

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法快速筛查茶叶中的多种农药残留

韩璐^{1,2}, 陈达炜², 吕冰², 苗虹^{1,2}

(1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050;

2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

摘要:目的 采用超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS)和改进的 QuEChERS 样品前处理技术,建立茶叶中多种农药残留的快速筛查检测方法。方法 样品采用乙腈提取,提取液经 *N*-丙基乙二胺(PSA)、石墨化炭黑(GCB)及茶叶农残检测专用吸附剂(TPT)混合进行分散固相萃取净化(d-SPE)。以 BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)进行色谱分离,以电喷雾电离串联质谱多反应监测模式(MRM)进行监测。结果 以欧盟农药残留参比实验室组织的茶叶中 175 种农药残留的国际比对考核的茶叶样品进行定性筛查和定量测定,以液相色谱质谱技术从考核茶叶样品中共定性筛查出多菌灵、吡虫啉、噻嗪酮等 10 种农药残留。针对这 10 种农药进行了定量检测方法的建立和方法验证,10 种农药在 0.1 ~ 20 μg/L 的浓度范围内呈良好线性,相关系数 $r > 0.999$,各农药的定量限为 0.5 ~ 2.0 μg/kg,茶叶样品基质的加标回收率在 75.7% ~ 105.8% 之间,相对标准偏差在 2.3% ~ 18.4% 之间。定量测得考核的茶叶样品中 10 种农药的含量在 0.021 ~ 0.373 mg/kg 之间。结论 本方法简单、准确、灵敏度高,适用于农产品中农药多残留的快速筛查。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱; QuEChERS; 农药残留; 茶叶; 食品污染物; 风险监测

中图分类号:R155.5; F767.2; TS272 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)04-0386-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.04.009

Rapid screening of multi-residue pesticides in tea by UPLC-MS/MS

HAN Lu, CHEN Da-wei, LV Bing, MIAO Hong

(National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To establish a rapid screening and confirmation method for pesticide residues in tea using UPLC-MS/MS for instrument method and QuEChERS for sample preparation. **Methods** The pesticide residues were extracted from tea samples with acetonitrile, and purified by dispersion solid phase extraction (d-SPE) using *N*-propyl ethylene diamine (PSA), graphitized carbon black (GCB) and triple phase of tea (TPT). The pesticide analytes were then separated on a reversed phase column using a gradient elution program. The ion fragment were obtained using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry under multiple reaction monitoring mode and quantified by the external standard method. **Results** In checking tea sample, 10 pesticide were screened qualitatively and carried on the quantitative analysis. The method showed a good linearity ($r > 0.999$) in the ranges of 0.1-20 μg/L for 10 pesticide with average recovery rates of 75.7%-105.8% and the relative standard deviation (RSD) of 2.3%-18.4%. The limits of quantification (LOQs) for 10 pesticide were between 0.5 and 2 μg/kg. **Conclusion** The method was simple, sensitive and accurate, and was suitable for confirmation multi-residue pesticides in agricultural products.

Key words: Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS; pesticide residues; tea; food contaminant; risk monitoring

各国及国际食品法典委员会(CAC)均就农药

残留制定了相关法规,并规定了不同食品中的最大残留限量(MRL)。我国最新颁布的 GB 2763—2014《食品中农药最大残留限量》^[1]规定了食品中 387 种农药 3 650 项最大残留限量,无论在食品品种、还是限量要求上均较 GB 2763—2012 提出了更高要求。尽管如此,我国出口农产品常因农药残留超标而影响国际贸易。因此,建立准确、高效的农药残

收稿日期:2015-03-03

基金项目:国家国际科技合作专项(2011DFA31770)

作者简介:韩璐 女 研究生 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail:hl_hanlu0912@163.com

通讯作者:苗虹 女 研究员 研究方向为食品卫生

E-mail:miaoh@cfsa.net.cn

留分析方法十分必要^[2-3]。

目前,通常采用多残留分析技术开展食品及农产品中农药残留检测^[4]。根据农药的极性差异,一般采用气相色谱法及气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[5-9]、液相色谱法和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[10-12]。随着检测仪器的快速发展以及农药残留确证检测的需求,GC-MS和LC-MS方法在农药多残留检测方面得到较快的发展且为保证检测方法的特异性,多采用串联质谱技术^[13-16]。随着液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)的技术发展,特别是在检测的灵敏度方面,其应用在茶叶中农药残留的检测越来越多。

本研究针对欧盟农药残留参比实验室组织的2014年茶叶样品的国际比对考核(EUPT-FV-T02)中规定的175种农药组分为对象,采用超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS)作为检测手段,建立了茶叶样品中多种农药残留的快速检测方法,为完成考核任务提供了可靠的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

茶叶样品由欧盟农药残留比对实验室组织的茶叶中农药残留能力验证考核(EUPT-FV-T02)提供。

1.1.2 主要仪器与试剂

LC-30A超高效液相色谱、TQ8050三重四级杆质谱仪均购自日本岛津,涡旋混合器,冷冻离心机,分析研磨机。

农药标准品(纯度>98%,德国DR. Ehrenstorfer),乙腈和甲醇为色谱纯,甲酸和甲酸铵为色谱级,NaCl和无水硫酸钠为分析纯,N-丙基乙二胺(PSA,美国Agilen);Cleanert® PestiCarb石墨化炭黑(GCB)、Cleanert® TPT茶叶农残检测专用吸附剂(TPT)均购自美国Bonna-Agela,试验用水为重蒸水。

1.2 方法

1.2.1 农药标准溶液的配制

准确称取各农药标准品10 mg(精确至0.1 mg)于10 ml容量瓶中,以甲醇定容,配制成1 000 mg/L的标准储备溶液。标准储备溶液用甲醇逐级稀释,制成10 mg/L标准中间液,于-18℃贮存。用流动相将标准中间液配制成各浓度的混合标准工作液,于4℃贮存。

1.2.2 样品提取与净化

准确称取茶叶样品1 g(精确至0.001 g)于50 ml离心管中,加2 ml水浸泡20 min,加入10 ml

含有0.5%甲酸的乙腈溶液,涡旋混匀2 min,超声提取20 min。加入2 g NaCl和8 g无水硫酸钠,涡旋振荡2 min,5 000 r/min离心5 min,取1 ml上清液,加入300 mg无水硫酸钠、50 mg PSA粉末、50 mg TPT粉末和5 mg GCB粉末,涡旋振荡2 min,5 000 r/min离心3 min。移取500 μl上清液,加500 μl水,混匀,以0.22 μm滤膜过滤后待进样分析。

1.2.3 仪器条件

UPLC色谱条件:色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相A为含0.1%甲酸和5 mmol/L甲酸铵的水溶液,流动相B为含0.1%甲酸的甲醇溶液。梯度洗脱:0~3 min,10% B;3~14 min,10%~100% B;14~17 min,100% B;17~20 min,100%~10% B。进样量10 μl;流速300 μl/min;柱温40℃。

质谱条件:采用电喷雾离子化方式,正负离子模式自动切换,雾化气流速为3 L/min;加热气流速为10 L/min;接口温度为300℃;除溶剂管温度为250℃;加热块温度为400℃;干燥气流速为10 L/min;扫描方式为动态多反应监测模式(MRM)。

2 结果与分析

2.1 色谱质谱条件的优化

本研究采用UPLC BEH C₁₈色谱柱进行分析,分别比较了水和含5 mmol/L甲酸铵和0.1%甲酸的水溶液作为流动相A,以及甲醇、乙腈和含0.1%甲酸的甲醇作为流动相B的效果。结果表明,采用甲醇梯度洗脱虽然柱压相对乙腈增大,但由于样品基质的复杂性和有机磷农药的极性较强,甲醇更有利于有机磷农药的保留和洗脱以及基质杂质的洗脱,从而减少杂质在色谱柱中残留,延长色谱柱寿命。

由于电喷雾质谱的电离是在溶液状态下进行的,因此流动相的pH值和纯溶剂中添加的物质不仅会影响目标化合物的保留时间和峰形,还会影响离子化效率,最终影响灵敏度。在ESI正离子电离模式下,氨基甲酸酯类农药往往更易生成[M+NH₄]⁺,比[M+H]⁺的响应强度更高,因此在流动相中加入5 mmol/L甲酸铵溶液有助于[M+NH₄]⁺的生成;且0.1%甲酸有利于化合物的电离,提高化合物的响应值,另一方面也有利于改善化合物尤其是酸性农药的峰形。因此,本研究以含5 mmol/L甲酸铵和0.1%甲酸的水溶液作为流动相A,含0.1%甲酸的甲醇溶液作为流动相B。

2.2 样品前处理方法的选择和优化

QuEChERS前处理方法是在2003年由Anastassiades等开发,其意义是快速、简易、廉价、有

效、稳定、安全 (Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe),其基于分散固相萃取技术被广泛应用于农产品中农药多残留检测^[17]。本实验室在前期对 Carb-NH₂ 固相萃取柱和基于 PSA 分散固相萃取的 QuEChERS 方法的比较研究发现^[18],Carb-NH₂ 固相萃取柱虽具有较好的除色素能力,但对乙酰甲胺磷、倍硫磷等部分有机磷类农药和其他一些极性较强的农药有不同程度的吸附,从而造成这些农药无法检出或回收率低;而采用基于 PSA 分散固相萃取方法除杂效果虽不及 Carb-NH₂ 柱,但该净化方法具有高回收率、使用溶剂少、操作简单快捷等优点。因此,基于 PSA 分散固相萃取的 QuEChERS 前处理方法更适合农药多残留的快速筛查方法。

美国分析化学家协会 (AOAC) 针对蔬菜水果中农药多残留建立的 QuEChERS 前处理方法的净化过程未添加 C₁₈ 粉末^[19]。C₁₈ 属于反相吸附剂,可有效除去基质中的脂肪等非极性有机物。因此,为了研究 C₁₈ 是否会对农药的提取效果产生影响,进行了 1 ml 绿茶空白样品提取液添加 100 mg C₁₈ 粉末和不添加 C₁₈ 粉末的对比试验,农药添加水平为 0.2 mg/kg,根据保留时间选择极性差异较大的乐果、乙噻酚磷酸酯、乙酰甲胺磷、克百威、啶硫磷胺、敌敌畏、涕灭威亚砷、腈甲基抗蚜威

粉末去除色素。为了确定 GCB 粉末的用量,进行了 1 ml 绿茶空白样品提取液分别添加 5、10、15 mg GCB 粉末的对比试验,观察提取液颜色。试验发现,当加入 5 mg GCB 时提取液呈黄色透明,当加入 10 mg GCB 时提取液呈无色透明。由于 GCB 表面的六边形结构,使得它对于平面分子或者含有平面芳香环的分子具有强烈的吸附作用,随着 GCB 的加入会导致灭线磷、腈苯唑、克百威等片状农药的回收率降低,因此在茶叶样品的净化过程中加入 5 mg GCB 粉末。

2.3 茶叶样品的定性筛查方法

2.3.1 目标物的确证

本研究以欧盟茶叶考核样品 (EUPT-FV-T02) 所规定的 175 种农药为目标分析物,首先以 100 μg/L 的 175 种农药溶剂单标进样分析,结果显示在全扫描模式下能够很好地检测到 141 种农药,检测不到的农药主要是拟除虫菊酯类农药、有机氯农药及含氯的农药。根据欧盟指令 2002/657/EC^[21],每个化合物 1 个母离子,2 个子离子,选择其中一个离子对作为定量离子对。根据已检测出的 141 种农药的特征碎片离子及保留时间进行定性分析 (见表 1),要求所检测的化合物色谱峰信噪比大于 3,且只有当实际样品的色谱保留时间和质谱碎片离子与相当浓度标准溶液相吻合时,才能确定样品中含有目标物。为保证检测结果的准确,对每份阳性样品要求保留时间 (保留时间的偏差 < 5%) 和定性质谱碎片均与标准物质相同,任何一个条件不符,即判定为该样品中不含有该目标物。

2.3.2 实际样品的定性筛查

采用 1.2 方法,对欧盟考核的茶叶样品进行筛查,共定性筛查到 10 种农药残留,结果见表 2。图 2 为筛查到的 10 种农药的总离子流图。通过对样品定性筛查的结果可以看出,样品中有些杂质对呋喃特产生干扰,但是通过将保留时间和定性质谱碎片与相当浓度标准溶液进行比对,发现样品在标准物质对应的保留时间处,质谱碎片离子与标准物质相符,可判定茶叶样品中含有呋喃特。图 3 为样品中呋喃特检测结果与标准物质检测结果比较图。

2.4 基质效应的影响

在样品分析中,基质常对待测物的分析有明显干扰,并影响分析结果的准确性。本试验用甲醇配制 0.1 ~ 20 μg/L 浓度范围的农药混合标准溶液并绘制标准曲线,同时称取空白绿茶样品,按照 1.2.2 提取净化,并对空白样品进行分析,确定其不含有目标化合物后,再用空白样品提取液配制系列同浓度的基质混合标准溶液并绘制标准曲线。以基质

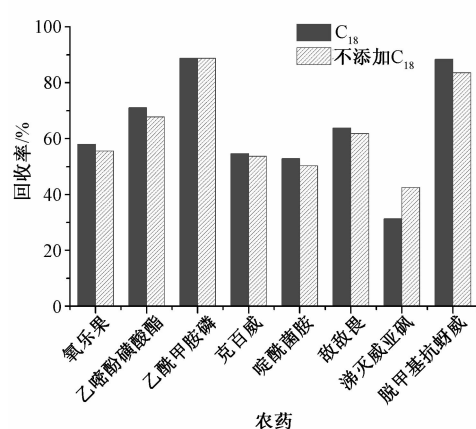


图 1 2 种 QuEChERS 前处理方法对净化效果的影响
(n = 8, 0.2 mg/kg)

Figure 1 Comparison of the effect of cleanup by the 2 QuEChERS method

欧盟标准方法 CEN 15662^[20] 针对蔬菜水果中农药多残留建立的 QuEChERS 前处理方法的净化过程规定,在深色样品中可加入少量 GCB 粉末除色。茶叶样品经过溶剂提取后,由于其提取液中存在叶绿素、叶黄素和花青素等,提取液呈墨绿色,而 PSA 只能除去少量色素,因此需要添加 GCB

表 1 141 种农药的保留时间、质谱分析参数

Table 1 Rention times, mass spectrometric parameters of 141 pesticides

农药	保留时间 /min	离子碎片 /(<i>m/z</i>)	碰撞能 量/eV	农药	保留时间 /min	离子碎片 /(<i>m/z</i>)	碰撞能 量/eV
3-羟基咪唑丹	8.46	237. /181. 1 * ,237. 8/163. 1	11,15	丙森锌	12.86	320. 9/119. 1 * ,320. 9/203. 2	23,9
乙酰甲胺磷	2.93	183. 8/143. 0 * ,183. 8/95. 1	11,24	甲基异柳磷	13.50	331. 9/231. 1 * ,331. 9/121. 1	16,45
吡虫清	8.66	222. 8/126. 0 * ,222. 8/90. 0	16,25	亚胺菌/醚菌酯	12.70	314. 0/149. 1 * ,314. 0/91. 1	14,17
涕灭砒威	5.31	222. 8/86. 1 * ,222. 8/148. 1	15,10	氟丙氧脲	14.67	510. 8/158. 0 * ,510. 8/140. 9	22,42
涕灭威亚砒	4.54	206. 8/89. 0 * ,206. 8/132. 0	25,19	马拉氧磷	10.66	314. 9/99. 0 * ,314. 9/127. 0	24,13
甲基谷硫磷	12.97	345. 9/97. 0 * ,345. 9/137. 0	32,25	马拉硫磷	12.60	330. 8/99. 0 * ,330. 8/127. 1	23,18
腈嘧菌酯	12.22	403. 9/372. 0 * ,403. 9/344. 0	16,11	嘧菌胺	12.92	223. 9/77. 1 * ,223. 9/106. 1	40,26
丙硫克百威	14.09	411. 0/195. 0 * ,411. 0/252. 0	9,7	甲霜灵	11.67	279. 9/220. 2 * ,279. 9/248. 0	15,12
联苯三唑醇	13.9	337. 9/269. 0 * ,337. 9/273. 9	8,6	叶菌唑	13.85	320. 0/70. 1 * ,320. 0/125. 0	24,19
啉酰菌胺	12.52	342. 8/307. 1 * ,342. 8/140. 0	20,12	甲胺磷	3.00	141. 8/94. 0 * ,141. 8/125. 0	15,18
糠菌唑	12.84,13.48	377. 8/158. 9 * ,377. 8/70. 0	28,23	杀扑磷	11.84	302. 8/145. 0 * ,302. 8/85. 0	9,22
乙嘧酚磺酸酯	13.04	316. 9/108. 0 * ,316. 9/166. 0	25,23	甲硫威	12.41	225. 8/169. 1 * ,225. 8/121. 1	10,17
噻嗪酮	14.51	306. 0/201. 1 * ,306. 0/116. 0	13,17	甲硫威砒	14.67	274. 9/256. 8 * ,274. 9/69. 1	9,18
西维因	10.89	201. 8/145. 0 * ,201. 8/127. 0	13,11	甲硫威亚砒	8.23	241. 8/185. 1 * ,241. 8/122. 1	14,29
多菌灵	5.64	191. 9/160. 2 * ,191. 9/132. 2	18,29	灭多威	6.13	162. 9/88. 0 * ,162. 9/106. 0	30,23
克百威	10.56	221. 9/165. 0 * ,221. 9/123. 0	6,16	甲氧虫酰肼	12.67	369. 0/149. 1 * ,369. 0/133. 0	21,19
丁呋喃	15.79	380. 9/160. 0 * ,380. 9/118. 0	20,12	久效磷	7.10	223. 9/127. 0 * ,223. 9/193. 0	15,10
溴虫腈	16.39	407. 0/361. 4 * ,407. 0/223	19,27	腈菌唑	12.82	288. 9/70. 1 * ,288. 9/125. 0	27,34
百菌清	13.7	341. 9/159. 0 * ,341. 9/69. 1	29,22	氧化乐果	3.76	213. 8/125. 0 * ,213. 8/109. 0	22,20
毒死蜱	14.83	349. 5/97. 0 * ,349. 5/197. 9	33,13	恶霜灵	10.00	278. 9/219. 1 * ,278. 9/132. 1	12,32
甲基毒死蜱	14.08	321. 8/125. 0 * ,321. 8/289. 8	22,16	杀线威	5.79	236. 9/72. 1 * ,236. 9/90. 0	24,22
虫螨磷	15.03	360. 8/304. 9 * ,360. 8/224. 9	17,22	砒吸磷	6.43	246. 8/169. 0 * ,246. 8/109. 0	14,27
四螨嗪	13.9	302. 8/138. 0 * ,302. 8/102. 0	16,36	多效唑	12.61	293. 9/70. 1 * ,293. 9/125. 0	23,19
噻虫胺	7.83	249. 8/169. 0 * ,249. 8/131. 9	13,12	甲基对氧磷	9.83	247. 6/202. 0 * ,247. 6/109. 1	22,31
蝇毒磷	13.61	362. 8/227. 0 * ,362. 8/307. 0	27,19	对硫磷	13.40	291. 8/236. 0 * ,291. 8/94. 0	16,37
戊唑醇	12.73,12.97	291. 9/70. 1 * ,291. 9/125. 0	22,33	戊菌唑	13.59	283. 9/70. 1 * ,283. 9/159. 0	17,20
嘧菌环胺	12.43	225. 9/93. 1 * ,225. 9/77. 1	34,13	戊菌隆	13.99	328. 9/125. 1 * ,328. 9/98. 9	26,30
甲基砒内吸磷/砒吸磷	6.65	262. 8/169. 0 * ,262. 8/109. 0	16,29	硝草胺	14.87	282. 0/212. 1 * ,282. 0/194. 1	12,17
脱甲基抗蚜威	7.73	224. 8/72. 1 * ,224. 8/168. 2	25,15	伏杀硫磷	13.86	367. 8/182. 0 * ,367. 8/111. 1	16,21
二嗪农	13.67	304. 8/169. 1 * ,304. 8/153. 1	21,14	亚胺硫磷	12.07	317. 9/74. 3 * ,317. 9/127. 4	22,0
抑菌灵	12.97	349. 6/123. 1 * ,349. 6/224. 0	29,17	辛硫磷	13.78	298. 9/129. 1 * ,298. 9/96. 9	12,22
敌敌畏	10.42	220. 8/109. 0 * ,220. 8/94. 8	17,32	抗蚜威	9.64	238. 8/72. 1 * ,238. 8/182. 2	30,20
氯硝胺	14.26	205. 0/149. 2 * ,205. 0/91. 0	9,13	甲基嘧啶磷	13.82	305. 8/108. 1 * ,305. 8/164. 1	31,20
苯醚甲环唑	14.05	405. 8/250. 9 * ,405. 8/110. 9	26,13	咪酰胺	13.78	375. 8/308. 0 * ,375. 8/70. 1	13,26
除虫脲	14.84	308. 8/197. 9 * ,308. 8/273. 0	33,27	腐霉利	11.20	283. 9/96. 9 * ,283. 9/115. 0	43,31
乐果	8.28	229. 8/198. 9 * ,229. 8/125. 0	10,22	丙溴磷	14.43	372. 7/302. 9 * ,372. 7/344. 9	19,21
烯酰吗啉	12.41,12.69	387. 9/301. 1 * ,387. 9/165. 1	22,14	炔螨特	15.12	368. 0 /231. 2 * ,368. 0/175. 2	12,16
二苯胺	12.90	169. 9/93. 1 * ,169. 9/66. 0	26,42	丙环唑	13.70	341. 9/159. 0 * ,341. 9/69. 1	29,22
单甲脒	7.06	162. 8/107. 2 * ,162. 8/77. 1	26,42	炔苯酰草胺	12.65	255. 8/190. 0 * ,255. 8/173. 0	14,22
DMST	10.76	214. 9/106. 1 * ,214. 9/79. 1	15,15	丙硫菌唑	13.77	343. 7/326. 0 * ,343. 7/154. 2	12,30
苯硫磷	14.11	323. 8/296. 0 * ,323. 8/157. 0	14,23	丙硫磷	15.59	344. 8/240. 9 * ,344. 8/275. 0	18,13
氟环唑	13.10	329. 9/121. 1 * ,329. 9/101. 1	22,44	百克敏	13.76	387. 9/194. 0 * ,387. 9/163. 1	13,25
乙硫磷	14.68	384. 8/198. 9 * ,384. 8/142. 9	11,24	哒螨灵	15.53	364. 9/147. 1 * ,364. 9/309. 1	24,21
灭线磷	13.10	242. 9/130. 9 * ,242. 9/96. 9	21,14	噻霉胺	11.85	199. 9/107. 1 * ,199. 9/82. 1	26,26
醚菊酯	15.95	394. 0/177. 1 * ,394. 0/107. 0	17,40	蚊蝇醚	14.72	322. 0/96. 0 * ,322. 0/185. 0	16,23
克线磷	13.30	303. 9/217. 0 * ,303. 9/202. 0	23,35	唑氧灵	14.83	307. 8/197. 0 * ,307. 8/162. 0	32,22
苯线磷砒	10.89	335. 9/266. 0 * ,335. 9/188. 1	21,15	多杀菌素 A	13.67	732. 2/142. 1 * ,732. 2/98. 1	30,54
苯线磷亚砒	10.69	319. 8/233. 0 * ,319. 8/292. 1	23,16	多杀菌素 D	13.98	746. 2/142. 1 * ,746. 2/98. 2	30,55
氯苯嘧啶醇	13.08	330. 9/268. 0 * ,330. 9/268. 0	24,24	螺螨酯	15.17	410. 9/313. 0 * ,410. 9/71. 1	13,23
啉螨醚	15.46	307. 0/161. 1 * ,307. 0/131. 0	17,16	螺环菌胺	12.29,12.41	298. 1/144. 1 * ,298. 1/100. 1	20,31
腈苯唑	13.25	336. 9/125. 1 * ,336. 9/70. 0	27,20	戊唑醇	13.60	308. 0/70. 0 * ,308. 0/125. 0	23,18
环酰菌胺	13.03	301. 9/97. 1 * ,301. 9/55. 1	23,40	抑虫肼	13.34	353. 0/133. 1 * ,353. 0/297. 0	25,8
杀螟硫磷	11.31	277. 9/125. 1 * ,277. 9/246. 0	20,13	吡螨胺	14.53	334. 0/117. 1 * ,334. 0/145. 1	35,22
苯氧威	13.36	301. 9/88. 0 * ,301. 9/116. 0	30,15	氟苯脲	14.70	380. 8/141. 1 * ,380. 8/158. 1	35,16
粉锈咪	12.11	304. 1/147. 1 * ,304. 1/117. 1	29,55	氟醚唑	13.10	371. 8/159. 0 * ,371. 8/70. 2	32,23

续表 1

农药	保留时间 /min	离子碎片 /(<i>m/z</i>)	碰撞能 量/eV	农药	保留时间 /min	离子碎片 /(<i>m/z</i>)	碰撞能 量/eV
倍硫磷	13. 59	278. 9/169. 0 * ,278. 9/105. 0	18,25	噻菌灵	7. 65	201. 8/175. 1 * ,201. 8/131. 2	25,23
倍硫磷亚砷	10. 82	294. 8/280. 0 * ,294. 8/109. 0	19,16	快胜/噻虫嗪	6. 60	291. 7/211. 1 * ,291. 7/132. 0	13,23
氟虫腈	13. 54	434. 9/330. 0 * ,434. 9/250. 1	-16, -27	噻虫啉	9. 11	252. 8/126. 0 * ,252. 8/90. 0	22,37
咯菌腈	12. 54	247. 2/126. 1 * ,247. 2/169. 2	-30, -31	硫双威	11. 09	354. 9/88. 1 * ,354. 9/108. 0	18,24
氟虫脲	15. 06	488. 8/140. 9 * ,488. 8/158. 1	45,17	甲基硫菌灵	10. 92	342. 9/151. 1 * ,342. 9/311. 0	19,8
氟吡菌胺	12. 63	382. 6/173. 0 * ,382. 6/145. 1	24,52	甲基立枯磷	13. 88	300. 8/125. 0 * ,300. 8/175. 0	17,26
啶唑菌酮	12. 94	375. 8/349. 0 * ,375. 8/307. 1	20,29	甲苯氟磺胺	13. 53	363. 8/238. 0 * ,363. 8/137. 1	15,29
氟硅唑	13. 33	315. 9/247. 1 * ,315. 9/165. 1	19,28	三唑酮	12. 74	293. 9/197. 2 * ,293. 9/225. 1	15,23
氟酰胺	12. 62	323. 9/242. 0 * ,323. 9/262. 1	25,16	三唑醇	12. 73	295. 9/227. 0 * ,295. 9/199. 1	10,16
粉唑醇	11. 53	301. 9/123. 0 * ,301. 9/95. 0	28,53	三唑磷	12. 85	313. 9/162. 1 * ,313. 9/119. 1	19,34
噻唑硫磷	11. 20	283. 8/104. 0 * ,283. 8/228. 0	23,11	敌百虫	9. 27	256. 9/127. 0 * ,256. 9/109. 0	19,24
己唑醇	13. 86	313. 9/70. 0 * ,313. 9/159. 0	26,17	布洛芬	14. 14	408. 9/186. 1 * ,408. 9/206. 0	21,18
噻螨酮	14. 82	352. 7/228. 1 * ,352. 7/168. 1	16,24	杀虫脲	11. 20	356. 9/74. 1 * ,356. 9/293. 1	26,7
烯菌灵	11. 30	296. 9/159. 0 * ,296. 9/201. 0	23,15	灭菌唑	13. 07	317. 9/70. 1 * ,317. 9/125. 1	24,25
吡虫啉	7. 80	255. 8/209. 0 * ,255. 8/175. 1	16,18	苯酰菌胺	13. 74	335. 8/187. 0 * ,335. 8/159. 0	24,41
茚虫威	14. 11	527. 9/203. 0 * ,527. 9/56. 0	28,38				

注：* 表示为定量离子对

表 2 欧盟考核茶叶样品的定性筛查结果

Table 2 Qualitative screening results from the tea sample

农药	分子式	保留时间 /min	母离子/子离子/(<i>m/z</i>)		碰撞能量/eV	
			定性	定量	1	2
多菌灵	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	5. 64	191. 9/160. 1	191. 9/160. 1	18	29
			191. 9/132. 1			
吡虫清	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	8. 66	222. 8/126. 0	222. 8/126. 0	16	25
			222. 8/90. 0			
吡虫啉	C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O ₂	7. 80	255. 8/209. 0	255. 8/209. 0	16	20
			255. 8/175. 1			
噻嗪酮	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	14. 55	306. 0/201. 1	306. 0/201. 1	13	17
			306. 0/116. 0			
三唑磷	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	12. 95	313. 9/162. 1	313. 9/162. 1	19	34
			313. 9/119. 1			
毒死蜱	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	14. 91	349. 5/97. 0	349. 5/97. 0	33	21
			349. 5/197. 9			
哒螨灵	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS	15. 53	364. 9/147. 1	364. 9/147. 1	24	13
			364. 9/309. 1			
炔螨特	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	15. 06	368. 0/231. 2	368. 0/231. 2	12	16
			368. 0/175. 2			
氟虫腈	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	13. 54	434. 9/330. 0	434. 9/330. 0	20	24
			434. 9/250. 1			
氟虫脲	C ₂₁ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O ₃	15. 12	488. 8/140. 9	488. 8/140. 9	45	22
			488. 8/158. 1			

标准溶液和溶剂标准溶液的标准曲线斜率比值作为评价基质效应,比值越接近 1.0 说明基质效应越弱。结果本方法对 10 种农药的基质效应如图 4 所示,比值在 0.53 ~ 2.13 范围之内,提示部分农药在茶叶中存在基质增强或抑制效应,如多菌灵(2.13)和氟虫腈(1.61)具有强的基质增强效应,而噻嗪酮(0.74)和吡虫林(0.53)则有强的基质抑制效应,因而本试验采用基质匹配的标准曲线进行定量,确保定量分析结果的可靠性。

2.5 茶叶样品中农药多残留的定量方法

2.5.1 线性范围、检出限和定量限

配制定性筛查到的 10 种农药的基质匹配系列

混合标准溶液,系列浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 μg/L,重复进样 2 次,以标准溶液浓度为横坐标,定量离子的色谱峰峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明 10 种农药在 0.1 ~ 20 μg/L 的浓度范围内均呈良好的线性关系,相关系数 $r > 0.999$ 。

以空白茶叶加标水平为 5 和 10 μg/kg 样品提取净化液在仪器上的响应为基础,以信噪比为 3 对应的浓度为方法的检出限,以信噪比为 10 对应的浓度为方法的定量限,10 种农药的检出限和定量限分别为 0.2 ~ 0.5 μg/kg 和 0.5 ~ 2 μg/kg,能够满足欧盟考核所规定的最低报告水平(MRRL),见表 3。

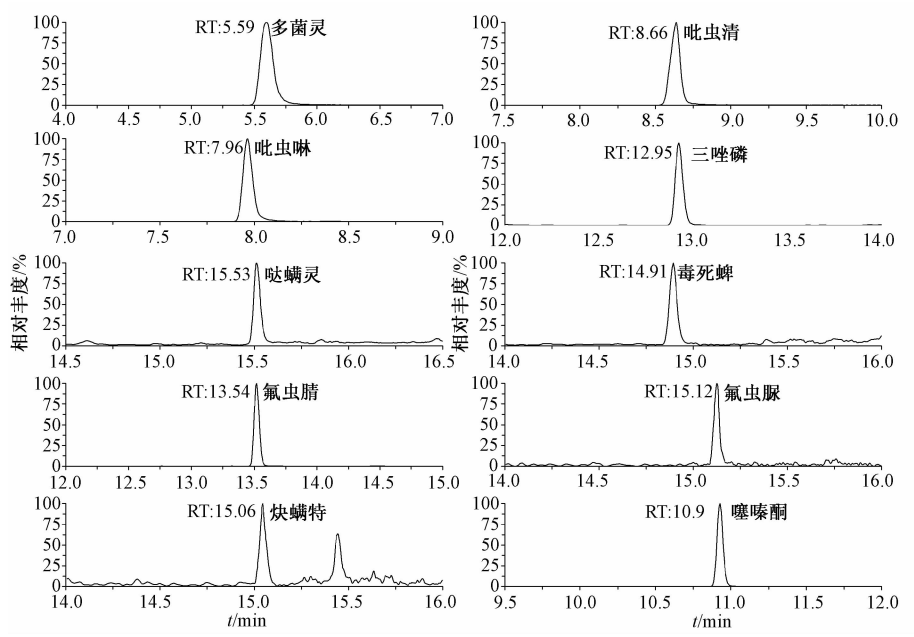


图 2 从欧盟考核茶叶样品中定性筛查到的 10 种农药总离子流色谱图

Figure 2 Total ion chromatograms of 10 pesticides from the check tea sample

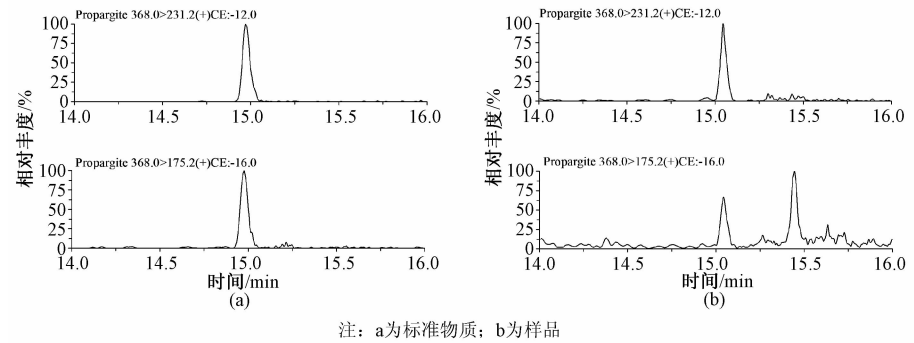


图 3 样品中炔螨特定量检测结果与标准物质定量检测结果比较图

Figure 3 Comparison of quantitative detection results about propargite between tea sample and reference standard

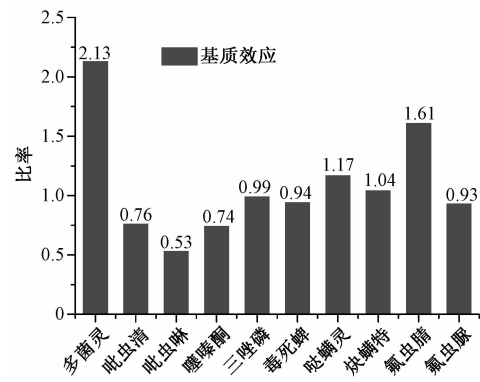


图 4 10 种农药在 0.2 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围下的基质效应
Figure 4 Matrix effects for 10 pesticides at the concentrations of 0.2-20 $\mu\text{g/L}$

2.5.2 方法的精密度和准确度

以空白茶叶样品加标的回收率表示方法的准确度,以回收率的相对标准偏差表示方法的精密度。通过比较 CAC、欧盟、日本及中国的茶叶农残限量标准,确定欧盟针对茶叶的农药最高残留限

表 3 检测农药的线性及定量限

Table 3 LOQ and linear equation of analytes

农药	线性方程	相关系数 r	线性范围 / ($\mu\text{g/L}$)	检出限 / ($\mu\text{g/kg}$)
多菌灵	$y = 979833x + 137821$	0.999 9	0.1 ~ 20	0.4
吡虫清	$y = 58582.7x + 74092.6$	0.999 1	0.1 ~ 20	0.2
吡虫啉	$y = 50090.7x + 2897.56$	0.999 6	0.1 ~ 20	1.0
噻嗪酮	$y = 1361079x + 843246$	0.999 8	0.1 ~ 20	0.2
三唑磷	$y = 122563x - 12108.9$	0.999 8	0.1 ~ 20	0.2
毒死蜱	$y = 137622x + 3359.99$	0.999 8	0.1 ~ 20	0.5
哒螨灵	$y = 878762x + 33645.7$	0.999 9	0.1 ~ 20	0.7
炔螨特	$y = 371871x - 11111.1$	0.999 7	0.1 ~ 20	0.5
氟虫腈	$y = 103162x + 234049$	0.999 8	0.1 ~ 20	0.2
氟虫脲	$y = 171877x - 1700.14$	0.999 9	0.1 ~ 20	0.2

量(MRL)的规定最为严格,即一律为 0.01 mg/kg ,因此本研究根据欧盟规定的最高残留限量以及目标化合物的定量限值,选择 2、10、20、100 $\mu\text{g/kg}$ 4 个水平作为加标水平,每个浓度水平 6 份平行样品,按照 1.2.2 进行处理,回收率和相对标准偏差结果见表 4。由表 4 可见,10 种农药的平均回收率在 75.7% ~

105.8%之间,相对标准偏差在2.3%~18.4%之间。空白加标回收试验结果说明方法的精密度和准确度良好,这是准确可靠地检测考核茶叶的前提。

表 4 空白茶叶样品加标回收试验结果($n=6$,%)
Table 4 Recovery and relative standard deviation of different

农药	spiked levels							
	添加浓度水平							
	2 $\mu\text{g/kg}$		10 $\mu\text{g/kg}$		20 $\mu\text{g/kg}$		100 $\mu\text{g/kg}$	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
多菌灵	88.8	9.3	77.1	18.4	88.3	9.7	84.2	5.3
吡虫清	94.5	9.0	104.0	14.0	96.8	13.1	94.4	10.0
吡虫啉	95.3	9.9	79.3	6.2	94.1	11.3	93.3	5.3
噻嗪酮	84.0	10.0	77.1	2.3	82.6	8.3	81.2	4.6
三唑磷	92.7	12.1	89.4	2.6	90.7	6.3	87.9	5.5
毒死蜱	79.3	9.3	78.7	8.2	79.2	12.8	75.7	4.5
哒螨灵	83.7	9.6	94.0	9.8	105.8	10.1	105.0	5.4
炔螨特	97.0	9.9	101.2	5.1	93.5	5.7	92.0	4.1
氟虫腈	87.8	8.7	89.0	11.2	93.1	8.4	102.0	6.7
氟虫脲	96.5	12.4	98.7	6.4	95.1	6.2	93.5	3.9

2.5.3 考核样品的测定

采用建立的方法检测欧盟茶叶考核样品中定性筛查到的10种农药残留量,含量结果见表5。初步考核结果显示,样品中含有农药灭多威约0.060 mg/kg。灭多威标准溶液在2 $\mu\text{g/kg}$ 浓度下灵敏度已不能达到检出要求,响应较低,并且灭多威本身具有较强的基质抑制效应,样品经过前处理净化、

稀释也有一定损失,故本次考核中灭多威出现假阴性报告。样品中其他种类农药考核结果优异。

表 5 考核茶叶样品中农药残留含量和相对标准偏差($n=3$)
Table 5 Contents and RSD of pesticides from the check sample

农药	样品含量 /(mg/kg)	RSD /%	农药	样品含量 /(mg/kg)	RSD /%
多菌灵	0.025	2.0	毒死蜱	0.030	6.4
吡虫清	0.373	1.9	哒螨灵	0.021	11.6
吡虫啉	0.144	0.0	炔螨特	0.003	8.7
噻嗪酮	0.167	6.4	氟虫腈	0.027	5.0
三唑磷	0.051	2.6	氟虫脲	0.004	1.2

注:由于炔螨特和氟虫脲两种农药含量低于要求报告的MRPL(0.01 mg/kg),因此,未报告具体含量

2.5.4 实际样品的测定

采用本文所建立的农药残留筛查检测方法对市售的10种绿茶样品进行测定,结果见表6。在10种绿茶样品中,共筛查出乙酰甲胺磷、氧化乐果、多菌灵、吡虫啉、吡虫清、醚菌酯、三唑磷、氟虫腈、氟硅唑、茚虫威、苯醚甲环唑、噻嗪酮、氟丙氧脲、毒死蜱、炔螨特、氟虫脲、哒螨灵和醚菊酯共18种农药残留,对其中多菌灵、吡虫啉、吡虫清、三唑磷、氟虫腈、噻嗪酮、毒死蜱、炔螨特、氟虫脲和哒螨灵10种农药进行定量检测,含量均未超过我国所规定的茶叶限量标准。

表 6 10 种绿茶样品中农药残留检出结果(mg/kg)
Table 6 Content of pesticide residues in 10 green tea samples

样品名称	多菌灵	吡虫啉	吡虫清	三唑磷	氟虫腈	噻嗪酮	毒死蜱	炔螨特	氟虫脲	哒螨灵
毛峰茶	0.250	0.653	—	0.002	—	—	0.035	—	—	—
六安瓜片	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
绿螺茶	—	0.044	0.111	0.241	—	0.194	—	—	—	0.065
雨花茶	—	0.277	0.483	—	0.030	0.202	0.023	—	—	0.206
龙井茶	—	—	—	0.041	—	—	—	—	—	0.125
云南滇绿	0.347	0.279	0.225	0.225	—	0.333	0.453	—	0.016	—
竹叶青	—	—	0.094	0.253	—	0.135	0.050	—	—	0.020
碧螺春	—	0.044	0.050	—	—	—	0.020	0.004	—	0.019
信阳毛尖	0.035	0.067	0.306	0.068	—	0.398	0.050	—	—	—
龙顶茶	0.043	0.508	0.221	—	0.087	—	0.155	—	0.451	0.044

注:—表示未检出

3 小结

本文利用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测技术,采用QuEChERS方法对样品进行前处理,建立了茶叶基质中农药的多残留快速筛查及目标化合物的定量检测方法。通过线性试验、检出限和定量限、加标回收试验等方法学验证,证明本方法简单、快速、准确、灵敏度高,适合于茶叶中农药多残留的筛查及确证定量同时检测。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,中华人民共和国

国农业部.GB 2763—2014 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].北京:中国标准出版社,2014.
[2] 朱永哲,冯雅男,金正汉.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定土壤中239种农药的残留量[J].色谱,2013,31(9):850-861.
[3] 宋稳成,单炜力,简秋,等.国际食品法典农药残留限量标准最新动态及发展趋势[J].农药科学与管理,2013,34(1):31-39.
[4] JIN B H, XIE L Q, GUO Y F, et al. Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: a review of extraction and detection methods[J]. Food Res Int, 2012, 46(1): 399-409.
[5] Pakritsadang K, William E B, Jon W, et al. M. Automated QuEChERS tips for analysis of pesticide residues in fruits and

vegetables by GC-MS[J]. J Agric Food Chem,2013,61(10): 2299-2314.

[6] ZHAO P Y, WANG L, ZHANG F Z, et al. Multi-walled carbon nanotubes as alternative reversed-dispersive solid phase extraction materials in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS method[J]. J Chromatogr A,2012,1225(1):17-25.

[7] 刘晓亮,李雪生,潘灿平,等. 中草药中13种代表性农药多残留的分散固相净化与气相色谱-质谱法测定[J]. 分析化学, 2013,41(4):553-558.

[8] 吕冰,朱盼,李荷丽,等. QuEChERS-气相色谱-质谱法测定土豆中109种农药残留[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(3): 238-244.

[9] 廖和菁,张雪春,胡礼澜,等. 气相色谱法同时测定茶叶中10种有机磷农药残留[J]. 中国食品卫生杂志,2015,27(1): 41-44.

[10] Lukasz R, Ana L, Ana U, et al. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A,2013,1304(1): 109-120.

[11] Sinha S N, Vrdhana Rao M V, Vasudev K, et al. A liquid chromatography mass spectrometry-based method to measure organophosphorous insecticide, herbicide and non-organophosphorous pesticide in grape and apple samples[J]. Food Control,2012,25(2):636-646.

[12] 金芬,史晓梅,王静,等. 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定水果中19种酸性农药[J]. 分析化学,2013,41(3): 354-359.

[13] Emilia F,Anna S. Application of a truly one-point calibration for pesticide residue control by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B,2012,901(15):107-114.

[14] Oscar N,Hector G,Imma F,et al. Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. J Chromatogr A,2012,1249(3):164-180.

[15] Polgar L, Garcia-Reyes J F, Fodor P, et al. Retrospective screening of relevant pesticide metabolites in food using liquid chromatography high resolution mass spectrometry and accurate-mass databases of parent molecules and diagnostic fragment ions[J]. J Chromatogr A,2012,1249(3):83-91.

[16] Chowdhury M A Z, Fakhruddin A N M, Islam M N, et al. Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Control,2013,34(1):457-465.

[17] Bruzzoniti M C, Checchini L, De Carlo R M, et al. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices;a critical review[J]. Anal Bioanal Chem,2014,406(17):4089-4116.

[18] 陈达炜,高洁,苗虹,等. 超高效液相色谱-高分辨质谱法快速筛查土豆中的多种农药残留[J]. 分析化学,2014,42(4): 579-584.

[19] AOAC Official Method. Pesti-cide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatog-raphy/tandem mass spectrometry [S]. 2007.

[20] EN 15662:2008. Foods of plant origin-determination of pesticide resi-dues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extrac-tion/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method [S]. 2008.

[21] European Communities. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC (1996) concerning the performance of analytical methods and the interpretation of result [S]. Official Journal of the European Communities,2002.

· 请示批复 ·

国家卫生计生委办公厅关于实施《食品添加剂使用标准》 (GB 2760—2014)问题的复函

国卫办食品函〔2015〕469号

中国食品工业协会：

你协会《关于〈食品安全标准 食品添加剂使用标准〉实施过渡期等有关问题的建议》(中国食协〔2015〕23号)收悉。经研究并征得工业和信息化部、质检总局、食品药品监管总局等部门同意,现函复如下：

一、《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760—2014)于2015年5月24日正式实施,请你协会加强标准宣传培训,做好行业贯彻实施。

二、关于食品添加剂名称修改带来的旧版标签标识问题,经研究,在不影响食品安全的前提下,2016年6月30日前生产的食品,允许其标签标识继续使用GB 2760—2011规定的食品添加剂名称,并在保质期内继续销售;2016年6月30日起,食品生产企业必须按照GB 2760—2014规定的食品添加剂名称进行标签标识。

专此函复。

(相关链接:<http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s3593/201505/4c7fce389d554490920c37c30b93b8cc.shtml>)

国家卫生计生委办公厅
二〇一五年五月二十七日