

分散液相微萃取—液相色谱联用测定番茄中 8种氨基甲酸酯农药残留

樊雯娟¹, 郝家勇², 罗瑞峰², *罗小玲²

(1. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000; 2. 农业部食品质量监督检验测试中心, 新疆 石河子 832000)

摘要: 采用分散液相微萃取与液相色谱—荧光检测联用技术建立了测定番茄样品中氨基甲酸酯农药残留的新方法。对影响萃取和富集效率的因素进行了优化。萃取条件选定为: 在 10 mL 带塞离心试管中加入 5.0 mL 番茄样品溶液 (pH 值 7), 并快速注入 2.2 mL 丙酮 (分散剂 2 mL) / 二氯甲烷 (萃取剂 200 μ L) 混合溶液, 振荡摇匀后以转速 8 000 r/min 离心 5 min, 然后将上层清液吸干至试管底部萃取剂沉积相, 用微量移液器准确移取 100 μ L 入自动进样瓶内胆进样分析。在优化的实验条件下, 8 种氨基甲酸酯农药的富集倍数可达 20.4 倍~24.3 倍; 检出限在 8.0~20.0 μ g/kg (S/N=3:1) 范围内。测定 8 种氨基甲酸酯农药残留的线性范围为 50.0~500.0 μ g/kg, 线性相关系数在 0.997 7~0.999 8 范围内。本方法已成功应用于番茄样品中 8 种氨基甲酸酯农药残留的测定, 平均加标回收率为 79.1%~98.6%, 相对标准偏差为 3.5%~8.5%。

关键词: 高效液相色谱; 分散液相微萃取; 氨基甲酸酯; 自动进样; 番茄

中图分类号: TS207.5 文献标志码: A

Dispersive Liquid-liquid Micro-extraction Method Coupled with HPLC for Determination of Eight Residual Carbamate Pesticides in Tomato Samples

Fan Wenjuan¹, Hao Jiayong², Luo Ruifeng², *Luo Xiaoling²

(1. College of Food Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China;

2. Supervision and Testing Center of Food Quality, Ministry of Agriculture, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: A novel method was developed for the determination of eight residual carbamate pesticides in tomato samples by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) coupled with HPLC-fluorescence detector. Some important parameters that affect the extraction efficiency of DLLME were studied. In this method, 5.00 mL tomato sample solution was placed in a 10 mL screw cap glass tube with conic bottom and 2.2 mL mixture of acetone (as disperser solvent) /dichloromethane (as extraction solvent) /was added quickly into it. The mixture was gently shaken for several seconds and a cloudy solution (water/acetone/dichloromethane) was formed in the tube. After centrifugation at 8 000 r/min for 5.0 min, the dichloromethane phase was sedimented at the bottom of the centrifuge tube, Then the supernatant liquid was transferred by micro-pipettor. 100 μ L of the sedimented phase was taken accurate by micro-pipettor and injected into the automatic sampling bottle. Under the optimum conditions, the enrichment factors ranged from 20.4 to 24.3. the linear range for the determination was 50~500 μ g/kg and the limits of detection were from 8.0 to 20.0 μ g/kg (S/N=3:1), with the correlation coefficients (r) varying from 0.997 7 to 0.999 8. The recoveries ranged from 79.1% to 98.6% with the relative standard deviations falling between 3.5% and 8.3%, tomato samples were successfully analyzed by the proposed method with satisfactory results.

Key words: HPLC; dispersive liquid-liquid microextraction; automatic sampling; eight residual carbamate pesticides; tomato

0 引言

氨基甲酸酯类农药具有高效、低残留、杀虫谱广、低毒、选择性高、持效期长等特点^[1], 主要应用于粮食、蔬菜和水果上。这类杀虫剂一旦进入人体

内, 可生成具有致癌作用的亚硝基化合物。随着人们对食品安全问题的关注, 对于果蔬中氨基甲酸酯类农药残留的监测十分重要^[2]。快速、灵敏、准确地同时检测多种农药残留, 是工作实践对检测技术提出的更高要求。

收稿日期: 2009-11-20

作者简介: 樊雯娟 (1983-), 女, 新疆人, 在读硕士, 研究方向: 农产品加工与储藏。E-mail: digulianzi1017@163.com。

* 为通讯作者: 罗小玲 (1962-), 女, 四川人, 高级工程师, 硕士, 研究方向: 食品安全与检测。

样品前处理是整个分析过程的关键一环,发展省时高效、有机溶剂用量少的样品前处理新技术一直是分析化学研究的一个热点^[3]。分散液相微萃取相当于微型化的液液萃取,是基于目标分析物在样品溶液和小体积的萃取剂之间平衡分配的过程,该方法操作简单、成本低、富集效率高、所需有机溶剂用量极少,仅使用几微升或十几微升的萃取剂,是一种环境友好的液相微萃取新技术。由于萃取溶剂用量极少,只能采用手动进样,无法形成自动连续进样。随着检测技术的迅猛发展,色谱工作站也更加智能化,手动进样显然不能满足大批量检测项目的要求。该实验基于分散液相微萃取的基本原理,通过改进方法,建立了番茄样品中涕灭威亚砷、涕灭威砷、灭多威、三羟基克百威、涕灭威、速灭威、克百威、甲萘威等的分散液相微萃取—高效液相色谱与荧光检测器联用技术测定方法,取得了满意的结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

色谱仪: Waters Alliance 2695, 配有自动进样器, 美国 Waters 公司产品; 荧光检测器: Waters 2475; 色谱柱: Carbamate Analysis (3.9×150 mm, 4 μm); 柱后衍生系统: Waters Reagent Manager, Waters Column Reaction Module; 组织捣碎匀浆机、漩涡混匀器、离心机等。

氯苯、溴苯、四氯化碳、二氯甲烷、三氯甲烷、1,2-二氯乙烷、四氯化碳、甲醇、丙酮、四氢呋喃、乙腈等有机溶剂, 均为色谱纯; 水为重蒸水。

涕灭威亚砷 (aldicarb sulfoxide)、灭多威 (methomyl)、涕灭威砷 (aldicarb sulfone)、3-羟基克百威 (3-hydroxycarbofuran)、涕灭威 (aldicarb)、速灭威 (metolcarb)、克百威 (carbofuran) 和甲萘威 (carbaryl) 标准品 (纯度≥99%); 番茄样品采于新疆生产建设兵团 133 团番茄示范基地。

1.2 色谱条件

1.2.1 柱温 42 °C, 荧光检测: λ_{ex}330 nm, λ_{em}465 nm。

梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 t/min	水 /%	甲醇 /%	流速 /mL·min ⁻¹
0.00	85	15	0.5
2.00	75	25	0.5
8.00	75	25	0.5
9.00	60	40	0.8
10.00	55	45	0.8
19.00	20	80	0.8
25.00	20	80	0.8
26.00	85	15	0.5

1.2.2 柱后衍生: OPA 衍生试剂、氢氧化钠溶液 (0.05 mol/L), 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后超声脱气, 流速均为 0.3 mL/min; 衍生池温度 90 °C; 进样体积 10.0 μL。以保留时间定性, 外标法定量。

1.3 样品前处理

将番茄样品在组织捣碎匀浆机中捣碎后称取 10.0 g 置于 20 mL 的带塞离心试管中, 定容至 20 mL。振荡摇匀后以转速 5 000 r/min 离心 10 min, 然后将上层清液转移至布氏漏斗中减压抽滤, 过 0.45 μm 微孔滤膜。得到的番茄样品溶液按 2.4 节中的实验方法进行萃取、测定。

1.4 分散液相微萃取的操作方法

移取 5.0 mL 番茄样品溶液装在 10 mL 带塞的尖底离心试管中, 快速注入 2.2 mL 丙酮 (分散剂 2 mL) —二氯甲烷 (萃取剂 200 μL) 混合溶液, 涡旋 1 min, 此时混合溶液形成水/丙酮/二氯甲烷的乳浊液体系, 二氯甲烷均匀地分散在水相中, 室温放置 2.0 min, 再以 8 000 r/min 离心 5 min, 萃取剂二氯甲烷沉积到试管底部, 移走上层清液, 用微量进样器吸取下层沉积相 100 μL 入自动进样瓶内胆等待进样。

1.5 标准曲线的绘制

准确称取 10.0 g 已经匀浆的番茄样品于 20 mL 的带塞离心试管中, 加入适量 10.0 mg/L 涕灭威亚砷、涕灭威砷、灭多威、三羟基克百威、涕灭威、速灭威、克百威、甲萘威的混合标准溶液, 其他按 2.3 节实验方法处理, 得到质量浓度分别为 50.0, 100.0, 250.0, 350.0, 500.0 μg/kg 的系列混合标准溶液。每个样品按 2.4 节的实验方法萃取, 用微量进样器吸取 100 μL 入自动进样瓶内胆等待进样。每个质量浓度平行测定 5 次。以保留时间定性, 以样品峰面积与标准溶液峰面积比较定量。

2 结果与讨论

本实验采用分散液相微萃取与高效液相色谱相结合测定番茄样品中涕灭威亚砷、涕灭威砷、灭多威、三羟基克百威、涕灭威、速灭威、克百威、甲萘威。参照文献^[4], 本方法的富集倍数和回收率的计算方法如下: 用甲醇作溶剂分别配制 8 种农药的质量浓度均为 0.05, 0.1, 0.5 mg/L 的混合标准溶液, 以保留时间定性, 以样品峰面积与标准溶液峰面积比较定量。富集倍数 EF 是以目标分析物在沉积相中的浓度 C_{sed} 与其在样品中的原始浓度 C_0 的比值来计算:

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0}$$

萃取回收率 ER 即沉积相中的分析物的萃取量占分析物总量的按下式计算:

$$ER = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{ap}} \times 100\%$$

式中： V_{sed} ——沉积到试管底部萃取剂的体积，mL；
 V_{ap} ——样品溶液的体积，mL；
 C_{sed} ——有机沉积相中分析物的浓度，mol/mL；
 C_0 ——水溶液中分析物的浓度，mol/mL。

为了达到最佳萃取效果，提高测定回收率，在待测物质量分数为 250.0 $\mu\text{g/kg}$ 的条件下对影响萃取效率的诸因素进行了优化。结果表明，在最优条件下，8 种农药的富集倍数可达 20.4~24.3 倍（表 2）。

2.1 萃取剂和萃取剂体积的选择

在分散液相微萃取中，萃取剂的选择是影响萃取效率的一个关键因素。所选萃取剂必须符合以下两个条件：一是密度大于水；二是不溶于水，且对被分析物的溶解能力大，以保证取得良好的萃取效率。本实验分别考察了四氯化碳（密度 1.59 g/mL）二氯乙烷（密度 1.26 g/mL）三氯甲烷（密度 1.47 g/mL）和二氯甲烷（1.323 g/mL）对 8 种农药的萃取能力，结果表明，使用二氯甲烷的萃取效率最好，故选择二氯甲烷作为萃取剂。萃取剂体积的选择直接影响本方法富集倍数的大小，考察了二氯甲烷体积（150.0, 200.0, 300.0, 400.0 μL ）对萃取效率的影响，随着二氯甲烷体积的增加，方法回收率变化不明显。但是，富集倍数却显著下降。其原因为二氯甲烷体积增加使离心得到的有机相体积也随之增加，致使有机相中待测物的质量分数降低，富集倍数减小，而且方法的灵敏度也随之降低。实验结果表明，当二氯甲烷体积为 200.0 μL 时，离心后得到的有机相的体积为 (130 ± 10) μL ，此时既可以保持较高富集倍数又能满足进样测定时所需的体积。所以氯苯体积选择 200.0 μL 。

2.2 分散剂和分散剂体积的选择

在本方法中分散剂的选择对“丙酮—二氯甲烷的乳浊液体系”的形成起着关键作用，要求所选分散剂不仅能与水互溶而且可以与萃取剂互溶。合适的分散剂可以使萃取剂在水相中分散成细小的液滴，使溶液形成良好的“水—丙酮—二氯甲烷的乳浊液体系”，增大萃取剂与待测物的接触面积。分别考察了丙酮、乙腈、甲醇和四氢呋喃作分散剂时的萃取效果。结果显示，使用丙酮时萃取效果最好，所以选用丙酮作为本实验的分散剂。

分散剂的体积直接影响“水—丙酮—二氯甲烷乳浊液体系”的形成，它会通过影响萃取剂在水中的分散程度来影响萃取效率。考察了丙酮体积（1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL）对萃取效率的影响。实验结果显示，萃取效率先随丙酮体积的增加而增加，在 2.0 mL 时达到最大值，而后又随丙酮体积的增加而减小。这是因为在丙酮体积小时，萃取剂不能均匀的分散在水相中，没有形成良好的水—丙酮—二氯甲烷乳浊液体系，致使二氯甲烷的萃取效率低；在丙酮体

积较大时，待测物在水中的溶解度加大不易被二氯甲烷萃取，萃取效率降低。所以选择分散剂丙酮体积为 2.0 mL。

2.3 萃取时间的选择

在本方法中，萃取时间是指在水相中注入了二氯甲烷后到混合液开始离心之前这段时间。分别考察了萃取时间为 3.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 min 时方法的萃取效率。实验结果显示，萃取时间对萃取效率没有显著地影响，因为在混合液形成乳浊液之后，二氯甲烷被均匀地分散在了水相中与待测物接触面积大，待测物可以快速的由水相转移到有机相并且很快的达到两相平衡。本实验选取萃取时间为 2.0 min。

2.4 NaCl 水溶液质量浓度的影响

通过在水相中加入 NaCl（0%~5%）的方法考察了 NaCl 水溶液质量分数对萃取效率的影响。随着 NaCl 质量浓度的增大，8 种农药的回收率变化很小，但是富集倍数显著下降。这是由于离子强度的增加使有机萃取剂在水相中的溶解度减小，最后得到的有机沉积物的体积增加所造成的。所以本实验不加盐。

2.5 样品溶液 pH 值的影响

通过在水相中加入磷酸二氢钠，调解待测溶液 pH 值分别为 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0。随着 pH 值的不断增加，到 pH 值为 7.0 时回收率成明显上升趋势，之后则开始下降。所以本实验确定样品溶液的 pH 值为 7.0 时为最佳条件。

2.6 方法的线性范围、检出限和重现性

在最优条件下，对系列质量分数标准溶液进行萃取。

8 种农药的线性方程及其相关系数和方法的检出限见表 2。

8 种农药在 50.0~500.0 $\mu\text{g/kg}$ 范围内均具有良好的线性关系。检出限为 8.0~20.0 $\mu\text{g/kg}$ ，可满足实际样品的测定。对 8 种农药含量均为 100, 250, 500 $\mu\text{g/kg}$ 的番茄样品平行萃取测定 5 次，测定结果的 RSD 为 3.5%~8.5%。

2.7 方法的回收率和样品测定

应用本方法分别测定了采于新疆生产建设兵团 133 团番茄示范基地 6 个不同地区的番茄样品，未检出有氨基甲酸酯农药残留。对没有农药残留的番茄样品采用标准加入法平行测定 5 次，计算回收率和相对标准偏差。

番茄样品中 8 种氨基甲酸酯农药的测定结果和加标回收率见表 3，番茄加标样品中 8 种农药的典型色谱图见图 1。

8 种农药的加标回收率为 79.1%~98.6%；相对标准偏差（RSD）小于 8.5%，本方法的回收率和重现性均令人满意。

表2 8种农药的线性方程及其相关系数和方法的检出限

农药	富集倍数	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	回归方程	相关系数 R	检出限 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
涕灭威亚砷	20.4	50~500	$Y=4.43\times 10^6+6.53\times 10^5$	0.999 2	20
涕灭威砷	20.8	50~500	$Y=5.39\times 10^6+1.60\times 10^5$	0.999 5	20
灭多威	23.6	50~500	$Y=4.45\times 10^6+2.68\times 10^5$	0.999 7	10
三羟基克百威	23.2	50~500	$Y=2.05\times 10^6+2.68\times 10^5$	0.997 7	10
涕灭威	24.3	50~500	$Y=2.50\times 10^6+2.66\times 10^5$	0.999 7	9
速灭威	23.3	50~500	$Y=2.64\times 10^6+4.87\times 10^4$	0.999 4	10
克百威	23.6	50~500	$Y=1.59\times 10^6+4.07\times 10^3$	0.999 7	10
甲萘威	22.6	50~500	$Y=3.70\times 10^6+6.48\times 10^4$	0.999 8	8

表3 番茄样品中8种氨基甲酸酯农药的测定结果和加标回收率

农药	加标量 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检出量 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率 /%	RSD ($n=5$) /%	农药	加标量 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检出量 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率 /%	RSD ($n=5$) /%
	0	ND				0	ND		
涕灭威亚砷	100	79.1	79.1	5.0	涕灭威	100	95.7	95.7	8.1
	250	209.4	83.8	3.5		250	246.1	98.4	7.0
	0	ND				0	ND		
涕灭威砷	100	81.8	81.8	5.2	速灭威	100	90.3	90.3	4.8
	250	211.8	84.7	5.4		250	239.4	95.8	5.8
	0	ND				0	ND		
灭多威	100	93.4	93.4	6.1	克百威	100	95.4	95.4	8.2
	250	237.9	95.2	7.3		250	246.6	98.6	7.0
	0	ND				0	ND		
三羟基克百威	100	93.9	91.9	6.7	甲萘威	100	89.3	89.3	5.9
	250	235.2	94.1	8.3		250	229.4	91.8	6.1

注:ND为未检出(no detected)。

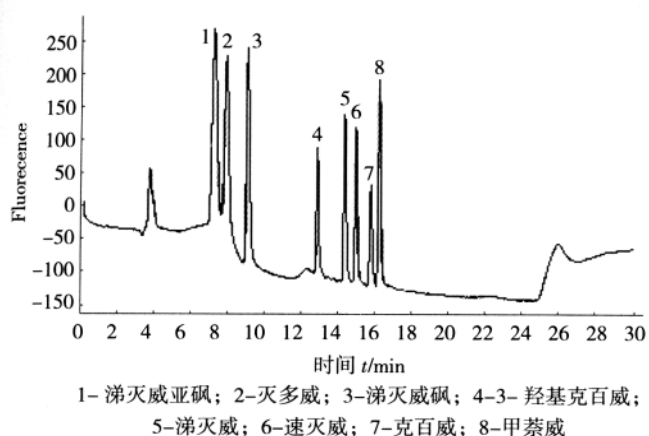


图1 番茄加标样品中8种农药的典型色谱图

4 结论

本实验建立了分散液相微萃取—高效液相色谱联用技术快速、灵敏地分析番茄样品中8种氨基甲酸酯农药残留的新方法。实验结果表明,与传统的萃取方法相比,本方法具有操作简单、快速、准确、低成本、环境友好和富集倍数高等优点。目前分散液—液

微萃取(DLLME)技术还主要用于简单基质成分和简单样品的测定,多使用手动进样。本实验的结果表明,该技术用于复杂基质的果蔬样品与自动进行系统的联用可极大地节省时间和精力,其测定结果也可取得满意的结果,这对于拓宽分散液相微萃取技术的应用范围具有指导意义。

参考文献:

- [1] 陈笑梅,胡贝真,刘海山,等. 高效液相色谱—串联质谱法测定粮谷中9种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 分析化学, 2007, 35(1): 106-110.
- [2] 李海飞,聂继云. HPLC快速分析水果中氨基甲酸酯类农药残留量[J]. 分析实验室, 2009, 28(5): 72-75.
- [3] 臧晓欢,王志. 分散液相微萃取—气相色谱联用测定葡萄中百菌清、克菌丹和灭菌丹残留[J]. 分析化学, 2009, 37(2): 161-168.
- [4] Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M, et al. Determination organic compounds in water using dispersize liquid -ligued microextraction [J]. Journal of Chromatogr A, 2006, 1116: 1-9.