

加速溶剂萃取-气相色谱-串联质谱法测定茶叶中 10 种吡唑和吡咯类农药的残留量

徐敦明¹, 卢声宇², 陈达捷¹, 蓝锦昌², 张志刚¹, 杨 方², 周 昱^{1*}

(1. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361026; 2. 福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350001)

摘要: 建立了加速溶剂萃取(ASE)-气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法用于测定茶叶中 10 种吡唑和吡咯类农药残留。ASE 萃取压力为 1.03×10^7 Pa, 萃取温度为 100 °C, 萃取时间为 5 min, 萃取溶剂为乙酸乙酯-正己烷(1:1, v/v)。萃取循环 1 次, 萃取液浓缩后用 Envi-Carb/PSA 固相萃取小柱净化, 乙酸乙酯-正己烷(1:1, v/v)洗脱。洗脱液浓缩后, 用正己烷定容, 供 GC-MS/MS 测定, 外标法定量。方法的准确度和精密度均符合残留分析要求。方法的定量限(LOQ)分别为唑啉酯 0.003 mg/kg、氟虫腈硫化物 0.001 mg/kg、氟虫腈 0.002 mg/kg、氟虫腈砒化物 0.005 mg/kg、溴虫腈 0.002 mg/kg、氟硅唑 0.006 mg/kg、野燕枯 0.001 mg/kg、吡草醚 0.001 mg/kg、吡啉胺 0.000 3 mg/kg、唑虫酰胺 0.005 mg/kg。方法的灵敏度能满足各国有关农药的残留限量要求。

关键词: 加速溶剂萃取; 气相色谱-串联质谱; 吡唑; 吡咯; 残留分析; 农药

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)03-0218-05

Determination of ten pesticides of pyrazoles and pyrroles in tea by accelerated solvent extraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry

XU Dunming¹, LU Shengyu², CHEN Dajie¹, LAN Jinchang²,
ZHANG Zhigang¹, YANG Fang², ZHOU Yu^{1*}

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China;

2. Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

Abstract: An effective method was developed and applied to determine the residues of ten pesticides of pyrazoles and pyrroles in tea by accelerated solvent extraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry (ASE-GC-MS/MS). The samples were extracted with ethyl acetate-hexane (1:1, v/v) for 5 min at 1.03×10^7 Pa and 100 °C for one cycle. Then, they were purified by Envi-Carb/PSA column, and eluted by ethyl acetate-hexane (1:1, v/v). The analytes were determined by GC-MS/MS and quantified by external standard method. The limits of quantification were 0.003 mg/kg for fenprophate, 0.001 mg/kg for fipronil-sulfide, 0.002 mg/kg for fipronil, 0.005 mg/kg for fipronil-sulfone, 0.002 mg/kg for chlorfenapyr, 0.006 mg/kg for flusilazole, 0.001 mg/kg for difenzoquat, 0.001 mg/kg for pyraflufen-ethyl, 0.000 3 mg/kg for tebufenpyrad and 0.005 mg/kg for tolfeprad. The results show that the proposed method is sensitive and accurate for the determination of the ten pesticide residues.

Key words: accelerated solvent extraction (ASE); gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS); pyrazole; pyrrole; residue analysis; pesticide

吡唑和吡咯类衍生物是一类具有良好杀菌活性的化合物, 目前所研制开发的此类农药主要是用作杀虫剂和杀螨剂。其作用机理独特, 选择性好, 对各个生长阶段及各种类型的害螨均有很高的活性, 与

传统的杀虫剂如有机磷、有机氯、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯类农药均不存在交互抗性, 其生物安全性和环境相容性均好于传统的杀虫剂。目前已商品化或即将商品化的吡唑、吡咯类杀虫剂和杀螨剂有: 溴虫

* 通讯联系人. Tel: (0592) 3269506, E-mail: Zhouy@xmciq.gov.cn.

基金项目: 厦门市科技计划项目(3502Z20092009, 3502Z20102013); 国家质检总局科技计划项目(2010IK192).

收稿日期: 2012-10-10

腈、氟虫腈、乙硫虫腈、唑螨酯、唑虫酰胺、吡螨胺、乙酰虫腈、vaniliprole等,已被广泛用于水稻、蔬菜、果树和观赏植物中害虫的综合防治^[1]。国内外已有大量报道各种单残留检测^[2-5],但未见同时检测吡唑、吡咯类农药残留的检测方法。

加速溶剂萃取(ASE)法,是一种全新的处理固体和半固体样品的的方法,萃取的目标化合物包括有机氯、有机磷、拟除虫菊酯类农药。1995年,Richter等^[6]提出了加速溶剂萃取方法,并运用于有机磷农药及除草剂的提取。自1996年Dionex公司推出加速溶剂萃取的商品化装置,ASE技术渐渐被人们所熟知,目前该技术已应用于环境化学、食品、农畜产品、饲料等的残留检测当中。美国EPA3545A标准方法已经将Dionex公司的ASE加速溶剂萃取仪列入标准方法^[7]。GB/T 19649-2005中,加速溶剂萃取仪被确认为相应的提取装置。目前,ASE被广泛运用于土壤、污泥、沉积物、动植物组织、蔬菜和水果等样品中的多氯联苯、多环芳烃、二恶英、呋喃等的萃取^[8-17]。本文采用ASE-GC-MS/MS技术对茶叶中吡唑、吡咯类农药残留进行分析,可对茶叶中的10种吡唑、吡咯类农药残留量进行定性、定量及确证,方法快速、简便,灵敏度高,重现性好。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器与耗材

GC-MS(CP3800-300 MS)购自瓦里安公司,Dionex ASE 200购自美国戴安公司,50 mL的聚丙烯(PP)材质带盖刻度离心管购自上海安谱科学仪器有限公司,HGC-24氮吹仪购自天津恒奥科技公司,活性炭/氧化铝、Envi-Carb/PSA和Envi-Carb/SAX/PSA小柱购自美国Supelco公司产品。

1.1.2 试剂

正己烷和乙酸乙酯等试剂均为色谱纯,水为蒸馏水。

分析物唑螨酯(fenpyroximate, $C_{24}H_{27}N_3O_4$, CAS No.: 134098-61-6)、氟虫腈硫化物(fipronil-sulfide, $C_{12}H_4C_{12}F_6N_4S$, CAS No.: 120067-83-6)、氟虫腈(fipronil, $C_{12}H_4C_{12}F_6N_4OS$, CAS No.: 120068-37-3)、氟虫腈砜化物(fipronil-sulfone, $C_{12}H_4C_{12}F_6N_4O_2S$, CAS No.: 120068-36-2)、氟硅唑(flusilazole, $C_{16}H_{15}F_2N_3Si$, CAS No.: 134098-61-6)、野燕枯(difenzoquat, $C_{17}H_{17}N_2$, CAS No.: 49866-87-7)、溴虫腈(chlorfenapyr, $C_{15}H_{11}BrClF_3N_2O$, CAS No.: 122453-73-0)、吡草醚

(pyraflufen-ethyl, $C_{15}H_{13}C_{12}F_3N_2O_4$, CAS No.: 139630-49-9)、吡螨胺(tebufenpyrad, $C_{18}H_{24}ClN_3O$, CAS No.: 119168-77-3)、唑虫酰胺(tolfenpyrad, $C_{21}H_{22}ClN_2O_2$, CAS No.: 129558765)标准品购自德国Dr. Ehrenstorfer公司,纯度大于98%。

标准溶液的配制:分别准确称取1.0 mg上述标准品,用乙酸乙酯溶解并定容至100 mL,配成10.00 mg/L的标准储备液。根据实际需要,梯度稀释成系列浓度的标准工作溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 提取

称取2 g(精确至0.01 g)均匀试样置于ASE的萃取池中,设定萃取温度为100℃,萃取时间5 min。萃取溶剂为约20 mL乙酸乙酯-正己烷(1:1,如无特别说明均为体积比),萃取压力 1.03×10^7 Pa。萃取结束后,萃取液于35℃氮吹浓缩至约1 mL。

1.2.2 净化

将Envi-Carb/PSA小柱装在固相萃取的真空抽滤装置上,先用3 mL乙酸乙酯-正己烷(1:1)预淋洗小柱,保持流速约为1 mL/min。将浓缩的萃取液过Envi-Carb/PSA小柱,再用10 mL乙酸乙酯-正己烷(1:1)洗脱。洗脱液置于35℃下氮吹近干,用正己烷定容至1 mL,供GC-MS/MS分析。

1.2.3 GC-MS/MS条件

石英毛细管柱DB-47MS(Agilent公司,30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。色谱柱温度:初始温度60℃,保持1 min;以20℃/min上升至180℃,保持7 min;以10℃/min上升至280℃,保持3 min;以50℃/min上升至300℃,保持7 min。进样口温度:250℃;离子化方式:电子轰击电离源(EI)模式;检测方式:多反应监测;载气:氮气,纯度≥99.999%,流速1 mL/min;进样量:2 μL;进样方式:不分流进样,1 min后开阀。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

吡唑、吡咯类农药溶于大多数有机溶剂,考虑到此类农药本身的性质以及ASE可使用的溶剂范围,选择乙酸乙酯-正己烷混合溶剂进行提取,该混合溶剂对本文分析的所有农药均显示出了良好的提取效率。为了确定最佳溶剂配比,将乙酸乙酯与正己烷分别按体积比配成4:1、1:1、1:2、1:9的提取溶剂进行空白茶叶基质中回收试验,各分析物的添加水平为0.01 mg/kg。每种比例的溶剂进行2次平行试验,记录两个结果的平均值。结果表明,不同比例的

提取液对不同分析目标物的回收率各有高低。因考虑到使用的溶剂要同时提取 10 种农药,故对每种农药在分别使用 4 种不同混合萃取溶剂时的回收率与 100% 的绝对差值进行比较。将该差值的绝对值按从小到大排序,最小的评 1 分,其次评 2 分,第三评 3 分,最大的评 4 分,结果见表 1。分数越低,回收率越高。乙酸乙酯-正己烷体积比为 4:1 时,10 种吡唑、吡咯类农药的总体回收率最高,但萃取液中杂质太多,尤其是浓缩后常有许多黏稠的杂质堵塞 SPE 柱,造成 SPE 过滤困难。而乙酸乙酯-正己烷体积比为 1:1 时,10 种吡唑、吡咯类农药的总体回收率在 70%~110% 之间,与 4:1 时的相差不大。但萃取液中杂质较少,不会出现堵塞 SPE 柱的情况。因此,综合考虑后最终选定乙酸乙酯-正己烷(1:1)为提取溶剂。

表 1 不同体积比乙酸乙酯-正己烷混合溶剂时的回收率的绝对偏差评分

Table 1 Marks of absolute deviation of recoveries with different volume ratios of ethyl acetate-hexane

Compound	4:1	1:1	1:2	1:9
Fenpyroximate	1	2	4	3
Fipronil-sulfide	2	3	4	1
Fipronil	2	3	4	1
Fipronil-sulfone	1	3	2	4
Flusilazole	3	2	4	1
Difenoquat	1	2	4	3
Chlorfenapyr	2	1	3	4
Pyraflufen-ethyl	4	1	3	2
Tebufenpyrad	1	2	3	4
Tolfenpyrad	1	2	4	3
Total points	18	21	35	26

2.2 ASE 提取条件的选择

茶叶中水分含量低,在用 ASE 提取前一般不需要加干燥剂,这样可以明显提高 ASE 的装填效率,同时可以取用较大的样品量,这些都是使用 ASE 的便利之处。影响 ASE 萃取效果的主要因素有萃取时间、萃取压力、萃取温度等。

2.2.1 萃取时间

理论上萃取时间越长,萃取率就越有保障,但太长的萃取时间对提高检测效率没有帮助。研究发现 ASE 萃取时间设为 5 min,即可满足大多数农药的萃取要求。

2.2.2 萃取压力

ASE 萃取过程中对萃取溶剂加压,是为了使温度高于沸点时溶剂仍然保持液体状态,并具有很好的流动性。ASE 的萃取压力变化对提取效果的差别不大,仪器默认的萃取压力为 1.03×10^7 Pa,在本实

验中能取得良好的萃取效果。

2.2.3 萃取温度

温度是 ASE 萃取中最重要的参数,通常 ASE 的适用温度范围是 75~125 °C。温度增加可以降低溶剂的黏度,从而提高溶剂对基质的浸润能力和对目标物的溶解能力。提高萃取温度可以使目标农药与基质更好的分离,使目标农药扩散到基质表面,从而取得更快、更好的提取效果。但太高的温度也可能导致目标农药产生不可预知的变化而影响最终的提取效果。

萃取时间为 5 min,萃取压力为 1.03×10^7 Pa,萃取溶剂为乙酸乙酯-正己烷(1:1)时,设定萃取温度分别为 80、100、120 °C 进行空白茶叶基质中添加回收试验,各分析物的添加水平为 0.01 mg/kg。每种温度条件进行 2 次平行试验,记录其平均值。表 2 数据显示,在上述条件下,80 °C 时的萃取回收率低于 100 °C 和 120 °C 时的。在能满足要求的情况下,用尽可能低的萃取温度,故最终设定 ASE 萃取温度为 100 °C。

表 2 不同萃取温度时的回收率

Table 2 Recoveries at different extraction temperatures

Compound	Recoveries / %		
	80 °C	100 °C	120 °C
Fenpyroximate	75.39	104.53	105.16
Fipronil-sulfide	73.40	103.03	103.46
Fipronil	70.00	95.00	103.18
Fipronil-sulfone	77.83	93.26	93.17
Flusilazole	86.05	105.51	108.46
Difenoquat	61.11	94.44	102.99
Chlorfenapyr	77.36	95.97	101.11
Pyraflufen-ethyl	73.22	102.30	101.72
Tebufenpyrad	77.00	111.50	94.00
Tolfenpyrad	71.49	106.14	93.76

2.3 净化条件的选择

2.3.1 净化用 SPE 柱

本研究考察了活性炭/氧化铝、Envi-Carb/PSA 和 Envi-Carb/SAX/PSA 柱对茶叶中分析目标物的净化效果。在空白茶叶基质中进行添加回收试验,各分析物的添加水平为 0.01 mg/kg。从表 3 中可以看出,经活性炭/氧化铝复合柱净化后 10 种农药的总体回收率较低,而经 Envi-Carb/PSA 和 Envi-Carb/SAX/PSA 净化后的总体回收率满足农药残留分析要求。但是 Envi-Carb/SAX/PSA 柱价格更贵。在净化效果相近的情况下,最终选择成本更低的 Envi-Carb/PSA 柱。

表 3 使用不同 SPE 柱时茶叶中 10 种农药的添加回收率
Table 3 Spiked recoveries of the ten pesticides in tea
with different SPE columns

Compound	Recoveries / %		
	Envi-Carb/ PSA	Envi-Carb/ SAX/PSA	Charcoal alumina
Fenpyroximate	100.38	105.5	83.52
Fipronil-sulfide	104.3	109.7	81.33
Fipronil	95.75	110.4	72.04
Fipronil-sulfone	105.8	96.47	86.99
Flusilazole	103.5	111.7	106.9
Difenoquat	97.87	104.2	81.93
Chlorfenapyr	102.3	100.1	64.24
Pyraflufen-ethyl	103.2	105.0	87.95
Tebufenpyrad	96.7	95.8	93.5
Tolfenpyrad	103.2	96.99	90.18

Elution solution: ethyl acetate-hexane (1:1, v/v).

2.3.2 洗脱体积

本文采用大体积的 Envi-Carb/PSA 柱(6 mL, 0.5 g), 乙酸乙酯-正己烷(1:1) 混合溶剂洗脱。从图 1 可见, 用 10 mL 的洗脱液洗脱, 10 种农药的回收率可达 90% 以上。最终确定洗脱体积为 10 mL。

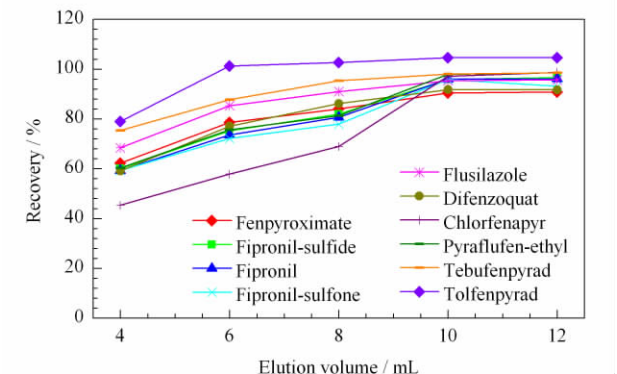


图 1 洗脱液体积对茶叶中 10 种农药回收率的影响
Fig. 1 Effect of volume of the elution solution on
recovery of the ten pesticides in tea

2.4 GC-MS/MS 分析

在 1.2.3 节的仪器条件下, 采用 GC-MS/MS 进行分析, 10 种吡唑、吡咯类农药的出峰顺序、保留时间、多反应监测离子和碰撞能量见表 4。标准品总离子流色谱图见图 2。比较茶叶样品的空白基体及不同添加水平的色谱图可知, 本方法对目标物的分析无干扰, 方法特异性好。

2.5 线性范围、线性关系及定量限

在本方法所确定的实验条件下, 峰面积 A 和质量浓度 C (mg/L) 呈良好的线性关系(见表 5)。以被测定物质的定量离子对的信噪比为 10 确定定量限(LOQ) 结果见表 5。

2.6 回收率和精密度

以不含农药残留的茶叶样品作为基质, 在 LOQ、

表 4 10 种农药的保留时间及串联质谱参数
Table 4 Retention times and MS/MS parameters of
the ten pesticides

No.	Compound	Retention time / min	Product ion (m/z)	Collision energy / V
1	fenpyroximate	10.467	213 > 168* 213 > 77	15 20
2	fenpyroximate	14.011	420 > 351* 420 > 255	15 30
3	fipronil	14.293	367 > 213* 367 > 246	25 15
4	fipronil-sulfone	15.575	383 > 335* 383 > 255	20 10
5	flusilazole	15.775	233 > 165* 233 > 152	15 25
6	difenoquat	15.837	234 > 129* 234 > 104	20 20
7	chlorfenapyr	15.979	329 > 247* 364 > 247	25 25
8	pyraflufen-ethyl	17.215	412 > 339* 412 > 349	15 15
9	tebufenpyrad	18.496	318 > 131* 318 > 145	15 15
10	tolfenpyrad	24.428	383 > 171* 383 > 197	20 20

* quantification ion.

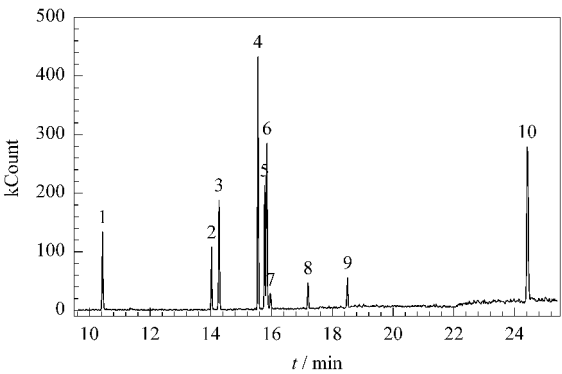


图 2 10 种农药的 GC-MS/MS 分析总离子流图
Fig. 2 Total ion chromatogram of the ten
pesticides by GC-MS/MS

Peaks: 1. fenpyroximate; 2. fipronil-sulfide; 3. fipronil; 4. fipronil-sulfone; 5. flusilazole; 6. difenoquat; 7. chlorfenapyr; 8. pyraflufen-ethyl; 9. tebufenpyrad; 10. tolfenpyrad.

2 倍 LOQ, 4 倍 LOQ 水平进行添加回收试验。每个样品在每个添加水平重复测定 10 次, 回收率为 77.86% ~ 104.84%, RSD 为 3.55% ~ 17.50%, 符合农药残留分析要求。

2.7 实际样品的测定

利用本研究建立的方法对来自市场的 162 份茶叶进行上述 10 种吡咯、吡唑类农药的测定, 检出率较高的农药为氟虫腈和溴虫腈, 应引起适度关注。日本厚生劳动省医药食品局食品安全部 2012 年 12 月 25 日发布通知, 修改 2012 年度进口食品监控计

表 5 10 种农药的线性回归方程和相关系数
Table 5 Linear equations and correlation coefficients of the ten pesticides

Compound	Linear equation	Linear range/(mg/L)	r^2	LOQ/(mg/kg)
Fenpyroximate	$A = 41783.20C + 11622.63$	0.003 – 0.024	0.9997	0.003
Fipronil-sulfide	$A = 336243.9C + 28879.08$	0.001 – 0.08	0.9995	0.001
Fipronil	$A = 503276.5C + 122960.9$	0.002 – 0.016	0.9992	0.002
Fipronil-sulfone	$A = 192957.1C + 73460.34$	0.005 – 0.04	0.9997	0.005
Flusilazole	$A = 124388.9C - 74871.57$	0.006 – 0.048	0.9995	0.006
Difenzoquat	$A = 183593.5C - 23545.93$	0.001 – 0.008	0.9985	0.001
Chlorfenapyr	$A = 42618.74C - 9392.479$	0.002 – 0.016	0.9982	0.002
Pyraflufen-ethyl	$A = 27723.53C + 5872.968$	0.001 – 0.008	0.9984	0.001
Tebufofenpyrad	$A = 679740.5C + 98345.39$	0.0003 – 0.0024	0.9991	0.0003
Tolfenpyrad	$A = 426180.1C + 251.6622$	0.005 – 0.04	0.9998	0.005

A: peak area; C: mass concentration, mg/L.

划 增加对茶叶中茚虫威和氟虫腈的检查^[18]。日本的关注与本研究的结果是一致的。

3 结论

ASE 具有快速、溶剂用量少、萃取效率高、安全等突出特点^[8]。已经被美国国家环保局批准为 EPA 3545 号标准方法^[19]。本研究建立了 ASE-GC-MS/MS 法测定茶叶中 10 种吡唑、吡咯类农药的残留。与传统方法比,可以大幅度提高萃取效率。方法的准确度和精密度均符合残留分析要求,方法灵敏度能满足各国相关农药残留限量要求,可作为日常检测的方法使用,可对茶叶中唑螨酯、氟虫腈硫化物、氟虫腈、氟虫腈砷化物、溴虫腈、氟硅唑、野燕枯、吡草醚、吡螨胺、唑虫酰胺进行测定和确证。

参考文献:

- [1] Zhang G S. Pesticide Science and Administration (张国生. 农药科学与管理), 2006, 25(11): 23
- [2] Li Y F, Gao Z L, Dang Z H, et al. Journal of Hebei Agricultural Science (李耀发, 高占林, 党志红, 等. 河北农业科学), 2010, 14(8): 84
- [3] Wang J, Yue Y D, Hua R M, et al. Food Science (王进, 岳永德, 花日茂, 等. 食品科学), 2007, 28(1): 239
- [4] Xu X Y, Pan H F, Liu J S, et al. Environmental Monitoring Management and Technology (许行义, 潘荷芳, 刘劲松, 等. 环境监测管理技术), 2011, 23(4): 43
- [5] Hu B Z, Cai H J, Song W H. Chinese Journal of Chromatography (胡贝贞, 蔡海江, 宋伟华. 色谱), 2012, 30(9): 889
- [6] Zhang H F, Hu Q Y, Wang F, et al. Acta Tabacaria Sinica (张洪非, 胡清源, 王芳, 等. 中国烟草学报), 2007, 13(4): 65
- [7] US EPA SW-846
- [8] Ye M L, Zhu Y. Modern Scientific Instruments (叶明立, 朱岩. 现代科学仪器), 2003(1): 35
- [9] Zhu X M, Cui Y H, Guo L Q, et al. Environmental Science (朱雪梅, 崔艳红, 郭丽青, 等. 环境科学), 2002(9): 113
- [10] Zhang T Y. Food Research and Development (张桃英. 食品研究与开发), 2004, 25(2): 115
- [11] Huang Q H. Pesticide Science and Administration (黄琼辉. 农药科学与管理), 2006, 27(5): 12
- [12] Pitzer K S. Thermodynamics. New York: Mc Graw-Hill, 1961: 118
- [13] Xu P J, Zhang T, Ren M, et al. Journal of Instrumental Analysis (许鹏军, 张姪, 任明, 等. 分析测试学报), 2012, 31(9): 1126
- [14] Lu F F, Xing H, Xu X Y, et al. Environmental Monitoring Management and Technology (卢福峰, 邢核, 许秀艳, 等. 环境监测管理技术), 2007, 19(3): 25
- [15] Donard O, Lalere B, Martin F, et al. Anal Chem, 1995, 67: 4250
- [16] Schantz M J, Nichols J J, Wise S. Anal Chem, 1997, 69, 4210
- [17] Ezzell J J, Richter B E, Francis E. Am Environ Lab, 1996, 12: 12
- [18] Bulletin of Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. No. 1225(1). (2012-12-25) [2013-01-29]. <http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/monitoring/2012/dl/03-421225-01.pdf>
- [19] US EPA 3545