

微波萃取-GPC 净化-GC/MS 法检验血中 氨基甲酸酯和沙蚕毒素类农药

应剑波^{1,2}, 谢伟宏², 程建波², 金立方², 郑 强²

(1. 浙江工业大学, 浙江 杭州 310004; 2. 杭州市公安局物证鉴定所, 浙江 杭州 310004)

摘要:利用微波萃取、凝胶色谱仪净化浓缩联用仪和气相色谱质谱联用仪技术,分析血中氨基甲酸酯和杀蚕毒素类农药的检验方法。结果表明,农药经 $V(\text{丙酮}) : V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{环己烷}) = 4 : 3 : 3$ 的混合溶剂微波辅助萃取,凝胶色谱自动净化浓缩至 2 mL,待 GC/MS/SIS 测定,各类农药的回收率为 68%~91%,检测限为 0.001~0.47 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,部分药物的线性相关系数为 0.990 0~0.997 6。该方法操作简便、机械化程度高、处理批量大、重现性好、空白干扰小,可用于医疗、卫生、法庭科学实际案例的药物毒物筛选。

关键词:气相色谱-质谱法(GC/MS);微波萃取;凝胶色谱净化;氨基甲酸酯和杀蚕毒素类农药;血样

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2009)01-47-04

Determination of Carbamate Pesticides and Kill Silkworm Toxin in Human Blood Using Microwave Extraction-PTV-GC/MS with Gel Permeation Chromatography Clean-Up

YING Jian-bo^{1,2}, XIE Wei-hong², CHENG Jian-bo², JIN Li-fang², ZHENG Qiang²

(1. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310004, China;

2. Public Security Bureau of Hangzhou, Hangzhou 310004, China)

Abstract:Carbamate pesticides and kill silkworm toxin in human blood were analyzed by microwave extraction-PTV-GC/MS and gel permeation chromatography (GPC) clean-up. The results showed that pesticide residues were extracted from blood with solvents by microwave assisted extraction, extracts were cleaned up by GPC, and analyzed by gas chromatography with mass selected detection in sis model. Programmed temperature vaporization (PTV) large volume injector(LVI) was applied to inject the sample. The rates of recovery range from 68% to 91%. The detection limits of pesticides are 0.001~0.47 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The method can be used for simultaneous determination of pesticide residues in blood. It is sensitive and simple, and meets the determinative requirement of pesticide residues.

Key words: GC/MS; microwave extraction; gel permeation chromatography (GPC) clean-up; carbamate pesticides and kill silkworm toxin ; blood

目前,对氨基甲酸酯类农药和杀蚕毒素类农药的检验,多以从水、植物等基体中,通过液液提取、固相提取等方法进行提取、净化、浓缩^[1-2],而血中该类农药的检验报道较少^[3-5]。所报道的方法有操作程序较为复杂、对分析人员的要求较高、自动化程度低等缺点,且重现性、精密度等完全依赖操作人员,对操作者要求严格。微波萃取技术(microwave-assisted extraction technique)是将被萃取的原料浸于某选定的溶剂中,通过微波反应器发射微波能,使原料中的化学成分迅速溶出。与传统的萃取方法(如蒸馏、索氏抽提、有机溶剂萃取等)相比,微波萃取技术具有操作简便、经济、省时等优点,同时可以提高收率和物质的纯度,但该技术对血、肝、胃肾等组织提取时,会提取出大量的油脂、色素等大分子物质,对后续的分析工作产生较大的干扰,须通过对样品进行净化、浓缩等一系列的步骤后才能供仪器分析。凝胶渗透色谱(GPC)基于体积排除的分离机理,不仅可用来分离和测定小分子物质,而且还可以分析具有相同化学性质但分子体积不同的高分子同系物。近年来,国外有将 GPC 凝胶渗透色谱净化技术用于样品的前处理^[6-7],具有省时、方便、环境污染少、有效去除色素和脂肪等大分子的特点。本工作通过对影响微波提取率的时间、温度等因素的考察,建立微波萃取法和 GPC 净化浓缩法,以供仪器分析使用。

1 实验部分

1.1 仪器

CEM 微波萃取仪,HP-500 型萃取罐;Varian CP-3800 Saturn 2000 气相色谱质谱联用仪;美国 Varian 公司产品,配 8200 自动进样器,PTV(程序升温汽化进样口)进样口;自动净化浓缩系统(二联机);德国 Lctech Ultra 公司产品。

1.2 对照标准品和试剂

氨基甲酸酯类农药:灭多威(methomyl)、涕灭威(aldicarb)、异丙威(isoprocarb)、甲萘威(carbaryl)、克百威(carbofuran)均为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲醇储备液,购自公安部物证鉴定中心。

杀蚕毒素类农药:杀虫双(bisultap)、杀虫眯(chlordimeform),购自迪马公司,使用时配制成 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲醇液。二氯甲烷、丙酮、环己烷、乙酸乙酯均为色谱纯;购自迪马公司,pH 6 的

NaAC-HAC 缓冲液。颗粒状硅藻土:购自戴安公司。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 VF-5 毛细色谱柱($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$);起始温度 $80 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 3 min,以 $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $280 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 12 min;载气(氦气)流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;1079 进样口升温程序:初始温度 $85 \text{ }^\circ\text{C}$,初始时间 0.03 min,升温速率 $200 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$,最终温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.3.2 质谱条件 电子轰击(EI)离子源温度 $200 \text{ }^\circ\text{C}$,接口温度 $280 \text{ }^\circ\text{C}$,电子能量 70 eV,质量扫描范围 m/z 50~300。

1.4 微波萃取条件

初始温度:室温,9 min 内升至 $70 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 10 min。功率根据萃取罐的个数进行选择,具体操作如下:1~2 个萃取罐选择 400 W,3~6 个萃取罐选择 800 W,6 个以上选择 1 600 W,系统压力仪器自动调节。

1.5 凝胶渗透色谱(GPC)净化

Bio Beads S-X3 凝胶柱 $400 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$,流动相为 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{环己烷})=1:1$ 的溶液,柱流速 $5.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,样品定量环 5.0 mL,杂质丢弃时间(GPC-fore-run)为 1 020 s,主要收集时间(GPC-main fraction)为 820 s,高位激光真空度 $2 \times 10^4 \text{ Pa}$,低位激光真空度 $2.5 \times 10^4 \text{ Pa}$ 。

1.6 样品的制备

1.6.1 血液提取 取 5 mL 血液放入萃取罐中,加入 0.5 mL pH 6 的缓冲液,混匀,依次加入 1.5 g 硅藻土和 10 mL 丙酮,振荡,再加入 15 mL $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{环己烷})=1:1$ 的溶液。萃取罐放入外罐,旋好外盖后放入微波系统中,按 1.4 条件萃取。待萃取完毕,微波系统自动完成降温后,将萃取液倒入 50 mL 的试管中,离心取上清液至 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴挥干,加入 5.6 mL $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{环己烷})=1:1$ 的溶液,溶解备用。

1.6.2 净化 将 1.6.1 步骤中的溶解液供 GPC 自动净化浓缩定量,仪器自动取 5 mL,净化浓缩定容至 2 mL,取 $3 \mu\text{L}$ 净化液供 GC/MS 进样分析。

2 结果与讨论

2.1 凝胶色谱净化浓缩联用仪条件的研究^[8]

本研究在 DFG Method S 19 欧盟标准方法的基础上,通过对仪器条件、收集液的考察,发

现在 1 000~1 820 s 的收集液中含有 7 种农药, 改变高、低位激光真空度后, 药物的回收率有一定提高, 选取 1.5 条件作为最终净化浓缩条件。

2.2 色谱条件的考察

根据 7 种农药的总离子流图, 设计了 5 个离子通道, 各通道中选择的监测离子列于表 1。

表 1 7 种农药的 SIM 分析参数

Table 1 SIM analytical parameters for seven pesticides

t_R /min	农药组分	选择离子/(m/z)	扫描范围
5.60~6.10	灭多威	88*	50~110
	涕灭威	87*	
7.70~8.00	异丙威	121*, 136	100~140
9.00~9.60	杀虫双	149*, 70	50~170
	克百威	164*, 149	
12.20~12.60	甲萘威	144*, 115	100~150
13.90~14.20	杀虫眯	196*, 181, 154	150~200

注: * 为定量离子

2.3 提取溶剂及 pH 值的选择

结合文献[5, 9], 选择 pH 6, 其他条件相同的情况下, 考察三氯甲烷、乙酸乙酯等有机试剂的萃取效果, 发现用 10 mL 丙酮和 15 mL V(二氯甲烷): V(环己烷)=1:1 的混合溶剂对该类农药进行萃取可获得较好的回收率。

2.4 添加硅藻土的考察

试验发现, 当用微波萃取时, 随着温度的升高, 血液会凝结成块, 影响药物的提取率^[10]。当向血中添加颗粒状的硅藻土后, 在高温时, 血液结块较为松散, 萃取液与药物的接触面积增大, 提高了药物的回收率。但随着硅藻土添加质量的增加, 在萃取完毕转移萃取溶剂时, 硅藻土又会吸附一定的溶剂, 造成回收率降低。通过与血液中不添加硅藻土比较, 当血液中添加 1~1.5 g 硅藻土时, 甲萘威萃取率提高 6%, 异丙威萃取率提高 5%, 杀虫眯萃取率提高 10%, 杀虫双萃取率提高 4%。因此选择萃取时添加 1.5 g 硅藻土为最优条件。

2.5 萃取温度的考察

在 50、70、80、90、110 °C 萃取条件下, 随着温度的升高, 药物的提取率有所增加, 同时, 有些药物(如涕灭威)的提取率随温度升高而降低。70 °C 下能较好的满足各类药物的提取, 最终选择 70 °C 为提取温度。

2.6 萃取时间的考察

考察仪器从室温升至萃取温度 70 °C 后, 平衡 0、5、10、15 min 对检材萃取的效果。发现在平衡 10 min 时, 各类药物的提取率较为满意; 在平衡 15 min 时, 克百威、杀虫双、甲萘威、异丙威的萃取率比平衡 10 min 时的萃取率降低 41%~68%; 试验最终选择平衡 10 min 作为萃取平衡时间。

3 分析方法的评价

3.1 线性方程、相关系数

取 5 mL 空白血数份, 分别添加杀虫眯、克百威、涕灭威、甲萘威的标准液, 使每毫升血中杀虫眯的浓度依次为 0.07、0.14、0.28、0.42、0.56 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 克百威、涕灭威、甲萘威的浓度依次为 0.44、0.88、1.76、2.64、3.52 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按 1.6 条件提取和检测。以各种物质不同浓度时的峰面积对浓度进行回归计算, 结果列于表 2。

3.2 回收率及检测限的测定

通过向空白血样中添加农药标准的方法, 考察沙蚕毒素和氨基甲酸酯农药的回收率($n=4$)为 68%~91%。取混合标样逐步稀释, 添加于 5 mL 空白血中, 按 1.4 条件操作, 萃取液定容至 2 mL, 以 $S/N=3$ 确定检测限, 测得灭多威、涕灭威、异丙威、杀虫双、克百威、甲萘威、杀虫眯的最

表 2 4 种农药的线性关系

Table 2 Regression of calibration curves and correlation for 4 kinds of pesticides

农药	标准曲线方程	相关系数 (R^2)	相对标准偏差 RSD%
涕灭威	$y=50.72x+199.11$	0.993 5	14.10
克百威	$y=670.77x-775.15$	0.997 6	6.9
甲萘威	$y=643.40x-943.39$	0.996 2	9.6
杀虫眯	$y=78.44x+23.16$	0.990 0	8.2

小检测限分别为 0.47、0.11、0.02、0.07、0.002、0.004、0.001 mg · L⁻¹。

3.3 讨论

3.3.1 在萃取温度考察的过程中发现,萃取温度越高,萃取出来的杂质越多,在 70~90 °C 时,有些药物回收率会有所提高,但杂质提取率也增多。因此,在 70 °C 时药物的整体萃取效果较好。

3.3.2 本试验采用的 GPC 净化浓缩联用仪是二联机,在对样品进行浓缩净化时,需经水浴蒸干、样品转移等过程,造成了样品损耗。但三联机避免了上述步骤的发生,回收率、检出限等都将会有所提高。

4 结论

本方法建立了血中同时测定氨基甲酸酯类农药和杀蚕毒素类农药的微波萃取,凝胶色谱浓缩净化和 PTV-GC/MS 相结合的检测方法。该方法具有准确度和精密度好,快速,简便,可满足农药残留分析的要求,适合卫生防疫、公安等领域的毒物快速分析工作。

参考文献:

[1] 杨大进,张莹,放从容.大米中有机磷和氨基甲酸酯农药残留毛细管气相色谱测定法[J].卫生研

究,1994,23(2):97-100.

- [2] 杨大进,放从容,张莹.蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯农药多残留的测定[J].中国食品卫生杂志,1997,9(5):9-11.
- [3] 张洪兰.用固相提取和高效液相色谱法分离检测生物体液中 7 中氨基甲酸酯类农药[J].色谱,1997,15(5):442-444.
- [4] 李莉,周永新.SPE 结合 GC-FID 和 GC/MS 分析 GPC 血浆中氨基甲酸酯类杀虫剂[J].药物分析杂志,2000,20(3):154-157.
- [5] 应剑波,谢伟宏.GC-PFPD 法测定血中的杀虫双[J].刑事技术,2006,1:39.
- [6] 王明泰,牟峻,靳颖,等.GPC 净化处理在测定拟除虫菊酯残留量中的应用[J].印染,2007,6:37-40.
- [7] 秦亚萍,端裕树,曹磊.应用 GPC-GC/MS 快速测定农产品中的多种农药残留[J].现代科学仪器,2007,1:48-49.
- [8] 田国刚,应剑波,李晓飞,等.凝胶色谱净化浓缩联用仪在毒物分析中的应用[J].刑事技术,2008,3:23-25.
- [9] 张新威.中国刑事科学技术大全:毒品和毒物检验[M].北京:中国人民公安大学出版社,2003:562.
- [10] 孙洪锋,谷学新,王继芬,等.微波萃取-气相色谱法测定血液中的甲基苯丙胺[J].色谱,2007,25(4):590-593.