

大米中环己烯酮类除草剂 残留量的测定

陈 丽¹ 杨长志² 程 阳² 刘 永² 吴 岩²

(1.哈尔滨市鱼苗繁育试验场,黑龙江 哈尔滨 150046 2.黑龙江出入境检验检疫局,黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要 建立了大米中环己烯酮类除草剂残留量同时测定的液相色谱-质谱/质谱法。试样中残留的环己烯酮类除草剂用酸性乙腈高速匀浆提取,提取液经 N-丙基乙二胺(PSA)、十八烷基硅烷(ODS)和石墨化炭黑净化,用液相色谱-质谱/质谱仪检测和确证,外标法定量。环己烯酮类除草剂的浓度在 0.0025~0.1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内时,线性关系良好,8 种环己烯酮类除草剂的相关系数为 0.9947~0.9992。在 0.005~0.050 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度范围内,样品平均加标回收率在 73.2%~107.0% 之间,相对标准偏差为 5.14%~10.15%。8 种环己烯酮类除草剂的最低检出限均为 0.005 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

关键词 环己烯酮类除草剂;液相色谱-质谱/质谱;动物源食品

中图分类号 :TQ457.2

文献标识码 :A

Determination of cyclohexanediones herbicide residues in rice

CHEN Li¹, YANG Chang-zhi², CHENG Yang², LIU Yong², WU Yan²

(1. Harbin Fry Breed Experimental Station, Harbin 150046, China; 2. Heilongjiang

Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China)

Abstractor: A method has been developed for the determination of cyclohexanediones herbicide residues in rice. The cyclohexanediones herbicide residues in the test sample are extracted with acidic acetonitrile by means of high speed homogenization. The residues is cleaned up by primary secondary amine (PSA), octadecylsilane(ODS) and graphitized carbon black. The residues is determined and confirmed by LC-MS/MS, using external standard method. The liner range was 0.0025~0.100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for cyclohexanediones herbicide. The correlation coefficients were 0.9947~0.9992 for the eight cyclohexanediones herbicide. The average recoveries of cyclohexanediones herbicide in spiked samples ranged from 73.2%~107.0%, and the relative standard deviations were between 5.14%~10.15% at spiked levels of 0.005~0.050 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The limit of detection was 0.005 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for the eight cyclohexanediones herbicide.

Key words cyclohexanediones herbicide; LC-MS/MS; animal-derived food

环己烯酮类(Cyclohexanediones)或环己二酮类除草剂是由日本曹达公司发现的一类具有选择性的内吸传导型茎叶处理剂^[1]。具有低毒、高效、杀草谱广和适用作物广等特点^[2]。自 1978 年第一个品种禾草灭问世以来,到目前为止共有 10 个品种商品化,它们是禾草灭、烯禾啶、噁草酮、烯草酮、三甲苯草酮、丁苯草酮、吡喃草酮、环苯草酮、Cloproxydim 和 CGA215684。除环苯草酮为水田除草剂外,其它均为旱田除草剂。为了保护人类健康,各国政府对食品中环己烯酮类除草剂残留量的检测都很重视,均制定了严格的限量要求。日本、美国、韩国、澳大利亚、加拿大、意大利、以色列和食品法典委员会等

国在各类食品中最高残留限量在 0.01~10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间。尤其日本政府于 2006 年 5 月 29 日实施了“肯定列表制度”,所要求的检测项目日益增多,残留限量要求越来越严,对我国出口食品将产生极大影响。为了破解这一难题,研究和探讨动物源食品中上述农药残留快速准确的分析方法变得极为迫切,而国外对大米中环己烯酮类除草剂的残留检测方法尚未见报道,国内报道^[3-5]为单残留检测方法,主要为液相色谱法和紫外分光光度法。本研究的关键是采用 QuEChERS 净化法^[6-10],即针对大米样品基质在提取液中直接加入 PSA 吸附剂粉末、ODSC₁₈ 或石墨炭黑粉进行净化,经离心后上清液于液相色谱-质谱/质谱联用仪检测,取得了满意的结果。该方法具有快速、灵敏、准确等特点,能满足国内外检测限量要求。

收稿日期 2010-01-18

作者简介 陈 丽(1963-)女,工程师。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙酸、甲酸、乙酸钠、NaCl 均为分析纯;乙腈(C. R.) 无水 MgSO_4 (A.R.) 经 650°C 灼烧 4 h,置于干燥器内备用;石墨化炭黑吸附剂($120\sim 400\ \mu\text{m}$);N-丙基乙二胺(PSA)吸附剂($40\sim 100\ \mu\text{m}$);十八烷基硅烷(ODS)键合相($40\sim 100\ \mu\text{m}$);环己烯酮类标准品:烯草酮(Clethodim),CAS:99129-21-2,纯度大于等于 99%;吡喃草酮(Tepaloxymid)CAS:149979-41-9,纯度大于等于 99%;噻草酮(Cycloxydim),CAS:101205-02-1,纯度大于等于 93.5%;三甲苯草酮(Tralkoxydim),CAS 87820-88-0,纯度大于等于 93.5%;禾草灭(Alloxydim-sodium)CAS 55635-13-7,纯度大于等于 98%;环苯草酮(Profoxydim-lithium),CAS:139001-49-3,纯度大于等于 98.5%;丁苯草酮(Butroxydim),CAS138164-12-2,纯度大于等于 99%;稀禾定(Sethoxydim)CAS:74051-80-2,纯度大于等于 99%。以上标准品均购于德国 Sigma-Aldrich 公司;

环己烯酮类标准储备溶液:准确称取适量环己烯酮类的标准品,用乙腈溶解并定容至 100mL 棕色容量瓶中,得浓度为 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准储备溶液,此溶液避光储存;

混合标准中间溶液:准确吸取环己烯酮类的标准储备溶液各 2.5mL 于 50mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释成浓度为 $5.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准中间溶液,此溶液避光储存。

混合标准工作溶液:根据需要使用前用空白样品基质配制适当混合标准工作溶液。

液相色谱—质谱/质谱联用仪(配 ESI 电离源);电子天平;离心机;漩涡混合器;氮吹仪;均质器。

1.2 分析条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C_{18} , $50\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}(\text{i.d.})$,粒度 $1.7\ \mu\text{m}$;流动相:梯度洗脱程序见表 1;流速 $0.25\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温 30°C ;进样量 $5\ \mu\text{L}$ 。

1.2.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源;扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测;离子源温度 110°C ;去溶剂气流量: $550\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, N_2 ;去溶剂温度: 350°C ;锥孔气流量 $50\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, N_2 ;碰撞气压力: $0.33\ \text{Pa}$, Ar,纯度 $\geq 99.999\%$;毛细管电压: $3.0\ \text{kV}$;定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞气能量见表 2。

表 1 梯度洗脱程序表

Tab.1 Gradient program of mobile phase

时间 /min	0.02%甲酸水溶液 /%	乙腈 /%
0.25	60	40
1.50	60	40
1.60	40	60
2.00	40	60
3.00	20	80
4.50	20	80
5.00	60	40
6.00	60	40

表 2 8 种环己烯酮类除草剂的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞气能量

Tab.2 MRM transitions of p recursor/product ion for qualitative and quantitative analysis, cone voltage, collision energy of 8 cyclohexanediones herbicide

复合物	定性离子对 / $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$	定量离子对 / $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$	锥孔电压 /V	碰撞气能量 /V
吡喃草酮	342.4/166.1	342.4/250.3	22, 22	21, 14
禾草灭	342.4/250.3	324.7/266.5	266.5/324.7	23, 23
噻草酮	326.4/180.2	326.4/280.3	326.4/280.3	20, 20
烯草酮	360.2/164.1	360.2/268.3	360.2/268.3	24, 24
稀禾定	328.3/178.1	328.3/282.2	328.3/178.1	12, 12
丁苯草酮	400.4/138.1	400.4/354.3	400.4/354.3	28, 28
三甲苯草酮	330.3/137.9	330.3/284.2	330.3/284.2	24, 24
环苯草酮	466.2/180.2	466.2/280.3	466.2/280.3	25, 25

1.3 样品前处理

称取试样 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 螺旋盖聚丙烯离心管中,加入 10 mL 水,于漩涡混合器上混合 30s,放置 15min。加入无水 MgSO_4 3g、NaCl 1g、乙酸钠 1g 和 1%乙酸乙腈溶液 15mL,用均质器以 $10000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 均质 2min, $4000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。将上清液转移至 25 mL 容量瓶中。再用 1%乙酸乙腈溶液 10mL 重复提取一次,合并提取液于同一 25mL 容量瓶中,并用乙腈定容至刻度,待净化。

移取 8mL 上述提取液于 15mL 螺旋盖聚丙烯离心管中,加入无水 MgSO_4 300mg、PSA250mg 和 ODS 500mg 鸡肝提取液(还需要加入石墨化炭黑 10mg),在漩涡混合器上混合 2min, $4000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5min。准确移取 5mL 净化液于 15mL 玻璃具塞离心管中,经 60°C 氮吹仪吹干后,用 60%乙腈水溶液溶解并定容 1.0mL,过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜,供液相色谱—质谱/质谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 测定方法的选择

从环己烯酮类农药化学结构式中可以看出,它

们是一类热不稳定化合物,很难采用气相色谱法-检测器(NPD 或 FPD)测定其残留量,我国检验检疫行业标准(SN 0596-1996)将残留物氧化,采用气相色谱仪附火焰光度检测器(FPD)测定玉米中稀禾啉残留量,这种方法不能将具有相同结构的化合物(烯草酮)区分开来,而且其检测限为 $0.04\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,不能满足国外检验限量($0.01\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)要求。国标(GB/T19648-2006、GB/T19649-2006、GB/T19650-2006)采用 GC-MS 只测定稀禾啉、噁草酮、烯草酮、三甲苯草酮这几种农药残留量,其检出限都大于 $0.025\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,不能满足国外检验限量($0.01\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)要求。国标(GB/T20769-2006、GB/T20770-2006、GB/T20772-2006)采用 LC-MS/MS 只测定吡喃草酮、稀禾啉、噁草酮、烯草酮、三甲苯草酮这几种农药残留量,其检出限都大多能满足 $0.01\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 要求,少数也有大于限量 $0.01\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。国外文献大多采用 LC 或 LC-MS/MS 测定环己烯酮类的几种农药残留量。所以本标准最后选用 LC-MS/MS 进行研究,经实验本方法的测定低限为 $0.005\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,完全能满足日本肯定列表“一律标准 $0.01\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ”要求。

2.2 提取溶剂的选择

环己烯酮类农药有些易溶于水、有些微溶于水,大多易溶于乙腈、苯、甲醇、丙酮和乙酸乙酯等有机溶剂,其 $\text{pKa}<5.91$,为弱酸性除草剂,同时又根据 Anastassiades 和 Lehotay 等研究建立的 QuEChERS (quick、easy、cheap、effective、rugged safe)的方法,即用含 1% HAc 的乙腈对样品进行浸提,所以本方法选用酸性乙腈作为提取剂。主要考虑到乙腈一方面能沉淀蛋白质而脂肪提出又很少,又有利于后续的盐析和净化。

2.3 净化方法的选择和优化

分散固相萃取净化技术路线来源于近年来国际上普遍采用的多残留检测前处理技术 QuEChERS。2002~2005 年,欧盟每年已有超过 100 个实验室参加这种方法验证实验的巡回赛,证明这种方法在实验室间取得成功,同样,这种方法首次被美国 AOAC (2007.01)方法所采纳。PSA(primary secondary amine,伯仲胺)吸附剂能有效去除样本中的脂肪酸、极性色素、糖类物质等极性基质杂质, C_{18} 吸附剂能去部分脂肪和脂溶性杂质。试验对添加 PSA 和 C_{18} 的量进行了优化,结果发现,PSA 添加 250 mg, C_{18} 添加 500 mg 即可达到净化效果,继续添加,样液无明显改善,不过对回收率影响也不大。故本方法中添加 PSA 250mg 和 C_{18} 500mg。

2.4 色谱柱和流动相的选择

文献和标准上报道,分析环己烯酮类残留量常用的色谱柱为 C_{18} 液相色谱柱。本试验选择了 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 液相色谱柱($50\text{mm}\times 2.1\text{mm}$ (i.d.), $1.7\mu\text{m}$) 和 ACQUITY UPLC BEH Phenyl ($50\text{mm}\times 2.1\text{mm}$ (i.d.), $1.7\mu\text{m}$) 液相色谱柱进行了实验。结果表明,ACQUITY UPLC BEH C_{18} 液相色谱柱无论在分离度,还是在灵敏度上都优于 ACQUITY UPLC BEH Phenyl 液相色谱柱。对于流动相,我们选择了 4 种不同溶剂配比:水-乙腈、乙酸铵水溶液(pH 3.0)-乙腈、0.1%乙酸-乙腈、0.1%甲酸-乙腈。试验表明:采用水-乙腈、乙酸铵水溶液(pH 3.0)-乙腈这两种流动相,环己烯酮类化合物的峰形不好,对于 0.1%乙酸-乙腈、0.1%甲酸-乙腈这两种流动相,环己烯酮类化合物的出峰时间和峰形都比较理想,但 0.1%甲酸-乙腈流动相要好于 0.1%乙酸-乙腈。在重复进样过程中,又发现灵敏度逐渐有所下降,可能是流动相的酸度太高引起的,后来改变 0.1%甲酸浓度为 0.02%甲酸时,灵敏度没有逐渐下降现象,所以本实验方法的流动相选择为 0.02%甲酸-乙腈。

2.5 标准曲线和最低检出限

根据环己烯酮类除草剂的灵敏度,配制一系列不同浓度的 8 种环己烯酮类除草剂的标准工作溶液,在选定的色谱条件和质谱条件下进行测定,进样 $5\mu\text{L}$,用峰面积对标准工作溶液中被测组分的浓度作图,其线性范围、线性方程、线性相关系数和最低检出限见表 3。

表 3 环己烯酮类除草剂的色谱保留时间、回归方程、线性关系及检出限

Tab.3 Retention time, linear relationships, detection limits of cyclohexanediones herbicide

复合物	t/min	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回归方程	r	LOD / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
吡喃草酮	2.83	0.0025~0.1000	$A=1254.2C+521.5$	0.9996	5
禾草灭	3.40	0.0025~0.1000	$A=1261.5C+494.3$	0.9996	5
噁草酮	3.81	0.0025~0.1000	$A=2130.3C+2366.8$	0.9989	5
烯草酮	3.89	0.0025~0.1000	$A=1180.5C+1481.5$	0.9973	5
稀禾定	4.05	0.0025~0.1000	$A=1473.1C+1822.9$	0.99985	5
丁苯草酮	4.08	0.0025~0.1000	$A=697.2C+1075.1$	0.9980	5
三甲苯草酮	4.17	0.0025~0.1000	$A=3319.7C+6164.2$	0.9978	5
环苯草酮	4.83	0.0025~0.1000	$A=1917.5C+2074.9$	0.9986	5

2.6 方法的回收率、精密度

本方法以大米为研究对象,采用添加法进行了 3 个水平的回收率试验,其回收率、精密度的结果见

表 4。

表 4 大米中环己烯酮类除草剂的回收率、精密度($n=10$)

Tab.4 Recoveries and relative standard deviations of cyclohexanediones herbicide in pig meat ($n=10$) compound

复合物	峰值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
吡喃草酮	5	75.20~101.00	9.72
	10	81.30~103.80	8.93
	50	77.04~102.64	10.16
禾草灭	5	76.80~101.00	7.59
	10	75.60~101.40	8.24
	50	80.52~102.14	9.95
噻草酮	5	76.40~102.20	8.20
	10	81.70~107.00	9.16
	50	79.40~102.20	9.73
烯草酮	5	76.40~105.00	9.42
	10	75.90~94.10	6.76
	50	73.24~94.58	10.15
稀禾定	5	84.00~103.60	8.30
	10	88.20~103.20	5.14
	50	82.06~104.34	6.19
丁苯草酮	5	83.12~105.60	8.30
	10	80.00~98.40	5.14
	50	79.46~100.62	6.19
三甲苯草酮	5	78.60~102.20	5.94
	10	81.20~104.20	7.84
	50	87.12~103.76	8.20
环苯草酮	5	82.20~104.20	6.45
	10	74.20~101.00	8.24
	50	78.76~94.84	8.47

由表 4 可以看出,8 种环己烯酮类除草剂在 $5\sim 50\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度范围之间,方法的回收率在 70%~120%之间,精密度均小于 15%,符合残留分析的要求。大米空白样品标准色谱图见图 1。

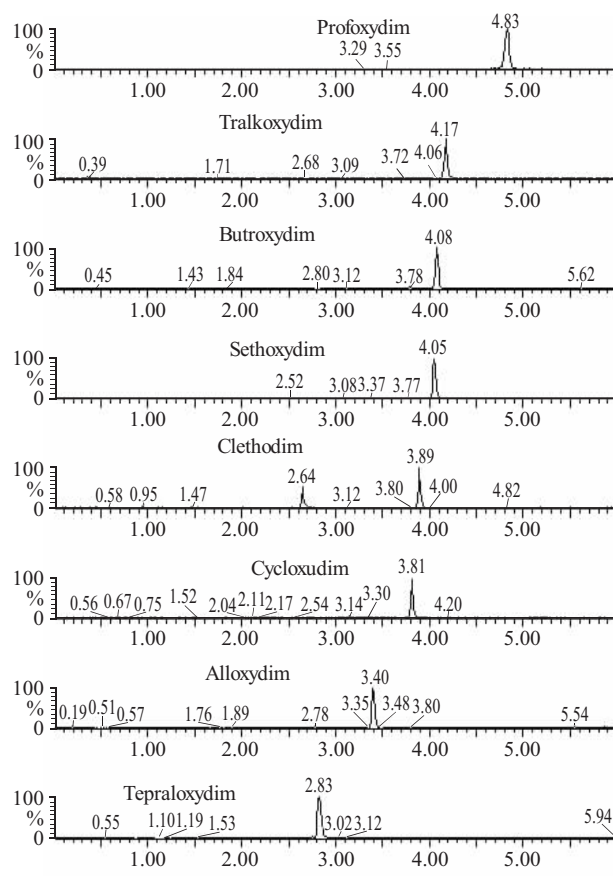


图 1 环己烯酮类标准品多反应监测色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of the cyclohexanediones standard

3 结论

本文采用改良的 QuEChERS 净化法,以液相色谱-串联质谱研究了大米中环己烯酮类除草剂残留量,色谱峰分离效果好,步骤简单,操作性强,具有良好的准确度和精密度,应用于实际样品检测,效果理想。实验证明,QuEChERS 方法作为一种快速高效的样品处理技术,完全可以应用到大米中农药残留检测的领域。

该方法回收率在 70%~120%之间,相对标准偏差均小于 15%,检出限 $5.0\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,符合残留分析的要求。该方法的建立,能满足日本肯定列表和欧盟对食品安全检测的要求。

参 考 文 献

- [1] 刘长令.环己烯酮类除草剂的创制经纬[J].农药,2002,41(6):46.
- [2] 杨博友.环己烯酮类除草剂[J].农药,1991,30(1):48-50.
- [3] 李优琴,陈明,曹其钢,李荣林.高效液相色谱法测量蔬菜水果中稀禾定的残留[J].盐城工学院学报,2007,20(4):52-54.
- [4] 陈玮瑄,逯志斌,刘伊玲.油菜籽中稀定及其主要活性代谢产物

(下转第 47 页)

发了油田废水外排量的逐年上升,使得油田生态环境急剧恶化。为了平衡油田污水的供、注矛盾,保护油田的生态环境,必须对含聚合物(PAM)的污水进行有效的处理。目前,对此类污水采用微生物处理法是行之有效的措施。

在有氧的条件及适宜的环境中,含油污水中的溶解性有机物透过细菌的细胞壁被细菌所吸收,固体和胶体等不溶性有机物先是附着在细菌体外,由细菌所分泌的一种特殊酶分解成可溶性物质,再渗入细胞体内,从而细菌通过自身的生命过程——氧化、还原、合成等把复杂的有机物降解成简单的无机物(H_2O 和 CO_2 等),放出的能量作为自身生存与繁殖的生命之源^[8]。在适宜的条件($15\sim 40^\circ C$)下微生物便以有机物为营养,实现生命的新陈代谢,达到净化废水的目的,对环境没有二次污染。

用来处理含聚物废水的微生物有硫酸盐还原菌、假单胞菌属中的产碱假单胞菌等。作为自然环境中常见的土著菌,产碱假单胞菌在简单的有机化合物为碳源和能源的培养基中即可生长,因此,在各种环境中均有很强的竞争力,可广泛应用于水处理工程。

6 结语

本文简略的介绍了目前微生物在污水处理方面的主要用途以及简单原理。在工业化进程不断加快的今天,随着污水排放量的不断增加和污染物种

类的愈加复杂,微生物在水环境保护方面的作用已经变得异常重要,这就更加要求这方面技术的不断更新和发展。如今,研究微生物降解转化污染物的机理已经深入到基因DNA的分子水平,从基因DNA组成结构的变化追溯到相关的生理生化变化及其代谢功能的变化已经成为研究的热点。在未来的研究中,如能将计算机相关软件、遥感技术、生物反应器等各种技术更加完善的利用在微生物水处理工程方面,将会更有利地推动该学科快速发展。

参 考 文 献

- [1] 李军,杨秀山.微生物与水处理工程[M].北京:化学工业出版社,2003.1-7.
- [2] 朱怀兰,徐亚同.SBR除磷系统中的积磷细菌[J].上海环境科学,1994,13(4):16-19.
- [3] 汪志国,李国刚.水中氮类污染物的联系与区别[J].干旱环境监测,2003,17(1):15-17.
- [4] 董金义,任绍娟.简析垃圾卫生填埋场恶臭治理[J].环境卫生工程,2007,15(3):50-51.
- [5] A.M. Jiménez-Rodríguez, M.M. Durán-Barrantes, Heavy metals removal from acid mine drainage water using biogenic hydrogen [J].Journal of Hazardous Materials sulphide and effluent from anaerobic treatment: Effect of pH,2008,251:7-14.
- [6] 王岚,杜郢.生物吸附剂及其应用[J].江苏工业学院学报,2006,18(3):61-64.
- [7] 胡厚堂,王海宁.生物吸附法处理水体中的重金属的现状与展望[J].环境技术,2004,(1):17-19.
- [8] 岳战林,蒋平安.石油类污染物的特性及环境行为[J].石化技术与应用,2006,24(4):308-312.
- [9] Masahiro OKIHASHI, Yoko KITAGAWA, Kazuhiko AKUTSU, Hirotaka OBANA and Yukio TANAKA. Rapid Method for the Determination of 180 Pesticide Residues in Foods by Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection [J]. J. Pestic. Sci., 2005, 30(4): 368-377.
- [10] 董静,宫小明,张立,孙军,王洪涛. QuEChERS - 高效液相色谱法同时检测动物组织中的克球酚、地克珠利和磺胺类药物残留量[J].中国卫生检验杂志,2008,18(1):26-27.
- [11] 胡西洲,程运斌,胡定金.农药多残留分析中 QuEChERS 方法介绍[J].现代农药,2006,5(4):24-29.
- [12] Steven J. Lehotay. Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe Approach for Determining Pesticide Residue [M]. Lehotay. Methods in Biotechnology, Totowa, NJ: Humana Press Inc. 239-261.

(上接第34页)

的残留分析[J].色谱,1992,10(6):371-372.

- [5] 逯忠斌,刘伊玲,徐威.12%稀禾定机油乳油在甜菜上的残留动态研究[J].吉林农业大学学报,1993,15(4):54-58.
- [6] M Anastassiades, S.J. Lehotay and D. Stajnbaher, Quick Easy Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for the Determination of Pesticide Residues [M]. In "18th Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium Proceedings" 2002:231-241.
- [7] Steven J. Lehotay. Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe Approach for Determining Pesticide Residue [M]. Lehotay. Methods in Biotechnology, Totowa, NJ: Humana Press Inc. 239-261.