

工作简报

在线柱后衍生-荧光检测-高效液相色谱法 测定果蔬中残留氨基甲酸酯农药

程盛华, 唐 斌, 郑 龙, 丁 丽*

(中国热带农业科学院 农产品加工研究所, 湛江 524001)

摘要: 提出了具有在线柱后衍生流路及荧光检测器的高效液相色谱法测定了果蔬中6种氨基甲酸酯类农药。果蔬样品经匀浆后用乙腈萃取, 经固相萃取柱纯化。用甲醇及二氯甲烷(1+99)混合溶剂作淋洗剂, 淋出液经氮吹蒸干后用甲醇溶解, 所得溶液供高效液相色谱分析。采用 Carbar mate Analysis 柱(3.9 mm × 150 mm, 5 μm)作为固定相, 并用不同比例配制的甲醇和水的溶液作为流动相进行梯度淋洗。在线柱后衍生化系在一反应器中进行, 0.05 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液及衍生化试剂邻苯二甲醛溶液均以 0.5 mL · min⁻¹ 速率引入于反应器中。采用 339 nm 及 445 nm 分别作为荧光检测的激发波长和发射波长, 测得6种农药的线性范围均在 0.01~2.5 mg · L⁻¹ 之间, 其检出限(3S/N)在 0.5~3.0 μg · kg⁻¹ 之间。用标准加入法测得方法的回收率在 86.4%~103.0% 之间。

关键词: 高效液相色谱法; 在线柱后衍生化; 残留氨基甲酸酯类农药; 水果; 蔬菜

中图分类号: O652.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2010)07-0816-04

HPLC Determination of Residual Carbamate Pesticides in Fruits and Vegetables with On-line Post-column Derivatization and Fluorescence Detection

CHENG Sheng hua, TANG Bin, ZHENG Long, DING Li*

(Research Institute of Agrotechny, China Tropical Agricultural Research Institute, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: Six residual carbamate pesticides in fruits and vegetables were determined by HPLC with on-line post-column derivatization and fluorescence detection. The sample was pounded, homogenized and extracted with acetonitrile, and purified by SPE column. The mixed solvent of methanol and dichloromethane(1+99) was used as eluant, and the eluates were collected and evaporated to dryness by N₂ blowing. The residue was taken up with methanol and used for HPLC analysis. The Carbamate Analysis column (3.9 mm × 150 mm, 5 μm) was used as stationary phase and mixtures of methanol and H₂O with various ratios were used as mobile phase in gradient elution. On-line post-column derivatization was carried out in the reactor into which 0.05 mol · L⁻¹ NaOH solution and derivatizing agent, OPA solution were introduced at a flow-rate of 0.5 mL · min⁻¹. Fluorescence detection was made at wavelengths of 339 nm (λ_{ex}) and 445 nm (λ_{em}). Ranges of linearity for the 6 pesticides were found between 0.01~2.5 mg · L⁻¹, with detection limits (3S/N) in the range of 0.5~3.0 μg · kg⁻¹. Results of recovery test obtained were in the range of 86.4%~103.0%.

Keywords: HPLC; On-line post-column derivatization; Residual carbamate pesticides; Fruits; Vegetable

果蔬的生长周期短, 病虫害较多, 农药在果蔬上

的用量大, 加上使用不合理, 极易造成农药残留。农药残留可导致人体慢性中毒, 如果长期积累势必对人类的健康构成极大的威胁, 因此果蔬中农药多残留的检测至关重要。氨基甲酸酯类农药是最常使用的农药。氨基甲酸酯类农药对人体的急性毒作用与

收稿日期: 2009-04-29

作者简介: 程盛华(1980-), 男, 江西九江人, 工程师, 研究方向为食品中农药、兽药残留的检测分析。

* 联系人



有机磷农药相似,抑制体内乙酰胆碱酯酶,使它失去分解乙酰胆碱的功能,造成组织内乙酰胆碱的蓄积而中毒^[1]。

各国政府和组织制定了相关法规,针对具体的果蔬限制了农药的最大残留限量(MRLs),并且其限量标准越来越低,因此需要高灵敏的分析技术。用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)做过氨基甲酸酯类农药的试验,发现部分农药的响应较低,检出限较高,不能满足痕量分析要求。农残监测的实时性要求分析方法快速、高效。气相色谱(GC)和气相色谱-质谱(GC-MS)是常用的农残分析技术,但是部分不挥发和半挥发性农药如氨基甲酸酯类很难用气相色谱法测定^[2],而且色谱图中杂质峰特别多。参照农业标准 NY 761-2008,本工作采用固相萃取(SPE)柱净化样品,建立了在线柱后衍生-荧光检测-高效液相色谱法测定果蔬中 6 种氨基甲酸酯残留量。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Alliance 2695 型高效液相色谱仪,配 2475 荧光检测器;Empower 化学工作站;CXJ-IIB 型低速大容量多管离心机;氮吹仪;氨基固相萃取柱。

氯化钠:140℃灼烧 4 h,贮于密封瓶中。

混合标准溶液:分别移取 100 mg·L⁻¹涕灭威、涕灭威砒、涕灭威亚砒、三羟基克百威、速灭威、仲丁威标准储备溶液 1.00 mL 于 25 mL 棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合标准溶液,质量浓度为 4.0 mg·L⁻¹,贮存于冰箱中,使用时用甲醇稀释,配成 0.100 mg·L⁻¹标准工作溶液。

邻苯二甲醛(OPA)溶液:称取 OPA 50 mg 溶解在 5 mL 甲醇中,缓慢旋转使其完全溶解后,转移至有 OPA 稀释溶液的 500 mL 棕色容量瓶中,称取巯基乙醇 100 mg 溶解在 5 mL 甲醇中,缓慢旋转使其完全溶解后,也转移至 500 mL 棕色容量瓶中,混匀,用 OPA 稀释液定容至 500 mL。然后将溶液置于密闭的棕色玻璃储液瓶中,用铝箔包裹避光保存。

试验用水为 Milli-Q 高纯水,所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器工作条件

Carbamate Analysis 色谱柱(3.9 mm × 150 mm, 5 μm);柱温 40℃,进样量为 20 μL;流动

相: A 为甲醇, B 为水;梯度洗脱:初始时, A 为 15%, B 为 85%,保持 7 min;9 min 时, A 为 65%, B 为 35%;13 min 时, A 为 75%, B 为 25%;15 min 时, A 为 15%, B 为 75%。平衡色谱柱 8 min,流动相流量为 1.0 mL·min⁻¹,激发波长 339 nm,发射波长 445 nm。

柱后衍生: 0.05 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液,流量 0.5 mL·min⁻¹;OPA 溶液流量 0.5 mL·min⁻¹。

反应器温度:水解温度为 100℃,衍生温度为室温。

1.3 试验方法

1.3.1 样品提取

称取蔬菜或水果样品 25.0 g 放入匀浆机中,加入乙腈 50.0 mL,在匀浆机中高速匀浆 2 min 后,用滤纸过滤,滤液收集到装有 5~7 g 氯化钠的 100 mL 具塞量筒中;收集滤液 40~50 mL,盖上塞子,剧烈振荡 1 min,在室温下静置 30 min;上层清液转移到 50 mL 离心管中,以 4 000 r·min⁻¹ 转速离心 10 min,使乙腈相和水相分层。

移取乙腈相溶液 10.00 mL 于 25 mL 烧杯中,将烧杯放在 60℃水浴锅上加热,杯内缓缓通入氮气,将乙腈蒸发近干,加入甲醇-二氯甲烷(1+99)混合溶剂 2.0 mL 溶解残渣,待净化。

1.3.2 样品净化

将氨基固相萃取柱用甲醇-二氯甲烷(1+99)混合溶剂 4.0 mL 预淋洗,当溶剂液面到达柱吸附层表面时,立即加入待净化溶液,用 15 mL 离心管收集洗脱液;用甲醇-二氯甲烷(1+99)混合溶剂 2.0 mL 洗烧杯后过柱,并重复两次,再用 6 mL 甲醇-二氯甲烷(1+99)混合溶剂过柱,收集洗脱液;将离心管置于氮吹仪上,水浴温度 50℃,氮吹蒸发近干,用甲醇定容至 2.0 mL,在混合器上混匀后,用 0.2 μm 有机滤膜过滤,按色谱条件进行分离,用柱后衍生剂和 OPA 溶液进行柱后衍生,于 339 nm 激发波长和 445 nm 发射波长下进行荧光测定。

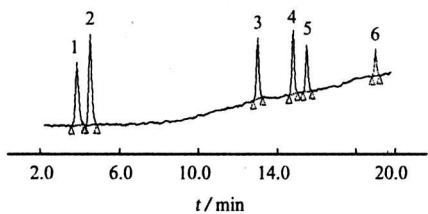
2 结果与讨论

2.1 色谱图

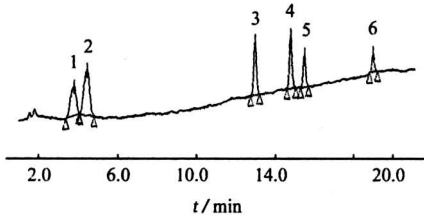
在色谱条件下,按试验方法对 6 种氨基甲酸酯混合标准溶液及样品溶液进行测定,氨基甲酸酯的色谱图见图 1。

2.2 提取溶剂的选择

试验比较了乙腈、甲醇、二氯甲烷等作为提取剂



(a) 6种氨基甲酸酯混合标准溶液



(b) 西葫芦中加入 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 农药标准溶液

1. 涕灭威亚砷 2. 涕灭威砷 3. 三羟基克百威
4. 涕灭威 5. 速灭威 6. 仲丁威

图1 氨基甲酸酯的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of carbamate pesticides

对目标物的提取效果,结果表明:用甲醇提取时需要同时加入丙酮和二氯甲烷进行萃取,操作复杂。参照标准 GB 14877- 1994 食品中氨基甲酸酯类农药残留量的测定方法,用二氯甲烷提取,但二氯甲烷提取时提取液中杂质较多且萃取时容易乳化;用乙腈提取时共萃取的杂质少,回收率高。试验选择乙腈作为提取剂。

2.3 固相萃取柱净化条件的选择

试验选用了佛罗里硅土、 C_{18} 、氨基固相萃取小柱进行空柱比较,6种氨基甲酸酯混合标准溶液经

过佛罗里硅土柱净化,回收率只有 70%,而经 C_{18} 和氨基固相萃取柱净化,回收率均接近 100%。在进行样品试验时,经 C_{18} 固相萃取柱净化,有部分干扰;只有经过氨基固相萃取柱净化,回收率高且没有干扰,氨基固相萃取柱能有效地吸附有机酸和糖分,试验选用氨基固相萃取柱对样品净化。

试验了二氯甲烷与甲醇以不同比例、不同用量作为洗脱剂时对农药洗脱的影响,结果表明:甲醇体积分数为 1%~ 9% 时,6 种氨基甲酸酯的回收率基本稳定,但随着甲醇量增加杂质峰也明显增多,选择甲醇用量为 1%。当洗脱剂用量为 10 mL 时,各农药的回收率接近 100%。试验选择体积比为 1 比 99 的甲醇与二氯甲烷的混合溶剂 10 mL 作为洗脱剂。

2.4 柱后衍生剂流量的选择

试验了柱后衍生剂流量对测定影响,结果表明:柱后衍生剂流量在 $0.3\sim 0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 范围内,随着流量增加,响应基线降低;流量为 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,6 种氨基甲酸酯峰形低而宽,灵敏度低;流量为 $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,灵敏度高,但有些峰分不开。试验选择柱后衍生剂流量为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.5 线性范围和检出限

在色谱条件下对 0.00, 0.05, 0.10, 0.20, $0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 混合标准工作溶液进行测定,6 种氨基甲酸酯的质量浓度在 $0.01\sim 2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内与峰面积呈线性关系,线性回归方程、相关系数和检出限($3S/N$)见表 1。

表 1 6 种氨基甲酸酯的线性关系和检出限

Tab. 1 Linear relationships and detection limits of the 6 pesticides

农药	线性范围 $\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	线性回归方程	相关系数	检出限 $w/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$
涕灭威	0.02~ 1.0	$y=286.4\rho-45.6$	0.999 1	0.9
涕灭威砷	0.01~ 0.5	$y=652.3\rho-32.4$	0.999 6	0.5
涕灭威亚砷	0.02~ 1.0	$y=532.8\rho-28.4$	0.999 7	0.7
三羟基克百威	0.02~ 1.0	$y=285.7\rho-12.3$	0.999 1	0.9
速灭威	0.05~ 2.5	$y=67.9\rho-11.3$	0.999 4	2.0
仲丁威	0.05~ 2.5	$y=103.3\rho-21.9$	0.999 6	3.0

2.6 方法的回收率与精密度

试验考察了西葫芦、黄瓜、甜豌豆、苹果、梨、芒果等 20 多种果蔬基质中 6 种氨基甲酸酯的加标回收率,以西葫芦和苹果样品为例,样品中添加 3 个浓

度水平的 6 种氨基甲酸酯的混合标准溶液,按试验方法对加标样品进行提取、净化和测定,回收率和精密度结果见表 2。测得方法的回收率在 86.4%~ 103.0% 之间。

表 2 6 种氨基甲酸酯在西葫芦和苹果中回收试验(n= 5)

Tab. 2 Test for recovery of the 6 pesticides added to sample matrixes of zucchini and apple

农药	标准加入量 $w/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$		回收量 $w/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$		回收率/ %		RSD/ %	
	西葫芦	苹果	西葫芦	苹果	西葫芦	苹果	西葫芦	苹果
涕灭威	5.0	5.0	4.56	4.765	91.2	95.3	2.6	2.0
	20.0	20.0	18.7	19.66	93.5	98.3	1.3	1.5
	40.0	40.0	40.1	36.84	101.0	92.1	1.0	0.8
涕灭威砒	5.0	5.0	5.13	5.105	102.6	102.1	2.5	2.4
	20.0	20.0	19.96	19.28	99.8	96.4	1.8	1.8
	40.0	40.0	38.68	36.84	96.7	92.1	2.0	1.3
涕灭威亚砒	5.0	5.0	4.965	4.55	99.3	91.0	1.6	3.4
	20.0	20.0	19.24	18.64	96.2	93.2	2.8	2.1
	40.0	40.0	36.52	37.04	91.3	92.6	3.0	1.2
三羟基克百威	5.0	5.0	4.825	4.565	96.5	91.3	1.6	2.8
	20.0	20.0	19.66	18.56	98.3	92.8	0.6	2.3
	40.0	40.0	41.2	39.0	103.0	97.5	0.7	1.5
速灭威	5.0	5.0	4.675	4.32	93.5	86.4	1.2	1.2
	20.0	20.0	18.16	17.84	90.8	89.2	2.6	0.7
	40.0	40.0	35.32	35.48	88.3	88.7	3.0	1.8
仲丁威	5.0	5.0	4.915	4.515	98.3	90.3	3.9	2.1
	20.0	20.0	19.36	18.64	96.8	93.2	2.4	1.5
	40.0	40.0	38.12	38.96	95.3	97.4	3.0	0.8

参考文献:

[1] 宋学省. 高效液相色谱法测定蔬菜中的氨基甲酸酯 [J]. 吉林蔬菜, 2005, 3: 50-52.

[2] 刘敏, 端裕树, 宋苑苑, 等. 分散固相萃取-液相色谱-质谱检测蔬菜水果中氨基甲酸酯和有机磷农药 [J]. 分析化学, 2006, 7(7): 941-942.

(上接第 815 页)

[4] 陈伟东, 陈国雄, 老倩群, 等. 程序升温毛细管气质联用法快速测定食品中 12 种有机氯农药 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(5): 807-809.

[5] 朱雪梅, 崔艳红, 郭丽青, 等. 用加速溶剂提取仪提取污染土壤中的有机氯农药 [J]. 环境科学, 2002, 23(5): 113-116.

[6] 刘现明, 徐学仁, 张笑天, 等. 大连湾沉积物中的有机氯农药和多氯联苯 [J]. 海洋环境科学, 2001, 20(4): 40-44.

[7] 胡贝贞, 宋伟华, 谢丽萍, 等. 加速溶剂萃取/ 凝胶渗透色谱-固相萃取净化/ 气相色谱-质谱法测定茶叶中残留的 33 种农药 [J]. 色谱, 2008, 26(1): 22-28.

[8] SANDRA R R, MARIO S G, VALDECIR F X, et al. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soil and water samples in the Northeastern part of São Paulo State, Brazil [J]. Chemosphere, 2006, 65: 1949-1958.

[9] WANG Xue jun, PIAO Xiu ying, CHEN Jing, et al.

Organochlorine pesticides in soil profiles from Tianjin, China [J]. Chemosphere, 2006, 64: 1514-152.

[10] TAO S, GUO L Q, WANG X J, et al. Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents [J]. The Science of the Total Environment, 2004, 320: 1-9.

[11] MORENO D V, FERRERA Z S, RODRIGUES J J S. Microwave assisted micellar extraction coupled with solid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in soil samples [J]. Anal Chim Acta, 2006, 571: 51-57.

[12] WANG Wei tao, MENG Bing jun, LU Xiao xia, et al. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques [J]. Anal Chim Acta, 2007, 602: 211-222.