

低共熔溶剂液相微萃取技术测定 5 种杀菌剂 农药残留分析方法

赵桐桐, 张冬昊, 郭振福, 何扩, 王素利

(河北北方学院河北省农产品食品质量安全分析检测重点实验室, 河北张家口 075000)

摘要: 本文建立了低共熔溶剂液相微萃取高效液相色谱法测定 5 种杀菌剂(三唑醇、嘧霉胺、三唑酮、烯唑醇、啉菌环胺)的农药残留分析方法, 以苯酚作为氢键给体, 氯化胆碱作为氢键受体组合而成的低共熔溶剂作为提取溶剂, THF 作为分散剂, 形成浑浊小液滴, 目标分析物被萃取到微量的 DESs 相中, 经过离心, 吸取 DESs 相进高效液相色谱分析。对影响萃取效率的重要因素进行选择和优化。研究表明, 氯化胆碱与苯酚在 1:2 的比率形成的低共熔溶剂萃取效果最好, 同时, 在最佳的萃取条件(样品容量为 5 mL, DES₂ 为 150 μ L, THF 为 150 μ L, 超声时间为 20 min, 离心时间为 10 min)下进行添加回收率实验, 回收率在 73.7%~102.3%之间, 相对标准偏差(RSD)为 0.7%~7.1%, 最小检出限(LOD) 0.026~0.052 μ g/L。为实际检测残留农药提供安全可靠的提取和分离技术, 减少有机溶剂的使用对环境及人体健康构成的危害。

关键词: 低共熔溶剂; 液相微萃取; 杀菌剂; 超高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2019)08-281-286

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.039

A Liquid-phase Microextraction Method Based on Deep Eutectic Solvents Determination for Five Kinds of Fungicides Residues

ZHAO Tong-tong, ZHANG Dong-hao, GUO Zhen-fu, HE Kuo, WANG Su-li

(Hebei North University Food Safety Research Center, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: A method was developed for the determination of five fungicide residues (triadiconazole, pyrimethanil, triadimefon, carbazole, and cyprodinil) by high performance liquid chromatography with deep eutectic solvent as extraction in liquid-phase microextraction. A DES containing phenol as a hydrogen bond donor and choline chloride as a hydrogen bond acceptor was used as the extraction solvent. THF was used as a dispersant solvent to form small droplets of turbidity. The target analyte was extracted into trace DESs phase. After centrifugation, the upper DESs phase was subjected to high-performance liquid chromatography for analysis. Various parameters affecting extraction efficiency were investigated and optimized. The results were shown that the DESa molar ratio of choline chloride and phenol 1:2 is the best extraction efficiency. Under the optimum conditions are as follows: sample volume 5 mL, DES₂ 150 μ L, and THF 150 μ L, ultrasonic time 20 min and centrifugation time 10 min. The recoveries were between 73.7%~102.3%, the relative standard deviations (RSDs) were between 0.7%~7.1%, and the low limits of detection (LOD) were 0.026~0.052 μ g/L.

Key words: deep eutectic solvents (DESs); liquid phase microextraction (LPME); fungicides; ultra high performance liquid chromatography (UPLC)

离子液体(Ionic liquids, ILs)在过去几十年中被认为是一种绿色溶剂, 并引发了高热度的研究。然而, 随着研究的不断深入, 传统的离子液体也暴露出了低生物降解能力弱、生物相容性差、可持续性不

收稿日期: 2019-03-21

基金项目: 河北省自然科学基金项目(B2017405049); 河北省高等学校科学重点研究(ZD2016139); 河北北方学院博士基金项目资助

作者简介: 赵桐桐(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品安全

通讯作者: 王素利(1968-), 博士, 教授, 研究方向: 农药残留分析和环境毒理

强^[1]等特点, 其安全性开始被质疑。2003 年, Abbott 等^[2]发现共熔溶剂(Deep eutectic solvents, DESs), 它被认为是一种离子液体类似物。具有和离子液体相似的物理性质, 比如低蒸汽压, 优良导电性等并且能在室温下以液体的形式存在, 同时具有生产成本低廉, 合成路线简单, 可生物降解, 无毒环保等优点, 因此, DESs 被认为是一种环境友好型溶剂。

正是由于 DESs 一系列的优势, 越来越多的科学工作者们开始将目光转移到低共熔液体的研究中^[3]。到目前为止, 已经被广泛应用于不同的学科, 如催化,

提取,生物化学和电化学等领域,特别是低共熔溶剂在提取和分离纯化领域具有很强的作用^[4-6]。低共熔溶剂还被应用于微波辅助萃取顶空固相微萃取技术的吸收烟草中挥发性溶剂介质^[7]、分散固相萃取中的洗脱剂^[8,9]、色谱中的添加剂、作为新型的流动相添加剂,改善色谱峰形^[10,11]等。

20 世纪 90 年代, Jeannot 和 Cantwell^[12]提出液相微萃取(Liquid phase microextraction, LPME)技术,替代传统的分散液液微萃取(Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME),应用于不同类型的液相微萃取技术中。近年来,随着技术的不断延伸和发展, DESs 液相微萃取成功应用测定了水和生物样品的美沙酮^[13],水中的多环芳烃^[14,15],境水中重金属^[16,17],同样 Arain^[16]以 1-硝基-2-萘酚作为配体,测定了水中的钴, Khezeli 测定了橄榄油、芝麻油中的酚酸类, Liu 食用油中的叔丁基对苯二酚^[18,19]。

本研究以苯酚作为氢键给体,氯化胆碱作为氢键受体组合而成的低共熔混合物作为提取溶剂,研究对 5 种杀菌剂类的提取效率,建立低共熔溶剂超声辅助液相微萃取技术(DES-UA-LPME)测定 5 种杀菌剂的残留分析方法,减少有机溶剂的使用对环境及人体健康构成的危害。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC H-Class 型超高效益相色谱,美国 Waters 公司;WD-9415E 型超声清洗器,北京市六一仪器厂;QL-901 型涡旋仪,澳门其林贝尔仪器制造有限公司;TDL-50B 低速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;ALC-210.4 分析天平,德国 Acculab 公司。

乙腈(色谱纯),美国 Mreda;氯化胆碱(纯度 99%),中国阿拉丁有限公司;苯酚(纯度≥99.5%),中国阿拉丁有限公司;四氢呋喃(THF,分析纯),天津市永大化学试剂有限公司;5 种农药标准品(三唑醇、嘧霉胺、三唑酮、烯唑醇、啉菌环胺)纯度均大于 98%,中国标准物质有限公司;实验用水为超纯水。

1.2 DESs 的制备

称取一定量的氯化胆碱和苯酚按照 1:1 (DES₁), 1:2 (DES₂), 1:3 (DES₃), 1:4 (DES₄), 1:5 (DES₅) 的比率进行混合。将混合物涡旋、静置直至完全混合成无色透明液体,避光保存备用。

1.3 样品前处理

取 5 mL 水样放入 10 mL 玻璃离心管中,加入一定浓度的混合标准溶液,混合均匀。吸取 150 μL 的 DESs 于玻璃离心管中,再加入 150 μL THF,涡旋 1 min,超声 20 min,在转速 3500 r/min 条件下离心 10 min。用微量注射器吸取上层有机相于干净的试管中,加入 50 μL 乙腈稀释,然后经 0.22 μm 有机相滤膜过滤注入 UPLC 中分析测定。

1.4 液相色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 柱 (2.1×100 mm, 1.8 μm);流动相 A: 水, B: 乙腈;检测波长: 225 nm;流速 0.3 mL/min;进样量 6 μL;梯度洗脱条件见下表:

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Mobile phase gradient elution conditions

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	80	20
5	60	40
15	40	60
18	20	80

1.5 数据分析

本实验回收率计算方法如下:以样品峰面积与标准溶液峰面积定量,根据测得的有机相中分析物的峰面积求得各物质的浓度,萃取回收率 ER 即有机相中的分析物的萃取量占分析物总量按以下公式计算:

$$ER = \frac{C_{org}V_{org}}{C_0V_{aq}} \times 100\%$$

式中: C_{org}: 有机相中分析物的浓度; C₀: 水溶液中添加浓度; V_{org}: 有机相的体积; V_{aq}: 水溶液的体积。

2 结果与讨论

2.1 氯化胆碱、苯酚、氯化胆碱与苯酚的红外光谱图

氯化胆碱、苯酚、氯化胆碱与苯酚的红外光谱图如图 1。

从图 1 中可以看出,氯化胆碱的吸收峰和苯酚的吸收峰大致在同一波数处,峰强度也相近,混合物的吸收峰为两者的吸收峰叠加,但是峰强度有所减弱。第一点,高度变矮,峰强度减弱,说明有一部分原来振动的基团受到两者混合后其他的阻碍,振动降低;第二点,从细微处观察可以看到,3600~3000 cm⁻¹处的 O-H 振动带略微向波数低的方向偏移,说明振动频率

略微降低,为分子间氢键的形成会是电子密度扁平化,略微降低O-H的电子云密度,使得振动频率下降,由此说明,两者之间形成了分子间氢键。综上所述,氯化胆碱与苯酚形成的混合溶剂,两者之间存在氢键作用力,且溶剂的红外性质两者相似,不会产生其他的杂质峰,在形成低共熔溶剂的同时又不改变溶剂的红外性质。

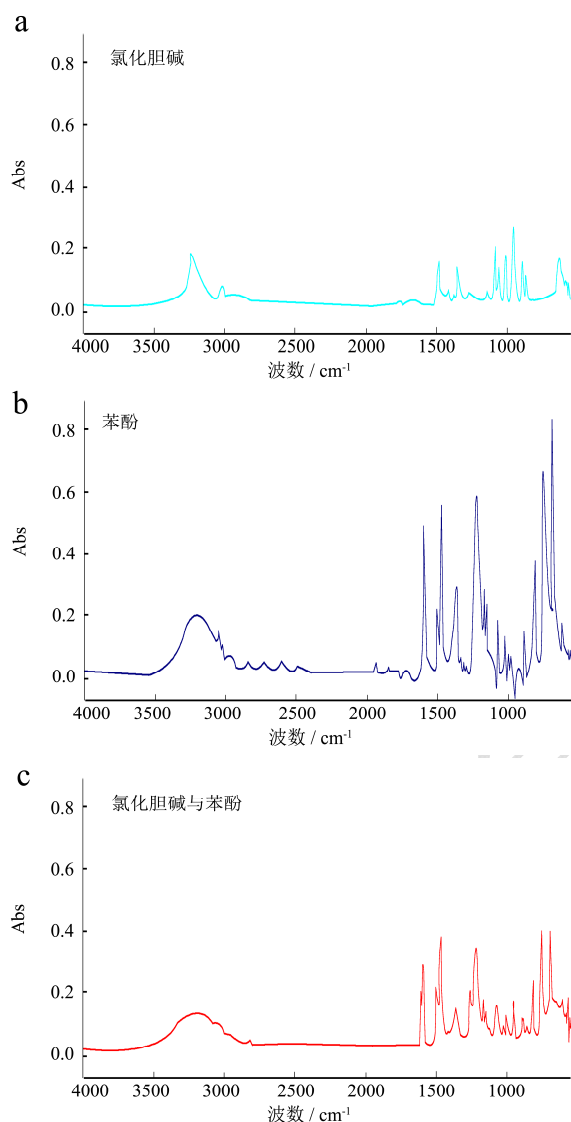


图1 氯化胆碱、苯酚、氯化胆碱与苯酚的红外光谱图
Fig.1 FT-IR spectra of choline chloride、phenol、choline chloride and phenol

注: a: 氯化胆碱; b: 苯酚; c: 氯化胆碱与苯酚。

2.2 低共熔溶剂最佳萃取条件

在此文章中, DES-UA-LPME技术用于提取和测定5种杀菌剂,对影响提取效率的各种主要影响参数进行了优化和选择。参数优化均在添加浓度为20 $\mu\text{g/L}$ 的水溶液中进行,每次实验是在改变一个参数其它参数保持不变的条件下进行的,每个实验重复6次。

2.2.1 DESs 比例的选择

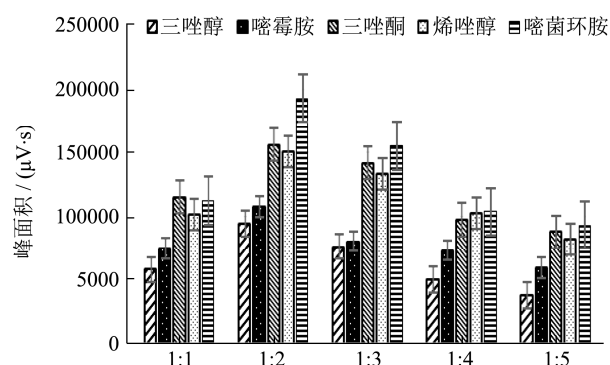


图2 氯化胆碱与苯酚的比例对萃取效率的影响

Fig.2 The effect of molar ratio of choline chloride and phenol on extraction efficiency

为了找出氯化胆碱和苯酚的合适比例,将氯化胆碱作为氢键接受体、苯酚作为氢键给体,以不同比例在涡旋仪上以3500 r/min 涡旋,直到完全混合至无色透明液体,不同的比例对于 DESs 的密度是重要的影响因素,同时影响对分析物的提取效率。本实验研究了氯化胆碱和苯酚摩尔比为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 形成的 DESs 分别对 5 种杀菌剂萃取效率的影响,图2所示的结果是在 5 种不同比例萃取溶剂条件下 5 种农药峰面积的变化,可以明显看出 5 种不同比例的 DESs 均有一定的萃取效果,当比例为 1:2 时对 5 种农药的萃取效果明显优于其他 DESs, DES₁ 的萃取效果也比 DES₄、DES₅ 的效果好,可能是由于苯酚比例的加大导致低共熔溶剂的粘度增大,影响了萃取效果。因此,选择比率 1:2 的 DES₂ 作为最佳溶剂进行进一步的试验。

2.2.2 DESs 的体积对萃取效率的影响

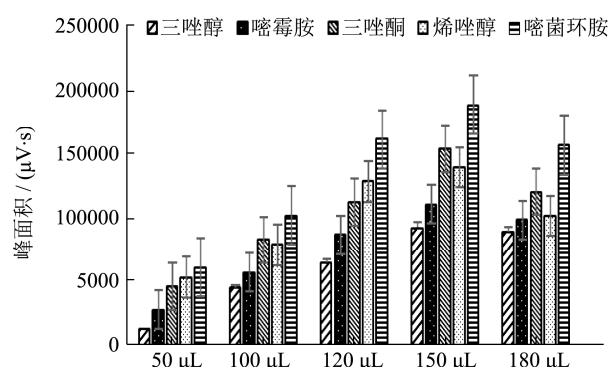


图3 DES 的量对萃取效率的影响

Fig.3 Effect of the amount of DES on extraction efficiency

DESs 作为液相微萃取技术中的提取溶剂,与分析物通过 π - π 共轭作用和氢键作用进行萃取, DESs 的体积对于其萃取效果是非常重要的影响因素,本研究对氯化胆碱和苯酚 1:2 比例条件下,研究体积在 0~180 μL 之间的萃取效率实验。分析结果如图3所示,

DESs 用量的多少对于萃取效率具有很大的影响,而且不同量的 DESs 对不同农药的萃取效果也不同,DESs 150 μL 时对 5 种农药萃取效果均较优。因此,以 DESs 体积 150 μL 作为条件进行进一步试验。

2.2.3 THF 的体积对萃取效率的影响

DLLME-DESs 是一种基于水介质中 DESs 的自聚集和乳化的方法,因此,需要通过在萃取过程中加入非质子溶剂,如四氢呋喃(THF)与水溶液分离^[18]。故,THF 的加入量对于萃取效率也会产生一定的影响,本研究对 THF 50、100、150、180、200 μL 进行萃取实验,试验结果如图 4 显示。分析数据可知,当 THF 的添加量较低时,萃取过程乳化程度较低,对于农药的提取效率并不高。随着量的增多,萃取效率显著提升,但是在该研究的几个变量中,当 THF 的添加量超过 150 μL 时,萃取效率并没有显著的提升,甚至对于个别农药有下降的趋势。因此,选取 THF 为 150 μL 作为最佳萃取条件进行进一步试验。

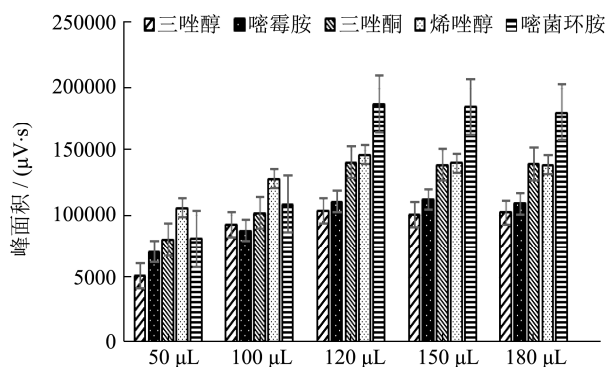


图 4 THF 的体积对萃取效率的影响

Fig.4 Effect of the amount of THF on extraction efficiency

2.2.4 超声萃取时间的选择

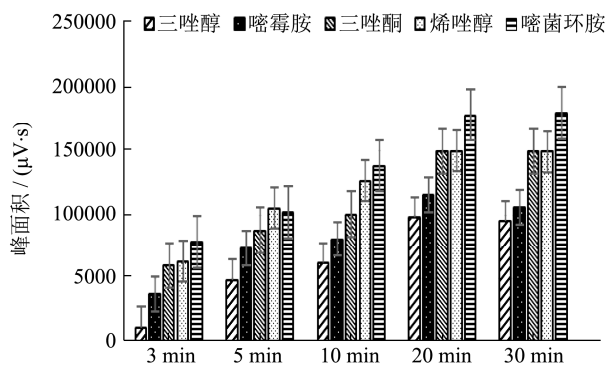


图5 超声时间对萃取效率的影响

Fig.5 The effect of ultrasonic time on extraction efficiency

超声在整个试验过程中是很重要的一个过程,它可以使 DESs 尽可能地分散到水样中,与农药有充分地接触。因此,对试验结果也具有一定的影响,本研究对超声 1、3、5、10、20、30 min 进行萃取分析,结果如图 5 显示。当超声时间较短时,DESs 分散性

不好,萃取结果并不理想,当超声时间足够时,萃取也取得了理想的结果。当萃取时间超过 20 min 后,DESs 分散性已经达到了最优效果,因此继续延长超声时间并没有太大的意义。故选取 20 min 作为最佳超声时间进行研究。

2.2.5 离心时间的选择

离心可以使 DESs 相与水相分离形成明显的分层,离心过后,DESs 相位于上层。若离心时间不足,有机相与水相分层不明显,不利于对分析物的提取。本研究在转速 3500 r/min 条件下分别离心 1、3、5、10、20 min。结果如图 6 所示,当离心时间达到 10 min 后,样品中的两相可以看到明显的分层,萃取效率也能达到最佳。因此,离心时间选用 10 min 即可进行进一步试验。

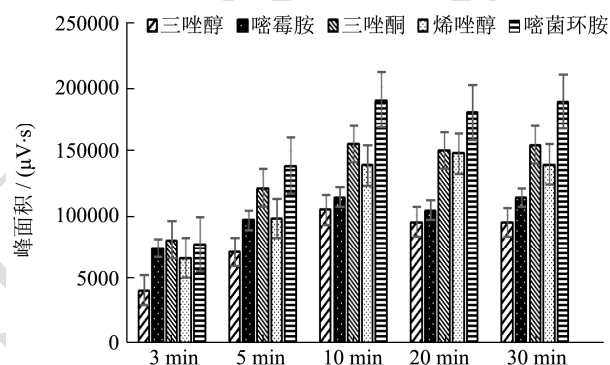


图 6 离心时间对萃取效率的影响

Fig.6 The effect of centrifuge duration on extraction efficiency

2.2.6 样品体积容量的影响

本研究分别对 1、3、5、6、8 mL 不同体积水进行了萃取效率影响实验研究,结果显示如图 7,当样品容量在 1 mL 到 5 mL 时,萃取效果并没有显著地变化;当样品容量超过 5 mL 时,DES₂ 的萃取效果稍有下降,此时 DES₂ 的量不足够支持萃取。因此,选用 5 mL 样品量进行进一步试验。

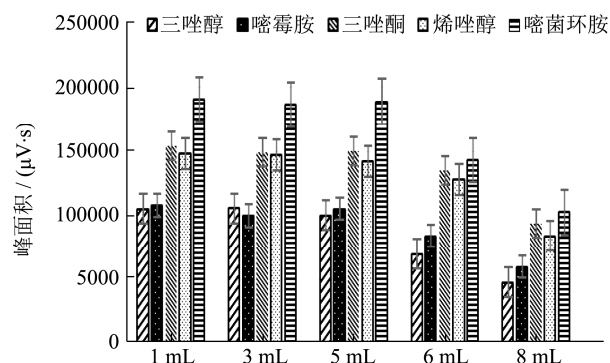


图 7 样品的体积对萃取效率的影响

Fig.7 Effect of sample volume on extraction efficiency

2.2.7 pH 的影响

pH 值是液相萃取技术中影响萃取一个重要因素,

影响分析物的存在状态和在水相中的溶解度,在本节研究中,调节混合溶液 pH 值,使 pH 值为 2、3、4、5、6、7、8、9,在此条件下研究 DESs 对 5 种杀菌剂萃取效率的影响,pH 值用 0.5 mol/L HAC 和 0.5 mol/L NaOH 调节。研究结果表明,pH 值对萃取效果并没有太大的影响,正常操作情况下 pH 值的波动并不大,因此,在接下来的研究过程中没有调节 pH 值。

2.3 方法有效性评价

表2 线性、相关系数(R²)、回收率、LOD和LOQ

Table 2 The linearity, correlation coefficients (R²), LOD and LOQ

分析物	回归方程	相关系数 R ²	检出限 LOD/(μg/L)	定量限 LOD/(μg/L)
三唑醇	y=25779x+810.2	0.9996	0.031	0.10
嘧霉胺	y=28077x-1416.1	0.9992	0.051	0.17
三唑酮	y=39164x-1690.4	0.9996	0.043	0.14
烯唑醇	y=39591x-2022.9	0.9993	0.052	0.17
啉菌环胺	y=50437x+1313.9	0.9991	0.026	0.09

表3 种杀菌剂在自来水、河水、田间水中 20 μg/L 和 50 μg/L 添加浓度的回收率

Table 3 Recoveries of five fungicides in tap water, river water and field water at two spiked level of 20 μg/L and 50 μg/L

杀菌剂	添加水平 (μg/L)	自来水		河水		田间水	
		回收率/%	相对标准 偏差 RSD/%	回收率/%	相对标准 偏差 RSD/%	回收率/%	相对标准 偏差 RSD/%
三唑醇	20	85.91	2.91	80.62	5.60	88.93	4.63
	50	97.52	0.71	87.91	6.51	73.69	2.21
嘧霉胺	20	75.58	4.83	88.34	3.52	92.42	5.87
	50	93.66	1.06	89.73	4.31	98.21	7.11
三唑酮	20	89.84	1.30	96.47	1.23	91.73	5.52
	50	92.31	5.44	97.32	3.85	87.12	2.11
烯唑醇	20	90.52	3.45	92.81	2.24	102.25	2.86
	50	89.34	5.22	92.07	1.31	78.51	4.85
啉菌环胺	20	96.84	0.94	91.19	5.62	96.58	4.11
	50	89.92	3.31	87.92	0.84	85.11	2.83

2.3.2 方法验证和实际样品分析

采集本地自来水、河水、田间水样,按上述方法进行添加浓度为 20 μg/L 和 50 μg/L 的回收率实验,结果如表 3 所示。从表中可知,回收率在 73.7%~102.3% 之间,RSD 小于 10%。自来水、河水、田间水样中分析物的浓度均低于定量限,未检出。

3 结论

本研究建立了低共熔溶剂液相微萃取高效液相色谱测定杀菌剂的残留分析方法,同时对影响萃取效率的一些影响因素(如 DESs 的比例、体积、超声萃取时间和离心时间、溶液 pH 值等)进行了优化,确定了最佳萃取条件。该技术利用氯化胆碱和苯酚混合组

2.3.1 方法的线性、精密度和检出限

在最佳优化实验条件下,向水中加入一定浓度的混合标准溶液,对其线性、回收率、重复性、最小检出浓度和定量限进行考查,结果如表 2 所示。以 5 个浓度添加水平的样品峰面积对浓度进行线性回归,每个浓度 3 个重复。10~500 μg/L 范围内线性良好,相关系数为 0.9991~0.9996;最小检出限以 3 倍信噪比计算为 0.026~0.052 μg/L,定量限以 10 倍信噪比计算为 0.09~0.17 μg/L。

成的 DESs 作为萃取剂,减少了有毒有害溶剂的使用。并且对不同水样进行添加回收率实验,得到满意的结果,该方法提取效率高、简便、快速、环保,为日后进一步研究其他低共熔溶剂的萃取试验做了铺垫,为实际检测残留农药提供安全可靠的提取和分离技术。

参考文献

- [1] Zhang Q, De O V K, Royer S, et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications [J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(21): 7108-7146
- [2] Abbott A P, Capper G, Davies D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. Chemical Communications, 2002, 9(1): 70-71

- [3] Li X, Row K H. Exploration of mesoporous stationary phases prepared using deep eutectic solvents combining choline chloride with 1,2-butanediol or glycerol for use in size-exclusion chromatography [J]. *Chromatographia*, 2015, 78 (21-22): 1321-1325
- [4] Li X, Row K, H. Row. Development of deep eutectic solvents applied in extraction and separation [J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(18): 3505-3520
- [5] Shishov A, Bu Latov A, Locatelli M. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry [J]. *Microchemical Journal*, 2017, 135: 33-38
- [6] Tang B, Zhang H, Row K H. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples [J]. *Journal of Separation Science*, 2015, 38(6): 1053-1064
- [7] Nie J, Yu G, Song Z, et al. Microwave-assisted deep eutectic solvent extraction coupled with headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS for the analysis of volatile compounds from tobacco [J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(5): 856-863
- [8] Li G, Tang W, Cao W, et al. Molecularly imprinted polymers combination with deep eutectic solvents for solid-phase extraction of caffeic acid from hawthorn [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(8):792-798
- [9] Khezeli T, Daneshfar A. Dispersive micro-solid-phase extraction of dopamine, epinephrine and norepinephrine from biological samples based on green deep eutectic solvents and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIL}-100$ (Fe) core-shell nanoparticles grafted with pyrocatechol [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(80): 65264-65273
- [10] Tan T, Zhang M, Wan Y, et al. Utilization of deep eutectic solvents as novel mobile phase additives for improving the separation of bioactive quaternary alkaloids [J]. *Talanta*, 2016, 149: 85-90
- [11] Tan T, Qiao X, Wan Y, et al. Deep eutectic solvent: A new kind of mobile phase modifier for hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(9):934-937
- [12] And M A J, Cantwell F F. Solvent microextraction into a single drop [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(13): 2236-2240
- [13] Lamei N, Ezoddin M, Abdi K. Air assisted emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration of methadone in water and biological samples [J]. *Talanta*, 2016, 165: 176-181
- [14] Farajzadeh M A, Mogaddam M R A, Feriduni B. Simultaneous synthesis of a deep eutectic solvent and its application in liquid-liquid microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous samples [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(53): 47990-47996
- [15] Khezeli T, Daneshfar A, Sahraei R. Emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent: An extraction method for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and seven polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples [J]. *Chromatography A*, 2015, 1425: 25-33
- [16] Yilmaz E, Soylak M. Ultrasound assisted-deep eutectic solvent based on emulsification liquid phase microextraction combined with microsample injection flame atomic absorption spectrometry for valence speciation of chromium (III/VI) in environmental samples [J]. *Talanta*, 2016, 160: 680-685
- [17] Arain M B, Yilmaz E, Soylak M. Deep eutectic solvent based ultrasonic assisted liquid phase microextraction for the FAAS determination of cobalt [J]. *Mol Liq*, 2016, 224: 538-543
- [18] Khezeli T, Daneshfar A, Sahraei R. A green ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil [J]. *Talanta*, 2016, 150: 577-585
- [19] Liu W, Zhang K, Yu J, et al. A Green ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of TBHQ in edible oils [J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 9(10): 3209-3215

(上接第 141 页)

- [20] 王军,张春鹏,欧阳平凯.5-羟甲基糠醛制备及应用的研究进展[J].*化工进展*,2008,27(5):702-706
WANG Jun, ZHANG Chun-peng, OUYANG Ping-kai.

Research progress in preparation and application of 5-hydroxymethylfurfural [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2008, 27(5): 702-706