

固相萃取-高效液相色谱法检测水中多种拟除虫菊酯类农药

沈登辉¹, 单晓梅^{1,2}, 陆蓓蓓¹, 谢继安²

摘要: [目的] 研究同时测定水中甲氰菊酯、氯氟氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、氯菊酯 5 种拟除虫菊酯类农药污染物的固相萃取-高效液相色谱方法。[方法] 水样经 C18 小柱富集, 以异丙醇洗脱, 采用光电二极管阵列检测器检测, 利用 C18 色谱柱分离, 以乙腈溶液和纯水为流动相等梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 在波长 205 nm 进行测定, 外标法定量。[结果] 5 种拟除虫菊酯类农药在 0.0~5.0 mg/L 浓度范围内具有良好的线性关系, 方法最低检测质量浓度为 0.025~0.050 $\mu\text{g/L}$, 回收率范围为 88.0%~102.2%, 相对标准偏差为 1.0%~3.8%。[结论] 该固相萃取-高效液相色谱法灵敏、准确, 适用于水源水及生活饮用水中痕量拟除虫菊酯类农药残留的检测。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱; 拟除虫菊酯农药

Determination of Five Pyrethroids in Water Using Solid Phase Extraction High Performance Liquid Chromatography SHEN Deng-hui¹, SHAN Xiao-mei^{1,2}, LU Bei-bei¹, XIE Ji-an² (1.Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China; 2.Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hefei, Anhui 230601, China). Address correspondence to SHAN Xiao-mei, E-mail:xiaomeishan@126.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To establish a method for the simultaneous determination of 5 pyrethroids in source water or drinking water, i.e. fenpropathrin, cyhalothrin, deltamethrin, fenvalerate, and permethrin, using solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography. [Methods] The water samples were extracted and condensed with solid-phase extraction using C18 cartridges and eluted by isopropanol. Separation was carried out on a Waters Sunfire C18 column, using acetonitrile and water as mobile phase gradient model at a flow rate of 1.0 mL/min, with detective wavelength at 205 nm. Quantification was calculated by an external standard method. [Results] The linear range of proposed determination methodology was 0.0-5.0 mg/L. The minimum detectable concentration was 0.025-0.050 $\mu\text{g/L}$. The recoveries were between 88.0% and 102.2% with a relative standard deviation in the range of 1.0%-3.8%. [Conclusion] The method is sensitive, accurate, and applicable to detect the trace pyrethroid residues in source water and drinking water.

Key Words: solid phase extraction; high performance liquid chromatography; pyrethroid

农药对水的污染,尤其是对水源以及饮用水的污染,对人体健康构成直接威胁。有机磷、氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类农药等为我国大陆生产和使用最多的农药品种,并通过各种途径污染水源^[1-2]。因此,探索建立水中多种有机农药快速、灵敏、准确的分析方法十分必要。

拟除虫菊酯类农药是一类结构或生物活性类似天然除虫菊酯的仿生合成杀虫剂,具有高效、广谱、低毒以及生物降解快的特点,广泛用于蔬菜、茶叶等农作物种植中的害虫防治。因其杀虫效果好,对人、畜的毒性比有机磷和氨基甲酸酯杀虫

剂低,相对比较安全,因而应用越发广泛。虽然现有生活饮用水卫生标准(GB 5749—2006)中仅有溴氰菊酯一项限值^[3],但菊酯类农药潜在的雌激素作用特性^[4-5]需引起高度重视。目前,水中拟除虫菊酯类农药残留量测定方法主要有气相色谱法、液相色谱法等^[6-8],由于一些拟除虫菊酯具有热不稳定性,而气相色谱法需要较高的汽化温度,可能会造成一定的分解,对分析结果的准确性产生影响。

固相萃取前处理技术,目前已广泛应用于药物分析、环境监测等^[9-10]方面,其利用样品通过固相萃取柱,分析物选择吸附在固体填料表面,再用溶剂洗脱下来,从而达到分离、净化和富集的目的。本实验拟采用固相萃取-高效液相色谱法同时检测水中拟除虫菊酯类农药残留量,探讨一种灵敏、准确、适用于同时测定水中拟除虫菊酯类农药污染状况的方法。

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(编号: 11040606M216)

[作者简介] 沈登辉(1989—),男,硕士生;研究方向:环境卫生学;

E-mail: anyixiaoshen@163.com

[通信作者] 单晓梅主任技师, E-mail: xiaomeishan@126.com

[作者单位] 1.安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系,安徽 合肥 230032; 2.安徽省疾病预防控制中心,安徽 合肥 230601

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

P680 型高效液相色谱仪,带光电二极管阵列(PDA)检

测器(美国戴安公司), C18 色谱柱(5 μm $\times$ 250 mm $\times$ 4.6 mm), Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。固相萃取装置(美国 Supelco 公司), AP-9925 型真空泵(天津奥特赛恩斯仪器有限公司), HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL, 美国 Waters 公司), C18 固相萃取柱(200 mg/3 mL, 美国 Waters 公司)。

乙腈(色谱纯), 盐酸(分析纯)。甲氰菊酯(纯度 99%)、氯氟氰菊酯(纯度 98%)、溴氰菊酯(纯度 99.5%)、氰戊菊酯(纯度 98%)、氯菊酯(纯度 94%), 以上 5 种农药标准品均购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司。

1.2 色谱分析条件

色谱柱柱温: 35℃; 流动相: 乙腈:水 = 78:22(体积比); 流速: 1.0 mL/min; PDA 检测波长: 205 nm; 进样量: 100 μL 。

1.3 标准储备液和混合标准中间溶液的配制

标准储备溶液(100 mg/L): 分别准确称取 5.0 mg 甲氰菊酯、氯氟氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、氯菊酯固体标准品于 50 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并定容。置于 4℃ 冰箱保存, 保质期 1 个月内。

标准中间溶液(5 mg/L): 吸取 5 种菊酯标准储备溶液各 5 mL 于 100 mL 容量瓶中, 流动相定容。置于 4℃ 冰箱保存, 临用现配。

1.4 标准工作液的配制

标准工作液临用现配, 取 6 个 25 mL 容量瓶, 将 5 种菊酯标准混合中间溶液(5 mg/L)用流动相稀释配成浓度分别为 0.0、0.05、0.10、0.50、1.0、2.5、5.0 mg/L 的标准系列。

1.5 水样的采集、前处理和储存

用玻璃磨口瓶采集样品, 每个样品 1 L。若水样含较多杂质, 应先用双层定量滤纸过滤, 出厂水、管网水应加 40~50 mg/L 亚硫酸钠去除余氯。本实验采集合肥市两家水厂进厂水、出厂水各 2 份, 对应水厂的管网末梢水各 3 份进行测定。样品应避光保存、在 24 h 内进行萃取。

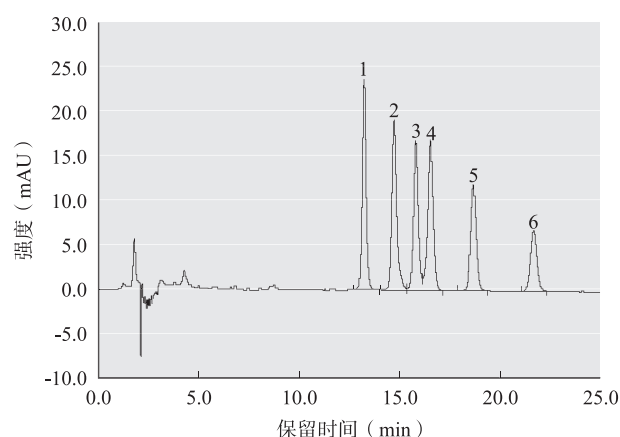
取待测水样 100 mL, 并用盐酸调节水样至 pH < 2。固相萃取柱预先依次用 5 mL 甲醇、10 mL 超纯水淋洗活化, 将酸化后的水样以 2~4 mL/min 负压抽滤通过固相萃取柱, 上样完毕后用 10 mL 超纯水淋洗小柱, 抽干柱中残留水分, 在高纯氮气下氮吹 10 min, 再用异丙醇 3 mL 洗脱并收集洗脱液, 氮吹至约 0.7 mL, 超纯水定容至 1 mL, 待高效液相色谱分析, 如果不能及时分析, 可将萃取液于 4℃ 冰箱保存, 在 48 h 内进行测定。

1.6 样品测定

在本实验选定的色谱条件下, 进样量 100 μL , 进行高效液相色谱分析。根据各组分的保留时间和紫外吸收光谱图定性, 峰面积定量。参考保留时间依次为: 甲氰菊酯为 13.210 min, 氯氟氰菊酯为 14.687 min, 溴氰菊酯为 15.777 min, 氰戊菊酯为 16.503 min, 氯菊酯(顺式)为 18.637 min, 氯菊酯(反式)为 21.630 min, 见图 1。

1.7 结果计算

$C_{\text{样}} = 100 \times C_{\text{测}}$ 。 $C_{\text{样}}$ ——水样中菊酯农药的浓度(mg/L), $C_{\text{测}}$ ——浓缩后水样中菊酯农药的测定浓度(mg/L), 由标准曲线计算得。



[注] 1. 甲氰菊酯; 2. 氯氟氰菊酯; 3. 溴氰菊酯; 4. 氰戊菊酯; 5. 氯菊酯(顺式); 6. 氯菊酯(反式)。

图 1 5 种拟除虫菊酯标准样品色谱图

2 结果

2.1 样品预处理方法优化

2.1.1 固相萃取柱的选择 根据相关文献^[11-12], 检测农药类化合物使用的萃取柱主要有 HLB 固相萃取柱和 C18 固相萃取柱。本文分别对 HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL, 美国 Waters 公司)和 C18 固相萃取柱(200 mg/3 mL, 美国 Waters 公司)的萃取效率进行比较, 数据见表 1。实验结果表明, C18 固相萃取柱对目标化合物回收率较佳, 因此选取该萃取柱进行固相萃取前处理。

2.1.2 水样酸度对萃取效率的影响 分别使用盐酸调节水样至 pH < 2 后及不调酸度的水样进行实验, 数据见表 1。实验结果表明水样酸化后, 回收率提高。

表 1 柱类型及水样酸度对 5 种拟除虫菊酯农药的回收率影响 (% , n=6)

柱类型	pH	甲氰菊酯	氯氟氰菊酯	溴氰菊酯	氰戊菊酯	氯菊酯(顺式+反式)
C18	未调	90.1	82.4	82.2	82.9	83.1
	pH<2	104.5	92.7	89.5	88.6	90.5
HLB	未调	5.2	10.9	4.0	5.5	—
	pH<2	8.9	19.3	12.7	13.5	6.0

2.1.3 洗脱剂的选择 根据相关文献^[13-14], 实验比较了乙腈、丙酮、乙腈/丙酮(1:1)、甲醇、异丙醇各 3 mL 作为洗脱剂的洗脱效果, 结果见表 2。可见用异丙醇作为洗脱剂效果最佳, 毒性小, 回收率好, 故选择其作为本实验洗脱方法。

表 2 不同洗脱剂下 5 种拟除虫菊酯农药的回收率 (% , n=3)

组分名称	乙腈	丙酮	乙腈/丙酮(1:1)	甲醇	异丙醇
甲氰菊酯	85.9~88.1	43.4~46.5	84.9~86.7	116.8~120.5	102.7~104.9
氯氟氰菊酯	76.8~77.4	28.4~30.2	69.6~71.9	89.5~93.2	91.2~95.6
溴氰菊酯	74.0~75.7	29.2~32.5	67.3~71.5	85.6~88.9	88.6~91.4
氰戊菊酯	75.1~78.1	29.3~33.5	67.5~71.1	86.9~90.8	89.0~92.5
氯菊酯(顺式+反式)	80.2~82.5	39.4~43.1	76.1~78.2	85.4~88.5	88.5~92.1

2.2 色谱分析条件优化

2.2.1 流动相的流速及配比的选择 结合文献^[6, 15], 并经本实验研究表明, 水含量过高时, 分析时间变长, 峰形变宽, 且灵敏度降低; 而水含量过低时, 分离度不够。通过比较乙腈: 水为 70: 30 至 80: 20 间的目标物分离情况, 发现当乙腈: 水=78: 22 时, 分离度最为理想。在乙腈: 水=78: 22 的情况下, 调节流速 0.80~1.50 mL/min 之间变化, 发现当流速为 1.0 mL/min, 峰形对称, 分离较好。故选择流动相配比为乙腈: 水=78: 22, 流速 1.0 mL/min 作为本方法实验条件。

2.2.2 检测波长的选择 通过 PDA 检测器进行光谱图扫描, 发现在波长 205 nm 处这 5 种拟除虫菊酯的吸收强度较理想, 灵敏度高, 且实验结果表明该波长下背景干扰小, 杂质峰少, 对目标物有着较强的选择性。

2.3 标准曲线的线性、最低检测质量及质量浓度

本法仪器最低检测质量浓度为 2.5~5.0 μg/L, 进样量 100 μL, 则最低检测质量 0.25~0.50 ng, 取 100 mL 水样处理后测定, 则方法最低检测质量浓度为 0.025~0.050 μg/L。仪器最低检测质量浓度是通过逐步稀释标准溶液进样所得, 约为 10 倍信噪比, 具体相关参数见表 3。

表 3 方法的线性方程、相关系数、最低检测质量及质量浓度

组分名称	回归方程	相关系数 (r)	最低检测质量 (ng)	最低检测质量浓度 (μg/L)
甲氧菊酯	y=14.308x-0.805 8	0.999 5	0.25	0.025
氯氟氰菊酯	y=11.723x-0.436 8	0.999 5	0.30	0.030
溴氰菊酯	y=11.528x-0.612 9	0.999 5	0.30	0.030
氰戊菊酯	y=12.553x-0.560 0	0.999 5	0.30	0.030
氯菊酯 (顺式+反式)	y=14.478x-0.379 1	0.999 6	0.50	0.050

2.4 方法精密度试验

取 5 种菊酯农药混合标准溶液 0.05、0.5、5.0 mg/L 平行测定 6 次, 结果见表 4, 其相对标准偏差 (RSD) 为 1.0%~3.8%。

表 4 方法的精密度试验结果 (n=6)

组分名称	标准 0.05 mg/L		标准 0.5 mg/L		标准 5.0 mg/L	
	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	RSD (%)
甲氧菊酯	0.052 ± 0.001	1.9	0.512 ± 0.012	2.3	5.056 ± 0.052	1.0
氯氟氰菊酯	0.053 ± 0.002	3.8	0.515 ± 0.012	2.3	5.058 ± 0.098	1.9
溴氰菊酯	0.054 ± 0.002	3.7	0.519 ± 0.015	2.9	5.031 ± 0.091	1.8
氰戊菊酯	0.054 ± 0.002	3.7	0.512 ± 0.013	2.5	4.990 ± 0.083	1.7
氯菊酯 (顺式+反式)	0.053 ± 0.001	1.9	0.508 ± 0.012	2.4	4.982 ± 0.105	2.1

2.5 方法准确度试验

以出厂水为本底, 分别加入 5 种不同量拟除虫菊酯农药混标, 测定方法的加标回收率 (每个样品平行测定 6 次), 结果见表 5, 其回收率范围为 88.0%~102.2%。

2.6 实际样品测定

采用该固相萃取-高效液相色谱法联用技术对合肥市两家具厂的水源水和出厂水水样进行处理分析, 结果 5 种目标农药

均未检出。合肥市主要饮用水和水源未见以上菊酯农药污染。

表 5 方法的回收率试验结果 (n=6)

组分	加入量 (μg/L)	测得平均值 (μg/L)	回收率 (%)
甲氧菊酯	0.5	0.44	88.0
氯氟氰菊酯		0.46	90.2
溴氰菊酯		0.45	90.0
氰戊菊酯		0.47	94.0
氯菊酯 (顺式+反式)		0.48	96.0
甲氧菊酯	5.0	4.78	95.6
氯氟氰菊酯		4.91	98.2
溴氰菊酯		4.88	97.6
氰戊菊酯		5.11	102.2
氯菊酯 (顺式+反式)		4.94	98.8
甲氧菊酯	50.0	49.12	98.3
氯氟氰菊酯		50.25	100.5
溴氰菊酯		49.55	99.1
氰戊菊酯		51.01	102.0
氯菊酯 (顺式+反式)		49.48	99.0

3 讨论

本实验研究了水源水及生活饮用水中多种拟除虫菊酯类农药残留的 C18 柱固相萃取-高效液相色谱-PDA 检测器检测方法。实验结果表明, 该法的准确度和精密度均令人满意, 能够满足生活饮用水卫生标准 (GB 5749—2006) 中溴氰菊酯限值要求 (<0.02 mg/L), 灵敏度高; 试剂消耗少, 污染小; 对目标物选择性强, 适用于实际样品检测。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] 宋安乔. 北京市北安河村水质农药污染的调查[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(1): 73.

[2] 王静, 刘铮铮, 潘荷芳, 等. 浙江省市级饮用水源地氨基甲酸酯农药的分析、污染特征及健康风险[J]. 环境化学, 2010, 29(4): 623-628.

[3] 中华人民共和国卫生部. GB 5749—2006 生活饮用水卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.

[4] DU G, SHEN O, SUN H, et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays [J]. Toxicol Sci, 2010, 116(1): 58-66.

[5] 陈海燕, 王心如, 肖继皋, 等. 有机磷与拟除虫菊酯农药的拟雌激素活性研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19(4): 274-277.

[6] 郭敏, 单正军, 孔德洋, 等. 固相萃取-气相色谱法测定水体中 29 种农药的残留量[J]. 农药学报, 2011, 13(2): 180-185.

[7] 陈天文. 固相萃取-高效液相色谱法 (固相萃取-HPLC) 测定环境水体中拟除虫菊酯农药残留[J]. 福建分析测试, 2007, 16(2): 16-18.

[8] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5750—2006 生活饮用水标准检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.

[9] 张吟, 陈一农, 陈崇宏. 固相萃取-高效液相色谱法分析血浆中的

- 13 种药物[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(21): 1648-1651.
- [10] LAZARTIGUES A, FRATTA C, BAUDOT R, et al. Multiresidue method for the determination of 13 pesticides in three environmental matrices: water, sediments and fish muscle[J]. Talanta, 2011, 85(3): 1500-1507.
- [11] 朱华平, 张超, 王硕, 等. 饮用水中 45 种农药残留检测方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(3): 112-116.
- [12] HLADIK ML, SMALLING KL, KUIVILA KM. A multi-residue method for the analysis of pesticides and pesticide degradates in water using HLB solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2008, 80(2): 139-144.
- [13] 王松, 孙铁珩, 孙丽娜, 等. 畜牧业污水中大环内酯和拟除虫菊酯类驱虫剂物质的 LC/MS/MS 检测[J]. 安全与环境学报, 2009, 9(6): 97-100.
- [14] 常爱敏, 宗栋良, 梁栋, 等. 气相色谱法测定水中 31 种农药类环境激素[J]. 中国给水排水, 2009, 25(18): 82-86.
- [15] 罗晓燕, 林玉娜, 周洪伟, 等. 反相高效液相色谱法检测水中五种拟除虫菊酯农药残留量[J]. 中国卫生检验, 2011, 21(6): 1371-1372.
- (收稿日期: 2012-03-02)
(英文编审: 黄建权; 编辑: 郭薇薇; 校对: 郑轻舟)

【精彩预告】

混苯接触工人遗传损伤和代谢酶基因多态性的关系

叶云杰, 吕建萍, 周莉芳, 等

为探讨混苯接触工人外周血淋巴细胞染色体损伤状况及其与代谢酶基因 *CYP2E1* 和 *NQO1* 基因的多态性的关系。研究人员采用胞质分裂阻滞微核实验方法 (cytokinesis-blocked micronucleus, CBMN) 评价 461 名混苯作业工人和 88 名对照组工人的染色体损伤水平, 应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态检测 *CYP2E1* *Pst* 和 *NQO1*⁶⁰⁹ 基因多态。结果显示, 接触组和对照组的淋巴细胞微核率分别为 (2.12±1.87)% 和 (1.19±1.68)%, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 单因素和多因素分析结果均显示 *NQO1*⁶⁰⁹ 野生纯合者为致染色体损伤的易感人群。年龄增长是微核率增加的危险因素, 未发现性别、吸烟和饮酒与微核率之间的关系。因此, 双核淋巴细胞微核数可以作为苯接触早期健康损害的指标。混苯中甲苯和二甲苯可能不是导致遗传损伤的主要物质。*NQO1*⁶⁰⁹ 位点多态与混苯接触诱导的染色体损伤有关。

此文将于近期刊出, 敬请关注!

基于计划行为理论的初中生不良交通行为危险因素分析

王静, 杨屹, 傅灵菲, 等

运用计划行为理论建立初中生不良交通行为的危险因素调查问卷, 并进行分析研究, 寻找相关危险因素, 为有针对性地开展学生不良交通行为干预提供依据。研究人员采用分层整群抽样对 1495 名 12~14 岁的初中生进行问卷调查, 参考计划行为理论模型设计问卷, 分析研究学生交通不良行为危险因素, 运用 logistic 回归模型进行单因素和多因素分析, 确定相关危险因素。结果显示, 本次调查中不良交通行为发生的学生占 65.5%; 有不良交通行为意向的学生占 66.6%; 本调查涉及的青少年对于交通安全行为的行为态度、主观规范和知觉行为控制的相关因素, 对安全的交通行为意向均有正相关的统计学意义, 行为意向对于青少年安全的交通行为发生有一致性的正相关。由此可见, 本次研究中运用计划行为理论模型初步找出初中生不良交通行为危险因素, 提示对于不良交通行为的干预应该从简单的知信行转变为从行为信念、规范信念和知觉行为控制等方面进行针对性干预。

此文将于近期刊出, 敬请关注!