

快速溶剂萃取-高效液相色谱法测定含脂羊毛中 残留的除虫脲和杀铃脲

樊苑牧*, 黄绍棠, 俞雪钧, 顾晓俊, 裘亚钧, 陈树兵, 房科腾, 陈俊
(宁波出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315012)

摘要: 建立了快速溶剂萃取-高效液相色谱(ASE-HPLC)测定含脂羊毛中除虫脲、杀铃脲残留量的方法。以正己烷饱和的乙腈为萃取剂,在80℃、10.34 MPa条件下用快速溶剂萃取仪提取样品中的目标物,提取液经冷冻除脂、浓缩及Waters Plus Silica柱净化后,采用Waters Atlants dC₁₈色谱柱分离,以乙腈和水为流动相进行梯度洗脱,二极管阵列检测器于254 nm处检测。结果表明,在0.1~10.0 mg/L范围内,除虫脲、杀铃脲的峰面积与其质量浓度的线性关系良好,相关系数均大于0.999 9,定量检出限($S/N \geq 10$)分别为0.05、0.04 mg/kg。该方法具有操作简便、快速、灵敏度高等特点,完全能满足含脂羊毛中除虫脲、杀铃脲残留初筛检测的要求。

关键词: 快速溶剂萃取; 高效液相色谱法; 除虫脲; 杀铃脲; 含脂羊毛; 杀虫剂

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)04-0463-04 栏目类别: 研究论文

Determination of diflubenzuron and triflumuron residues in greasy wool by accelerated solvent extraction technique and high performance liquid chromatography

FAN Yuanmu*, HUANG Shaotang, YU Xuejun, GU Xiaojun, QIU Yajun, CHEN Shubing, FANG Keteng, CHEN Jun

(Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, China)

Abstract: A method for the determination of diflubenzuron and triflumuron residues in greasy wool was developed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with accelerated solvent extraction (ASE). The diflubenzuron and triflumuron residues were extracted with acetonitrile saturated with *n*-hexane at 80 °C and 10.34 MPa. The extract was pretreated by a series of procedures such as freezing-lipid filtration, concentration and purification by solid-phase extraction prior to the determination with HPLC. The target analytes were separated on a Waters Atlants dC₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), gradiently eluted with acetonitrile and water as the mobile phases and detected by a photodiode array detector (DAD) at 254 nm. The linear ranges were 0.1 – 10.0 mg/L. There were good linearity between the peak areas and concentrations in the linear range for the analytes, and the correlation coefficients of diflubenzuron and triflumuron were higher than 0.999 9. The limits of quantification for diflubenzuron and triflumuron were 0.05 and 0.04 mg/kg ($S/N \geq 10$), respectively. The method is simple, rapid, sensitive and suitable for preliminary screening of diflubenzuron and triflumuron residues in greasy wool.

Key words: accelerated solvent extraction (ASE); high performance liquid chromatography (HPLC); diflubenzuron; triflumuron; greasy wool; pesticide

除虫脲、杀铃脲是20世纪70年代开始开发的新型杀虫剂,均为苯甲酰脲类杀虫剂,具有胃毒和触杀作用。其作用机理是通过抑制几丁质在幼虫体内

的生物合成而使昆虫中毒,因此国外将其作为昆虫生长调节剂用来控制羊毛中虱或大头苍蝇等寄生虫^[1,2]。1992年国际羊毛局为关注生态环境,开始

* 通讯联系人: 樊苑牧, 副主任技师。E-mail: fym1112@sina.com.

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目(2006IK021)。

收稿日期: 2009-02-19

对含脂羊毛进行药物残留检测,1994年在羊毛中检出除虫脲、杀铃脲;2004~2005年度澳大利亚产含脂羊毛中除虫脲残留量平均为7.2 mg/kg,最高残留量达140 mg/kg,杀铃脲残留量平均为12.3 mg/kg,最高残留量达260 mg/kg^[3]。欧盟有关纺织品生态标签(Eco-label)标准的指令(2002/371/EC)和国际纺织品生态学研究检测协会的生态纺织品标准100(Oeko-Tex Standard 100)都对杀虫剂在羊毛或纺织品中的残留提出了限量要求,2007年最新修订的Eco-label标准规定昆虫生长调节剂在含脂羊毛及其他含角蛋白纤维中的残留量不得超过2 mg/kg^[4]。

目前国内关于含脂羊毛中除虫脲、杀铃脲残留量的检测方法报道较少^[5-7]。缪翔等^[5]采用索氏提取、高效液相色谱法(HPLC)测定;国际毛纺织组织(IWTO)于2006年5月公布的检测方法(IWTO RWG04)^[8]则采用振摇过夜提取、高效液相色谱法测定。而上述方法提取时间长、消耗试剂多,不能适应目前快速、简便、环保等检测要求,因此建立快速、便捷的方法十分必要。快速溶剂萃取(ASE)技术具有萃取时间短、穿透能力强、溶解力大、加快分析物解吸、提取率高等优点,本文参考国内外有关报道^[5-14],建立了采用ASE-HPLC测定含脂羊毛中除虫脲、杀铃脲残留量的方法。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

Dionex ASE 200 快速溶剂萃取仪(美国 Dionex 公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(DAD)(美国 Agilent 公司);Sigma-3 K 台式高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);QL-901 旋涡混合器(其林贝尔仪器制造公司);B-490 型旋转蒸发仪(德国 BüCHI 公司);恒温水浴、固相萃取仪(美国 Supelco 公司);N-EVAP™ 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司)。

除虫脲、杀铃脲标准品(Dr. Ehrenstorfer 公司);乙腈、正己烷、二氯甲烷(农残级,美国 Tedia 公司);无水硫酸钠、石英砂(分析纯,上海国药集团);Waters Plus Silica 固相萃取(SPE)柱(500 mg,美国 Waters 公司)。

样品:编号为 060403,060803,060612,060904,071031,071012 的含脂羊毛样品由利华(宁波)羊毛工业有限公司提供。

1.2 样品前处理

提取:萃取池底部放入玻璃纤维滤纸片,加入少许石英砂和无水硫酸钠;称取 2 g(精确到 0.01 g)

含脂羊毛或羊毛屑样品置于萃取池中,其上面再加少许无水硫酸钠,放入 ASE 仪中萃取。萃取溶剂为正己烷饱和的乙腈,提取温度为 80 ℃,压力为 10.34 MPa,加热时间为 5 min,静态萃取时间为 5 min,萃取溶剂冲洗用量为池体积的 60%,吹扫时间为 120 s,循环萃取 2 次。将收集瓶中的全部液体放进 -30 ℃ 冰箱中冷冻 3 h。冷冻液冷冻离心后过滤于鸡心瓶中,滤液经旋转蒸发、浓缩至干,残余物中加 1.5 mL 正己烷溶解,待净化。

净化:先用 5 mL 二氯甲烷、5 mL 正己烷淋洗 Waters Plus Silica 柱,然后将上述提取液上样,弃去流出液,用 10 mL 二氯甲烷洗脱并收集洗脱液后置于 40 ℃ 水浴中用氮气吹干,残余物中加入 1 mL 乙腈-水(体积比为 75:25)溶液溶解,过 0.45 μm 滤膜,滤液用于 HPLC 测定。

1.3 色谱条件

色谱柱:Waters Atlantis dC18(250 mm × 4.6 mm 5 μm);柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;流动相:A 相为乙腈,B 相为水;梯度洗脱程序:0→9 min,75% A;9→10 min,75% A→100% A;11→24 min,100% A;24→25 min,100% A→75% A;检测波长 254 nm;进样量 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择

除虫脲、杀铃脲两者的化学性质极为相似,均为弱极性,在水中微溶,易溶于极性溶剂(如乙腈、二甲基砜),也可溶于一般极性溶剂(如乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醇)。因此在参考国内外有关除虫脲、杀铃脲及含脂羊毛中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯的报道^[5-14]基础上,考察了用 ASE-HPLC 测定含脂羊毛中除虫脲、杀铃脲残留量的效果。为了获得好的萃取效果,考察了 3 种不同的萃取条件(10.34 MPa 与 50 ℃,10.34 MPa 与 80 ℃,12.41 MPa 与 80 ℃)的萃取效果,发现后两种条件下的萃取效果基本一致,均好于第一种,因此本法选择在 10.34 MPa、80 ℃ 条件下进行萃取。

含脂羊毛中含有 10%~15% 油脂,在萃取时几乎可全部被提取出来,因此需要除脂。目前常用的除脂方法为凝胶渗透色谱(GPC),但是该法的溶剂消耗比较大,每份样品所需溶剂在 100 mL 以上,并且仍有少部分油脂不能去除^[7]。而 Hong 等^[9]采取将提取液放入 -24 ℃ 冰柜中冷冻的方法可去除 92% 的油脂。考虑到含脂羊毛提取液中的油脂在乙腈中的溶解度低,且在低温时会析出,因此本文试验了 GPC 法和冷冻法除脂,并进行效果比较。实验结

果表明,冷冻法的除脂效率优于 GPC 法,同时节省了大量的有机溶剂,达到了高效、环保的目的。

2.2 不同提取方法的比较

文献[5,6]采用索氏提取法,以正己烷-乙醚(体积比为2:1)为提取剂,提取时间为4 h,于4℃下冷藏12 h除脂,前处理所用试剂的总量约为140 mL;文献[7]采用的提取方法与文献[5,6]的方法相同,但采用GPC法除脂,消耗试剂约为380 mL;文献[8]以5%乙醚正己烷为溶剂,振摇提取,提取时间约为15 h,GPC法除脂,所用试剂总量约为150 mL。上述提取及除脂方法所需时间均较长,溶剂消耗量大。而本文采用ASE提取,提取剂为正己烷饱和的乙腈,提取时间只需30 min;于-30℃冷冻3 h除脂,大大提高了效率,且只需60 mL试剂。

与其他方法相比,本文方法具有快速、简便、试剂用量少等特点。

2.3 HPLC 条件的选择

本文选用 Waters Atlantis dC₁₈柱是因为该柱适合极性化合物的分离,具有对极性化合物保留能力强、适合以100%水为流动相、低pH条件下色谱柱寿命长、色谱峰形优异、重现性好等特点。本文选用乙腈和水为流动相进行梯度洗脱,使除虫脲、杀铃脲在7 min之前全部出峰,且能很好地与杂质峰相分离;与文献[5-7]中杀铃脲需要40 min才出峰相比,大大节省了分析时间和溶剂消耗。

在本文确定的色谱条件下测定除虫脲和杀铃脲标准溶液、羊毛样品及加标羊毛样品的色谱图如图1所示。

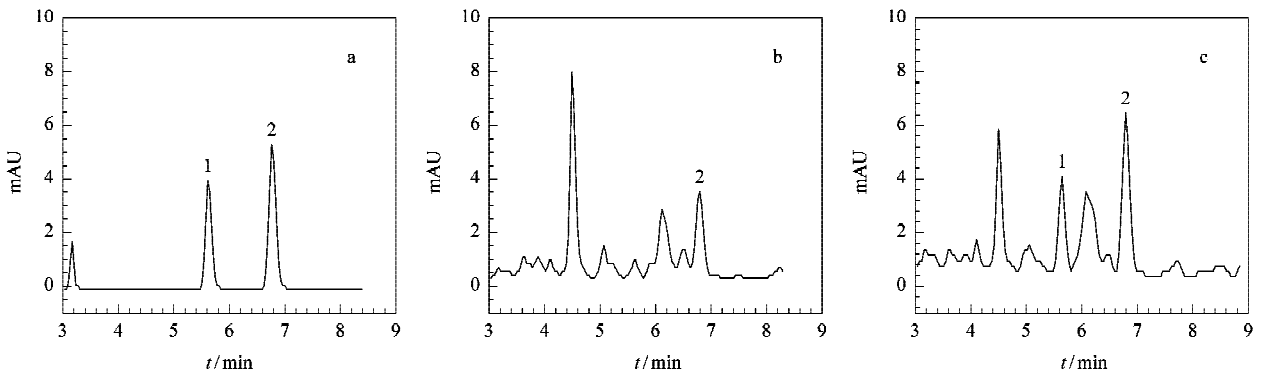


图1 (a)除虫脲、杀铃脲标准溶液(1.0 mg/L)、(b)羊毛样品及(c)加标羊毛样品(0.25 mg/kg)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) standard solution of diflubenzuron and triflumuron (1.0 mg/L), (b) a greasy wool sample and (c) the greasy wool sample spiked with diflubenzuron and triflumuron of 0.25 mg/kg
1. diflubenzuron; 2. triflumuron.

2.4 线性关系和定量检出限

配制除虫脲、杀铃脲质量浓度分别为0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L的标准溶液,在本文确定的色谱条件下进行测定,以分析物的峰面积Y对其质量浓度X(mg/L)进行线性回归,得到的回归方程分别为 $Y = 35.56X + 0.33$ (除虫脲)、 $Y = 48.32X + 0.54$ (杀铃脲),相关系数均大于0.9999。以 $S/N \geq 10$ 计,本方法的除虫脲和杀铃脲的定量检出限分别为0.05和0.04 mg/kg。

2.5 精密度和回收率

在空白含脂羊毛样品中分别添加0.25, 0.5, 1.0 mg/kg 3个水平的除虫脲、杀铃脲标准品,按1.2节所述方法进行处理后分别测定加标回收率,每个加标水平样品测定3次,结果见表1。从表1可以看出,除虫脲的平均加标回收率为92.9%~107.0%,相对标准偏差(RSD)为6.3%~12.7%;杀铃脲的平均加标回收率为87.1%~106.1%,RSD为4.3%~9.4%,表明本法完全可用于含脂羊毛中除虫脲、杀铃脲的初筛检测。

表1 空白含脂羊毛样品中除虫脲、杀铃脲的加标回收率($n=3$)

Table 1 Spiked recoveries of diflubenzuron and triflumuron in a blank greasy wool sample ($n=3$)

Pesticide	Spiked/ (mg/kg)	Found/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %
Diflubenzuron (除虫脲)	0.25	0.232	92.9	12.7
	0.5	0.471	94.2	6.3
	1.0	1.07	107.0	9.7
Triflumuron (杀铃脲)	0.25	0.218	87.1	9.4
	0.5	0.477	95.4	4.3
	1.0	1.06	106.1	6.2

2.6 样品测定

应用本方法对含脂羊毛中的除虫脲、杀铃脲残留量进行了测定。根据色谱峰的保留时间定性,峰面积定量,结果见表2,羊毛样品的色谱图见图2。

表2 含脂羊毛样品中除虫脲和杀铃脲的残留量

Table 2 Contents of diflubenzuron and triflumuron residues in greasy wool samples mg/kg

Pesticide	Sample No.					
	060403	060803	060612	060904	071031	071012
Diflubenzuron	10.2	27.4	5.4	23.5	17.0	47.6
Triflumuron	27.6	110.4	62.4	59.2	21.1	21.7

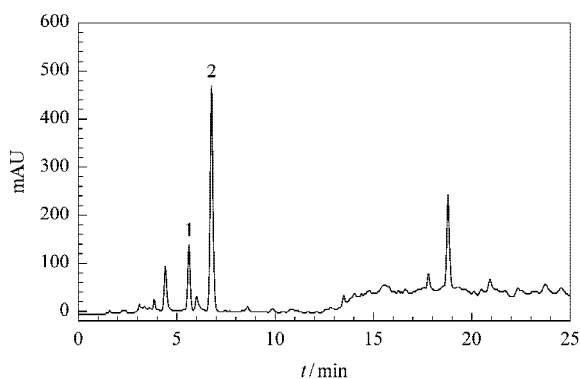


图 2 编号为 060904 羊毛样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a greasy wool sample (No. 060904)

1. diflubenzuron ; 2. triflumuron.

3 结论

本文建立了采用快速溶剂萃取、高效液相色谱测定含脂羊毛中除虫脒、杀铃脒残留量的检测方法。该方法具有萃取时间短、试剂用量少、色谱分离效果好、操作简便、定量准确、重现性好、干扰少等特点，且回收率符合农药残留的测定要求。已将该方法成功地应用于国家质量监督检验检疫总局立项的《进口原羊毛携带的危害物质的调查监控与预警技术研究》课题工作中。

参考文献：

- [1] Bob A , Geoffrey K , Wendy M . Sheep parasites-choosing a chemical group to treat blowflies and lice . [2008-01-30] . <http://www2.dpi.qld.gov.au/sheep/9009.html>
- [2] Chen Z L , Qiu Y S , Zeng Z L . Chinese Journal of Veterinary Drug (陈杖榴 , 邱银生 , 曾振灵 . 中国兽药杂志) , 2002 , 36 (3) : 42
- [3] Nunn C R , Russell I M , Williams S . Residues of pesticides in Australian wool 2004 - 2005 : results from AWI Survey . [2007-04-03] . http://www.awta.com.au/Documents/Research%20Papers/Wool%20Contamination/IWTO2005_11_RWG03.pdf
- [4] Revision of the textile Eco-label draft final report-July 13th 2007 . [2008-07-30] . http://ec.europa.eu/environment/gpp/pdf/toolkit/textiles_GPP_background_report.pdf
- [5] Miao X , Zhu M J , Song Y X , et al . Journal of Donghua University : Natural Science (缪翔 , 朱明杰 , 宋燕西 , 等 . 东华大学学报 : 自然科学版) , 2008 , 34 (2) : 192
- [6] SN/T 1766 . 3
- [7] Wang H , Zhao J , Chen Z W , et al . Chinese Journal of Chromatography (王恒 , 赵洁 , 陈志伟 , 等 . 色谱) , 2008 , 26 (6) : 740
- [8] Nunn C R , Grundy L , Russell I M . Robust extraction and clean-up method for analysis of organophosphorous , synthetic pyrethroids , organochlorines , diflubenzuron and triflumuron on raw wool . [2007-03-20] . http://www.awta.com.au/Documents/Research%20Papers/Wool%20Contamination/IWTO2006_05_RWG04.pdf
- [9] Hong J , Kim H Y , Kim D G , et al . J Chromatogr A , 2004 , 1038 (1) : 27
- [10] Hu B Z , Song W H , Xie L P , et al . Chinese Journal of Chromatography (胡贝贞 , 宋伟华 , 谢丽萍 , 等 . 色谱) , 2008 , 26 (1) : 22
- [11] Huang Y C , Wang J J , Fu X Q , et al . Journal of Agro-Environment Science (黄永春 , 王继军 , 傅学起 , 等 . 农业环境科学学报) , 2004 , 23 (3) : 615
- [12] Lü D Z , Cheng L L , Chinese Journal of Tropical Agriculture (吕岱竹 , 程伶俐 . 热带农业科学) , 2007 , 27 (2) : 34
- [13] Fan Y M , Huang S T , Yu X J , et al . Environmental Chemistry (樊苑牧 , 黄绍棠 , 俞雪钧 , 等 . 环境化学) , 2008 , 27 (5) : 653
- [14] Fan Y M , Huang S T , Yu X J , et al . Chinese Journal of Chromatography (樊苑牧 , 黄绍棠 , 俞雪钧 , 等 . 色谱) , 2008 , 26 (5) : 583