

超临界流体萃取气相色谱法测定鱼肉中的毒死蜱残留

徐敦明¹ 陈安良^{1,2} 余向阳¹ 王箬霞^{1,2} 何 军^{1,2} 张 兴^{*1,2}

¹ (西北农林科技大学无公害农药研究服务中心 杨凌 712100) ² (陕西省生物农药工程技术中心 杨凌 712100)

摘 要 建立了利用离线超临界 CO₂ 萃取气相色谱 (SFE-GC) 测定鱼肌肉中毒死蜱残留量的分析方法。超临界 CO₂ 萃取鱼肌肉中毒死蜱的适宜条件为: 温度 100 °C, 压力 41.370 MPa, CO₂ 流量为 1 mL/min, 动态萃取 30 min, 静态萃取时间 15 min, 调节剂甲醇 (添加量 0.5 mL), 收集液丙酮。最小检出量为 0.01 ng, 添加回收率为 77.3% ~ 105.1%, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.4% ~ 15.4%, 符合残留分析要求。全程分析时间小于 2 h。

关键词 超临界流体萃取, 气相色谱, 残留分析, 毒死蜱, 鱼肌肉

1 引 言

毒死蜱 (chlorpyrifos) 是一种有机磷杀虫、杀螨剂, 具有良好的触杀、胃毒和熏蒸作用^[1], 属中毒农药, 杀虫谱广, 广泛用于防治多种害虫^[2]。近年, 由于毒死蜱的大面积使用, 在土壤、水体、生物体及食品等中均有毒死蜱的残留。鱼类作为生态系统中主要的水生生物类群, 也受到不同程度的污染, 甚至因慢性中毒而死亡。通过生物富集, 大量毒死蜱积累在鱼体内, 对人体的健康造成间接危害。目前, 对毒死蜱的残留分析多采用溶剂提取法进行前处理^[3,4], 样品前处理时间长, 且有机溶剂耗费多, 有毒试剂污染环境。因此, 很有必要改进和发展有关样品前处理技术。近几年兴起的超临界流体萃取 (supercritical fluid extraction, SFE) 是一种利用超临界状态下的流体作为提取剂进行萃取的方法, 与传统萃取法相比, 其可通过改变温度、压力或添加少量的有机溶剂, 优化萃取过程, 提高提取效率。它能同时完成萃取和分离, 分离效率高, 操作周期短, 传质速度快, 溶解力强, 选择性高, 而且不环境污染。本实验通过对鱼肌肉中的毒死蜱萃取操作条件的优化, 建立了一种离线超临界流体萃取气相色谱测定鱼肌肉中毒死蜱的残留分析方法。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

ISCO SFX™ 2-10 型超临界 CO₂ 萃取仪及相关配备 (皆能 (亚洲) 有限公司); PERKIN ELMER Auto system XL 气相色谱仪及 PE NELSON 900 Series 工作站 (美国 PE 公司) 检测器: ⁶³Ni ECD 检测器; 色谱柱: 1 m × 3 mm 不锈钢柱; 担体: Chromosorb WHP, 0.18 ~ 0.154 mm 粒径; 固定液: 1% OV-101; 检测温度: 色谱柱 190 °C, 检测器 350 °C, 进样口 220 °C; 载气: 氮气 (99.99%), 流速 35 mL/min; 保留时间: 3.75 min; 衰减 8, 进样量 1 μL。毒死蜱原药 (97%, 沙隆达农药股份有限公司); 二氯甲烷、石油醚、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯及乙腈均为分析纯。

2.2 供试鱼种和实验用水

大鲤鱼, 由陕西省钓鱼协会渔场提供, 实验前在室内驯养 7 d, 预养期间鱼的死亡率小于 2%, 实验用鱼全部生长正常健康无病; 实验用水: 用曝气去氯处理 24 h 后的自来水, pH 控制在 6.8 ~ 7.5 之间。

2.3 实验方法

2.3.1 毒死蜱标准溶液的配制 准确称取 0.1031 g 毒死蜱原药于 100 mL 容量瓶中, 用重蒸石油醚 (30 ~ 60 °C) 定容至刻度, 得 1031 mg/L 的毒死蜱标准贮备溶液。系列浓度的标准工作溶液由毒死蜱标准贮备溶液用重蒸石油醚配制。

2.3.2 样品前处理和 SFE 萃取 (1)萃取条件筛选所需样品 取鱼肌肉并切成细条,加药使鱼肉含药量为 10 mg/kg,用研钵磨成匀浆,1 h 后进行 SFE 萃取;(2)鱼体中农药残留分析所需样品 取大鲤鱼 15 尾并分别称重,用微量注射器以 10 mg/kg 的药量进行注射。在 1、3、6、12 和 24 h 各取鱼 3 尾(3 个重复),并取鱼肌肉磨成匀浆,在优化条件下萃取鱼肌肉中的毒死蜱;(3) SFE 萃取 准确称取 2 g 上述处理匀浆,装入萃取仓中,仓的上下都垫有少许棉花,按不同条件进行萃取,各设有 3 个重复。利用 2 因素 7 水平进行预试实验,在预试实验的基础上选择 3 个不同压力(34475、41370、48265 kPa)和 3 个不同温度(50、70、100)进行正式实验。实验中,静态萃取时间为 15 min,动态 CO₂ 流量为 1 mL/min,动态萃取 30 min,用 20 mL 的重蒸二氯甲烷进行收集,室温待二氯甲烷挥发尽,用 2~3 mL 重蒸石油醚溶洗,并定容至 10 mL,供气相色谱直接测定。当进行鱼体中农药残留分析时,萃取条件选用本实验所优化的组合。

3 结果与讨论

3.1 毒死蜱的标准曲线

由毒死蜱标准贮备液用重蒸石油醚配成 16、8、4、2、1 和 0.5 mg/L 系列浓度标准工作溶液。将系列浓度分别进样 1 μL,在气相色谱仪上测定峰面积,测得毒死蜱标准曲线方程为 $Y = 2.1899X + 2.7341$, $r = 0.9984$ 。

3.2 SFE 萃取条件的选择

3.2.1 萃取压力和温度的选择 萃取压力和温度是影响超临界萃取效果的重要因素(见图 1)。同一压力下,萃取率随温度的升高而升高;在 100, 3 个不同压力下的萃取率分别为 56.91%、83.06% 和 60.75%。由图 1 可知,随着压力升高,萃取率先升高后降低,在 41.37 MPa 时,萃取率最高。3 个不同温度下的萃取率分别为 6.58%、55.06% 和 83.06%。因此,实验中 SFE 萃取毒死蜱的温度可选择 100;压力可选择 41.37 MPa。

3.2.2 调节剂的选择 超临界 CO₂ (SC-CO₂) 作为非极性溶剂,难以萃取极性物质。通过加入一定量极性溶剂,可以改善超临界流体极性。不同溶剂因其理化性质的差异而对流体性能的影响不同,对同一溶质萃取效果的影响也不同。实验中选取甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯及乙腈作为调节剂,添加量为 0.5 mL,进行萃取。图 3 显示,加甲醇、丙酮、乙酸乙酯比不加调节剂的萃取率高,甲醇的改性作用相对最好,萃取率达 103.5%。因此,在用 SFE 仪萃取毒死蜱时,可适当添加一些调节剂,甲醇为首选。

表 1 调节剂对萃取率的影响

Table 1 Effect of modifiers on extraction efficiency

调节剂 Modifier	无 No	甲醇 Methanol	乙醇 Ethanol	丙酮 Acetone	乙酸乙酯 Ethylacetate	乙腈 Acetonitrile
萃取率 (%) Extraction efficiency	77.1	103.5	29.1	78.9	80.9	53.7

3.2.3 收集液的选择 实验中其它萃取条件不变,选取甲醇、丙酮、石油醚和二氯甲烷 4 种极性不同的溶剂作为收集液,比较它们的收集效果。表 2 表明,用丙酮、石油醚和二氯甲烷收集的萃取率均高于 80%,它们均可作为 SFE 萃取毒死蜱的收集溶液。但当用二氯甲烷作为收集液,在上气相色谱测定时,必须在自然条件或用 N₂ 吹干二氯甲烷,然后用石油醚或丙酮定容,这样耗时且造成分析物的损失。石油醚室温极易挥发,用石油醚作为收集液进行萃取时需要不断添加石油醚,耗大量有机溶剂。可见,上述 4 种收集液,丙酮为最佳收集液,回收率为 93.7%,且能选择性地收集毒死蜱。

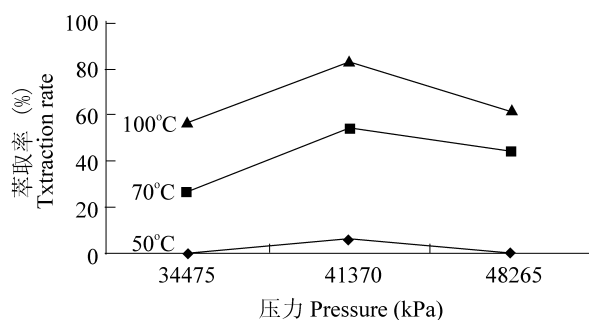


图 1 压力和温度对萃取效果的影响

Fig.1 Effects of pressure and temperature on extraction efficiency

表 2 收集液对萃取率的影响

Table 2 Effect of collecting solvents of extraction efficiency

收集液 Collecting solvents	二氯甲烷 Dichloromethane	甲醇 Methanol	丙酮 Acetone	石油醚 Petroleum ether
萃取率 (%) Extraction efficiency	99.4	60.1	93.7	81.6

3.3 添加回收实验和最低检测浓度

取鱼肌肉 3 组, 每组 3 个重复。一组拌入毒死蜱, 使肌肉中农药浓度为 10 mg/kg; 二组浓度为 5 mg/kg; 三组浓度为 1 mg/kg。混匀 1 h 和 4 h 后, 采取上述分析过程进行回收实验, 最小检出量为 0.01 ng, 最低检出浓度为 0.05 mg/kg; 回收率 (表 3) 为 77.3% ~ 105.1%; 相对标准偏差为 2.4% ~ 15.4%, 符合残留分析要求。

表 3 毒死蜱在鱼肌肉中回收率实验

Table 3 Recovery rate of chlorpyrifos in fish tissue

添加浓度 Concentration	10.0 (mg/kg)		5.0 (mg/kg)		1.0 (mg/kg)	
	1 h	4 h	1 h	4 h	1 h	4 h
平均回收率 Recovery rate (%)	105.08	97.72	92.42	90.12	81.63	77.34
相对标准偏差 RSD (%)	2.44	3.77	6.97	7.44	12.41	15.35

3.4 鱼体中毒死蜱的消解

在优化的萃取条件下, 测定鱼体中毒死蜱残留, 1 h 检测到毒死蜱的浓度为 8.86 mg/kg, 24 h 未检测到毒死蜱 (表 4)。用指数降解模型进行拟合, 得方程为 $\ln C = 2.1268 - 0.1133t$ ($r = 0.9130$, $n = 5$), 其消解半衰期为 6.12 h。

表 4 鱼肌肉中的毒死蜱的消失

Table 4 Diminish of chlorpyrifos in fish tissue

取样时间 Sample time (h)	0	1	3	6	12	24
鱼体中农药浓度 Concentration (mg/kg)	10.05	8.86	4.57	3.25	2.59	ND
消失率 Diminish rate (%)	-	11.4	54.3	67.5	74.1	-

注 (notes): ND 为未检测到 (undetected); ($\ln C = 2.1268 - 0.1133t$ ($r = 0.9130$, $n = 5$, $t_{1/2} = 6.12$ h))

3.5 小结

本研究的方法与常规方法^[5-7]比较, SC-CO₂ 萃取效果优于常规萃取方法, SC-CO₂ 萃取过程仅需约 1 h, 常规方法则需 2 d 或更长时间, 有机溶剂用量仅为常规方法的 1/10。此方法同时完成萃取和分离两步操作, 分离效率高, 操作周期短, 传质速度快, 溶解力强, 选择性高, 无环境污染。利用实验建立的方法对鱼体肌肉中的毒死蜱残留进行了测定, 结果表明毒死蜱在鱼肌肉中的消解半衰期为 6.12 h。这与 USEPA 报道^[8]的结果基本一致。

References

- Gao Xiwu (高希武). Pesticide Manual (农药手册). Beijing (北京): Agricultural Publishing House (农业出版社), 2002: 65 ~ 66
- Worthing C R, Hance R J. The Pesticide Manual: A World Compendium. 9th ed., U.K., Surrey: The British Crop Protection Council, Farnham, 1991: 134 ~ 135
- ICAMA (农业部农药检定所). Analytical Method Manual of Pesticide Residue (农药残留量实用检测方法手册). Beijing (北京): Agricultural Science and Technology Press (农业科技出版社), 1995: 115
- Shi Lili (石利利), Lin Yusuo (林玉锁), Xu Yigang (徐亦钢). Soil and Environment (土壤与环境), 2000, 9(1): 73 ~ 74
- Sundaram B, Rai S K, Ravendra N. Pesticide Science, 1999, 55: 1222 ~ 1228
- Snyder J L, Grob R L, McNally M E. Anal. Chem., 1992, 64: 1940 ~ 1946
- Lopez A V, Dodhiwala N S, Bockert W F. J. Chromatogr. Sci., 1990, 28: 468 ~ 476

- 8 USEPA. Re-registration Eligibility Science Chapter for Chlorpyrifos: Fate and Environmental Risk Assessment Chapter (20460). Washington D. C.:USEPA, 1999: 128 ~ 129

Determination of Chlorpyrifos in Fish Tissue by Supercritical Fluid Extraction and Gas Chromatography

Xu Duming¹, Chen Anliang^{1,2}, Yu Xiangyang¹, Wang Qingxia^{1,2}, He Jun^{1,2}, Zhang Xing*^{1,2}

¹ (Research and Development Center of Biorational Pesticides, Northwest Sci. Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100)

² (Shaanxi Engineering and Technology Center of Biopesticides, Yangling 712100)

Abstract The insecticide chlorpyrifos was extracted from fish tissue by supercritical fluid extraction (SFE). The extraction conditions were optimized, including temperature, pressure, modifier, and collection solvent. Gas chromatography with electron-capture detection was used to analyse the extracts. The analytes were extracted at 41370 kPa and 100 °C with 1 mL/min supercritical carbon dioxide modified with methanol for 30 min after 15 min static extraction. The extracts were collected in 20 mL of acetone. Recoveries ranged from 77.3% ~ 105.1%, and a method precision of 2.4% ~ 15.4% was obtained for spiking levels of 1 ~ 10 mg/kg.

Keywords Supercritical fluid extraction, gas chromatography, residue analysis, chlorpyrifos, fish tissue

(Received 24 December 2003; accepted 14 June 2004)

中国化学会第十三届有机分析与生物分析学术会议征稿启事

由中国化学会有机分析专业委员会、国家自然科学基金委员会和中国科学院研究生院应用化学研究所主办,鞍山师范学院承办的“中国化学会第十三届有机分析与生物分析学术研讨会”定于 2005 年 10 月在辽宁鞍山召开,这次会议旨在交流我国有机分析与生物分析研究中的领域最新成果,并从即日起开始征集与有机分析、生物分析、波谱分析、药物分析,以及其他分析方法与技术相关的学术论文。会议论文将以“分析试验室”增刊正式出版。

征文要求

1. 已在国内外学术刊物上公开发表或在国际、国内学术会议上报告过的论文概不受理。

2. 论文摘要(中文或英文)1页,请用激光打印在 A4(210 × 297 mm)纸上,版芯规格为 160 × 230 mm。摘要内容应包括:题目(三号黑体居中)、作者(四号仿宋居中)、作者单位(小四号宋体居中,含城市名称和邮政编码并用逗号分开)、正文(五号字体)、关键词(五号宋体,自版芯左起)和参考文献(小五号字体);英文摘要一律用相应大小(8号)的 Times New Roman 字体打印。

3. 投寄摘要时,请同时寄 3.5 寸软盘或用 E-mail 作为附件发送给联系人。请在信封上注明“有机分析与生物分析会议征文”字样。

4. 随文请寄作者单位介绍信,说明论文内容不涉及保密问题,否则不予受理。

5. 投稿截止日期为 2005 年 7 月 31 日(以邮戳日期为准)。

联系地址

辽宁省鞍山市鞍山师范学院化学系 邮政编码:114005

联系人:侯冬岩 电话:0412-2960006,13998030389

联系人:金辉 电话:0412-2960065

E-mail:huaxue@mail.asnc.edu.cn

中国科学院研究生院应用化学研究所

北京市玉泉路 19 号甲

联系人:袁倬斌 李向军

E-mail:lixiang@gscas.ac.cn

邮政编码:100049

电话:010-88256336