

综述

食品中农药残留分析前处理技术应用进展

陈小萍 林升清

(福建省疾病预防控制中心,福建 福州 350001)

摘要:对近年来食品中农药残留分析试样前处理技术中得到迅速发展和广泛应用的固相萃取、超临界流体萃取、基质固相分散萃取进行评述;同时对新兴的分子识别技术-分子印迹聚合物在固相萃取中的应用及影响因素加以讨论。

关键词:食品; 农药残留量; 预处理; 化学, 分析

食品样品中农药残留分析是一项复杂混合物中痕量组分的分析技术。因存在同系物、异构体、降解产物或代谢产物的影响,且由于环境的迁移作用,通过根系吸收、传导等途径,农药进入农作物组织内部,以及待测样品的增加从而加大了检测难度。近十年来,随着样品萃取净化技术的迅速发展和现代分析仪器分辨能力、分析速度与仪器自动化程度的大大提高,农药残留的分离、在线分析已成为分析化学领域中最活跃的前沿课题之一,国内外学者在这方面做了许多工作,已发表了一些综述和评论^[1-4]。

农药残留分析试样的预处理包括提取与净化,

大多数传统的提取与净化方法已无法满足现代食品安全性分析快速、准确的要求。上世纪 80 年代起国际上针对传统提取与净化技术的不足,发展了一些新的试样前处理技术并不断被引进。本文就近年来在食品中农药残留分析的试样制备技术领域中得到迅速发展和广泛应用的固相萃取(solid-phase extraction, SPE)、超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)、基质固相分散萃取(matrix solid-phase dispersion extraction, MSPDE)的方法进行评述并对分子印迹合成受体技术(molecular imprinting technique, MIT)在固相萃取中的应用及影响因素加以讨论。

in raw milk [J]. J AOAC Int, 2000, 83(6):1345-1348.

[19] CLOAK O M, DUFFY G, SHERIDAN J J, et al. Development of a surface adhesion immunofluorescent technique for the rapid detection of *Salmonella* spp. from meat and poultry [J]. J Appl Microbiol, 1999, 86(4):583-590.

[20] RESTAINO L, CASTILLO H J, STDWART D, et al. Antibody-direct epifluorescent filter technique and immunomagnetic separation for 10-h screening and 24-h confirmation of *Escherichia coli* O157:H7 in beef [J]. J Food Prot, 1996, 59(10):1072-1075.

[21] TORTORELLO M L, REINEKE K F, STEWART D S. Comparison of antibody-direct epifluorescent filter technique with the most probable number procedure for rapid enumeration of *Listeria* in fresh vegetables [J]. J AOAC Int, 1997, 80(6):1208-1214.

[22] BOISEN F, SKOVGARRD N, EWALD S, et al. Quantitation of microorganisms in raw minced meat using the direct epifluorescence filter technique: NMKL collaborative study [J]. J AOAC Int, 1992, 75:465-473.

[23] HOLAH J T, BETTS R P, THORPE R H. The use of direct epifluorescence microscope and the direct epifluorescent filter to assess microbial populations on food contact surface [J]. J Appl Bacteriol, 1988, 65:215-221.

[24] D'HAESE E, NELIS H J. Rapid detection of single cell bacteria as a novel approach in food microbiology [J]. J AOAC Int, 2002, 85(4):979-983.

[25] D'HAESE E, NELIS H J, REYBROECK W. Determination of somatic cells in milk by solid phase cytometry [J]. J Dairy Res, 2001, 68(1):9-14.

[26] WAVERLA M, EISGRUBER H, SCHALCH B, et al. Zum Einsatz der Impedanzmessung in der Lebensmittelmikrobiologie [J]. Arch Lebensmittelhyg, 1998, 49:73-89.

[27] GIBSON D M, COOMBS P, PIMBLEY D W. Automated conductance method for the detection of *Salmonella* in foods: collaborative study [J]. J AOAC Int, 1992, 75:231-236.

[28] BARBOUR W M, TICE G. Genetic and immunologic techniques for detecting foodborne pathogens and toxins [M]//Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (Eds). Food Microbiology, Fundamental and frontiers, ASM Press, New Technologies, Marcel Dekker, New York, 1997, 249-264.

[29] BRETT M M. Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits [J]. Symp Ser Soc Appl Microbiol, 1998, 27:110S-118S.

[30] HEUVELINK A E, ZWARTKRUIS J T M, DE BOER E. Evaluation of media and tests kits for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from minced beef [J]. J Food Prot, 1997, 60:817-824.

[31] ROBISON B J. Immunodiagnosics in the detection of foodborne pathogens//Tortorello M L, Gendel S M (Eds). Food Microbiological analysis-New Technologies, Marcel Dekker, New York, 1997, 77-89.

[收稿日期:2006-10-20]

中图分类号:R15;Q9333 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2007)01-0058-05

作者简介:陈小萍 主任技师

1 固相萃取技术(SPE)

SPE是由液固萃取和柱液相色谱技术相结合发展而来的,是目前应用最广泛的净化方法,具有活性基团或经活性化化合物涂渍的SPE固定相可用于分析物衍生化反应,是一种柱色谱分离过程,分离机理、固定相和淋洗溶剂的选择性等方面与高效液相色谱类似,近年来已经发展了在线SPE萃取检测技术。目前用于HPLC的填料几乎均可用于SPE。但SPE柱的填料粒径大于HPLC填料,因此SPE柱效会低于HPLC色谱柱,适于分离保留性质差别很大的化合物。

SPE柱的种类有正相SPE柱,其填料主要为硅胶、氧化铝、硅镁吸附剂等;反相SPE柱,填料主要为 C_{18} ;另外还有氰基键合相柱(CN)以及离子交换柱和吸附树脂柱 Nilsson U J。SPE操作步骤包括柱预处理、加样、洗去干扰组分和回收待测组分4个部分。其中加到萃取柱上的样品量取决于萃取柱的尺寸、类型、待测组分的保留性质以及待测组分与基质组分的浓度等因素。SPE的另一种分离情况是杂质被保留在柱上,待测组分通过柱。试样被净化但不能富集待测组分,也不能分离保留性质比待测组分更弱的杂质,即净化不完全。洪振涛等^[5]研究了四种固相萃取柱消除蔬菜水果试样基质干扰的能力以及它们对54种农药回收率的影响。结果表明 Florisil 和 C_{18} 对农药有很好的回收率,而 C_{18} 对试样的净化能力相对优于 Florisil。

刘长武等^[6]采用乙腈提取、SPE浓缩、高效液相色谱分离、柱后衍生-荧光检测法测定了蔬菜、水果中8种氨基甲酸酯类杀虫剂及其代谢物残留量。采用加标法测定了氨基甲酸酯杀虫剂及其代谢物的回收率,其平均回收率为70%~120%。向增旭等^[7]以丙酮为提取溶剂、 C_{18} 柱和硅胶柱串联净化萃取、气相色谱检测,测定金银花中11种有机磷农药的残留量。前处理方法的添加回收率在85.38%~91.35%之间,相对标准偏差2.8%~6.1%。李锋格等^[8]采用乙腈提取,盐析,florisil 硅土固相萃取小柱净化,微池电子捕获检测器(μ ECD)负化学源质谱(NCIMS)并联对净化液进行检测,一次进样可对番茄制品中的9种拟除虫菊酯类农药残留准确定量和确证。 μ ECD回收率为87.6%~107.0%;相对标准偏差为5.2%~12.7%;负化学源选择离子(NCFSIM)模式回收率为91.9%~109.7%;相对标准偏差为5.2%~12.7%。

2 超临界流体萃取法(SFE)

超临界流体萃取是指处于超临界状态的流体为

溶剂对样品中待测组分的萃取分析。SFE是当前发展最快的分析技术之一,国外很多实验室已经用来作为液体和固体样品的前处理技术。其优点是基本上避免了使用有机溶剂,简单快速,能选择性地萃取待测组分并将干扰成分减少到最低程度。

所谓超临界流体(supercritical fluid, SF)是指处于临界温度和临界压力的非凝缩性的高密度流体,这种流体介于气体和液体之间,兼具二者优点。选用SCF萃取剂时应考虑:临界条件是否容易达到、溶解能力的大小、萃取剂的毒性和腐蚀性对装置是否有影响、价格等因素。SF萃取溶剂有二氧化碳、一氧化碳、氟氯甲烷、一氧化二氮等。惰性溶剂避免了萃取中产生化学反应, SF的萃取温度可以很低,这对热不稳定化合物有利。超临界流体研究中,应用最多的是 CO_2 ($T_c = 31.1$, $P_c = 7.38$ MPa),它具有无毒无臭、化学惰性、不污染试样、易于提纯、超临界条件温和等特点。 CO_2 是萃取热不稳定性的非极性物质的良好溶剂。但 CO_2 属于非极性溶剂,在萃取极性化合物时具有一定的局限性;在实际应用中,通过加入少量的改进剂如: NH_3 、MeOH、 NO_2 、 CCl_4 等极性化合物来改善萃取效果。

SFE的流程由萃取与分离两过程组成,影响SFE效率的因素除萃取剂外主要还有:1)萃取条件,包括压力、温度、萃取剂流量及萃取时间;2)物料性质的影响,包括物料的粒度、样品中的水分及萃取剂的极性;3)分离条件,包括分离时的压力与温度的选择。

Norman K N T等^[9]用超临界流体提取,SPE净化,气相色谱法检测玉米和小麦中的有机磷残留量,二嗪磷、毒死蜱、杀螟硫磷、马拉硫磷等十几种农药的回收率在80%左右,纯化效果较好。Wig field Y Y, et al.^[10]研究了SPE用于鸡蛋食品中有机氯农药的残留分析。先将22种有机氯农药注入鸡蛋样品中,再用SFE提取并与乙腈有机溶剂萃取作比较,馏出物提取率分别为52%~100%(SFE)和53%~93%(乙腈)。France J E等^[11]利用SFE从鸡肉脂肪中分离、净化有机氯农药,获得了优于传统的柱层析法检测结果,回收率93%~111%,相对标准差不大于8.5%。王建华等^[12,13]也用该方法对水果、蔬菜样品中的有机氯和有机磷农药残留进行测定,并分别以无水硫酸镁和硅藻土作为样品的分散剂和吸水剂,将试样与无水硫酸镁或硅藻土混合后进行萃取。用正交设计法选择最佳超临界萃取条件(有机氯的萃取压力为30.4 mPa,温度为40;有机磷的萃取压力为30 mPa,温度为50),用乙酸乙酯收集后直接进样测定,2 g试样农药残留回收率为82%~108%,相对标准偏差为4.6%~11%,测得结果与传

统方法一致。整个萃取过程只需10 min。近几年来SFE技术在农残分析中的应用随SF的性质、萃取机理、过程控制等的深入研究而日益广泛,并显示了其独特的优势。

3 基质固相分散萃取法(MSPDE)

美国Austin RL报道的基质固相分散前处理提取分离技术,是将试样吸附在比表面达 $500\text{ m}^2/\text{g}$ 的、 C_{18} ODS键合相上^[14],然后利用所选定溶剂依次洗脱,可大大简化许多残留物前处理方式,最大限度地避免被测残留物的流失。其基本操作是将试样直接与适量反相填料(C_{18})研磨、混匀制成半固态装柱淋洗。MSPDE浓缩了传统的试样前处理中所需的试样匀化、组织细胞裂解、提取、净化等过程,避免了试样均化、转溶、乳化、浓缩等造成的待测物的损失,是简单高效的提取净化方法,适应于各种分子结构和极性的农药残留的提取净化,特别是单个和一类化合物的分离。此外MSPDE技术更适于自动化,经MSPDE的淋洗液可直接通过florisil柱进一步净化,最后的流出液可直接用于色谱分析,使现场检测成为可能。

胡小钟等^[15]采用基质固相分散技术进行试样前处理,建立了浓缩苹果汁样品中22种有机氯农药和15种拟除虫菊酯类农药的气相色谱-质谱检测方法,研究了一定浓度范围内农药峰面积与浓度的线性关系,相关系数好于0.99。除六氯苯外其余36种农药的添加回收率在70%~108%范围内,相对标准偏差在2.1%~24.9%。Kandenczki L^[16]以活性florisil为填料,以乙酸乙酯或三氯甲烷-丙酮(9+1体积分数)为淋洗液,利用MSPDE技术,测定了26种蔬菜、水果中9类共120多种农药残留,其回收率>80%,且与蔬菜、水果的品种无关。李建科等^[17]建立了浓缩苹果汁工业化生产中主要有机磷农药残留的快速检测并给出了试样重量(W_p)与florisil的重量(W_f)之间的关系: W_f/W_p 为1.4。MSPDE萃取技术适用于各种分子结构和极性农药残留的提取净化。MSPDE首先提高了分析速度,使现场监测成为可能,其次减少了试剂的用量,比传统L-L萃取的回收率提高10%~25%,另外更适于自动化分析。

4 分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)

分子印迹聚合物(molecular imprinted polymers MIPs)是通过模板分子、功能单体和交联剂的作用产生有化学选择性的键合位点的一种技术。1972年,Wulff G^[18]研究小组首次成功制备出分子印迹聚合物,使这方面的研究产生了突破性进展,利用酶和

抗体具有分子形状、空间结构选择性的特点,发展了用于色谱手性拆分的分子印迹技术得到人们的重视。以后,分子印迹技术得到了迅猛发展,受到全球众多研究人员的重视,很快在许多相关领域如手性分离和底物选择性分离、固相萃取、化学或生物传感器、不对称催化和模拟酶等方面得到了应用^[19]。预计15~20年内,生物农药将代替化学农药,分析重点将转向于生物组织成分很难区分的生物大分子农药。未来的分析化学家将要分析的污染物可能是蛋白质、肽、核酸、细菌、病毒等^[20],由此使其成为化学和生物学交叉的新兴领域之一,得到世界注目并迅速发展。

4.1 分子印迹技术的制备和主要影响因素 制备对印迹分子具有“预定”识别能力的高分子聚合物一般包括以下3个步骤:(1)在一定溶剂(也称致孔剂),模板分子(Template Molecule,即印迹分子)与功能单体(Functional Monomer)依靠官能团之间的共价(Covalent)或非共价(Noncovalent)作用形成主客体配合物(Host-guest complex);(2)加入交联剂(Cross-linker),通过引发剂(Initiator)引发进行光或热聚合,使主客体配合物与交联剂通过自由基共聚合在模板分子周围形成高交联的刚性聚合物;(3)用一定的物理和化学方法将聚合物中的印迹分子洗脱(extraction)或解离(dissociation)出来,这样在聚合物中便留下了与模板分子大小和形状相匹配的立体孔穴,同时孔穴中包含了精确排列的与模板分子官能团相互补的由功能单体提供的功能基团。这样,可以再次选择性地与模板分子结合,从而具有专一识别模板分子(即目标分子)的功能。MIPs在SPE中应用的主要影响因素^[21]有:(1)模板分子的用量。合成MIPs时,模板分子、单体和交联剂的相对用量对MIPs性能有直接的影响。模板分子通常为总量的5%。此外,模板分子的用量还受到其溶解性和获取难易程度的影响。(2)单体和交联剂的用量:在聚合时增加交联剂的用量有利于形成稳定和完整的“印记”位点。增加交联剂的用量可以使聚合物具有相当的刚性,降低在溶液中的溶胀。减少位点空间结构和功能基定向的改变,提高选择性,这对于结构类似的物质间的分离十分重要。但底物从聚合物进入结合位点主要依靠扩散作用,扩散速度除受温度和浓度的控制外,还受到高分子的制约。提高扩散速度、缩短响应时间,主要是通过减少交联剂用量、增加致孔剂用量以增大聚合物链间的空隙。一般而言,对于易挥发的有机待测物需要制备高度交联的聚合物;对于具有一定形状的模板分子,交联剂的用量适量降低。(3)单体-模板复合物的刚性和稳定

性。单体-模板复合物的刚性大,形成的位点与模板分子的吻合程度高,在位点上发生相互识别和键合作用时熵小,有利于提高亲和力和选择性。

4.2 分子印迹技术在农药残留分析中的应用 分子印迹聚合物(MIPs)具有特效的选择性和亲和性,用作固相萃取剂可克服生物或环境试样体系复杂、预处理手续繁杂等不利因素,为试样的采集、富集和分析提供了极大的方便。欧盟有 MICA 计划(molecular imprinting techniques for efficient methods in chemical analysis),支持欧盟各国科学家进行 MIP 作为 SPE 材料(MISPE)的合作研究工作。MISPE 用于农用化学品的富集时十分有效。Bjarnason B 等^[22]、Jun Matsui 等^[23]分别合成了以阿特拉津为模板的分子印迹聚合物,对氯代三嗪类除草剂进行富集提取,取得较好的效果(提取效率 74%~77%)。Ferrer I 等^[24]利用特丁津印迹聚合物对环境水和底泥样品中的微量氯代三嗪类农药(去异丙基阿特拉津、去乙基阿特拉津、西玛三嗪、阿特拉津、扑灭津、特丁津)进行选择性的富集,除扑灭津外(回收率为 53%),所有的三嗪类化合物回收率都高于 80%,表明该聚合物具有较高的选择性。

目前分子印迹聚合物大多只能在有机相中进行聚合反应,如何制备亲水性的 MIPs 实现亲水性溶质的手性分离,以及制备球形(单分散)MIPs,避免 MIPs 在合成后粉碎、筛分、沉降造成的损失及提高柱效,尤其是功能单体种类太少,一直不能满足某些分子识别的要求,使分子印迹技术永远不能满足实际应用的需求,是当前需要解决的问题。但随着分子印迹过程和分子识别过程的机理和表征问题、结合位点的作用机理、聚合物的形态和传质机理的深入研究,分子印迹聚合物必将在未来生物农药分析应用领域中取得新进展。

参考文献

- [1] NILSSON U J. Solid-phase extraction for combinatorial libraries[J]. J Chromatog A, 2000, 885(1-2):305-319.
- [2] CARSON M C. In-pair solid-phase extraction [J]. J Chromatog A, 2000, 885(1):343-350.
- [3] 易军,李云春,弓振斌. 食品中农药残留分析的样品前处理技术进展[J]. 化学进展, 2002, 14(6):415-424.
- [4] 江腾辉,菊荣,徐汉虹. 固相萃取技术在农药残留分析中的应用[J]. 农药, 2004, 43(10):463-466.
- [5] 洪振涛,张卫锋,聂建荣,等. 应用固相萃取分析蔬菜水果中农药残留的研究[J]. 广东化工, 2005, 7:8-10.
- [6] 刘长武,刘潇威,翟广书,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定蔬菜、水果中的氨基甲酸酯杀虫剂及其代谢物残留[J]. 色谱, 2003, 21(3):255-257.
- [7] 向增旭,赵维佳,高山林. 固相萃取法测定金银花中 11 种有机磷农药的残留量[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(4):334-337.
- [8] 李锋格,全晓盾. 气相色谱-质谱法同时测定番茄制品中拟除虫菊酯类农药残留[J]. 分析化学, 2005, 33(6):838-842.
- [9] NORMAN K N T, PANTON S H W. Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residues in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection[J]. J Chromatog A, 2001, 907(1):247-255.
- [10] WIG FIELD Y Y, LANOUILLE M J. Supercritical fluid extraction of the fortified residues of fluzafop-butyl (Fusilade) and its major metabolite, fluzafop-p, in onions [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41:84-88.
- [11] FRANCE J E, KING J W, SNYDER J M. Supercritical fluid based cleanup technique for the separation of organochlorine pesticides from fats[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39:1871-1874.
- [12] 王建华,徐强,焦奎,等. 蔬菜中有抗氯农药残留的超临界流体提取和气相色谱法测定[J]. 色谱, 1998, 16(6):506-507.
- [13] 王建华,王国涛,袁杜梅. 超临界流体萃取-气相色谱法测定水果和蔬菜中有机磷农药残留[J]. 分析实验室, 1999, 18(6):55-58.
- [14] AUSTIN R LONG. MSPD technique [J]. J AOAC Int, 1990, (3):379-382.
- [15] 胡小钟,储晓刚,余建新,等. 基质固相分散和气相色谱-质谱法测定浓缩苹果汁中 22 种有机氯农药和 15 种拟除虫菊酯的残留量[J]. 分析测试学报, 2004, 23(5):38-42.
- [16] KANDENCZKI L, ARRAD Z, EBING W. Column extraction of several pesticides from fruits and vegetable: a simple multiresidue analysis method[J]. J of AOAC Int, 1992, 75(1):53-61.
- [17] 李建科,胡秋辉,乌日娜,等. 基质固相分散萃取-气相色谱法检测苹果浓缩汁中 5 种有机磷农药的残留[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2):111-115.
- [18] WULFF G, SARHAN A, ZABROCKI K. Enzyme-analogue built polymers and their use of the resolution of racemates[J]. Tetrahedron Lett, 1973, 44:4329-4332.
- [19] 刘学良,刘莺,王俊德,等. 分子烙印技术的应用与最新进展[J]. 分析化学, 2002, 30(10):1260-1266.
- [20] 仲维科,郝骥,樊耀波,等. 食品农药残留分析进展[J]. 分析化学, 2000, 28(7):904-910.
- [21] 郭宇妹,谢剑炜,胡绪英. 分子印迹聚合物技术在固相萃取中的应用及影响因素[J]. 国外医学药学分册, 2001, 28(5):300-304.
- [22] BJANASON B, CHIMUKA L, RAMSTR. On-line SPE of triazine herbicides using a MIP for selective sample enrichment [J]. Anal Chem, 1999, 71(11):2152-2156.
- [23] MATSUI J, MIYOSHI Y, DOBLHOFF-DIER O, et al. A molecularly imprinted synthetic polymers receptor selective for atrazine [J]. Anal Chem, 1995, 67(23):4404-4408.
- [24] FERRER I, LANZA F, TOLOKAN A, et al. Selective trace enrichment of chlorotriazine pesticides from natural waters and sediment samples using terbutylazine molecularly imprinting polymers [J]. Anal Chem, 2000, 72(16):3934-3941.

[收稿日期:2006-10-20]