

高效液相色谱法测定白葡萄汁中苯甲酰脲类农药

周建科, 韩朝家, 唐翠苓, 付艳芳

(河北大学理化分析中心, 河北省分析科学技术重点实验室, 河北 保定 071002)

摘要: 以二氯甲烷为萃取剂, 甲醇为分散剂, 采用分散液液微萃取-正相高效液相色谱法测定白葡萄汁中4种苯甲酰脲类农药(氟苯脲、杀铃脲、除虫脲、氟铃脲)。色谱条件: Apollo Silica柱; 正己烷-无水乙醇(97:3, V/V)为流动相; 流速: 1.0mL/min; 紫外检测波长: 200nm。在0.33~100μg/mL范围内4组分线性良好, 方法检出限在5.80~6.60ng/mL之间, 平均回收率范围是73.72%~97.85%, 相对标准偏差范围是1.33%~4.62%。该方法快速、检出限低、重现性好, 可用于白葡萄汁中苯甲酰脲类农药的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 苯甲酰脲; 液液分散微萃取; 白葡萄汁

Determination of Benzoylurea Insecticides in White Grape Juice by High Performance Liquid Chromatography

ZHOU Jian-ke, HAN Chao-jia, TANG Cui-ling, FU Yan-fang

(Research Center of Physics and Chemistry Analysis, Key Laboratory of Analytical Science and Technology of Hebei Province, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Residues of benzoylurea insecticides (teflubenzuron, triflumuron, diflubenzuron and hexaflumuron) in white grape juice were determined by dispersive liquid-liquid micro-extraction combined with normal-phase high performance liquid chromatography. In the dispersive liquid-liquid micro-extraction, the extraction solvent was methylene chloride and dispersive solvent was methanol. The analytes were separated on Apollo Silica column with a mobile phase made up of *n*-hexane and anhydrous alcohol (97:3, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min and detected at 200 nm. Good linearity was found in the range of 0.33 to 100 μg/mL with correlation coefficients above 0.999. The limits of detection were between 5.80 ng/mL and 6.60 ng/mL. The average recoveries of the benzoylurea insecticides ranged from 73.72% to 97.85%, with relative standard deviations between 1.33% and 4.62%. The proposed method is rapid and highly reproducible and shows a limit of detection. Therefore it is applicable for the determination of benzoylurea insecticide residues in white grape juice.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); benzoylurea; dispersive liquid-liquid micro-extraction; white grape juice

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)10-0169-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201310036

苯甲酰脲类杀虫剂是几丁质合成抑制剂, 通过抑制昆虫表皮几丁质的合成, 杀灭害虫。现已在粮食、蔬菜和水果种植上得到广泛应用。但此类农药的残效期较长, 其残留对人体健康有害。美国、欧盟和日本等国家对该类农药均制定了相应的最大残留限量, 我国国家标准中规定氟苯脲在柑橘中最大残留限量为0.5mg/kg^[1], 有关肉类^[2]、蔬菜^[3-5]、水果^[5-7]和水^[8-10]中该类农药的残留检测已有报道, 但果汁饮品(如白葡萄汁)中此类农药的检测报道很少。

目前, 苯甲酰脲类农药的检测主要有固相萃取-液相色谱法^[1,6]、基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法^[4]、QuEChERS-液相色谱-电喷雾串联质谱法^[11]、液下单滴微萃取-高效液相色谱法^[12]、微萃取瓶富集-液

收稿日期: 2012-03-17

基金项目: 国家计量基标准(化学部分)资源共享平台建设项目(2005DKA10800)

作者简介: 周建科(1956—), 男, 研究员, 本科, 主要从事色谱分离研究。E-mail: zhoujianke@yahoo.com.cn

相色谱法^[9]等。分散液液微萃取(dispersive liquid liquid microextraction, DLLME)技术于2006年由Assadi等^[13]首次提出, 具有操作简单、快速、富集能力强、有机溶剂用量少等优点。本实验采用该处理方法对白葡萄汁中4种苯甲酰脲类化合物进行提取、浓缩, 结合正相高效液相色谱法, 建立白葡萄汁中氟苯脲、杀铃脲、除虫脲、氟铃脲4种苯甲酰脲类农药的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白葡萄汁 市售。

氟苯脲(98.8%)、杀铃脲(99.5%)、除虫脲(90%)、氟铃脲(99.3%) 美国Sigma-Aldrich公司；甲醇、二氯甲烷、无水乙醇和正己烷(均为色谱纯)，所用水为二次蒸馏水，其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LC-6A高压输液泵 日本岛津公司；7125型手动进样阀 美国Rheodyne公司；LINEAR 200紫外检测器 美国热电公司；XW-80A旋涡混合器 上海医科大学仪器厂；N2000色谱工作站 浙江大学智能信息工程研究所。

1.3 方法

1.3.1 正相色谱分离条件

色谱柱：Apollo Silica柱(250mm×4.6mm, 5μm)；流速：1.0mL/min；柱温：室温；检测波长：200nm；进样量：10.0μL；流动相：正己烷-无水乙醇(7:3, V/V)；采用色谱峰保留时间定性，外标法峰面积定量。

1.3.2 标准溶液配制

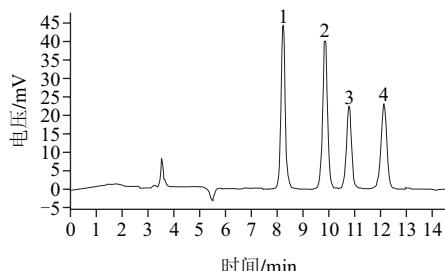
准确称取氟苯脲、杀铃脲、除虫脲、氟铃脲标准品适量，用甲醇溶解并定容，配成质量浓度均为1mg/mL的标准储备液。移取标准储备液各200μL于2mL的具塞锥形刻度管中，微氮气流赶走甲醇，用流动相溶解并定容至2mL，制成标准混合液，4℃冰箱存放。用流动相逐级稀释标准混合液，配制系列工作溶液。

1.3.3 样品预处理

于10mL具塞尖底离心试管中，加入5.0mL样品溶液(NaOH溶液调节pH值为3.7)。将225μL二氯甲烷和1.2mL甲醇混匀，用注射器迅速注入样品溶液，形成乳浊液体系，静置3min，以3500r/min离心3min，用250μL微量进样器吸取离心管底部二氯甲烷相于具塞锥形刻度管中，微氮气流吹至近干，用100μL流动相溶解，混匀。取10μL进样分析。

2 结果与分析

2.1 色谱条件选择



1.氟苯脲；2.杀铃脲；3.除虫脲；4.氟铃脲。

图1 标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of benzoylurea insecticide standards

实验考察190~280nm范围内4组分的紫外吸收情况，结果表明，在195~215nm范围内有较强吸收，若采用反相色谱分离，常用的流动相溶剂在此波长范围内往往有吸收，基线噪声大，干扰测定。而正相色谱中正己烷等常用流动相则不会造成此种干扰，故本实验选用正相色谱法。实验证明，在200nm波长下灵敏度高且基线噪声小，故选200nm作为最佳检测波长。在等度洗脱条件下，考察不同体积比正己烷-无水乙醇作为流动相时出峰情况，当体积比为97:3时，4个组分能完全分离。标准品色谱图见图1。

2.2 萃取剂和分散剂选择

萃取剂的性质是影响萃取效率的重要因素之一。萃取剂需满足一定的条件：密度最好大于样品溶液；易溶于分散剂不易溶于样品溶液；富集效果好；不影响后续色谱分析。实验考察二氯甲烷、三氯甲烷和氯苯对目标化合物的萃取情况，三氯甲烷和氯苯对组分出峰有干扰，二氯甲烷对目标化合物没有干扰且萃取效果较好。

萃取剂体积对萃取效率有一定影响，在分散剂(甲醇)体积一定(1.2mL)的情况下，考察二氯甲烷100~300μL时，4种苯甲酰脲类化合物的萃取情况，结果见图2。故选择萃取剂体积是225μL。

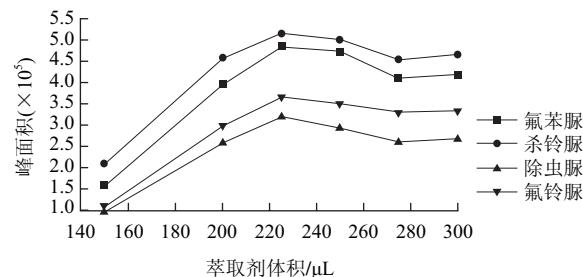


图2 萃取剂体积对峰面积的影响

Fig.2 Effect of extraction solvent volume on peak area

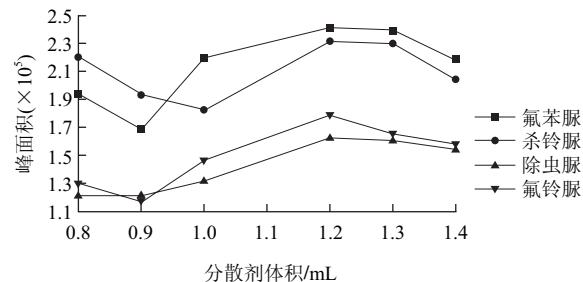


图3 分散剂体积对峰面积的影响

Fig.3 Effect of dispersive solvent volume on peak area

分散液液微萃取中的分散剂要能够很好的溶解样品和萃取剂。实验考察甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、四氢呋喃作为分散剂时的情况。结果表明，乙醇和乙腈能很好的溶于样品，但萃取效率较低；丙酮对目标化合物出峰

有干扰；四氢呋喃不能很好的分散于样品溶液中；甲醇既有好的溶解能力，又有高的萃取效率，故选甲醇做分散剂。

分散剂的体积是影响萃取效率的又一重要因素，体积过小，分散效果不好，导致萃取效率不高；体积过大，目标化合物会过多的溶解于样品和分散剂中，同样降低萃取效率。实验考察分散剂体积0.8~1.4mL时的萃取情况，结果见图3，选择甲醇的体积是1.2mL。

2.3 萃取时间

在分散液液微萃取中，萃取时间是从向样品溶液中加入萃取剂和分散剂混合溶液到开始离心的时间。实验考察1~8min时的萃取情况，结果表明，萃取时间小于3min时，回收率略小于萃取时间为3min时；萃取时间大于3min时，回收率不再增加。故实验选定萃取时间为3min。

2.4 酸度

酸度往往对萃取效果有影响。氟苯脲、杀铃脲、除虫脲、氟铃脲在中性或弱酸性介质中稳定。所测样品白葡萄汁本身的pH值为2.7，实验考察pH值为2.7~5.6时，对4种待测物萃取效率的影响情况。结果表明，溶液pH值为3.7时，萃取效率最高，如图4所示。

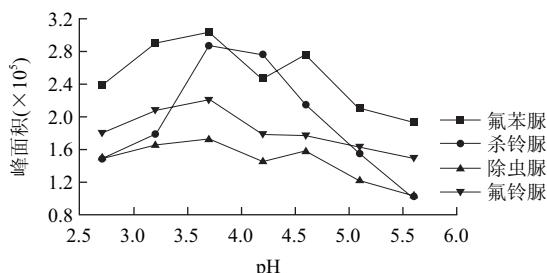


Fig.4 Effect of pH value on peak area

2.5 线性方程及检出限

移取系列标准工作液，在所选的色谱条件下，以Y(峰面积)对X(质量浓度)绘制工作曲线，4组分在0.33~100μg/mL范围内线性良好，其线性方程、相关系数及方法检出限见表1。

表1 线性方程及方法检出限

Table 1 Linear equations and detection limits for insecticides

组分	线性方程	测定范围/(μg/mL)	r	方法检出限/(ng/mL)
氟苯脲	$Y=44300.86+38369.71X$	0.31~100	0.9996	6.20
杀铃脲	$Y=49115.14+27816.26X$	0.31~100	0.9990	6.20
除虫脲	$Y=47521.10+34842.74X$	0.29~100	0.9995	5.80
氟铃脲	$Y=34533.82+21173.56X$	0.33~100	0.9996	6.60

2.6 精密度

在最佳色谱条件下，将20μg/mL的混合标准溶液连续进样6次，根据所得到的峰面积分别计算4个组分的精密度，氟苯脲、杀铃脲、除虫脲和氟铃脲的RSD范围在

0.59%~1.74%之间，表明此方法的精密度良好。实验结果见表2。

表2 方法的精密度实验(n=6)

Table 2 Results of precision experiments (n=6)

组分	峰面积						平均值	RSD/%
氟苯脲	666907.688	691367.313	684576.500	679054.138	685166.742	678313.250	680897.605	1.22
杀铃脲	825090.000	819912.688	819036.813	814053.128	827743.581	820002.213	820973.071	0.59
除虫脲	526602.313	521077.031	537205.750	525243.250	514896.438	538393.813	527236.433	1.74
氟铃脲	536681.813	528431.813	539262.250	537742.406	530453.031	526243.138	533135.742	1.02

2.7 稳定性实验

根据1.3.3节样品预处理方法，配制样品加标溶液。室温下放置，分别于0、1、2、4、8、12h在优化的色谱条件下进行测定，结果见表3。计算4个组分的峰面积的RSD值在1.04%~1.78%范围内，表明该方法在12h内有较好的稳定性。

表3 稳定性实验结果

Table 3 Stability of the method

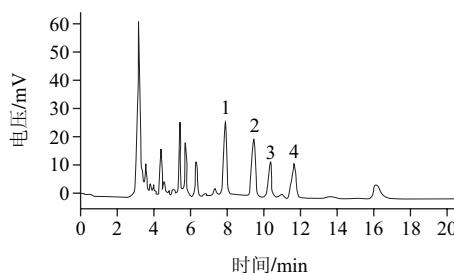
组分	放置时间/h						平均值	RSD/%
	0	1	2	4	8	12		
氟苯脲	302222.938	312412.704	303299.797	299748.781	296538.281	301032.844	302542.558	1.78
杀铃脲	247220.938	246513.204	250601.625	249412.156	250057.157	243789.156	247932.373	1.04
除虫脲	226534.203	223508.289	228591.071	231645.297	227253.469	230540.953	228012.214	1.29
氟铃脲	192691.960	195243.769	200096.564	199287.269	193737.156	196564.703	196270.237	1.51

2.8 加标回收率

表4 加标回收率及RSD(n=6)

Table 4 Recoveries and RSD (n = 6) of benzoylurea insecticides

组分	本底值/(μg/mL)	加入量/(μg/mL)	回收率/%	RSD/%
氟苯脲	0	0.15	89.53	2.18
	0	0.30	90.61	4.62
杀铃脲	0	0.15	95.37	1.57
	0	0.30	91.06	3.77
除虫脲	0	0.14	74.59	1.59
	0	0.30	73.72	1.75
氟铃脲	0	0.16	97.85	1.40
	0	0.30	97.74	1.33



1.氟苯脲；2.杀铃脲；3.除虫脲；4.氟铃脲。

图5 样品加标色谱图

Fig.5 Chromatogram of spiked sample

实验考察两个加标量条件下，氟苯脲、杀铃脲、除虫脲和氟铃脲在白葡萄汁样品中的加标回收率。每个加

标样品，均准确移取6份样品溶液，按照优化的样品处理方法和色谱条件，进行4个组分的含量分析。结果见表4。4组分的平均回收率范围在73.2%~97.85%之间，RSD值在1.33%~4.62%范围之间。说明方法重现性好，实验结果可靠。样品加标色谱图见图5。

2.9 样品测定

在优化的色谱条件下，对市售白葡萄汁样品进行测定，4组分未被检出，样品色谱图见图6。

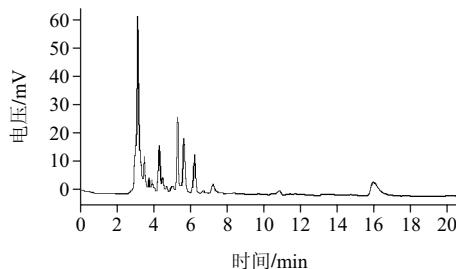


图6 样品色谱图
Fig.6 Chromatogram of real sample

3 结论

本实验建立了分散液液微萃取-正相色谱法同时测定白葡萄汁中氟苯脲、杀铃脲、除虫脲和氟铃脲的方法。该方法操作简单、快速、有机溶剂用量少，属于环境友好的检测方法。市售白葡萄汁中4组分均未检出。

参考文献：

- [1] 吴刚, 吴俭俭, 赵珊红, 等. 固相萃取-液相色谱分析蔬菜中多种苯甲酰脲类昆虫生长调节剂残留量[J]. 检验检疫学刊, 2009, 19(1): 10-13.
- [2] 刘锦霞, 王美玲, 黄志强, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中10种苯甲酰脲类杀虫剂[J]. 分析实验室, 2010, 29(9): 39-42.
- [3] 丁慧瑛, 谢文, 周召千, 等. 蔬菜中11种苯甲酰脲类农药残留的液相色谱-串联质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(8): 970-974.
- [4] 韩笑, 娄喜山, 张莉, 等. 基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法检测蔬菜中残留的苯甲酰脲类和双酰肼类杀虫剂[J]. 色谱, 2010, 28(4): 341-347.
- [5] SANNINO A, BANDINI M. Determination of seven benzoylphenylurea insecticides in processed fruit and vegetables using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(19): 2729-2733.
- [6] MILIADIS G E, TSIROPOULOS N G, APLADA-SARLIS P G. High performance liquid chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction[J]. Journal of chromatography A, 1999, 835(1/2): 113-120.
- [7] LEANDRO C C, HANCOCK P, FUSSELL R J, et al. Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching[J]. Journal of chromatography A, 2007, 1144(2): 161-169.
- [8] 刘世勤, 李方实. 高效液相色谱法测定水体中的苯甲酰脲类杀虫剂残留量[J]. 南京大学学报, 2010, 32(1): 102-105.
- [9] 周建科, 杨冬霞, 徐鹏. 微萃取/反相液相色谱法测定水中苯甲酰脲类农药[J]. 中国给水排水, 2011, 27(8): 96-98.
- [10] GARRIDO-FRENICH A, GIL-GARCIA M D, ARREBOLA F J, et al. Determination of parts per trillion level of benzoylurea pesticides in groundwater by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. Chromatographia, 2000, 52(9/10): 569-574.
- [11] 王连珠, 周昱, 陈泳, 等. 果蔬中8种苯甲酰脲类农药残留量的液相色谱-串联质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(3): 289-293.
- [12] 周建科, 刘瑞英, 宋歌, 等. 液下单清微萃取-高效液相色谱法测定果汁中苯甲酰脲农药残留[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 290-293.
- [13] REZAEI M, ASSADI Y, MILANI HOSSEINI M R, et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1116(1/2): 1-9.