

QuEChERS 前处理方法联合 GPC-GC/MS 在测定蔬菜水果农药残留中的应用

卢大胜, 熊丽蓓, 温忆敏, 邱歆磊, 汪国权
(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

摘要: 采用 QuEChERS 前处理方法和在线凝胶过滤色谱-气相色谱-质谱(GPC-GC/MS)联用法对蔬菜水果样品中的 25 种有机氯、菊酯和杀螨剂等农药残留进行测定。首先用 QuEChERS 方法进行样品前处理, 即乙腈提取, 提取溶液经脱水后离心, 用分散性吸附剂去除离心提取液中的干扰基质(如脂肪酸和色素等), 然后直接进行在线 GPC-GC/MS 分析。GPC-GC/MS 系统中的 GPC 能弥补 QuEChERS 方法去除干扰物质不彻底的问题, 从而降低了分析背景, 改善了峰形, 提高了分析结果的准确性和相关质谱图的匹配性。在加标 0.01 mg/kg 情况下, 3 种样品(菠菜、黄瓜和苹果)的回收率均在 80%~120% 之间, 相对标准偏差(RSD)均小于 20%。

关键词: 农药残留; 在线凝胶过滤色谱-气相色谱-质谱(GPC-GC/MS); QuEChERS 前处理; 食品安全
中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2011)04-0229-07

Application of QuEChERS Method Coupled with Online GPC-GC/MS for Determination Pesticide Residues in Vegetables and Fruits

LU Da-sheng, XIONG Li-bei, WEN Yi-min, QIU Xin-lei, WANG Guo-quan
(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: 25 pesticide residues including organochlorine, pyrethroid, acaricide in vegetables and fruits were determined by online GPC-GC/MS coupled with QuEChERS method. The results show that GPC of online GPC-GC/MS system can effectively remove chromatographic interferences that QuEChERS pretreating method can not effectively removed. Compared with GC/MS, online GPC-GC/MS has the lower interfered background and better peak shape. Identification and quantization of pesticide residues with online GPC-GC/MS can be well performed. All pesticides including three spiked samples (spinach, cucumber and apple) at the level of 0.01 mg/kg have 80%—120% of the recovery and less than 20% of the coefficients of variation.

Key words: pesticide residues; online gel permeation chromatography-gas chromatography-mass spectrometry(GPC-GC/MS); QuEChERS pretreating method; food safety

收稿日期: 2010-08-30; 修回日期: 2010-12-21

作者简介: 卢大胜(1976~), 男(汉族), 湖北宜昌人, 硕士, 从事环境污染分析研究。E-mail: dslu@sedc.sh.cn

通信作者: 汪国权(1967~), 男(汉族), 上海人, 主任技师。E-mail: gqwang@sedc.sh.cn

随着大量不同种类农药的使用和人们对日常农药残留监测数量日益剧增的需要, 农药残留分析已不能只局限于单一农药检测(SRM_s), 而需要进行多种类农药的同时检测(MRM_s)。目前国内外已有很多MRM_s方法, 但这些方法都有一个共性: 耗时、耗力、费用昂贵和多种农药同时分析时很难满足所有待测农药均取得很好的定性定量效果^[1]。QuEChERS方法在蔬菜水果农残分析中具有快速、简单、廉价、有效、可靠和安全等优势, 已在世界很多国家和地区得到验证和推广^[2]。目前已形成AOAC 2007. 01、EN 15662和NY/T 1380-2007标准方法, 但该方法用分散性SPE粉末去除干扰物质的能力比SPE柱差^[3], 往往在分析检测中出现衬管和柱前端严重污染而导致色谱峰丢失或拖尾、背景高、基质诱导色谱增强效应严重, 从而影响了一些农药的定性和定量检测。

凝胶渗透色谱(GPC)能很好地去除样品基质中潜在的干扰目标化合物分析的油脂、色素(叶绿素、叶黄素等)、生物碱、聚合物等大分子化合物, 并已在农药残留分析中得到广泛应用^[4]。欧盟标委会技术委员会的农药残留测定标准(TC 275)和日本厚生劳动省的农药残留分析都采用了GPC法^[5,6]。但是, 常规的GPC法一般采用离线方式, 存在速度慢、有机溶剂使用量大、操作繁琐等问题, 限制了GPC法在这一领域的广泛使用。

本工作通过在线凝胶渗透色谱-气体色谱-质谱(GPC-GC/MS)联用法克服QuEChERS方法去除干扰物不彻底的缺陷, 对蔬菜水果中的25种有机氯、菊酯和杀螨剂等农药残留进行测定, 实现MRM_s的快速、自动化、高效性和可靠性, 满足农药残留日常性监测的需求。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

GPC-GC/MS系统: 日本岛津公司产品, 配有LG-10ADvp泵、10ADvp自动进样器、Shodex CLNpak EV-200AC凝胶渗透色谱柱(2 mm × 150 mm)等部件; GC/MS系统: 日本岛津公司产品, 配有PTV-2010大体积进样器, Rtx-5ms毛细管色谱柱(0.25 mm × 30 m × 0.25 μm)。

25种农药标准品和过氧七氯内标(含量>98.0%); 美国Chem Service公司产品; 乙腈(农

残级): 美国Sigma Aldrich公司产品; 氦气(纯度99.999%): 昆山普莱克斯实用气体有限公司产品; 氯化钠、无水硫酸镁和醋酸钠(含量大于98.0%): 国药集团化学试剂有限公司产品, 使用前在400℃烘2h; 石墨碳黑(GCB)、C18和乙二胺基-N-丙基固相(PSA)分散性SPE粉末来源于SPE小柱(3 L/500 g): 美国Supelco公司产品; 13 mm有机过滤膜: 美国Millipore公司产品。

1.2 GPC-GC/MS分析条件

泵流速: 0.1 mL/min; 柱温: 40℃; 农药残留馏分截取时间段: 4~6 min; 载气吹扫: 0.1 min; 流动相: $V(\text{丙酮}) : V(\text{环己烷}) = 3 : 7$ 的溶液; PTV进样口程序升温: 120℃保持4.5 min, 以80℃/min升至250℃, 保持34 min; 进样模式: 不分流进样; 进样时间: 7 min; 柱温箱程序升温: 82℃保持5 min, 以80℃/min升至280℃, 保持10.25 min; 柱流速控制: 恒压, 120 MPa; 载气总流速: 30 mL/min; 柱流速: 1.75 mL/min; 进样量: 20 μL。

MS离子源温度: 200℃; 接口温度: 250℃; 溶剂延迟时间: 8 min; 检测电压: 1.05 kV; 质谱检测模式为单离子检测(SIM), 选择质量数大(特异性强)和强度大(灵敏度高)的离子作为定量和定性离子, 其中定量离子在灵敏度、特异性和选择性上更高于定性离子, 而且这些离子经空白基质实验验证, 要求空白基质对应的共流离子小于标准曲线最低点10倍以下, 并且避免选择实验环境和柱流失过程中常见的干扰离子, 具体SIM离子参数列于表1, 标准图谱示于图1。

1.3 实验方法

1.3.1 QuEChERS前处理方法 取蔬菜或水果样品擦净, 蔬菜去掉非可食部分, 然后用食品处理器粉碎, 制成蔬菜或水果试样。

按照文献[1]的方法, 取10 g制备的样品于40 mL具塞聚四氟乙烯离心管中, 加入10 mL含1%醋酸的乙腈溶液和1 g醋酸钠, 摇匀后加入1 g氯化钠和4 g无水硫酸镁, 趁热剧烈震荡1 min, 以4 000 r/min离心1 min; 取1 mL上清液于含有50 mg PSA、50 mg C18、20 mg GCB和125 mg无水硫酸镁的离心管中, 剧烈震荡1 min, 然后以4 000 r/min离心2 min; 取上清液0.5 mL于有刻度的进样瓶中, 加入10 μL 2.5 mg/L内标过氧七氯, 用氮气吹至0.5 mL, 过膜

后置于冰箱保存, 备用。

1.3.2 标准溶液系列 将各标准农药和内标过
氧七氯溶于丙酮, 配成 5 g/L 标准储备液, 置于

冰箱保存, 备用。将标准储备液稀释, 配制
0.005~0.1 mg/L 标准工作溶液, 内标浓度均为
0.05 mg/L。

表 1 25 种农药化合物 GC/MS 测定的单离子检测参数表

Table 1 Table of GC/MS single ion monitor parameters of 25 pesticides

序号	化合物	保留时间/min	定量离子/ u	定性离子/ u
1	α -六六六(α BHC)	18.652	219	181 111
2	六氯苯(Hexachlorobenzene)	18.838	284	142 249
3	β -六六六(β BHC)	19.506	181	219 111
4	γ -六六六(γ BHC)	19.666	181	219 111
5	δ -六六六(δ BHC)	20.415	219	181 111
6	艾氏剂(Aldrin)	22.719	263	293 255
7	三氯杀螨醇(Kelthane)	22.994	139	215 251
8	过氧七氯(内标)(Heptachlor epoxide)	23.764	353	263 237
9	七氯(Heptachlor)	23.884	272	237 185
10	硫丹 I (Endosulfan I)	24.686	339	195 241
11	p, p' -滴滴滴(p, p' -DDE)	25.253	246	318 176
12	狄氏剂(Dieldrin)	25.351	345	277 263
13	噻嗪酮(Buprofezin)	25.479	172	305 249
14	异狄氏剂(Endrin)	25.908	345	263 281
15	硫丹 II (Endosulfan II)	26.161	241	267 339
16	p, p' -滴滴滴(p, p' -DDD)	26.320	235	320 165
17	o, p' -滴滴涕(o, p' -DDT)	26.383	235	199 165
18	p, p' -滴滴涕(p, p' -DDT)	27.212	235	199 165
19	联苯菊酯(Bifenthrin)	28.346	181	166 197
20	甲氰菊酯(Fenpropathrin)	28.551	265	349 181
21	三氯杀螨砜(Teradifon)	29.117	229	159 175
22	功夫菊酯 1(Cyhalothrin 1)	29.401	181	197 208
23	功夫菊酯 2(Cyhalothrin 2)	29.647	181	208 197
24	氯菊酯 1(Permethrin 1)	30.691	183	163 255
25	氯菊酯 2(Permethrin 2)	30.883	183	163 255
26	氯氰菊酯 1(Cypermethrin 1)	32.389	181	209 163
27	氯氰菊酯 2(Cypermethrin 2)	32.567	181	163 209
28	氯氰菊酯 3(Cypermethrin 3)	32.722	181	163 209
29	氯氰菊酯 4(Cypermethrin 4)	32.751	181	163 209
30	氰戊菊酯 1(Fenvalerate 1)	34.452	167	125 225
31	氰戊菊酯 2(Fenvalerate 2)	34.803	167	125 225
32	溴氰菊酯 1(Deltamethrin 1)	36.812	172	253 181
33	溴氰菊酯 2(Deltamethrin 2)	37.801	172	253 181

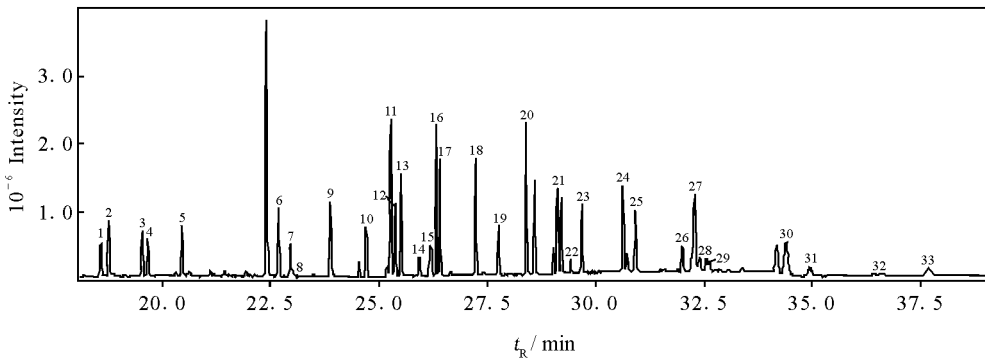


图 1 25 种农药(0.05 mg/L)的标准总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatography of 25 pesticides in standard solution at the concentration of 0.05 mg/L

2 结果与讨论

2.1 QuEChERS 前处理方法

在提取净化分析过程中, pH 值的高低会影响一些农药的降解, 如 *N*-三卤代乙基硫农药(克菌丹、灭菌丹、敌菌丹、抑菌灵、对甲抑菌灵和百菌清)会在碱性环境中发生丢失 SX3 的降解, 三氯杀螨醇会降解为 4, 4'-二氯苯甲酮^[7]。本实验若三氯杀螨醇不在缓冲液体系中提取, 其回收率会降至 60% 左右, 所以用 QuEChERS 处理样品时, 应使用缓冲液体系来防止或降低这些农药的降解。

在加入氯化钠和无水硫酸镁时, 应先加入氯化钠振荡 2 min, 让氯化钠完全溶解, 水相和有机相(乙腈)分层后再加入无水硫酸镁; 若同时加入, 无水硫酸镁瞬间与大量的水接触而结块, 结块里层的无水硫酸镁由于被包裹会降低吸水效果。实验表明, 若除水不彻底, 会降低农药(特别是水溶性农药)转入到乙腈层的效果, 净化效果也会受到影响, 回收率降低。

石墨碳黑能去除部分色素、类胡萝卜素、固醇和具有平面结构等极性大的基质干扰物, 但对仪器检测器识别起干扰作用的脂肪酸去除作用则不大, 所以在蔬菜水果农残测定中, 无法从图谱上看出其去除干扰物的优越性, 示于图 2。但考虑到仪器的维护需要使用石墨碳黑, 因此用量要适量, 否则会吸附一些平面结构的农药(如六氯苯、五氯硝基苯、噻菌灵、蝇毒磷、百菌清、特丁硫磷等^[7])而造成回收率下降。在实验中发现六氯苯由于石墨碳黑(50 mg)的吸附, 回收率会下降 30% 以上。

另外发现分散性 SPE 粉末 C18 对除去干扰基质的能力要差于氨基或 PSA, 氨基和 PSA 能去除一些仪器检测器识别的干扰基质(如脂肪酸等), 这与文献[8]报道一致。由于 PSA 能提供伯氨基和仲氨基, 它与氨基相比其去除干扰物质的范围更广, 所以在蔬菜水果农残测定中 PSA 是首选的。为了加强仪器的维护, 往往在 PSA 的基础上再加一种吸附填料——C18 或 GCB。

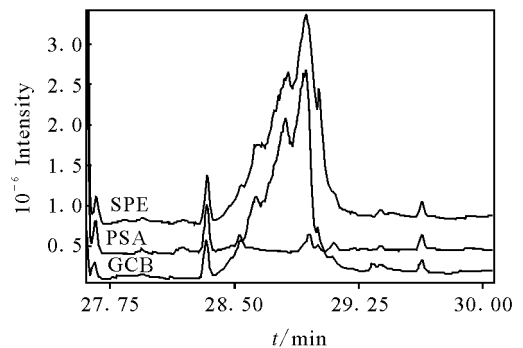


图 2 3 种不同的分散性 SPE 粉末处理样品后的部分色谱图

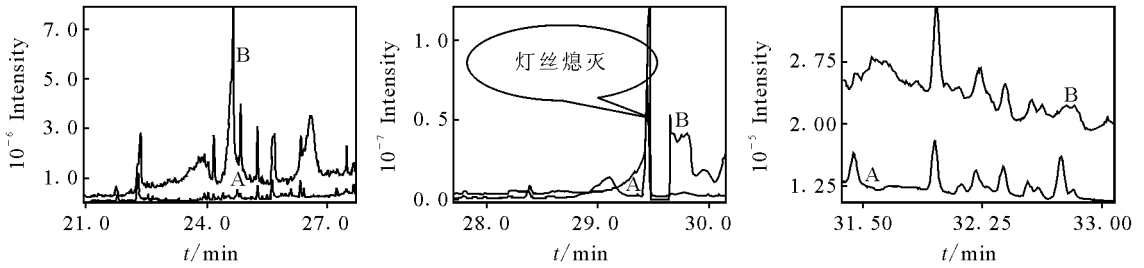
Fig. 2 TIC comparison of samples after cleaning up with 3 different dispersive SPE powers

2.2 GPC/GC/MS 的应用

在黄瓜基质加标样品中, 按照 QuEChERS 方法处理两份样品。一份采用 GPC-GC/MS 分析农药残留, 样品在 GPC 色谱柱中实现了根据相对分子质量的不同, 将油脂、色素成分与农药分离, 通过两个流动通道选择阀的切换, 有效截取含有农药残留部分的馏分(4~6 min), 导入试样定量捕集环(200 μ L), 然后进行程序升温, 进

样口 (PTV) 进样和 GC/MS 分离检测, 实现样品全自动的前处理和仪器分析测定的在线分析; 另一份直接进行 GC/MS 分析。通过比较谱图可知, 直接进样 GC/MS 分析的背景明显高于 GPC/GC/MS。当开启质谱灯丝保护功能时, 由于直接 GC/MS 分析时样品基质没有经过 GPC 净化去除干扰而导致质谱检测过载, 所以常出现电离离子过饱和而灯丝熄灭现象, 示于图 3。

另外, 由于 GPC 具有强去除基质干扰的能力, 黄瓜基质加标样品的 GPC-GC/MS 峰形和强度明显好于 GC/MS, 特别是 *o, p'*-DDT 和氰戊菊酯两个组分, 其图谱示于图 4。所以 GPC-GC/MS 能改善由于基质干扰导致的 GC/MS 灵敏度差、定性和定量不准确等问题, 同时也降低了仪器的维护成本。



注: A. GPC/GC/MS; B. GC/MS

图 3 黄瓜的 GPC/GC/MS 和 GC/MS 农残图谱比较

Fig. 3 Chromatographic comparison of pesticide residues between GPC/GC/MS and GC/MS in the matrix of cucumber

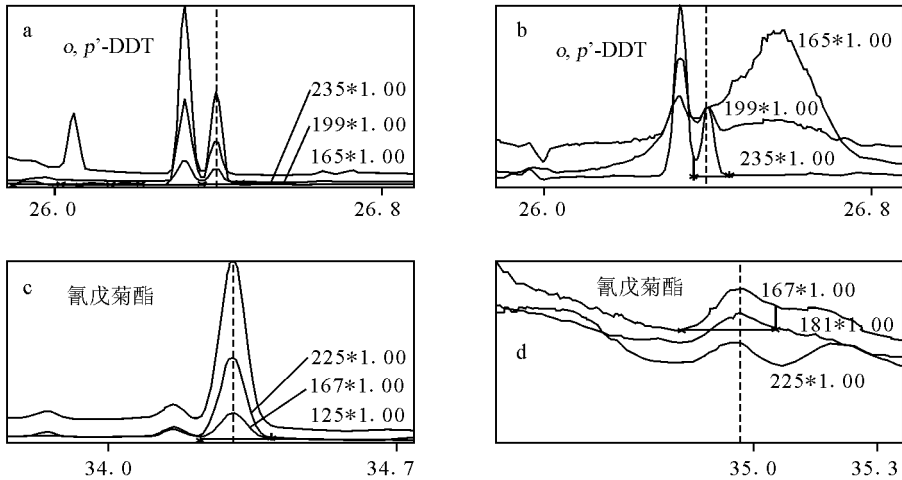
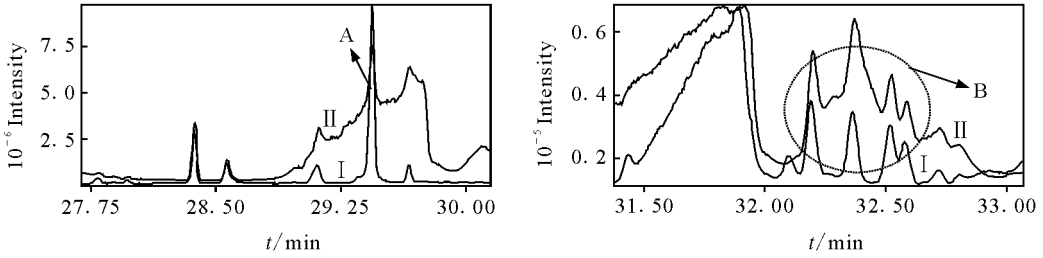


图 4 QuEChERS 方法提取两种农药的 GPC/GC/MS (a, c) 和 GC/MS (b, d) 图谱

Fig. 4 Chromatographic of two pesticide residues between GPC/GC/MS (a, c) and GC/MS (b, d) with QuEChERS method in the matrix of cucumber

QuEChERS 方法的提取液不经过净化直接进行 GPC-GC/MS 分析, 除个别时间段的图谱由于背景过高而影响个别农药 (如三氯杀螨砜和氰戊菊酯) 的定性和定量外, 其他农药均同净化样品一样获得较好的定性定量图谱, 示于图 5, 所以 GPC-GC/MS 法可直接用于蔬菜水果中农

药残留的快速筛选, 特别是应对农药中毒等突发事件。但为了更好地进行农药残留的定性、定量分析, 降低仪器的维护成本, GPC-GC/MS 与 QuEChERS 前处理方法联用可以便利、快速、高效地测定蔬菜水果中的农药残留。



注: A. 三氯杀螨砒; B. 氯氰菊酯

图 5 黄瓜经过 QuEChERS 方法净化(I)和未经过净化(II)的 GPC/GC/MS 农残图谱比较

Fig. 5 Chromatographic of pesticide residues between cleaning up(I) and non cleaning up(II) with QuEChERS method in the matrix of cucumber

2.3 QuEChERS 方法与在线 GPC/GC/MS 联用的加标回收测定

本实验选用菠菜、黄瓜和苹果 3 种样品,按 0.01 mg/kg 添加农药标准,用 QuEChERS 方法进行前处理,添加内标过氧七氯使其浓度为 0.05 mg/L,每个样品重复 5 次,用 GPC-GC/MS 测定,内标法积分,线性相关系数 R 均在 0.99 以上。除硫丹的最低定量限在 0.01 mg/kg

外,其他所有农药均在 0.005 mg/kg,其回收率和相对标准偏差统计结果列于表 2。3 种样品的回收率均在 80% ~ 120%,相对标准偏差均在 20% 以下。但若分散性 SPE 石墨碳黑的添加量增加到 50 mg,六氯苯的回收率会下降到 50% ~ 70%;但若在提取液中加入 1/3 体积的甲苯,回收率则可以提高到 70% ~ 90%。

表 2 3 种样品基质测定的回收率和相对标准偏差($n=5$)

Table 2 Recovery and RSD of pesticide residues in 3 spiked samples using QuEChERS method coupled with GPC/GC/MS

化合物	回收率/%			相对标准偏差/%			化合物	回收率/%			相对标准偏差/%		
	菠菜	黄瓜	苹果	菠菜	黄瓜	苹果		菠菜	黄瓜	苹果	菠菜	黄瓜	苹果
α 六六六	113	110	96	4	6	7	p, p' DDT	109	119	105	8	2	3
六氯苯	82	98	108	3	5	4	联苯菊酯	118	111	108	3	6	5
β 六六六	100	112	93	14	5	6	甲氰菊酯	103	114	104	6	4	4
γ 六六六	105	112	98	4	5	6	三氯杀螨砒	104	112	107	1	4	3
δ 六六六	110	114	103	8	5	3	功夫菊酯 1	95	101	103	5	11	7
艾氏剂	105	110	100	5	4	5	功夫菊酯 2	106	115	102	6	6	6
三氯杀螨醇	113	109	102	5	6	5	氯菊酯 1	115	108	100	3	6	5
七氯	107	99	100	7	12	7	氯菊酯 2	116	108	101	5	7	4
硫丹 I	107	107	104	11	5	5	氯氰菊酯 1	107	112	97	7	7	6
p, p' DDE	115	113	110	4	2	3	氯氰菊酯 2	97	113	103	6	4	4
狄氏剂	113	106	101	4	3	6	氯氰菊酯 3	116	110	104	8	7	7
噻嗪酮	111	118	114	7	1	3	氯氰菊酯 4	85	109	102	5	4	3
异狄氏剂	110	108	107	8	10	4	氰戊菊酯 1	109	107	104	9	10	2
硫丹 II	101	91	102	10	3.9	5	氰戊菊酯 2	111	110	100	4	4	2
p, p' DDD	114	111	108	4	4	5	溴氰菊酯 1	109	106	105	5	5	4
α, p' DDT	115	115	103	4	4	5	溴氰菊酯 2	99	114	102	3	3	3

3 结论

通过 QuEChERS 前处理和 GPC-GC/MS 分析方法,对 3 种蔬菜水果(菠菜、黄瓜和苹果)中的 25 种农药进行分析测定。QuEChERS 方法提取过程中要确保缓冲体系、防止农药的降解,做好除水步骤,让农药向有机相(乙腈)中分配,以获得高回收率;净化步骤中分散性 SPE 去除干扰物能力的顺序为: PSA 或氨基 > 石墨碳黑 > C18, 石墨碳黑会吸附一些平面结构的分子(如六氯苯),所以石墨碳黑的用量要适当(一般 20 mg)。QuEChERS 方法具有快速(处理 8 个样品不超过 30 min)、简单(实验步骤简单,误差来源小)、廉价、溶剂用量低(10 mL 乙腈)、农残范围广(包括非极性、极性和 pH 依赖性农药)和提取溶剂与 GC/MS 仪器兼容性好等优势。GPC 具有强的基质干扰能力,一方面弥补了 QuEChERS 前处理方法去干扰物质不彻底的问题,提高了方法的灵敏度、分析结果的准确性和相关质谱图的匹配性;另一方面把 GPC 净化和 GC/MS 分析检测联用,每个样品的分析时间只比 GC/MS 法多 4~5 min,按每个样品的分析检测时间为 1 h 算,从进样到完成 GPC 色谱柱冲洗仅需要使用 12 mL 有机溶剂。在 0.01 mg/kg 加标情况下,3 种样品(菠菜、黄瓜和苹果)的回收率均在 80%~120%,相对标准偏差均在 20% 以下。

参考文献:

- [1] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER D. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues[C]. 18th Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium Proceedings, 2002: 231-241.
- [2] SCHENCK F J, HOBBS J E. Evaluation of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2004, 73(1): 24-30.
- [3] HERCEGOV A, KRUIZ D, MATISOV E. Comparison of sample preparation methods combined with fast gas chromatography mass spectrometry for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food[J]. J Sep Sci, 2006, 29(8): 1 102-1 109.
- [4] LIU L B, HASHI Y, QIN Y P. Development of automated online gel permeation chromatography-gas chromatography mass spectrometry for measuring multiresidual pesticides in agricultural products[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 845(1): 61-68.
- [5] SCHENZLER C, THEIR H P. European standardization of methods for pesticide residue analysis in foods-current status[J]. Food Additives and Contaminants, 2001, 18(10): 875-879.
- [6] Director Notice of Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Analytical methods for residual compositional substances of agricultural chemicals, feed additives, and veterinary drugs in food[S]. Syokur An No. 0124001, 2005, Final amendments were made on May 26, 2006.
- [7] MAŠTOVSKÁ K, LEHOTAY S J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1 040(2): 259-272.
- [8] SCHENCK F J, LEHOTAY S J, V VEGA. Comparison of solid phase extraction sorbents for cleanup in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables[J]. J Sep Sci, 2002, 25(14): 883-890.