

QuEChERS—高效液相色谱法检测柑桔中毒死蜱、吡虫啉和残杀威农残

Detected chlorpyrifos, imidacloprid, and propoxur residues in citrus by QuEChERS-high performance liquid chromatography method

孙志高^{1,2} 盛冉¹ 郝静梅¹ 龙勇¹ 于奉生¹ 方明¹

SUN Zhi-gao^{1,2} SHENG Ran¹ HAO Jing-mei¹ LONG Yong¹ YU Feng-sheng¹ FANG Ming¹

(1. 西南大学柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

(1. College of Food Science Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Southwest University, Citrus Research Institute, Chongqing 400712, China)

摘要:将改进的 QuEChERS 方法与 GB/T 24691—2009 中农药提取方法进行比较,通过高效液相色谱法检测 2 种方法对柑桔农残的分离效果。结果显示:改进的 QuEChERS 方法检测毒死蜱、吡虫啉和残杀威时出峰时间分别约为 5.1, 3.8, 11.5 min;当空白加标水平分别为 0.8~80.0, 0.5~40.0, 0.8~80.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,检出限分别为 0.89, 0.55, 0.39 $\mu\text{g/mL}$;当空白加标水平分别为 1~20, 1~20, 5~30 $\mu\text{g/mL}$ 时,回收率分别为 68%~109%, 94%~108%, 109%~125%, 相对标准偏差分别为 2.48%~5.03%, 7.79%~10.92%, 2.32%~6.77%。采用 GB/T 24691—2009 提取毒死蜱、吡虫啉和残杀威时,出峰时间与改进的 QuEChERS 方法基本相同;当与改进的 QuEChERS 方法采用相同的空白加标水平,检出限分别为 0.80, 0.78, 0.54 $\mu\text{g/mL}$, 回收率分别为 107%~195%, 25%~87%, 53%~93%, 相对标准偏差分别为 5.61%~7.73%, 6.89%~9.42%, 5.44%~10.45%。因此, QuEChERS—高效液相色谱法检测毒死蜱、吡虫啉和残杀威农残时优于 GB/T 24691—2009 方法。

关键词: QuEChERS; 高效液相色谱; 毒死蜱; 吡虫啉; 残杀威

Abstract: QuEChERS is a simple and efficient extraction method, widely used in the pesticide of residue detection. The purpose of this paper was to compare the extraction methods of pesticides between the improved QuEChERS method and the GB/T 24691—2009 (fruit and vegetable detergent). The extraction of pesticide residue from citrus samples was detected by HPLC. The results showed that when the chlorpyrifos, imidacloprid and propoxur were detected by the improved QuEChERS method, the peak time was about 5.1,

3.8, 11.5 min, respectively. When the spiked blank levels were 0.8~80, 0.5~40, 0.8~80 $\mu\text{g/mL}$, the detection limits were 0.89, 0.55, and 0.39 $\mu\text{g/mL}$. While the spiked blank levels respectively were in 1~20, 1~20, 5~30 $\mu\text{g/mL}$, the recovery rate was 68%~109%, 94%~108%, 109%~125% and the relative standard deviation was 2.48%~5.03%, 7.79%~10.92%, 2.32%~6.77% respectively. When the fruit and vegetable detergent extracted from GB/T 24691—2009, the peak time of chlorpyrifos, imidacloprid and propoxur was basically the same as the modified QuEChERS method. Moreover, when the same spiked blank level was applied to the improved QuEChERS method, the detection limits were 0.80, 0.78, and 0.54 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The recoveries were 107%~195%, 25%~87% and 53%~93%, and the relative standard deviations were 5.61%~7.73%, 6.89%~9.42% and 5.44%~10.45%, respectively. Thus, it indicated that the improved QuEChERS-HPLC was better than GB/T 24691—2009 (fruit and vegetable detergent).

Keywords: QuEChERS; high performance liquid chromatography; chlorpyrifos; imidacloprid; propoxur

柑桔作为世界第一大类水果,种植面积和产量都逐年稳步增长,且种植面积和产量中国都稳居第一,2014 年中国柑桔种植面积为 $240.40 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 、产量为 $3\,546.93 \times 10^4 \text{ t}$ ^[1]。同时,柑桔也是世界第三大贸易农产品,鲜果出口为其主要方式,但中国柑桔的质量安全、贸易出口形势却不容乐观,突出表现为农药残留率偏高^[2]。因此,开发快速、高效、简便、灵敏的农残检测方法刻不容缓,对柑桔产业发展有着重要的意义。

果蔬农药残留检测方法较多,其中分子印迹^[3]、光谱无损检测^[4]、QuEChERS 联用液相或气相^[5-7]等方法发展迅速。但在众多方法之中,QuEChERS 联用液相或气相对农药检测更具有广泛性、稳定性和准确性。该方法以乙腈作为提

基金项目:四川省科技计划项目(编号:2014NZ0062)
作者简介:孙志高(1964—),男,西南大学副研究员,硕士生导师。
E-mail: cpro@cric.cn

收稿日期:2017—03—20

取剂,利用氯化钠盐析以促进农药提取,采用无水硫酸镁对水、PSA(乙二胺基-N-丙基)等基质杂物进行吸取净化处理,进而实现农药的简单高效提取^[7-10]。QuEChERS 技术经过 10 多年的发展,国外已经将其作为标准方法应用,如英国 BS EN 15662:2008 标准已将 QuEChERS 法作为植物来源食物中农药残留的检测方法,并在原方法的基础上改进和发展了多种相似的方法,根据检测样品、农药种类不同,采用具有缓冲或酸性物质的乙腈溶液,取代了原始单一乙腈提取剂^[8,11-13];将具盐析功能的氯化钠、吸水功能的无水硫酸镁、纯化吸附各种基质杂质功能的 PSA 等也替换成了其它物质^[14-17]。

虽然中国 GB/T 24691—2009 已实施,但该标准方法在提取农残时存在有机溶剂消耗量大、耗时长、准确度不高等缺陷。本试验拟对改良 QuEChERS 法与 GB/T 24691—2009 中农药提取试验方法进行对比研究,旨在探讨改良 QuEChERS 法在果蔬洗涤剂国标中应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

柑桔样品:北碚 447,采于重庆市北碚区歇马镇卫星村;
毒死蜱农药:有效成分 14.8%,中国农业科学院植保所廊坊农药中试厂;

吡虫啉农药:有效成份 10%,江苏克胜集团股份有限公司;

残杀威农药:有效成份 12%,江苏扬农化工股份有限公司;

吡虫啉[Imidacloprid,1-(6-氯吡啶-3-吡啶基甲基)-N-硝基亚咪唑烷-2-基胺,cas:138261-41-3]标准品(纯度 98.4%)、毒死蜱[Chorpyrifos, O, O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫代磷酸,cas:2921-88-2]标准品(纯度 99.4%)、残杀威[Propoxur,2-(1-甲基乙氧基)苯基氨基甲酸甲酯,cas:114-26-1]标准品(纯度 98.1%)、PSA(乙二胺基-N-丙基):上海哈灵生物科技有限公司;

乙腈:色谱纯,美国 Sigma 公司;
其它试剂未作特殊说明均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

高效液相色谱(HPLC):UltiMateTM 3000 型,美国 DI-ONEX 公司;

台式低速大容量离心机:L-550 型,长沙湘仪离心仪器有限公司;

台式高速冷冻离心机:UnicenMR 型,德国 Germany Herolab 公司;

漩涡振荡器:XW-80A 型,上海青浦沪西仪器厂;
组织捣碎机:JJ-2B 型,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;

电子天平:YP10K-1 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

电子天平:FA2004B 型,赛多利斯科学仪器;
水浴锅:LKTC-B1-T 型,上海双舜实业发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:博纳艾杰尔 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm,5 μm);柱温:35 ℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:230(毒死蜱),269(吡虫啉),210(残杀威) nm;进样量:20 μL;流动相为乙腈/水(毒死蜱、吡虫啉、残杀威对应的乙腈与水体积比分别为 95:5,55:45,80:20)。

1.2.2 标准溶液制备 分别准确称取毒死蜱标准品、吡虫啉标准品、残杀威标准品 0.04,0.02,0.04 g,乙腈溶解,制成质量浓度分别为 200,100,200 μg/mL 的标准品原溶液。准备适量原溶液,将 3 种标品分别配置成 0.8,1.0,2.0,3.0,4.0,20.0,80.0 μg/mL(毒死蜱);0.5,1.0,2.0,3.0,10.0,40.0 μg/mL(吡虫啉);0.8,1.0,2.0,3.0,4.0,20.0,80.0 μg/mL(残杀威)系列浓度的标准溶液,备用。

1.2.3 试样处理

(1) 标准硬水:称取 MgSO₄ · 7H₂O 24.7 g 和 CaCl₂ 16.7 g,配制成 10 L,即浓度为 2 500 mg/kg。在使用时,将 1 L 再稀释成 10 L,即浓度为 250 mg/kg。

(2) 农药乳液制备:称取适量毒死蜱、吡虫啉和残杀威等农药分别溶于 500 g 无水乙醇溶液中搅拌均匀,再用标准硬水定量至 5 000 g,搅拌均匀备用。3 种农药乳液浓度分别为 >1 000(毒死蜱),>500(吡虫啉),>1 000(残杀威) mg/kg。

(3) 含农药柑桔样本制备:选取无损伤、腐烂且大小均匀的柑桔作为试验样本。将样品浸于农药乳液中,30 min 后取出放置于通风橱晾干 24 h。将制备好的柑桔样品分成若干组,每组 2 份平行样品,每份重量为(400±40) g。

1.2.4 样品检测

(1) 改良 QuEChERS 方法:称取样品 10 g 加乙腈 15 mL、无水 MgSO₄ 4 g、NaCl 1 g 漩涡振荡 3 min,并在 4 200 r/min 离心 5 min,取 2 mL 离心上清液于加有 150 mg/mL 无水 MgSO₄,20 mg/mL PSA 的 10 mL 离心管中漩涡振荡,再在 10 000 r/min 离心 5 min,并用 0.22 μm 有机膜过滤备用。

(2) 国标法(GB/T 24691—2009):取 60 g 捣碎均匀的柑桔样品、加入 100 mL 0.1%冰乙酸乙腈溶液、6 g 无水乙酸钠和 18 g 无水 MgSO₄,搅匀并置于 50 Hz 的超声器中处理 3 min 后,取上清萃取液于烧杯中,且按此方法重复 2 次。将重复萃取 3 次后的样品残渣放入 50 mL 离心管,于 4 000 r/min 离心 4 min,将离心之后的上清液与前面得到的萃取液混合,并置于(80±2) ℃水浴中浓缩至 5~8 mL(浓缩耗时约 3~4 h),最后浓缩液定容至 50 mL 备用。

2 结果与分析

2.1 色谱条件选择

在 190~400 nm 波长范围,分别对毒死蜱、吡虫啉、残杀威标准溶液进行全波段扫描,分别在 230,269,210 nm 处能够获得较好吸收值。为了避免因出峰时间太早受到溶剂峰干扰、出峰时间太晚耗时太长,以及受样品基质等因素的影响,本研究通过优化检测条件,确定的最佳流动相为乙腈(A)和水(B),且 3 种农药(毒死蜱、吡虫啉、残杀威)检测流动相 A 与 B 的体积比分别为 95:5,55:45,80:20;所检测

的标品色谱图见图 1。

2.2 样品测定

由表 1 可知,在提取柑桔样品农药残留过程中,标准法与改良 QuEChERS 法相比,不论是提取时间还是溶剂消耗量,改良 QuEChERS 法都远远少于国标法,因此改良 QuEChERS 法极具实际应用意义。

由图 2 和图 3 可知,毒死蜱和残杀威在 2 种提取方法下其保留时间(毒死蜱约 5.1 min、残杀威约 11.5 min)、峰形与标品一致、峰形对称且受其它基质影响较小。但吡虫啉由 QuEChERS 法处理后其色谱图中基质对目标峰影响较小,与

标品对比保留时间均在 3.8 min 附近,色谱图更优于国标提取法,且改良 QuEChERS 法峰形更加对称、保留时间附近无杂质干扰,能够更好地实现农残检出,因此改良 QuEChERS 法对样品中基质清除效果优于标准法。

2.3 线性方程和检出限

以空白基质加标的方式确定 2 种方法对毒死蜱、吡虫啉、残杀威 3 种农药的线性方程和检出限。根据选择的 HPLC 条件对标准溶液检测,以峰值为 y 、标准溶液浓度为 x 绘制标准曲线,得出毒死蜱、吡虫啉和残杀威 3 种农药的线

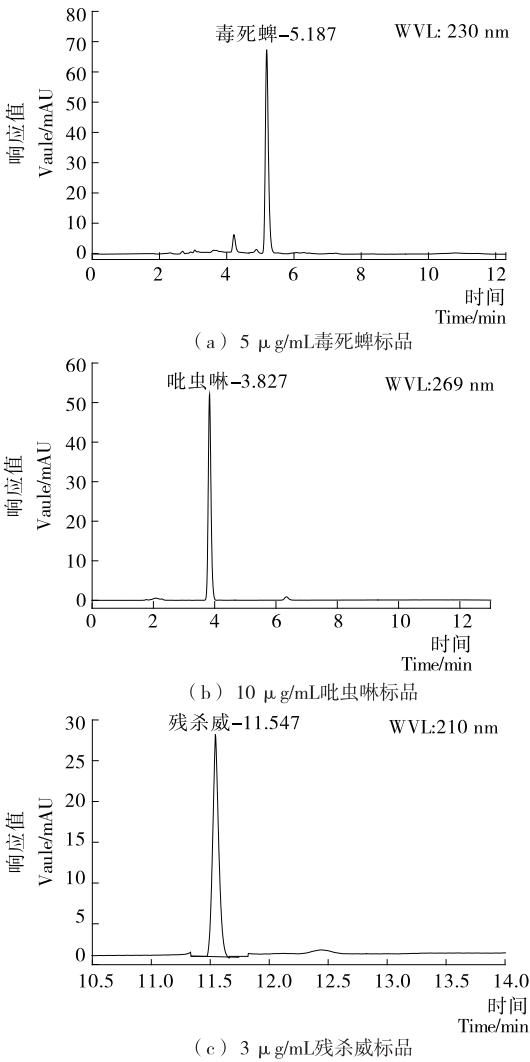


图 1 毒死蜱、吡虫啉、残杀威标品 HPLC 图
Figure 1 Chlorpyrifos, imidacloprid and propoxur standard HPLC

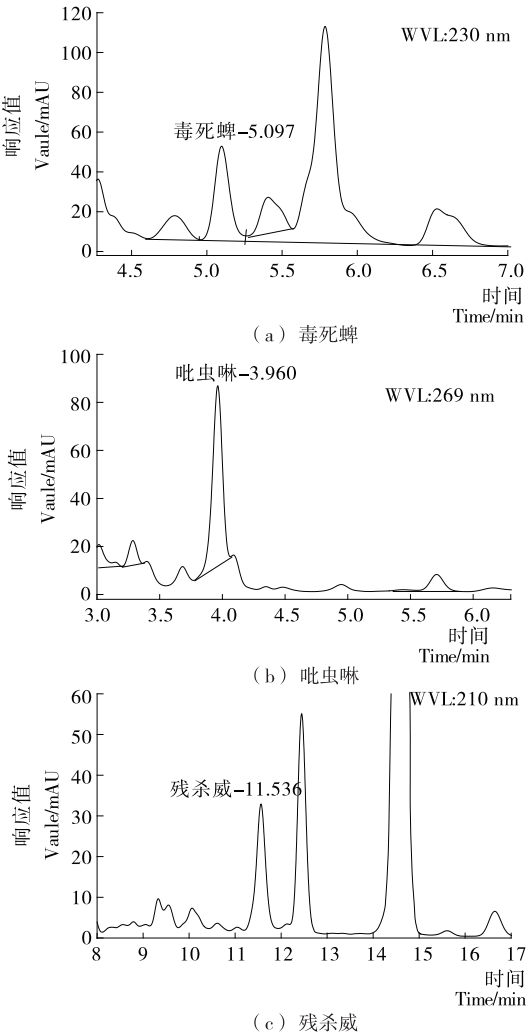


图 2 国标法提取柑桔样品中毒死蜱、吡虫啉、残杀威残留 HPLC 图
Figure 2 The national standard method extraction of Citrus samples of chlorpyrifos, imidacloprid and propoxur residues HPLC

表 1 改良 QuEChERS 法与国标法比较

Table 1 Comparison of improved QuEChERS method and pesticide extraction test in fruit and vegetable detergent GB/T 24691—2009

方法	每个样提取 所需时间/ h	溶剂(乙腈)消 耗总体积/ mL	盐析剂(无水 MgSO ₄) 消耗量/g	吸水剂 消耗量/ g	吸附 剂消耗/mg
改良 QuEChERS	<0.5	15	4	1(NaCl)	40(PSA)
国标法	>3.0	340	54	18(无水乙酸钠)	—

性方程分别为 $y=0.690\ 5x-0.137\ 1$ 、 $y=1.802\ 4x+0.093$ 、 $y=0.805\ 5x-0.219\ 9$ ，相关系数 R^2 分别达 0.999 9、1.000 0、0.999 8。由表 2 可知，毒死蜱、吡虫啉和残杀威 3 种农药空

白加标水平分别为 0.8~80.0、0.5~40.0、0.8~80.0 $\mu\text{g/mL}$ 时，改良后的 QuEChERS 法对吡虫啉和残杀威的检出限分别为 0.55、0.39 $\mu\text{g/mL}$ 均低于国标法的 0.78、0.54 $\mu\text{g/mL}$ ，虽改良后的 QuEChERS 法对毒死蜱的检出限为 0.89 $\mu\text{g/mL}$ 稍高于国标法的 0.80 $\mu\text{g/mL}$ ，但相差不大。整体而言，改良后的 QuEChERS 法优于国标法。

表 2 HPLC 测定范围及检出限

组分	测定范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R^2	方法检出限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
			改良 QuEChERS	国标法
毒死蜱	0.8~80.0	0.999 9	0.89	0.80
吡虫啉	0.5~40.0	1.000 0	0.55	0.78
残杀威	0.8~80.0	0.999 8	0.39	0.54

2.4 精密度与加标回收率试验

采用空白柑桔样品加标，其中 1~20 $\mu\text{g/mg}$ 毒死蜱、1~20 $\mu\text{g/mg}$ 吡虫啉和 5~30 $\mu\text{g/mg}$ 残杀威，采用改良的 QuEChERS 法，回收率可分别控制在 68%~109%，94%~108%，109%~125%，相对标准偏差分别为 2.48%~5.03%，7.79%~10.92%，2.32%~6.77%。而国标法回收率仅能分别控制在 107%~195%，25%~87%，53%~93%，相对标准偏差分别在 5.44%~10.45%，6.89%~9.42%，5.61%~7.73%。由表 3~5 可知，采用改良的 QuEChERS 法，3 种农药的回收率都远远高于国标法，且加标回收率及相对标准偏差能够满足 NY/T 788—2004《农药残留试验准则》要求，仅部分指标与《农药残留试验准则》推荐标准稍有偏差，因此改良的 QuEChERS 法优于标准法。

3 结论

对柑桔样品中 1~20 $\mu\text{g/mg}$ 毒死蜱、1~20 $\mu\text{g/mg}$ 吡虫啉和 5~30 $\mu\text{g/mg}$ 残杀威采用改良的 QuEChERS 提取，HPLC 图谱目标峰较对称、检出限较低分别为 0.89、0.55、0.39 $\mu\text{g/mL}$ ，回收率分别达到 94%~108%，68%~109%，109%~125%，相对标准偏差分别为 7.79%~10.92%，2.48%~5.03%，2.32%~6.77%，基本可满足《农药残留试验准则》中所要的范围；采用 GB/T 24691—2009 的方法目标峰

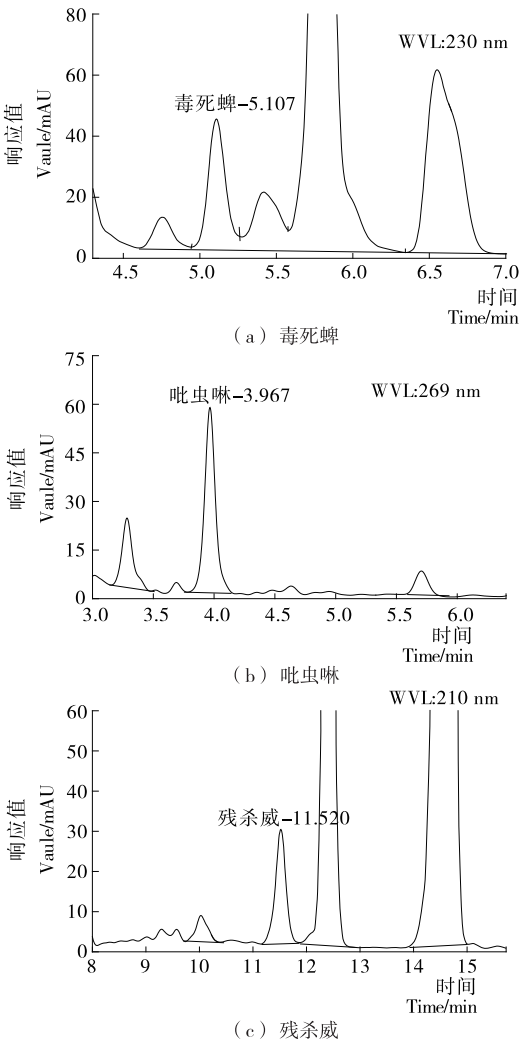


图 3 改良 QuEChERS 法提取柑桔样品中毒死蜱、吡虫啉、残杀威残留 HPLC 图

Figure 3 The modified QuEChERS method (right) extraction of Citrus samples of chlorpyrifos, imidacloprid and propoxur residues HPLC

表 3 HPLC 加标回收率及变异系数

Table 3 HPLC recovery and RSD of benzoylurea insecticides (n=5)						
组分	本底值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加入量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	改良 QuEChERS		国标法	
			加标回收率/%	RSD/%	加标回收率/%	RSD/%
毒死蜱	0	1	108	10.92	25	9.42
	0	10	99	7.36	66	9.19
	0	20	94	7.79	87	6.89
吡虫啉	0	1	68	2.48	195	10.45
	0	10	109	4.83	128	7.32
	0	20	103	5.03	107	5.44
残杀威	0	5	125	6.77	53	7.73
	0	15	119	2.99	78	7.16
	0	30	109	2.32	93	5.61

表 4 《农药残留试验准则》中不同添加浓度要求的回收率

Table 4 Recovery ratio of different additive concentrations

添加浓度/(mg·kg ⁻¹)	平均回收率/%
>1	70~110
(0.1,1]	70~110
(0.01,0.1]	70~110
(0.001,0.01]	60~120
≤0.001	50~120

表 5 《农药残留试验准则》中不同添加浓度回收率试验要求的相对标准偏差

Table 5 Required relative standard deviation of different additive concentrations

添加浓度/(mg·kg ⁻¹)	相对标准偏差 RSD/%
>1	10
(0.1,1]	15
(0.01,0.1]	20
(0.001,0.01]	25
≤0.001	30

也较为对称,检出限分别为 0.8,0.78,0.54 μg/mL,回收率低分别为 25%~87%,107%~195%,53%~93%,相对标准偏差高分别为 6.89%~9.42%,5.61%~7.73%,5.44%~10.45%;2 种方法出峰时间都分别在 5.1,3.8,11.5 min 左右。表明改良的 QuEChERS 法在检测柑桔农残毒死蜥、吡虫啉和残杀威时,优于 GB/T 24691—2009 的方法。

本试验采用简单、快捷、高效的改良-QuEChERS 法,将其运用到农残检测领域,具有替代 GB/T 24691—2009 中检测毒死蜥、吡虫啉和残杀威 3 种农残的潜质。同时,本试验对仪器和试验条件要求不高,适合大多数实验室开展农残分析。但基质效应是农残检测定量分析中影响准确性的重要因素^[18-20],本试验中基质效应虽低于国标,但还需从中寻找更优的方法,以降低基质效应或建立有效的基质效应补偿措施。

参考文献

[1] 齐乐,祁春节. 世界柑桔产业现状及发展趋势[J]. 农业展望, 2016, 12(12): 46-52.

[2] 张耀海,焦必宁,赵其阳,等. 我国主产地柑桔的农药残留现状研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(4): 189-193.

[3] SELLERGRÉN B. Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer [J]. Analytical Chemistry, 1994, 66(9): 1 578-1 582.

[4] 李文秀,徐可欣. 蔬菜农药残留检测的红外光谱法研究[J]. 光谱学与光谱析, 2004, 24(10): 1 202-1 204.

[5] 张秀尧,蔡欣欣,陈路略,等. 缓冲 QuEChERS 法提取气相色谱火焰光度检测法快速测定水果蔬菜中 39 种有机磷农药残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2 133-2 135.

[6] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S, STAJNBAHER D. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determi-

nation of pesticide residues in produce[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(2): 412-431.

[7] PAREJA L, CESIO V, HEINZEN H, et al. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS [J]. Talanta, 2011, 83(5): 1 611-1 622.

[8] Technical Committee CEN/TC 275. BS EN 15662:2008 Foods of plant origin-Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method[S]. [S. l.]: Standards Policy and Strategy Committee, 2008.

[9] 何进林,张志华. 高效液相色谱法测定水果中吡虫啉农药残留量 [J]. 食品科学, 2011, 32(6): 230-232.

[10] 鲁红,吴国杰,梁世强,等. QuEChERS/超高效液相色谱—高分辨飞行时间质谱联用法测定蔬菜中 4 种有机磷农药残留[J]. 广东农业科学, 2012, 39(11): 181-184.

[11] LEHOTAY S J, MASTOVSKA K, LIGHFIELD A R. Use of buffering to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables [J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(2): 615-629.

[12] AYSAL P, AMBRUS A, LEHOTAY S J, et al. Validation of an efficient method for the determination of Pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction[J]. Journal of Environmental Science and Health, 2007, 42(5): 481-490.

[13] LESUEUR C, KNITTL P, GARTNER M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method[J]. Food Control, 2008, 19(9): 906-914.

[14] LEHOTAY S J, SON K A, KWON H, et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1 217(16): 2 548-2 560.

[15] PAYA P, ANASTASSIADES M, MACK D, et al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(6): 1 697-1 714.

[16] 刘洪林,童华荣,曾艺涛,等. 农药残留分析前处理方法研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 299-304.

[17] 张帆,李忠海,黄媛媛,等. 改良 QuEChERS—气相色谱法测定茶油中有机磷类农药残留[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 87-90.

[18] FRENICH A G, VIDAL E L M, MONTORO P, et al. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 390(3): 947-959.

[19] 王连珠,周昱,陈泳,等. QuEChERS 样品前处理—液相色谱—串联质谱法测定蔬菜中 66 种有机磷农药残留量方法评估 [J]. 色谱, 2012, 30(2): 146-153.

[20] 潘媛,牛华,马雪涛,等. 阿维菌素类农残检测方法的优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 90-92.