

SPE – HPLC 测定黄瓜中除虫脲灭幼脲和杀铃脲的残留检测方法

黄永春¹, 王继军¹, 傅学起², 黄士忠¹

(1. 农业部环境保护科研监测所农业部农业环境与农产品安全重点开放实验室, 天津 300191;

2. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘要: 采用固相萃取 (SPE) 和液相色谱 (HPLC) 相结合的方法对除虫脲、灭幼脲和杀铃脲在黄瓜中的残留检测条件进行了研究。结果表明, 本法采用乙腈提取经盐析脱水后, 取 5.0 mL 稀释 1 倍直接上样, 经甲醇洗脱后定容至 4.0 mL, 摇匀后进液相色谱直接检测, 方法简便易于操作。3 种农药的最小检出浓度分别为 $0.0143 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.0167 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.020 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 高浓度、中浓度和低浓度的平均添加回收率分别为 95.11% ~ 99.35%, 94.00% ~ 101.63%, 101.65% ~ 105.15%。变异系数分别为 1.35% ~ 1.84%, 3.77% ~ 6.09%, 2.63% ~ 8.09%。

关键词: 农药残留; 固相萃取; 液相色谱; 除虫脲; 灭幼脲; 杀铃脲; 检测方法

中图分类号: X839.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2004)03-0615-04

Residual Quantity Determination of Diflubenzuron, Micyouniao and Triflumuron in Cucumber Using SPE – HPLC

HUANG Yong-Chun¹, WANG Ji-jun¹, FU Xue-qi², HUANG Shi-zhong¹

(1. Key Laboratory of Agro – Environment and Agro – Product Safety of MOA, Tianjin 300191, China; 2. College of Environment Science and Engineering of Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The conditions for detecting residues of diflubenzuron, micyouniao and triflumuron using solid phase extraction (SPE) – high performance liquid chromatography (HPLC) in cucumber were studied. The sample (25 g) was extracted with acetonitrile (50 mL) for 2min with a homogenizer. About 30mL extract, after a coarse paper filtration, was collected into a 50 mL graduated cylinder with a cap in which 5 g NaCl was added in advance. Shaking 2 min and stabilizing 10 min, a 5 mL supernatant aliquot was taken to a tube and diluted to 10 mL which was loaded to a conditioned C₁₈ SPE cartridge. A 3.5 mL methanol was added into the SPE cartridge as elution after the solution loading was finished under weight and collected in a 5 mL test tube made up to 4 mL with methanol then the solution was detected by HPLC. Using a ternary complex structure the adsorption and desorption mechanism was explained also. The three pesticides were recovered at 94.00% ~ 105.15% at spike levels of 0.2, 0.5 and 1.0 mg · kg⁻¹ in cucumber. Relative standard deviations were less than 10% for all of the recovery tests. The minimal limits of assay were $1.43 \times 10^{-9} \text{ g}$, $1.67 \times 10^{-9} \text{ g}$ and $2.0 \times 10^{-9} \text{ g}$ for diflubenzuron, micyouniao and triflumuron respectively. The proposed method was fast, easy to perform, and could be utilized for regular monitoring of pesticide residues.

Keywords: pesticides residue; solid phase extraction; liquid chromatography; micyouniao; diflubenzuron; triflumuron

脲类农药如灭幼脲其作用机制主要是通过抑制昆虫蜕皮、变态, 导致不育及直接杀卵等方面的作用^[1]来控制害虫, 所以其对人畜毒性相对较低, 因而

在粮食、蔬菜、水果上得到广泛的应用。其化学结构式见图 1。

除虫脲和灭幼脲原药的分析检测, 高效液相色谱方法已有报道^[2, 3], 在国标中^[4]也推荐了灭幼脲的分析方法, 但较为繁琐。目前 3 种脲类的多残留分析方法尚未见报道。本文采用固相萃取 (SPE) 和高效液相色谱 (HPLC) 相结合的方法同时成功检测了黄瓜中这

收稿日期: 2004-02-19

基金项目: 国家“十五”攻关资助项目, 农业部农业环境与农产品安全重点开放实验室开放基金资助

作者简介: 黄永春 (1975—), 男, 博士生, 从事农药的残留检测研究。

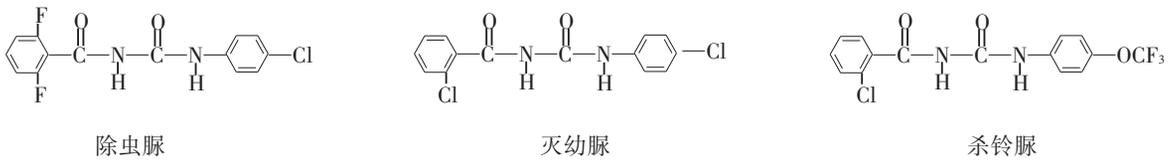


图1 除虫脲、灭幼脲、杀铃脲的化学结构式

Figure 1 The structural formula of diflubenzuron, meiyouniao and triflumuron

3 种农药的残留。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 510 型高效液相色谱仪, 配有紫外检测器; Waters 740 型数据积分仪; DS-1 型高速组织捣碎机, 上海标本模具厂生产。

1.2 试剂和材料

乙腈、丙酮、甲醇(均为色谱纯级), 氯化钠(分析纯)。

除虫脲、灭幼脲、杀铃脲标样由农业部环境保护科研监测所农药室提供, 纯度 > 98%。

C_{18} 固相萃取柱(1 g, Varian, Mega Bond Elut)。

HPLC 分析柱: C_{18} 4.6 mm × 30 cm, 5 μ m。

实验用黄瓜取自蔬菜批发市场。

2 样品的提取、净化

2.1 提取、净化

准确称取 25.0 g 切碎混匀的黄瓜样品于捣碎缸中, 用移液管准确加入 50.0 mL 乙腈, 高速匀浆捣碎提取 2 min。在 50.0 mL 的具塞量筒中放入约 5.0 g 的 NaCl, 放一铺有滤纸的玻璃漏斗, 过滤匀浆好的样品, 收集约 30 ~ 40 mL 的滤液, 盖上塞子剧烈振摇 2 min, 静置分层约 10 min^[5]。

用移液管准确吸取上层的乙腈溶液 5.0 mL(相当于 2.5 g 样品)于一 10.0 mL 的刻度试管中, 用双蒸水稀释至 10.0 mL, 在重力作用下通过用 5.0 mL 甲醇和 5.0 mL 双蒸水条件化的 C_{18} 固相萃取柱。将固相萃取柱中的水挤干后, 加入甲醇洗脱, 收集洗脱液约 3.5 mL 用甲醇定容至 4.0 mL, 混匀后待进液相色谱检测。

2.2 添加回收率试验

分别向 3 份切碎混匀的 25.0 g 黄瓜样品中添加 100 μ g · mL⁻¹ 的 3 种农药混标溶液各 250 μ L, 125 μ L 和 50 μ L, 则 3 个水平的添加浓度分别为 1.0 mg · kg⁻¹, 0.5 mg · kg⁻¹ 和 0.2 mg · kg⁻¹, 提取、净化步骤

同 2.1。共重复 5 次, 并同时做空白对照。

3 检测条件

流动相: 甲醇: 水 = 75: 25; 流速: 1 mL · min⁻¹; 波长: 254 nm; 分析柱: C_{18} 4.6 mm × 30 cm, 5 μ m; 柱温: 室温; 进样量: 20 μ L; 纸速: 2 min · cm⁻¹; 衰减: 32。其标准色谱图如图 2。图中色谱峰按时间顺序分别为除虫脲(17.278 min)、灭幼脲(19.745 min)、杀铃脲(29.052 min)。

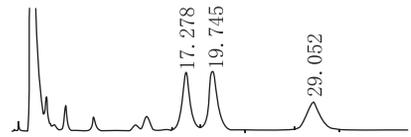


图2 除虫脲、灭幼脲、杀铃脲混标的标准图谱

Figure 2 The chromatogram of diflubenzuron, meiyouniao and triflumuron

4 结果和讨论

4.1 固相萃取柱穿漏试验

固相萃取的方法已广泛应用于液体样品中的农药残留分析, 例如水和浆液^[6,7]。为了使食物样品进入固相萃取柱, 首先要使用与水相溶的溶剂进行提取如丙酮, 在上柱前把提取溶剂蒸发近干^[8], 用适当溶剂溶解后并将此溶剂用水进行适当的稀释以降低溶剂的强度, 使农药保留在固相萃取柱上。否则由于溶剂强度过大, 直接上样农药分子将随溶剂一起流出固相萃取柱, 即造成穿漏现象。为解决穿漏现象本试验中分别考察了 3 种不同浓度的溶剂。

分别用不同浓度的甲醇、乙腈和丙酮的水溶液配制 1.0 μ g · mL⁻¹ 的 3 种农药的混标溶液 10 mL。在重力作用下使其通过固相萃取柱, 然后用甲醇进行洗脱, 收集 3.5 mL 淋洗液, 混匀后取 20 μ L 进液相色谱测定其回收率, 其结果见表 1。

由表 1 中数据可见, 当甲醇的浓度增加时, 穿漏现象也迅速增加导致回收率迅速降低; 但 20% 至

表 1 不同浓度的甲醇、乙腈、丙酮固相萃取柱穿漏试验

Table 1 The breakthrough test for different concentration of methanol, acetonitrile and acetone in solid phase extraction cartridge

农药	甲醇			乙腈				丙酮			
	10%	15%	20%	20%	30%	50%	100%	20%	30%	50%	100%
除虫脲	73.91	39.13	30.43	102.80	105.14	100.75	0.50	22.45	100.00	102.38	0.61
灭幼脲	70.37	44.44	29.63	101.78	102.22	100.00	0.41	33.96	95.65	101.12	0.53
杀铃脲	65.00	40.00	30.00	104.41	101.47	98.24	0.38	35.00	100.86	105.63	0.56

注:(1)表中数据均为回收率/%;(2)表中数据均为 5 次平均值。

50% 的乙腈和 30% 至 50% 的丙酮回收率均在 100% 左右;而 100% 的乙腈和丙酮的回收率低于 1%。

分析其原因是由于农药分子中的脲基团 $(-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-)$ (见图 1) 与甲醇 (CH_3-OH) 可形成较强的氢键,而甲醇与水也会形成很强的氢键,在此甲醇起到了纽带的作用,它把脲类农药分子和水分子连接起来形成 1 个三联体结构(如图 3)。

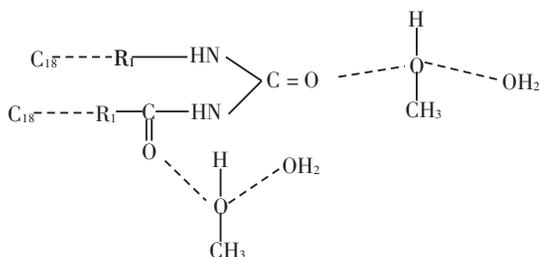


图 3 脲类农药分子、甲醇、水形成的三联体结构与 C_{18} 基团作用示意图

Figure 3 The ternary complex structure among urea pesticide molecule, methanol, water and C_{18} group

当此三联体结构通过固相萃取柱时, C_{18} 基团对脲分子的侧链基团 $(\text{R}-)$ 也具有吸附亲和作用,但当甲醇浓度很高时此亲和作用力不足以打破甲醇分子与脲类农药分子之间绝大部分的氢键作用力,结果大部分脲类农药分子就以三连体的形式随水分子流出固相萃取柱。而当甲醇的浓度降低时甲醇分子与脲类农药分子之间的氢键作用力减弱,当通过 C_{18} 固相萃取柱时,脲基与 C_{18} 基团之间的亲和作用力可以将大部分的脲类农药分子与甲醇分子间的氢键作用力打破使大部分脲类农药分子保留在固相萃取柱中,所以当甲醇浓度降低时,3 种脲类农药的回收率迅速升高。

当将甲醇换做乙腈和丙酮时,由于乙腈 $(\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CN})$ 和丙酮 $(\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_3)$ 分子侧链基团的空间位阻较大,羰基和腈基与脲基之间形成的氢键较弱,当经过固相萃取柱时此氢键作用力很容易被 C_{18} 基团和脲类农药分子侧链基团间的亲和作用力打破,

则脲类农药被保留在固相萃取柱上。当乙腈和丙酮的浓度增加时,虽然氢键作用力也相应增加,但由于位阻较大增加缓慢,所以对于 50% 的溶剂浓度仍能获得满意的回收率,但当两种溶剂的浓度无限升高直至 100% 的纯溶剂时则会造成严重的穿漏现象,导致回收率小于 1%。

在 50% 的乙腈和 50% 的丙酮的穿漏试验中两者的回收率都很高,但当使用丙酮上样时在色谱图上溶剂峰过大,这可能是由于丙酮部分残留在固相萃取柱中,当洗脱时随甲醇一起流出,故本方法采用 50% 乙腈上样。

在样品提取时如选用其他溶剂如丙酮或甲醇,则在提取完成后仍需要将提取溶剂蒸发近干再用 50% 乙腈溶解。为简化操作,本方法直接采用乙腈进行捣碎提取,经盐析脱水、稀释 1 倍后直接上样,这样既简化了操作又可避免在蒸发的过程中造成农药的损失,可达到较高的回收率,并节省大量的有机溶剂。

4.2 淋洗曲线的绘制

当 10 mL 经稀释的提取液在重力作用下通过固相萃取柱后,用从顶部加压或从下面抽真空的方法把柱管中残留的水分挤干。向柱管中加入甲醇进行洗脱,用刻度试管按每管 1 mL 收集洗脱液,混匀后进液相色谱进行定量检测,并绘制出洗脱曲线,见图 4。从图 4 中可见,在前 2 mL 中大部分农药已经被洗脱下来。从第 3 mL 以后溶液中 3 种农药的含量已经不再增加。故收集约 3.5 mL 足可以将固相萃取柱中的农药全部洗脱下来。

4.3 添加回收率试验结果

向黄瓜样品中添加 1.0, 0.5, 0.2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的农药以后,其回收率测定结果列于表 2、表 3 和表 4 中,在空白对照样品中未检出 3 种农药。

由表 2、表 3 和表 4 可见 3 种农药在 3 个水平上的平均添加回收率分别为 95.11% ~ 99.35%, 94.00% ~ 101.63%, 101.65% ~ 105.15%。变异系数分别为 1.35% ~ 1.84%, 3.77% ~ 6.09% 和 2.63%

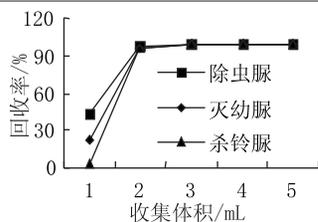


图4 3种脲类农药的洗脱曲线

Figure 4 The elution curves of three urea pesticides

表2 添加 1.0 mg · kg⁻¹ 的黄瓜回收率试验结果(%)Table 2 The recovery rates spiked with 1.0 mg · kg⁻¹(%)

农药	回收率					平均值	相对标准偏差
除虫脲	97.62	94.80	94.02	93.82	95.30	95.11	1.60
灭幼脲	95.80	97.57	98.05	99.03	96.30	97.35	1.35
杀铃脲	99.10	100.00	98.18	97.38	102.10	99.35	1.84

表3 添加 0.5 mg · kg⁻¹ 的黄瓜回收率试验结果(%)Table 3 The recovery rates spiked with 0.5 mg · kg⁻¹(%)

农药	回收率					平均值	相对标准偏差
除虫脲	92.00	96.00	93.33	101.42	96.00	97.75	3.77
灭幼脲	91.11	94.44	88.88	97.78	97.78	94.00	4.23
杀铃脲	93.88	104.08	97.96	110.20	102.04	101.63	6.09

表4 添加 0.2 mg · kg⁻¹ 的黄瓜回收率试验结果(%)Table 4 The recovery rates spiked with 0.2 mg · kg⁻¹(%)

农药	回收率					平均值	相对标准偏差
除虫脲	110.53	98.57	96.67	108.00	112.00	105.15	6.71
灭幼脲	100.00	97.50	117.00	98.30	98.62	102.28	8.09
杀铃脲	98.56	99.38	102.56	102.60	105.13	101.65	2.63

注:表中回收率数据为3次测定的平均值。

留限量(MRL)为 3.0 mg · kg⁻¹[9], 除虫脲在梨果和柑橘中最大残留限量为 1.0 mg · kg⁻¹[10]。使用本方法完全可以满足日常检测要求, 并且具有操作简便、回收率和灵敏度较高、节省溶剂的特点。

参考文献:

- [1] 中国农业百科全书·农药卷[M]. 北京:农业出版社, 1993. 10.
- [2] 胡颖园, 黄秀明, 成秀娟. 除虫脲·吡虫啉悬浮剂的液相色谱分析[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(3): 11-12.
- [3] 薛健. 反相高效液相色谱法同时测定复配制剂中的灭幼脲、抗蚜威、三唑酮[J]. 农药, 2000, 39(2): 19-20.
- [4] GB/T16340-1996, 食品中灭幼脲残留量的测定[S].
- [5] 王一茹, 曹哲. 新鲜蔬菜水果的农药多残留快速检测[J]. 现代

~ 8.09%。将检出限(LOD)定义为 S/N > 2, 则3种农药的最小检出浓度为 0.014 3 mg · kg⁻¹, 0.016 7 mg · kg⁻¹, 0.020 mg · kg⁻¹; 最小检测出量为 1.43 × 10⁻⁹ g, 1.67 × 10⁻⁹ g, 2.0 × 10⁻⁹ g。

5 结论

在我国的国家标准中规定灭幼脲在蔬菜中的最大残

科学仪器, 2003, (1): 28-32.

- [6] Bengtsson S, Ramberg A. Solid-phase extraction of pesticides from surface water using bulk sorbents[J]. *J Chromatogr Sci*, 1995, 33: 554-556.
- [7] Pico Y, Viana E, Font G, et al. Determination of organochlorine pesticide content in human milk and infant formulas using solid phase extraction and capillary gas chromatography[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 1610-1615.
- [8] Iijima K, Saka M, Odanaka Y, et al. Multiresidue analytical method of pesticides by GC-MS: Application of macroporous diatomaceous earth column and silica gel cartridge[J]. *J Pestic Sci*, 1997, 22: 17-26.
- [9] GB15195-1994, 食品中灭幼脲最大残留限量标准[S].
- [10] GB16333-1996, 双甲脒等农药在食品中最大残留限量标准[S].