

分散固相萃取-高效液相色谱法测定 柑橘中四螨嗪的残留量

杨愿愿 杨晓云 黄其亮 洪海 苗雪雪 徐汉虹

华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

摘要 建立了高效液相色谱法快速检测柑橘中四螨嗪残留量的方法。试样经乙腈提取, 使用 N-丙基乙二胺键合固相吸附材料(PSA)和 C18 吸附剂净化, 在 C18 柱上以乙腈-水(V:V=70:30)为流动相进行分离, 在 268 nm 波长下检测。四螨嗪在 0.05~5.00 mg/L 时线性关系良好($R^2=0.9993$); 柑橘果肉和果皮中四螨嗪的最低检测限(LOD)均为 0.05 mg/kg; 在 0.05~1.00 mg/kg 添加水平时, 果肉和果皮中四螨嗪的回收率分别为 77.6%~91.6%、79.3%~105.6%, 相对标准偏差(RSD)均低于 8.1%。

关键词 分散固相萃取; 高效液相色谱; 四螨嗪; 柑橘; 残留检测

中图分类号 R 284 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)04-0073-04

四螨嗪, 化学名称为 3,6-双(2-氯苯基)-1,2,4,5-四嗪, 为触杀型有机氮杂环类杀螨剂, 用于防除苹果和其他果树树冠上苹果全爪螨、柑橘锈螨等植物螨害, 现在已广泛应用于水果蔬菜螨害的防治^[1-2]。四螨嗪属于中等毒性杀螨剂, 使用不当会造成严重的食品安全问题, 其在水果蔬菜中的残留日益受到重视。因此, 世界许多国家均对其在农产品上的残留规定了严格限量。目前, 我国公布的四螨嗪在柑橘中的最大残留限量标准(MRL 值)为 0.5 mg/kg^[3]。

关于四螨嗪在水果蔬菜中的残留量测定方法, 目前有高效液相色谱法^[4-7]和气相色谱-质谱联用法^[8]。上述各方法都是采取液-液萃取或 SPE 固相萃取等净化方法, 液-液萃取^[9]是较为传统的净化方法, 该方法费时、操作繁琐且需大量的有机溶剂, 会对环境造成危害; SPE^[10-11]净化方法在有机溶剂的使用上大大减少, 但其净化柱成本较高, 且该方法操作费时复杂^[12]。分散固相萃取净化技术是近年来国外发展起来的快速试样净化方法, 该方法直接在试样的提取液中加入固相吸附剂以去除基体中的杂质, 然后进行色谱测定。应用此法可将前处理时间缩短至 1 h 左右, 有机溶剂消耗量只有液-液萃取的 10%~20%^[13]。

笔者采用乙腈作为提取剂, 经 PSA 和 C18 2 种吸附剂固相分散净化基体中的杂质, 高效液相色谱-紫外检测器检测, 建立了柑橘中四螨嗪残留量的高效液相色谱紫外检测方法, 该方法快速、简便、节约溶剂, 方法准确度、精密度和灵敏度均可满足残留检测分析要求。

1 材料与方 法

1.1 试验仪器

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司, 配紫外检测器); 紫外分光光度计(UV-1800 型, 日本岛津公司); DL-4000B 离心机(上海安亭科学仪器公司); FC-16C 台式离心机(广州是万统生物科技有限公司); MS2 minishaker 涡旋振荡器(广州仪科实验室技术有限公司); KH-500 超声清洗器(昆山市超声仪器公司); DS-1 高速组织捣碎机(上海精科实业有限公司); BS124S 电子天平(赛多利斯科学仪器公司)。

1.2 试验试剂

四螨嗪标准品(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 农业部环境保护科研检测所); N-丙基乙二胺(PSA)、C18、石墨化炭黑(GCB)(北京艾杰尔科技有限公司); 甲醇和乙腈为

收稿日期: 2012-07-02

基金项目: 农业部农药残留田间试验项目(2011P107)

杨愿愿, 硕士研究生。研究方向: 农药残留分析和农药毒理环境。E-mail: yjydy23@126.com

通讯作者: 杨晓云, 博士, 副教授。研究方向: 农药残留分析和农药毒理环境。E-mail: yxyhyxy@scau.edu.cn

色谱纯,其他试剂为分析纯;试验用水为超纯水。

1.3 试验方法

1)样品制备。将柑橘样品的橘皮剥去,将果皮和果肉分别切碎,放入组织捣碎机中捣碎混匀,装入封口袋中放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待测。

2)样品提取。准确称取 10.0 g 样品于 50 mL 塑料离心管中,加入 10.0 mL 乙腈,涡旋振荡 1 min ,超声提取 20 min 。加入 5.0 g NaCl ,涡旋振荡 1 min , $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 5 min 。

3)样品净化。准确吸取本文“1.3 2)”离心后的上清液 1.0 mL 于 2.0 mL 离心管中,加入 0.1 g PSA 和 0.1 g C18 吸附材料,涡旋振荡 1 min , $10\ 000\text{ r/min}$ 离心 3 min ,取上清液过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜,待HPLC检测。

4)HPLC检测条件。色谱柱:Agilent TC-C18柱($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$);柱温: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相: $V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=3:7$;流速 1.0 mL/min ;检测波长 268 nm ;进样体积 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

使用紫外分光光度计对四螨嗪进行紫外吸收光谱扫描,发现四螨嗪在 215 nm 处有最大吸收峰,但其他杂质的吸收干扰也很大;而在 268 nm 时,四螨嗪的吸收也较大,而杂质的吸收峰很小,所以选择 268 nm 作为检测波长。

在反相HPLC色谱分离中,乙腈和甲醇是最常

用的洗脱剂。分别比较了以乙腈-水、甲醇-水为流动相体系的洗脱分离效果,经过反复试验,结果表明,以乙腈-水 $=70:30(V/V)$ 洗脱时,待测物与杂质分离效果较好,四螨嗪的保留时间为 10.5 min 左右,相关的HPLC色谱图见图1~3。以甲醇-水体系($V_{\text{水}}:V_{\text{甲醇}}=30:70$)洗脱时,色谱图中杂质峰多,待测物很难与杂质分离(图4)。

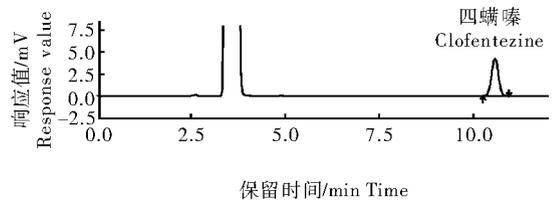


图 1 四螨嗪标样液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of clofentezine

2.2 提取溶剂的选择

四螨嗪为中等极性的杀螨剂,采用丙酮、乙腈、正己烷-乙酸乙酯($V/V=1:1$)3种溶剂进行提取试验,对比发现,用丙酮提取时,四螨嗪的回收率为 $94.5\%\sim 106.4\%$,但同时会提取出较多的色素等杂质,对下一步的净化造成困难;用正己烷-乙酸乙酯($V/V=1:1$)提取时,虽然提取的杂质较少,但四螨嗪的回收率仅有 $26.2\%\sim 32.6\%$;用乙腈提取时,四螨嗪的回收率为 $86.7\%\sim 95.8\%$,且乙腈对样品中的色素、糖类、脂肪酸等杂质的溶解性较小,降低了基质中杂质的干扰,试验选择乙腈作为提取剂。

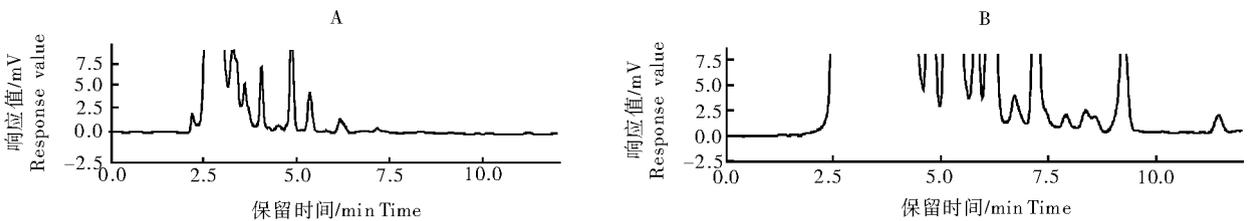


图 2 柑橘果肉(A)和果皮(B)空白样品液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of orange pulp(A) and peel(B) control blank sample

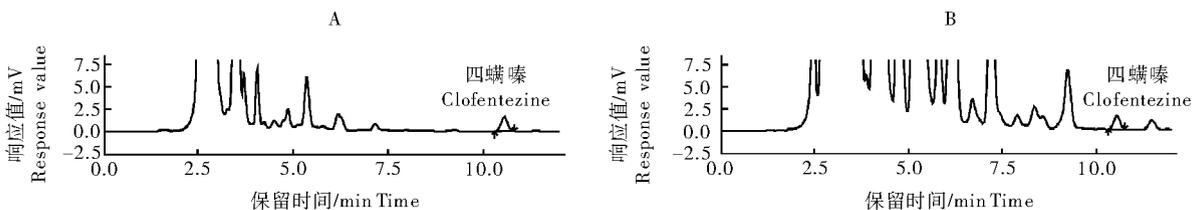


图 3 柑橘果肉(A)和果皮(B)中添加四螨嗪的样品液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of orange pulp(A) and peel(B) spiked with clofentezine

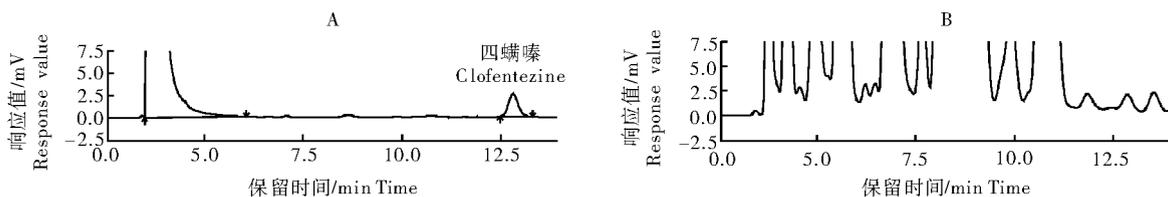


图 4 四螨嗪标样(A)和柑橘果皮空白样品(B)液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of clofentezine(A)and orange peel control blank sample(B)

2.3 净化方法的选择

柑橘样品中含有大量的色素、脂肪酸、维生素、糖类以及甾醇等,因此,样品前处理需选择能有效去除上述物质的方法。笔者考察了不同用量的 PSA、C18 和 GCB 作为吸附剂的净化效果及对目标农药四螨嗪(含量为 0.1 mg/kg, 体积为 1 mL)的吸附能力(表 1),由表 1 可知,GCB 对四螨嗪的吸附能力最强;PSA 对四螨嗪也有一定的吸附作用,且随着 PSA 用量的增加,吸附作用也随之增大,回收率为 83%~96%;C18 对四螨嗪的吸附能力较弱,回收率较高。虽然 GCB 能很好地吸附提取液中的色素等杂质,由于其对四螨嗪的吸附能力太强,所以不选择 GCB 作为净化吸附剂;PSA 同时含有伯胺和仲胺基团,具有弱的阴离子交换能力,对提取液中的色素、脂肪酸、糖类和甾醇等均有良好的净化作用;C18 对弱极性的杂质有很好的吸附作用,二者组合能有效地去除提取液中的干扰杂质,为保证较高的四螨嗪回收率,最终选择 0.1 g PSA+0.1 g C18 为净化吸附剂。

表 1 不同吸附剂对标样的吸附

Table 1 Comparison of adsorptive capacity of different adsorbent of clofentezine %

| 吸附剂/mg Adsorbent | 平均回收率 Average recovery | | |
|---------------------|------------------------|-------|------|
| | PSA | C18 | GCB |
| 10 | 96.5 | 103.1 | 12.6 |
| 20 | 95.3 | 105.7 | / |
| 50 | 92.2 | 101.4 | / |
| 100 | 90.8 | 97.7 | / |
| 150 | 83.9 | 93.5 | / |

2.4 标准曲线

配制不同浓度的四螨嗪标准溶液,按上述色谱条件进样分析,以进样量 x 为横坐标,峰面积 y 为纵坐标绘制标准曲线。在进样量 0.5~50 ng 时,峰面积和进样量之间有良好的线性关系。线性回归方程为 $y=5161x-1716.3(R^2=0.9993)$ 。

分别用乙腈、柑橘果皮空白样品基质液和柑橘果肉空白样品基质液将四螨嗪标准溶液稀释至 1 mg/mL,按上述色谱条件进样分析,分别以 A、B、

C 代表其峰面积,则柑橘果皮基质效应 = $B/A \times 100\% = 102.8\%$,柑橘果肉基质效应 = $C/A \times 100\% = 101.6\%$,由此可见,柑橘果皮和果肉的基质效应均不明显。

2.5 方法的准确度、精密度及灵敏度

添加 3 个含量(添加水平分别为 0.05、0.5、1.0 mg/kg)的四螨嗪标准溶液于空白橘皮和橘肉样品中,每个处理重复 5 次,按上述已建立的提取、净化方法及测定步骤,进行添加回收率试验。结果(表 2)表明,四螨嗪在柑橘果肉中的平均回收率为 77.6%~91.6%,相对标准偏差(RSD)为 2.6%~5.2%;在柑橘果皮中的平均回收率为 79.3%~105.6%,相对标准偏差(RSD)为 1.5%~8.1%。

按照信噪比(S/N)=3 求得四螨嗪的仪器检测限为 0.1 ng,橘皮、橘肉中的最低检测限均为 0.05 mg/kg。目前我国公布的四螨嗪在柑橘中最大残留限量标准(MRL 值)为 0.5 mg/kg,因此,本方法可以满足柑橘中四螨嗪的残留检测。

表 2 四螨嗪在柑橘果皮和果肉中的添加回收结果

Table 2 Recoveries of clofentezine in orange pulp and peel samples

| 样品类型 Sample | 添加水平/ (mg/kg) Spiked levels | 平均回收率/% Average recovery | 相对标准偏差/% RSD |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 果肉 Pulp | 0.05 | 91.6 | 4.8 |
| | 0.5 | 77.6 | 5.2 |
| | 1.0 | 88.5 | 2.6 |
| 果皮 Peel | 0.05 | 105.6 | 8.1 |
| | 0.5 | 79.3 | 1.5 |
| | 1.0 | 96.2 | 1.8 |

3 讨论

本研究利用分散固相萃取的方法,用乙腈提取柑橘中的四螨嗪农药,PSA 和 C18 2 种吸附剂混合净化,高效液相色谱-紫外检测器检测。由表 3 可知,本方法的最低检测限、回收率和相对标准偏差与文献[4,7-8]所报道的检测方法相当,但是本方法有机溶剂的使用量远远少于其他 3 种方法,而且本方法操作快速、简便,前处理仅需要 40 min 左右。因

此,本方法具有快速、简便、节约溶剂、对环境友好 留分析的要求,可以为柑橘中四螨嗪残留检测提
等特点,其灵敏度、准确度和精密度都符合农药残 供参考。

表3 分散固相萃取法与其他检测四螨嗪方法的比较

Table 3 Comparison of DSPE with other methods for the determination of the clofentezine

| 方法 Methods | 最低检测限/(mg/kg) LOD | 回收率/% Recovery | 相对标准偏差/% RSD | 有机溶剂使用量/mL Usage amount of organic solvent | 参考文献 Reference |
|-----------------|----------------------|-------------------|-----------------|---|-------------------|
| SPE-HPLC-UV | 0.07 | 82.9~88.4 | 0.9~4.8 | 116 | [4] |
| LLE-SPE-HPLC-UV | 0.05 | 90.0~92.0 | 2.5~3.9 | 188 | [7] |
| LLE-SPE-GC-MS | 0.01 | 83.8~91.6 | 5.1~7.4 | 245 | [8] |
| DSPE-HPLC-UV | 0.05 | 77.6~105.6 | 1.5~8.1 | 10 | 本方法 This study |

参 考 文 献

- [1] 饶国武,周欣,杨忠愚,等. 农药四螨嗪合成新工艺的研究[J]. 农药,2003,42(2):13-14.
- [2] 沈长朋,张海凤,孙书兴,等. 螨死净对苹果园两种叶螨的田间药效试验[J]. 莱阳农学院学报,1994,11(A06):161-167.
- [3] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 2763—2005 食品中农药最大残留限量[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [4] BICCHI C, AMATO A D, TONUTTI I. Simultaneous determination of clofentezine, fenoxycarb and hexythiazox by HPLC on apples, pears and their pulps[J]. Pesticide Science, 1990, 30(1):13-19.
- [5] NAVICKIENE S, RIBEIRO M L. Determination of fluquinconazole, pyrimethanil, and clofentezine residues in fruits by liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. Journal of AOAC international, 2004, 87(2):435-438.
- [6] 赵善仓,赵领军,毛江胜,等. 草莓中四螨嗪残留反相高效液相色谱法测定[J]. 现代农药,2007,6(2):40-41.
- [7] 邓立刚,耿越,李增梅,等. 高效液相色谱法测定苹果中四螨嗪残留量[J]. 理化检验-化学分册,2009,45(2):151-153.
- [8] 李爱军,王明泰,牟峻,等. 气相色谱-质谱联用法测定水果中四螨嗪残留量[J]. 理化检验-化学分册,2008,44(4):323-325.
- [9] 刘科强,丁健桦,刘成佐,等. 液相微萃取技术在农药残留检测中的应用[J]. 湖北农业科学,2012(15):3153-3158.
- [10] 曹鹏,王建芸,唐莉,等. 基质固相分散萃取-气相色谱法测定农产品中炔苯酰草胺残留[J]. 湖北农业科学,2012(22):5180-5181.
- [11] 王秀婷,李培武,王琳,等. 内标校准液相色谱荧光法测定食用油中苯并(a)芘[J]. 中国油料作物学报,2011(6):603-608.
- [12] 张敏,黄其亮,殷帅,等. 基于离子液体的分散液相微萃取-高效液相色谱法测定水中三唑类农药[J]. 华中农业大学学报,2012,31(3):341-345.
- [13] 胡江涛,盛毅,方智,等. 分散固相萃取-高效液相色谱法快速检测猕猴桃中的氯吡啶[J]. 色谱,2007,25(3):441-442.

HPLC determination of clofentezine in oranges with dispersive solid phase extraction

YANG Yuan-yuan YANG Xiao-yun HUANG Qi-liang HONG Hai MIAO Xue-xue XU Han-hong

Key laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract A quick method was developed for determining clofentezine residues in oranges by HPLC with dispersive solid phase extraction. The residues of clofentezine in samples was extracted by acetonitrile, cleaned up by PSA and C18 adsorbent. HPLC was performed on a C18 column with UV detection at 268 nm using acetonitrile-water(70 : 30, V/V) as mobile phase. The newly developed method showed a good linear relationship at the range of 0.05-5.00 mg/L with good precision and accuracy for clofentezine ($R^2=0.9993$). The limit of quantification (LOD) of clofentezine in orange pulp and peel was all 0.05 mg/kg. With RSD lower than 8.1% for pulp and peel, the average recoveries were 77.6%-91.6% and 79.3%-105.6% for pulp and peel samples spiked with 0.05-1.00 mg/kg of clofentezine, respectively.

Key words dispersive solid phase extraction; high performance liquid chromatographic; clofentezine; oranges; residue detection

(责任编辑:陆文昌)