

# 有机磷农药残留前处理技术的研究

何 聿 陈金泉 张 兰

(食品安全分析与检测技术教育部重点实验室,福州大学运动科学研究中心,福州 350002)

**摘 要:**本实验主要是利用固相萃取技术对食品中有机磷农药前处理方法进行了研究。对自制的固相萃取小柱的选择参数进行了优化,建立合适的样品提取、净化、浓缩的前处理方法,确保色谱分析测定时无样品基质的干扰,从而为测定的结果提供了保证,并延长色谱柱的寿命,降低了实验成本。茶叶样品以丙酮为提取剂,超声波 30 min 后,经 florisil 柱(1000mg)+活性炭(50mg)混合柱浓缩净化,用 10 mL 的乙酸乙酯淋洗后,经色谱分析验证,所得回收率在 73.7% 以上,RSD 在 4.1% 以下,结果令人满意。

**关键词:**有机磷农药,固相萃取,前处理技术

**中图分类号:**O657. **文献标识码:**A **文章编号:**1009-8143(2007)03-0006-06

## Study of techniques about preparation to the organophosphorus pesticides in foods

He Yu, Chen Jinquan, Zhang Lan

(Key Laboratory Analysis and Detection Technology for Food Safety, Ministry of Education, The Sport Science Research Center, Fuzhou University, Fuzhou, 350002, CHINA)

**Abstract:** The technique of solid-phase extraction was researched. The preparation method of vegetables and fruits was studied as follows: using acetonitrile as extract solvent, OPs can be enriched by solid phase extraction with florisisil and the analytes were eluted by acetonitrile. The preparation method of tea was studied as follows: using acetone as extract solvent with ultrasonic, OPs can be enriched by solid phase extraction with florisisil and active carbon, and the analytes were eluted by ethyl-acetate. Good recoveries 73.7% and RSD 4.1% were obtained. The results are satisfactory.

**Key words:** organophosphorus pesticides; solid-phase extraction; preparation

## 1 引言:

人类对食品中农药残留的关注推动了农药残留分析技术的发展。由于样品前处理在整个农药残留分析过程中占据关键地位,直接关系到整个分析的准确性与精密度,使得快速、简便的前理技术得到了迅速发展。传统的前处理方法(液液萃取、树脂吸附、索氏提取等)存在诸多局限<sup>[1]</sup>,《中华人民共和国标准 GB/T 17331-1998》对有机磷农药残留的样品前处理步骤复杂,消耗时间较长,难以满足食品中农药残留的快速、简便的检测要求。

固相萃取(Solidphaseextraction, SPE)具有分效率高、使用方便、快速、重复性好、节省经费、安

全、预处理时间短等优点<sup>[2]</sup>;而且可选择不同类型的吸附剂和有机溶剂用于处理各种不同类别的有机污染物<sup>[3]</sup>,已在农药残留,特别是在脂肪和蛋白质含量高的复杂样品中农药残留物以及农药多残留的分离、提取、净化和浓缩方面得到了广泛应用<sup>[4]</sup>,在国外已逐渐取代了传统的液液萃取而成为样品前处理的可靠而有效的方法。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

仪器: BeckmanHPLC (125systemn and 168 UV);BF2000 氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限

收稿日期:2007-1-29

基金项目:福建省自然科学基金(B0510006)

作者简介:何聿(1978~),女,福州,硕士,主要从事毛细管电泳研究。Email:hevu@fzu.edu.cn

公司);FS-1 电动匀浆机(金坛市富华仪器有限公司);漩涡冷凝器(江苏海门市麒麟医用仪器厂);恒温烘箱 SX2-512(上海跃进医疗器械厂);KQ-100E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

试剂:甲基对硫磷标准品(99.0%,国家农药质检中心(沈阳));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);正己烷、丙酮、乙酸乙酯、石油醚等均为分析纯;实验用水为重蒸馏水。

Florisil 柱、C18 小柱:Agilent 公司,规格

1000mg/6ml

## 2.2 固相萃取小柱的制备

对固相萃取柱的制备进行摸索,比较了干法装柱和湿法装柱两种方法。由于湿法装柱需耗用较多有机溶剂,可能造成对环境的污染,故采用干法装柱。装柱流程如下: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;加入处理过的 florisil 土,轻轻敲打,使得填料装填均匀;再垫上聚四氟乙烯固相萃取小柱垫片,并用机器压实。其制备流程见图 1。

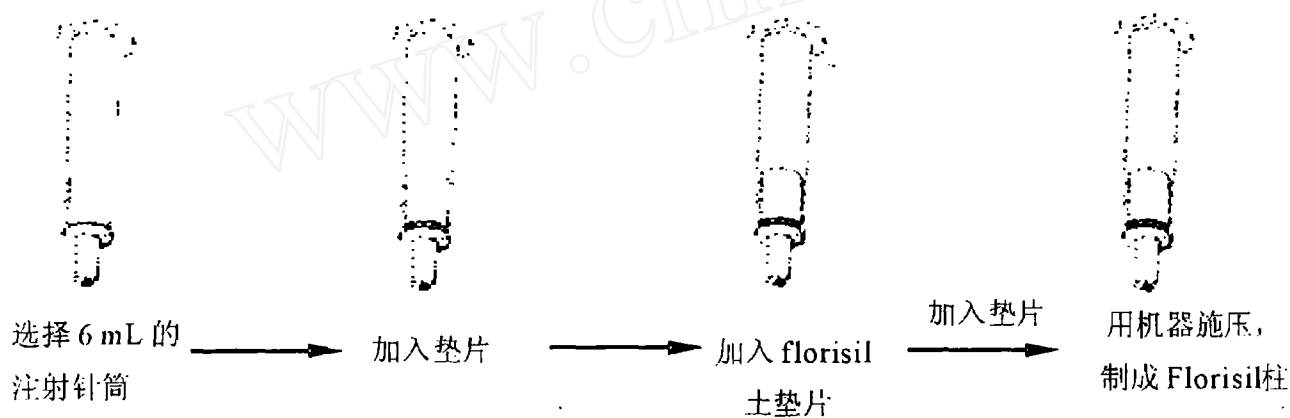


图 1 Florisil 柱的制备流程图

Fig. 1 The executing flow chart of florisil column

## 2.3 固相萃取小柱净化步骤

在萃取样品之前,用一满管溶剂冲洗管子,湿润固相萃取柱填料。如果填料为反相类型硅胶和非极性吸附剂介质,通常用水溶性有机溶剂如甲醇预处理,然后用水或缓冲溶液润洗。甲醇湿润吸附剂表面和渗透键合烷基相,以允许水更有效地湿润硅胶表面。有时前预处理溶剂使用在甲醇之前。这些溶剂通常是与洗脱溶剂一样,用于消除固相萃取管上的杂质对分析物的干扰,也可能使杂质溶于强洗脱溶剂。

正相类型固相萃取硅胶和极性吸附剂介质,通常用样品所在的有机溶剂来预处理。离子交换填料将用于非极性有机溶剂中的样品,其用 3-5 mL 的去离子水或低浓度的离子缓冲溶液来预处理。为了使固相萃取填料从预处理到样品加入时都保持湿润,允许大约 1 mL 的预处理溶剂在管过滤片(frit)或萃取片表面之上。如果样品是从一个贮液管或过滤管引入固相萃取管,则多加入 0.5 mL 最

后的预处理溶剂到 1 mL 的固相萃取管中,如果是 2 mL-3 mL 的萃取柱中,多加入 4 mL-6 mL 管中等。如果在样品加入之前,萃取柱中的填料干了,重复预处理过程。在重新引入有机溶剂之前,用水冲洗柱中缓冲溶液的盐。

将样品装入萃取柱,固相萃取柱中的填料将吸附样品中的杂质与化合物。当样品流出时,杂质与所选择的化合物都被留在萃取柱上。选定一种既能洗脱杂质又能保留所选化合物的冲洗液来冲洗萃取柱。洗脱特定的混合物:用溶剂将吸附在萃取柱上的化合物洗脱。

## 2.4 样品处理

### 2.4.1 蔬菜和水果样品处理

制备:取不少于 1000 g 蔬菜样品,取可食部分,用干净纱布轻轻擦去样品表面的附着物,采用对角线分割法,取对角部分,将其切碎,充分混匀以备用。

提取:准确称取 25.0 g 样品置于 100 mL 烧杯

中,加 50 mL 乙腈,转移至高速匀浆机机匀浆 1 min。将匀浆后的样品过滤到 100 mL 的具塞刻度量筒(量筒内放有 5~7 g NaCl),收集滤液后盖上塞子,剧烈振摇 1 min,静置 10 min,使乙腈相与水相分层。准确吸取 10.0 mL 上层乙腈相溶液,移至 10 mL 具塞刻度试管中,于 50℃ 的氮吹仪上缓慢氮气流吹动,蒸发至近干,用色谱级甲醇溶解样品并定容至 1.0 mL,待净化。

净化:将提取浓缩液加入固相萃取柱(使用前先用 5.0 mL 正己烷活化固相萃取柱)中,靠重力过柱。用 5 mL 的乙腈溶液淋洗固相萃取柱,重复 2 次,淋洗液于 50℃ 下氮吹浓缩至干,用甲醇准确定容至 1.0 mL,过 0.20  $\mu\text{m}$  滤膜,待 HPLC 分析。

#### 2.4.2 茶叶的样品处理

提取:准确称取 1.00 g 过 20 目的干茶叶样品,加入 10 mL 丙酮,充分混匀后,超声提取 30 min,旋转离心(4000 r/min)10 min,移取上层澄清液,氮气氛围下 45℃ 浓缩至干,用色谱级甲醇溶解并定容至 1.0 mL,待净化。

净化:将提取浓缩液直接经过正己烷预淋洗的装填有 1000 mg florisil 填料和 50 mg 活性炭的固相萃取柱,用 10 mL 的乙酸乙酯淋洗,收集全部的淋洗液,在 45℃ 条件下的氮吹浓缩至干,用色谱级的甲醇溶解并定容至 1.0 mL,过 0.20  $\mu\text{m}$  滤膜,待 HPLC 分析。

### 3 结果和讨论

#### 3.1 提取溶剂的选择

在对样品进行前处理过程中,最主要的是选择最佳的提取方式和提取剂,使目标物尽可能被提取

出来,故先对提取方法和提取剂进行选择。

##### 3.1.1 蔬菜和水果样品

在国内外报道中<sup>[5,6]</sup>,蔬菜和水果中有机磷农药的提取液主要有乙腈,丙酮,二氯甲烷。由于二氯甲烷的极性较大,溶解的能力强,易带来更多的杂质,杂质对萃取柱带来严重的污染,降低了柱子的使用效能,影响分析的精密性,增加了分析的成本;丙酮与水混溶,使得提取过程繁琐。故选用乙腈作为提取溶剂。

##### 3.1.2 茶叶样品

由于茶叶中包含酚类,咖啡碱以及其它一些成分,针对有机磷农药的结构特点,参考国家标准(GB/T 5009.20-2003)设计了三个提取方法:方法 1:准确称取 0.5 g 的过 20 目的干茶叶样品,加入 2.5 mL 的水和足量的无水硫酸钠混匀,加入 2 mL 的提取剂充分混合后,离心 3 min(3000 r/min)吸取上清液,分别加入 2 mL 提取剂重复提取两次,合并三次提取液浓缩至 1 mL,过 0.20  $\mu\text{m}$  的滤膜,待 HPLC 测定。

方法 2:准确称取 0.5 g 过 20 目的干茶叶样品,加入 13 mL 的丙酮,超声 10 min,静置 1 h,准确移取上清液 10 mL,浓缩至干,定容至 1 mL,过 0.20  $\mu\text{m}$  的滤膜,待 HPLC 测定。

方法 3:准确称取 0.5 g 过 20 目的干茶叶样品,加入 13 mL 的丙酮,超声 30 min 后,离心(4000 r/min)10 min 后,准确移取上清液 10 mL,浓缩至干,定容至 1 mL,过 0.20  $\mu\text{m}$  的滤膜,待 HPLC 测定。

对以上三种提取方法进行了回收率比较,结果列于表 1(n=5)

表 1 不同提取方法的回收率

Contents	Method 1		Method 2		Method 3	
	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
Acetonitrile	43.9	4.7	50.5	4.3	45.8	4.1
Ethyl-acetate	61.4	4.5	62.3	4.9	68.5	2.6
V/V(Ethyl-acetate/acetone)=1/1	69.1	3.2	69.1	3.8	72.5	3.0
Acetone	80.9	4.4	85.3	4.0	88.6	3.6
V/V(Ethyl-acetate/hexane)=1/1	69.0	4.8	62.9	2.8	66.6	2.9
V/V(acetone/hexane)=1/1	45.6	2.9	34.2	2.4	43.9	4.0
Petroleum ether	35.4	5.6	42.3	3.2	40.3	3.1

Conditions:  $\lambda=254\text{nm}$ ; Velocity of flow :1.0ml/min,  $V_{\text{甲}}/V_{\text{水}}=70/30$

从表中可见,方法3的回收率最高。在此的基础上,研究超声时间的长短对回收率影响,表2为在不同超声时间内的回收率情况。

表2 不同超声时间的回收率(n=5)

Contents	10min	20min	30min	40min	50min
Recovery(%)	64.8	74.2	88.6	88.5	90.8
RSD(%)	2.5	1.3	2.4	2.2	1.2

#### 操作条件间表1

可见,采用方法3,以丙酮作为提取剂,超声50min,离心10min,移取上清液,总体回收率相对较高。

### 3.2 固相萃取柱条件优化

#### 3.2.1 固相萃取柱填料的选择

根据固相萃取原理,针对不同的萃取对象采用不同的固相萃取填料。由于有机磷农药同时带有非极性和极性的官能团,根据其特性初步选择florisil、硅胶和C18三种固相萃取小柱,并对每种填料的4根固相萃取小柱进行平行实验,测定其回收率,发现florisil与C18固相萃取小柱两者的回收率偏差不大,而硅胶柱所得的回收率相对较低,如图2所示,C18柱平均回收率是85.3%(RSD=5.0%);florisil柱平均回收率是83.1%(RSD=4.4%);硅胶平均回收率是67.8%(RSD=2.8%)。

考虑到florisil固相萃取柱为自制柱,成本较低,且净化效果与C18相当,因此选择florisil柱作为SPE中使用的小柱。

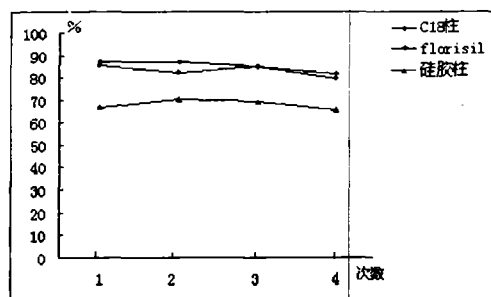


图2 不同填料的回收率

#### 3.2.2 填料量和淋洗液的选择

根据固相萃取原理,填料质量越大,其吸附容量越大。此外,为了将分析物尽量从固定相中彻底洗脱并进行分析,必须选用合适的,能够较好地预分离其他干扰组分的淋洗液。淋洗液的极性太小,洗脱不完全,回收率不高;淋洗液极性太大,其他杂质也被洗脱,对液相色谱柱的损耗很大。因此在验证500mg、1000mg两种规格的florisil固相萃取小柱的过程中,同时对几种淋洗液进行比较,结果见表3。

从表3可以看出,当填料量为1000mg时,选择乙腈淋洗液回收率最高。

#### 3.2.3 淋洗液体积的选择

考察了洗脱剂乙腈用量的影响,测定结果见表4。发现洗脱溶剂的体积大于10mL时,洗脱溶剂的体积对洗脱效果的影响不大。根据单位体积溶剂的洗脱图(图3)也可得出10mL的淋洗体积足以满足要求。

### 3.3 茶叶样品净化条件的选择

由于茶叶本身含有大量的各种类型的有机物质,加之有机磷、特异性昆虫生长调节剂等多种性质的农药,因而对样品的提取、净化条件的选择要求较苛刻。针对前面蔬菜和水果中有机磷农药净化手段是采用florisil固相萃取小柱(规格1000mg/mL),在此基础上对茶叶中有机磷农药的残留的净化条件进行了研究。

表3 不同提取方法的回收率

Solvents	Stuffings (mg)	1	2	3	4	Average Recovery (%)	RSD (%)
Dichloro-methane	500	32.2	32.0	32.2	31.9	32.1	3.7
	1000	32.6	31.1	33.2	32.2	32.3	2.7
Ethyl-acetate	500	27.6	29.4	28.6	28.5	28.5	2.5
	1000	33.0	31.7	32.6	32.7	32.5	1.8
V/V(Ethyl-acetate /Acetone)=80/20	500	58.6	62.0	60.4	59.7	60.2	2.3
	1000	41.4	38.4	39.1	40.5	39.9	3.4
Acetonitrile	500	71.3	70.1	68.8	70.3	70.1	1.4
	1000	72.3	77.3	74.6	75.4	74.9	2.8
V/V(Acetonitrile /Methanol)=80/20	500	16.0	20.5	21.1	18.7	19.1	11.9
	1000	35.8	25.0	28.1	30.4	29.8	15.2
Methanol	500	16.0	21.7	21.0	19.8	19.6	13.0
	1000	17.2	15.4	16.7	17.4	16.7	5.4

操作条件同表1

表4 不同溶剂体积的回收率(n=5)

Contents	5mL	10mL	15mL
Recovery (%)	76.6	90.6	91.0
RSD (%)	3.8	5.9	4.2

操作条件同表1

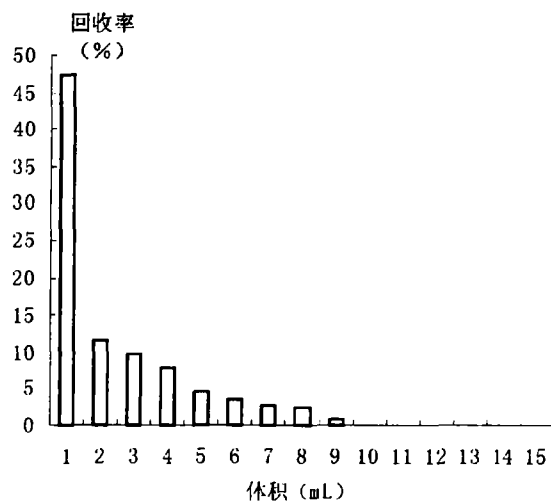


图3 溶剂体积与回收率关系图

## 3.3.1 洗脱剂和活性炭量的选择

OPs 极性相对较强,故洗脱溶剂的极性必须与提取剂相当或更强,初步选择了乙腈、乙酸乙酯、丙酮和石油醚等洗脱剂对目标物进行洗脱。同时为了消除茶叶中的杂质与色素,在自制的 florisil 柱中添加活性炭,从表 5 中的实验结果可以得出结论:当 florisil 柱中含有 35 mg 活性炭,并采乙酸乙酯作为洗脱剂时,回收率最高。

表5 不同活性炭含量及不同溶剂的回收率

Contents	35mg		50mg		80mg		100mg	
	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
Acetonitrile	44.0	2.5	40.4	2.6	33.1	2.9	28.1	2.2
Ethyl-acetate	77.8	1.3	76.9	1.5	54.8	1.6	47.3	3.5
acetone	63.4	1.3	52.2	3.6	42.5	3.6	35.1	1.3
Petroleum-ether	30.7	1.1	26.8	1.5	22.6	2.0	18.6	1.9

操作条件同表1

## 3.3.2 洗脱剂体积的选择

对乙酸乙酯的洗脱体积进行考察,结果显示当体

积为10~15 mL,其回收率变化不大,最终选择洗脱剂的体积为10mL。

表6 不同洗脱剂体积的回收率

Contents	Parathion-methyl	Triazophos	Parathion	Fenthion	Phoxim
5 ml Recovery(%)	71.5	76.5	68.3	64.1	77.8
RSD(%)	5.0	1.1	2.7	6.0	3.4
10ml Recovery(%)	79.3	83.6	76.4	73.7	87.2
RSD(%)	2.7	4.1	2.8	3.6	4.0
15ml Recovery(%)	79.4	85.0	78.0	74.0	88.7
RSD(%)	1.0	1.6	1.2	5.4	1.6

操作条件同表1

## 4 结论:

《中华人民共和国标准法 GB/T 17331-1998》中对食品中有机磷农药残留的前处理过程比较繁琐。本实验对食品中有机磷农药残留提取方法进行了探讨,并对 SPE 浓缩净化有机磷农药残留的参数条件进行了选择,结果令人满意。从而为降低样品污染、减少有机溶剂用量,降低实验成本提供了可行性方法。确定的前处理条件如下:

1、蔬菜和水果中有机磷农药残留的前处理条件:蔬菜和水果样品以乙腈为提取溶剂,经过 florisil 固相萃取小柱浓缩、净化。

2、茶叶中有机磷农药残留的提取、净化条件:茶叶样品以丙酮为提取剂,超声波 30 min 后,经 florisil 柱(1000mg)+活性炭(50mg)混合柱浓缩净化,用 10 mL 的乙酸乙酯淋洗后,经色谱分析验证,所得回收率回收率在 73.7%以上,RSD 在 4.1%以下,结果令人满意。

## 参考文献

- [1] 姜会书,徐会君. 固相萃取技术在农药分析中的应用 [J]. 农业与技术, 1999,19(6): 35-37.
- [2] 张海霞,朱彭龄. 固相萃取 [J]. 分析化学, 2000,28(9): 1172-1180.
- [3] 王立. 色谱分析样品处理 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [4] 时亮,王丽. 用固相萃取-毛细管气相色谱法测定烟草中氨基甲酸酯类农药残留量 [J]. 分析测试技术与仪器, 2000,1(6): 49-51.
- [5] 刘永波,贾立华,牛淑妍. 气-质联用快速检测蔬菜、水果中农药多残留的分析方法 [J]. 青岛科技大学学报, 2003, 24(6): 491-495.
- [6] Aybar Munoz a J, Ferna'ndez Gonza'lez a E, Garc?? a-Ayuso L E, et al. A new approach to qualitative analysis of organophosphorus pesticide residues in cucumber using a double gas-chromatographic system; GC-pulsed-flame photometry and retention time locking GC/mass spectrometry [J]. Talanta, 2003, 60: 433-447.