

茶叶中联苯菊酯残留自然基体标准样品的研制

余孔捷, 杨 方, 黄 杰, 李耀平, 江锦彬, 李 捷, 蓝锦昌, 王 彦
(福建出入境检验检疫局, 福建省检验检疫技术研究重点实验室, 福建 福州 350001)

摘 要: 为获得与真实检测样品完全一致的茶叶中联苯菊酯残留分析质量控制用标准样品, 建立制备茶叶中联苯菊酯自然基体标准样品的方法。以每亩茶园约3.0g联苯菊酯的用量对茶树喷洒0.017g/L联苯菊酯药液, 每日监控检测施药后茶叶中联苯菊酯含量, 适时采茶, 正常制茶, 磨粉并通过120目网筛获得联苯菊酯残留不同含量的2批各320个独立包装的茶粉样本。经均匀性检验、稳定性检验、协同定值和不确定度评估, 制得检测质控用茶叶中联苯菊酯残留自然基体标准样品。该标准样品应用于全国98家实验室参加的能力验证计划。

关键词: 茶叶; 联苯菊酯残留; 自然基体; 标准样品

Development of Natural Matrix Standard Tea for Quality Control of Bifenthrin Residues

YU Kong-jie, YANG Fang, HUANG Jie, LI Yao-ping, JIANG Jin-bin, LI Jie, LAN Jin-chang, WANG Yan
(Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fujian Key Laboratory of Inspection and Quarantine Technology Research, Fuzhou 350001, China)

Abstract: In order to obtain quality control standard for the analysis of bifenthrin residues in tea, a methodology was explored for establishing tea natural matrix reference material containing bifenthrin. Tea plants were due to the spraying of 0.17 g/L bifenthrin solution at a dosage of 3.0 g/mu (1 mu = 666.67 m²). Daily monitoring detection was conducted after the application of bifenthrin in tea plants. After tea picking at appropriate moment, normal tea making, and milling and screening through 120 mesh, the content of bifenthrin residues in 320 tea samples with independent bags from 2 batches were determined. The homogeneity and stability of the samples were examined. The chemical constituents of the samples were certified through collaborative analysis program and uncertainty assessment. The developed standard was applied to CNAS national proficiency testing program participated by 98 laboratories.

Key words: tea; bifenthrin residues; natural matrix; reference material

中图分类号: O652

文献标志码: B

文章编号: 1002-6630(2013)08-0317-04

联苯菊酯(bifenthrin, CAS号: 82657-04-3)作为农药用于多种作物防治虫害, 在茶叶的日常检测中有一定检出率。各国对茶叶中联苯菊酯的限量不完全相同, 如欧盟的限量为5mg/kg, 日本限量25mg/kg, 韩国限量0.3mg/kg, 我国农业部标准^[1]规定限量为5mg/kg。本研究制备A、B两个含量水平的含联苯菊酯的茶叶自然基体标准样品(RM)。自然基体RM通常是指RM的候选材料获取于天然基体, 不包括获取于“在基体材料中加入已知量的化合物或元素”。后者在GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3)标准样品: 定值的一般原则和统计方法》^[2](术语)中称为“加料(spiking)”。

我国食品分析用RM数量虽不少, 但基本集中在无机元素测定上, 如海带^[3]、牡蛎^[4]、黄鱼^[5]等, 国家标准GB/T 18795—2002《茶叶标准样品的制备技术》^[6]规定了茶叶标准样品制备技术, 但仅限于产品品质特性。农药、兽

药等特性检测方面的基体RM十分欠缺^[7]。农兽残检测中需要建立纯品标准物质与基体标准物质以满足检测质量控制、解决分析中遇到的问题、保证结果准确等要求^[8]。欧盟的残留检测法规文件要求采用标准样品控制检测质量、验证检测方法^[9-11]。采用加料法制备基体RM, 虽制备简便, 但存在目标物和基体结合情形与真实检测样品不完全一致的情况, 从而可能会导致提取、净化行为与真实检测样品不同等问题。余孔捷等报道了含AOZ虾肉糜样^[12]、含氟甲喹鳊鱼糜样^[13]自然基体RM的研制, 杨方等^[14]研制了含AOZ鳊鱼肌肉冻干粉基体RM, 但未见含联苯菊酯的茶叶自然基体RM的研究报道。本研究采用从茶树施药、适时采茶、制茶加工到磨粉、包装、均匀性检验、稳定性检验、实验室网络协同定值等完整的一条链研制过程, 以期制备成预期含量水平的茶叶中联苯菊酯残留自然基体RM, 使该RM形态及其目标物与基体结合

收稿日期: 2011-12-14

基金项目: 福建省重点科技项目(2007Y0001); 福建出入境检验检疫局科技项目(FK2010-23)

作者简介: 余孔捷(1956—), 男, 研究员, 本科, 研究方向为食品安全分析检测。E-mail: ykjqc@163.com

的情形都与真实检测样品完全一致,避免加料基体RM的缺陷。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验茶树为鼓山白云6号,树龄10年以上,产自福州北峰茶园南口28号地块;联苯菊酯乳油(25g/L,经实验室气相色谱法检测实际含量为24.84g/L) 苏州富美实植物保护剂有限公司。

实验用水为GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》^[15]规定的一级水;氯化钠、丙酮、正己烷均为分析纯;丙酮-正己烷(1:2, V/V);丙酮-正己烷(1:9, V/V);联苯菊酯标准品((100.00±0.16)μg/mL,国家一级标准样品) 农业部环境保护科研监测所。

酸性氧化铝:层析用,100~200目,500℃灼烧4h,冷却后储于密封容器中;联苯菊酯标准储备液:准确移取0.500mL的100.00μg/mL的联苯菊酯标准品(溶液),用正己烷稀释并定容至50.0mL,配制成质量浓度1.00μg/mL的标准储备液;混合标准工作液:分别准确移取摇匀的联苯菊酯标准储备液5.00mL,混合,用正己烷准确稀释至10.0mL,配制成0.500μg/mL联苯菊酯标准工作溶液。

1.2 仪器与设备

16型喷雾器 浙江台州路桥恒达喷雾器厂;闽茶55型揉茶机 福建福鼎茶机厂;6CSR-80型茶叶杀青机 浙江杭州富阳茶叶机械总厂;30B-V1型吸尘粉碎机组 江苏江阴市宏达机械制造有限公司;V-14型V型混合机 广东广州康诺医药机械公司;SC-300A型真空包装机 福建安溪县三和茶叶机械厂;BC/BD-718A冰柜 山东青岛海尔特种电冰柜有限公司;6890N型气相色谱仪 美国Agilent公司;ENVI-Carb固相萃取小柱(3mL) 美国Supelco公司;LAB Dancer涡旋振荡器 德国IKA公司;ANKE TDL-5-A型离心机 上海安亭科学仪器厂;HY-2型调速多用振荡器 国华电器有限公司;HGC-12A型干浴氮吹仪 天津市恒奥科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 施药实验

施药天气条件:以施药后无雨、多云天气为主,每天上午10时叶面平均温度为37℃,温度波动范围32~43℃。

施药方式:均匀喷雾。在0.8亩试验茶园中共喷施了4×35L农药水乳液。共4次配制农药水乳液;每次分别转移24mL农药联苯菊酯至喷雾器中,加入约35L水,混合均匀。

茶叶中农残量监控:施药前和施药后0.5h,以后每天(间隔24h)各采鲜叶约0.5kg,即返回实验室(约需2h)按

SN/T 1117—2008《进出口食品中多种菊酯类农药残留量测定方法:气相色谱法》^[16]检测其联苯菊酯含量,同时检测水分以对干基换算茶叶中联苯菊酯残留量。

1.3.2 阳性材料的采集、制茶

采集施药后次日、第5天、第14天的鲜叶(3叶一芽)各约60~70kg。送制茶车间按杀青、揉捻、烘干顺序加工成干茶坯。

1.3.3 茶叶的磨碎、混匀、包装

将加工成的干茶坯用吸尘粉碎机粉碎并通过120目筛网。过筛后茶粉经人工粗搅匀后用V型混合机以15r/min,45min混匀。混匀后装袋,每袋10g,用真空封口机热封口。

1.3.4 均匀性与稳定性检验

按总样本单元数 N 的 $2 \times N^{1/3}$ 抽样量随机抽取均匀性检验样共16份,进行检测,每个样品重复测试3次。采用方差分析法(F -检验)检验样品的瓶间均匀性(between-bottle homogeneity, GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3)标准样品:定值的一般原则和统计方法》^[2]规定该术语“适用于其他类型的包装”;与“瓶间”相对的是“瓶内, within-bottle”)。

稳定性研究的基本模型可表示为:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$$

式中: β_0 和 β_1 为回归系数; ε 为随机误差分量; X 为时间变量, Y 为残留量。

根据GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3)标准样品:定值的一般原则和统计方法》^[2],应用统计量 F 检验一元线性回归模型的显著性:当 $P \geq 0.05$ 时表示回归是不显著的,判为未观测到不稳定性,反之亦然。其中短期稳定性采用 t -检验法研究夏、冬气温下经实际运输的样品与正常冻藏样品的残留量检测结果进行。

1.3.5 定值与不确定度评估

由协同实验室参加的定值检测结果经过剔除技术无效结果、统计无效结果(经柯克伦检验、格拉布斯检验)后的结果值取平均结果定值。特性值不确定度(U_{CRM})由测定值标准不确定度(u_{char})、瓶间标准不确定度(u_{bb})、长期稳定性标准不确定度(u_{lis})和短期稳定性标准不确定度(u_{sis})合成并扩展(包含因子 $k=2$)而得。

2 结果与分析

2.1 施药实验

按1.3节进行施药实验并取样,鲜样采集后约2h后到达实验室检测茶叶干基的联苯菊酯含量。鲜叶干基中联苯菊酯含量随施药后时间变化的曲线见图1。

由图1可见,茶园中茶叶喷施联苯菊酯农药后第1天其残留量迅速下降,而后平缓下降。施药第1天茶叶中农

残迅速下降的原因应该是新喷的农药在茶叶表面还未与之牢固结合,同时由于此时质量浓度高则联苯菊酯的蒸汽压大,因此挥发损失明显。1d后,农药与茶叶结合较牢固,农残经第1天迅速减少后含量较低,进入正常的以降解和生长稀释为主的时期。图1显示,施药后第1天由于茶树农残急速变化,不适于采集到预期质量浓度的阳性材料。

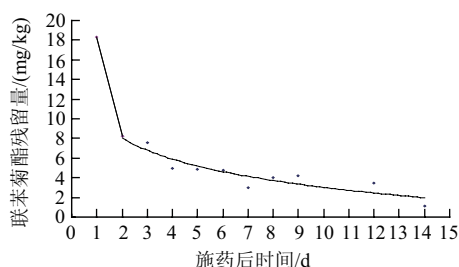


图1 施药后鲜叶干基中联苯菊酯残留量的变化
Fig.1 Changes of bifenthrin residues in fresh tea after bifenthrin application

2.2 阳性材料采集期的预测

将剔除施药第1天检测数据后鲜叶干基中农残的质量浓度/(mg/kg)对施药后时间/d的对数值作图,得到线性回归方程为 $y = -7.2102x + 10.233$, $R^2 = 0.8581$ 。

查 $n-2=8$ 时,相关系数临界值为 $r(0.01, 8)=0.765$ 。由线性回归方程, $r^2=0.8581$, $r=0.9263$; $r > r_{0.01(8)}$, 即线性相关显著性水平大于99%。表明施药次日起,茶树农残含量与施药后时间的对数值呈高度显著相关。因此可以近似的用对数趋势线表达施药次日起茶树农残含量与施药时间的关系。

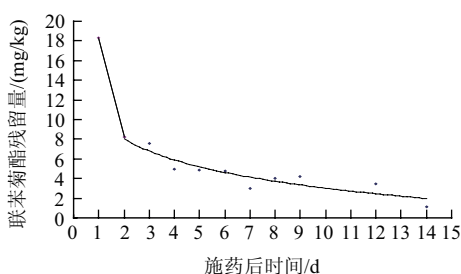


图2 不同采集日期的鲜叶干基、茶粉干基中残流量
Fig.2 Bifenthrin residues in fresh tea and tea powder from different tea-picking dates

将不同日期采集的鲜叶、制茶并粉碎后的茶粉的检测结果(均对干基计)对采集日期(以施药后日期计)按对数趋势线模式作图,见图2。由于采茶、制茶、粉碎的人工和租用车间的成本原因,仅进行3个日期的试验。利用该趋势线,可以按候选RM预期含量水平预测合适的采茶日期。图2显示,茶粉数据点的离散性大于鲜叶,是由于后续的制茶、粉碎过程条件影响所累积的。

2.3 均匀性研究

获得两批(分别记为tea-A、tea-B)样本,总单元数各320个,顺序编号后利用随机数表各随机抽取16个单元,每个单元检测3次。结果按 F 检验法进行均匀性统计分析,方差分析结果见表1。tea-A和tea-B的联苯菊酯残留量的 F 值 $< F_{0.05(15,32)}=1.99$, $P > 0.05$ 。结果表明单元间差异不显著,即tea-A和tea-B的联苯菊酯的瓶间均匀性均符合要求。该结果同时验证了所采取的均质操作是可行的。

表1 瓶间均匀性研究方差分析
Table 1 ANOVA of between-bottle homogeneity

		SS	df	MS	F值	P值	$F_{\text{临界}}$
tea-A	瓶间	0.1099	15	0.007328	1.459	0.180	1.992
	瓶内	0.1607	32	0.005022			
tea-B	瓶间	0.3966	15	0.02644	1.364	0.224	1.992
	瓶内	0.6201	32	0.01938			

2.4 稳定性研究

2.4.1 短期稳定性

安排两次短期稳定性试验。第1次为冬天2月份福州-北京飞机来回,两城市中心-机场分别来回两次汽车运输。第2次为夏季7月7日将样品交由“中铁快运”发送至海南省海口市,海口收件人于7月14日收到后再交由公路运输发回福州市于7月17日抵达。第2次短期稳定性运输试验时值7月份,南方气温高,短期稳定性试验样品来回福州-海口间样品运输试验时值南方暑夏,运输时间长达10d。两次运输样品均与正常冻藏样品同时检测。各同样进行了3次重复检测。采用 t -检验法研究稳定性。结果见表2。在 $\alpha=0.05$ 显著性水平下,tea-A、tea-B的联苯菊酯两组结果间均无显著性差异。

表2 短期稳定性研究 t -检验
Table 2 t -Test of short-term stability

项目	tea-A				tea-B			
	夏季运输		冬季运输		夏季运输		冬季运输	
	变量1	变量2	变量1	变量2	变量1	变量2	变量1	变量2
平均值	0.829	0.846	0.808	0.828	5.57	5.68	5.98	5.92
方差	0.0012	0.00087	1.43×10^{-5}	0.00015	0.13	0.0025	0.0024	0.0029
观察数	3	3	3	3	3	3	3	3
合并方差	0.0010		8.32×10^{-5}		0.068		0.0026	
自由度	4		4		4		4	
t	-0.65		-2.64		-0.5		1.47	
$t_{0.05(4)}$, 双侧	2.78		2.78		2.78		2.78	

2.4.2 长期稳定性

样品长期储藏于 -20°C 冰箱中,每月取样一次(第5个月漏检)共进行10个月(9次)的检测。每月16日前后3次平行检测后取平均值,在第4个月使用夏季实际运输样品,第10个月使用冬季实际运输样品。另外,由于测量是在(实验室内)再现性条件下进行的,其中也包括了测量的不稳定性。长期稳定性研究结果见表3。结果显示,

6值均大于0.05,表示回归均为不显著的(对于95%置信水平, $P<0.05$ 就成为显著的)。

表3 长期稳定性研究方差分析
Table 3 ANOVA of long-term stability

		自由度	平方和	均方	F值	P值
tea-A	回归	1	2.35×10^{-6}	2.35×10^{-6}	0.001	0.978
	残差	7	0.0199	0.00284		
	总和	8	0.0199			
tea-B	回归	1	0.110	0.110	4.304	0.077
	残差	7	0.179	0.0255		
	总和	8	0.288			

2.5 定值与不确定度评定

参加协同定值实验室采用GC-ECD检测($n_0=3$), tea-A样最终由12个实验室结果取平均值,定值联苯菊酯为0.751mg/kg; tea-B茶叶样中联苯菊酯最终由14个实验室结果取平均值,定值5.40mg/kg。

特性值不确定度的评定按照GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3)标准样品:定值的一般原则和统计方法》,考虑测定、均匀性、稳定性对特性值总不确定度的贡献,即通过测定值标准不确定度(u_{char})、瓶间标准不确定度(u_{bb})、长期稳定性标准不确定度(u_{ls})和短期稳定性标准不确定度(u_{sts})的合成并扩展(包含因子 $k=2$)来评定特性值不确定度(U_{CRM})。由于采用协同定值(平行测定 $n_0=3$),通过邮政网络将候选RM分发给各参加协同定值的实验室,所得到的一系列测量值已包含运输不稳定性造成的附加不确定度,另外,在进行稳定性实验时,第4个月和第10个月测定时样品已是实际传递后样品,在稳定性不确定度中也包括了运输不稳定性造成的不确定度(即计算得 u_{ls} 已经包含了 u_{sts}),不再单独考虑 u_{sts} 。故 $U_{\text{CRM}}=k(u_{\text{char}}^2+u_{\text{bb}}^2+u_{\text{ls}}^2)^{1/2}$ (取 $k=2$)。 u_{ls} 的计算参考了Thonas等^[17]的报道。

候选RM特性值分别为tea-A中联苯菊酯(0.751 ± 0.086)mg/kg; tea-B中联苯菊酯(5.34 ± 0.06)mg/kg。

2.6 实际应用

已有6个实验室试用本实验所述RM进行检测质量控制,绘制质量控制图。采用本方法制备的RM成功实施了全国98家实验室参加的茶叶中联苯菊酯检测能力验证。

3 结论

通过施药控制和合适采集时机的选择及生产条件下制茶可获得预期含量的含联苯菊酯的茶叶粉自然(污染)基

体阳性材料,采用粉碎、混匀均质和人工全量搅拌相结合的工艺可以保证材料的均匀性。经均匀性检验、稳定性检验和协同定值制备得茶叶粉中联苯菊酯残留分析质控用自然(污染)基体RM。特性稳定,使用方便。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. NY 5244—2004 无公害食品:茶叶[S]. 北京:中国农业出版社, 2004.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 15000.3—2008 标准样品工作导则(3)标准样品:定值的一般原则和统计方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
- [3] 吕海燕, 王正方. 海洋标准物质——海带的研制[J]. 科技通报, 2004, 20(4): 363-367.
- [4] 邢书才, 张自杰, 张太生, 等. 牡蛎生物环境标准样品的研制[J]. 中国环境检测, 2003, 19(5): 34-37.
- [5] 吕海燕, 王正方. 大黄鱼海洋标准物质的研制[J]. 科学技术与工程, 2003(5): 482-485.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 18795—2002 茶叶标准样品的制备技术[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
- [7] 卢晓华, 纪洁. 我国食品分析用标准物质现状分析[J]. 中国计量, 2007(4): 78-79.
- [8] MARKUS S, WAYNE R W, PETER J J. Reference materials for chemical analysis: certification, availability, and proper usage[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2001: 111-112.
- [9] EC. Quality control procedures for pesticide residues analysis. [EB/OL] (2006). http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol_en.pdf.
- [10] EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. [EB/OL]. (2002). http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2002/L_221/L_22120020817_en_00080036.pdf.
- [11] Health and Safety Executive (UK). Guidelines for validation of analytical methods for non-agricultural pesticide active ingredients and products[EB/OL]. (2002). <http://www.hse.gov.uk/biocides/copr/pdfs/validation.pdf>.
- [12] 余孔捷, 杨方, 刘正才, 等. 含氟甲唑残留的鳊鱼肌肉自然基体标准样品的制备[J]. 色谱, 2011, 29(7): 691-695.
- [13] 余孔捷, 刘正才, 杨方, 等. AOX残留分析用虾蟹自然(污染)基体标准样品的研制[J]. 分析试验室, 2010, 29(3): 50-53.
- [14] 杨方, 杨守深, 卢声宇, 等. 鳊鱼肌肉冻干粉中呋喃唑酮代谢物3-氨基-2-恶唑烷酮残留标准物质的研制[J]. 分析化学, 2010, 38(3): 397-400.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1117—2008 进出口食品中多种菊酯类农药残留量测定方法:气相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
- [17] THOMAS P J L, JEAN P, ANDRÉE L, et al. Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs[J]. Fresenius J Anal Chem, 2001, 370(2/3): 183-188.