

固相萃取-高效液相色谱联用分析 蔬菜中5种有机磷

张卓^{1,2}, 陈金泉^{1,2}, 张兰^{1,3}

(1. 福州大学 食品安全分析与检测教育部重点实验室, 福建 福州 350002;

2. 福州大学 化学化工学院, 福建 福州 350002; 3. 福州大学 运动科学研究中心, 福建 福州 350002)

摘要: 建立了固相萃取(SPE)-高效液相色谱(HPLC)联用测定蔬菜中甲基对硫磷、三唑磷、乙基对硫磷、倍硫磷和辛硫磷的分析方法。采用自制 Florisil SPE柱, 优化了萃取溶剂、SPE柱填料类型、SPE柱填料用量和SPE淋洗溶剂等前处理条件以及HPLC仪器条件。方法线性范围为0.02~2.00 μg/L; 检出限介于0.10~0.17 μg/g。分析加标实际样品, 回收率为76.5%~109.0%, RSD为2.1%~8.0%。方法完全符合蔬菜中痕量有机磷农药残留的快速分析要求。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱; 有机磷农残; 蔬菜

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2008)02-0087-05

有机磷农药(OPPs)有较强的杀虫效果, 广泛用于粮食、蔬菜和水果等农作物的生产过程。我国近年来发生的农药中毒事故大多数集中于高毒有机磷农药, 在生长期短的蔬菜类食品中, 有机磷农药残留超标现象尤为突出。因此, 建立可靠、高灵敏的蔬菜中有机磷农残检测方法成为目前食品安全的研究热点^[1]。

有机磷农残的分析多采用气相色谱法^[2,3], 但热不稳定、强极性或易于吸附在气相色谱柱上的有机磷农药不适合采用气相色谱法分析。高效液相色谱(HPLC)适用于几乎所有有机磷农残的分析, 其适用范围较气相色谱法宽广, 重复性好、灵敏度高、分析过程易于实现^[4]。欧洲某些国家已采用HPLC为有机磷农残的常规分析方法^[4]。目前, 蔬菜样品中有机磷农残分析的传统预处理方法主要为液液萃取法和机械振荡萃取法^[5], 这些方法操作步骤烦琐, 萃取过程使用大量高毒的有机溶剂, 对周围环境和实验人员身体健康造成危害。超临界流体萃取^[6]、固相微萃取^[7]和微波萃取^[8]等新兴预处理方法也被逐渐用于有机磷农残分析, 此类方法萃取效率高、环境友好, 但是分析成本高, 应用受到限制。固相萃取技术(SPE)是一个基于液固两相物理萃取的过程, 仅使

用少量有机溶剂、操作简便、费用低、易于实现自动化及与其他分析仪器的联用^[9], 已被应用于多种蔬菜样品的农残分析。

目前, SPE-HPLC联用分析蔬菜中有机磷农残的研究报道国内尚不多见, 大部分研究仍基于气相色谱方法。刘晓颖等^[10]采用SPE-HPLC联用测定了蔬菜中甲1605和久效磷2种有机磷农药的残留量。陶宏亮等^[11]建立了SPE-HPLC联用测定蔬菜中甲基对硫磷和对硫磷残留量的分析方法。甲基对硫磷、三唑磷、乙基对硫磷、倍硫磷和辛硫磷是我国广泛使用的有机磷农药, 其残留污染面广、毒性高。本文首次建立了SPE-HPLC联用分析蔬菜中甲基对硫磷、三唑磷、乙基对硫磷、倍硫磷和辛硫磷的分析方法。采用自制SPE柱, 优化了各种前处理和HPLC仪器条件, 并分析了实际样品。该法省时、环境友好、操作简便、准确可靠, 适合于蔬菜中痕量有机磷农残的快速测定。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司), 配

收稿日期: 2008-03-19; 修订日期: 2008-04-16。

基金项目: 福建省科技厅国际合作重点项目(编号 2007I0020); 福州大学人才基金资助项目(编号 0041826260, 0041826486)。

作者简介: 张卓 (1980-), 男, 博士, 讲师, 从事色谱分析。

SPD-10AVP/10APVP 紫外-可见检测器、LC-10A 高压溶液输送泵和 N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所);C18 SPE Tubes (1 000 mg/6 mL, Agilent, USA) 和 Florisil SPE Tubes (1 000 mg/6 mL, 自制);BF2000 氮吹仪(北京八方世纪科技有限公司);FS-1 电动匀浆机(金坛市富华仪器有限公司)。

甲基对硫磷标准品(99.0%, 国家农药质检中心);乙基对硫磷标准品(99.0%, 天津农药质检中心);三唑磷标准品(98.0%, 天津农药质检中心);倍硫磷(99.0%, Sigma 公司);辛硫磷(99.2%, Sigma 公司)。甲醇(色谱纯, 江苏汉邦有限公司);乙腈(色谱纯, 天津市博迪化工有限公司);实验用水为重蒸馏水。Florisil 填料, 650 灼烧 4 h 贮于密封瓶内备用, 使用前 120 灼烧 2 h, 趁热加入 5% 水灭活后使用。

自制 Florisil SPE 柱采用干法装柱。首先, 挑选不同规格的注射针筒, 在针筒底部装填聚四氟乙烯固相萃取小柱垫片, 加入已处理过的 Florisil 填料, 轻轻敲打使填料装填均匀。再用聚四氟乙烯固相萃取小柱垫片, 并用机器压实, 制成自制 Florisil SPE 柱。

1.2 HPLC 操作条件

Hypersil-ODS₂ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, Shim-Pack);流动相: V(甲醇) : V(水) = 70 : 30;流速为 1.0 mL/min;检测波长 254 nm;进样量 20 μL。

1.3 样品处理

将 1 000 g 蔬菜样品切碎, 准确称取 25.0 g 样品置于 100 mL 烧杯, 加入 50 mL 乙腈后转移至高速匀浆机中, 高速匀浆 1 min, 过滤至 100 mL 具塞刻度量筒中(量筒内已放置 5 ~ 7 g NaCl)。盖上塞子, 剧烈振荡 1 min, 静置, 准确吸取 10.0 mL 上层清液至 10 mL 具塞刻度试管。50 氮吹蒸发至近干。用 1.0 mL 甲醇溶解残渣, 过 SPE 柱(先以 5.0 mL 正己烷活化 SPE 柱), 再以 5 mL 乙腈洗涤刻度试管, 洗液过 SPE 柱, 重复 2 次, 收集洗脱液。再将流出组分于氮吹仪上 50 吹至近干, 用甲醇溶解残渣并定容至 1.0 mL, 过滤、定容溶液, 待测。

1.4 定性和定量

根据色谱保留时间定性, 以峰面积定量。图 1 给出了最优条件下加标蔬菜样品中 5 种有机磷农残的 HPLC 分离色谱图。

2 结果与讨论

2.1 SPE 条件的优化

2.1.1 萃取溶剂的选择

用于蔬菜中有机磷农残的萃取溶剂主要有乙腈、丙酮和二氯甲烷。二氯甲烷的极性较大、溶解能力强, 但是易带来基体杂质, 对 SPE 柱产生污染, 降低 SPE 柱的使用性能。丙酮与水混溶, 不易分离。本文对比乙腈和乙酸乙酯对蔬菜中有机磷农残的萃取率(表 1), 结果表明乙腈的萃取率高于乙酸乙酯, 因此选用乙腈作为萃取溶剂。

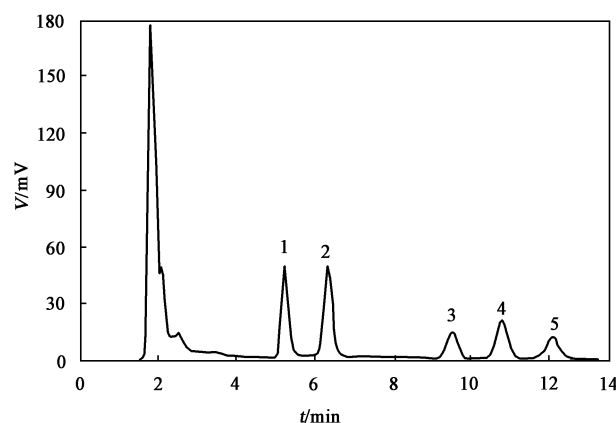


图 1 5 种有机磷农残的分离色谱图

Fig. 1 Chromatogram of five OPPs by HPLC

1. 甲基对硫磷; 2. 三唑磷; 3. 乙基对硫磷; 4. 倍硫磷; 5. 辛硫磷。

表 1 萃取溶剂对有机磷农残萃取率的影响

Table 1 Effect of extraction solvents on the extraction efficiency of OPPs

萃取溶剂	萃取率/ %				RSD/ % (n = 3)
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	平均值	
乙酸乙酯	15.1	14.4	15.3	14.9	3.2
乙腈	76.8	79.6	77.7	78.0	1.8

2.1.2 SPE 柱的选择

甲基对硫磷、三唑磷、乙基对硫磷、倍硫磷和辛硫磷同时带有非极性和极性官能团, 理化性质不尽相同, 为使 5 种有机磷农残在 SPE 过程中均有较高的回收, 对比了自制 C18 和 Florisil 2 种 SPE 柱对有机磷农残的回收率。结果表明 C18 和 Florisil 2 种 SPE 柱对此 5 种有机磷农残的回收率相接近(表 2), 由于 Florisil 柱可由实验室自制, 成本低, 因此选取自制 Florisil 柱为优化的 SPE 柱。

2.1.3 SPE柱填料量和淋洗液的选择

SPE柱填料的质量是影响吸附容量的关键因素.填料越多,吸附容量越大.淋洗液是影响分析物SPE洗脱行为的重要因素.弱极性淋洗液,洗脱不完全,回收率低;强极性的淋洗液往往会带来其它杂

质,影响后续的色谱分离过程.对比研究了5种不同极性淋洗液以及500、1 000 mg两种规格Florisil SPE柱对有机磷农残SPE回收率的影响(表3),结果表明采用1 000 mg Florisil柱以及乙腈淋洗液可以获得较高的回收率.

表2 SPE柱对有机磷农残回收率的影响

Table 2 Effect of SPE columns on the recovery of OPPs

SPE柱	回收率/ %				RSD/ % (n = 3)
	第1次	第2次	第3次	平均值	
C18柱	87.5	86.7	85.2	86.5	1.4
自制 Florisil 柱	85.6	82.2	84.8	84.2	2.1

表3 SPE柱填料量和淋洗液对有机磷农残回收率的影响

Table 3 Effect of the amounts of SPE column stuffing and elution solvents on the recovery of OPPs

淋洗液	填料量 / mg	回收率/ %				RSD/ % (n = 3)
		第1次	第2次	第3次	平均值	
二氯甲烷	500	32.0	32.2	31.9	32.0	0.5
	1000	31.1	33.2	32.2	32.2	3.3
乙酸乙酯	500	29.4	28.7	28.5	28.9	1.6
	1000	31.7	32.6	32.7	32.4	1.7
乙酸乙酯 丙酮 (V/V = 80 20)	500	62.0	60.4	59.7	60.7	1.9
	1000	38.4	39.1	40.5	39.3	2.7
乙腈	500	70.1	68.8	70.3	69.7	1.2
	1000	77.3	74.6	75.4	75.8	1.8
乙腈:甲醇 (V/V = 80 20)	500	20.5	21.1	18.9	20.2	5.6
	1000	25.0	28.1	30.4	27.8	9.7

2.2 HPLC操作条件的选择

2.2.1 检测波长的选择

采用UV-760CRT紫外/可见分光光度计对5种有机磷农残标准储备液进行波长扫描,测得最大吸收波长分别为:甲基对硫磷 268 nm,三唑磷 240 nm,乙基对硫磷 268 nm,倍硫磷 243 nm,辛硫磷 278 nm.综合考虑5种有机磷的分析灵敏度,最终选择254 nm为优化的检测波长.

2.2.2 流动相的选择

为了得到最佳的检测结果,固定流动相流速1.0 mL/min、检测波长254 nm,考察流动相中不同比例的甲醇与水对5种有机磷农残分离的影响,结果见表4.结果表明,随着甲醇含量的增加,其分离度逐渐减小;当甲醇:水(V/V) = 70:30时,各组份得到很好的分离,分析耗时短,确定为本文优化的流动相组成.

2.3 方法的线性范围、检出限与精密度

在优化实验条件下,配制系列标准溶液,以峰面

表4 流动相比对有机磷农残分离度的影响

Table 4 Effect of the ratios of mobile phase on the separation of OPPs

甲醇	水(V/V)	R1 ^a	R2 ^b	R3 ^c	R4 ^d
74	26	0.89	2.50	1.16	0.88
73	27	0.91	2.20	1.08	1.01
72	28	1.10	2.68	1.08	1.05
71	29	1.17	3.08	1.22	1.09
70	30	2.67	5.91	2.19	2.34
65	35	4.02	6.81	2.39	3.55

a: R1 为甲基对硫磷与三唑磷两色谱峰的分离度;b: R2 为三唑磷与乙基对硫磷两色谱峰的分离度;c: R3 为乙基对硫磷与倍硫磷两色谱峰的分离度;d: R4 为倍硫磷与辛硫磷两色谱峰的分离度.

积(A)对各组分浓度(C)做线性回归方程,以3倍信噪比计算检出限.取0.52 μg/g 甲基对硫磷、0.65 μg/g 三唑磷、0.40 μg/g 乙基对硫磷、0.34 μg/g 倍硫磷、

0.58 $\mu\text{g/g}$ 辛硫磷的混标溶液,连续测定 8 次,获得 5 种有机磷农残的分析方法精密度(RSD).结果表明,方法线性范围为 0.02 ~ 2.0 $\mu\text{g/L}$,检出限介于 0.10 ~ 0.17 $\mu\text{g/g}$,RSD 介于 5.2 ~ 7.6 % (见表 5).

2.4 实际样品的分析

采用 SPE-HPLC 分析加标蔬菜样品,5 种有机磷农残回收率在 76.5 % ~ 109 % 之间,RSD 在 2.1 % ~ 8.0 % 之间(表 6).

表 5 方法的线性范围、相关系数、检出限和精密度

Table 5 Regression equation, correlation coefficient, detection limit and precision of the method

有机磷农残	线性回归方程 *	相关系数	检出限/ ($\mu\text{g/g}$)	RSD/ % (n = 8)
甲基对硫磷	A = 25743C - 23106	0.9980	0.10	5.2
三唑磷	A = 22074C - 327	0.9983	0.17	5.8
乙基对硫磷	A = 13491C - 12430	0.9979	0.10	5.9
倍硫磷	A = 23321C + 5830	0.9953	0.10	7.6
辛硫磷	A = 7563C - 4661	0.9978	0.12	5.5

* :A 为色谱峰面积;C 为分析物浓度.

表 6 加标蔬菜样品的分析结果

Table 6 Analytical results of spiked vegetable samples

有机磷农残	加入量 / ($\mu\text{g/g}$)	回收量/ ($\mu\text{g/g}$)			回收率/ %	RSD/ %
		第 1 次	第 2 次	第 3 次		
甲基对硫磷	10.3	9.3	9.9	9.7	93.5	3.2
	20.6	17.8	17.6	18.5	87.2	2.6
	30.9	26.7	28.0	27.7	88.9	2.5
三唑磷	13.0	13.5	11.8	12.8	97.7	6.7
	26.0	27.3	26.8	26.0	103	2.5
	39.0	32.6	31.9	33.3	83.6	2.1
乙基对硫磷	8.1	6.1	6.0	6.5	76.5	4.3
	16.2	13.3	14.3	14.6	86.8	4.8
	24.2	20.2	19.6	20.7	83.3	2.7
倍硫磷	6.7	5.1	5.7	5.4	80.6	5.6
	13.4	11.3	11.5	11.9	86.3	2.6
辛硫磷	20.1	16.1	15.8	16.7	80.6	2.8
	11.6	12.5	13.8	11.8	109	8.0
	23.3	26.0	25.8	24.4	109	3.4
	34.8	36.3	35.7	34.5	102	2.6

3 结论

本文建立了 SPE-HPLC 联用分析蔬菜中甲基对硫磷、三唑磷、乙基对硫磷、倍硫磷和辛硫磷 5 种有机磷农残的测定方法.选用乙腈为萃取溶剂,采用 1 000 mg 自制 Florisil 柱以及乙腈淋洗液可以获得较高的回收率.方法线性范围为 0.02 ~ 2.0 $\mu\text{g/L}$,检出限介于 0.10 ~ 0.17 $\mu\text{g/g}$.分析加标蔬菜样品,回收率在 76.5 % ~ 109 % 之间,RSD 在 2.1 % ~ 8.0 % 之间,满足蔬菜实际样品中有机磷农药残留的

分析与检测.

参考文献:

- [1] 王晓飞,周启星.蔬菜中农药残留检测技术研究进展[J].生态科学,2004,23 (4): 356-361.
- [2] B Alberro, C Sánchez-Brunete, J L Tadeo. Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 6 915-6 921.
- [3] F Ahmadi, Y Assadi, S M R Milani Hosseini, et

- al. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1101: 307-312.
- [4] 朱正斌. 高效液相色谱法在农药残留分析中的应用[J]. 化学工业与工程技术, 2004, 25 (6): 51-53.
- [5] 黄聪. 键合固定相气相色谱法分离测定蔬菜中有机磷农药的残留量[J]. 分析科学学报, 1999, 15 (4): 321-323.
- [6] M T Tena, A Rios, M Valcarcel, et al. Supercritical fluid extraction of organophosphorus pesticides from orange samples: Effect of solid additives on recovery[J]. Chromatographia. 1997, 46(9): 524-528.
- [7] A A Boyd-boland, S Magdic, J Pawliszyn. Simultaneous determination of 60 pesticides in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Analyst, 1996, 121: 929-937.
- [8] 杨云, 张卓, 李攻科. 微波辅助萃取/气相色谱-质谱联用分析蔬菜中的有机磷农药[J]. 色谱, 2002, 20 (5): 390-393.
- [9] 李攻科, 胡玉玲, 阮贵华. 样品前处理仪器与装置[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [10] 刘晓颖, 吴飞, 吴杭. 蔬菜中有机磷农药残留的高效液相色谱分析[J]. 生物学杂志, 2004, 21 (6): 41-42.
- [11] 陶宏亮, 关燕萍, 苏晓峰, 等. SPE-HPLC 用于蔬菜中甲基对硫磷和对硫磷同时测定[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25 (1): 46-49.

Determination of Five Organophosphorus Pesticides in Vegetables by Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Zhuo-min^{1,2}, CHEN Jin-quan^{1,2}, ZHANG Lan^{1,3}

1. Key Laboratory of Analysis & Detection for Food Safety (Fuzhou University) Ministry of Education, Fuzhou 350002, China;
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;
3. The Sport's Science Research Center of Fuzhou University, Fuzhou, 350002, China)

Abstract : An analytical method was developed for the determination of five organophosphorus pesticides including methyl parathion, triazophos, ethyl parathion, fenthion and phoxim in vegetables by solid phase extraction (SPE) coupled to high performance liquid chromatography (HPLC). The SPE procedures were based on the home-made Florisil SPE columns. The experimental conditions for the sample preparation such as extraction solvent, the type of SPE column, SPE column stuffing and elution solvents and corresponding instrumental conditions for HPLC detection were optimized in detail. The linear range was from 0.02 to 2.00 µg/L. The detection limit ranged from 0.10 to 0.17 µg/g. The method was used for the determination of trace organophosphorus pesticides in spiked vegetables. The average recovery was from 76.5 % to 109.0 % and the RSD was from 2.1 % to 8.0 %. The results indicate that the method is very suitable for the rapid determination of trace organophosphorus pesticides in vegetables.

Key words : solid phase extraction; high performance liquid chromatography; organophosphorus pesticides; vegetable

Classifying number : O657.32