

实验技术与方法

正交试验法优选黄瓜中拟除虫菊酯类农残检测的净化剂组合

黄诚<sup>1</sup>, 郭梅<sup>2</sup>

(1. 中山市疾病预防控制中心, 广东 中山 528403; 2. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080)

**摘要:**目的 优选 QuEChERS 方法中黄瓜拟除虫菊酯类农药残留净化剂的最佳组合。方法 采用正交实验法, 以农药加标回收率(气相色谱法)为指标, 考察净化剂 PSA(N-丙基乙二胺)、C18(C18 烷基-硅胶)、GCB(石墨化炭黑)三因素的影响。结果 重复试验表明, 10 g 黄瓜 2 ml 定容液净化剂的最佳组合是 A2B1C2, 即 0.075 g PSA, 0.025 g C18, 0.050 g GCB。结论 正交试验法用于优选蔬菜中农药残留检测的 QuEChERS 净化剂组合, 既可节省试剂, 又能满足检测需要。

**关键词:** QuEChERS; 拟除虫菊酯; 正交试验; 黄瓜; 农药残留; 食品安全

**中图分类号:** S642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2012)05-0438-03

Optimizing cleanup of pyrethroid pesticide residues in cucumber by orthogonal design-repeat experiment method

Huang Cheng, Guo Mei

(Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhongshan 528403, China)

**Abstract: Objective** To optimize cleanup of pyrethroid pesticide residues in cucumber for QuEChERS. **Methods** The study was carried out through orthogonal experimental design, using GC recovery as the guide. Three factors of PSA (A), C18 (B) and GCB (C) were studied. **Results** The optimized conditions for cleanup were A2B1C2, namely 0.075g PSA, 0.025g C18 and 0.050g GCB for 10 g cucumber. **Conclusion** Orthogonal test for the best conditions of cleanup by QuEChERS can not only cut down expenses but also meet the requirement of the pesticide residues detection.

**Key words:** QuEChERS; pyrethroids; orthogonal experiment; cucumber; pesticide residues; food safety

拟除虫菊酯是一类能防治多种害虫的广谱杀虫剂,对昆虫具有强烈的触杀作用,因其高效低毒,在茶叶、蔬菜、水果种植中得到广泛应用<sup>[1-2]</sup>。QuEChERS 法是 2003 年由美国农业部农业研究服务中心的 Anastassiades 等<sup>[3-4]</sup>在固相萃取和基质固相分散技术上建立起来的一种新的样品预处理方法,为 Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe 首字母的缩写,意为快速、简单、经济、有效、稳定、安全。在 QuEChERS 分散固相萃取前处理技术问世后,其在蔬菜、水果、谷物等多种农产品中得到广泛的应用。在其净化步骤中,主要运用 PSA, C18, GCB 等 3 种净化剂处理,本文将考察 3 种常用净化剂的不同组合,以加标回收率为指标,对 QuEChERS 方法中净化这一重要步骤进行正交优化试验。为提高统计分析精确性和可靠性,故做了重复设计试

验,以确定各因素的显著性水平,得出黄瓜最佳净化剂组合的相关参数。

1 材料与方法

1.1 仪器

岛津 GC-2010 气相色谱仪,具电子捕获检测器(ECD)和 AOC-20i 自动进样器;GC Solution 软件;SPSS 统计软件;氮吹仪;离心机;涡旋振荡器;电子天平。

1.2 试剂和标准

正己烷(色谱纯);乙腈、乙酸乙酯、环己烷、冰醋酸(分析纯);无水硫酸镁(分析纯);GCB(石墨化炭黑)、PSA(N-丙基乙二胺填料)、C18(C18 烷基-硅胶),Agela Technologies Inc. 公司。

标准溶液:联苯菊酯、甲氰菊酯、氯菊酯、功夫菊酯(三氟氯氰菊酯)、氯氰菊酯、氰戊菊酯、溴氰菊酯,购自农业部环境保护科研监测所,浓度均为 100 μg/ml。

1.3 混合标准溶液的配制

将上述标准溶液用正己烷稀释并配制成约 10 μg/ml 的混合标准中间液,临用时再用正己烷稀释到需要浓度。

收稿日期:2012-03-01

基金项目:中山市科技计划项目 QuEChERS 方法在蔬菜水果农药残留检测中的应用研究(20113A091)

作者简介:黄诚 男 硕士 副主任技师 研究方向为理化检验  
E-mail: zsedchc@163.com

### 1.4 仪器条件

色谱柱: HP-5 毛细管柱, 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm; 温度: 进样口 250 °C, 检测器 280 °C, 电流 1.0 nA; 炉温程序升温: 150 °C 保持 1 min, 以 5 °C/min 升温至 230 °C, 保持 21 min, 再以 2 °C/min 至 250 °C, 最后在 250 °C 运行 4 min; 载气: N<sub>2</sub>, 纯度大于 99.999%, 40 cm/s (恒线速度); 进样方式: 分流进样, 分流比 20:1; 进样体积: 1 μl。

### 1.5 实验方法

#### 1.5.1 净化剂组合的正交试验设计

选定 3 种常用净化剂 PSA, C18, GCB 作为 A、B、C 3 个因素, 对每个因素取不同的 2 个水平 (表 1), 以加标回收率为考察指标, 选用 L8(2<sup>7</sup>) 正交表并考察 A 和 C 的交互作用进行正交设计-重复试验法选择最佳实验组合<sup>[5]</sup>。

#### 1.5.2 样品的测定

将黄瓜作为样品, 将其粉碎并混合均匀, 准确称取 10 g (精确至 0.01 g) 样品于 50 ml 塑料离心管中, 加入 6 g 无水硫酸镁振摇 1 min 使其成糊状, 再

表 1 净化剂水平表

Table 1 Levels of cleanup(g)

水平	因素		
	A(PSA)	B(C18)	C(GCB)
1	0.025	0.025	0.025
2	0.075	0.100	0.050

根据黄瓜样品量按照 0.1 mg/kg 加标量加入农药混合标准品, 然后加入 0.1% 冰乙酸的乙腈溶液 20 ml 振摇提取 2 min, 用超声波超声 30 min, 以 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 19 ml 在 45 °C 水浴下氮吹浓缩近干, 用乙酸乙酯-环己烷 (1+1) 溶液定容至 2 ml 备用。另取一 5 ml 玻璃离心管, 加入 300 mg 无水硫酸镁及所选净化剂混合均匀, 完全转入上述定容液, 涡旋 1 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 取出上清液 1 ml 至样品瓶, 供 GC 分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 净化剂正交重复试验

以功夫菊酯的回收率为例, 实验重复 6 次, 净化剂正交重复试验结果见表 2。

表 2 正交试验结果表 L8(2<sup>7</sup>)

Table 2 Results of orthogonal tests (n = 6)

实验号	A	B	C	A * C				实验结果(回收率%)					
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6
1	1	1	1	1	1	1	1	89.4	87.4	83.1	86.9	84.5	85.6
2	1	1	1	2	2	2	2	76.1	73.3	83.6	82.8	76.8	84.5
3	1	2	2	1	1	2	2	84.8	84.1	83.1	84.2	83.6	85.9
4	1	2	2	2	2	1	1	73.7	78.5	78.0	85.7	81.3	88.4
5	2	1	2	1	2	1	2	87.5	95.3	78.3	79.4	86.5	105.9
6	2	1	2	2	1	2	1	99.5	109.6	92.9	105.4	86.4	100.7
7	2	2	1	1	2	2	1	74.4	64.9	61.9	67.3	72.5	62.4
8	2	2	1	2	1	1	2	102.2	106.8	109.7	97.2	98.2	106.0

### 2.2 数据处理及方差分析

结果见表 3 ~ 表 5。

表 3 方差分析表

Table 3 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
校正模型	0.457 <sup>a</sup>	4	0.114	18.243	0.000
截距	35.831	1	35.831	5721.777	0.000
PSA * GCB	0.254	1	0.254	40.542	0.000
PSA	0.065	1	0.065	10.347	0.002
C18	0.029	1	0.029	4.588	0.038
GCB	0.110	1	0.110	17.496	0.000
误差	0.269	43	0.006		
总计	36.558	48			
校正总计	0.726	47			

注: <sup>a</sup>R 平方 = 0.629 (调整 R 平方 = 0.595)。

由表 3 方差分析结果可以得出: A 因素 (PSA) 和 C 因素 (GCB) 的交互作用 ( $P < 0.001$ ), B 因素 (C18) ( $P = 0.038 < 0.05$ ) 差异有统计学意义。由表 4 可得出 A 因素 (PSA) 和 C 因素 (GCB) 的最佳搭配组合是 A2(0.075 g)、C2(0.050 g), 回收率为

表 4 交互作用分析表

Table 4 Results of interaction analysis

GCB	PSA	均值 (%)	标准误差	95% 置信区间 (%)	
				下限	上限
0.025	0.025	85.2	0.023	80.6	89.8
	0.075	78.0	0.023	73.4	82.6
0.050	0.025	80.2	0.023	75.6	84.8
	0.075	102.1	0.023	97.5	106.7

表 5 净化剂水平分析表

Table 5 Results of cleanup levels

C18	均值 (%)	标准误差	95% 置信区间 (%)	
			下限	上限
0.025	88.8	0.016	85.6	92.1
0.100	84.0	0.016	80.7	87.2

102.1%。由表 5 可得出 B 因素 (C18) 第一水平平均回收率 88.8% 高于第二水平 84.0%, 故选择 B1 水平即 C18 量为 0.025 g, 因此综合考虑最佳组合应为 A2B1C2 即 PSA 为 0.075 g, C18 为 0.025 g, GCB 为 0.050 g。

以同样的统计分析方法并考虑节约材料、降低

成本以及扩大农药成分适用范围等实际情况得到其他6种农药组分净化剂的最佳组合同样为A2B1C2。即为L8(2<sup>7</sup>)正交表中第6种组合,其重复试验得到结果为99.5%、109.6%、92.9%、105.4%、86.4%、100.7%,平均值为99.1%,相对标准差为8.7%,此回收率结果是满意的,并符合相关标准的要求<sup>[6]</sup>。

## 2.3 讨论

### 2.3.1 净化剂的选择

待测液中含有的水分会使ECD的信号值迅速升高甚至饱和,影响ECD灵敏度,还会对色谱柱的固定相造成化学损伤。蔬菜中特别是瓜果类蔬菜如黄瓜水分较多,不容忽视,因此本试验在样品前处理时加入6g无水硫酸镁使其成糊状,在样品净化时再加入300mg无水硫酸镁进行脱水。PSA去除脂肪酸效果较好,在去除色素、甾醇和维生素方面效果一般,而C18和GCB去除维生素、色素、甾醇的能力较强<sup>[7]</sup>,所以在净化过程中一般把几种净化剂联合使用,以达到更好的净化效果,且各种吸附剂粉末用量不为定数,本次实验对每种蔬菜各种净化剂的水平定量是根据不同样品基质进行调整设定。

### 2.3.2 正交试验的选择

本实验采用了安排多因素试验、寻求最优水平组合的一种高效率试验正交试验设计方法。本次实验选用的L8(2<sup>7</sup>)正交表,安排了三因素二水平,在回收率方面,C18几乎不影响各种菊酯类农药化合物的回收率,可单独考虑其作用。而PSA、GCB同时都对某些农药吸附性较强<sup>[8]</sup>,使其回收率降低,故在正交试验设计的同时需要考察两者之间的吸附作用对回收率的影响是否存在交互作用而造成相互影响,因此由第5列考察A(PSA)、C(GCB)两因素间的交互作用。一般情况下正交表的各列都已安排满因素或交互作用,没有空列,为了估价试验误差和进行方差分析,需要进行重复试验。本次实验所选正交表的列虽未安排满,但为了提高统计分析的精确性和可靠性,往往也可进行重复试验,故本次实验进行了6次重复试验。

### 2.3.3 方法的适用性和实测结果

在含7种拟除虫菊酯农药本底均为0的黄瓜中添加低、中、高三个浓度(0.01、0.05、0.10 mg/kg)水平的农药,进行加标回收试验。按样品处理方式进行平行操作,低、中、高三个浓度各平行测定6次。7种拟除虫菊酯农药的加标回收率和相对标准偏差结果见表6。

由表6可知7种拟除虫菊酯农药的低、中、高浓度水平平均加标回收率介于75%~115%之间,RSD小于

表6 黄瓜中7种拟除虫菊酯农药的加标回收率和相对标准偏差

Table 6 Results of RSD and recovery of 7 synthetic pyrethroids in cucumber(% , n = 6)

农药名称	添加浓度 0.01 mg/kg		添加浓度 0.05 mg/kg		添加浓度 0.10 mg/kg	
	平均 回收率	RSD	平均 回收率	RSD	平均 回收率	RSD
联苯菊酯	87.27	6.28	108.52	4.02	101.37	6.88
甲氰菊酯	84.14	12.11	109.63	4.13	101.68	8.45
功夫菊酯	80.70	12.93	110.47	3.88	99.06	8.46
氯菊酯	96.67	5.13	105.69	4.13	100.17	7.25
氯氰菊酯	87.97	8.77	108.85	4.21	99.83	7.50
氰戊菊酯	77.86	6.95	107.83	4.28	93.96	9.40
溴氰菊酯	75.60	9.29	108.89	4.13	98.43	8.25

15%,能很好满足分析要求并符合相关标准<sup>[6]</sup>。方法操作简单、分析速度快,且节约有机溶剂的使用量,适合于黄瓜中拟除虫菊酯类农药残留的检测。

本次实验选择的样品是瓜果类蔬菜黄瓜,每100g含蛋白质0.8g,脂肪0.2g,碳水化合物2.9g,含水量为95.8%<sup>[9]</sup>。研究者可根据其脂肪、糖类、色素及含水量对其他蔬菜的净化剂和脱水剂无水硫酸镁的量进行调整,详细内容见后续发表论文。

## 参考文献

- [1] 李红,陈广平,常健,等.气相色谱法测定茶叶中多种拟除虫菊酯农药残留[J].农业科技与装备,2010(1):19-21.
- [2] 金戈辉,焦阳,李太平,等.气相色谱法测定水果、蔬菜中多种拟除虫菊酯类农药残留[J].检验检疫科学,2008,18(4):41-43.
- [3] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce [J]. J AOAC Int, 2003, 86(2):412-431.
- [4] STEVEN J L, KATERINA MATOVSKÁ, SEON Jongyun. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes [J]. J AOAC Int, 2005, 88(2):630-638.
- [5] 吴俊萍,姜少灏,王淑芹,等.正交设计-重复试验法优选抗抑郁胶囊提取工艺[J].河北医科大学学报,2002,23(2):95-97.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检测的标准[S].北京:中国标准出版社,2008
- [7] 刘玉波,樊明涛,梁俊,等.改进的QuEChERS-GC-ECD法测定苹果中4种拟除虫菊酯农药残留[J].西北农业学报,2009,18(4):61-65.
- [8] SCHENCK F J, HOBBS J E. Evaluation of the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2004, 73(1):24-30.
- [9] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所.中国食物成分表第一册[M].2版.北京:北京大学医学出版社,2009:34.