

凝胶色谱净化-毛细管气相色谱法测定黄瓜、番茄 和青椒中 15 种有机磷农药

潘灿平, 王丽敏, 孔祥雨, 江树人, 钱传范

(中国农业大学应用化学学院, 北京 100094)

摘要 建立了凝胶色谱柱净化蔬菜样本, 毛细管气相色谱-火焰光度检测器测定 15 种有机磷农药的方法。用环己烷-乙酸乙酯(体积比为 1:1)淋洗液以 1 mL/min 的流量洗脱凝胶色谱柱(10 mm i.d. × 200 mm, SX-3), 分别用气相色谱检测各段流出液中农药的含量, 得到了 15 种有机磷农药的凝胶色谱流出曲线。采用该方法检测, 15 种有机磷农药在黄瓜、番茄和青椒中的最小检出质量比均低于 5×10^{-3} mg/kg, 在蔬菜中不同添加浓度的平均回收率为 77.8% ~ 106%, 相对标准偏差(RSD)为 0.10% ~ 16.6%, 其准确度和精密度均达到了农药残留分析的要求。

关键词 凝胶色谱; 有机磷农药; 蔬菜; 净化

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2002)06-0565-04

Determination of 15 Organophosphorus Pesticides in Cucumber, Tomato and Pepper Samples by Capillary Gas Chromatography with Gel Permeation Chromatographic Clean-up

PAN Can-ping, WANG Li-min, KONG Xiang-yu, JIANG Shu-ren, QIAN Chuan-fan

(Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Fifteen organophosphorus pesticide residues in vegetable samples were extracted and cleaned-up by gel permeation chromatography and detected by capillary GC-FPD. An alternative validation method was established based on GC-NPD detection on an HP-1701 column. The eluting profiles of 15 compounds on a gel permeation column (10 mm i.d. × 200 mm, SX-3) eluted by 1 mL/min cyclohexane-ethyl acetate (volume ratio of 1:1) were established according to GC quantitation. Minimum detection limits of this method were between 5×10^{-4} mg/kg to 5×10^{-3} mg/kg. The average fortified recoveries and coefficients of variation of the method were determined. The results show that recoveries are between 77.8% - 106%, with an average RSD of 0.10% - 16.6%.

Key words: gel permeation chromatography; organophosphorus pesticide; vegetable; cleaned-up

目前,在检测蔬菜等植物样本中的农药残留时,提取净化手段大都采用液-液分配,需要耗费大量时间和溶剂,而且由于大部分有机磷农药如甲胺磷、敌百虫、敌敌畏等极性较大,使用液-液分配法时容易造成农药损失,影响回收率。利用凝胶色谱作为蔬菜样本的净化技术在国内报道较少^[1-4],国外在这方面开展了一些研究工作^[5-8],但通常采用体积较大的凝胶色谱柱(25 mm i.d. × 500 mm),需要消耗大量的有机溶剂。本文探讨了几种蔬菜样本的匀浆提取-凝胶色谱柱净化方法,对 15 种有机磷农药进行流出曲线测定和添加回收率测定。采用小型凝胶色谱柱(10 mm i.d. × 200 mm),装填聚苯乙烯凝胶

SX-3,研究了 15 种有机磷农药在凝胶色谱柱上的流出规律及净化效果。本文还比较了不同极性的色谱柱对有机磷农药的分离效果,确定了采用气相色谱-火焰光度检测器(GC-FPD)进行有机磷农药多残留分析及采用气相色谱-氮磷检测器(GC-NPD)进行农药确证的色谱条件。

1 实验部分

1.1 仪器及设备

DS200 型高速组织捣碎机(江苏省江阴市周庄科研器械厂);KL-SX-3 型半自动凝胶色谱仪;玻璃凝胶柱:10 mm i.d. × 200 mm;BUCHI Rotavapor

收稿日期 2002-03-08

作者简介 潘灿平,男,1970 年生,博士,副教授,全国农药标准化委员会委员,研究方向:农药残留分析、农药毒理、食品安全, Tel: (010) 62892949, E-mail: zcanping@mail.cau.edu.cn.

资助项目 本研究得到世界粮农组织/国际原子能机构(FAO/IAEA)协作项目(项目号:CRP 9903)和国家科技攻关计划“农药污染控制技术”研究(课题编号:2002BA516A01)的支持。

R-114 旋转蒸发仪;电子天平(精确到 0.000 1 g,德国 Sartorius);电子天平(精确到 0.01 g,德国 Sartorius);SHIMADZU GC-14A 气相色谱仪带 FPD(P) 及 C-R6A 记录仪(岛津公司);Agilent-4890 气相色谱仪带 NPD(惠普公司)。

色谱柱:RTX-1 30 m×0.25 mm i.d.×0.25 μm 熔融石英毛细管柱(Restek 公司),OV-101 25 m×0.25 mm i.d.×0.25 μm 熔融石英毛细管柱(岛津公司),HP-5 15 m×0.53 mm i.d.×1.5 μm 熔融石英毛细管柱(惠普公司),HP-1701 30 m×0.25 mm i.d.×0.25 μm 熔融石英毛细管柱(惠普公司)。

1.2 试剂和标样

丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯、环己烷、正己烷等(分析纯,重蒸馏);聚苯乙烯凝胶 Bio Beads SX-3 (200 目~300 目);碳酸氢钠、无水硫酸钠、氯化钠(分析纯)。

甲胺磷(98.3%)、乙酰甲胺磷(95%)、敌敌畏(99%)、敌百虫(90%)、甲拌磷(98%)、对硫磷(83%)、甲基对硫磷(99%)、水胺硫磷(99.5%)、甲基异柳磷(97%)、二嗪磷(95.02%)、杀螟硫磷(98%)、马拉硫磷(91%)、乐果(99%)、毒死蜱(99%)和三唑磷(98%)。

1.3 农药标准工作溶液的配制

以重蒸乙酸乙酯为溶剂将各农药标准品配制成 1 g/L 的母液,备用。再取一定体积的农药标准品母液,混合后用正己烷定容,配制成混合标准溶液 A 和 B,用于仪器分析和方法研究。

混合标样 A 的组成:甲胺磷、敌敌畏、敌百虫、乙酰甲胺磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷、马拉硫磷、对硫磷、水胺硫磷和甲基异柳磷。混合标样 B 的组成:甲拌磷、二嗪磷、乐果、毒死蜱和三唑磷。

1.4 色谱条件

1.4.1 GC-FPD 测定

仪器:SHIMADZU GC-14A-FPD(P)。

进样口温度:240℃;检测器温度:250℃;衰減 2³;纸速:2 mm/min;灵敏度:10¹;气体压力:H₂ 117.7 kPa, Air 78.8 kPa;气体流速:N₂ 10 mL/min,补充气 N₂ 30 mL/min,进样量:1 μL。

条件 A:色谱柱为 RTX-1 熔融石英毛细管柱;柱温 60℃(1 min) $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 110℃(1 min) $\xrightarrow{10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 150℃(1 min) $\xrightarrow{4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 230℃(5 min)。条件 B:色谱柱为 OV-101 熔融石英毛细管柱;柱温 50℃(2 min) $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 110℃(1 min) $\xrightarrow{2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 140℃(1 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 220℃(10 min)。条件 C:色谱柱为 HP-5

熔融石英毛细管柱;柱温 50℃(1 min) $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 130℃(2 min) $\xrightarrow{2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 140℃(1 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 220℃(5 min)。

1.4.2 GC-NPD 确证

仪器:Agilent 4890 GC-NPD。

条件 D:色谱柱为 HP-1701 熔融石英毛细管柱,进样口温度 240℃,检测器温度 260℃,柱温 80℃(1 min) $\xrightarrow{10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 180℃(1 min) $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 240℃(5 min) $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 240℃(15 min);气体压力 H₂ 135 kPa, Air 290 kPa, N₂ 流速 1 mL/min;分流比 30:1;补充气 N₂ 流速 30 mL/min,进样量 1 μL。

1.5 凝胶色谱净化

称取 7 g 聚苯乙烯凝胶 SX-3 浸泡在 50 mL 环己烷-乙酸乙酯(体积比为 1:1,下同)溶液中至少 5 h,吸涨后的凝胶仍保持在液面下。在半自动凝胶色谱仪上,利用 N₂ 的压力将吸涨的凝胶转移到玻璃柱(10 mm i.d.×200 mm)内,用环己烷-乙酸乙酯溶液作淋洗剂,在 N₂ 的压力作用下流经凝胶柱,调节流速至 1 mL/min,稳定后待用。

吸取 0.5 mL 的 10 mg/L 有机磷农药混合标样,直接注入凝胶色谱柱中,用环己烷-乙酸乙酯溶液淋洗,每 1 mL 流出液收集于 1 个试管中,共收集 20 mL,用气相色谱检测各段流出液中农药的含量,制作有机磷农药在凝胶色谱上的流出曲线,确定淋洗溶剂使用量及收集体积。

准确称取切碎的蔬菜样本 30 g、碳酸氢钠 5 g、无水硫酸钠 30 g,放入组织捣碎机中,加入 60 mL 乙酸乙酯,匀浆 1 min。将样本转移至 250 mL 离心管中,以 2 300 r/min 离心 10 min。吸取上清液 20 mL 转移至 100 mL 圆底烧瓶,减压浓缩至近干,用氮气吹干,再用环己烷-乙酸乙酯溶液定容至 2 mL,作为提取液。取上述提取液 1 mL 进样到凝胶渗透色谱柱上,开启压力保持流动相流速为 1 mL/min,收集第 10 mL~第 18 mL 流出物。在 40℃ 下用旋转蒸发仪浓缩淋洗液至近干,再用氮气吹干,用乙酸乙酯定容至 1 mL 待测。

2 结果与讨论

2.1 不同色谱条件下有机磷农药的保留时间

通过对不同色谱条件下有机磷农药保留值的比较,发现色谱柱种类不同会导致农药的保留时间差异显著,还会出现色谱峰顺序颠倒现象。如 HP-1701 柱与其他 3 种柱相比,一些峰的顺序发生了变化,OV-101 柱与 RTX-1 及 HP-5 柱都是非极性柱,

各农药的出峰次序基本相同,只有乐果与甲拌磷的顺序有变化。用 RTX-1 和 OV-101 柱分离有机磷农药时,由于柱吸附作用,极性偏强的甲胺磷、乙酰甲胺磷、乐果等农药的色谱峰有不同程度的拖尾现象,而且低浓度的标准溶液信号不鲜明,因此毒死蜱、对硫磷和水胺硫磷的分离效果不好,影响检测。用 HP-5 柱检测时(见图 1),消除了甲胺磷、乙酰甲胺磷、乐果等色谱峰的拖尾现象,只是毒死蜱与对硫磷仍无法很好地分离,因此把乐果、毒死蜱和三唑磷编入标样 B 组进行分析。采用 HP-1701 柱分离、NPD 检测,有机磷农药的分离效果最佳,信号响应值也高,有较好的灵敏度。然而因 NPD 在检测蔬菜样本时,对有机磷农药的选择性不如 FPD,因而对经凝胶色谱净化后的蔬菜样本采用方法 C 即 HP-5 色谱柱分离、FPD 检测,并将有机磷农药分成两组进行回收率试验。用方法 D 中 GC-NPD(HP-1701 柱)进行未知物定性确认,结果见图 2。

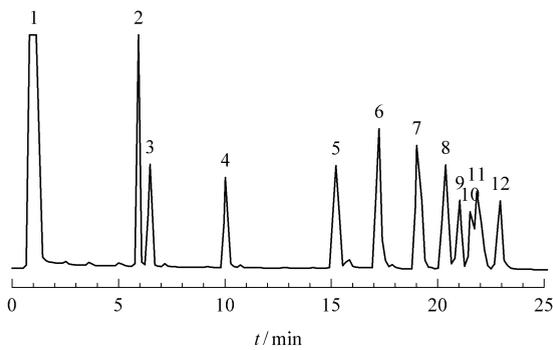


图 1 有机磷农药混合标样 A 的 GC-FPD 色谱图

Fig.1 GC-FPD chromatogram of organophosphorus pesticides

Column: HP-5, temperature: 50 °C (1 min) $\xrightarrow{5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 130 °C (2 min) $\xrightarrow{2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 140 °C (1 min) $\xrightarrow{20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 220 °C (5 min).

1. trichlorfon; 2. methamidophos; 3. dichlorvos; 4. acephate; 5. phorate; 6. diazinon; 7. parathion-methyl; 8. fenitrothion; 9. malathion; 10. parathion; 11. isocarbophos; 12. isofenphos-methyl.

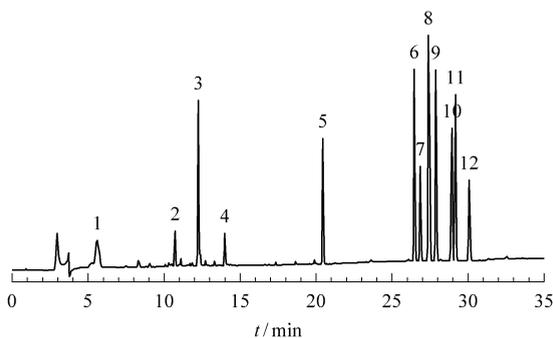


图 2 有机磷农药混合标样 A 的 GC-NPD 色谱图

Fig.2 GC-FPD chromatogram of organophosphorus pesticides

Column: HP-1701, temperature: 80 °C (1 min) $\xrightarrow{10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 180 °C (1 min) $\xrightarrow{5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 240 °C (5 min) $\xrightarrow{5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 240 °C (15 min).

1. trichlorfon; 2. acephate; 3. dichlorvos; 4. methamidophos; 5. phorate; 6. diazinon; 7. parathion-methyl; 8. malathion; 9. fenitrothion; 10. parathion; 11. isofenphos-methyl; 12. isocarbophos.

表 1 列出的是不同色谱条件下各种有机磷农药相对于甲拌磷保留时间的相对值。

表 1 不同色谱条件下有机磷农药相对保留时间的比较

Table 1 Relative retention times of organophosphorus pesticides under different chromatographic conditions

Pesticide	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾	D ⁴⁾
Trichlorfon	0.179	0.131	0.067	0.274
Methamidophos	tailed peak	0.390	0.388	0.684
Dichlorvos	0.468	0.415	0.423	0.599
Acephate	tailed peak	0.583	0.657	0.525
Phorate	1(15.41 min)	1(19.33 min)	1(15.20 min)	1(20.45 min)
Diazinon	1.096	1.1691	1.133	1.070
Parathion-methyl	1.178	1.298	1.249	1.313
Fenitrothion	1.230	1.400	1.339	1.363
Malathion	1.249	1.447	1.382	1.339
Parathion	1.283	1.473	1.415	1.451
Isocarbophos	1.287	1.478	1.435	1.470
Isofenphos-methyl	1.331	1.524	1.508	1.427
Dimethoate	1.030	0.981	1.037	1.206
Chlorpyrifos	1.283	1.426	1.414	1.294
Triazophos	1.631	1.651	1.806	2.028

1) A: Column, RTX-1; temperature, 60 °C (1 min) $\xrightarrow{5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 110 °C (1 min) $\xrightarrow{10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 150 °C (1 min) $\xrightarrow{4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 230 °C (5 min). 2) B: column, OV-101; temperature, 50 °C (2 min) $\xrightarrow{5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 110 °C (1 min) $\xrightarrow{2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 140 °C (1 min) $\xrightarrow{20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 220 °C (10 min). 3) C: the conditions as in Fig. 1. 4) D: the conditions as in Fig. 2.

2.2 凝胶色谱净化

空白黄瓜样本经 GPC 净化后 GC-FPD 测定谱图见图 3。应用本方法对胡萝卜和甘蓝等蔬菜样本进行净化,同样能得到很好的净化效果。

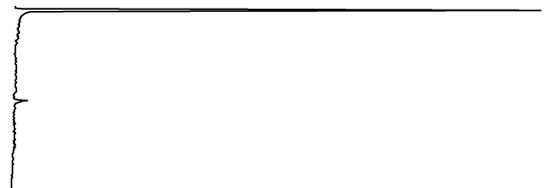


图 3 空白黄瓜样本经 GPC 净化后 GC-FPD 测定谱图

Fig.3 GC-FPD chromatogram of extract of blank cucumber sample after cleaned-up by GPC

2.3 多种有机磷农药在凝胶色谱柱的流出规律

为了观察聚苯乙烯凝胶 SX-3 对有机磷杀虫剂的分离净化,将 A 组、B 组有机磷农药混合标样直接过凝胶色谱柱,用环己烷-乙酸乙酯溶液作淋洗液,以 1 mL/min 的流速洗脱,每 1 mL 流出液收集于单个试管中,分别用气相色谱检测各段流出液中农药的含量,结果见表 2。

从各农药的凝胶色谱流出曲线可以看出,15 种有机磷农药在凝胶色谱柱上都是在第 10 mL ~ 15

mL 时流出,因而在样本过凝胶柱净化时,只需收集第 9 mL~16 mL,就可以对蔬菜样本中的农药有较高的回收率。

2.4 有机磷农药在蔬菜样本中的最小检出浓度

采用 GC-FPD 方法检测,结果 15 种有机磷农药在黄瓜、番茄和青椒中的最小检出质量比分别为:敌百虫 5×10^{-4} mg/kg,甲胺磷 5×10^{-3} mg/kg,敌敌

畏 1×10^{-3} mg/kg,乙酰甲胺磷 5×10^{-3} mg/kg,甲拌磷 1×10^{-3} mg/kg,二嗪磷 2×10^{-3} mg/kg,甲基对硫磷 2×10^{-3} mg/kg,杀螟松 2×10^{-3} mg/kg,马拉硫磷 1×10^{-3} mg/kg,对硫磷 2×10^{-3} mg/kg,水胺硫磷 1×10^{-3} mg/kg,甲基异柳磷 1×10^{-3} mg/kg,乐果 2×10^{-3} mg/kg,毒死蜱 2×10^{-3} mg/kg,三唑磷 5×10^{-3} mg/kg。

表 2 15 种有机磷农药在 SX-3 凝胶色谱柱上的流出规律

Table 2 Eluting profile of 15 organophosphorus pesticides on an SX-3 gel permeation chromatographic column

Pesticide	Pesticide eluted (%)					
	9 mL-10 mL	10 mL-11 mL	11 mL-12 mL	12 mL-13 mL	13 mL-14 mL	14 mL-15 mL
Trichlorfon	26.1	42.9	25.0	4.9	1.1	- ¹⁾
Methamidophos	10.9	51.9	32.0	6.0	-	-
Dichlorvos	4.6	40.5	40.3	12.1	2.5	-
Acephate	11.4	50.8	27.7	10.1	-	-
Phorate	7.2	23.9	54.8	12.4	1.6	-
Diazinon	8.2	43.9	40.6	6.9	0.5	-
Parathion-methyl	1.1	30.6	37.3	22.8	7.2	1.0
Fenitrothion	0.7	24.7	34.6	28.0	10.3	1.8
Malathion	10.5	51.0	32.6	5.9	-	-
Parathion	5.3	46.4	38.8	9.5	-	-
Isocarbophos	26.6	50.7	22.7	-	-	-
Isofenphos-methyl	25.0	47.4	25.6	2.0	-	-
Dimethoate	-	16.6	64.2	11.4	6.6	1.2
Chlorpyrifos	-	2.9	17.8	52.2	21.9	5.2
Triazophos	-	17.0	55.7	19.5	6.5	1.3

1) - : not detected.

2.5 有机磷农药在蔬菜样本中的添加回收率

用 GC-FPD 方法检测黄瓜、番茄和青椒中 15 种有机磷农药,其添加回收率和相对标准偏差(RSD)结果见表 3。

表 3 有机磷农药(0.05 mg/kg)在经凝胶色谱净化后的蔬菜中的添加回收率(n=3)

Table 3 Fortified recoveries of 15 organophosphorus pesticides (0.05 mg/kg) in vegetables by GPC method (n=3) %

Pesticide	Cucumber		Tomato		Bell pepper	
	recovery	RSD	recovery	RSD	recovery	RSD
Trichlorfon	95.14	6.35	81.62	4.92	91.87	6.25
Methamidophos	77.80	4.13	83.03	7.38	85.23	9.50
Dichlorvos	100.12	0.33	97.83	5.93	106.38	6.54
Acephate	80.62	5.58	78.73	3.12	81.66	5.22
Phorate	86.04	14.18	87.94	7.57	83.14	2.66
Diazinon	92.64	2.37	100.63	3.70	94.07	12.44
Parathion-methyl	82.77	4.43	90.30	5.71	94.87	1.59
Fenitrothion	87.80	1.26	93.25	8.02	86.71	2.92
Malathion	83.94	3.67	99.35	9.62	97.26	0.70
Isocarbophos	90.06	5.92	100.21	11.12	89.36	10.79
Isofenphos-methyl	82.90	2.58	92.64	10.02	80.90	6.25
Dimethoate	92.20	8.94	98.35	2.52	96.34	2.07
Chlorpyrifos	81.21	0.43	83.46	3.78	86.77	6.16
Triazophos	94.91	0.1	93.18	1.56	101.46	4.47
Parathion	93.80	7.95	86.90	8.31	94.05	16.64

致谢 感谢世界粮农组织/国际原子能机构(FAO/IAEA)农业化学品实验室主任 Ambrus 博士提供有关技术资料和指导。

参考文献:

[1] LI Hong-bo, WANG Xu-qing. Pesticides, 1993, 3(2): 12
李洪波,王绪卿. 农药, 1993, 3(2): 12

[2] YU Jian-xin, WU Cai-ying. Pesticides, 1998, 37(1): 26
余建新,吴采樱. 农药, 1998, 37(1): 26

[3] ZHANG Qiao, LI Wei-ge, XIE Fa-ming, Han Hua-qiong. Scientia Agricultura Sinica, 1987, 20(1): 75
张乔,李伟格,谢发明,韩华琼. 中国农业科学, 1987, 20(1): 75

[4] ZHUANG Wu-ji, ZHOU Yu, LIU Sheng-li. Journal of Instrumental Analysis, 1995, 14(3): 68
庄无忌,周昱,刘胜利. 分析测试学报, 1995, 14(3): 68

[5] Sannino A, Mambriani P, Bandini M, Bolzoni L. J AOAC Int, 1995, 78(6): 1502

[6] Gelsomino A, Petrovicova B, Tiburtini S, Magnani E, Felici M. J Chromatogr A, 1997, 78(1): 105

[7] Dejonckheere V, Steurbaut W, Drieghe S, Verstraeten R, Braeckman H. J AOAC Int, 1996, 79(1): 97

[8] Leoni V, Caricchia A M, Chiavarini S. J AOAC Int, 1992, 75(3): 511