高效液相色谱法检测多种食品基体中残留的喹氧灵

杨 方[1,2]， 卢声宇[1]， 陈祥明[1]， 李 捷[1]， 刘正才[1]，
林永辉[1]， 蓝锦昌[1]， 陈国南[2]
（1. 福建出入境检验检疫局，福建 福州 350001；2. 福州大学化学系 食品安全分析与检测技术教育部重点实验室，福建 福州 350002）

摘要：建立了采用液相色谱检测大豆、花椰菜、樱桃、木耳、葡萄酒、茶叶、蜂蜜、猪肝、鸡肉、鳗鱼等多种食品基体中喹氧灵残留的方法。利用乙酸乙酯提取样品中残留的喹氧灵，用氨基固相萃取小柱净化；对于脂肪含量较高的样品，在进行固相萃取前采用凝胶渗透色谱净化技术去脂。方法的准确度与精密度较好，在添加浓度为 0.010 ~ 5.0 mg/kg 时，平均回收率及相对标准偏差分别为 82% ~ 96% 及 3.2% ~ 11.8%；在 0.050 ~ 50.0 mg/L 范围内有良好的线性关系，检测限达 0.010 mg/kg。该方法适用性广，能消除复杂基质带来的干扰，可用于各类食品中喹氧灵残留的分析。

关键词：高效液相色谱法；固相萃取；凝胶渗透色谱法；喹氧灵；食品；残留
中图分类号：O658 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-8713(2008)04-0499-05 **栏目类别**：研究论文

Determination of quinoxyfen residue in foodstuffs of plant and animal origins by high performance liquid chromatography

YANG Fang[1,2], LU Shengyu[1], CHEN Xiangming[1], LI Jie[1], LIU Zhengcai[1],
LIN Yonghui[1], LAN Jinchang[1], CHEN Guonan[2]
(*1. Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China; 2. Department of Chemistry, Fuzhou University, Key Laboratory of Analysis and Detection Technology for Food Safety of Ministry of Education, Fuzhou 350002, China*)

Abstract: A high performance liquid chromatographic (HPLC) method has been developed for the determination of quinoxyfen residue in various food matrixes including soybean, cauliflower, cherry, mushroom, wine, tea, honey, pork liver, chicken and eel. The analyte was extracted by ethyl acetate, and then purified with aminopropyl solid phase extraction (NH_2 SPE) cartridge. Post-extraction gel permeation chromatography (GPC) was used for animal (except honey) and fishery products prior to NH_2 SPE cleanup. The average recoveries and relative standard deviations (RSDs) for the analysis of all samples fortified in the range of 0.010 – 5.0 mg/kg were in the ranges of 82% – 96% and 3.2% – 11.8%, respectively. Good linearity was obtained in the concentration range from 0.050 to 50.0 mg/L. The limit of detection was 0.010 mg/kg. The proposed method was successfully applied to the analysis of quinoxyfen residue in various food samples.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); solid phase extraction (SPE); gel permeation chromatography (GPC); quinoxyfen; foodstuffs; residue

喹氧灵(quinoxyfen)，亦称快诺芬，其结构式见图 1，是美国陶氏益农公司近年来新推出的一种喹啉类杀真菌剂。这种能起保护作用的杀真菌剂，包括有悬浮液与乳液的单成分制剂与混配剂，被广泛应用于樱桃、葡萄、莴苣等蔬菜水果作物。2003 年 9 月，美国环境保护署(EPA)农药计划办公室(OPP)

收稿日期：2007-10-12
通讯联系人：杨 方，理学硕士，副主任技师. Tel：(0591)87065542，E-mail：yffjciq@gmail.com.
基金项目：福建省科技攻关重点项目(2006Y0002).

批准的 14 个新的常规农药有效成分中就包括喹氧灵;欧盟委员会于 2004 年 9 月 1 日批准了该药,并将其有效成分列入了欧盟农药登记法令(91/414)附录 1 中[1]。该法令要求各成员国在审查批准含喹氧灵的产品时,应特别注意保护水生生物,在易受影响的地区采取风险降低措施和监控计划。这是由于喹氧灵虽然急性毒性较低,对人畜相对安全,但亚慢性与慢性毒理学实验发现,一定剂量的喹氧灵可以使得兔子与大鼠的肝增大、肝细胞增生[2],因此喹氧灵在包括动植物源性产品中的残留已引起人们的重视。

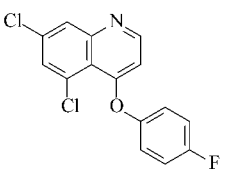

图 1 喹氧灵的化学结构式

Fig. 1 Molecular structure of quinoxyfen

世界各国对喹氧灵的使用范围与使用方式均已有明确限制,并严格规定了其在各种食品中的最高残留限量(MRLs)。如在美国,喹氧灵在牛肉、羊肉、马肉等食品中的 MRLs 为 0.03 mg/kg,牛奶中为 0.10 mg/kg,蔬菜和水果等食品中为 0.50 mg/kg。日本则规定植物源性食品除了葡萄中的 MRLs 为 1 mg/kg、啤酒花中为 3 mg/kg 外,其余均为 0.3 mg/kg;而对于动物源性食品,除了脂肪中的 MRLs 为 0.1 mg/kg 外,其余均为 0.01 mg/kg。

目前国内尚未见有公开发表的仅针对喹氧灵的检测方法的报道。国外有关喹氧灵的检测方法主要为多残留分析方法,包括气相色谱法[3]、气相色谱-质谱法[4]、液相色谱-质谱/质谱法[5]等。这些方法虽然可同时对多种残留物进行检测,但均存在适用的样品基体单一、对实验条件要求高、方法建立需要时间长以及针对某一特定分析物的灵敏度及精密度不尽如人意等问题。因此,建立一种高效准确、简单易行的可用于测定各类食品中喹氧灵农药残留量的检测方法是很有必要的。本文建立了多种食品基体中喹氧灵残留的液相色谱检测方法,方法的灵敏度、精密度令人满意,能很好地满足食品中喹氧灵残留的检测需求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪,配备二极管阵列检测器;美国 J2 Scientific 公司 AccuPrep MPS™凝胶渗透色谱仪,配备紫外检测器。

乙酸乙酯、正己烷、乙腈均为色谱纯;碳酸氢钠、无水硫酸钠为分析纯。水为去离子水。氨基固相萃取小柱(NH_2 SPE,500 mg,3 mL)购自美国 Supelco 公司。

喹氧灵标准物质(CAS No. 124495-18-7)购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度高于 98%。以甲醇为溶剂配制 100 mg/L 的喹氧灵标准储备液,实际使用时可根据需要以 50%(体积分数)乙腈水溶液稀释成适当浓度的标准工作液。

1.2 样品提取

对于茶叶、谷物、坚果、肉类、果汁、蜂蜜、葡萄酒等含水量较低及饮料类样品,可称取 5 ~ 10 g 均匀试样,加入 10 mL 饱和碳酸氢钠溶液振摇浸泡使基体充分浸润后以 2 × 20 mL 乙酸乙酯超声提取;对于蔬菜、水果等样品,可称取 10 g 均匀试样以 2 × 30 mL 乙酸乙酯超声提取。在 4 500 r/min 下离心 3 min,合并有机相,以无水硫酸钠干燥后于 50 ℃旋转蒸发至近干,加入 5 mL 正己烷,涡旋溶解残渣。

1.3 样品净化

对于除肉及肉制品以外的其他食品,可直接以 NH_2 SPE 柱净化。以 3 mL 正己烷预淋洗小柱后,将样品溶液上柱,用 5 mL 正己烷淋洗,弃去全部淋洗液,再以 5 mL 5%(体积分数)丙酮-正己烷洗脱,保持流速约为 1 mL/min。收集洗脱液,于 50 ℃下水浴氮吹至近干,以 50% 乙腈水溶液定容至 1 mL,过 0.45 μm 滤膜后备用。

对于油脂含量高的食品,在固相萃取小柱净化前先用凝胶渗透色谱(GPC)去脂。将样品提取液离心后取上清液 5 mL 通过样品环注入 GPC 净化柱。色谱条件:GPC 净化柱(填料 Bio-Beads S-X3,200 mm × 25 mm);流动相为环己烷-乙酸乙酯(体积比为 1∶1),流速 4.2 mL/min。收集 9.5 ~ 21.5 min 的流出液于 50 ℃下旋转蒸发至近干,加入 5 mL 正己烷后用固相萃取小柱净化。

1.4 液相色谱参数

色谱柱:Waters Symmetry C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(体积比为 75∶25),流速 1.0 mL/min;检测波长:235 nm;进样量:40 μL。

2 结果与讨论

2.1 喹氧灵溶液的稳定性

研究表明[6],在 pH 4、温度为 50 ℃时,质量浓度为 0.5 μg/mL 与 0.06 μg/mL 的喹氧灵溶液的半衰期为 7 d,且与配制溶剂无关;而在 pH 7 或 pH 9、温度为 50 ℃时喹氧灵溶液稳定(所试验的溶剂

包括丙酮、四氢呋喃、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液等)。本实验也表明,以 50% 乙腈水溶液配制的质量浓度为 0.1 μg/mL 的喹氧灵标准溶液在室温中至少可存放一个月。由于喹氧灵不会产生光解反应,因此在实验过程中无需避光操作。

2.2　提取溶剂的选择

喹氧灵几乎不溶于水,易溶于有机溶剂,其纯品在二氯甲烷中的溶解度达 589 g/L。考虑到二氯甲烷作为提取溶剂时对环境及人体的危害较大,本实验比较了实验室常用的乙腈、丙酮-正己烷(体积比为 2∶1)、乙酸乙酯、正己烷等 4 种溶剂体系的提取效果。实验结果表明,乙腈可用于植物性样品如大豆、茶叶、花椰菜、樱桃等样品的提取,但对于含脂高的样品如肉、鱼等提取效率差,且由于乙腈与水互溶,在用于果汁、葡萄酒等饮料提取时,难以与水相分离浓缩,给随后的净化步骤造成很大困难;对于所有食品基体来说,正己烷无法将分析物提取出来;丙酮-正己烷与乙酸乙酯是较理想的提取溶剂。有研究表明[7],乙酸乙酯不但适用于不同基体里多种农药残留的提取,而且具有回收率较高、成本低廉等优点,因此,本实验选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

在采用乙酸乙酯进行提取时,由于茶叶、大豆、木耳等样品含水较少,样品难以在溶剂中充分展开,可能造成提取效率偏低,因而通常的做法是加水浸润后再以有机溶剂提取。有文献报道,对于在酸性条件下可降解的农药,加入一些弱碱有助于提高回收率[8-10]。本实验选择加入饱和碳酸氢钠溶液代替水溶液以充分浸润样品,因水相含有大量盐,有助于减少乙酸乙酯相与水相的互溶。另外,对于蜂蜜、果酒类样品,一般也需要加水溶解样品后再进行提取。本实验还比较了采用加入饱和碳酸氢钠溶液与水溶液浸润样品后再以乙酸乙酯提取的效果。实验表明,加入饱和碳酸氢钠溶液后,有机相与水相间分层更清晰,且可避免乳化现象的产生,使得操作相对容易,所得到的回收率也更为稳定,这可能是因为饱和碳酸氢钠溶液有一定的盐析作用的缘故。另外,对于如鸡肉、猪肝等动物源性食品,加入饱和碳酸氢钠溶液后,动物组织分散更均匀,与有机溶剂的接触更充分,其回收率也较直接以乙酸乙酯提取更好,尤其是对于脂肪含量较高的鳗鱼来说效果更为明显。然而,对于如蔬菜、水果等含水量较大的样品,加与不加饱和碳酸氢钠溶液无区别。

2.3　净化条件的选择

本实验涉及的基体较多,净化步骤至关重要。在众多的净化技术中,固相萃取技术是目前应用最多的净化手段。由于采用乙酸乙酯为提取溶剂,因此在待测物被提取的同时,样品中大量的脂溶性物质也会被提取出来。为了避免旋转蒸发后因再溶解残余物而造成损失,本实验选用兼有弱阴离子交换作用的 NH_2 SPE 柱净化。根据溶剂极性的不同,在正相小柱上的洗脱强度不同的原理,本实验比较了不同体积比组成的正己烷-丙酮(体积比分别为 10∶0,9.5∶0.5,9.0∶1.0,8.5∶1.5,8.0∶2.0,7.0∶3.0,6.0∶4.0 和 5.0∶5.0)溶剂的洗脱效果。结果表明,单纯采用正己烷不能将待测物洗脱,只能除去脂溶性的一些杂质,而随着丙酮含量的增高,虽然洗脱剂用量减少,但液相色谱分析中的干扰现象也越严重;相比之下,体积比为 9.5∶0.5 的正己烷-丙酮混合溶剂作洗脱剂时,杂质干扰少,回收率良好。

本实验表明,对于包括茶叶在内的大多数样品而言,仅采用 NH_2 SPE 柱一种净化方式即可取得较好的效果,但对于脂肪含量高的样品如鳗鱼等却因提取出的油脂过多,效果很差。为了最大限度地除去蛋白质和油脂大分子,同时待测物又能有比较理想的回收率和精密度,本实验以鳗鱼、鸡肉和猪肝作为研究对象,探讨了使用 GPC 方法进行预净化的可能性。分别收集样品提取液与标准溶液通过 5 mL 样品环注入 GPC 净化柱,将紫外检测器波长设为 254 nm,其流出物谱图见图 2。

由图 2 可见,三种空白基体的样品溶液约在 5 min 开始出峰,猪肝与鸡肉的主要杂质峰在 10 min 前已经基本流出,而鳗鱼则需至 15 min 左右,喹氧灵标准溶液最大出峰时间在 11 ~ 14 min。因此,采用 GPC 净化可以较好地除去猪肝与鸡肉中的脂溶性杂质,而对于鳗鱼来说仅能除去约 70% 左右的脂溶性杂质,需再结合 SPE 柱净化,才能达到较好的效果。

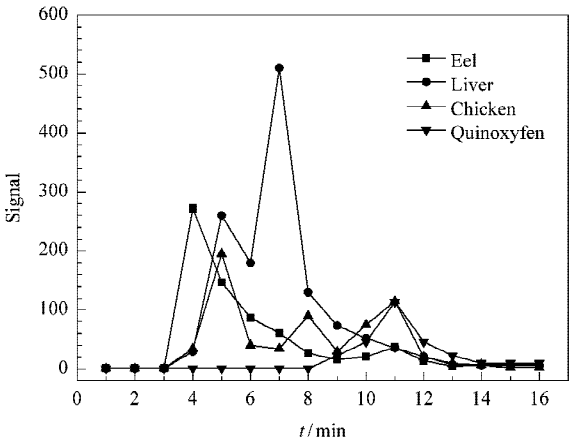

图 2　空白样品基体与喹氧灵标准溶液在凝胶色谱柱上的流出曲线图(检测波长:254 nm)

Fig. 2　GPC elution profiles of the extracts of blank samples and quinoxyfen standard solution (detection wavelength:254 nm)

2.4 光谱图与色谱图

喹氧灵在 235 nm 附近呈现较强的紫外吸收，因此可采用配备紫外检测器的液相色谱仪进行测定。在选定的仪器条件下，喹氧灵的出峰时间约为 8.0 min。喹氧灵标准溶液的紫外吸收光谱图与色谱图见图 3。

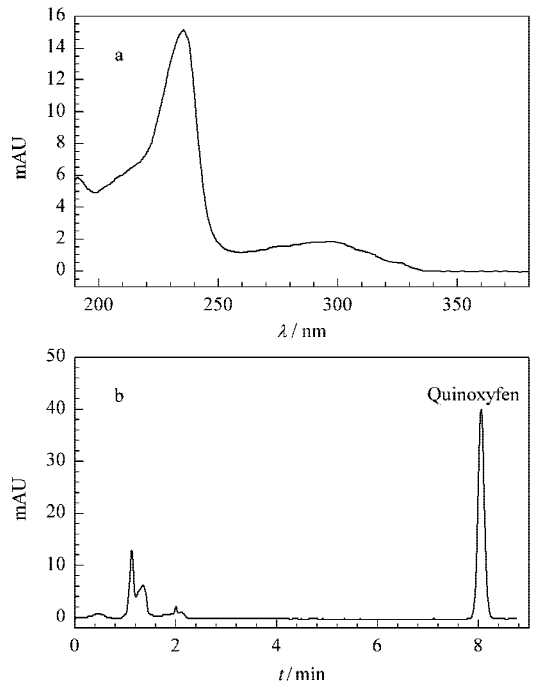

图 3 喹氧灵标准溶液(0.50 mg/L)的(a)光谱图与(b)色谱图

Fig. 3 (a) UV Spectrum and (b) HPLC chromatogram of quinoxyfen standard solution (0.50 mg/L)

2.5 线性范围、线性关系及检出限

在本方法所确定的实验条件下，以标准溶液的峰面积(y)和质量浓度(x，mg/L)作图，获得的线性方程为 $y = 307.16x + 92.292$，相关系数(r)为 0.999 6。以实际检测时的信噪比(S/N)为 3 作为检出限时，本方法的检出限为 0.010 mg/kg，且在 0.050 ~ 50.0 mg/L 范围内呈良好的线性关系，添加检出限水平标准溶液的典型样品的色谱图见图 4。

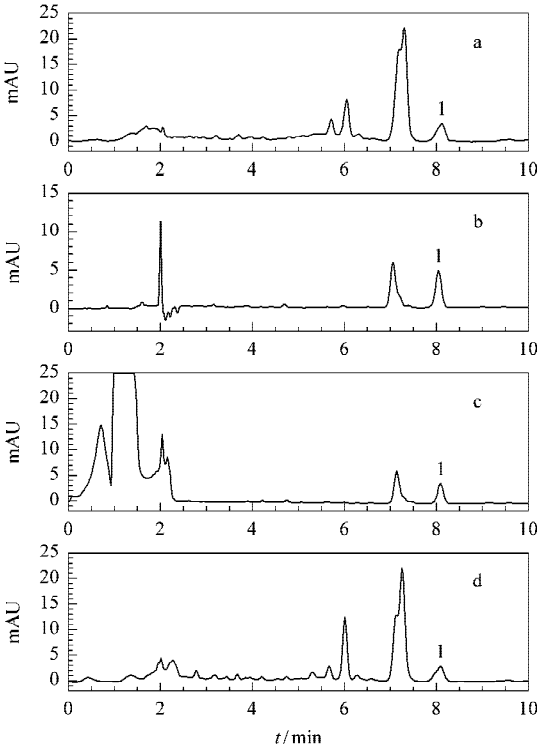

图 4 (a)大豆加标样品、(b)葡萄酒加标样品、(c)鳗鱼加标样品和(d)蜂蜜加标样品的色谱图(添加水平：0.010 mg/kg)

Fig. 4 Chromatograms of (a) a spiked soybean sample, (b) a spiked wine sample, (c) a spiked eel sample, and (d) a spiked honey sample (spiked level：0.010 mg/kg)

1. quinoxyfen.

2.6 方法的回收率和精密度

以不含喹氧灵残留的大豆、花椰菜、樱桃、木耳、葡萄酒、茶叶、蜂蜜、猪肝、鸡肉、鳗鱼样品作为基质，进行 0.010，0.10，5.0 mg/kg 三个浓度水平的添加回收实验，每个样品基体和添加水平重复测定 10 次，回收率与精密度见表 1。由表 1 可见，三种添加水平下的平均回收率为 82% ~ 96%，相对标准偏差(RSD)为 3.2% ~ 11.8%。说明本方法可满足喹氧灵残留的检测要求。

表 1 液相色谱检测多种食品基体中喹氧灵残留的平均回收率与相对标准偏差(n = 10)

Table 1 Recoveries and the relative standard deviations (RSDs) of quinoxyfen at different spiked levels (n = 10) %

Sample	Spiked levels/(mg/kg)					
	0.010		0.10		5.0	
	recovery	RSD	recovery	RSD	recovery	RSD
Soybean (大豆)	92.65	9.65	89.69	8.37	87.57	6.31
Cauliflower (花椰菜)	92.90	10.32	92.31	5.14	91.21	3.76
Cherry (樱桃)	92.76	7.75	87.24	4.52	90.61	5.88
Mushroom (木耳)	96.14	6.49	91.42	5.73	93.38	7.02
Wine (葡萄酒)	91.89	8.82	93.01	7.14	92.28	5.12
Tea (茶叶)	93.30	11.79	86.91	9.11	87.87	9.87
Honey (蜂蜜)	92.42	7.22	90.36	3.24	91.46	4.03
Pork liver (猪肝)	90.68	11.60	87.23	7.12	86.61	7.67
Chicken (鸡肉)	89.15	9.76	86.27	6.87	87.87	7.98
Eel (鳗鱼)	90.76	11.61	86.41	7.96	82.34	10.14

3　结论

建立了一种以液相色谱技术检测多种食品基体中喹氧灵残留的方法。以乙酸乙酯提取样品中喹氧灵残留,需要时加入饱和碳酸氢钠溶液以增加样品在有机溶剂中的提取效率,防止被测物损失。对于肉及肉制品、鱼类等含脂肪高的样品则先采用 GPC 净化除去脂质后再以 NH_2 SPE 柱净化,其他样品则可直接采用 NH_2 SPE 小柱净化。建立的方法简单、容易形成标准化操作,方法的准确度与精密度较好,适用性广,能消除复杂基质带来的干扰,可用于各类食品中喹氧灵残留的分析。

参考文献:

[1] Hu X X. New Pesticides (胡笑形. 新农药), 2004(4):27

[2] U. S. Environmental Protection Agency. Federal register: Quinoxyfen; Notice of filing a pesticide petition to establish a tolerance for a certain pesticide chemical in or on food. [2003-05-30]. http://www.epa.gov/EPA-PEST/2003/May/Day-30/p13562.htm

[3] Hirahara Y, Kimura M, Inoue T, et al. J Health Science, 2005, 51(5):617

[4] Mol H G J, Rooseboom A, van Dam R, et al. Anal Bioanal Chem, 2007, 389:1 715

[5] Pihlstrom T, Blomkvist G, Friman P, et al. Anal Bioanal Chem, 2007, 389:1 773

[6] Department of Food Safety, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Analytical methods for residual compositional substances of agricultural chemicals, feed additives, and veterinary drugs in food. [2006-05-26]. http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/060526-1a.pdf

[7] Andersson A, Palsheden H. Fresenius J Anal Chem, 1991, 339:365

[8] Taylor M J, Hunter K, Hunter K B, et al. J Chromatogr A, 2002, 982:225

[9] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. J AOAC Int, 2003, 86:412

[10] Gamon M, Lleo C, Ten A, et al. J AOAC Int, 2001, 84:1 209

会议报道

第二届中国中西部地区色谱学术交流会在湖北宜昌举行

第二届中国中西部地区色谱学术交流会于 2008 年 7 月 18 日 – 22 日在世界水电名都湖北宜昌顺利召开。来自湖北、湖南、陕西、甘肃、青海、宁夏、河南、广东、广西、四川、重庆、云南、贵州等中西部省市的许多著名大学、科研院所、大型企业的代表共 120 余人参加了会议。中国色谱学会常务副理事长武杰教授应邀出席并讲话,副理事长兼秘书长许国旺研究员为大会做了题为"二维液相色谱技术研究进展"的主题学术报告。会议还特邀了 11 位中西部地区知名色谱专家做大会报告。

会议共收到研究论文 131 篇。这些论文充分展示了近年来中西部地区色谱研究的丰硕成果。会议期间,代表们就色谱学科各前沿领域及其应用做了广泛、充分的研讨和交流。为了表彰优秀中青年色谱工作者,会议评选出 9 篇优秀论文,并为获奖者颁发了证书和奖品。

本次会议由中国中西部地区色谱联谊会主办,湖北省化学化工学会色谱专业委员会承办。会议期间,经中西部地区各省市色谱专业委员会主任和秘书长联席会议讨论决定,第三届中国中西部地区色谱学术交流会由陕西省色谱专业委员会筹办,将于 2010 年在陕西临潼举行。

湖北省色谱专业委员会

2008 年 7 月 25 日