

贺江, 龙海波. 分散液相微萃取-高效液相色谱法测定水体中毒死蜃残留[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1179-1183.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.037

分散液相微萃取-高效液相色谱法测定水体中毒死蜃残留

贺江, 龙海波

(湖南文理学院 生命科学学院, 环洞庭湖水产健康养殖与加工湖南省重点实验室, 湖南省水产高效健康生产协同创新中心, 湖南 常德 415000)

摘要: 水体中的农药残留是严重的环境安全问题之一, 并可通过水产养殖或种植业等途径污染食品。本研究应用分散液相微萃取(Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)技术, 建立水体中毒死蜃的高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)分析方法。通过考察萃取剂种类、分散剂种类、萃取剂用量、分散剂用量、盐度以及 pH 等因素对分散液相微萃取的影响, 确定最佳操作参数。经优化的水体中毒死蜃分散液相微萃取过程为: 以 100 μl 三氯乙烷为萃取剂, 1 200 μl 甲醇为分散剂, 混匀后, 加入 10 ml 水样, 室温静置 2 min, 以 3 000 r/min 离心 2 min, 吸取 15 μl 沉积相, 进行 HPLC 分析。本方法操作简单、成本低, 灵敏度、准确度及精密度高, 可为水体中毒死蜃残留检测提供新的方法。

关键词: 分散液相微萃取; 高效液相色谱; 毒死蜃; 水体; 农药残留

中图分类号: S132 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)05-1179-05

A dispersive liquid-liquid microextraction-HPLC method for determination of chlorpyrifos in water

HE Jiang, LONG Hai-bo

(College of Life Science, Hunan University of Art and Science/Hunan Provincial Key Laboratory of Aquatic Healthy Farming and Processing in Dongting Lake/ Collaborative Innovation Center for Efficient and Healthy Production of Fisheries in Hunan Province, Changde 415000, China)

Abstract: The residue of pesticides in water system is one of the serious environmental safety problems, and may contaminate food through a variety of ways. In the current study, dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME) technology was applied for develop a high performance liquid chromatography (HPLC) analysis methods for the detection of chlorpyrifos in water. In the optimized protocol, the mixture of 100 μl trichloroethane used as extract agent and 1 200 μl methanol used as dispersing agent were added with 10.0 ml water samples and stored at room temperature for 2 min, and 15 μl deposition sampled from above mixture centrifuged at 3 000 r/min for 2 min were subjected to HPLC analysis. The newly developed method was applied to detected the chlorpyrifos with the concentrations ranging from 0.01 ~ 1.00 mg/L, the results showed the spiked

recoveries were above 85.5%, indicative of the sensitivity, accuracy and precision. This method offers a new approach for the detection of chlorpyrifos in water sample.

Key words: dispersive liquid-liquid micro extraction; high performance liquid chromatography; chlorpyrifos; water; pesticide residue

收稿日期: 2015-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401583); 湖南省教育厅科研项目(12C0828); 湖南省常德市联合基金项目(2015JJ5008); 湖南文理学院生命科学学院省级平台开放项目(SKYPT201202)

作者简介: 贺江(1983-), 男, 江西萍乡人, 博士, 讲师, 主要从事食品安全与食品生物技术方面的研究。(Tel) 15115667084; (E-mail) hejiang1119@163.com

随着经济和社会的发展, 中国水产品的消费量逐

年上升,与此同时,水产养殖业在中国环洞庭湖等地区已成为农民增收的重要途径。然而,水体中农药残留等化学污染物的积累严重制约了中国水产养殖业的健康发展,建立水体中此类化学污染物的监测技术,成为水产品安全生产体系中的核心环节之一。毒死蜱是目前中国农业生产中广泛应用的一种有机磷杀虫剂,它的使用使水体中积累毒死蜱农药残留的风险增大。中国现行的各级农药残留检测标准方法多是基于色谱或色谱-质谱联用技术,标准方法中的样品前处理技术仍以液液萃取技术为主,其存在操作繁琐耗时、有机溶剂使用量大、难以实现自动化等不足。

针对传统样品前处理技术的各种不足,建立省时高效、有机溶剂耗用量少的样品前处理新技术一直是分析化学领域、食品安全检测领域的一个热门研究方向^[1]。近年来国内外学者发展建立起了多种新型样品前处理技术,例如固相萃取(Solid-phase extraction, SPE)技术^[2-3]、超临界流体萃取(Supercritical fluid extraction, SFE)技术^[4-5]、固相微萃取(Solid-phase micro extraction, SPME)技术^[6-7]、悬滴微萃取(Single drop micro extraction, SDME)技术^[8-9]、基于中空纤维的液相微萃取(Hollow fiber-liquid phase micro extraction, HF-LPME)技术^[10]、分散液相微萃取(Dispersive liquid-liquid micro extraction, DLLME)技术^[11-14]等。其中 DLLME 技术自建立以来,受到了国内外诸多学者的重视,该技术集采样、萃取和浓缩于一体,避免了固相微萃取中可能存在交叉污染的问题,是一种操作简单、快速、成本低、富集效率高且对环境友好的样品前处理新技术,在对液体样品进行处理时 DLLME 技术的优势尤为显著。

本研究拟建立水体中毒死蜱的 DLLME—HPLC 分析检测技术,重点对 DLLME 技术中萃取剂与分散剂种类的选择、萃取剂与分散剂用量的确定、样品盐浓度及 pH 等条件进行优化,使水体中毒死蜱残留检测技术得到改进,也可作为水体中其他类型化学污染物的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

毒死蜱标准品(来自中国食品药品检定研究院),四氯化碳、三氯乙烷、二氯甲烷、四氯乙烯、三氯甲烷(分析纯,上海化学试剂有限公司生产),乙腈、丙酮、乙醇、甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有

限公司生产)。

1.2 仪器与设备

P680 高效液相色谱仪(美国戴安公司生产),配可变波长紫外检测器和自动进样器;Diamondsil ODS 色谱柱(250.0 mm×4.6 mm, 5 μm ODS C18,迪马科技有限公司生产);UV-1750 型紫外可见分光光度计(日本岛津制作所生产);TG16-II 型高速离心机;涡旋振荡器;15 ml 尖底具塞离心管;带支架的色谱自动进样瓶内插管。

1.3 方法与步骤

1.3.1 毒死蜱 HPLC 检测条件的设定 采用 UV-1750 型紫外可见分光光度计对毒死蜱标准溶液进行波长扫描,确定其最佳检测波长为 300 nm。参考文献[15],确定毒死蜱液相色谱分析条件如下:流动相为甲醇和水(9:1,体积比),流速为 1.0 ml/min,柱温 25 ℃,进样量 15 μl。在该条件下,毒死蜱色谱峰与溶剂峰分离效果较佳,且峰形较好,其保留时间约为 8.3 min(图 1)。

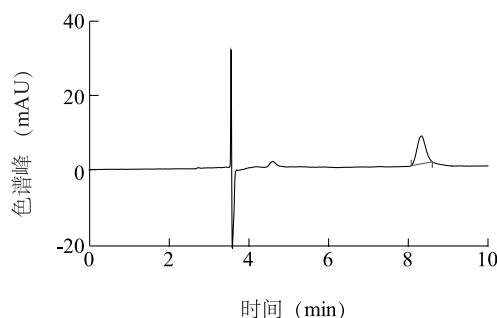


图 1 浓度为 1.0 μg/ml 的毒死蜱液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of 1.0 μg/ml chlorpyrifos

1.3.2 水体中毒死蜱 DLLME 技术关键参数的优化 用池塘水配制浓度为 0.10 mg/L 的毒死蜱模拟水样,用于毒死蜱 DLLME 条件的优化。具体过程如下:将一定体积的萃取剂和分散剂分别加入到 15 ml 尖底具塞离心管中,轻轻摇匀,然后加入 10 ml 毒死蜱模拟水样,轻轻振荡,萃取剂均匀地分散在水相中,形成水、分散剂和萃取剂的乳浊液体系,室温放置 2 min。然后以 3 000 r/min 离心 2 min,萃取剂沉积在离心管底部,吸取沉积相到带支架的色谱自动进样瓶内,按方法 1.3.1 所述条件进行 HPLC 分析。试验设置不同种类和不同用量的萃取剂和分散剂,

以及不同盐浓度和 pH 的水体样品进行对比试验,以毒死蜥色谱峰面积为指标对上述条件进行优化。

1.3.3 水体中毒死蜥 DLLME-HPLC 分析技术的评价 用池塘水配制系列浓度的毒死蜥模拟水样,按优化的 DLLME 条件和方法 1.3.1 所述 HPLC 条件进行分析,建立基质标准曲线用于毒死蜥的定量分析,并以信噪比(S/N)为 3 所对应的水样毒死蜥浓度为检出限。用池塘水配制浓度为 0.01 mg/L、0.10 mg/L、1.00 mg/L 的水体模拟样品,按相同方法进行分析,以模拟样品分析的回收率评价方法的准确度,以回收率的变异系数评价方法的精密度。

2 结果与分析

2.1 水体中毒死蜥 DLLME 技术关键参数的优化

2.1.1 萃取剂类型及其用量的优化 根据 DLLME

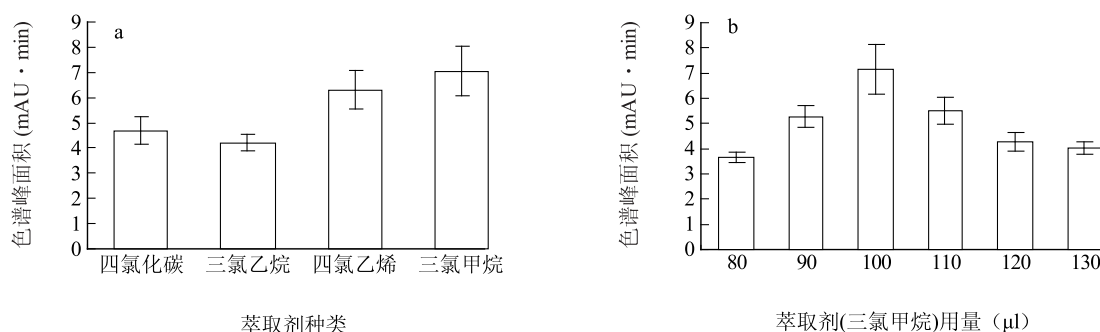


图2 萃取剂种类(a)及萃取剂(三氯甲烷)用量(b)对毒死蜥分散液相微萃取效果的影响($n=3$)

Fig.2 Effect of extraction agent variety (a) and volume (b) on DLLME of chlorpyrifos ($n=3$)

2.1.2 分散剂类型及其用量的优化 根据 DLLME 技术原理,分散剂应能完全溶解萃取剂,且易溶于水,分散剂作用是使萃取剂和水样溶液的接触面积最大,其在水中的溶解度越大,形成的液滴会越小,与目标物接触面积越大,萃取效率也越高^[11-14]。以 100 μ l 三氯甲烷作为萃取剂,分别考察了乙腈、丙酮、乙醇和甲醇 4 种分散剂(用量均为 1 000 μ l)对毒死蜥萃取效果的影响。结果表明,丙酮本身在 300 nm 处有较强吸收,不宜选用,其他 3 种分散剂中甲醇效果最佳(图 3a)。分散剂的体积大小将影响萃取剂在水中的分散程度,从而影响沉积体积的大小,进而影响萃取效率。因此,本研究进一步对甲醇的最佳用量进行了探讨。结果表明,毒死蜥色谱峰面积随着分散剂体积的增加而增加,这是由于随

技术原理,选择萃取剂的主要原则如下:密度必须大于水且不溶于水;对目标待测物的溶解能力大;还要有较好的色谱行为,不影响目标物的定性和定量分析^[11-14]。以 1 000 μ l 甲醇作为分散剂,分别考察了四氯化碳(密度 1.59 g/ml)、三氯乙烷(密度 1.35 g/ml)、二氯甲烷(密度 1.33 g/ml)、四氯乙烯(密度 1.63 g/ml)、三氯甲烷(密度 1.48 g/ml) 5 种萃取剂(用量均为 100 μ l)对毒死蜥的萃取效果。结果表明,除二氯甲烷外,其他 4 种萃取剂都能使毒死蜥得到富集,其中三氯甲烷效果最佳(图 2a)。在此基础上,进一步对三氯甲烷的最佳用量进行了探讨。结果表明,在分散剂体积一定时,随着萃取剂体积的增大,毒死蜥的色谱峰面积呈先增大后减小的趋势,用量为 100 μ l 时对毒死蜥的富集效果最佳(图 2b)。

甲醇体积增大,三氯甲烷在水中分散更充分,萃取效率也相对越高;甲醇用量为 1 200 μ l 时萃取效果达到最佳,进一步增大用量则沉积体积下降,影响进样要求,萃取效率也降低(图 3b)。

2.1.3 水体样品 NaCl 浓度与 pH 的优化 样品的 NaCl 浓度和 pH 能够影响 DLLME 富集效果^[14]。本研究以 1 200 μ l 甲醇为分散剂,100 μ l 三氯甲烷为萃取剂,进一步考察水样 NaCl 浓度和 pH 对毒死蜥萃取效果的影响。结果表明,当在水体样品中添加 0.2% ~ 20.0% 的 NaCl 时, DLLME 过程受到较大影响,难以获取到足量的沉积相用于后续 HPLC 分析,因此后续试验中不添加 NaCl。当水体 pH 在 5 ~ 10 时,毒死蜥的富集效果变化较大;在 6 ~ 8 时富集效果较为稳定;pH 为 7 时毒死蜥的富集效果最佳(图 4)。

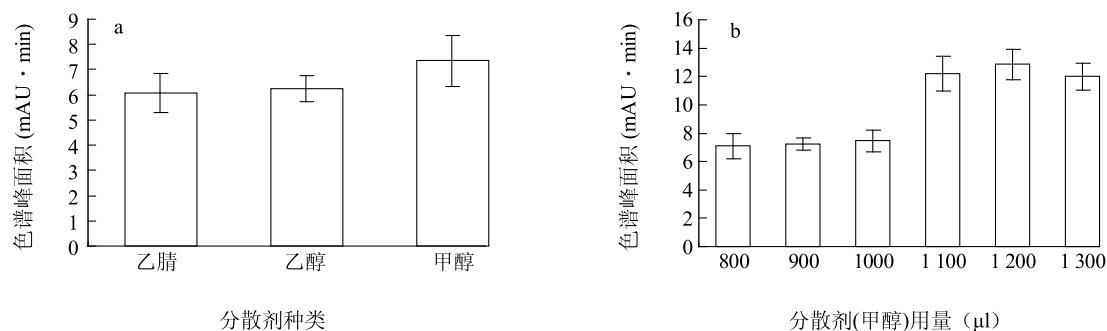


图3 分散剂种类(a)及分散剂(甲醇)用量(b)对毒死蜱分散液相微萃取效果的影响($n=3$)

Fig.3 Effect of dispersing agent variety (a) and volume (b) on DLLME of chlorpyrifos ($n=3$)

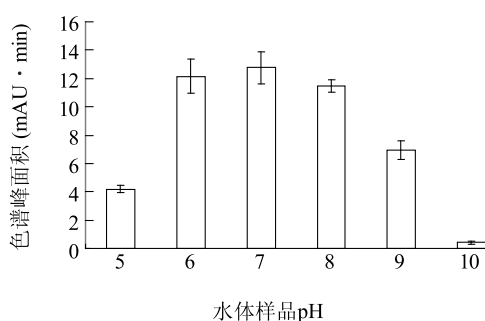


图4 水体样品 pH 对毒死蜱分散液相微萃取效果的影响($n=3$)

Fig.4 Effect of pH on DLLME of chlorpyrifos ($n=3$)

2.2 水体中毒死蜱 DLLME-HPLC 分析技术的评价

评价所建立的 DLLME-HPLC 分析技术对毒死蜱检测的有效性,进一步对该方法的灵敏度、准确度

和精密度进行了研究。用池塘水配制系列浓度的毒死蜱模拟水样,按优化的 DLLME 条件和 1.3.1 所述 HPLC 条件进行分析,得到毒死蜱定量分析的基质标准曲线为 $y = 113.5030x + 0.5165$, $R^2 = 0.9999$ (其中 y 为毒死蜱色谱峰面积, x 为水样中毒死蜱浓度)。逐步稀释模拟水体样品,按同样方法进行分析,当模拟水样毒死蜱浓度为 0.005 mg/L 时,其峰面积约为基线噪声的 3 倍,故确定该方法的最低检出限为 0.005 mg/L。对毒死蜱浓度为 0.01 mg/L, 0.10 mg/L, 1.00 mg/L 的水体模拟样品进行 5 次重复分析,得其回收率和变异系数(表 1),添加样品与空白水样的色谱图对比如图 5 所示。由表 1 可知,毒死蜱添加浓度为 0.01 ~ 1.00 mg/L 时,添加回收率高于 85%,变异系数低于 7.5%,说明所建立的方法具有较好的准确度和精密度。

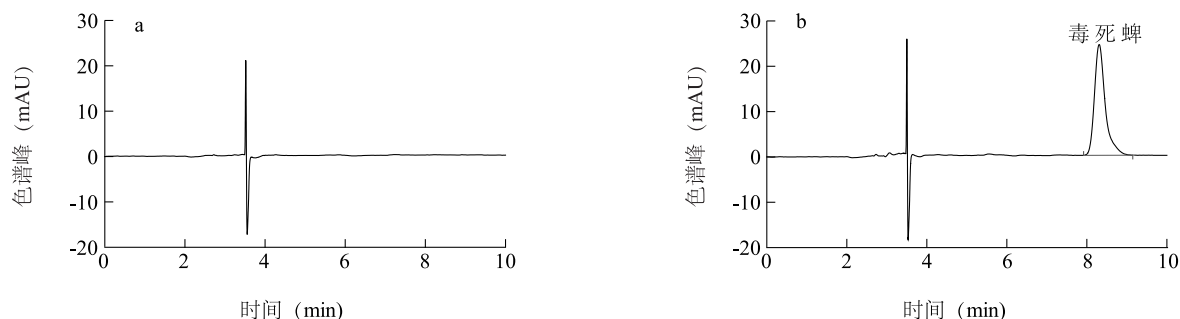


图5 空白水样(a)与毒死蜱添加样品(0.1 mg/L)(b)的色谱图对比

Fig.5 The chromatogram of blank water sample (a) and spiked water sample (b)

3 讨论

分散液相微萃取集采样、萃取和浓缩于一体,是

一种新型的样品前处理技术,与传统的萃取方法相比具有操作简单、快速、准确、成本低、对环境友好且回收率高和富集倍数高等特点,其在痕量分析领域

中展现出愈来愈广阔的应用前景。本研究建立了水体中毒死蜥 DLLME-HPLC 分析检测方法,其关键参数为:以 100 μl 三氯甲烷为萃取剂,1 200 μl 甲醇为分散剂,样品无需添加 NaCl,样品酸碱度控制在中性为宜。该方法的最低检测限为 0.005 mg/L,其准确度和精密度均能满足实际应用的要求。

表 1 水体中毒死蜥 DLLME-HPLC 分析法的添加回收率及变异系数 ($n=5$)

Table 1 Spiked recovery and its coefficient of variation of chlorpyrifos in water by DLLME-HPLC ($n=5$)

毒死蜥添加浓度 (mg/L)	平均添加回收率 (%)	回收率变异系数 (%)
0.01	95.31	5.52
0.10	87.68	4.48
1.00	101.37	7.29

参考文献:

- [1] 和晓彤. 农药残留分析前处理技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2011(17): 132-135.
- [2] 牛鹏飞,仇农学,郭玉蓉,等. 固相萃取结合高效液相色谱同时检测浓缩苹果汁中 6 种农药残留[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(4): 843-847.
- [3] ZHAO C L, DING R Y, HUO L G, et al. Determination of pesticide residues in tea by gas chromatography / triple quadrupole mass spectrometry with solid-phase extraction[J]. J AOAC Int, 2014, 97(4): 1001-1006.
- [4] 张艳,王松雪,孙长坡. 超临界流体萃取技术在粮食农药残留检测中的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 274-277.
- [5] CHIKUSHI H, HIROTA K, YOSHIDA N, et al. Simple water analysis of golf link pesticides by means of batch-wise adsorption and supercritical fluid extraction[J]. Talanta, 2009, 80(2): 738-743.
- [6] 罗美中,李苑雯,陈素娟,等. 固相微萃取-气相色谱-质谱法同时测定天然饮用水中 39 种有机污染物[J]. 理化检验:化学分册, 2013, 49(3): 329-333.
- [7] BASHEER C, ALNEDHARY A A, RAO B S, et al. Determination of carbamate pesticides using micro-solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2009, 16(2): 211-216.
- [8] 李星星,汪路路,孙福生. 基于离子液体的单滴液相微萃取-高效液相色谱法测定水中杀螨隆农药残留[J]. 分析试验室, 2011, 30(3): 73-76.
- [9] TSIROPOULOS N G, AMVRAZI E G. Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography[J]. J AOAC Int, 2011, 94(2): 634-644.
- [10] GONZÁLEZ-CURBELO M Á, HERNÁNDEZ-BORGES J, BORGES-MIQUEL T M, et al. Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in cereal-based baby foods and wheat flour by means of ultrasound-assisted extraction and hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography with nitrogen phosphorus detection[J]. J Chromatogr A, 2013, 1313: 166-174.
- [11] 张雪莲,焦必宁. 分散液相微萃取技术及其在食品和环境农药残留检测中的应用[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 307-313.
- [12] 苗雪雪,杨愿愿,刘登彪,等. 分散液相微萃取-气质联用法测定牛奶中酰胺类除草剂[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(2): 43-48.
- [13] 侯德坤,何江,张福金,等. 分散液-液微萃取技术在污染物分析中的应用[J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 606-614.
- [14] WU Q, ZHOU X, LI Y, et al. Application of dispersive liquid - liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography to the determination of carbamate pesticides in water samples[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393: 1755-1761.
- [15] 韩畅,朱鲁生,王军,等. HPLC 测定水体中毒死蜥及其有毒降解产物 TCP[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(7): 1552-1556.

(责任编辑:陈海霞)