

固相萃取-全二维气相色谱/飞行时间质谱 同步快速检测蔬菜中 64 种农药残留

姜俊^{1,3} 李培武^{*1,2,3} 谢立华¹ 丁小霞^{1,2} 李英^{1,3}
王秀嫔^{1,3} 汪雪芳^{1,3} 张奇^{1,3} 管笛^{1,3}

(中国农业科学院油料作物研究所¹, 农业部油料作物生物学重点开放实验室²
农业部油料及制品质量监督检验测试中心³, 武汉 430062)

摘要 建立了蔬菜中 64 种农药残留固相萃取-全二维气相色谱-飞行时间质谱(GC × GC-TOF-MS) 的测定方法。用乙腈提取样品, NH₂-SPE 固相萃取柱净化, 甲醇-二氯甲烷溶液(5: 95, V/V) 洗脱, 氮气吹扫浓缩, 丙酮定容, 全二维气相色谱(HP-5MS 柱和 DB17ht 柱)-飞行时间质谱检测, 基质曲线外标法定量。本方法的检出限(S/N = 3) 和定量限(S/N = 10) 范围分别为 0.010 ~ 6.032 μg/kg 和 0.035 ~ 20.107 μg/kg。64 种农药在油菜薹、黄瓜、茄子、四季豆和辣椒中的回收率范围为 68.3% ~ 117.8%。相对标准偏差为 0.6% ~ 9.1%。采用本方法检测市场中样品, 发现 2 例样品中含乙酰甲胺磷和氯氰菊酯残留, 测定值分别为 0.036 和 0.107 mg/kg。

关键词 全二维气相色谱-飞行时间质谱; 农药残留; 蔬菜

1 引言

我国是世界上最大的蔬菜生产和消费国, 也是最早使用农药国家之一^[1], 农药在十字花科蔬菜上登记的产品非常多, 到 2008 年 2 月初, 已有 3496 个品种^[2]。作为十字花科蔬菜, 随着油菜两用品种育成, 油菜两用油菜已由早期的尝试性栽培发展成为产业化栽培^[3], 蔬菜中的农药残留问题备受关注。农药残留的检测方法主要有气相色谱法(GC)^[4]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS) 及超高效液相-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[5,6]。利用 GC 和 HPLC 检测时, 依据农药结构和性质不同, 采用不同预处理方法。例如, 文献[7]采用 GC 和 HPLC 测定了蔬菜和水果中 105 种农药残留; 文献[8]用 GC-MS 和 LC-MS/MS 检测, 对农药分组进行选择离子扫描; 杨琳等^[9]以正己烷-丙酮(1: 1, V/V) 为萃取溶剂, 采用加速溶剂萃取-液相色谱-串级质谱测定方法检测拟除虫菊酯农药; 佟玲等^[10]用 GC-MS 测定了含硫蔬菜中 50 种农药残留; 柳茵等^[11]采用 LC-MS/MS 测定了蔬菜中 26 种农药残留; 吴岩等^[12]采用固相萃取-在线凝胶渗透色谱-气相色谱/质谱法测定板栗中 44 种有机磷农药残留。全二维气相色谱(GC × GC) 具有高分辨、高灵敏度、高峰容积等优势, 特别适合分析复杂体系^[13]。飞行时间质谱(TOF-MS) 具有高采集频率, 是目前唯一可以与 GC × GC 很好匹配的质谱技术^[14]。GC × GC-TOF-MS 已应用于石化、烟草、酿酒、天然产物等领域的研究^[15,16]。本研究采用固相萃取-GC × GC-TOF-MS 同步快速检测 5 种蔬菜中 64 种农药残留, 此方法缩短了检测时间, 可应用于农药残留的定性与定量分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Leco Pegasus4D GC × GC-TOF-MS(美国 Leco 公司); Agilent7890 二维气相色谱、HP-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)、DB17ht(1.7 m × 0.1 mm × 0.1 μm) 均购自美国 Agilent 公司; ULTRA-TURRAX T50 型高速匀质器(德国 IKA 公司); 氮气浓缩仪(美国 Organomation 公司); NH₂-SPE 固相萃取柱(500 mg, 美国 Agilent 公司); Cleanert PestiCarb-SPE(天津 Agela Technologies 公司)。

2010-06-24 收稿; 2010-09-06 接受

本文系国家科技支撑计划(No. 2009BADB9B03-Z09) 和武汉市青年科技晨光计划(No. 200950431224) 资助

* E-mail: peiwuli@oilcrops.cn

甲醇(HPLC纯, J. T. Baker公司); 乙腈、丙酮、二氯甲烷(HPLC纯, Fisher公司); NaCl(国药集团化学试剂有限公司)。29种有机磷类农药、27种有机氯类农药、8种氨基甲酸酯类农药、环氧七氯(国家标准物质中心)。

2.2 色谱-质谱条件

柱系统: 一维柱为 HP-5MS, 二维柱为 DB17ht; 载气: He; 流量: 2.0 mL/min; 进样口温度: 290 °C, 升温程序: 初温 80 °C, 以 30 °C/min 升至 130 °C 后, 以 10 °C/min 升至 300 °C, 恒温 8 min; 液氮冷喷调制, 调制周期: 6 s; 不分流进样; 进样体积: 2.0 μL。

运行时间: 26.17 min; 溶剂延迟: 4 min; 离子源温度: 250 °C; 传输线温度: 280 °C; 扫描起止质量数: 50 ~ 550 amu; 采集速率: 每秒采集 100 张信号图; 检测电压: 1700 V; 电离电压: -70 V。

数据处理: PegasusIII(美国 Leco 公司), 识别信噪比大于 10 的色谱峰, 质谱阈值为 10, 检索谱库: NIST/PEST H2/PEST He。

2.3 样品预处理

为了优化提取溶液、固相萃取柱、洗脱溶液的组合, 设计 4 种实验方法: 方法(1) 称取 25 g 试样于 100 mL 试管中, 加入 50 mL 乙腈, 以 12000 r/min 匀浆 2 min, 滤入 50 mL 离心管, 滤液中加 15 g NaCl, 匀浆 1 min, 以 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液 10 mL 于刻度试管, 40 °C 氮吹近干, 以甲醇-二氯甲烷溶液(5:95, V/V) 定容至 2 mL, 待净化。以 2 mL 甲醇-二氯甲烷溶液(5:95, V/V) 活化 NH₂-SPE 柱, 转入样液, 以 2 mL 甲醇-二氯甲烷溶液(5:95, V/V) 洗涤样液瓶并转入 NH₂-SPE 柱, 重复此操作 4 次, 收集全部流出液, 45 °C 氮吹近干, 以丙酮定容至 5 mL, 过 0.22 μm 滤膜, 待测。方法(2) 乙腈提取, 石墨碳黑-NH₂-SPE 串联柱净化, 以乙腈-甲苯(3:1, V/V) 洗脱。方法(3) 丙酮提取, 正己烷和二氯甲烷液-液萃取后, 旋转浓缩^[17]; 方法(4) 二氯甲烷提取, NH₂-SPE 柱净化, 以甲醇-二氯甲烷溶液(5:95, V/V) 洗脱。

3 结果与讨论

3.1 样品预处理方法选择

按 2.3 节 4 种实验方法操作后, 对 64 种农药在油菜薹的添加回收率进行测定, 结果如表 1 所示。采样方法(2) 33 种农药的回收率为 70% ~ 120%, 占总数 51.6%; 采用方法(3) 51 种农药的回收率为 70% ~ 120%, 占总数 79.7%; 采用方法(1) 或(4) 63 种农药的回收率全部处于 70% ~ 120%, 占总数 98.4%, 但方法(4) 使用了大量有机氯试剂; 因此, 本研究选择方法(1) 对样品进行预处理。

表 1 4 种提取净化方法对油菜薹中添加 64 种农药回收率的统计分析

Table 1 Recoveries of spiked 64 pesticides in brassica campestris with four cleaning methods

回收率范围 Recoveries range	Method 1		Method 2		Method 3		Method 4	
	样品数量 Number of samples	占样品总数 比例 Percentage of the total (%)						
<70%	1	1.4	31	48.4	8	12.5	1	1.4
70% ~ 120%	63	98.4	33	51.6	51	79.7	63	98.4
>120%	0	0.0	0	0.0	5	7.8	0	0.0

3.2 全二维气相色谱/飞行时间质谱条件优化

3.2.1 柱系统 使用 GC × GC 时, 待测物在非极性的一维柱上按沸点规律分离, 经调制器聚焦后以脉冲方式进入中等极性的二维柱按物质极性分离。本实验中农药极性具有差异但都不强, 选择 HP-5MS 和 DB17ht 的柱系统。如图 1 所示 4 种异构体 α-666, δ-666, β-666 和 γ-666 的色谱峰分离效果好, 质谱图与谱库相似度达 92.7%。

3.2.2 升温程序 优化升温程序、载气流量和调制周期。确定初温 80 °C, 以 30 °C/min 升至 130 °C 后, 以 10 °C/min 升至 300 °C, 恒温 8 min; 载气流量为 2.0 mL/min 和 6 s 的调制周期时能将待测农药有效富集与分离。如图 2 所示, α-666, δ-666, β-666, γ-666 和 P, P'-DDE, P, P'-DDT, P, P'-DDD, O, P'-DDT 两组同分异构体得到很好分离。根据待测农药分子量大小, 选择质谱扫描起止质量数为 50 ~ 550 amu。

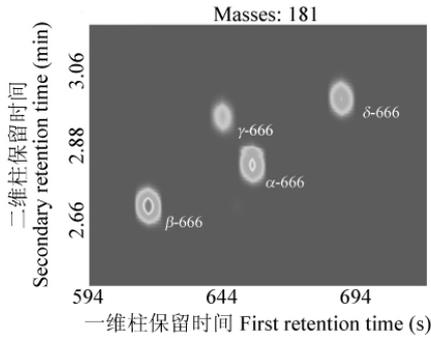


图 1 4 种异构体 α -666, δ -666, β -666 和 γ -666 的质谱图

Fig. 1 Mass chromatogram of trichlorfon isomers (α -666, δ -666, β -666 and γ -666)

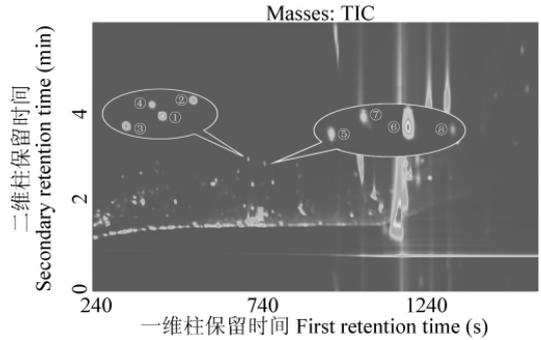


图 2 油菜薹中添加 64 种农药(浓度: 0.1 mg/kg) 的总离子流图 (圈内为局部放大图)

Fig. 2 TIC chromatogram of spiked 64 pesticides (0.1 mg/kg) in brassica campestris (Drawing of partial enlargement in the circle)

1. α -666; 2. δ -666; 3. β -666; 4. γ -666; 5. P, P' -DDE; 6. P, P' -DDT; 7. P, P' -DDD; 8. O, P' -DDT

3.3 方法学验证

3.3.1 检出限(LOD)和定量限(LOQ) 在基质空白样品中添加标准溶液, 计算检出限和定量限。以信噪比 $S/N=3$ 确定方法检出限为 0.010 ~ 6.032 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 以信噪比 $S/N=10$ 确定方法定量限为 0.035 ~ 20.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (见表 2, 详表见 <http://www.analchem.cn/table/100652.pdf>) 满足我国农药残留监控的要求。

表 2 多种农药的保留时间、特征离子、标准曲线、线性范围、相关系数(r)、检出限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$) (简表)
Table 2 Retention time, quantify mass m/z , standard curve, linear ranges, correlation coefficients(r), limits of detection ($S/N=3$), limits of quantification($S/N=10$) of some pesticides(brief table)

农药种类 Pesticide	特征离子 Quantify mass (m/z)		标准曲线 Standard curve	线性范围 Linear ranges ($\mu\text{g}/\text{L}$)	相关系数 Linear ranges (r)	检出限 LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	I	II						
有机磷类 organophorus(29 种)								
敌敌畏 Dichlorvos	318	2.06	109	$Y=1.16541 \times 10^8 X + 101502$	0.44 ~ 90	0.9814	0.010	0.035
乙酰甲胺磷 Acephate	432	3.04	136	$Y=5.96089 \times 10^6 X - 18309$	3.80 ~ 100	0.9952	0.697	2.3
乐果 Dimethoate	630	3.35	87	$Y=1.88487 \times 10^7 X - 6030.7$	0.66 ~ 225	0.9985	0.20	0.6
甲基对硫磷 Parathion-methyl	738	2.90	263	$Y=1.2192 \times 10^7 X - 729.945$	0.5 ~ 100	0.9995	0.049	0.16
毒死蜱 Chlorpyrifos	786	2.67	199	$Y=6.82485 \times 10^6 X - 3231.06$	1.0 ~ 97	0.9968	0.19	0.62
倍硫磷 Fenthion	792	3.00	278	$Y=1.06485 \times 10^7 X - 3423.56$	0.6 ~ 96	0.9980	0.15	0.49
三唑磷 Triazophos	972	3.48	162	$Y=6.77994 \times 10^6 X - 1085.96$	0.5 ~ 100	0.9991	0.23	0.77
亚胺硫磷 Phosmet	1056	3.76	160	$Y=2.492633 \times 10^7 X - 25247$	2.1 ~ 100	0.9993	0.098	0.33
甲胺磷 Methamidophos	312	2.57	94	$Y=3.37862 \times 10^7 X - 44921.6$	1.5 ~ 100	0.9941	0.35	1.2
治螟磷 Sulfotep	594	2.56	322	$Y=4.91263 \times 10^6 X - 1313.15$	0.9 ~ 100	0.9995	0.16	0.54
有机氯类 Organochlorine(27 种)								
α -666 α -BHC	660	2.81	183	$Y=1.3324 \times 10^7 X - 2019.5$	0.7 ~ 100	0.9996	0.094	0.32
异菌脲 Iprodione	954	3.79	187	$Y=1.211765 \times 10^6 X + 579.141$	10.3 ~ 200	0.9993	1.01	3.4
联苯菊酯 Bifenthrin	1050	2.37	181	$Y=1.96389 \times 10^7 X - 4668.49$	0.5 ~ 100	0.9994	0.075	0.25
氟胺氰菊酯 Tau-fluvalinate	1362	4.76	250	$Y=2.12289 \times 10^6 X - 560.075$	1.7 ~ 100	0.9997	0.69	2.3
p, p' -DDE	912	2.64	246	$Y=1.44605 \times 10^7 X - 45555.56$	0.6 ~ 96	0.9968	0.088	0.29
乙烯菌核利 Vinclozolin	732	2.49	212	$Y=4.34511 \times 10^6 X - 4434.37$	1.8 ~ 97	0.9982	0.30	0.98
硫丹 Endosulfan	888	2.77	170	$Y=2.13772 \times 10^6 X - 1917.69$	1.9 ~ 100	0.9994	0.57	1.9
三氯杀螨醇 Dicofol	1014	2.99	139	$Y=2.77744 \times 10^6 X - 123628$	1.6 ~ 100	0.9992	0.78	2.6
氟氰茚菊酯 Cyhalothrin	1110	2.53	181	$Y=7.69169 \times 10^6 X - 1959.32$	0.5 ~ 100	0.9995	0.22	0.73
氨基甲酸酯类 carbamate(8 种)								
抗蚜威 Pirimicarb	702	2.92	166	$Y=5.32622 \times 10^7 X - 5211.42$	0.5 ~ 100	0.9992	0.062	0.21
甲霜灵 Metalaxyl	750	2.83	160	$Y=7.93424 \times 10^6 X - 3906.67$	1.0 ~ 100	0.9984	0.18	0.60
克螨特 Propargite	1020	2.58	135	$Y=6.93306 \times 10^6 X - 1483.4$	0.5 ~ 98	0.9994	0.16	0.52
氟氰戊菊酯 Flucythrinate	1260	4.21	199	$Y=3.70904 \times 10^6 X - 4046.1$	13 ~ 100	0.9999	0.65	2.2
百菌清 Chlorothalonil	678	3.03	266	$Y=7.63207 \times 10^6 X - 76591.8$	10 ~ 101	0.9823	0.38	1.3

I: 一维柱保留时间(Retention time of column 1, s); II: 二维柱保留时间(Retention time of column 2, min)。

3.3.2 基质标准曲线及线性范围 用基质空白溶液配制梯度混合标准溶液,浓度范围为0.50~400.00 $\mu\text{g/L}$ 加入0.1 mg/L 内标物环氧七氯,按2.2节检测,重复5次,以峰面积对应浓度作标准曲线。结果显示:不同样品的标准曲线的斜率差异显著,28种农药标准曲线斜率归一化后变化的相对标准偏差(RSD)超过30%。因此,本实验采用基质曲线和内标物归一化法进行定量分析。

3.3.3 回收率和精密度 在空白样品中添加混合标准溶液,按2.3节处理,重复3次,计算方法的回收率和精密度。本实验在油菜薹、黄瓜、茄子、四季豆和辣椒中,对64种农药以1,2和5倍定量限浓度水平进行添加实验,平均回收率在68.3%~117.8%之间,相对标准偏差(RSD)在0.6%~9.1%之间($n=3$)。

3.4 实际样品检测

抽查市场上油菜薹、黄瓜、茄子、四季豆和辣椒各5例,采用本方法筛查64种农药,检测出1例黄瓜样品含乙酰甲胺磷,含量为0.036 mg/kg ;1例茄子样品含氯氰菊酯,含量为0.107 mg/kg 。结果表明,本方法适用于蔬菜中农药残留的筛选和检测。

References

- 1 YANG Hui, WANG Fu-Hua(杨慧,王富华). *Agro-Environment & Development*(农业环境与发展), **2008**, 25(5): 67~72
- 2 ZHANG Hong-Jun, ZHANG Jia, LIU Xue, ZHU Wen-Da, CUI Hai-Lan, WEI Shou-Hui, ZHANG Chao-Xian(张宏军,张佳,刘学,朱文达,崔海兰,魏守辉,张朝贤). *Hubei Agricultural Sciences*(湖北农业科学), **2008**, 47(7): 846~851
- 3 JIN Xiao-Ma, WANG Guo-Huai, LIU Ben-Kun, WANG Lin-Hui(金小马,王国槐,刘本坤,王林辉). *Crop Research*(作物研究), **2008**, 22(5): 445~448
- 4 MO Xiao-Rong, ZHENG Chun-Hui, CHEN Jia-Wei, ZHAO Dao-Yuan, YANG Ming-Min(莫小荣,郑春慧,陈建伟,赵道远,杨明敏). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(8): 1178~1182
- 5 LI Yan, ZHENG Feng, WANG Minglin, PANG Guo-Fang(李岩,郑峰,王明林,庞国芳). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2009**, 27(2): 127~137
- 6 XIE Wen, QIAN Yan, DING Hui-Ying, CHEN Xiao-Mei, Xi Jun-Yang, JIANG Xiao-Ying(谢文,钱艳,丁慧英,陈笑梅,奚君阳,蒋晓英). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(4): 495~499
- 7 *Pesticide Multiresidue Screen Methods for Determination of Organophosphorus Pesticides, Organochlorine Pesticides, Pyrethroid Pesticides and Carbamate Pesticides in Vegetables and Fruits*(蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定). Agricultural Industry Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国农业行业标准) NY/T 761-2008
- 8 *Method for Determination of 500 Pesticides and Related Chemicals Residues in Fruits and Vegetables GC-MS Method*(水果和蔬菜中500种农药及相关化学品残留的测定 气相色谱-质谱法). National Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国国家标准) GB/T 19648-2006
- 9 YANG Lin, WEN Yu-Yun, GONG Zhen-Bin(杨琳,温裕云,弓振斌). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2010**, 38(7): 968~972
- 10 TONG Ling, LI Chong-Jiu(佟玲,李重九). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2008**, 27(9): 930~935
- 11 LIU Han, XU Jin-Zhong, DING Tao, ZHANG Xiao-Yan, YANG Wen-Quan, ZHAO Zeng-Yun, CHEN Hui-Lan, WU Bin, SHEN Chong-Yu, JIANG Yuan(柳菡,徐锦忠,丁涛,张晓燕,杨雯荃,赵增运,陈惠兰,吴斌,沈崇珏,蒋原). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2009**, 28(2): 181~185
- 12 WU Yan, KANG Qing-He, GAO Kai-Yang, LI Zhi-Bin(吴岩,康庆贺,高凯扬,李志斌). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(5): 753~757
- 13 QIU Ya-Qiong, LU Xin, XU Guo-Wang(邱涯琼,路鑫,许国旺). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*(药物分析杂志), **2008**, 28(3): 498~505
- 14 LI Hai-Feng, ZHONG Ke-Jun, LU Xin, BAI Chang-Min, HUANG Jian-Guo, LU Hong-Liang, MA Chen-Fei, ZHU Shu-Kui, KONG Hong-Wei, ZHAO Ming-Yue, XIE Jian-Ping, NIU Send, XU Guo-Wang(李海锋,钟科军,路鑫,白长敏,黄建国,鹿洪亮,马晨菲,朱书奎,孔宏伟,赵明月,谢剑平,牛森,许国旺). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), **2006**, 64(18): 1897~1903
- 15 LU Xin, WU Jian-Fang, WU Jian-Hua, KONG Hong-Wei, HUA Rui-Xiang, TAO Wen-Sheng, GU Jun-Lei, XU Guo-Wang

- (路鑫, 武建芳, 吴建华, 孔宏伟, 花瑞香, 陶文晟, 顾君磊, 许国旺). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2004**, 22(1): 5~11
- 16 JI Ke-Liang, GUO Kun-Liang, ZHU Shu-Kui, LU Xin, XU Guo-Wang(季克良, 郭坤亮, 朱书奎, 路鑫, 许国旺). *Liquor-making Science & Technology*(酿酒科技), **2007**, 153(3): 100~102
- 17 XU Hong, LIN An-Qing, GU Long, TANG Dan-Zhou, KOU Deng-Min, CHENG Qi-Gang, LU Shi-Bing(许泓, 林安清, 古珑, 唐丹舟, 寇登民, 成启刚, 吕诗炳). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2004**, 23(3): 34~38, 42

Rapid Screening and Simultaneous Confirmation of 64 Pesticide Residues in Vegetable Using Solid Phase Extraction-comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography Coupled with Time-of-Flight Mass Spectrometer

JIANG Jun^{1,3}, LI Pei-Wu^{1,2,3}, XIE Li-Hua¹, DING Xiao-Xia^{1,2}, LI Ying^{1,3},
WANG Xiu-Pin^{1,3}, WANG Xue-Fang^{1,3}, ZHANG Qi^{1,3}, GUAN Di^{1,3}

¹(Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062)

²(Key Laboratory of Oil Crop Biology of the Ministry of Agriculture, Wuhan 430062)

³(Quality Inspection and Test Center for Oilseeds Products, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062)

Abstract A solid phase extraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass Spectrometric (GC × GC-TOF-MS) method for analysis of 64 pesticides in vegetables was developed and validated. After extracting with acetonitrile, cleaning-up with NH₂-SPE cartridge and concentrating with nitrogen, the pesticide residues were redissolved in the acetone and analyzed by GC × GC-TOF-MS coupled with HP-5MS and column DB-17 column. Sample matrix-matched calibration was used to determine the residue contents by external standard. The method was validated by the real samples, such as Brassica campestris, cucumber, eggplant, kidney bean and capsicum. The limits of detection (S/N = 3) and the limits of quantification (S/N = 10) were from 0.010 to 6.032 μg/kg and from 0.035 to 20.107 μg/kg, respectively. The overall recoveries ranged from 68.3% to 117.8% with the relative standard deviations (RSD) of 0.6% - 9.1%. Two positive samples, polluted by acephate and cypermethrin with a residual concentration of 0.036 and 0.107 mg/kg, were screened by the developed method as detecting markets samples.

Keywords Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry; Multiple pesticide residues; Vegetable

(Received 24 June 2010; accepted 6 September 2010)