

固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中 啉虫脒、吡虫啉和氟虫腈残留量

成 婧, 王美玲, 朱绍华, 文江为, 丁 利, 王利兵*

(湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 国家食品安全检测重点实验室, 食品安全科学技术湖南省重点实验室,
长沙 410004)

摘 要: **目的** 建立茶叶中啉虫脒、啉虫脒和氟虫腈三种农药残留的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱测定方法。**方法** 样品用水浸泡, 乙腈提取, 经石墨化碳-氨基复合固相萃取小柱净化, 采用 Agilent Eclipse AAA 色谱柱分离, 以 0.1% 乙酸水溶液和乙腈为流动相梯度洗脱, 正、负离子切换扫描, 多反应监测(MRM)模式检测, 外标法定量。**结果** 在 3 个添加水平下, 啉虫脒、啉虫脒和氟虫腈的平均回收率分别为 78.8%~91.5%, 81.3%~92.8%, 和 72.8%~90.0%; 相对标准偏差分别为 2.6%~10.6%, 3.7%~6.6%和 3.6 %~7.4%。啉虫脒、啉虫脒和氟虫腈的检出限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 建立的方法简便、快速, 灵敏度高, 可满足出口茶叶中啉虫脒、啉虫脒和氟虫腈残留同时检测的要求。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱-串联质谱; 啉虫脒; 吡虫啉; 氟虫腈; 农药残留; 茶叶

Determination of imidacloprid, acetamiprid and fipronil residues in tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase extraction

CHENG Jing, WANG Mei-Ling, ZHU Shao-Hua, WEN Jiang-Wei, DING Li, WANG Li-Bing*

(Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, State Key Laboratory of Food Safety Testing, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Changsha 410004, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of imidacloprid, acetamiprid and fipronil residues in tea based on solid-phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The samples were soaked with water, extracted with acetonitrile and cleaned up with Carb/NH₂ solid phase extraction column, In the chromatographic analysis, 3 compounds were separated on an Agilent Eclipse AAA column with the gradient elution using the mobile phases of acetonitrile and water containing 0.1% acetic acid. The extractions were detected by HPLC-MS/MS using external standard method. **Results** The recoveries of at 3 spiking levels were ranged from 78.8% to 91.5%, 81.3% to 92.8% and 72.8% to 90.0% for imidacloprid, acetamiprid and fiproni, respectively. The relative standard deviations (RSDs) were ranged from 2.6% to 10.6%, 3.7% to 6.6% and 3.6 % to 7.4% for imidacloprid, acetamiprid and fiproni,

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD29B05)

Fund: Supported by the National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2012BAD29B05)

*通讯作者: 王利兵, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全与检验检疫安全。E-mail: wanglb0419@126.com

*Corresponding author: WANG Li-Bing, Ph.D, Researcher, Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China. E-mail: wanglb0419@126.com

respectively. The limits of detection (LOQ, $S/N = 10$) were 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The limits of quantification (LOD, $S/N = 3$) were 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The method is simple, fast and sensitive. It is suitable for the simultaneous determination of imidacloprid, acetamiprid and fipronil residues in tea.

KEY WORDS: solid-phase extraction; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; imidacloprid; acetamiprid; fipronil; pesticide residues; tea

1 引言

我国茶叶资源丰富, 茶叶作为我国出口的主要经济作物之一被越来越多的非产茶国家的消费者所青睐。但是为防治各种茶树病虫害, 化学农药在茶园中广泛使用, 而茶叶上残留的农药进入体会威胁人类的健康。因此, 欧盟和日本都制订了严格的农药残留的最大残留限量(MRL)^[1]。随着欧盟公布的法规 EU87/2014 于 2014 年 8 月 25 日正式生效实施, 其中茶叶中啉虫脒的 MRL 从 0.1 mg/kg 加严为 0.05 mg/kg, 另外吡虫啉和氟虫腓的 MRL 值分别为 0.05 和 0.005 mg/kg。而日本肯定列表规定茶叶中氟虫腓的 MRL 值为 0.002 mg/kg^[1,2]。农药残留限量要求日益严格, 通过查询欧盟食品和饲料快速报警系统^[3], 至 2012 年以来中国出口茶叶因啉虫脒、吡虫啉和氟虫腓多次农残超标被通报, 多次被检出含量超过进口国允许最大残留量, 给我国的茶叶出口造成了巨大的经济损失。为有效打破国外技术壁垒, 缩短茶叶通关时间, 促进茶叶的出口, 建立茶叶中啉虫脒、吡虫啉和氟虫腓等多种农药残留的高灵敏、快速准确的检测技术方法显得尤为重要。

由于农药残留限量要求日益严格, 其检测技术的发展也随之受到重视。目前已有关于茶叶中农药残留分析方法主要以气相色谱(GC)^[4,5]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[6,7]、高效液相色谱(HPLC)^[8,9]、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)^[10,11]等。在以上这些茶叶的多农残项目检测方法中, GC 和 GC-MS 方法常常受到化合物极性以及处理的相对复杂和耗时等限制, 而 HPLC 方法存在检出限高的缺陷, 在低含量检测时容易造成假阳性。而目前针对茶叶中的啉虫脒、吡虫啉和氟虫腓残留同时进行检测分析的 HPLC-MS 法报道不多^[12]。胡贝贞等^[12]采用混合溶剂加速溶剂提取的方法对茶叶中的氟虫腓等 8 种农药残留进行了提取, 提取方法较为繁琐。针对已有报道中存在的不足, 依据目前欧盟、日本对茶叶中农残的限量要求, 针对

茶叶中限量要求严格且重点监控的啉虫脒、吡虫啉和氟虫腓 3 种农药, 本文建立了一种简便、快速、灵敏度高的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱(SPE-HPLC-MS/MS)检测方法, 在对提取和净化方法进行优化和评估之后, 将其应用于实际样品的分析检测。该方法可同时定性和定量检测茶叶中多种农药残留, 对于保障出口茶叶农药残留的监测有重要的意义。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

API4000 QTRAP 三重四级杆串联线性离子阱质谱(美国 Applied Biosystems 公司)配电喷雾离子源(ESI); SHIMADZU LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); MILLI-Q Gradient 超纯水系统(美国密理博公司); GX-274 全自动固相萃取仪(美国吉尔森公司); SK-1 快速混匀器(常州澳华仪器有限公司); GM200 切割式混合研磨仪(德国 Retsch 公司); Sigma 1-15P 高速离心机。

吡虫啉标准品(纯度大于 99.9%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); 啉虫脒标准品(纯度大于 99.9%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); 氟虫腓标准品(纯度大于 98.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); 石墨化碳-氨基复合型固相萃取小柱(500 mg, 6 mL, 美国 Agilent 公司); 乙腈、甲醇、甲苯均为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 实验用水为超纯水; 实验检测的茶叶均来自于市场。

2.2 样品前处理

2.2.1 提取

称取粉碎均匀的茶叶样品 1.0 g(精确至 0.001 g)至 50 mL 塑料离心管, 加入 5 mL 水浸泡 20 min。加入 2 g 氯化钠、10 mL 乙腈, 在涡旋混匀器上混匀 3 min, 6500 r/min 离心 3 min, 取分层后的上清液于 20 mL 具塞刻度试管中, 再加入 10 mL 乙腈重复提取样品 1 次, 合并两次提取液并用乙腈定容, 待净化。

2.2.2 净化

在石墨化碳-氨基复合型固相萃取小柱上端装入约 1 cm 高的无水硫酸钠, 用 10 mL 甲苯-乙腈溶液(1:3=V:V)活化并弃去, 加入 5 mL 上述提取液(相当于 0.2 g 样品), 并用 15 mL 甲苯-乙腈(1:3=V:V)混合溶剂洗脱, 收集全部流出液, 控制流速为 0.5 mL/min。将收集到的溶液在 40 °C 下氮吹至干, 残渣用 1.0 mL 50% 甲醇水溶液溶解, 过 0.22 μm 滤膜待测。

2.3 仪器条件

2.3.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX XDB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相: 0.1%乙酸(A相)和乙腈(B相)。梯度洗脱程序: 0~6 min, 90%A~60%A; 6~10 min, 60%A~15%A; 10~17 min, 15%A; 17~18 min, 15%A~90%A; 18~20 min, 90%A; 流速: 0.5 mL/min。柱温: 40 °C。进样量: 10 L。

2.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 气帘气(CUR): 68.95 kPa(10 psi); 碰撞气(CAD): 48.27 kPa(7 psi); 雾化气(GS1): 448.2 kPa(65 psi); 辅助加热气(GS2): 413.7 kPa(60 psi); 离子源温度: 500 °C。正负离子切换扫描: 0~8.2 min, 正离子扫描(ESI+), 电喷雾电压(IS): 5000 V; 8.2~18.0 min, 负离子扫描(ESI-), 电喷雾电压(IS): 5000 V。多反应监测(MRM), 定性离子对、定量离子、碰撞能量(CE)、去簇电压(DP)如表 1 所示。

3 结果与讨论

3.1 流动相的选择和质谱条件的优化

根据待测化合物的结构特征, 分别在正负离子模式下考察各个化合物的质谱参数。结果发现吡虫啉和啶虫脒易在正离子模式下电离, 形成[M+H]⁺准分子离子, 氟虫腈在负离子模式下, 形成[M-H]⁻准分子

离子。因此采用正负离子切换模式进行扫描, 实现一次进样对所有化合物进行定性定量分析, 节省分析时间。同时优化质谱的离子源温度、雾化气、辅助加热气等气流大小, 使所有目标化合物都有良好的质谱响应信号。

流动相考察了水-甲醇、0.1%乙酸-甲醇、0.1%甲酸-乙腈、5 mmol/L 乙酸胺-乙腈和 0.1%乙酸-乙腈等体系对色谱峰形以及质谱强度的影响。通过比较发现当 0.1%乙酸-乙腈梯度洗脱, 分离效果较好, 且灵敏度高, 见图 1。

3.2 样品提取、净化方法的选择

在农药残留分析中常用的提取溶剂有乙腈、丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、甲醇等。由于乙腈的提取效率高, 提取杂质少, 有利于后续盐析和净化, 操作简便, 因此采用乙腈作为提取溶剂^[13]。而干燥的茶叶样品需先用水浸泡 20 min, 待其充分润展开, 以保证提取溶剂与样品充分接触, 增加溶剂的提取效率, 加入过量氯化钠, 使乙腈与水分层。

茶叶中主要干扰物是色素和有机酸类物质, 参考相关文献^[13,14], 选取石墨化碳-氨基复合型小柱进行净化。因为活性炭小柱能够有效去除色素, 而氨基柱能去除有机酸类物质, 因而使用石墨化碳-氨基复合柱可以有效去除色素和有机酸类物质, 达到净化效果。

研究发现, 将全部提取液浓缩再净化, 部分色素不能被完全除去, 净化效果不理想, 基质效应较强。综合考虑灵敏度、基质效应等各方面因素, 移取部分提取液进行净化。考察不同体积的淋洗液对目标回收率的影响, 得到洗脱曲线如图 2 所示, 从图 2 中可以看到, 淋洗液体积增至 15 mL 时, 目标化合物回收率都已达到 90% 以上。因此, 将部分提取液采用石墨化碳-氨基复合型小柱进行净化, 大体积淋洗液进行洗脱, 能够有效地实现目标物与杂质的分离, 达到净化目的。

表 1 3 种农药的 HPLC-MS/MS 分析参数
Table 1 HPLC-MS/MS parameters of 3 pesticides

化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	驻留时间/ms	去簇电压 DP/V	碰撞能量 CE/eV	保留时间/min	ESI 模式
吡虫啉	256.1	209.0*	200	51	21	6.23	+
		175.1	200	46	33		+
啶虫脒	223.0	126.1*	200	36	27	6.41	+
		90.1	200	36	45		+
氟虫腈	436.1	330.8*	200	-82	-23	10.31	-
		399.9	200	-80	-18		-

注: “*”表示定量离子对

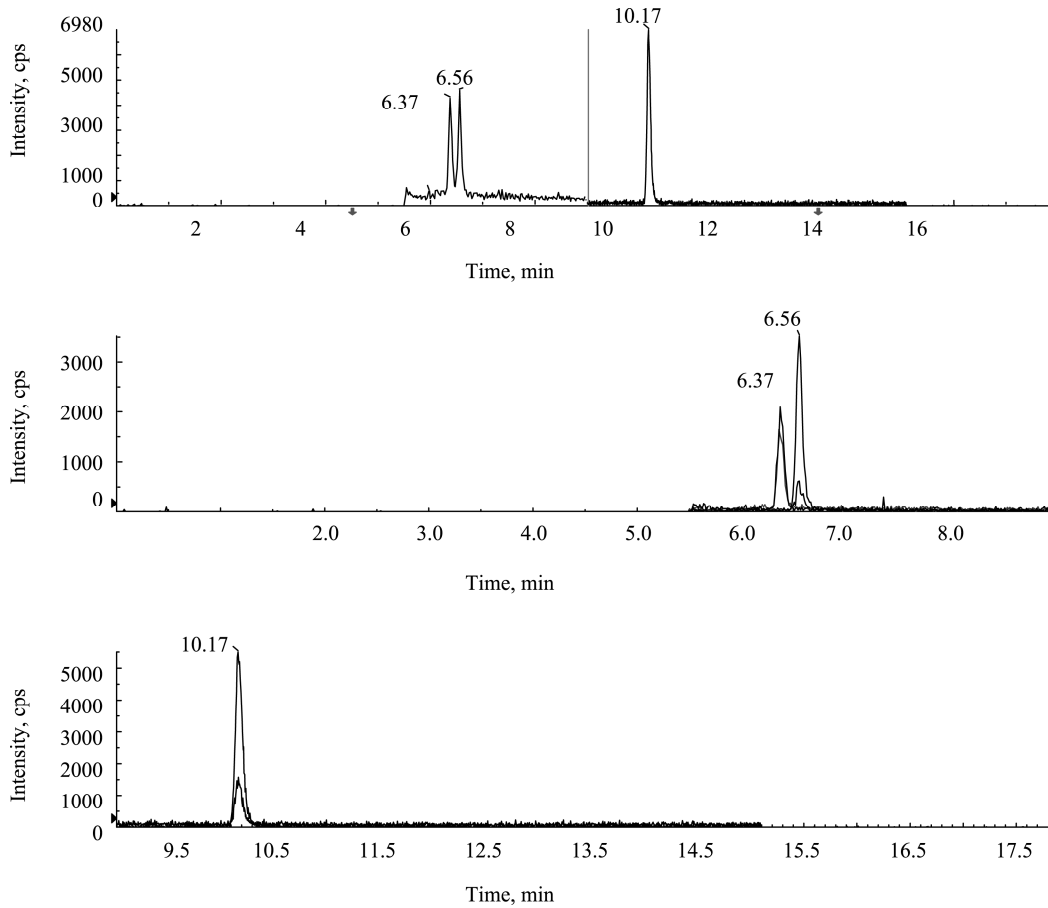


图 1 3 种农药的混合标准品(0.4 ng/mL)的总离子流色谱图(上), 吡虫啉、啶虫脒(中)和氟虫脍(下)的提取离子流图
 Fig. 1 Total ion current chromatograms (TIC) of a mixture of 3 pesticides standards solution (0.4 ng/mL)(top), extracted ion chromatogram (EIC) of imidacloprid, acetamiprid (middle) and fipronil (bottom)

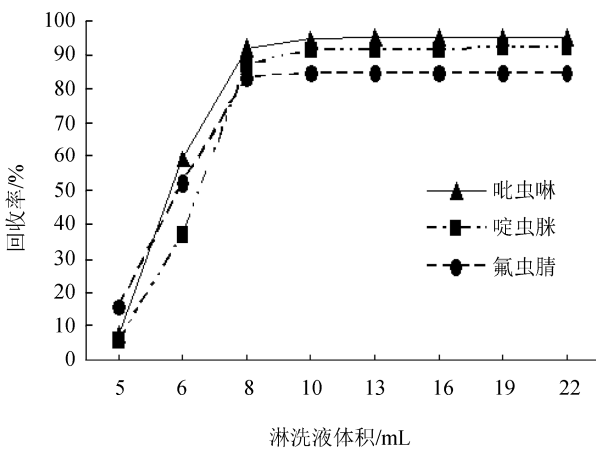


图 2 三种农药的淋洗曲线图
 Fig. 2 The elution curve of 3 pesticides

3.3 基质效应

液相色谱-质谱进行检测时, 由于基质效应的影

响, 导致目标化合物发生离子增强或抑制作用, 从而影响定量分析的准确性和重现性, 本研究分别以定容液和不同的空白茶叶样品基质配制标准溶液, 以 2 ng/mL 浓度作为比较, 考察了不同的茶叶样品的基质效应, 结果发现, 对不同的茶叶样品, 啶虫脒、吡虫啉、氟虫脍三种化合物的基质效应都不显著, 基质抑制率均在 15%以下, 说明采用此前处理方法和色谱分离条件, 能有效避免基质效应的影响。

3.4 方法的线性关系及定量限

采用 50%甲醇水混合溶液配制系列不同浓度的混合标准溶液进行测定, 以各组分的峰面积对质量浓度绘制标准曲线, 求的线性回归方程和线性相关系数, 见表 2。外标法定量。以 10 倍信噪比($S/N \geq 10$)对应的空白样品添加质量浓度作为方法的定量限(LOQ), 经样品添加实验确定茶叶样品中吡虫啉、啶虫脒和氟虫脍的检出限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限均为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

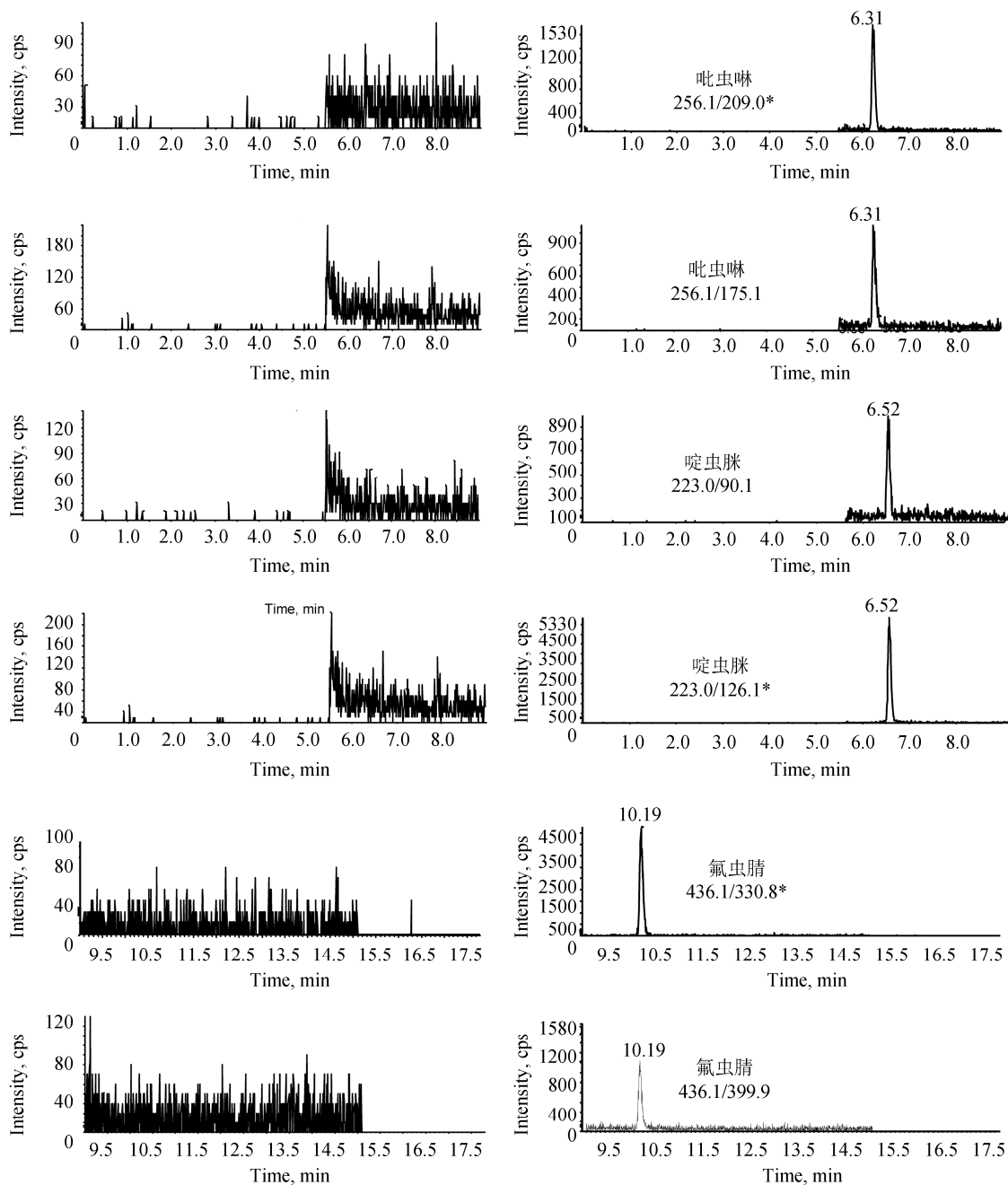


图 3 空白茶叶样品的 MRM 谱图(左)和空白茶叶样品添加 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 混合标准品的 MRM 谱图(右)

Fig. 3 Multiple reaction monitor (MRM) chromatograms of a blank green tea sample (left) and spiked with standards at 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for each compound (right)

3.5 回收率和精密度

在空白绿茶样品中添加 3 个不同浓度水平的混合标准溶液进行添加回收试验, 使样品中氟虫脒的含量为 2、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 吡虫啉和啶虫脒的含量为 2、5、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。每个添加水平平行测定 6 次, 计算回收

率和相对标准偏差, 如表 2 所示。结果表明 3 个添加水平下各农药的平均回收率为 71.8%~97.0%; 相对标准偏差为 0.4%~9.07%。空白茶叶样品及添加 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氟虫脒、吡虫啉和啶虫脒混合标准溶液的多反应监测色谱图分别见图 3(左)和图 3(右)。

表 2 三种农药的线性范围、相关系数、添加回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 2 Linear range, correlation coefficients (r^2), recoveries and precisions (relative standard deviations, RSDs) of 3 pesticides ($n=6$)

化合物	线性范围/(ng/mL)	相关系数 r^2	添加水平(g/kg)	回收率范围(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
吡虫啉	0.4 ~ 100	0.998	2.0	65.0 ~ 88.0	78.8	10.5
			5.0	73.0 ~ 94.5	83.8	8.3
			50	89.0 ~ 94.0	91.5	2.6
			2.0	90.2 ~ 98.4	92.8	3.7
啶虫脒	0.4 ~ 100	0.995	5.0	74.5 ~ 87.5	81.3	6.6
			50	84.8 ~ 96.6	89.0	4.8
			2.0	82.5 ~ 97.5	90.0	5.6
			5.0	68.6 ~ 83.4	72.8	7.4
氟虫腈	0.4 ~ 100	0.997	10	79.8 ~ 87.6	82.0	3.6

3.6 实际样品的检测

应用本方法对市场上的绿茶、红茶、普洱茶、黑茶等 225 个样品进行测定, 结果 53 个样品检出有吡虫啉, 含量范围为 0.01 ~ 0.17 mg/kg, 78 个样品检出有啶虫脒, 含量范围为 0.01 ~ 0.16 mg/kg, 4 个样品检出有氟虫腈, 含量范围为 0.002 ~ 0.005 mg/kg。

4 结 论

本文建立了茶叶中吡虫啉、啶虫脒和氟虫腈的液相色谱-串联质谱分析方法。样品采用用水浸泡样品, 乙腈提取, 活性碳氨基复合固相萃取小柱净化, 通过正负离子切换模式扫描, 可同时实现三种化合物的定性定量分析。该方法操作简单, 快速, 灵敏度高, 准确性好, 能在短时间内检测大量样品, 实用价值高, 满足日常检测要求, 为出口欧盟茶叶中农药残留检测和监控提供技术保障。

参考文献

- 童小麟, 陈建民. 我国出口欧盟茶叶农药残留超标通报的分析与应对[J]. 检验检疫学报, 2015, 25(1): 16-18.
Tong XL, Chen JM. Analysis and countermeasures of the excessive pesticide residues notification of the tea from china export to the EU [J]. J Inspect Quarant, 2015, 25(1): 16-18.
- 马惠民, 王永强, 钱和. 国内外茶叶农药残留限量标准的比较分析[J]. 中国茶叶加工, 2012, (4): 18-22, 11.
Ma HM, Wang YQ, Qian H. International comparative analysis of standards for tea pesticide residue limits[J]. Chin Tea Process, 2012, (4): 18-22, 11.
- 欧盟食品和饲料快速报警系统 (RASFF)[EB/OL]. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1,http://db.foodmate.net/rasff/>.
The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) [EB/OL]. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1,http://db.foodmate.net/rasff/>.
- 张莹, 黄志强, 李拥军. 气相色谱法测定茶叶中多种有机磷农药残留量[J]. 色谱, 2001, 19(03): 273-275.
Zhang Y, Huang ZQ, Li YJ. Determination of organophosphorus pesticide multi-residues in tea by gas chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2001, 19(03): 273-275
- 楼正云, 陈宗懋, 罗逢健, 等. 固相萃取-气相色谱法测定茶叶中残留的 92 种农药[J]. 色谱, 2008, 26(5): 568-576.
Lou ZY, Chen ZM, Luo FJ, et al. Determination of 92 pesticide residues in tea by gas chromatography with solid-phase extraction [J]. Chin J Chromatogr, 2008, 26(5): 568-576.
- 陈红平, 刘新, 汪庆华, 等. 气相色谱-串联质谱法测定茶叶中 88 种农药残留量[J]. 色谱, 2011, 29(5): 409-416.
Chen HP, Liu X, Wang QH, et al. Determination of 88 pesticide residues in tea using gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(5): 409-416.
- 颜鸿飞, 李拥军, 王美玲, 等. 微波辅助萃取-分散固相萃取-气相色谱质谱法测定茶叶中 23 种农药残留[J]. 分析测试技术与仪器, 2013, 19(04): 206-213.
Yan HF, Li YJ, Wang ML, et al. Residual analysis of 23 pesticides in tea by microwave assisted extraction/dispersive

- solid phase extraction purification and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Test Technol Instrum*, 2013, 19(4): 206–213.
- [8] 王学贵, 张琴, 徐汉虹, 等. 高效液相色谱测定茶叶中多菌灵的残留[J]. *农药*, 2009, 48(1): 55–57.
Wang XG, Zhang Q, Xu HH, *et al.* Residue determination of carbendazim in Tea with HPLC [J]. *Agrochem*, 2009, 48(1): 55–57.
- [9] 廖国会, 金星, 陈文龙. 高效液相色谱法同时检测茶叶中吡虫啉和啮虫脒残留的方法[J]. *贵州农业科学*, 2011, 39(4): 130–132.
Liao GH, JIN X, Chen WL. Application of high performance liquid chromatography in detection of imidacloprid and acetamiprid residue in tea [J]. *Guizhou Agric Sci*, 2011, 39(4): 130–132.
- [10] 张帆, 黄志强, 张莹, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 20 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. *色谱*, 2010, 28(4): 348–355.
Zhang F, Huang ZQ, Zhang Y, *et al.* Determination of 20 carbamate pesticide residues in food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2010, 28(4): 348–355.
- [11] 贾玮, 黄峻榕, 凌云, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定茶叶中 290 种农药残留组分[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(1): 9–22.
Jia W, Huang JR, Ling Y, *et al.* Determination of 290 pesticide residues in tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2013, 32(1): 9–22.
- [12] 胡贝贞, 蔡海江, 宋伟华. 茶叶中氟虫腈等 8 种农药残留的液相色谱-串联质谱法测定及不确定度评定[J]. *色谱*, 2012, 30(9): 889–895.
Hu BZ, Cai HJ, Song WH. Determination of eight pesticide residues in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its uncertainty evaluation [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(9): 889–895.
- [13] 陆小磊, 蒋美蓉, 叶美君, 等. 固相萃取净化-气相色谱质谱法测定茶叶中 22 种禁用农药残留量[J]. *中国茶叶加工*, 2015, (1): 11–17.
Lu XL, Jiang MR, Ye MJ, *et al.* Determination of 22 banned pesticides residues in tea by solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry [J]. *Chin Tea Process*, 2015, (1): 11–17.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



成 婧, 工程师, 研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: chengjing4323@163.com



王利兵, 研究员, 研究方向为食品安全与检验检疫安全。

E-mail: wanglb0419@126.com