

蔬菜及水果中 77 种有机磷和氨基甲酸酯 农药残留量检测技术研究

王明泰, 牟 峻, 吴 剑, 李爱军, 卢春梅, 周 晓*
(吉林出入境检验检疫局技术中心, 吉林 长春 130062)

摘 要: 本方法采用丙酮水溶液(8+2)提取样品, 提取液经二氯甲烷液-液分配、凝胶色谱柱(GPC)净化, 固相萃取柱(活性炭)再净化, 浓缩定容后, 用气相色谱-质谱仪(GC-MS)测定, 外标法定量。采用选择离子检测进行阳性确证。选择菠菜、柑橘等 10 种蔬菜水果为实验样品、敌敌畏等 77 种农药添加水平在 0.05~2.00mg/kg 时, 该方法回收率为 53.6%~124.8%; 精密度为 4.01%~24.90%; 方法测定低限为 0.01~0.200mg/kg。

关键词: 农药残留量; 蔬菜及水果; 气相色谱-质谱

Determination Study of 77 Organophosphorous and Carbamate Pesticide Residue in Fruits and Vegetables

WANG Ming-tai, MU Jun, WU Jian, LI Ai-jun, LU Chun-mei, ZHOU Xiao*
(Technology Center, Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China)

Abstract: One testing technology of determining 77 organophosphorous and carbamate pesticides residues in fruits and vegetables is developed. In this study, the samples are extracted with acetone and water (8+2). The extract is distributed with dichloromethane, and then is cleaned by passing through one gel permeation chromatography (GPC) column and one active carbon solid phase extraction (SPE) column in sequence. The eluate is condensed to a definite volume, and then determined and confirmed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with external standard method. Ten vegetables and fruits including spinach and orange etc. are selected as samples. 0.05~2.00mg/kg of the 77 pesticides such as dichlorvos etc. are fortified into blank samples. The corresponding recoveries are 53.6%~124.8% and the precisions are 4.01%~24.90% and the limit of determination (LOD) are 0.01~0.100mg/kg.

Key words pesticide residue; fruits and vegetables; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: TS207.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0247-07

关于水果和蔬菜中多种有机磷和氨基甲酸酯类农药残留分析, 国内目前普遍采用气相色谱火焰光度检测器法或氮磷检测器法(GC-FPD 或 GC-NPD)测定, 该方法灵敏度高、分离效果好、定量准确, 经过多年实践运用, 已经证明是一种经典适用的分析方法。但在气相色谱分析中, 干扰物与待测物在同一根色谱柱具有相同保留时间的现象经常发生, 特别是对污染物的不明样品更容易造成假阳性。而在样品前处理方面, 目前主要采用传统的溶剂萃取、液液分配、柱层析净化的前处理方法, 使得现有的检测方法自动化程度和提取净化的效率较低、检测速度较慢、劳动强度较大且环境污染严重。同时, 由于农药品种越来越多和最大残留限量的日趋严格, 检测方法的检测低限已不能完全满足国内外趋严格

的要求, 如部分方法标准的检出限竟高出最新 MRL 1 个数量级以上。目前国际上对水果和蔬菜多种有机磷农药和氨基甲酸酯类农药残留分析, 为提高检测速度和减少检测成本以及降低检测低限, 多残留分析、高效样品净化、准确阳性确证技术已成为农药残留分析技术的主流, 其中前处理技术主要有基体分散固相萃取(MSPD)、加速溶剂萃取(ASE)、超临界萃取(SFE), 凝胶色谱(GPC)净化、固相萃取(SPE)净化; 测试技术主要采用气相色谱-质谱法(GC-MS)、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)等。

本研究依据各主要发达国家政府和世界权威组织及我国对水果蔬菜中有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的最高残留限量(MRL)要求, 针对我国主要大宗进出口及敏

收稿日期: 2006-02-09

*通讯作者

基金项目: 科技部国家重大专项-食品安全关键技术子课题(2001BA804A17-03-01)

作者简介: 王明泰(1960-), 男, 高级工程师, 研究方向为食品中农、兽药残留分析及有毒、有害成分分析。

表1 77种农药选择监测离子时间设定参数表
Table 1 Retention time of the 77 pesticides according to their selected mentoring ions

序号	时间(min)	选择离子(amu)	驻留时间(ms)
1	9.60	94、109、151、164、136	100
2	13.50	144、121、263、156、121、110、142、301、237、127、207、246	15
3	16.88	229、164、270、231、236、246、304、274、292	70
4	19.00	279、264、263、286、265、285、275、169、168、277、290、173、267、278、295、314、 291、289、269、331	10
5	22.65	333、255、196、267、213、298、329、274、145、329	70
6	25.00	377、303、309、339、314	90
7	27.00	308、257、324、157、218、310	80
8	31.50	160、157	300
9	34.00	160、182、382、377、160、221、360、362	70

注: amu - atomic mass unit, 原子质量单位。

感的10类水果蔬菜产品(西兰花、茼蒿、大葱、芹菜、番茄、黄瓜、菠菜、柑橘、苹果、草莓),利用目前国际上最为先进的和普遍采用的先进农药残留检测技术和样品前处理技术,特别是采用凝胶净化(GPC)和固相萃取(SPE)样品净化,研究建立了水果蔬菜中多种有机磷农药和氨基甲酸酯类农药残留量的气相色谱-质谱(GC-MS)检测方法和阳性确证方法。本方法中涉及农药的种类共77种,其中有机磷类农药67种、氨基甲酸酯类农药10种,基本上覆盖了国内外对水果蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯农药残留量种类的要求。本研究经方法提取效率试验、净化方法选择试验、测定方式选择试验、气相色谱-质谱测定和确证条件试验、回收率试验、精密度试验、方法协同验证试验。实验结果表明:本法科学合理、技术先进,测定准确度和精密度高,阳性判别结果准确可靠,检测限和应用范围完全满足目前国内外检测限量的要求。方法的灵敏度、准确度、精密度、专属性及确证的可靠性等方面符合国际通用的质量控制要求。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Agilent5973I气相色谱-质谱仪(美国安捷伦公司),配有质量选择检测器(MSD),凝胶色谱仪(GPC):配有单元泵和馏分收集器;旋转蒸发器;丙酮、二氯甲烷、环己烷、乙酸乙酯、正己烷均为残留级;无水硫酸钠:650℃灼烧4h,贮于密封容器中备用;标准储备溶液:分别准确称取适量的每种农药标准品(纯度≥98.0),用丙酮分别配制成浓度为100~1000μg/ml的标准储备溶液;混合标准工作溶液:根据需要再用丙酮逐级稀释成适用浓度的系列混合标准工作溶液;活性炭固相萃取柱:0.25g,ENVI-Carb,或相当者。

1.2 气相色谱-质谱条件

色谱柱:DB-5 MS 30m×0.25mm×0.1μm,或相

当者;色谱柱温度:50℃(1min)30℃/min180℃(1min)15℃/min280℃(20min);进样口温度:270℃;色谱-质谱接口温度:280℃;载气:氦气,纯度≥99.999%,流速1.2ml/min;电离方式:EI;

电离能量:70eV;测定方式:选择离子监测方式;进样方式:无分流进样,1.5min后开阀;进样量:1μl。选择监测离子(m/z):每种农药分别选择1个定量离子,2~3定性(阳性确证)离子;选择监测离子时间设定参数见表1,每种农药的定量离子和定性离子见表2。

1.3 分析步骤

1.3.1 提取

准确称取25g(精确至0.1g)试样置于250ml具塞锥形瓶中,加入20ml水,混摇后放置1h。然后加入100ml丙酮,高速均质提取3min。将提取液抽滤于250ml浓缩瓶中。残渣再用50ml丙酮重复提取一次,合并滤液,于40℃水浴中旋转浓缩至约20ml。将浓缩提取液转移至250ml分液漏斗中。

在上述分液漏斗中,加入100ml氯化钠水溶液和100ml二氯甲烷,振摇3min,静置分层,收集二氯甲烷相。水相再用2×50ml二氯甲烷重复提取两次,合并二氯甲烷相。经无水硫酸钠柱脱水,收集于250ml浓缩瓶中,于40℃水浴中旋转浓缩至近干,加入5ml二氯甲烷-环己烷(1+1)以溶解残渣,并用0.45μm滤膜过滤,待净化。

1.3.2 凝胶色谱(GPC)净化

1.3.2.1 凝胶色谱条件

净化柱:700mm×25mm,BioBeadsS-X3,或相当者;流动相:环己烷-乙酸乙酯(1+1)。

流速:5.0ml/min;样品定量环:5.0ml;预淋洗体积:50ml;洗脱体积:200ml;收集体积:105~185ml。

1.3.2.2 凝胶色谱净化步骤

将5ml待净化液按凝胶色谱条件进行净化,合并馏

分收集器中的收集液于250ml浓缩瓶中。

1.3.3 固相萃取(SPE)净化

使用前用5ml正己烷预淋洗活性炭固相萃取柱,将2ml溶解液倾入活性炭固相萃取柱中,用30ml乙酸乙酯-正己烷(2+3)进行洗脱。收集全部洗脱液于50ml浓缩瓶中,于40℃水浴中旋转浓缩至干。用丙酮溶解并定容至2.0ml,供气相色谱-质谱测定。

1.3.4 定量测定

根据样液中被测农药预估含量,选定浓度相近的标准工作溶液。标准工作溶液和待测样液中农药的响应值均应在仪器检测的线性范围内。对混合标准溶液与样液等体积分组时段参插进样测定。外标法定量。

1.3.5 定性测定

对混合标准溶液及样液按上述规定的条件进行测定时,如果样液与混合标准溶液的选择离子图中,在相同保留时间有峰出现,则根据定性选择离子的种类及其

表2 77种农药的保留时间、定量和定性选择离子、线性范围、回收率范围、精密度范围及测定下限
Table 2 Retention time, qualification ions and quantification ion, linear range, recoveries, precisions, and LODs

序号	农药名称	出峰 顺序	保留时间 (min)	特征碎片离子(amu)			线性范围 (μg/g)	线性 相关系数	回收率范围 (%)	精密度范围 (%)	测定下限 (μg/g)
				定量	定性	丰度比					
1	甲胺磷	1	10.29	94	111、126、141	100:10:10:72	0.365~18.75	0.9932	57.0~89.5	6.43~20.03	0.10
2	敌敌畏	2	10.62	109	185、220、187	100:45:9:15	0.125~6.25	0.9967	79.0~112.0	4.47~19.13	0.01
3	恶虫威	3	10.96	151	166、126、108	100:77:64:8	0.365~18.75	0.9991	56.8~87.7	4.77~17.51	0.05
4	克百威	4	11.33	164	149、131、221	100:77:27:5	0.365~18.75	0.9955	58.0~89.7	7.07~16.92	0.10
5	乙酰甲胺磷	5	13.18	136	125、181、183	100:37:2:15	0.5~25.0	0.9977	70.6~117.4	5.55~21.52	0.05
6	甲萘威	6	14.07	144	145、201、115	100:12:5:48	0.365~18.75	0.9943	56.7~88.7	6.95~19.71	0.10
7	异丙威	7	14.45	121	136、137、122	100:26:5:9	0.125~6.25	0.9967	69.0~110.4	7.70~20.22	0.02
8	特普	8	14.60	263	235、246、219	100:69:10:16	0.5~25.0	0.9989	70.8~117.2	5.98~17.56	0.10
9	氧乐果	9	15.09	156	110、126、141	100:84:13:11	0.5~25.0	0.9990	71.2~115.2	7.22~18.48	0.10
10	仲丁威	10	15.29	121	150、107、122	100:5:8:9	0.125~6.25	0.9978	70.2~111.6	5.29~16.91	0.02
11	残杀威	11	15.33	110	152、111	100:17:7	0.125~6.25	0.9994	79.9~111.6	6.21~18.85	0.05
12	甲基内吸磷	12	15.43	142	109、143、230	76:100:39:10	0.365~18.75	0.9983	72.1~127.8	5.67~20.43	0.05
13	二溴磷	13	15.94	301	145、185、220	11:75:100:19	0.365~18.75	0.9991	72.0~128.2	4.78~24.50	0.05
14	百治磷	14	16.13	237	193、192、127	69:100:46:77	0.125~6.25	0.9972	70.2~111.7	6.77~18.33	0.05
15	久效磷	15	16.31	127	192、109、223	100:2:37:47	0.365~18.75	0.9954	60.0~85.5	5.50~14.41	0.10
16	甲拌磷	16	16.41	260	121、131、153	65:100:8:22	0.125~6.25	0.9987	71.0~111.9	4.22~18.26	0.05
17	甲基乙拌磷	17	16.75	246	158、185、217	100:64:32:16	0.5~25.0	0.9989	58.0~78.0	4.33~12.98	0.20
18	乐果	18	17.00	229	143、157、171	100:94:36:19	0.125~6.25	0.9939	70.0~110.5	4.31~17.35	0.05
19	丙硫克百威	19	17.19	164	149、131、221	100:56:15:7	0.125~6.25	0.9988	70.3~110.8	4.06~17.46	0.02
20	敌杀磷	20	17.50	270	197、169、153	100:38:18:36	0.125~6.25	0.9970	69.0~110.0	7.13~17.89	0.05
21	特丁磷	21	17.76	231	153、288、186	100:25:11:14	0.125~6.25	0.9989	69.0~111.5	5.74~19.14	0.05
22	胺丙畏	22	17.80	236	194、138、222	31:49:100:24	0.125~6.25	0.9991	70.4~108.4	4.73~19.14	0.05
23	地虫硫磷	23	17.84	246	137、174、202	100:83:11:7	0.125~6.25	0.9954	70.0~111.3	4.09~16.19	0.05
24	二嗪磷	24	18.20	304	179、137、276	52:100:96:25	0.125~6.25	0.9967	71.0~111.1	4.01~12.59	0.02
25	乙拌磷	25	18.30	274	186、153、142	75:90:95:100	0.125~6.25	0.9986	70.0~111.9	6.18~17.77	0.02
26	乙嘧硫磷	26	18.70	292	277、263、229	100:33:11:8	0.125~6.25	0.9991	70.0~111.8	9.52~21.88	0.05
27	除线磷	27	19.47	279	223、251、281	100:80:39:38	0.125~6.25	0.9990	73.1~105.2	5.66~16.04	0.02
28	磷胺II	28	19.51	264	227、193、265	100:16:18:12	0.365~18.75	0.9991	70.1~112.4	6.41~18.72	0.10
29	甲基对硫磷	29	19.79	263	200、233、246	100:10:8:9	0.365~18.75	0.9988	75.0~107.2	6.00~17.52	0.10
30	甲基毒死蜱	30	19.91	286	288、197	100:73:6	0.125~6.25	0.9979	72.5~111.9	6.40~19.61	0.01
31	甲基立枯磷	31	19.96	265	267、250、266	100:37:11:11	0.125~6.25	0.9976	71.5~107.7	4.67~19.29	0.02
32	皮蝇磷	32	20.35	285	287、289	100:73:16	0.125~6.25	0.9956	76.4~115.6	4.09~17.18	0.01
33	乙基对氧磷	33	20.33	275	220、247、232	100:68:75:56	0.365~18.75	0.9981	74.6~118.3	4.83~22.42	0.05
34	虱吸磷	34	20.53	169	109、125、142	100:54:30:10	0.365~18.75	0.9992	72.3~108.8	6.01~19.08	0.05
35	灭虫威	35	20.87	168	153、109、225	100:63:18:12	0.365~18.75	0.9974	75.2~122.1	6.92~24.47	0.20
36	杀螟硫磷	36	20.89	277	260、247、214	100:60:7:8	0.125~6.25	0.9992	80.0~111.1	4.82~18.80	0.05
37	甲基嘧啶磷	37	21.03	290	276、305、262	100:80:75:25	0.125~6.25	0.9978	71.2~105.4	4.32~18.06	0.02
38	马拉硫磷	38	21.40	173	158、143、256	100:41:20:9	0.125~6.25	0.9980	76.3~115.5	4.34~18.84	0.05
39	乙霉威	39	21.65	267	225、196、168	100:91:63:66	0.125~6.25	0.9978	72.5~111.4	4.34~17.29	0.05
40	倍硫磷	40	21.68	278	169、153、263	100:15:9:6	0.125~6.25	0.9937	74.6~106.3	5.73~19.00	0.02
41	甲基毒虫畏	41	21.71	295	297、204、170	100:65:9:7	0.125~6.25	0.9990	75.6~113.6	5.22~17.72	0.05
42	毒死蜱	42	21.79	314	258、286、311	100:92:64:2	0.125~6.25	0.9990	77.2~108.3	5.34~17.01	0.01
43	对硫磷	43	21.82	291	186、235、218	100:14:14:8	0.125~6.25	0.9978	71.8~118.2	4.56~21.11	0.02

(续表2)

序号	农药名称	出峰 顺序	保留时间 (min)	特征碎片离子(amu)			线性范围 (μg/g)	线性 相关系数	回收率范围 (%)	精密密度范围 (%)	测定下限 (μg/g)
				定量	定性	丰度比					
44	水胺硫磷	44	22.10	289	230、136	100:63:62	0.625~31.25	0.9976	67.9~101.6	5.38~16.97	0.20
45	毒壤磷	45	22.28	269	196、245	49:100:50:82	0.125~6.25	0.9990	74.1~110.6	4.19~18.35	0.05
46	甲基溴硫磷	46	22.47	331	329、213、316	100:73:6:5	0.125~6.25	0.9992	83.5~114.6	4.75~17.06	0.02
47	乙基噻啉磷	47	22.86	333	318、304、290	100:99:73:26	0.125~6.25	0.9976	73.4~105.8	6.30~22.52	0.02
48	棉胺磷	48	23.30	255	227、196、210	100:26:7	0.125~6.25	0.9977	77.5~104.6	7.94~18.38	0.05
49	地安磷	49	23.45	196	227、269、168	100:57:18:58	0.125~6.25	0.9988	78.6~121.2	6.88~16.91	0.10
50	毒虫畏	50	23.62	267	323、295、269	100:68:25:65	0.125~6.25	0.9978	72.5~108.8	6.62~19.70	0.02
51	丙胺磷	51	23.65	213	255、185、245	100:42:42:16	0.125~6.25	0.9954	69.9~118.3	8.21~19.40	0.02
52	啶硫磷	52	23.71	298	146、157、323	22:100:64	0.125~6.25	0.9964	72.5~110.0	7.13~15.63	0.01
53	灭蚜磷	53	23.72	329	296、226、206	100:53:44:38	0.125~6.25	0.9980	71.2~107.7	4.20~16.81	0.05
54	稻丰散	54	23.74	274	246、320、275	100:25:6:14	0.125~6.25	0.9992	71.9~115.8	5.77~16.56	0.05
55	杀扑磷	55	24.26	145	157、302、146	100:2:4:6	0.365~18.75	0.9990	72.3~112.5	11.72~19.70	0.05
56	杀虫畏	56	24.85	329	331、333、240	100:98:32:9	0.125~6.25	0.9991	72.6~118.3	6.04~16.26	0.05
57	碘硫磷	57	25.49	377	379、250、362	100:28:44	0.365~18.75	0.9978	78.6~121.7	7.43~20.29	0.20
58	灭线磷	58	25.45	303	288、260、217	100:38:5:4	0.125~6.25	0.9987	71.6~116.6	7.11~18.96	0.01
59	丙硫磷	59	25.69	309	267、239、281	100:90:30:11	0.125~6.25	0.9976	78.8~112.5	4.06~19.23	0.01
60	丙溴磷	60	25.84	339	374、297、337	100:51:40	0.125~6.25	0.9989	80.1~119.2	8.42~16.55	0.05
61	脱叶磷	61	26.06	314	258、226、202	17:43:45:100	0.365~18.75	0.9993	71.2~107.3	4.01~24.47	0.05
62	丰索磷	62	27.82	308	292、293、265	8:100:35:5	0.365~18.75	0.9990	70.1~111.3	7.77~24.90	0.05
63	三唑磷	63	29.1	257	285、313	100:80:42	0.365~18.75	0.9983	70.4~108.4	5.31~20.66	0.10
64	甲基吡恶磷	64	29.35	326	215、217、324	100:2:3:2	0.365~18.75	0.9941	76.1~110.9	8.43~16.99	0.20
65	三硫磷	65	29.38	157	342、199、296	100:44:6	0.125~6.25	0.9945	77.7~105.9	8.24~19.71	0.10
66	伐灭磷	66	29.37	218	217、282、202	100:22:6:7	0.125~6.25	0.9988	70.2~108.1	10.42~21.58	0.20
67	敌瘟磷	67	29.53	310	173、201、218	57:100:58:28	0.125~6.25	0.9992	73.4~113.1	4.65~19.21	0.05
68	亚胺硫磷	68	32.38	160	161、317、192	100:11:5:2	0.5~25.0	0.9993	79.2~115.1	6.59~21.41	0.10
69	苯硫磷	69	32.69	157	69、323、185	100:47:21:92	0.125~6.25	0.9976	70.0~110.5	7.48~18.70	0.02
70	保棉磷	70	34.46	160	132、77、161	100:80:73:11	0.365~18.75	0.9981	71.0~127.6	5.52~24.47	0.10
71	伏杀硫磷	71	34.60	182	367、154、369	100:14:21:14	0.125~6.25	0.9981	70.0~115.1	5.27~17.98	0.10
72	呋线威	72	34.60	182	329、194、382	100:3:372	0.365~18.75	0.9984	70.1~111.5	6.65~20.88	0.10
73	溴苯磷	73	34.65	382	213、171、377	100:6:122	0.125~6.25	0.9976	71.0~112.0	6.69~16.74	0.05
74	益棉磷	74	36.46	160	77、161、133	86:33:100	0.125~6.25	0.9991	70.0~112.0	7.51~20.39	0.05
75	吡菌磷	75	36.75	221	232、373	100:36:22	0.125~6.25	0.9990	72.0~107.2	7.75~18.09	0.05
76	吡啉硫磷	76	37.01	318	290、194、360	100:10:161	0.125~6.25	0.9992	69.0~111.0	6.63~19.66	0.05
77	蝇毒磷	77	38.68	362	226、334、364	100:47:16:19	0.125~6.25	0.9978	70.2~109.9	6.88~17.82	0.05

丰度比对其进行阳性确证。各种农药的选择离子的种类及其丰度比见表2。

2 结果与分析

2.1 农药种类的确定

我们首先查阅和检索了国内外对水果蔬菜产品中有有机磷农药和氨基甲酸酯农药残留限量的种类和MRL值的要求，并分别对CAC、美国、欧盟、日本等主要发达国家和组织和主要进出口国及中国的农药限量要求进行了归类统计。同时，根据上述各种农药的理化性质和在气相色谱-质谱检测的可行性分析及农药标准品的购置实现情况，确定了104种农药为研究对象。另外，我们根据气相色谱-质谱实际检测结果，筛选淘汰出检测灵敏度低或峰形脱尾，无法满足MRL值要求的农药，研究建立了水果蔬菜中77种农药残留量检测方法，其中有机磷农药67种、氨基甲酸酯农药10种，基本满足了

水果蔬菜产品中农药残留检测的需求。

2.2 样品种类的确定

参照CAC、美国、欧盟、日本等主要发达国家和组织对水果蔬菜的产品分类标准，我们按照对蔬菜(十字花科、苣荬菜、百合科、散行花科、茄科、葫芦科)和水果(柑橘类、浆果类)的植物分类属性，结合我国主要大宗进出口及敏感的水果蔬菜产品种类为依据，确定了西兰花、茼蒿、大葱、芹菜、番茄、黄瓜、菠菜、柑橘、苹果、草莓等10种产品为研究对象，研究建立水果蔬菜中77种农药残留量检测方法，产品的品种和覆盖面基本满足了国内外对水果蔬菜产品中农药残留检测的需求。

2.3 提取溶剂的选择

依据相似相容原理，以试样种类、待测农药特性、提取溶剂性质三方面综合考虑，以采用单一溶剂或混合溶剂进行提取是确定选用提取溶剂的原则。正己

烷、石油醚等弱极性溶剂适用于有机氯和除虫菊酯类农药的提取；二氯甲烷、乙酸乙酯等中等极性溶剂适用于有机磷类和氨基甲酸酯类农药的提取；丙酮、乙腈等强极性溶剂适用于强极性农药类的提取。本实验研究待测的77种农药均属有机磷和氨基甲酸酯类农药，但由于水果和蔬菜样品种类繁多，大多属高水分含量样品基质，决定于本方法需采用极性较强的有机溶剂提取。本研究对丙酮、乙腈作为提取进行选择试验，虽然两种溶剂对农药目标物的提取效果相当，提取物的基质有一定的差别，丙酮提取物的色素含量较高，乙腈提取时能够舍去亲脂性化合物，但乙腈提取存在价格较为昂贵，且有高毒性、浓缩时间长等缺点。因此，本方法选用丙酮作为提取溶剂可兼顾多种农药种类和高水分含量样品基质的需要。

2.4 净化方法的选择

当前最为常用的传统经典提取方法有液-液分配法、层析法、凝结沉淀法、冷冻法、化学法、薄层色谱法、扫集共蒸馏法。伴随着科学技术的发展，相应的出现了新的提取方法，如凝胶色谱(GPC)和固相萃取(SPE)净化技术。液-液分配技术是利用待测农药与干扰杂质在两种互不相溶的溶剂中，溶解度(分配系数)的差异而达到分离目的的净化方法，该方法净化效果较差，一般只作为粗分离。凝胶渗透色谱(GPC)又称为尺寸排阻色谱，此技术是基于凝胶对不同大小分子的排阻效应进行分离，从而使农药(小分子量)与油脂和色素杂质(大分子量)进行分离以实现分析样品的净化。固相萃取(SPE)是一种基于液相色谱分离机制的样品前处理方法，即根据待测农药与样品干扰杂质在吸附剂和溶剂中的分配系数不同，通过选择合适的溶剂强度和体积分别进行淋洗和洗脱，待测干扰杂质与农药依次从固定相解吸以实现分析样品的净化，由于其采用了高效和高选择性的固定相，减少了有机溶剂的用量，使得方法简便快速。

由于水果蔬菜样品基质较为复杂，特别是样品色素含量较高、水分含量较多，传统的净化方法不能有效地对样品进行高效净化，从而对气相色谱-质谱多残留测定存在较大的干扰，并对色谱柱的分离度、灵敏度和使用寿命及质谱离子源的污染存在潜在地影响。因此，在查阅了大量的国内外关于水果蔬菜中农药多残留净化技术的文献资料基础之上，本方法采用对提取样品三次净化，即采用二氯甲烷-水相液液分配净化以除去水溶性杂质，再利用凝胶色谱柱净化除去大部分色素和油脂后，最后再经活性炭固相柱除去少部分色素的净化方法，以便于国际接轨和现行通用，使得本方法的自动化程度大为提高，并保证了本方法具有良好的精密度和重现性。

2.4.1 液液分配净化

果蔬样品通常含有大量的水分、糖份、有机酸、色素和少量油脂及香味物质等成分，因此，高效净化多基质样品干扰物是高灵敏多种农药残留检测的关键。本方法针对西兰花、茼蒿、大葱、芹菜、番茄、黄瓜、菠菜、柑橘、苹果、草莓等10种果蔬样品，首先采用有机相和水相液液分配的方法，即对提取液采用加氯化钠水溶液后用二氯甲烷三次提取，以除去大量的水分、糖份、有机酸、水溶性色素等部分基质干扰物。经试验，本方法净化效果较好。

2.4.2 凝胶色谱(GPC)净化

本方法第二步采用凝胶色谱柱净化，针对色素含量较高和不同颜色(绿、黄、红)、糖份含量较高的4种样品基质，选用菠菜、番茄、柑橘、苹果样品进行凝胶色谱净化条件试验，以观察凝胶色谱柱对77种农药与4种样品基质的分离、净化效果。即分别对77种农药混合标准溶液和菠菜、番茄、柑橘、苹果等4种果蔬样品经液液分配提取后的空白样液和标准添加样液，按照本方法规定的GPC净化条件采用环己烷-乙酸乙酯(1+1)为流动相通过凝胶色谱柱，收集每10ml流出液于单个试管中，共收集220ml，并分别检测出各段流出液中农药的总含量和回收率，同时对空白样液进行了分光光度的色素测定试验，以确定凝胶色谱净化的收集流出体积。从凝胶色谱流出曲线可以看出，77种农药在凝胶柱上在100~190ml时流出，而4种样品色素基质在凝胶色谱柱上在50~120ml时流出。因此，本方法收集105~185ml洗脱液则可最大程度地除去基质干扰物的同时保证农药组分的回收率符合农药残留检测的要求。试验结果见图1。

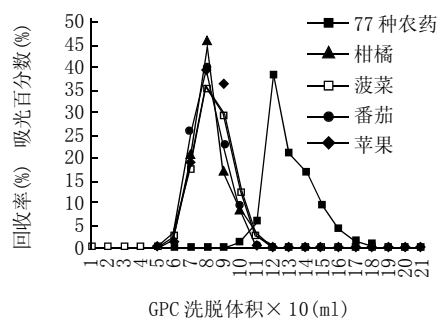


图1 GPC洗脱曲线

Fig.1 GPC elute curve

2.4.3 固相萃取(SPE)净化

本方法第三步采用固相萃取柱净化，由于水果蔬菜样品脂肪含量较少，且经第二步采用凝胶色谱柱净化后的样液仍含有少量的色素，而利用活性炭固相萃取柱对色素净化率较高的再净化是解决这一问题的有效技术手段。

段。但有关资料表明,受部分有机磷农药结构与活性炭晶体结构易于结合,难洗脱的限制,个别有机磷农药会存在回收率偏低的现象。因此,我们针对第二步凝胶色谱柱净化后的样液色素含量相对较高的4种样品基质,选用菠菜、番茄、柑橘、苹果样品进行活性炭固相萃取柱净化条件选择试验,即分别对77种农药混合标准工作溶液和菠菜、番茄、柑橘、苹果等4种果蔬样品经凝胶色谱(GPC)净化后的空白样液和标准添加样液,然后根据洗脱液的种类、配比、洗脱体积的试验选择,以观察Envi-Carb活性炭固相萃取柱对77种农药与4种样品基质的分离净化效果。

2.4.3.1 由于有机磷和氨基甲酸酯类农药属中等极性溶的农药,正己烷、石油醚等弱极性溶剂不易洗脱目标农药或洗脱体积过大,而丙酮、甲醇等强极性溶剂虽极易洗脱目标农药,但色素杂质也会随之被洗脱下来,以不能达到高效净化的目的。因此,本方法选用正己烷和乙酸乙酯的二元混合溶液作为淋洗液,并通过正己烷和乙酸乙酯的适用配比以作为Envi-Carb活性炭固相萃取净化的洗脱液。

2.4.3.2 分别选用二元配比为正己烷-乙酸乙酯(3+2)、正己烷-乙酸乙酯(2+3)、正己烷-乙酸乙酯(2+8)为洗脱液,对上述标准添加样液进行Envi-Carb固相萃取净化试验,收集每2ml流出液于单个试管中,共收集40ml,并分别检测出各段流出液中农药的总含量和回收率,绘制洗脱曲线。同时,观察每一流段的色素含量和检查气相色谱-质谱总离子流图中杂质的含量情况。从洗脱曲线和观察和检查结果可以看出,选用正己烷-乙酸乙酯(2+3)为洗脱液,通过Envi-Carb固相萃取柱,并定量收集30ml洗脱液作为检测样液,则可最大程度地除去基质干扰物的同时保证目标农药组分的回收率符合农药残留检测的要求。试验结果见图2。

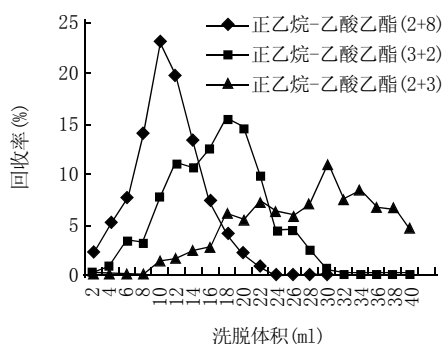


图2 SPE洗脱曲线
Fig.2 SPE elute curve

2.5 气相色谱-质谱检测条件选择试验

气相色谱-质谱(GC-MS)是目前国际上通用的农药多

残留检测技术手段,其选择离子监视方式(SIM)具有灵敏度高、广谱性强、抗干扰好的特点,不仅可以实现多种不同化学结构的农药的同时一次检测,同时还可利用色谱保留时间和质谱特征离子及其丰度比等多重因素定性,使测定结果更加准确、阳性结果确证更加可靠。

2.5.1 本方法选用DB-5 MS(30m × 0.25mm × 0.1μm)石英毛细管柱,采用色谱柱程序升温,利用毛细管不分流进样及其溶剂效应技术,首先对确定的77种有机磷和氨基甲酸酯农药目标物的每种农药进行独立的全扫描方式(GC-MSD/SCAN)检测,做出总离子流色谱图(TIC)。然后根据每种农药其保留时间、分离度、灵敏度,并同时考虑:①残留分析质量控制指南的要求(靠近待测物最近的最大峰与待测物的分离度是待测物峰高10%的峰宽),②检测流程时间,③仪器设备的控制和数据处理软件的适用性,④色谱和质谱参数的可操作性和简易性等方面;选择优化色谱条件分离,最终确定GC的检测条件。

2.5.2 根据每种农药其质谱图中的碎片离子信息,对购置的标准物质依据标准质谱库和有关资料进行质谱解析确认,并建立了相应的77种农药的质谱库。

2.5.3 根据每种农药其质谱图中碎片离子的种类和丰度、每种农药的色谱出峰顺序、仪器设备规定的通道数及通道离子数进行选择离子方式(GC-MSD-SIM)选择试验。本研究采用分时段、分通道的方式来对每个通道选择离子分别进行监测,①在选择时段和通道时,为保证每种农药目标物都具有较高的灵敏度和所有监测的目标物都有足够的数据采集点,应适当控制每个通道内的监测离子数目和住留时间及每个色谱峰具有恒定的循环扫描时间。②在选择特征目标监测离子时,为保证每种农药目标物的定量和定性结果的准确性,应同时综合考虑选择其离子丰度相对较高、分子质量较大的碎片离子,共享和避让其共有离子(保留时间相远和相近的农药之间),测试样品基质干扰离子的差异。经试验研究,本方法最终确定选择9个通道进行检测;并对每种农药分别选择1个定量离子,2~3定性(阳性确证)离子,以最终确定选择离子作为定性和定量的特征目标监测离子。测定时,可根据其标准物和待测样品的SIM总离子流图中的峰面积,采用外标法定量;确证时,可根据待测阳性检出物中碎片离子的种类和丰度比作为其阳性判别的依据。选择监测离子时间设定参数见表1,每种农药的定量离子和定性离子见表2。

2.5.4 利用Agilent 6890/5973 I保留时间锁定(RTL)功能,本研究通过对目标物毒死蜱农药在五个不同柱头压力下与其色谱保留时间的对应关系,锁定其色谱工作参

数作为整个仪器的恒定检测工作条件,通过自动补偿可能在长序列中引起的保留时间的变化,消除农药多残留检测中由于对选择监测离子时间设定参数的精确要求而带来的偏差,以提高方法的精密度和重现性。

经试验结果表明,本方法确定的特征目标监测离子测定灵敏度高,选择性好,干扰物少,线性范围宽,重现性好,定量准确,阳性确证结果准确可靠。在选定的气相色谱-质谱条件下,77种农药标准物的气相色谱-质谱选择离子色谱图见图3。

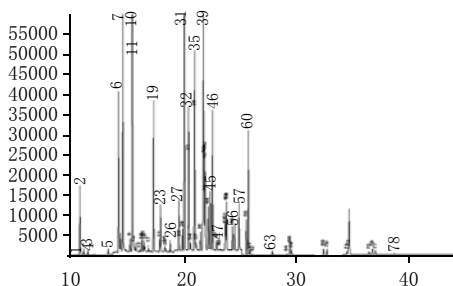


图3 77种农药的气相色谱-质谱选择离子色谱图
Fig.3 Selected ions chromatogram of the 77 pesticides

2.6 线性关系

在本方法所确定的GC-MS检测条件下,分别对77种有机磷和氨基甲酸酯农药标准物在一定浓度范围内制备5个不同浓度水平的混合标准溶液进行测定,以浓度与峰面积进行线性回归分析。试验结果表明,两组农药其浓度与响应值有良好的线性关系。线性范围和相关系数见表2。

2.7 测定低限

本方法测定低限是根据77种有机磷和氨基甲酸酯农药在GC-MSD检测的灵敏度($S/N \geq 10$)及10种样品基质的响应值而制定的。可以看出,本方法的检测低限完全满足国内外最高残留限量(MRL)对水果蔬菜的检测需要。

2.8 方法的准确度和精密度

本方法选用西兰花、茼蒿、大葱、芹菜、番茄、黄瓜、菠菜、柑橘、苹果、草莓等10种果蔬样品,

采用添加法,即对本底不含77种农药的10种样品,分别添加2个浓度水平的样品进行回收测定,每水平单独测定5次,从而计算其回收率和精密度。试验结果见表2,在选定的色谱-质谱条件下,气相色谱-质谱选择离子色谱图见图3。试验结果表明:本方法回收率为53.6%~124.8%,相对标准偏差为4.01%~24.90%,完全符合残留分析质量控制指南的要求。

参考文献:

- [1] 林维宣. 各国食品中农药兽药残留量规定[M]. 大连: 大连海事大学出版社, 2002.
- [2] FILLION J. Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of AOAC, 1995, 78(5): 1252-1265.
- [3] FILLION J. Analysis of pesticide residues in mixed fruit and vegetable extracts by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Journal of AOAC, 2000, 83(3): 698-713.
- [4] COOK J, BECKETT M P. Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables using procedures developed by the florida department of agriculture and consumer services[J]. Journal of AOAC, 1999, 82(6): 1419-1435.
- [5] YUMIKO N, YASUhide T, YUKIHIRO S, et al. Multiresidue analysis of 48 pesticides in agricultural products by capillary gas chromatography[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42(11): 2508-2518.
- [6] MOGADATI P. Multiresidue determination of pesticides in high-organic-content soils by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry[J]. Journal of AOAC, 1999, 82(3): 705-713.
- [7] ADOU K. Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography[J]. Agric Food Chem, 2001, 49(9): 4153-4160.
- [8] HIROTAKE O, KAZUHIRO A, MASHAHIRO O, et al. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using two-layered column with graphitized carbon and water absorbent polymer[J]. Analyst, 2001, 126: 1529-1534.
- [9] 许泓, 林安清, 古珑. 果蔬中107种农药残留量测定[J]. 分析测试学报, 2004, 23(3): 34-38.
- [10] 胡小钟, 储晓刚. 浓缩果汁中109种农药残留量测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6): 26-31.
- [11] TUINSTRAL G, ROOS A H, MATSETR A M, et al. Development of a multi-residue/multi-matrix method for pesticide analysis in agricultural products[J]. Fresenius J Anal Chem, 1991, 339: 384-386.
- [12] SZYMCHYK K, MALCZEWSKA M. Gas chromatography analysis of organophosphorus pesticides in plant samples[J]. Chromatographia, 1998, 48(12): 156-157.

中国科学引文数据核心库收录期刊