6	4.82
	10	94.1	6.67	89.6	4.44	115.7	2.27	94.4	4.15	105.4	7.73
	50	100.7	4.65	100.8	4.03	107.5	0.70	103.1	2.97	97.5	1.90
IMI-olefin	5	91.3	2.26	77.5	4.21	114.0	1.85	97.9	5.55	98.8	6.04
	10	90.8	5.08	83.9	6.87	116.7	0.82	90.2	3.34	96.3	8.32
	50	106.0	6.03	98.2	2.63	114.0	2.67	104.5	1.91	91.3	4.66
UF	50	72.4	6.90	93.5	4.10	83.9	4.80	77.3	5.19	85.1	2.37
	100	93.7	2.47	102.7	3.59	89.7	5.87	100.0	4.02	94.8	4.62
	500	94.4	1.59	101.4	4.84	87.1	1.77	104.8	7.53	97.1	2.16
6-CNA	50	64.4	2.18	82.6	2.33	65.2	3.47	68.1	6.44	65.0	7.56
	100	84.7	2.29	82.6	1.46	81.1	1.46	83.1	5.27	81.1	1.71
	500	82.0	1.50	81.5	3.83	81.8	1.38	84.8	3.87	80.9	0.66

(relative standard deviation, RSD)，结果见表3，新烟碱类杀虫剂及其代谢物在5种畜禽肉基质中的平均回收率为61.0%~116.7%，RSD为0.66%~14.81%。

2.7 实际样品分析

依据优化方法对市售16批猪肉、14批牛肉、3批羊肉、19批鸡肉、3批鸭肉中新烟碱类杀虫剂及其代谢物的残留量进行测定，结果发现牛肉、羊肉、鸭肉中的新烟碱类杀虫剂及其代谢物均为未检出。在前腿瘦肉（猪肉）中发现DIN有检出（表4、图7），低于GB 2763—2021<sup>[13]</sup>所规定的DIN在猪肉中的最大残留限量（0.1 mg/kg）。在前腿瘦肉（猪肉）中检出ACE，鲜迪竹园鸡中检出IMI的代谢物IMI-urea，但含量均较低。图8为加标猪肉样品的总离子流色谱图。

表4 市售样品中检出新烟碱类杀虫剂及其代谢物结果  
Table 4 Results of detection of neonicotinoid insecticides and their metabolites in commercial meat samples

样品	检出新烟碱类杀虫剂及其代谢物	检出量/(mg/kg)	限量/(mg/kg)
前腿瘦肉（猪肉）	DIN	0.089 0	0.10
前腿瘦肉（猪肉）	ACE	0.002 2	0.50
鲜迪竹园鸡	IMI-urea	0.003 8	0.02

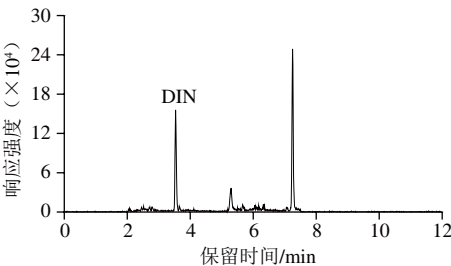
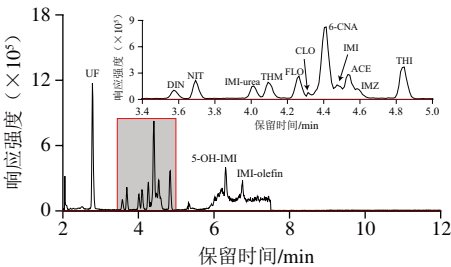


图7 猪肉样品定量离子MRM色谱图

Fig. 7 Quantitative ion MRM chromatogram of pork



DIN、ACE、FLO、CLO、THI、IMI、NIT、THM、IMZ、IMI-urea、5-OH-IMI、IMI-olefin含量为50 μg/kg；6-CNA、UF含量为500 μg/kg。

图8 加标猪肉样品的总离子流色谱图

Fig. 8 Total ion current chromatogram of pork spiked with neonicotinoid insecticides and their metabolites

3 结论

本实验以QuEChERS为前处理方法，采用UPLC-MS/MS法，建立同时测定畜禽肉中9种新烟碱类杀虫剂及

5种代谢物的分析方法，该方法采用C<sub>18</sub>粉末净化，可有效减少检测过程中畜禽肉中脂肪等杂质对目标化合物的干扰。前处理简单快速、灵敏度高、精密度好，能实现畜禽肉中新烟碱类杀虫剂及其代谢物的同时测定，为畜禽肉中的农残快速检测提供技术支持。

参考文献：

[1] WANG Y D, FU Y W, WANG Y Y, et al. A comprehensive review on the pretreatment and detection methods of neonicotinoid insecticides in food and environmental samples[J]. Food Chemistry: X, 2022, 15: 100375. DOI:10.1016/j.fochx.2022.100375.

[2] LIU S Y, ZHENG Z T, WEI F L, et al. Simultaneous determination of seven neonicotinoid pesticide residues in food by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(6): 3271-3278. DOI:10.1021/jf904045j.

[3] HOU J B, XIE W, HONG D, et al. Simultaneous determination of ten neonicotinoid insecticides and two metabolites in honey and royal-jelly by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2019, 270: 204-213. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.07.068.

[4] GOULSON D. Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides[J]. Journal of Applied Ecology, 2013, 50(4): 977-987. DOI:10.1111/1365-2664.12111.

[5] WU C C, DONG F S, MEI X D, et al. Isotope-labeled internal standards and grouping scheme for determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in fruits, vegetables and cereals: a compensation of matrix effects[J]. Food Chemistry, 2020, 311: 125871. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125871.

[6] GBYLIK-SIKORSKA M, SNEGOCKI T, POSYNIK A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 990: 132-140. DOI:10.1016/j.jchromb.2015.03.016.

[7] YI X H, ZHANG C, LIU H B, et al. Occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface water and sediment of the Guangzhou section of the Pearl River, South China[J]. Environmental Pollution, 2019, 251: 892-900. DOI:10.1016/j.envpol.2019.05.062.

[8] WANG R M, WANG Z H, YANG H, et al. Highly sensitive and specific detection of neonicotinoid insecticide imidacloprid in environmental and food samples by a polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(6): 1253-1260. DOI:10.1002/jsfa.4691.

[9] HOU J, WANG L X, WANG J Z, et al. A comprehensive evaluation of influencing factors of neonicotinoid insecticides (NEOs) in farmland soils across China: first focus on film mulching[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 470: 134284. DOI:10.1016/j.jhazmat.2024.134284.

[10] BONMATIN J M, MITCHELL E A D, GLAUSER G, et al. Residues of neonicotinoids in soil, water and people's hair: a case study from three agricultural regions of the Philippines[J]. Science of the Total Environment, 2021, 757: 143822. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.143822.

[11] 张婧文, 王禹衡, 刘俊宁, 等. 响应曲面优化QuEChERS法结合液相色谱-高分辨质谱检测尿液中的新烟碱类杀虫剂及其代谢物[J]. 分析化学, 2023, 51(11): 1802-1816. DOI:10.19756/j.issn.0253-3820.231057.



- [12] 马跃, 毛亚萍, 刘芙, 等. 新烟碱类杀虫剂对人类及哺乳动物的生殖毒性作用[J]. 沈阳医学院学报, 2022, 24(2): 191-195. DOI:10.16753/j.cnki.1008-2344.2022.02.020.
- [13] 国家卫生健康委员会, 农业农村部, 国家市场监督管理总局. 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- [14] GIROUD B, BRUCKNER S, STRAUB L, et al. Trace-level determination of two neonicotinoid insecticide residues in honey bee royal jelly using ultra-sound assisted salting-out liquid liquid extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Microchemical Journal, 2019, 151: 104249. DOI:10.1016/j.microc.2019.104249.
- [15] 平华, 赵天宇, 马智宏, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定土壤中新烟碱类农药及其代谢物的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2023, 59(11): 1276-1283. DOI:10.11973/lhyy-hx202311006.
- [16] ZHANG W H, ZHOU C J, ZHOU F L, et al. Determination of twelve neonicotinoid pesticides in chili using an improved QuEChERS method with UPLC-Q-TOF/MS[J]. Food Chemistry, 2024, 452: 139463. DOI:10.1016/j.foodchem.2024.139463.
- [17] LI D H, ZHANG H, CHANG M M, et al. Neonicotinoid insecticide and their metabolite residues in fruit juices: implications for dietary intake in China[J]. Chemosphere, 2020, 261: 127682. DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.127682.
- [18] 王玉丹. 中药中新烟碱类杀虫剂高通量筛查、快速检测和脱除技术的研究和应用[D]. 北京: 北京协和医学院, 2023. DOI:10.27648/d.cnki.gzxhu.2023.000500.
- [19] 邢宇. 基于新型分散固相萃取技术测定动物源食品中的农药多残留[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [20] WATANABE E. Review of sample preparation methods for chromatographic analysis of neonicotinoids in agricultural and environmental matrices: from classical to state-of-the-art methods[J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1643: 462042. DOI:10.1016/j.chroma.2021.462042.
- [21] 高萌, 贺凯, 张家萌, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS法同时测定枸杞子中15种新烟碱类农药及代谢产物残留量[J/OL]. 分析试验室: 1-11[2024-04-19]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2017.TF.20240418.1724.004.html>.
- [22] ADELANTADO C, RÍOS Á, ZOUGAGH M. Magnetic nanocellulose hybrid nanoparticles and ionic liquid for extraction of neonicotinoid insecticides from milk samples prior to determination by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Food Additives & Contaminants. Part A, 2018, 35(9): 1755-1766. DOI:10.1080/19440049.2018.1492156.
- [23] ZHAO F F, LIU J K, LUO J H. Development of a high-quality ELISA method for dinotefuran based on a novel and newly-designed antigen[J]. Molecules, 2019, 24(13): 2426. DOI:10.3390/molecules24132426.
- [24] GUO Y R, ZOU R B, SI F F, et al. A sensitive immunoassay based on fluorescence resonance energy transfer from up-converting nanoparticles and graphene oxide for one-step detection of imidacloprid[J]. Food Chemistry, 2021, 335: 127609. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127609.
- [25] ZHANG Y P, ZHANG Q P, LI S H, et al. Simultaneous determination of neonicotinoids and fipronils in tea using a modified QuEChERS method and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2020, 329: 127159. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127159.
- [26] DING L H, GUO J W, CHEN S, et al. Electrochemical sensing mechanisms of neonicotinoid pesticides and recent progress in utilizing functional materials for electrochemical detection platforms[J]. Talanta, 2024, 273: 125937. DOI:10.1016/j.talanta.2024.125937.
- [27] 侯建波, 谢文, 钱艳, 等. 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中新型烟碱类杀虫剂及其代谢物的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2019, 55(3): 270-277. DOI:10.11973/lhyy-hx201903005.
- [28] 梁秀美, 王祥云, 薛晓锋, 等. 液相色谱-串联质谱法测定蜂产品中吡虫啉及其3种代谢物[J]. 分析化学, 2017, 45(4): 553-559. DOI:10.11895/j.issn.0253-3820.160833.
- [29] 郭礼强, 刘永强, 王乐, 等. HPLC-MS/MS法测定婴幼儿果蔬米粉中17种新烟碱类杀虫剂及代谢物[J]. 分析测试学报, 2022, 41(12): 1773-1778. DOI:10.19969/j.fxcxb.22060103.
- [30] 蒋康丽, 扈斌, 吴兴强, 等. 自动QuEChERS结合气相色谱-串联质谱法测定花生中297种农药残留[J]. 分析测试学报, 2021, 40(9): 1257-1270. DOI:10.19969/j.fxcxb.21010406.
- [31] 国家卫生健康委员会, 农业农村部, 国家市场监督管理总局. 植物源性食品中331种农药及其代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱联用法: GB 23200.121—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- [32] 李悦欣, 杜洪振, 刘骞, 等. 低脂畜禽及脂肪替代物开发途径研究进展[J]. 肉类研究, 2023, 37(1): 39-45. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20220817-096.
- [33] GAWEŁ M, KILJANEK T, NIEWIADOWSKA A, et al. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2019, 282: 36-47. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.003.
- [34] MUSARURWA H, CHIMUKA L, TAVENGWA N T. Z-sep<sup>+</sup> based QuEChERS technique for the pre-concentration of malathion pesticide in fruits followed by analysis using UV-Vis spectroscopy[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2020, 37(12): 2093-2108. DOI:10.1080/19440049.2020.1794054.
- [35] PEÑA-HERRERA J M, MONTEMURRO N, BARCELÓ D, et al. Analysis of pharmaceuticals in fish using ultrasound extraction and dispersive spe clean-up on que Z-Sep/C<sub>18</sub> followed by LC-QTOF-MS detection[J]. MethodsX, 2020, 7: 101010. DOI:10.1016/j.mex.2020.101010.
- [36] 余晓琴, 闵宇航, 刘斯琪, 等. QuEChERS EMR-Lipid净化结合超高效液相色谱串联质谱法快速测定食品中非法添加工业染料[J]. 食品科学, 2024, 45(16): 268-283. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230819-138.
- [37] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 化学分析方法验证通则: GB 5009.295—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.