

免疫亲和柱在果蔬有机磷农药残留测定前处理中的应用研究

杨 柳, 朱杰丽, 柴振林, 尚素微, 吴翠蓉, 蒋步云, 方 燕

(浙江省林产品质量检测站, 浙江 杭州 310023)

摘要: 建立了一种可快速净化果蔬中有机磷农药残留测定的方法。在 NY/T 761-2008 标准的基础上, 采用多功能的免疫亲和柱 (MycoSep 226 AflaZon+) 对杨梅 *Myrica rubra*, 黄瓜 *Cucumis sativus*, 辣椒 *Capsicum annuum* 样品的有机磷农药提取液进行净化, 净化过程可在 1 min 内钟完成, 净化液可直接用于测定, 并可明显降低对检测设备的污染程度。试验结果表明, 所测定的敌敌畏、丙溴磷、乙酰甲胺磷等 19 种常见有机磷农药在 $0.02 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内有良好的线性关系, 相关系数 (r^2) 均大于 0.999; 重现性良好, 多次重复测定相对标准偏差仅 0.84%, 明显优于标准规定处理方法; 低、中、高浓度的加标回收率分别在 85.4%~96.1%, 89.7%~97.1%, 90.2%~103% 之间, 总体回收率均在 85% 以上。

关键词: 免疫亲和柱; 果蔬; 有机磷农药; 残留; 前处理

中图分类号: S481 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776 (2019) 04-0067-05

Application of IAC in Pretreatment for Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Fruits and Vegetables

YANG Liu, ZHU Jie-li, CHAI Zhen-lin, SHANG Su-wei, WU Cui-rong, JIANG Bu-yun, FANG Yan

(Zhejiang Forestry Product Testing Station, Hangzhou 310023, China)

Abstract: A multifunctional immunoaffinity columns, MycoSep 226 AflaZon+, were applied to purify the extract of organophosphorus pesticide from *Myrica rubra*, *Cucumis sativus* and *Capsicum annum*, based on the standard of NY/T 761-2008. The process of purification could be completed in one minute, and the purified liquid could be directly determined, that significantly reduced contamination to the devices. The result demonstrated that 19 common organophosphorus pesticides, including dichlorvos, profenofos and acephate, had good linear relations in the range of $0.02 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with correlation coefficients above 0.999. This method could be repeated many times with standard deviation of only 0.84%. The total recovery rates of low, medium, and high concentrations of samples in the range of 85.4%-96.1%, 89.7%-97.1%, 90.2%-103% were above 85%.

Key words: immunoaffinity columns; fruits and vegetables; organophosphorus pesticide ; residues; pretreatment

目前有关水果、蔬菜中有机磷农药残留检测的前处理方法报道较多, 并主要体现在提取液配置及提取后的净化处理上^[1-2]。其中应用最为广泛的是 NY/T 761-2008《蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定》^[3], 方法规定有机磷农药提取试剂为乙腈, 而后提取液经旋干、丙酮定容后待上仪器测定, 该方法具有普适性。但由于对提取液的净化效率较为低下, 更适合样品本底较少、背景较为干净的样

收稿日期: 2019-03-05; 修回日期: 2019-06-19

作者简介: 杨柳, 高级工程师, 硕士, 从事食品安全研究; E-mail: yangliuxs@163.com。

品,而对一些提取液颜色深或本底成份复杂的样品不适用。主要体现在这些样品在进样时造成了对检测设备的极大污染,以致仪器灵敏度下降,特别是对一些极性较强的有机磷如甲胺磷、久效磷、氧化乐果等下降幅度更大,这样不仅增大了方法的检出限,还会对仪器部件如进样口配件、色谱柱等造成极大损耗,甚至缩短仪器寿命^[4]。

鉴于此,有人通过改变提取液极性或增加净化步骤来加以改善。欧阳蒲月^[5]等采用二氯甲烷、丙酮混合提取液提取蔬菜中有机磷;宋国新^[6]采用混合提取液,由乙腈 25%、丙酮 25%、乙醚 25%、二氯甲烷 25%按体积百分比组成,在后续试验中增加了氨基柱净化步骤并引入甲苯作为洗脱液提取测定豇豆中农药残留。Huang^[7]等采用凝胶渗透色谱法及固相萃取法提取茶叶中多种有机磷农药。这些改进均对 NY/T 761-2008 进行了延伸和拓展,使有机磷检测技术得到了极大提升。但这些改进方案,如混合提取液虽能提高各种农药的提取效率,但同时也增加了对非目标物的提取量,而这些非目标物必然是检测方法的累赘。各种固相萃取净化小柱的应用势必额外增加有机试剂的用量,增加对环境的污染,同时增加方法应用步骤,增大检测劳动量。

本实验发现一种多功能的免疫亲和柱(MycoSep 226 AflaZon+)可直接应用于水果、蔬菜有机磷农药残留检测中净化有机磷的乙腈提取液。免疫亲和柱是一种特殊的 SPE 柱,以极性、非极性 & 离子交换等几类基团组成填充剂,可选择性吸附样液中的脂类、蛋白类等杂质,现主要被用于黄曲霉毒素含量测定的前处理净化过程中^[8-9]。应用该柱对果蔬中有机磷农药残留提取液进行净化处理,可有效去除脂类、蛋白类等杂质,有机磷农药则可顺利通过。该方法净化速度快,省时省力,有望在今后农药残留测定中广泛应用。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验用杨梅 *Myrica rubra*, 黄瓜 *Cucumis sativus*, 辣椒 *Capsicum annuum* 鲜样各 5 kg,均来源于浙江省杭州市西湖区留下镇世纪联华超市。

1.2 仪器设备与试剂

仪器设备:气相色谱仪(Agilent 6890N)配火焰光度检测器(FPD),HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm),磨样机(九阳 JYL-C022E),高速分散机(IKA T18 basic),免疫亲和柱(MycoSep 226 AflaZon+),具塞量筒(100 mL),计时器。

试剂:乙腈(分析纯),氯化钠(分析纯),丙酮(优级纯),有机磷农药标准溶液(上海安谱科技有限公司):敌敌畏、丙溴磷、乙酰甲胺磷、治螟磷、甲拌磷、氧化乐果、二嗪磷、久效磷、除线磷、乐果、皮蝇磷、对硫磷、倍硫磷、异柳磷、水胺硫磷、啶硫磷、杀扑磷、乙硫磷、硫环磷,浓度均为 1 000 μg·mL⁻¹,使用时用丙酮将其配制成相应浓度混表。

1.3 色谱条件

进样口:230℃,不分流进样;进样量:1 μl;载气:N₂(1 mL·min⁻¹);程序升温:70℃(0.5 min)、 $\xrightarrow{15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ 240℃(5 min);检测器:240℃,Air(400 mL·min⁻¹),H₂(40 mL·min⁻¹),补充气 N₂(20 mL·min⁻¹),外标法定量,出峰时间定性。

1.4 样品制备及提取、净化

用磨样机将样品鲜样粉碎,称取 25.00 g 至 150 mL 烧杯中,加入 50 mL 乙腈,在高速分散机上分散萃取 2 min (10 000 r·min⁻¹),过滤,将滤液收集到装有 7 g NaCl 的 10 mL 具塞量筒中,盖上塞子,剧烈振荡 1 min 后,静止 30 min,吸取上清液过免疫亲和柱净化,收集净化液 0.5 mL 于进样瓶中,待测。

1.5 不同净化处理方式处理结果比较

分别向 3 种样品中添加含量为 0.2 mg·kg⁻¹ 浓度的上述混合标样,按照 NY/T 761-2008 中有机磷农药残留前处理的净化方式和过免疫亲和柱净化方式对样品进行前处理,以目标物的检出限高低、对仪器的污染程度及处理时间作为评价依据,对其净化处理效果进行比较。

1.6 精密度与检出限

分别在杨梅、黄瓜、辣椒样品中添加浓度为 0.02 mg·kg⁻¹, 0.05 mg·kg⁻¹, 0.10 mg·kg⁻¹ 有机磷农药混标, 按照 1.4, 1.3 的方法进提取、检测, 测定其精密度检出限, 各处理均 6 次重复。

1.7 数据分析

采用 Excel97-2003 软件进行分析处理数据, 安捷伦气相色谱工作站 Chemistation 软件生成图。

2 结果与分析

2.1 校准曲线绘制

用杨梅基质提取液将混合标准溶液配制成 0.02 ~ 1.00 mg·L⁻¹ 的标液在优化选择的色谱条件下进行分析, 获得混标色谱图, 如图 1。图 1 中, 19 种浓度为 0.10 mg L⁻¹ 的混合标液色谱图, 谱图基线平稳, 杂质干扰小, 不影响目标物定性分析。以化合物的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线(表 1), 各种有机磷农药在该范围内均有良好的线性关系, 相关系数(r²)均大于 0.999。黄瓜、辣椒的校准曲线与之相近。

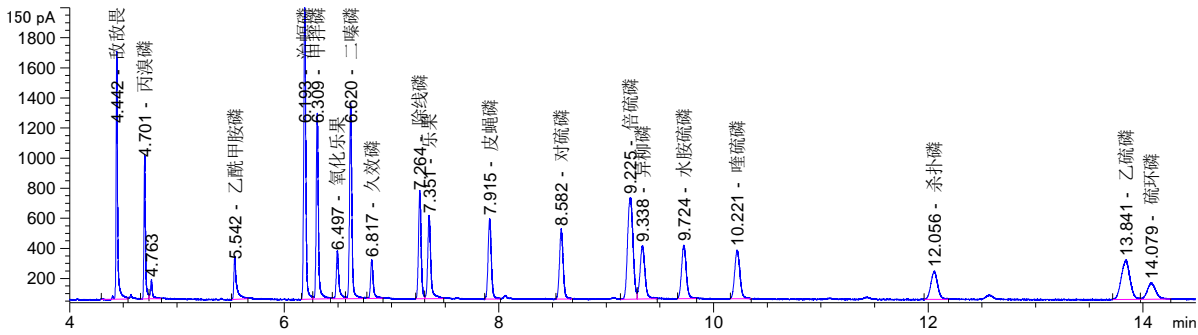


图 1 浓度为 0.10 mg·L⁻¹ 的 19 种混合标样色谱图
Figure 1 Chromatograms of 19 mixed standard solution with concentration of 0.10 mg·L⁻¹

表 1 19 种有机磷农药的线性范围、回归方程及相关系数
Table 1 Linear range, regression equation and correlation coefficient of 19 organophosphorus pesticides

农药名称	出峰时间/min	回归方程	r ²
敌敌畏	4.44	y=7 655.9x+6.0	0.999 1
丙溴磷	4.70	y=4 573.0x+2.6	0.999 2
乙酞甲胺磷	5.54	y=2 422.2x+2.0	0.999 0
治螟磷	6.19	y=12 840.2x+7.0	0.999 3
甲拌磷	6.31	y=8 498.6x+4.3	0.999 6
氧化乐果	6.50	y=2 916.8x+2.5	0.999 2
二嗪磷	6.62	y=9 703.3x+4.7	0.999 3
久效磷	6.82	y=2 410.3x+1.2	0.999 5
除线磷	7.26	y=6 107.7x+2.7	0.999 4
乐果	7.35	y=5 528.9x+2.9	0.999 6
皮蝇磷	7.92	y=5 684.3x+2.5	0.999 4
对硫磷	8.58	y=5 804.1x+1.4	0.999 8
倍硫磷	9.22	y=12 354.6x+4.3	0.999 7
异柳磷	9.34	y=5 606.5x+1.8	0.999 7
水胺硫磷	9.72	y=5 788.2x+1.4	0.999 8
啶硫磷	10.22	y=5 841.1x+1.4	0.999 6
杀扑磷	12.06	y=4 506.5x+1.1	0.999 1
乙硫磷	13.84	y=7 888.3x+2.1	0.999 4
硫环磷	14.08	y=3 564.4x+2.5	0.999 2

2.2 不同净化处理方式结果比较

分别向三种样品中添加含量为 0.20 mg·kg⁻¹ 浓度的上述混合标样, 按照 NY/T 761-2008 中有机磷农药残留前处理的净化方式和过免疫亲和柱净化方式对样品进行前处理, 以目标物的检出限高低、对仪器的污染程度及处理时间作为评价依据, 对其净化处理效果进行比较。各处理测定结果如表 2。由表 2 可知, 所有农药的平均含

量为 0.18 mg·kg⁻¹, 标准差为 0.002 7 mg·kg⁻¹, 免疫亲和柱处理的则为 0.19 mg·kg⁻¹, 0.001 6 mg·kg⁻¹。经 NY/T 761-2008 的处理的 3 种样品经过 20 次进样后色谱仪中进样隔垫、衬管、分流平板等均有明显污渍, 色谱柱接进样口端色泽变化明显, 且目标峰峰高呈逐渐缩小趋势, 而采用免疫亲和柱处理的样品则无这些现象。NY/T 761-2008 的净化处理过程约 2 h, 而免疫亲和柱的则只需要 1 min。可见采用免疫亲和柱对果蔬中有机磷残留测定进行净化处理效果及测定结果准确度明显优于 NY/T 761-2008, 而且平行性良好, 既省时省力, 又能够有效保护检测设备。

表 2 不同净化方式样品进样 20 次的测定结果
Table 2 Result of 20 tests on samples purified by different methods

农药名称	NY/T 761-2008 平均含量/(mg·kg ⁻¹)			免疫亲和柱平均含量/(mg·kg ⁻¹)		
	杨梅	黄瓜	辣椒	杨梅	黄瓜	辣椒
敌敌畏	0.181	0.181	0.178	0.192	0.190	0.194
丙溴磷	0.182	0.182	0.174	0.194	0.196	0.187
乙酰甲胺磷	0.175	0.173	0.175	0.188	0.190	0.183
治螟磷	0.174	0.179	0.176	0.188	0.189	0.185
甲拌磷	0.187	0.180	0.190	0.198	0.191	0.192
氧化乐果	0.171	0.170	0.176	0.184	0.189	0.188
二嗪磷	0.175	0.181	0.170	0.185	0.191	0.181
久效磷	0.178	0.179	0.174	0.187	0.192	0.187
除线磷	0.183	0.181	0.182	0.192	0.187	0.191
乐果	0.179	0.184	0.180	0.193	0.192	0.191
皮蝇磷	0.183	0.180	0.181	0.195	0.191	0.191
对硫磷	0.185	0.185	0.188	0.197	0.189	0.197
倍硫磷	0.187	0.176	0.188	0.192	0.187	0.194
异柳磷	0.174	0.178	0.174	0.187	0.188	0.185
水胺硫磷	0.185	0.181	0.181	0.189	0.183	0.187
啶硫磷	0.181	0.176	0.185	0.182	0.182	0.185
杀扑磷	0.182	0.180	0.182	0.189	0.184	0.185
乙硫磷	0.185	0.181	0.180	0.188	0.183	0.183
硫环磷	0.177	0.178	0.179	0.187	0.187	0.185

2.3 精密度与检出限

分别在杨梅、黄瓜、辣椒样品中添加浓度为 0.02 mg·kg⁻¹, 0.05 mg·kg⁻¹, 0.10 mg·kg⁻¹ 有机磷农药混标, 按照 1.4, 1.3 的方法进提取、检测, 测定其精密度、检出限, 各处理均 6 次重复。

表 3 19 种有机磷农药的检出限及精密度
Table 3 Detection limit and precision of 19 organophosphorus pesticides

农药名称	杨梅				黄瓜				辣椒			
	RSD/%			检出限 /(mg·kg ⁻¹)	RSD/%			检出限 /(mg·kg ⁻¹)	RSD/%			检出限 /(mg·kg ⁻¹)
	0.02 mg·kg ⁻¹	0.05 mg·kg ⁻¹	0.10 mg·kg ⁻¹		0.02 mg·kg ⁻¹	0.05 mg·kg ⁻¹	0.10 mg·kg ⁻¹		0.02 mg·kg ⁻¹	0.05 mg·kg ⁻¹	0.10 mg·kg ⁻¹	
敌敌畏	3.2	3.1	2.0	0.006	3.3	3.1	2.0	0.007	3.2	3.2	1.9	0.008
丙溴磷	4.2	3.1	2.5	0.010	4.1	2.8	2.3	0.009	4.5	3.8	2.3	0.010
乙酰甲胺磷	4.8	3.5	2.6	0.010	4.5	3.2	2.1	0.010	4.7	3.5	2.4	0.010
治螟磷	3.1	3.2	2.4	0.004	2.9	2.7	2.5	0.005	3.5	3.7	2.1	0.007
甲拌磷	3.1	2.8	2.8	0.006	2.8	2.8	2.5	0.006	3.6	3.6	2.1	0.006
氧化乐果	4.3	2.9	2.3	0.010	5.2	3.2	2.4	0.010	4.8	3.4	2.2	0.010
二嗪磷	3.9	3.2	2.1	0.004	3.4	3.2	2.8	0.006	3.8	3.1	1.9	0.005
久效磷	4.6	3.7	2.8	0.010	4.1	3.1	3.1	0.010	4.5	3.7	2.8	0.010
除线磷	4.2	3.5	2.1	0.008	4.2	3.4	2.5	0.009	4.6	3.7	2.3	0.008
乐果	4.1	3.2	2.2	0.008	3.9	3.6	2.9	0.008	4.7	3.5	2.5	0.009
皮蝇磷	3.4	3.4	2.3	0.008	3.8	3.1	2.7	0.007	3.8	3.5	2.4	0.008
对硫磷	3.7	2.9	2.8	0.008	3.6	3.6	3.1	0.008	3.9	3.5	2.1	0.008
倍硫磷	3.4	3.1	1.6	0.004	3.3	3.4	2.7	0.006	3.8	3.1	2.6	0.005
异柳磷	4.2	2.7	2.4	0.008	4.2	3.4	3.2	0.008	3.7	2.9	2.4	0.007
水胺硫磷	4.1	3.8	2.3	0.008	4.3	3.9	3.0	0.007	3.4	3.1	2.4	0.008
啶硫磷	3.5	3.3	2.4	0.008	3.8	3.7	3.4	0.008	3.2	3.0	1.9	0.008
杀扑磷	4.5	3.3	2.5	0.010	4.9	4.0	2.9	0.010	4.5	4.1	2.7	0.010
乙硫磷	3.1	3.2	2.4	0.006	3.5	3.1	3.2	0.008	3.9	4.0	2.7	0.007
硫环磷	4.8	3.1	2.4	0.010	4.8	4.1	3.2	0.010	4.5	4.0	2.9	0.010

根据峰面积与标准曲线计算浓度值并计算相对标准偏差,以此考察方法的精密度。19种有机磷农药的相对标准偏差(RSD)在1.6%~4.8%,检出限均在 $0.01\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以下,如表3。由表3可知,实验中低浓度添加水平($0.02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)回收率在85.4%~96.1%,中浓度($0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)在89.7%~97.1%,高浓度($0.10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)在90.2%~103%,总体回收率均在85%以上,可满足当前果蔬中有机磷农药残留测定要求。

3 结论与讨论

在NY/T 761-2008标准的基础上,本试验采用多功能免疫亲和柱对有果蔬中机磷农药提取液进行净化,建立了一种可快速净化果蔬中有机磷农药残留的方法。19种有机磷农药不同浓度回收率中,低浓度添加水平($0.02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)回收率在85.4%~96.1%,中浓度($0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)在89.7%~97.1%,高浓度($0.10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)在90.2%~103%,总体回收率均在85%以上,RSD在1.6%~4.8%范围内,检出限均在 $0.01\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以下,明显优于NY/T 761-2008的规定方法。本方法净化过程可在1 min内钟完成,净化液可直接用于测定,方便、快捷,并可明显降低对检测设备的污染程度,这与刘艺^[10]等对宣木瓜中有机氯农药处理效果相近。可见,本方法可满足当前果蔬中有机磷农药残留测定要求,有望在今后农药残留测定中广泛应用。

参考文献:

- [1] 吕晶,张群.气相色谱在食品中有机磷农药残留的检测应用[J].现代食品,2016(7):101-102.
- [2] 张泾凯,顾青清,许小燕,等.液液萃取/气相色谱/串联质谱法测定水中有机磷[J].中国给水排水,2016,32(17):145-147.
- [3] 中国农业部.蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定:NY/T 761-2008[S].北京:中国农业出版社,2008.
- [4] 张艳丽,韩木先.NY/T 761-2008标准方法中蔬菜样品前处理过程应注意的问题[J].理化检验:化学分册,2015,51(8):1130-1132.
- [5] 欧阳蒲月,黄智璇,周金森,等.蔬菜中有机磷农药残留前处理技术初探[J].中国热带医学,2009,9(4):757-758,760.
- [6] 宋新国.豇豆农药残留的提取方法:201010619162.5[P].2014-08-03.
- [7] HUANG Z Q, LI Y J, CHEN B. Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2007, 853(1-2):154-162.
- [8] 叶日金,冯志强,庄俊钰,等.超高效液相色谱-串联质谱测定鸡饲料中黄曲霉毒素B1[J].食品安全导刊,2016,7X:135-137.
- [9] 刘超,景赞.饲料中黄曲霉毒素B1的检测[J].中国果菜,2015(12):25-27.
- [10] 刘艺,徐慧群,谢晓梅,等.宣木瓜中重金属、农药残留及黄曲霉毒素的测定[J].安徽中医药大学学报,2015(1):73-76.