

分散液-液微萃取-气相色谱法快速检测 番茄中 3 种拟除虫菊酯类农药

李贤波^{1,2}, 赵 嫚¹, 李胜清¹, 陈 浩^{1*}, 沈 菁^{2*}

(1. 华中农业大学理学院, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 湖北 武汉 430064)

摘要: 建立了快速(quick)、简单(easy)、便宜(cheap)、有效(effective)、可靠(rugged)和安全(safe) (QuEChERS) 的分散液-液微萃取(DLLME)-气相色谱快速测定番茄中拟除虫菊酯类农药残留的方法。样品经乙腈提取, *N*-丙基乙二胺(PSA) 净化, 采用 DLLME 富集, 用气相色谱法分析。考察了联苯菊酯、甲氰菊酯和氟氰菊酯在番茄中的残留测定, 同时考察了萃取剂种类与体积、分散剂体积以及萃取时间等因素对萃取效率的影响, 以 40 μ L 氯仿为萃取剂, 1 000 μ L 乙腈为分散剂, 萃取时间为 60 s。结果表明: 3 种拟除虫菊酯类农药在番茄中的检出限分别为 0.5、0.5、0.3 μ g/kg。在 1、10 和 50 μ g/kg 添加水平下, 联苯菊酯、甲氰菊酯和氟氰菊酯在番茄中的平均回收率分别为 89%~109%、92.5%~105% 和 90%~108%, 相对标准偏差分别为 2.5%~7.6%、2.8%~5.7%、3.8%~9.1%。该方法简便、快速、安全、价格低廉, 重现性好, 可用于番茄中拟除虫菊酯类农药的快速检测。

关键词: 分散液-液微萃取; QuEChERS; 气相色谱; 拟除虫菊酯类农药; 番茄

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012) 09-0926-05

Rapid determination of pyrethroids in tomatoes using gas chromatography combined with dispersive liquid-liquid microextraction

LI Xianbo^{1,2}, ZHAO Man¹, LI Shengqing¹, CHEN Hao^{1*}, SHEN Jing^{2*}

(1. College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology Research, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430064, China)

Abstract: An analytical method was established for the determination of three pyrethroids (bifenthrin, fenpropathrin and flucythrinate) in tomatoes using the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) cleanup and gas chromatography. The tomato samples were extracted with acetonitrile, cleaned-up by dispersive solid-phase extraction using primary secondary amine as sorbents, concentrated by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), and analyzed by gas chromatography. Factors affecting the extraction efficiency such as the type and volume of extraction solvent and the volume of dispersive and extraction time were investigated in detail. In the DLLME procedure, 40 μ L chloroform was used as the extraction solvent and 1 000 μ L acetonitrile was used as the dispersive solvent and the extraction time was 60 s. Under the optimized conditions, the limits of detection for bifenthrin, fenpropathrin and flucythrinate were 0.5, 0.5 and 0.3 μ g/kg, and the average recoveries in tomato samples at the spiked levels of 1, 10 and 50 μ g/kg were 89%–109%, 92.5%–105% and 90%–108% with the relative standard deviations of 2.5%–7.6%, 2.8%–5.7% and 3.8%–9.1%, respectively. The proposed

* 通讯联系人: 陈 浩, 教授, 研究方向为农药残留与食品安全. E-mail: hchenhao@mail.hzau.edu.cn.

沈 菁, 副研究员, 研究方向为农药残留与食品安全. E-mail: myshengjing@126.com.

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20100146110004)。

收稿日期: 2012-06-05

method is simple, quick, safe, reliable and applicable to analyze pyrethroid residues in tomato samples.

Key words: dispersive liquid-liquid microextraction; QuEChERS; gas chromatography (GC); pyrethroid pesticides; tomatoes

拟除虫菊酯类农药是继有机氯、有机磷和氨基甲酸酯类农药之后化学合成的一类生物活性优异、环境相容性好的杀虫剂,具有高效、广谱、低毒、低残留、能被生物降解等特点,已经在农作物生产中广泛使用。但其使用后残留的毒副作用也逐步显现。它们的残留物会在作物和动物体内富集^[1],会对人类的健康直接造成非常大的危害。随着生活水平的不断提高,食品安全问题和无公害绿色农产品已日渐引起老百姓的重视,人们对农药残留限量的要求也将更严格^[2]。因此,食品与环境中拟除虫菊酯类农药的痕量残留检测分析方法的建立非常必要。

目前,关于拟除虫菊酯类农药的残留检测方法主要有气相色谱-电化学检测(GC-ECD)^[3,4]、气相色谱-质谱(GC-MS)^[5]、高效液相色谱(HPLC)^[6]和液相色谱-质谱(LC-MS)^[7]。由于样品基质的复杂性和拟除虫菊酯类农药在环境中的相对较低的残留量,为了得到较为准确的检测结果,样品的前处理和富集过程就成了关键的环节。到目前为止,样品的前处理技术主要有液-液萃取(LLE)^[8]、微波提取(MAE)^[9]、超声辅助提取(UAE)^[10]、固相萃取(SPE)^[11]、固相微萃取(SPME)^[12]、搅拌棒吸附萃取(SBSE)^[13]等,但上述方法都有不足,如提取时有机溶剂用量大、分析时间长、富集倍数不高等。

近年来,由Anastassiades等^[14]提出的具有快速(quick)、简单(easy)、便宜(cheap)、有效(effective)、可靠(rugged)和安全(safe)(QuEChERS)等特点,基于固相萃取和基质固相分散技术的方法,可同时检测超过200种农药,也包括含脂肪的介质体系^[15],受到人们广泛的关注,然而富集倍数低、灵敏度不够高是其亟待克服的缺陷。文献^[16]显示QuEChERS与分散液-液微萃取技术(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)联用可有效解决这一问题,并用于玉米中41种农药的残留检测^[17],但此联用技术在番茄中的应用未见报道。

DLLME由于操作简便、实验速度快、富集倍数高^[18,19],已用于多种农药的残留检测。本课题组也对此技术的发展做出了一些贡献^[20-23]。本文将QuEChERS与DLLME这两种前处理方法联用,用于番茄样品的提取、净化、浓缩。此方法简便、快速、安全、价格低廉,重现性好,消除了番茄样品中色素基质的干扰,满足番茄中3种拟除虫菊酯类农药的检

测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪(带电子俘获检测器(ECD))、HP-5 毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm,美国安捷伦公司); AB204/01 型分析天平(感量0.1 mg)和 PL2002/01 型电子顶载天平(感量10 mg)(梅特勒-托利多(上海)有限公司); FJ-200 型高速分散均质机(上海标本模型厂); Anke TDL-40B 型离心机(连云港东邦化工机械有限公司)。乙腈、三氯甲烷、四氯化碳、氯苯、二氯乙烷、二氯乙烯均购于 Mallinckrodt Baker 公司,均为分析纯;氯化钠为分析纯,140 °C 下烘烤 4 h 备用。

3 种标准储备液:联苯菊酯、甲氰菊酯、氟氰菊酯各标准品的质量浓度均为 1 000 mg/L,均购于农业部环境保护科研检测所。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

进样口温度:260 °C;柱温升温程序:100 °C 保持 1 min,以 20 °C/min 升至 180 °C,再以 5 °C/min 升至 250 °C,再以 10 °C/min 升至 280 °C,保持 5 min;载气:高纯氮气,纯度 ≥ 99.999%,流速:1.0 mL/min;进样方式:不分流进样,0.75 min 后打开分流阀和隔垫吹扫阀,进样体积为 1 μL。

1.2.2 标准溶液的配制

1 000 mg/L 的标准储备液用正己烷逐级稀释至所需浓度,置于 -18 °C 冰箱中保存。

1.3 样品前处理

准确称取捣碎的番茄样品 5.00 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 10 mL 乙腈,振荡提取 2 min,加入 3 g NaCl 和 0.1 g MgSO₄,再次振荡 1 min,于 5 000 r/min 下离心 5 min;取 2.00 mL 上清液转入已加有 100.0 mg N-丙基乙二胺(PSA)的离心管中,振荡混合,静置 5 min;取上清液 1.00 mL 于 5 mL 聚四氟乙烯小管中,再加入 40 μL 三氯甲烷,涡旋约 30 s,用注射器吸取全部液体快速注入含有 5 mL 去离子水的离心管中,形成均匀的乳浊液,于 5 000 r/min 下离心 5 min 使之分层;弃去上部的水,用氮吹仪吹干底部的有机相,再用 20 μL 正己烷复溶,供 GC-ECD 分析。

2 结果与讨论

2.1 QuEChERS 方法条件的优化

2.1.1 提取剂的选择

乙腈、乙酸乙酯和丙酮是常用的分析拟除虫菊酯农药的提取剂。与丙酮和乙酸乙酯相比,乙腈提取色素和基质中的蜡质、脂肪等非极性成分的能力相对较小,而且更容易通过盐析作用去除样品中的水分。故本实验选用乙腈作为提取剂。

2.1.2 净化条件的优化

本文比较了不加 PSA 与加有 PSA 时的净化效果。不加 PSA 时溶液中存在大量色素,在目标化合物出峰时有干扰;而加入了 PSA 后消除了干扰(见图 1)。故本实验选择了加入 PSA 用于净化。

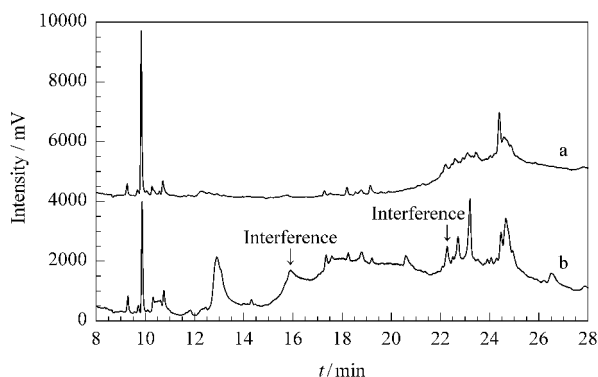


图 1 PSA 对净化效果的影响

Fig. 1 Influence of PSA on clean-up

Chromatograms of extract of a blank tomato sample: a. clean-up with PSA; b. without clean-up with PSA.

2.2 DLLME 方法的优化

2.2.1 萃取溶剂的选择

萃取溶剂的选择直接影响萃取效率。萃取剂的密度必须大于水,而且对待测物的溶解度要大,以保证取得良好的萃取效率。分别考察了 CHCl_3 、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ 、 $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$ 、 C_2Cl_4 对 3 种拟除虫菊酯农药的萃取效果。由图 2 可知, CHCl_3 的萃取效率最高,故本实验选择 CHCl_3 作为最佳萃取剂。

2.2.2 萃取剂体积的选择

分别以含有不同体积(35.0、40.0、45.0、50.0 μL) CHCl_3 的 1.0 mL 的乙腈为萃取体系进行萃取,当萃取剂的体积为 40 μL 时,萃取效率最高(见图 3),故选择 CHCl_3 的体积为 40 μL 。

2.2.3 分散剂体积的选择

分散剂乙腈体积的大小直接影响三氯甲烷在水中的分散程度,进而影响萃取效率。分别考察了乙腈体积在 750 ~ 1 500 μL 范围内对萃取效率的影响。结果如图 4 表明,萃取效率在乙腈体积为 750

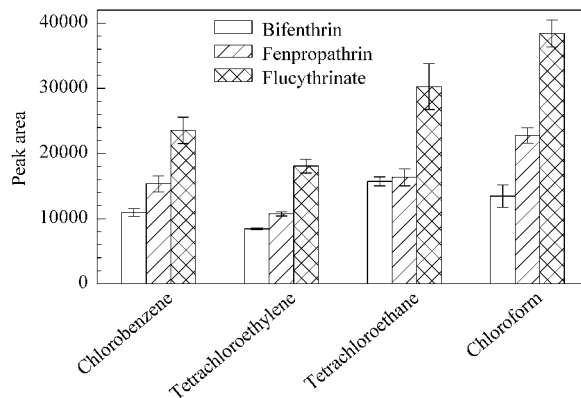


图 2 DLLME 萃取剂的选择

Fig. 2 Influence of extraction solvent in DLLME

Extraction conditions: water sample volume, 5.00 mL; extraction solvent volume, 50 μL ; dispersive solvent (acetonitrile) volume, 1.0 mL; concentration of each pyrethroid in water, 0.2 mg/L.

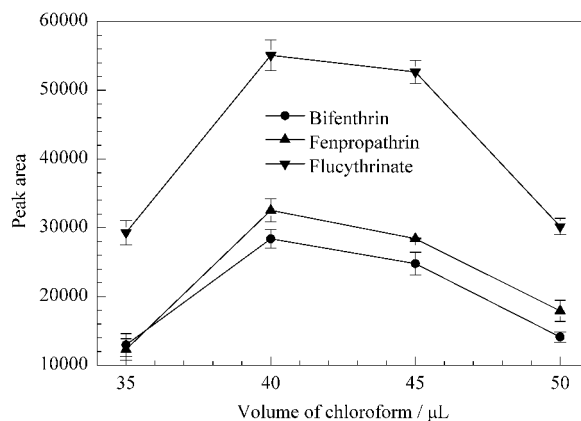


图 3 DLLME 萃取剂体积的选择

Fig. 3 Selection of extraction solvent volume in DLLME

Extraction conditions: extraction solvent, chloroform; other conditions were the same as in Fig. 2.

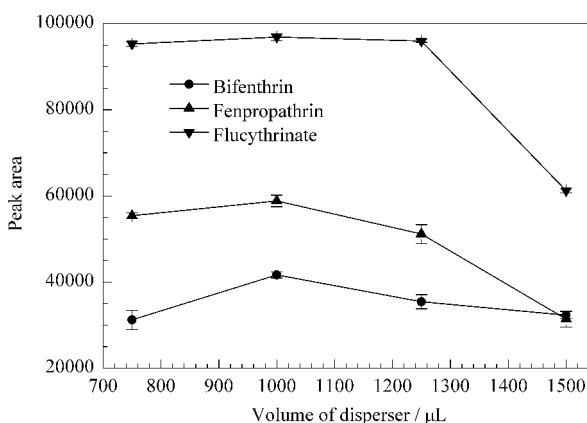


图 4 DLLME 分散剂体积的选择

Fig. 4 Selection of dispersive solvent volume in DLLME

Extraction conditions: dispersive solvent, acetonitrile; extraction solvent, chloroform, 40 μL ; concentration of each pyrethroid in water, 0.4 mg/L; other conditions were the same as in Fig. 2.

~1 000 μL 范围内随着体积增加而增加,在 1 000 μL 时达到最大值;在 1 000 ~ 1 500 μL 范围内随着乙腈体积的增加而减小。这是由于当乙腈体积小小时,三氯甲烷未能均匀分散在水相中,导致萃取效率低;当乙腈体积过大时,使得待测物在水中的溶解度增大,萃取效率降低,因此本实验选择乙腈的最佳体积为 1 000 μL 。

2.2.4 萃取时间的选择

考察了萃取时间(30、45、60、75 s)对拟除虫菊酯农药的萃取效率的影响。结果如图 5,表明在 60 s 时萃取可达到平衡。

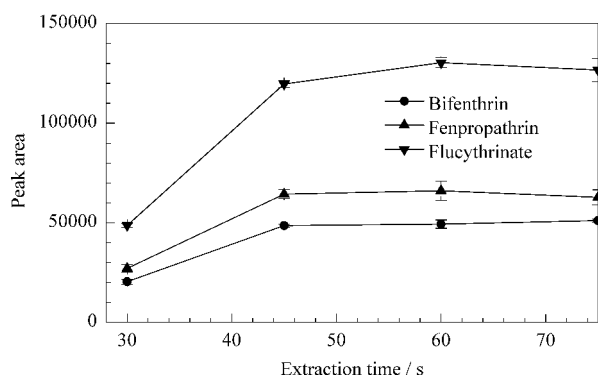


图 5 DLLME 萃取时间的选择

Fig. 5 Selection of extraction time of DLLME

Extraction conditions: dispersive solvent (acetonitrile) volume, 1.0 mL; other conditions were the same as in Fig. 4.

2.3 方法的线性关系和检出限

用上述方法分别在 5.00 g 捣碎的番茄样品中添加 1、5、10、50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的混合拟除虫菊酯农药,按上述实验方法萃取后进样分析。每个添加水平平行测定 3 次,以分析物的峰面积 Y 对各农药的含量 X ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 做标准曲线,结果见表 1。富集 25 倍,3 种拟除虫菊酯农药在 1 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内均呈良好的线性关系,其相关系数均为 0.999 7,方法的检出限(按信噪比(S/N) = 3 计)分别为联苯菊酯 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、甲氰菊酯 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、氟氰菊酯 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限(按 S/N = 10 计)分别为联苯菊酯 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、甲氰菊酯 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、氟氰菊酯 1.0

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法具有富集效果好、灵敏度高优点,可满足番茄中农药残留检测的要求。

2.4 方法的准确度与精密度

分别在 5.00 g 捣碎的番茄样品中添加 1、10、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平的拟除虫菊酯农药,按实验方法进行平行测定 5 次,联苯菊酯、甲氰菊酯和氟氰菊酯的平均回收率分别为 89% ~ 107.3%、92.5% ~ 105% 和 90% ~ 108%,相对标准偏差分别为 2.5% ~ 7.6%、2.8% ~ 5.7%、3.8% ~ 9.1% (见表 1),表明该方法回收效果较好。空白样品、空白加标样品和标准的谱图见图 6。

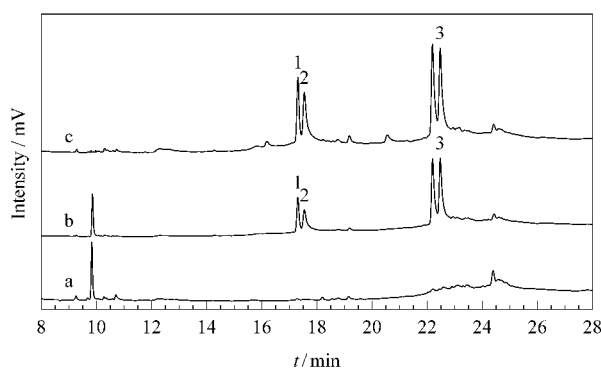


图 6 (a) 空白番茄样品、(b) 添加 0.1 mg/kg 拟除虫菊酯的番茄样品和 (c) 0.1 mg/L 拟除虫菊酯混合标准溶液的谱图

Fig. 6 Chromatograms of (a) a blank tomato sample, (b) a blank tomato sample spiked with 0.1 mg/kg for each pyrethroid and (c) 0.1 mg/L mixed standard solution of pyrethroids

Peak identifications: 1. bifenthrin; 2. fenpropathrin; 3. flucythrinate.

2.5 实际样品测定

在最优条件下,按本实验方法分别对武汉市 3 个市场上的 27 个番茄样品进行了分析检测,结果均未检出上述 3 种拟除虫菊酯农药。

2.6 与文献方法的比较

将所建立的 QuEChERS-DLLME-GC 方法与文献^[3,4,6,7]报道的方法进行对比可见,QuEChERS-DLLME-GC 具有样品(5.00 g)和有机溶剂用量(10 mL)少和检出限低等优点(见表 2),可以作为痕量拟除虫菊酯农药分析的主要方法。

表 1 3 种拟除虫菊酯农药的线性关系、欧盟肯定列表规定的最大残留限量值(MRL)、检出限及在番茄样品中的添加回收率

Table 1 Linear equations, maximum residue limit (MRL) from EU Positive List, limits of detection (LOD) and recoveries of three pyrethroid pesticides spiked in a tomato sample

Pesticide	Linear equation	MRL/ (mg/kg)	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Spiked at 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Spiked at 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Spiked at 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
				Recovery/ %	RSD/ %	Recovery/ %	RSD/ %	Recovery/ %	RSD/ %
Bifenthrin	$Y = 1 \times 10^6 X - 1595$	0.2	0.5	89.0 ~ 107.3	7.6	97.4 ~ 103.0	2.4	89.7 ~ 109.0	7.0
Fenpropathrin	$Y = 961942 X - 1343$	0.01	0.5	92.5 ~ 105.0	5.7	97.0 ~ 103.8	2.8	94.0 ~ 104.9	5.1
Flucythrinate	$Y = 2 \times 10^6 X - 2983$	0.05	0.3	89.8 ~ 108.0	9.1	94.7 ~ 104.0	3.8	93.9 ~ 104.8	4.0

Y : peak area; X : content, $\mu\text{g}/\text{kg}$. Linear range: 1 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$; correlation coefficient: 0.9997.

表 2 本方法与文献方法对拟除虫菊酯农药在番茄中残留分析结果的比较

Table 2 Comparison of this method with other methods from references for determination of pyrethroids in tomatoes

Mass of sample/g	Sample preparation method	Volume of solvent/mL	LOD/($\mu\text{g/kg}$)	Detection method	Recovery/%	Ref.
35	LE	50	13–49	HPLC	80.7–107.4	[6]
15	LE	40	3.0–6.0	LC-ESI-MS	80.1–109.8	[7]
20	LE-SPE	80	0.3–15	GC-ECD	88.9–109.0	[8]
5	LLE	20	3.0–14	GC-ECD	97.0–99.5	[9]
5	QuEChERS-DLLME	10	0.30–0.50	GC-ECD	89.0–109.0	This work

LE: liquid extraction; LE-SPE: liquid extraction-solid phase extraction; LLE: liquid-liquid extraction; DLLME: dispersive liquid-liquid microextraction; HPLC: high performance liquid chromatography; LC-ESI-MS: liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry; GC-ECD: gas chromatography-electron capture detector.

3 结论

建立了 QuEChERS-DLLME-GC 联用测定番茄中 3 种拟除虫菊酯农药残留的方法。采用 QuEChERS 一步萃取净化、DLLME 富集的前处理方法,考察了 PSA 吸附剂对于干扰基质的净化效果、萃取剂种类与体积的选择、分散剂体积以及萃取时间的选择,同时简化了前处理步骤,方法简单、快速,富集效果好,得到了较高的回收率和较好的净化富集效果。本方法简便、快速、安全、价格低廉,重现性好,检出限低,富集倍数高,可以作为番茄中拟除虫菊酯农药残留痕量检测及常规检测方法。

参考文献:

- [1] Yasin M, Baugh P J, Bonwick G A, et al. J Chromatogr A, 1996, 754(1/2): 235
- [2] Li Y, Yuan T. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (李晔, 袁佗. 中国卫生检验杂志), 2008, 18(9): 1774
- [3] Zawiyah S, Yaakob B C M, Nazimah S A H, et al. J Chromatogr A, 2006, 1127(1/2): 254
- [4] Shinger M I, Elbashir A A, Ahmed H E, et al. Biomed Chromatogr, 2012, 26(5): 589
- [5] Esteve Turrillas F A, Pastor A, Guardia M. Anal Chim Acta, 2006, 560(1/2): 118
- [6] Martínez G M, Gil García M D, Santiago Valverd R. J Chromatogr A, 2006, 1113(1/2): 191
- [7] Martínez D B, Vázquez P P, Galera M M, et al. Chromatographia, 2006, 63(9/10): 487
- [8] Mekebri A, Grane D B, Blondina G J, et al. Bull Environ Contam Toxicol, 2008, 80(5): 455
- [9] Esteve-Turrillas F A, Aman C S, Pastor A, et al. Anal Chim Acta, 2004, 522(1): 73
- [10] Barro R, García-Jares C, Llompart M, et al. J Chromatogr A, 2006, 1111(1): 1
- [11] Esteve Turrillas F A, Pastor A, Guardia M. Anal Chim Acta, 2005, 553(1/2): 50
- [12] Vázquez P P, Mughari A R, Galera M M. J Chromatogr A, 2008, 1188(2): 61
- [13] Hoeck E V, David F, Sandra P. J Chromatogr A, 2007, 1157(1/2): 1
- [14] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412
- [15] Lehotay S, Kok A D, Hiemstra M, et al. J AOAC Int, 2005, 88(2): 595
- [16] Zhao E, Zhao W, Han L, et al. J Chromatogr A, 2007, 1175(1): 137
- [17] Cunha S C, Fernandes J O. J Chromatogr A, 2011, 1218(43): 7748
- [18] Hashemi P, Beyranvand S, Mansur R S, et al. Anal Chim Acta, 2009, 655(1/2): 60
- [19] Mohammad R, Yaghoub A, Mohammadreza M H, et al. J Chromatogr A, 2006, 1116(1): 1
- [20] Chen H, Chen R W, Li S Q. J Chromatogr A, 2010, 1217(8): 1244
- [21] Zhu B Q, Chen H, Li S Q. Chinese Journal of Chromatography (祝本琼, 陈浩, 李胜清. 色谱), 2012, 30(2): 201
- [22] Chen H, Du P, Chen J, et al. Talanta, 2010, 81(1/2): 176
- [23] Li S Q, Cai S, Chen H, et al. Spectrochim Acta Part B, 2009, 64(7): 666