

基质固相分散 – 共振光散射法测定 蔬果中的甲基毒死蜱

张传林,胡庆红*

(遵义医学院 药学院,贵州 遵义 563003)

摘要:建立测定蔬果中甲基毒死蜱残留量的基质固相分散 – 共振光散射新方法,为蔬果中甲基毒死蜱的快速检测提供技术支持。以曲拉通 X-100 为稳定剂,甲基毒死蜱与灿烂甲酚蓝在 pH 值为 10.00 的 Britton – Robinson 缓冲液中相互作用,使体系共振光散射强度显著增强,并在 360 nm、544 nm 处出现特征散射峰。甲基毒死蜱质量浓度在 0.1 ~ 5.0 μg/mL 与 544 nm 处的散射强度有良好的线性关系,其检出限为 0.029 μg/mL。各样品经基质固相分散法处理后,测得甲基毒死蜱的平均回收率为 91.5% ~ 96.8%。该方法快速、灵敏,可用于蔬果中甲基毒死蜱的检测。

关键词: 共振光散射; 甲基毒死蜱; 灿烂甲酚蓝; 基质固相分散

中图分类号: S481⁺.8 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2016)08-0081-05

Determination of Chlorpyrifos-methyl in Vegetables and Fruit by Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and Resonance Light Scattering Method

ZHANG Chuanlin, HU Qinghong*

(School of Pharmacy, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: This study aimed to establish a new resonance light scattering (RLS) method for determination of chlorpyrifos-methyl in vegetables and fruit, providing technical support for rapid detection of chlorpyrifos-methyl in vegetables and fruit. In Britton-Robinson buffer (pH = 10.00), with Triton X-100 as a stabilizer, the RLS intensity of chlorpyrifos-methyl greatly enhanced when brilliant cresyl blue was added. The scattering peaks were located at 360 nm and 544 nm. The RLS intensity was linear to the concentration of chlorpyrifos-methyl in the range of 0.1—5.0 μg/mL at 544 nm with a detection limit of 0.029 μg/mL. Several samples were purified by matrix solid-phase dispersion (MSPD) and then determined. The average recoveries of chlorpyrifos-methyl in these samples ranged from 91.5% to 96.8%. This method was quick and sensitive for determination of chlorpyrifos-methyl residues in vegetables and fruit.

Key words: resonance light scattering; chlorpyrifos-methyl; brilliant cresyl blue; matrix solid-phase dispersion

甲基毒死蜱是一种广谱、高效的有机磷酸酯类杀虫剂,广泛应用于农业生产与卫生杀虫。但其在体内蓄积能引起一系列的中毒反应^[1]。我国在最新实施的《食品中农药最大残留限量》中,将多种食

品中甲基毒死蜱的残留限量暂定为 5 mg/kg^[2]。目前,检测样品中甲基毒死蜱残留的前处理方法主要为固相萃取法^[3],检测方法主要有高效液相色谱法^[4]、气相色谱法^[5]、色谱 – 质谱联用^[6-8]等。现代

收稿日期:2015-12-30

基金项目:贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字 LKZ(2011)44]

作者简介:张传林(1990-),男,江苏盐城人,在读硕士研究生,研究方向:分子光谱的分析应用。

E-mail:zhangcl215@163.com

* 通讯作者:胡庆红(1963-),男,贵州遵义人,教授,主要从事分子光谱的分析应用研究。

E-mail:huqinghong1963@126.com

食品安全需要发展更加快速、灵敏的检测技术。基质固相分散法是近些年发展起来的一种新型的样品前处理技术,其以固相萃取填料为分散剂,将样品与适量的分散剂充分研磨,制成均相装入小柱后选择合适的有机溶剂洗脱,除去基质中的杂质,同时完成对样品待测组分的提取和净化^[9]。共振光散射法是近些年来发展起来的一种操作简便、分析快速、灵敏度可达纳克级的光谱新技术,在蛋白质^[10]、核酸^[11-12]、免疫^[13]、药物^[14-16]、无机离子^[17]等分析领域得到了广泛应用。本研究利用基质固相分散法作为样品前处理手段,通过研究甲基毒死蜱与灿烂甲酚蓝相互作用产生的共振光散射光谱,建立了蔬果中甲基毒死蜱残留量的检测方法,以期为蔬果中甲基毒死蜱的快速检测提供技术支持,同时拓展共振光散射技术在分析领域的应用。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

蔬果样品购于遵义市某超市;甲基毒死蜱标准品购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;灿烂甲酚蓝为分析纯,购自湘中精细化学品厂;丙酮、二氯甲烷、无水硫酸镁均为分析纯,曲拉通 X - 100、弗罗里硅土为化学纯,均购自国药集团化学试剂有限公司。无水硫酸镁、弗罗里硅土在 650 ℃ 马弗炉烘烤 5 h,弗罗里硅土用 3% 的水脱活后贮存于密封干燥器中备用。用酸度计测定配制一系列不同 pH 值的 Britton - Robinson (B - R) 缓冲溶液。

仪器包括 VARIAN Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国瓦里安公司)、TU - 1901 双光束紫外可见光分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、90Plus PALS 高灵敏度 Zeta 电位及粒度分析仪(美国布鲁克海文仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制 精密称取甲基毒死蜱标准品 0.020 0 g,用丙酮定容于 100 mL 的容量瓶中,配成 200 μg/mL 的储备液,4 ℃ 保存,临用时用水稀释到 20 μg/mL;精密称取灿烂甲酚蓝 0.010 0 g,用水定容于 100 mL 的容量瓶中,备用。

1.2.2 样品处理 将样品洗净,取 10 g 放入粉碎机中,匀浆。取 1.0 g 于研钵中,加入 2 g 无水硫酸镁充分研磨后再与 3 g 弗罗里硅土研磨均匀。在层析柱底部装 1 片滤纸,从下至上依次填入无水硫酸镁 0.5 g、研磨均匀的混合物、无水硫酸镁 0.5 g,每种填料填入后敲实,使填料均匀紧密地分布在柱中,柱上端再加 1 片滤纸。用 10 mL 二氯甲烷分 2 次洗

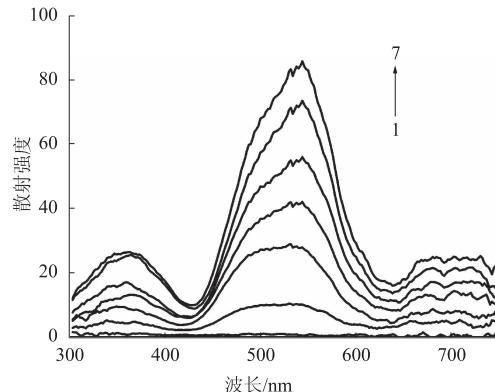
涤研钵和淋洗层析柱,收集洗脱液,40 ℃ 氮气吹干,加 0.1 mL 丙酮。

1.2.3 测定方法 在 10 mL 具塞比色管中依次加入 1 mL pH 值为 10.00 的缓冲液、1 mL 质量浓度为 20 μg/mL 的甲基毒死蜱标准品溶液、1 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的曲拉通 X - 100 溶液、1 mL 质量浓度为 100 μg/mL 的灿烂甲酚蓝溶液,用水定容至刻度,摇匀、静置 5 min,在荧光分光光度计中保持狭缝为 5 nm,低压条件下,以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 同步扫描,得到共振光散射光谱。在最大散射波长 544 nm 处测得散射强度值为 I ,不加入农药测得值为 I_0 ,则 $\Delta I = I - I_0$ 。配制一系列不同质量浓度的甲基毒死蜱标准溶液,利用粒度分析仪测定并记录体系有效粒径值;分别测定其散射强度,并根据 ΔI 和质量浓度(c)绘制标准曲线,求出回归方程。测定样品处理液和空白对照液在 544 nm 处的散射强度值,求出 ΔI ,代入标准曲线回归方程,求出样品处理液中甲基毒死蜱的质量浓度。

2 结果与分析

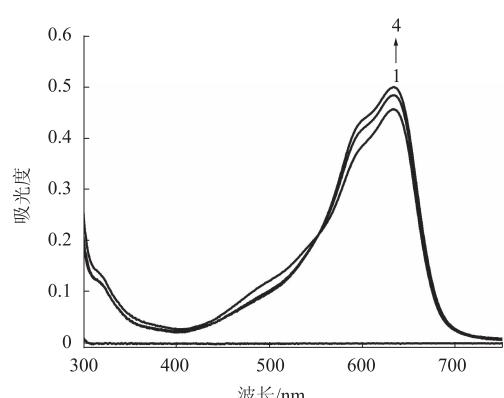
2.1 共振光散射光谱与吸收光谱

由图 1 可知,甲基毒死蜱和灿烂甲酚蓝本身散射强度较弱;而两者在碱性条件下相互作用后,其散射强度显著增大,并在 360 nm、544 nm 处出现特征散射峰,随着甲基毒死蜱质量浓度的增大体系在最大散射波长处的散射强度值也明显增加,表明能够利用共振光散射法对甲基毒死蜱进行定量检测。由图 2 可知,随着甲基毒死蜱的加入,体系在 550 ~ 750 nm 出现减色效应,在 300 ~ 550 nm 出现增色效应,并在 550 nm 处出现等吸收点。对比图 1 和图 2 可以看出,体系的最大散射峰位于其吸收带内,因此能够产生共振增强的散射作用,使散射增强。



1. 单独的甲基毒死蜱溶液 (2.0 μg/mL); 2 ~ 7. 不同质量浓度甲基毒死蜱 (0.05, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 μg/mL) 与灿烂甲酚蓝、曲拉通 X - 100 作用后的体系

图 1 甲基毒死蜱 - 灿烂甲酚蓝体系的共振光散射光谱

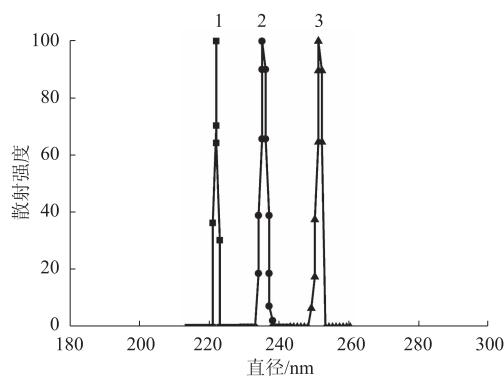


1. 单独的甲基毒死蜱溶液($2.0 \mu\text{g/mL}$)；2~4. 不同质量浓度甲基毒死蜱($4.0, 2.0, 0 \mu\text{g/mL}$)与灿烂甲酚蓝、曲拉通 X-100 作用后的体系

图2 甲基毒死蜱-灿烂甲酚蓝体系的吸收光谱

2.2 动态光散射(DLS)粒度测量

由于散射强度与散射粒子的体积相关,因而利用粒度分析仪对不同质量浓度甲基毒死蜱与灿烂甲酚蓝、曲拉通 X-100 作用后体系的粒径大小进行检测。由图 3 和表 1 可知,体系有较好的分散性,同时随着甲基毒死蜱的加入,体系的有效粒径逐渐增大,表明甲基毒死蜱与灿烂甲酚蓝在碱性溶液中作用形成缔合物大分子。根据瑞利散射公式 $I = \frac{24\pi^3 N\nu^2}{\lambda^4} \left(\frac{n_1^2 - n_0^2}{n_1^2 + 2n_0^2} \right) I_0$ ^[18] (式中, I 为散射光强度, N 为单位体积内粒子数目, ν 为粒子体积, I_0 为入射光强度, λ 为入射光波长, n_1 和 n_0 分别表示分散相和分散介质的折射率),在其他条件不变时,散射强度



1~3 为不同质量浓度甲基毒死蜱($2.0, 3.0, 4.0 \mu\text{g/mL}$)与灿烂甲酚蓝、曲拉通 X-100 作用后的体系

图3 体系 DLS 粒度测量多分布图

表1 体系 DLS 粒度测量结果

| 甲基毒死蜱质量浓度/($\mu\text{g/mL}$) | 有效粒径/nm | 多分散系数 |
|--------------------------------|---------|-------|
| 2.0 | 226.49 | 0.003 |
| 3.0 | 235.82 | 0.049 |
| 4.0 | 260.31 | 0.010 |

与散射分子体积的平方成正比,随着甲基毒死蜱质量浓度的增大,体系有效粒径增大,散射增强,与散射光谱试验结果一致。

2.3 试验条件的优化

2.3.1 缓冲液酸度的选择 考察不同 pH 值的 B-R 缓冲液对体系散射值的影响,结果表明,pH 值为 10.00 时,体系有较大的 ΔI (图 4),为最佳 pH 值。

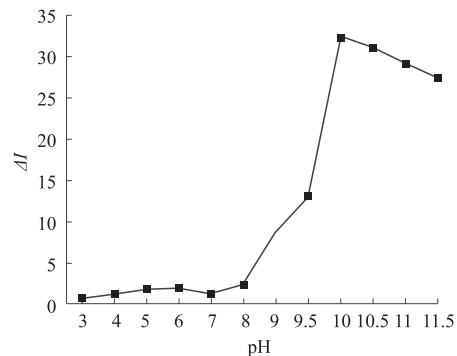


图4 pH 值对体系散射值的影响

2.3.2 灿烂甲酚蓝质量浓度的选择 考察灿烂甲酚蓝质量浓度对体系散射值的影响,结果表明,灿烂甲酚蓝最终质量浓度为 $10 \sim 18 \mu\text{g/mL}$ 时,体系 ΔI 较大(图 5),试验选择灿烂甲酚蓝的质量浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 。

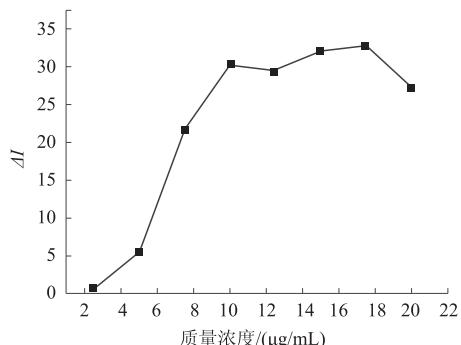


图5 灿烂甲酚蓝质量浓度对体系散射值的影响

2.3.3 反应时间的选择 考察了反应时间对体系散射值的影响,结果表明,体系在 $5 \sim 40 \text{ min}$ 有较大的 ΔI (图 6)。本试验选择室温反应 5 min 。

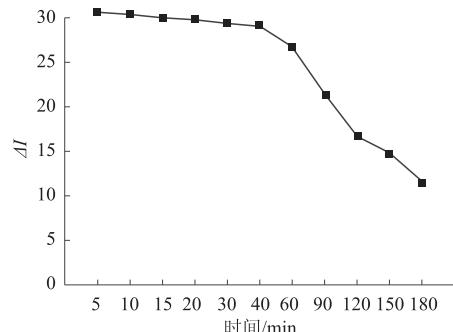


图6 反应时间对体系散射值的影响

2.3.4 表面活性剂的选择 为改善体系的稳定性, 考察了吐温 -80、曲拉通 X -100、聚乙二醇 -6000 等表面活性剂对体系的增稳作用, 结果表明, 曲拉通 X -100 可在一定程度上增加体系的稳定性和散射值。试验还发现, 曲拉通 X -100 最终质量浓度为 80~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 体系 ΔI 较大(图 7)。本试验选择加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的曲拉通 X -100。

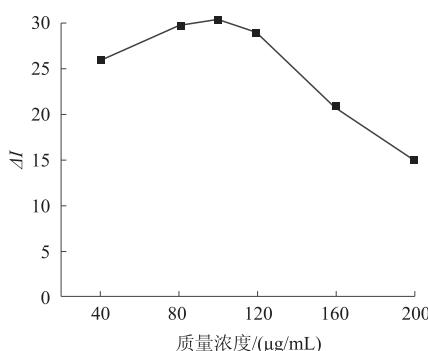


图 7 曲拉通 X -100 质量浓度对体系散射值的影响

2.3.5 样品处理方法的优化 参照文献[19]选择弗罗里硅土作为固相分散剂, 分散剂与样品的质量比为 3:1, 考察其净化效果, 发现当分散剂与样品直接研磨时, 由于样品中的水分较多, 降低了弗罗里硅土的活性, 致使洗脱液中有大量的色素; 当样品与无水硫酸镁充分研磨后再与分散剂一起研磨, 此时洗脱液较为洁净。

2.3.6 洗脱剂及其用量的选择 考察了乙腈、丙酮、二氯甲烷的洗脱效果, 结果表明, 乙腈和丙酮作为洗脱剂时洗脱液中有大量的色素, 而使用极性较小的二氯甲烷作为洗脱剂时, 洗脱液中色素含量较少。同时考察了二氯甲烷用量对农药回收率的影响, 当洗脱剂用量为 10 mL 时, 农药的回收率在 92.7%~99.4%, 增加洗脱剂用量, 农药回收率基本不变。因此选择 10 mL 二氯甲烷作为洗脱剂。

表 2 样品测定及回收试验结果($n=3$)

| 样品 | 样品测定值/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | HPLC 测定值/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 添加量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 样品加标测定值/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 平均回收 率/% | RSD/% | HPLC 法回 收率/% |
|----|---------------------------------------|--|-------------------------------------|---|-------------|-------|-----------------|
| 白菜 | ND | ND | 1.0 | 0.889、0.981、0.948 | 93.9 | 5.00 | 92.3 |
| 香蕉 | ND | ND | 1.0 | 0.966、1.020、0.918 | 96.8 | 5.21 | 96.1 |
| 苹果 | ND | ND | 1.0 | 0.997、0.946、0.880 | 94.1 | 6.26 | 92.0 |
| 梨 | ND | ND | 1.0 | 0.932、0.920、0.894 | 91.5 | 2.12 | 94.1 |

注:ND 表示未检出。

3 结论与讨论

本研究建立了一种以共振光散射技术检测样品中甲基毒死蜱残留量的分析方法, 甲基毒死蜱质量浓度在 0.1~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 544 nm 处的散射强度有

2.4 共存物质的影响

保持 10 mL 比色管中甲基毒死蜱含量为 20 μg , 同时加入一定量的共存物质, 按照 1.2.3 方法测定, 考察共存物质对体系散射值的影响。当体系测定误差小于 $\pm 10\%$ 时, 共存物质的允许量(以质量计)为: 淀粉、蔗糖、葡萄糖、 Na_2S 、 KBr 、 NaNO_3 、 Na_3PO_4 、 KCl 、 KAc 的允许量均大于 2 000 μg , $\text{L}-\text{丙氨酸}$ 、 $\text{L}-\text{蛋氨酸}$ 、 $\text{L}-\text{精氨酸}$ 、 AlCl_3 为 500 μg , $\text{L}-\text{半胱氨酸}$ 为 300 μg , BaCl_2 、 ZnSO_4 、 CaCl_2 、 CuSO_4 为 200 μg , FeSO_4 、 FeCl_3 为 80 μg , 乙酰甲胺磷、咪唑啉大于 600 μg , 乙醇、丙酮为 600 mg。

2.5 标准曲线及方法灵敏度

配制一系列不同质量浓度的甲基毒死蜱标准溶液, 根据测定的 ΔI 和质量浓度(c)绘制标准曲线, 结果如图 8 所示, 其线性回归方程为 $\Delta I = 14.881c + 1.6206$, 相关系数 $r = 0.9992$, 线性范围为 0.1~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检出限为 0.029 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

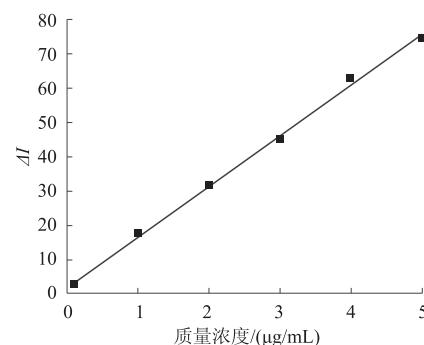


图 8 甲基毒死蜱标准曲线

2.6 样品测定结果

取各样品 1.0 g, 按照方法 1.2.2 和 1.2.3 进行处理和测定, 结果见表 2。4 种样品中均未检出甲基毒死蜱残留, 平均加标回收率为 91.5%~96.8%, 与高效液相色谱(HPLC)法^[20]对比, 结果基本一致。

良好的线性关系, 检出限为 0.029 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 各样品中甲基毒死蜱的回收率为 91.5%~96.8%, 能够满足对蔬果中甲基毒死蜱的检测需求。与分光光度法相比, 该方法具有更高的灵敏度; 与色谱检测技术相比, 该方法对设备要求较低, 利用普通荧光分光光度

计就能完成检测,并且分析快速,可在短时间内完成大批量样品的筛选,同时无须使用大量有机溶剂,节约试验成本。

鉴于蔬果样品的基质较为复杂,基质效应会干扰检测结果,因此本研究对样品前处理过程进行了系列优化。以基质固相分散法作为前处理手段,考察了各填料的研磨顺序对净化效果的影响,同时对比了乙腈、丙酮、二氯甲烷的洗脱效果,并考察了洗脱剂的用量,最终选择样品与无水硫酸镁充分研磨后再与分散剂研磨,并以10 mL二氯甲烷作为洗脱剂来提取、净化蔬果样品中的甲基毒死蜱,可以降低样品基质对试验测定的干扰,确保试验结果的可靠性。

参考文献:

- [1] Fortenberry G Z, Hu H, Turyk M, et al. Association between urinary 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, a metabolite of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl, and serum T4 and TSH in NHANES 1999—2002 [J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 424(1):351-355.
- [2] 国家卫生计生委,农业部. 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2014[S]. 北京:中国标准出版社,2014.
- [3] 王莹,王颜红,李波,等. 气相色谱-质谱法测定羊毛脂中13种农药多残留[J]. 农药, 2013, 52(12): 905-908.
- [4] 周梦春,何海,舒耀皋,等. 分子印迹-基质固相分散萃取-高效液相色谱法测定土壤中4种硫代磷酸酯类农药残留量[J]. 农药学学报, 2015, 17(1):83-88.
- [5] Łozowicka B, Jankowska M, Rutkowska E, et al. The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2014, 68(1):95-111.
- [6] Radford S A, Panuwet P, Hunter R E, et al. HPLC-MS/MS method for the measurement of insecticide degradates in baby food [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(29):7085-7091.
- [7] Yang Z, Liu Y, Liu D, et al. Determination of organophosphorus pesticides in soil by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2012, 50(1): 15-20.
- [8] 邱伟芬,张昌娟,文良,等. 气相色谱-质谱联用结合QuEChERS法快速筛查大米中多种农药残留[J]. 食品科学, 2015, 36(12):221-225.
- [9] Barker S A, Long A R, Short C R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion [J]. *Journal of Chromatography A*, 1989, 475(1):353-361.
- [10] Yan S, Zhang L, Tang Y, et al. Synthesis of water-soluble Ag₂Se QDs as a novel resonance Rayleigh scattering sensor for highly sensitive and selective ConA detection [J]. *Analyst*, 2014, 139(17):4210-4215.
- [11] 徐红,刘绍璞,罗红群. 盐酸吖啶黄-脱氧核糖核酸反应体系的共振瑞利散射及其应用[J]. 理化检验(化学分册), 2010, 46(1):5-7.
- [12] Wang Y, Bi S Y, Zhou H F, et al. Resonance light scattering spectroscopy of procyanidin-CPB-DNA ternary system and its potential application [J]. *Spectrochimica Acta Part A (Molecular and Biomolecular Spectroscopy)*, 2015, 146(1):255-260.
- [13] 江波,蒋治良. 抗凝血酶Ⅲ的免疫共振散射光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(5):1145-1148.
- [14] 胡庆红,江波,孔存杰,等. 曲利本蓝与阿米卡星相互作用的共振瑞利散射光谱及其应用[J]. 化学研究与应用, 2008, 20(8):1043-1046.
- [15] Parham H, Pourreza N, Marahel F. Determination of thiram using gold nanoparticles and Resonance Rayleigh scattering method [J]. *Talanta*, 2015, 141(1):143-149.
- [16] 庞向东,谭建红,江虹. 共振瑞利散射法测定药物及生物样品中的头孢硫脒[J]. 化学世界, 2015, 56(6): 340-342.
- [17] 盛丽,米莹,陶彩虹. 锆(Ⅲ)-碘化钾-若丹明B体系共振瑞利散射光谱法测定痕量锆[J]. 化学通报, 2014, 77(5): 474-476.
- [18] 印永嘉,李大珍. 物理化学简明教程:下册[M]. 北京:人民教育出版社,1980:132.
- [19] 钟冬莲,汤富彬,沈丹玉,等. 基质固相分散净化-气相色谱法测定竹笋中7种农药多残留[J]. 分析试验室, 2013, 32(1):64-68.
- [20] 张超,杨红. 水、土壤和蔬菜中毒死蜱、甲基毒死蜱残留检测前处理方法[J]. 农药, 2010, 49(5):367-370.