

实验技术与方法

加速溶剂萃取 - GPC 液相色谱柱后衍生化测定动物源性
食品中多种氨基甲酸酯类农药残留量

吴 刚^{1,2} 王华雄¹ 俞春燕¹ 鲍晓霞¹ 叶庆富² 吴慧明³

(1. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江大学原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310029; 3. 浙江大学农药与环境毒理研究所, 浙江 杭州 310029)

摘 要:目的 建立动物源食品中 12 种氨基甲酸酯类农药的快速分析方法。方法 以乙腈作为提取溶剂, 对试样采用加速溶剂萃取, 自动凝胶渗透色谱仪净化预处理, N- 丙基乙二胺 (PSA) 填料再净化, 液相色谱柱后衍生化分离, 荧光检测器测定, 激发波长为 330 nm, 发射波长为 465 nm, 外标法定量。结果 12 种氨基甲酸酯类农药在样品中的最低检出浓度 ($S/N = 3$) 在 0.24 $\mu\text{g/kg}$ (异丙威) ~ 1.02 $\mu\text{g/kg}$ (涕灭威亚砷) 之间, 当试样中氨基甲酸酯类农药添加浓度分别为 0.05、0.1 和 0.2 mg/kg 时, 方法回收率在 62.1% $\pm$ 8.8% ~ 104.0% $\pm$ 5.6% 之间, RSD 均小于 20%。结论 方法的最低检测限和加标回收率均符合农药残留分析的要求。

关键词:氨基甲酸酯类; 食品; 色谱法, 凝胶; 色谱法, 液相

Determination of Carbamate Pesticides in Animal-Derived Foods with
Accelerated Solvent Extraction and Gel Permeation Chromatography by
High Performance Liquid Chromatography Post-Column Derivation

WU Gang, WANG Hua-xiong, YU Chun-yan, BAO Xiao-xia, YE Qing-fu, WU Hui-ming

(Zhejiang Province Institute of Inspection & Quarantine Science and Technology, Zhejiang Hangzhou 310012, China)

Abstract: **Objective** To determine the multi-residues of 12 kinds of carbamate pesticides in animal-derived foods. **Method** The samples were extracted with acetonitrile by accelerated solvent extraction (ASE) and cleaned up by auto gel permeation chromatography (GPC) and primary secondary amine (PSA) packing material. The collected solution was analyzed by high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-FLD) with post-column derivation and quantified by external standard method. The wavelengths of excitation and emission were set at 330 nm and 465 nm, respectively. **Results** The limits of detection ($S/N = 3$) of 12 kinds of carbamate pesticides ranged from 0.24 $\mu\text{g/kg}$ (isoprocarb) to 1.02 $\mu\text{g/kg}$ (aldicarb sulfoxide). The recoveries ranged from 62.1% $\pm$ 8.8% to 104.0% $\pm$ 5.6% by fortified with 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg and 0.2 mg/kg of 12 kinds of carbamate pesticides into the blank treated samples. The RSD was less than 20%. **Conclusion** The limits of detection and the recoveries of 12 kinds of carbamate pesticides both meet the analysis requirements of pesticide residues.

Key word: Carbamates; Food; Chromatography, Gel; Chromatography, Liquid

氨基甲酸酯类农药是目前农业生产上控制病虫害的主要农药之一, 被广泛用于育种、土壤和作物病虫害防治。一般认为氨基甲酸酯类化合物易受环境中的化学(水解)、物理(光、温度)和生物(微生物降解)等因素影响而降解, 稳定性较低^[1,2]。但是, 其作为乙酰胆碱酯酶抑制剂被认为对环境和脊椎动物健康存在着潜在毒性风险^[3,4], 并且已有关于氨基甲酸酯类化合物慢性中毒的报道。目前, 关于食品中氨基甲酸酯类农药残留的分析方法大多见于水、土壤、蔬菜、水果、大米等样品^[5-10], 而动物源性食品中氨

基甲酸酯类农药多残留组分分析方法则较为少见^[11,12]。本文建立了同时测定动物源性食品中 12 种常用氨基甲酸酯类农药(含部分代谢物)多组分残留分析方法, 具有简便、快速、覆盖面广等优点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 液相色谱仪 Agilent 1100, 带 FLD 检测器和自动进样器, 美国 Agilent 公司; PCX5200 柱后衍生化仪, 美国 Pickering 公司; 加速溶剂萃取仪 ASE200, 带 22 ml 萃取池, 美国 Dionex 公司; 凝胶色谱仪 GPC 1122, 德国 LC Tech 公司; pH 计、205 型旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; 氮吹仪等。

基金项目: 浙江省重点科技攻关项目资助(2005C23068)

作者简介: 吴刚 男 工程师 博士研究生

1.1.2 试剂 乙腈、丙酮、环己烷、乙酸乙酯均为 HPLC 级。聚苯乙烯凝胶(Bio-Beads S-X3, 200~400 目), 美国 Bio-Rad 公司; 乙酸乙酯+环己烷(1+1, 体积比), 浸泡 24 h; 无水硫酸钠(分析纯), 650℃ 灼烧 3 h, 冷却待用; 氢氧化钠(分析纯); N-丙基乙二胺填料(PSA), 美国 Supelco 公司; Extrelut 20, 德国 Merck 公司; 邻苯二甲醛(OPA), 美国 Sigma 公司; 巯基乙胺(Thioflur), 美国 Sigma 公司。12 种氨基甲酸酯类农药标准样品: 涕灭威亚砷、涕灭威砷、灭多威、3-羟基咪喃丹、涕灭威、速灭威、硫双灭多威、残杀威、克百威、甲萘威、异丙威、仲丁威, (纯度 ≥ 97.0%) 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

衍生化试剂的配制 (A) OPA 荧光衍生试剂: 称取 19.1 g 四硼酸钠, 溶于 1 000 ml 超纯水中备用。称取 50 mg 邻苯二甲醛, 用 5 ml 甲醇溶解备用; 称取 1.0 g 巯基乙胺, 用 5 ml 甲醇溶解备用。分别将它们转移至 500 ml 容量瓶中, 用四硼酸钠溶液稀释至刻度, 混匀后用 0.45 μm 滤膜过滤, 超声脱气, 避光保存。(B) 氢氧化钠溶液: 称取 1.0 g 氢氧化钠溶于 500 ml 超纯水中, 使其浓度为 0.05 mol/L, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 使用前超声脱气。

1.2 方法

1.2.1 试样制备 取一定量的动物肌肉样品(本试验以猪肉、牛肉、鸡肉及鱼肉作为供试样本) 绞碎后初步混匀, 四分法取样, 所取试样均等分为 2 份, 1 份供测定, 另 1 份置于 -20℃ 冰柜中保存备用。

1.2.2 提取 称取绞碎的试样 10.0 g 于研钵中, 加入适量硅藻土 Extrelut 20 拌匀后, 装入加速溶剂萃取池, 置于加速溶剂萃取仪的试样管卡口处, 按设定的提取程序运行: 温度 80℃, 压强 2 000 psi, 预热 2 min, 加热 5 min, 用乙腈静态萃取 5 min, 60% 溶剂快速冲洗试样, 60 s 氮气吹扫收集全部提取液, 静态萃取运行 2 个周期。提取完成后, 将提取液过无水硫酸钠层, 收集于平底烧瓶中, 35℃ 水浴中减压浓缩近干, 然后用氮气吹干。准确加入 2 ml 乙酸乙酯+环己烷(1+1, 体积比) 溶解残留物, 待净化。

1.2.3 净化 称取 Bio-Beads S-X3 填料 15 g, 乙酸乙酯+环己烷(1+1, 体积比) 浸泡 24 h 后, 装入凝胶色谱柱中, 柱径 10 mm, 柱长 40 cm。吸取上述制备好的待净化试样进样(1.0 ml 定量阀定量), 乙酸乙酯+环己烷(1+1, 体积比) 作为淋洗液, 以 1.0 ml/min 的流速进行淋洗。根据淋洗溶剂的流速和农药流出时间的关系, 弃去前 15 min 的淋洗液 15 ml, 收集 15~57 min 的淋洗液共 42 ml, 并于 35℃ 水浴中减压浓缩近干, 用氮气吹干后, 加入适量 PSA, 用 5 ml 乙腈充分涡旋溶解残渣, 用氮气吹干, 乙腈定容

至 200 μl。

1.2.4 色谱条件 色谱柱: Symmetry-C₁₈, 5 μm, 4.6 mm(i.d.) × 25 cm; 柱温为 42℃; 衍生化反应温度为 100℃; 碱液(氢氧化钠溶液) 流速为 0.3 ml/min; OPA 试剂反应温度为室温, 流速为 0.3 ml/min; 荧光检测器的激发波长为 330 nm, 发射波长为 465 nm; 流动相为乙腈与水的梯度洗脱(见表 1); 进样量 20 μl。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间(min)	水(%)	乙腈(%)	流速(ml/min)
0	90	10	0.8
2	90	10	0.8
10	65	35	0.8
25	65	35	0.8
30	40	60	0.8
40	10	90	0.8
44	90	10	0.8

2 结果

2.1 方法检测限与色谱分离

按上述色谱条件, 鱼肉空白试样、鱼肉添加试样与 12 种氨基甲酸酯类农药的液相色谱图见图 1、图 2 和图 3。除了残杀威和克百威的分离欠佳外, 其他农药均能较好地分离, 试用 C₆ 和 C₁₈ 的不同液相色谱柱和不同的色谱条件, 亦不能将两者完全分离, 参考文献 5~13 的图谱也不能将两者完全分开, 这可能与它们的化学性质有关。12 种氨基甲酸酯类农药的方法学参数见表 2, 以 3 倍信噪比(S/N=3) 确定最低检出浓度(LOD), 其中涕灭威亚砷的 LOD 最大, 为 1.02 μg/kg, 异丙威的 LOD 最小, 为 0.24 μg/kg; 以 S/N=10 确定最低定量限(LOQ), 则涕灭威亚砷的 LOQ 最大, 为 3.3 μg/kg, 异丙威的 LOQ 最小, 为 0.72 μg/kg。

2.2 方法的检测线性

本试验采用外标定量的检测方法, 将 12 种氨基甲酸酯类混合标准溶液的母液稀释成一系列不同浓度的标准溶液(0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 μg/ml), 在上述色谱条件下, 氨基甲酸酯类农药的进样浓度与 HPLC-FLD 的响应线性关系见表 2, 表明 12 种氨基甲酸酯类农药的线性相关均较好。

2.3 方法添加回收率与方法的精密度研究

分别在新鲜鱼肉的空白试样中加入 12 种氨基甲酸酯类农药的混合标准溶液(设 0.05、0.1 和 0.2 mg/kg 3 个浓度梯度), 每个浓度设置 6 个重复, 按上述前处理和分析方法, 测定氨基甲酸酯类农药在鱼肉试样中的添加回收率, 结果见表 3, 6 次平行检测结果的相对标准偏差最小为 0.9%, 最大为 17.6%, 同一试样的重现性较好。不同添加水平的回收率有一定的差异, 低浓度的添加回收率较低, 但随着添加

表 2 12 种氨基甲酸酯类农药方法学检测参数

序号	农药名称	保留时间 (min)	最低检出浓度 (μg/kg)	线性回归方程	相关系数 <i>r</i>
1	涕灭威亚砷 (aldicarb sulfoxide)	7.579	1.02	$y = 479.05x + 5.66$	0.9999
2	涕灭威砷 (aldoxycarb)	9.958	0.70	$y = 698.31x - 51.22$	0.9998
3	灭多威 (methomyl)	10.912	0.40	$y = 825.22x + 2.22$	0.9999
4	3- 羟基咪喃丹 (3 - hydroxycarbofuran)	13.634	0.50	$y = 683.69x + 11.43$	0.9999
5	涕灭威 (aldicarb)	17.748	0.74	$y = 438.07x + 96.63$	0.9911
6	速灭威 (metolcarb)	19.908	0.30	$y = 1002.92x - 34.88$	0.9997
7	硫双灭多威 (thiodicarb)	21.786	0.62	$y = 524.81x + 29.39$	0.9988
8	残杀威 (propoxur)	23.171	0.44	$y = 869.70x + 3.71$	0.9999
9	克百威 (carbofuran)	23.697	0.52	$y = 622.65x + 8.03$	0.9999
10	甲萘威 (carbaryl)	26.137	0.34	$y = 1135.15x + 10.83$	0.9999
11	异丙威 (isoprocarb)	31.888	0.24	$y = 3348.42x + 180.68$	0.9990
12	仲丁威 (fenobcarb)	34.902	0.52	$y = 1391.80x + 48.73$	0.9996

表 3 添加回收率试验结果 (*n* = 6)

序号	农药名称	添加 0.05 mg/kg		添加 0.1 mg/kg		添加 0.2 mg/kg	
		回收率 ($\bar{x} \pm s$) (%)	RSD (%)	回收率 ($\bar{x} \pm s$) (%)	RSD (%)	回收率 ($\bar{x} \pm s$) (%)	RSD (%)
1	涕灭威亚砷 (aldicarb sulfoxide)	65.4 ±5.2	7.9	74.5 ±9.0	12.1	80.7 ±6.7	8.2
2	涕灭威砷 (aldoxycarb)	64.5 ±6.6	10.2	71.1 ±9.3	13.1	100.0 ±3.8	3.8
3	灭多威 (methomyl)	68.5 ±8.9	13.0	74.7 ±13.2	17.6	80.8 ±4.7	5.9
4	3- 羟基咪喃丹 (3 - hydroxycarbofuran)	81.0 ±11.1	13.7	87.7 ±12.3	14.0	97.2 ±10.0	10.3
5	涕灭威 (aldicarb)	65.5 ±3.1	4.8	72.1 ±8.6	11.9	104.0 ±5.6	5.4
6	速灭威 (metolcarb)	73.0 ±5.0	6.9	70.3 ±0.6	0.9	99.3 ±7.5	7.6
7	硫双灭多威 (thiodicarb)	62.1 ±8.8	14.2	73.1 ±10.3	14.1	103.8 ±8.1	7.8
8	残杀威 (propoxur)	64.9 ±8.5	13.1	77.6 ±12.3	15.8	98.5 ±10.2	10.3
9	克百威 (carbofuran)	74.0 ±9.3	12.6	94.5 ±3.1	3.2	92.0 ±10.0	10.9
10	甲萘威 (carbaryl)	74.7 ±10.6	14.2	74.7 ±10.6	14.2	97.0 ±5.1	5.2
11	异丙威 (isoprocarb)	76.7 ±6.0	7.8	76.5 ±3.3	4.3	99.0 ±7.9	7.9
12	仲丁威 (fenobcarb)	71.4 ±7.7	10.8	96.2 ±6.2	6.4	97.5 ±8.4	8.6

浓度水平的增高,回收率有上升的趋势,可能 ASE 方法的温度、压强对农药的回收率有一定影响。

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 参考动物源性食品中氨基甲酸酯类农药多组分残留量测定的国家标准方法 GB/T 5009.163—2003 和德国 DFG- S19 农药多残留分析方法^[13],选择提取溶剂。氨基甲酸酯类农药极性较大,丙酮和乙腈都具有极性大、穿透力强的特点,特别是对极性大的农药的提取效果比较好,但是动物源样品一般含脂肪量都比较大,丙酮容易将大量脂肪提取出来,不利于提取液的浓缩和净化,而采用乙腈做提取剂,提取液中脂肪的量要少得多,因此本方法选用乙腈作为提取溶剂。

3.2 净化材料的选择 本方法使用了自动高压凝胶渗透色谱仪,通过对仪器条件的设置改进,实现了加压和收集特定馏分的目的,同时也缩短了试样净化时间。采用 Bio-Beads S - X3 填料对试样进行净化,用乙酸乙酯 + 环己烷 (1 + 1, 体积比) 对色谱柱进行淋洗。动物源样品中含有大量的脂肪、蛋白质和有机酸类物质,如果试样的前处理不好,会对 GPC

净化柱产生不良影响,导致柱压过高,同时会对色谱柱造成污染,使色谱柱的分离效果明显下降,缩短色谱柱的使用寿命,并干扰色谱测定。在凝胶渗透色谱中大分子物质将首先被洗脱出来,如油脂、类脂化合物、聚合物、蛋白质、色素及类固醇等,而小分子物质 (如农药等) 则扩散进入凝胶孔内,较晚流出色谱柱。凝胶渗透色谱的条件温和,对农药的性质没有特殊要求,再加上在一个固定的淋洗系统中,凝胶可以被反复使用,所以利用 Bio-Beads S - X3 填料净化样本中的残留农药,技术成熟,廉价,而且净化效果和回收效果良好^[8,14]。

PSA 填料是与氨基柱填料相似的吸附剂,它的两个氨基 pKa 值分别为 10.1 和 10.9,有比氨基柱填料更强的离子交换能力,同时 PSA 可与金属离子产生螯合作用,用于去除金属离子,广泛用于农残分析试样的处理,去除有机酸、色素和金属离子的干扰。经过 GPC 净化后的动物源样品可能含有少量有机酸等杂质,再加入 PSA 填料对试样进一步进行基质固相分散净化,达到良好的净化分离效果,可以保证试样中的残留农药与其他杂质得到很好的分离,克服了杂质干扰,减少了对色谱柱的损耗。

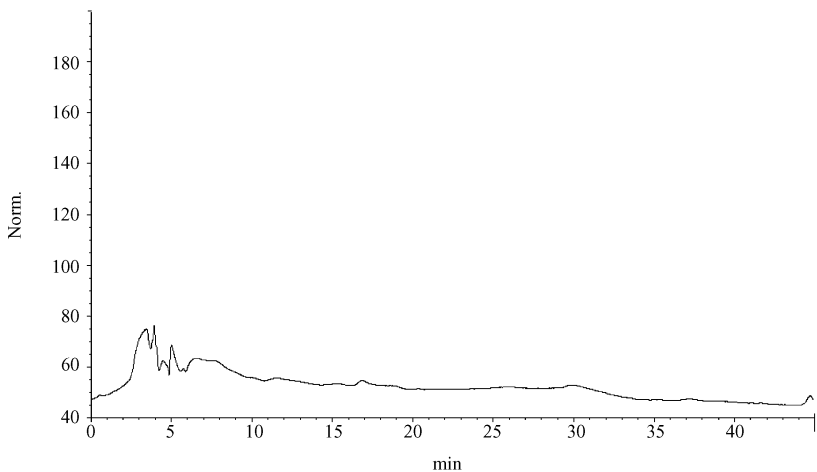


图 1 鱼肉空白样品液相色谱图

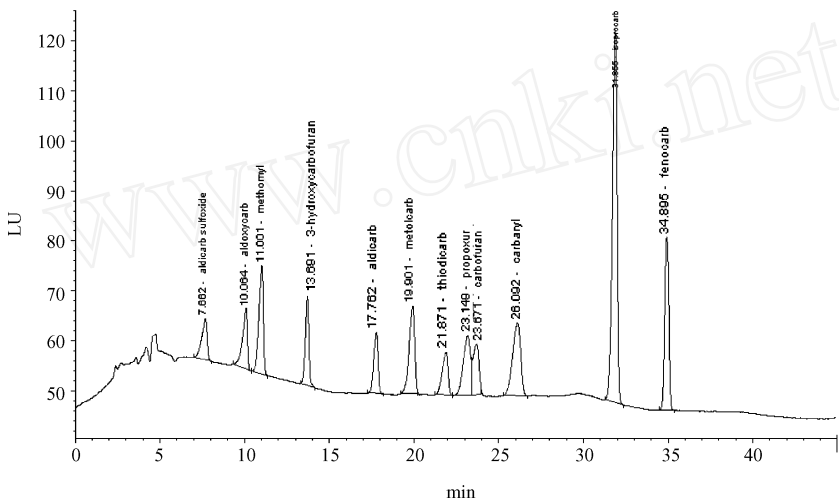


图 2 鱼肉空白样品添加 12 种氨基甲酸酯类农药液相色谱图(添加 0.05 mg/kg)

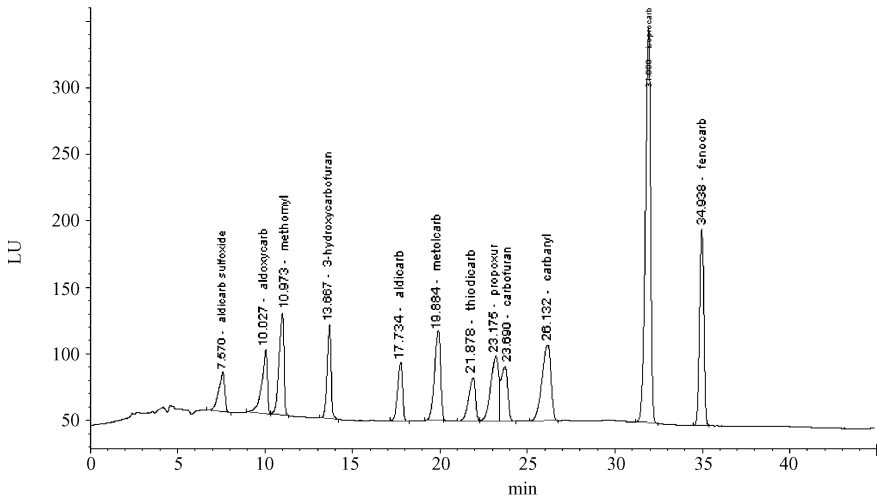


图 3 12 种氨基甲酸酯类农药标准液相色谱图(5 μ g/ml)

参考文献

- [1] 张劲强,董元华,安琼,等.不同种植方式下土壤和蔬菜中氨基甲酸酯类农药残留状况研究[J].土壤学报,2006,43(5):772-778.
- [2] MEHMET T, RENCUZOGULLAR E. Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with Marshal and its effective ingredient Carbosulfan [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology, 1993,319(2):103-111.
- [3] GIRI S, GIRI A, SHARMA G D, et al. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,2002,519(1/2):75-82.

实验技术与方法

气相色谱法快速测定蔬菜水果中痕量拟除虫菊酯

吕 芬 梁春穗 黄伟雄 陈 明
(广东省疾病预防控制中心,广东 广州 510300)

摘 要:目的 建立一种快速、准确测定蔬菜水果中拟除虫菊酯残留量的气相色谱法,并应用于广东省食品化学污染物网络监测工作中。方法 用石油醚提取,浓缩后经 Florisil 固相萃取柱净化,用气相色谱-电子捕获检测器测定,色谱柱为 DB-1 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)。结果 小白菜中的平均回收率为 86.2%~93.4%,相对标准差为 3.4%~8.6%;苹果中的回收率为 87.3%~92.8%,相对标准差为 2.8%~8.1%。检测了 511 份蔬菜水果样品中 5 种拟除虫菊酯的残留量,检出率为 17.4%,超标率为 0.59%。结论 与 GB/T 5009.146—2003 比较,方法快速、准确、分析成本低,能满足拟除虫菊酯类农药痕量残留快速分析的要求。
关键词:除虫菊酯类;蔬菜;水果;色谱法;气相

Rapid Determination of Pyrethroid Pesticide Residues in Vegetables and Fruits by Gas Chromatography

L Ü Fen , L IANG Chun-sui , HUANG Wei-xiong , CHEN Ming
(Guangdong Province Center for Disease Control and Prevention , Guangdong Guangzhou 510300 , China)

Abstract : Objective To establish a rapid method for determination of pyrethroid pesticide residues in vegetables and fruits , and to monitor chemical pollution in foods in Guangdong province. **Method** The pesticide residues of samples were extracted with petroleum ether , concentrated and cleaned up by Florisil solid phase extraction column , and then determined by gas chromatography with electron detector. The column was DB-1 capillary column (30 m×0.25 mm×0.25 μm). **Results** When

[4] 齐红莉,张树林,戴伟. 农药对水产动物毒理的研究现状[J]. 水利渔业,2005,25(1):73-75.

[5] MOYE H A, SCHERER S J, ST JOHN P A. Dynamic fluorogenic labeling of pesticides for high performance liquid chromatography: Detection of N-methylcarbamates with O-phthalaldehyde [J]. Analytical Letters,1977,10:1049-1073.

[6] KRAUSE R T. Liquid chromatographic determination of N-methylearbamate insecticides and metabolites in crops [J]. J AOAC Int, 1985,68(4):726-733.

[7] KRAUSE R T. High-performance liquid chromatographic determination of aryl N-methylcarbamate residues using post-column hydrolysis electrochemical detection [J]. J Chromatogr,1988,442:333-343.

[8] HIEMSTRA DE K. Optimization, automation, and validation of the solid-phase extraction clean up and on-line liquid chromatographic determination of N-methylcarbamate pesticides in fruits and vegetables [J]. J AOAC Int, 1992,75(6):1063-1072.

[9] 蒋新明,蔡道基,华晓梅. 高效液相色谱柱后衍生法用于氨基甲酸酯类农药的测定[J]. 色谱,1994,12(1):32-34.

[10] 于文莲,王超,储晓刚. 高效液相色谱柱后衍生法测定谷物中9种氨基甲酸酯类农药及3种代谢物残留量[J]. 色谱,1998,15(5):430-432.

[11] ALI M S. Determination of N-methylearbamate pesticides in liver by liquid chromatography[J]. J AOAC Int,1989,72(4):586-592.

[12] ALI M S, WHITE J D, BAKOWSKI R S, et al. Extension of a liquid chromatographic method for N-methylearbamate pesticides in cattle, wine, and poultry liver[J]. J AOAC Int, 1993,76(4):907-910.

[13] STAN H J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation [J]. Journal of Chromatography A,2000,892:347-377.

[14] 任一平,张晶,铁晓威,等. 叶菜中有机磷类农药多组分残留的快速分析[J]. 中国食品卫生杂志,2006,18(2):127-134.

[收稿日期:2008-05-18]

中图分类号:R15;O657.72;S482.43 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2008)05-0409-05

基金项目:广东省食品污染物网络监测及动态研究(2006B21001016)

作者简介:吕芬 女 技师