

固相萃取-气相色谱法测定水果中氯吡脞

黄艳丽, 陈小龙, 谢 纯, 桂 花*

(云南农业大学热带作物学院, 普洱 665000)

摘 要: **目的** 建立固相萃取-气相色谱法(solid-phase extraction and gas chromatography, SPE-GC)检测水果中氯吡脞的方法, 并对猕猴桃、无籽黑提、夏橙和黄心西瓜 4 种常见水果中氯吡脞的残留进行检测。**方法** 比较了正己烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇等有机溶剂的萃取效果, 并比较了不同固相萃取小柱的净化效果。**结果** 萃取溶剂最佳为易分离水层的乙腈, 溶解进样溶剂为丙酮, 溶解度高毒性小且价格经济, 固相萃取小柱选用 Florisil 柱较好。在此实验条件下, 氯吡脞在 0.01~100 mg/L 浓度范围内线性良好($r^2=0.999893$), 检出限为 0.01 mg/kg, 实验回收率在 72.8%~90%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) $\leq 7.9\%$, 基质效应可以忽略(91.4%~103.0%)。**结论** 该方法简单准确, 线性范围大, 适用于水果中氯吡脞的残留检测。利用此方法对普洱市某大型超市内猕猴桃等 4 种水果进行检测, 均未检出氯吡脞, 可见超市水果膨大剂污染很微小。

关键词: 水果; 氯吡脞; 固相萃取; 气相色谱

Determination of chlorpyrifos in fruits by solid phase extraction-gas chromatography

HUANG Yan-Li, CHEN Xiao-Long, XIE Chun, GUI Hua*

(College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er 665000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for detecting chlorpyrifos in fruits by solid-phase extraction and gas chromatography (SPE-GC), and detected the residues of chlorpyrifos in 4 common fruits of kiwi, seedless black, summer orange and yellow heart watermelon. **Methods** The extraction effects of organic solvents such as *n*-hexane, ethyl acetate, acetone and methanol were compared, and the purification effects of different solid phase extraction cartridges were compared. **Results** The extraction solvent was preferably acetonitrile which is easy to separate the water layer, and the dissolution injection solvent was acetone, whose solubility is high and the toxicity is small and the price is economical. The solid phase extraction column was preferably a Florisil column. Under the experimental conditions, chlorpyrifos had a good linearity in the concentration range of 0.01–100 mg/L ($r^2=0.999893$), the detection limit was 0.01 mg/kg, and the experimental recovery rate was between 72.8% and 90%. The relative standard deviation (RSD) was $\leq 7.9\%$, and the matrix effect was negligible (91.4%–103.0%). **Conclusion** This method is simple, efficient and low instrument requirements, which could be used for the determination of chlorpyrifos residues in fruits. With the method, no forchlorfenuron was detected in kiwifruit and other four fruits in a supermarket in Pu'er city, which indicated that the supermarket fruit swelling agent pollution is very small.

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2015C133Y)

Fund: Supported by Project of Scientific Research Fund of Yunnan Provincial Department of Education (2015C133Y)

*通讯作者: 桂花, 讲师, 主要研究方向为食品分析。E-mail: 569684980@qq.com

*Corresponding author: Gui Hua, Lecturer, College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, No.3, Siting Road, Simao District, Pu'er 665000, China. E-mail: 569684980@qq.com

KEY WORDS: forchlorfenuron; gas chromatography; fruit; solid-phase extraction

1 引言

氯吡脞又名吡效隆、CPPU、KT-30, 可以促进细胞分裂, 因此被广泛应用于农业上, 使果实肥大以提高产量^[1,2]。氯吡脞在我国属于登记限量使用的农药品种, 残留量超限, 将提高消费者膳食摄入风险^[3]。根据 GB 2763.1-2018 食品安全国家标准 食品中百草枯等 43 种农药最大残留限量^[4]规定, 猕猴桃、葡萄、琵琶、橙的最大残留为 0.05 mg/kg, 西瓜的最大残留量为 0.1 mg/kg。氯吡脞的检测分析方法主要有液相色谱法以及高效液相色谱法串联质谱法^[5-11], 这种方法精密度较高但对仪器要求也高。相对来说, 气相色谱法应用不多。对于实验溶剂, 一些学者采用正己烷作为溶解、进样溶剂^[12,13], 也有采用丙酮、甲醇、乙腈作为溶剂^[14-16]。样品前处理方法与检测结果紧密相关。在实验过程中, 笔者发现氯吡脞在正己烷中溶解度很小, 实验回收率低, 不宜选用。对于样品净化方法, 目前常见的有分散固相萃取、固相萃取小柱、QuEChERS 等方法^[10-15], 都能满足农药残留的分析要求。QuEChERS 相对来说更简单、快速些^[16], 但固相萃取净化比较彻底, 且基质效应小, 实验重复性好, 更能满足实验回收率要求。

本研究以实验回收率与相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)作为比较依据, 分析不同溶剂、不同萃取净化方法对氯吡脞残留检测结果的影响, 同时优化了色谱检测条件, 建立固相萃取-气相色谱法(solid-phase extraction and gas chromatography, SPE-GC)检测猕猴桃、无籽黑提、夏橙和黄心西瓜 4 种水果样品中氯吡脞的方法, 以期该为批量的检测水果样品中氯吡脞残留提供了参考。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

2.1.1 试剂和标准品

氯吡脞(>99%, 美国 Aladdin 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 丙酮、氯化钠(分析纯, 天津风船科技公司); Florisil、C₁₈、PC/NH₂、Silica 固相萃取小柱(美国 Agela 公司)。

猕猴桃、无籽黑提、夏橙和黄心西瓜均购于普洱市某大型超市。

2.1.2 仪器设备

Clarus 600 气相色谱仪(美国 Perkin Elmer 公司); HC-3618R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳公司); WD-12 氮吹仪(杭州奥盛公司); SK-18TC 超声仪(上海科导公司); ME204E 分析天平(美国 METTLER TLEDO 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制与标准曲线的绘制

准确称取氯吡脞标准物质 10.0 mg 于 100 mL 容量瓶中, 丙酮定容, 得到 100.00 mg/L 标准储备液。置于 -18 °C 冰箱中保存。将储备液依次稀释, 得到浓度分别为 0.01、0.04、0.16、0.80、4.00、100.00 mg/L 系列标准溶液。

标准溶液按 2.2.2 色谱检测条件测定, 以保留时间定性, 以峰面积定量, 绘制标准工作曲线。

2.2.2 色谱检测

色谱柱: Agilent HP-5(30 m × 0.320 mm, 0.25 μm); 氮气流速: 2.0 mg/mL; 柱温: 80 °C, 保留 1 min, 以 10 °C/min 升至 120 °C, 再以 25 °C 升至 280 °C, 保持 5 min; 进样量 1 μL; 气化室温度: 240 °C; 电子俘获检测器(electron capture detector, ECD)检测器温度: 300 °C。在此条件下, 氯吡脞保留时间 5.488 min。

2.2.3 样品前处理

提取: 准确称取 10.0 g 水果匀浆于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中, 加入乙腈 10 mL, 25 kHz 下超声提取 15 min。加入氯化钠 3 g, 8000 r/min 离心 10 min, 静置, 取上清液 4 mL, 于 50 °C 下氮吹至干, 用正己烷:丙酮=4:1(V/V), 2 mL 溶解, 待净化。

净化: 分别用正己烷、丙酮各 3 mL 预淋洗 Florisil 柱, 上样, 2 mL 丙酮洗脱 2 次, 洗脱液在 50 °C 下氮吹至干, 丙酮 2 mL 定容, 过 0.22 μm 滤膜, 待测。

3 结果与分析

3.1 色谱图

标准品色谱图如下图 1, 其中, 峰 4 为氯吡脞, 保留时间 $t=5.488$ min, 因进样溶剂丙酮非色谱纯, 而是价格较低的分析纯, 因此溶剂峰含有甲醇、正丙醇等杂质峰, 但不影响氯吡脞的定性和定量分析。

3.2 溶剂的选择和优化

氯吡脞属于中低极性试剂, 在样品前处理萃取溶剂和标准品溶解溶剂的选择上, 实验依次考察了正己烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇和乙腈多种溶剂。对于样品萃取溶剂, 实验发现正己烷对氯吡脞溶解度小, 影响实验回收率(回收率 < 20%); 甲醇和丙酮对氯吡脞溶解度高, 但作萃取溶剂时与水果中的水相不易分开; 乙腈提取杂质较少, 且离心后与水相分离较完全。因此, 本研究选择乙腈作为水果样品的萃取试剂。

对于标准品溶解溶剂和样品进样溶剂的选择上, 实验发现乙腈膨胀体积较大, 不宜大量进气相检测; 甲醇溶解杂质较多, 且毒性较大; 乙酸乙酯溶剂峰出峰时间较

晚;丙酮溶解度合适,出峰时间不影响氯吡脞保留时间,毒性小。色谱纯级丙酮价格昂贵,本次实验选择分析纯级丙酮作为进样溶剂,同时对分析纯里含有的杂质溶剂峰甲醇、正丙醇进行了定性测定,不会影响到实验结果的准确度和精密度。

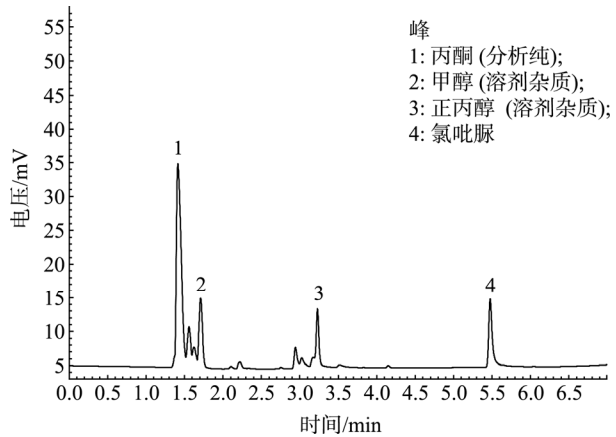


图 1 氯吡脞标准品色谱图
Fig.1 The GC chromatography of standard

3.3 固相萃取柱的选择和优化

本研究选取了常用的 Florisil、C₁₈、PC/NH₂、Silica 4 种固体萃取小柱最为筛选对象。结果发现,PC/NH₂小柱净化后样品稳定性不好,Silica 小柱主要用于分离非极性化合物,Florisil 和 C₁₈小柱均可选用。从经济成本考虑,本研究选用 Florisil 柱。

3.4 线性关系和检出限

在 0.01~100 mg/L 浓度范围内,氯吡脞标准曲线线性关系 $r^2=0.999893$,线性回归方程为 $Y=6933.568451+47191.821740X$,可用于痕量分析。以 3 倍信噪比($S/N\geq 3$)计算该方法的检出限为 0.01 mg/kg。

3.5 方法的加标回收率

按照上述色谱条件,分别在猕猴桃、无籽黑提、夏橙和黄心西瓜 4 种空白样品中进行 3 个浓度加标回收率实验,每次实验 5 次重复测定。结果见表 1。可见该方法满足水果中氯吡脞定量分析的测定要求。

3.6 基质效应的影响

本研究采取了相对响应值法对基质效应的影响进行了简单分析。取猕猴桃、无籽黑提、夏橙和黄心西瓜 4 种水果的空白基质溶液各 0.8 mL,分别加入 4.0 mg/L 氯吡脞标准溶液 0.2 mL,对比 0.80 mg/L 氯吡脞标准溶液的峰面积发现,响应值比值为 91.4%~103.0%,基质效应很小,可以忽略不计。

3.7 样品中氯吡脞的测定结果

研究对普洱市某大型超市内猕猴桃、无籽黑提、夏橙和黄心西瓜 4 种水果,早、中、晚分 3 次进行取样,按上述方法检测,均未检出氯吡脞残留。此测定结果表明,超市水果膨大剂污染水平很低。水果加标样品、水果样品的色谱图如下图 2-图 5。

表 1 氯吡脞在水果中的回收率
Table 1 Recoveries of chlorpyrifos in fruits

样品	加标水平 /(mg/kg)	重复 次数	平均回收量 /(mg/kg)	平均回收率 /%	RSD /%
猕猴桃	0.01	5	0.008	80.0	7.2
	0.10	5	0.077	77.0	7.4
	1.00	5	0.728	72.8	7.8
无籽黑提	0.01	5	0.008	80.0	7.6
	0.10	5	0.079	79.0	6.7
	1.00	5	0.751	75.1	7.2
夏橙	0.01	5	0.009	90.0	6.8
	0.10	5	0.087	87.0	7.2
	1.00	5	0.882	88.2	7.8
黄心西瓜	0.01	5	0.008	80.0	7.2
	0.10	5	0.075	75.0	6.4
	1.00	5	0.736	73.6	7.9

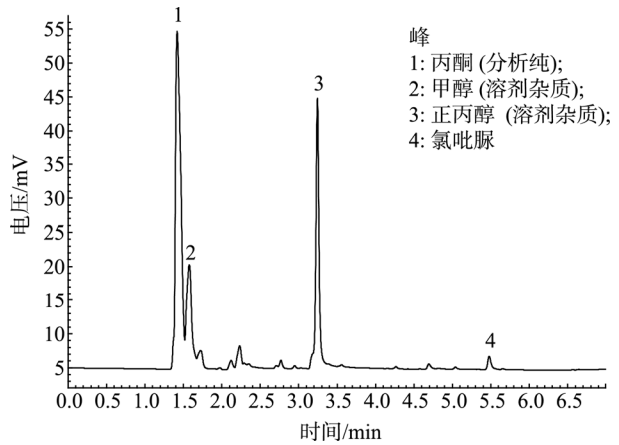


图 2 猕猴桃加标样品色谱图
Fig.2 The GC chromatography of spiked Kiwifruit

4 讨论与结论

4.1 讨 论

4.1.1 分析方法的选择

氯吡脞农药残留的检测,大多数情况下采用液相色谱法^[4-10],因其精密度高,应用范围广。但在分析过程中,液相色谱法中用作流动相的乙腈,毒性大,价格高;而采用气相色谱法检测时,载气为氮气,安全性好,成本低。此

外, 氯吡脞沸点(170~172 °C)不高, 可气化, 用气相色谱法检测, 分析速度快, 操作也相对简单; 而液相色谱仪的高压泵易出故障, 维护不易。

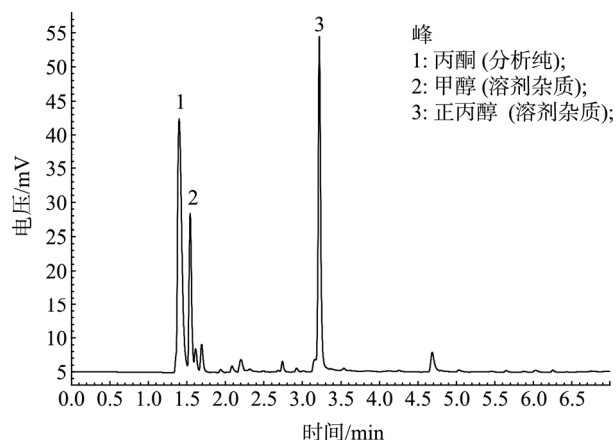


图 3 无籽黑提样品色谱图

Fig.3 The GC chromatography of black grape

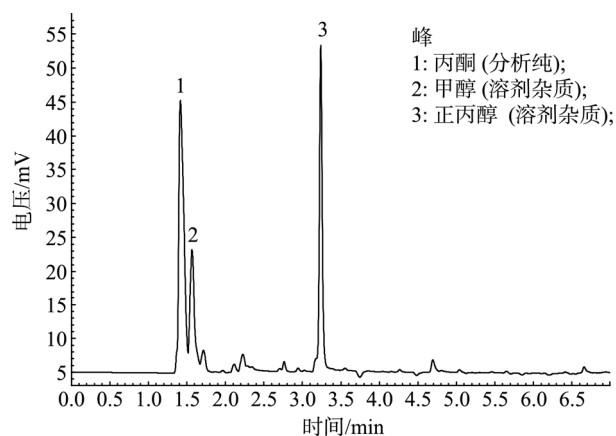


图 4 夏橙样品色谱图

Fig.4 The GC chromatography of Valencia orange

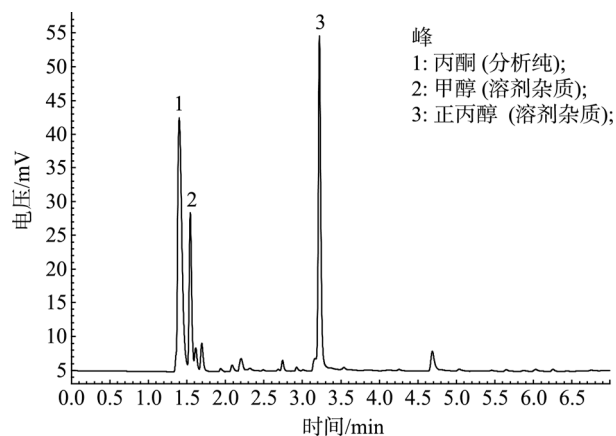


图 5 黄心西瓜样品色谱图

Fig.5 The GC chromatography of yellow watermelon

4.1.2 溶剂的选择

氯吡脞极性中低等, 易溶于丙酮、甲醇、乙腈, 但在正己烷中溶解度较小。正己烷作为气相色谱法的溶剂时, 样品杂质含量少, 溶剂峰出峰时间早, 因而一些学者^[11,12]选择正己烷作为溶剂。但以正己烷为溶剂制备标准溶液时, 因氯吡脞较高浓度时溶解不完全, 故而浓度梯度范围较窄, 仅为 0.01~1mg/L。同时, 样品净化后采用正己烷定容, 实验回收率很低($\leq 50\%$)。乙酸乙酯和甲醇对氯吡脞溶解度高, 但是乙酸乙酯溶剂出峰时间晚, 甲醇溶剂溶解杂质较多, 均不是最佳选择。

丙酮溶剂对氯吡脞溶解度高且毒性较小, 出峰时间早。不过, 市面上色谱纯级价格昂贵。本研究选用分析纯级丙酮作为溶剂, 虽然含有一些甲醇、正丙醇等杂质峰, 但不影响氯吡脞色谱峰的判断, 对实验的定性和定量分析, 也没有影响。

4.1.3 样品净化方法的选择

在氯吡脞残留分析中, 分散固相萃取、固相萃取小柱、QuEChERS 这 3 种样品净化方法^[12~17]较为常见。固相萃取净化手段研究较早, 虽然不如 QuEChERS 快速, 但是净化较彻底, 且实验重复性好, 因此本研究选择固相萃取柱来净化水果样品。在比较筛选 Florisil、C₁₈、PC/NH₂、Silica 4 种固体萃取小柱后, 发现 Florisil 柱的净化效果能满足实验回收率的要求($\geq 70\%$), 且价格较低。

4.2 结 论

氯吡脞残留检测, 气相色谱法对仪器要求不高, 是除了液相色谱法的另外一种较好的选择。在标准溶液配制和样品处理时, 不宜采用正己烷萃取和溶解, 乙腈萃取、丙酮溶解进样较为可行, 虽然丙酮(分析纯)溶剂峰较高且含有杂质峰, 但不影响实验结果。样品净化方法的选择上, Florisil 柱稳定性好且价格相对较低, 适合分离净化氯吡脞类中低等极性的植物成长调节剂。

通过以上对样品前处理的优化, 本实验研究建立了固相萃取—气相色谱法检测猕猴桃等水果中的氯吡脞的方法。该方法简单、准确, 在保证线性关系良好($r^2=0.999893$)、加标回收率(72.8%~90%)满足实验准则的前提下, 扩大了浓度检测范围(0.01~100 mg/L), 为批量地检测水果样品中氯吡脞残留提供了参考。利用此方法对普洱市某大型超市内猕猴桃等 4 种水果进行检测, 均未检出氯吡脞残留, 侧面说明超市水果氯吡脞污染较小。

参考文献

- [1] 郭西智, 任致远, 陈锦永, 等. 植物生长调节剂在西瓜甜瓜生产中的安全应用[J]. 中国瓜菜, 2017, 30(7): 42~44.
Guo XZ, Ren ZY, Chen JY, et al. Safety application of plant growth regulators in watermelon and melon production [J]. Chin Cucurb Veg, 2017, 30(7): 42~44.
- [2] 赵治兵, 王金华, 刘永玲, 等. 基于主成分分析法研究氯吡脞对猕猴桃

- 品质的影响[J]. 食品工业, 2018, 39(9): 190–193.
- Zhao ZB, Wang JH, Liu YL, *et al.* Explore the Influences of forchlorfenuron on the kiwi fruit quality based on principal component analysis method [J]. Food Ind, 2018, 39(9): 190–193.
- [3] 张志恒, 汤涛, 徐浩, 等. 果蔬中氯吡脞残留的膳食摄入风险评估[J]. 中国农业科学, 2012, 45(10): 1982–1991.
- Zhang ZH, Tang T, Xu H, *et al.* Dietary intake risk assessment of forchlorfenuron residue in fruits and vegetables [J]. Sci Agric Sin, 2012, 45(10): 1982–1991.
- [4] GB 2763.1-2018 食品安全国家标准 食品中百草枯等43种农药最大残留限量[S].
- GB 2763.1-2018 National food safety standards-Maximum residue limits for 43 pesticides such as paraquat in food [S].
- [5] 杨春平, 李钊君, 宁红, 等. HPLC 检测枇杷中氯吡脞含量的前处理方法[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2016, 42(3): 350–357.
- Yang CP, Li ZJ, Ning H, *et al.* Pretreatment method of forchlorfenuron residues in loquat by HPLC analysis [J]. J Zhejiang Univ, 2016, 42(3): 350–357.
- [6] 李珍, 郑义, 段路路, 等. HPLC 法同时测定叶面肥中4种植物生长调节剂[J]. 化学试剂, 2018, 40(3): 231–234.
- Li Z, Zheng Y, Duan LL, *et al.* Simultaneous determination for 4 kinds of plant growth regulators in foliar fertilizer via HPLC [J]. Chem Reagent, 2018, 40(3): 231–234.
- [7] 张志伟, 高振红, 袁亚红, 等. QuEChERS-液相色谱串联质谱法快速检测猕猴桃中的氯吡脞及其代谢产物[J]. 现代食品科技, 2017, 33(10): 262–267.
- Zhang ZW, Gao ZH, Yuan YH, *et al.* Determination of forchlorfenuron and its metabolites in kiwifruit using QuEChERS – LC - MS /MS [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(10): 262–267.
- [8] 张婧, 万慧慧, 张华. 基质分散固相萃取-高效液相色谱/串联质谱法检测红薯中氯吡脞[J]. 分析科学学报, 2017, 33(3): 387–390.
- Zhang J, Wan HH, Zhang H. Determination of clopidourea in sweet potato by matrix dispersive solid phase extraction high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2017, 33(3): 387–390.
- [9] 郑玲, 李丽华, 黄大新, 等. 液相色谱-串联质谱法对水果中氯吡脞残留的测定[J]. 食品工业, 2011, 32(7): 90–92.
- Zheng L, Li LH, Huang DX, *et al.* Determination of forchlorfenuron in fruits by liquid chromatography-electrospray negative ionization mass spectrometry [J]. Food Ind, 2011, 32(7): 90–92.
- [10] 侯玉茹, 杨媛, 石磊, 等. 固相萃取-高效液相色谱法检测葡萄中氯吡脞的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(1): 255–258.
- Hou YR, Yang Y, Shi L, *et al.* Study of determination of forchlorfenuron in grape by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol, 2011, 36(1): 255–258.
- [11] 赵治兵, 刘志刚, 谢国芳, 等. Florisil 分散固相萃取-HPLC 法测定猕猴桃中氯吡脞的残留[J]. 食品科技, 2018, 43(5): 339–342.
- Zhao ZB, Liu ZG, Xie GF, *et al.* Determination of forchlorfenuron residues in kiwi fruit by florisil dispersive solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(5): 339–342.
- [12] 吴挺. 采用固相萃取-气相色谱法测定西瓜中氯吡脞的消解动态和残留量[J]. 上海农业科技, 2019, (2): 43–45.
- Wu T. Determination of clopidourea in watermelon by solid phase extraction gas chromatography [J]. Shanghai Agric Sci Technol, 2019, (2): 43–45.
- [13] 龚勇, 单伟力, 简秋, 等. 黄瓜、西瓜和土壤中氯吡脞残留分析方法[J]. 农药科学与管理, 2011, 32(11): 30–34.
- Gong Y, Shan WL, Jian Q, *et al.* Determination of forchlorfenuron residues in cucumber, watermelon and soil [J]. Pesticid Sci Admin, 2011, 32(11): 30–34.
- [14] 孙大利, 郑尊涛, 叶火春, 等. 氯吡脞在葡萄中的残留分析及消解动态[J]. 农药, 2011, 50(10): 751–753.
- Sun DL, Zheng ZT, Ye HC, *et al.* Residue determination and degradation dynamics of forchlorfenuron in grape [J]. Agrochemicals, 2011, 50(10): 751–753.
- [15] 胡江涛, 俞凌云, 帅培强, 等. QuEChERS-液质联用法测定水果蔬菜中氯吡脞残留[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(17): 71–75.
- Hu JT, Yu LY, Shuai PQ. Determination of forchlorfenuron residue in fruits and vegetables by QuEChERS extraction and HPLC-MS/MS [J]. J Anhui Agric Sci, 2017, 45(17): 71–75.
- [16] 王楠, 胡坪, 国欣, 等. QuEChERS-HPLC 法快速检测猕猴桃中氯吡脞残留[J]. 食品工业, 2014, 35(5): 234–237.
- Wang N, Hu P, Guo X, *et al.* Application of the QuEChERS-HPLC method for the determination of forchlorfenuron residues in kiwi fruit [J]. Food Ind, 2014, 35(5): 234–237.
- [17] 易长文. QuEChERS 和 SPE 固相萃取小柱联用检测农药残留前处理方法[J]. 中国热带医学, 2012, 12(12): 1539–1540, 1552.
- Yi CW. Pretreatment of QuEChERS coupled with SPE for the determination of pesticide residue [J]. Chin Tropic Med, 2012, 12(12): 1539–1540, 1552.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



黄艳丽, 硕士, 讲师, 研究方向为植物化学、食品检测分析。
E-mail: 17376711@qq.com

桂 花, 讲师, 主要研究方向为食品分析。
E-mail: 569684980@qq.com