

王博文,唐爱星,韦滢军,等. 双水相萃取-高效液相色谱法检测高效氯氰菊酯及其降解产物[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):268-271.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.088

双水相萃取-高效液相色谱法检测 高效氯氰菊酯及其降解产物

王博文¹,唐爱星¹,韦滢军²,陈振¹

(1. 广西大学化学化工学院,广西南宁 530004; 2. 广西植保总站,广西南宁 530022)

摘要:通过 Plackett-Burman 试验,建立一种乙腈-无机盐-水双水相萃取-高效液相色谱法检测高效氯氰菊酯及其降解产物 3-苯氧基苯甲醛与 3-苯氧基苯甲酸,确立双水相萃取体系的最佳条件为: $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{样品溶液}}=1:1$,振荡时间 3 min,氯化钠:样品溶液=1 g:1 mL。在最佳萃取条件下,对生物降解体系中浓度分别为 10、100 mg/L 的底物和降解产物平均回收率为 94.6%~98.3%,变异系数为 2.1%~3.4%。该方法可以同时检测生物降解过程中高效氯氰菊酯及其降解产物 3-苯氧基苯甲醛与 3-苯氧基苯甲酸,操作简单,结果准确。

关键词:双水相萃取;高效液相色谱法;高效氯氰菊酯;3-苯氧基苯甲酸;3-苯氧基苯甲酸

中图分类号: O657.7⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0268-03

拟除虫菊酯类农药是一种广谱、高效的杀虫剂,由于其广泛使用而导致环境中存在大量残留^[1-2]。研究表明,拟除虫菊酯残留会危害哺乳动物和人类的健康,具有潜在的致癌性、生殖毒性、神经毒性以及引发急性中毒^[3-5]。同时,高效氯氰菊酯、溴氰菊酯、甲氰菊酯等多种拟除虫菊酯的降解中间产物 3-苯氧基苯甲酸也具有生殖毒性,在土壤中迁移性比母体化合物更强,对环境更具危害。

生物修复在降解和消除农药残留方面具有安全、高效等特点,是治理农药环境污染的有效途径。利用微生物及其产生的降解酶来消除农药污染已成为目前研究的热点,而对降解体系中农药及其降解产物的检测是此类研究的基础。目前,拟除虫菊酯类农药常用的检测方法为有机溶剂萃取-气相色谱或者高效液相色谱法。气相色谱法具有灵敏度高、分析速度快等优点,但是不能对不易气化或受热易分解的农药进行检测,对 3-苯氧基苯甲酸等酸性降解产物的检测通常需要衍生化。高效液相色谱法可以检测分子量较大、极性强与离子型的农药,具有检测效率高、灵敏度高、速度快和自动化程度高等优点,是农药残留分析的重要方法。通常农药萃取采用乙酸乙酯、环己烷等为萃取剂的液液萃取法,虽然这些溶剂对残留农药及降解产物有较好的溶解性,萃取回收率高,但采用高效液相色谱法检测时往往会出现溶剂峰的干扰,需要氮吹或其他净化处理,操作复杂,增大了试验误差。

双水相萃取法(aqueous two-phase extraction)是根据亲水性高分子聚合物或有机溶剂与无机盐在水溶液中超过一定浓度后可以形成两相,利用目标物在两相溶液中分配系数不

同而进行分离的方法^[6],具有条件温和、价廉、溶剂消耗较少等优点,在生物物质萃取及金属离子分离测定中得到广泛应用^[7],如贾凤燕等使用双水相萃取-高效液相色谱法检测鱼肉样品中 6 种拟除虫菊酯类农药,回收率为 81.1%~96.4%^[8]。乙腈是高效液相色谱常用的流动相,采用乙腈-无机盐水双水相萃取,可以避免高效液相色谱检测中溶剂峰对拟除虫菊酯及其降解产物峰的干扰,简化净化步骤,有利于检测分析。目前,有关拟除虫菊酯类农药的双水相萃取的报道还比较少。本研究通过建立一种乙腈-无机盐-水双水相萃取体系用于高效氯氰菊酯生物降解体系中底物及代谢产物的检测,以期对其他拟除虫菊酯类农药的检测具有借鉴意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) GF31,由中国微生物种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)保藏,登记入册编号 CGMCC No. 7173;95.8% 高效氯氰菊酯标准品,由广西田园生物有限公司提供;97.0% 3-苯氧基苯甲醛与 99.0% 3-苯氧基苯甲酸分别购于 J&K chemical LTD 与 Acros Organics;乙腈色谱纯,购于 Fisher 公司;其他常用药品,购于西陇化工股份有限公司。

1.2 仪器与设备

ULTIMATE 3000 高效液相色谱仪,配有紫外检测器,美国热电集团生产;LDZ4-1.2 离心机,北京众益中和生物技术有限公司生产;EP214C 分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司生产;H-1 微型漩渦混合器,上海精科实业有限公司生产。

1.3 溶液配制与胞外酶制备

20 g/L 高效氯氰菊酯贮备液的制备:准确称取 0.205 8 g 高效氯氰菊酯原药,精确至 0.2 mg,用乙腈定容至 10 mL;2 g/L 3-苯氧基苯甲酸贮备液的制备:准确称取 0.020 2 g 3-苯氧基苯甲酸原药,精确至 0.2 mg,用乙腈定容至 10 mL;

收稿日期:2014-04-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:21066001);广西研究生创新计划(编号:GXU11T31090);广西大学科研基金(编号:XJZ120278)。

作者简介:王博文(1989—),男,河南周口人,硕士,从事生物环境工程研究。Tel:(0771)3233718;E-mail:wangbowen918@163.com。

通信作者:唐爱星,男,湖南永州人,博士,讲师,从事生物环境工程研究。Tel:(0771)3233718;E-mail:aistar2000@163.com。

2 g/L 3-苯氧基苯甲醛贮备液的制备:准确称取 0.020 6 g 3-苯氧基苯甲醛原药,精确至 0.2 mg,用乙腈定容至 10 mL; 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液的制备:称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.169 g、 KH_2PO_4 2.72 g,用蒸馏水溶解并定容至 1 L, pH 值调节至 7.0; 无机盐培养基 (MS): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g,蒸馏水溶解并定容至 1 L, pH 值调至 7.0; 牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 5.0 g、 NaCl 5.0 g,使用蒸馏水溶解并定容至 1 L, pH 值调节至 7.0。培养基在 121 °C 条件下灭菌 20 min。胞外粗酶液的制备:将牛肉膏蛋白胨培养基装于 250 mL 锥形瓶中,每瓶装液量为 30 mL, 120 °C 灭菌 30 min; 接入菌种,在 30 °C、120 r/min 摇床中培养 18 h; 将发酵培养液用低温冷冻离心机在 4 °C、6 000 r/min 离心 15 min; 取上层清液,经 0.45 μm 滤膜过滤,再用 Milipore 10 kDa 超滤膜超滤获得超滤截留液,即为胞外粗酶液。

1.4 双水相萃取方法

将高效氯氰菊酯贮备液用无机盐培养基 (MS) 稀释为 50 mg/L; 取 1 mL 溶液,加入 0.1 mL 1 mol/L 盐酸酸化; 加入一定量乙腈,涡旋振荡一定时间,再加入一定量的 NaCl 振荡,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上层液,通过 0.22 μm 有机相膜过滤后进行高效液相色谱分析。高效氯氰菊酯回收率 (Recovery rate, R) 计算公式为: $R = AC_u/C_0$, 其中, A 为稀释倍数, C_u 为上相溶液中高效氯氰菊酯的量, C_0 为初始加入的高效氯氰菊酯的量。3-苯氧基苯甲醛与 3-苯氧基苯甲酸双水相萃取方法及回收率计算方法同上。

1.5 降解体系中高效氯氰菊酯及其降解产物检测

将菌体 GF31 接种于含有 50 mg/L 高效氯氰菊酯的无机盐培养基中,一定条件下降解 3 d,取样经双水相萃取后进行高效液相色谱法检测。将胞外酶加入到含有 50 mg/L 高效氯氰菊酯的磷酸盐缓冲溶液中,一定条件下降解 48 h,取样经双水相萃取后进行高效液相色谱法检测。

1.6 高效液相色谱检测

检测条件:色谱柱 AQUASIL C_{18} (4.6 \times 250 mm \times 5 μm) 柱,紫外检测器波长为 235 nm,流动相为乙腈:水 = 85:15 (体积比,下同),流速为 1 mL/min,温度 30 °C,进样量 20 μL ,采用自动进样器控制。采用外标法定量,高效氯氰菊酯标准曲线回归方程为 $y = 0.678x + 0.489$, $r^2 = 0.9997$,其中, y 为高效氯氰菊酯总峰面积, mAU/min, x 为高效氯氰菊酯进样浓度, mg/L。3-苯氧基苯甲酸标准曲线回归方程为 $y = 1.121x - 0.169$, $r^2 = 0.9995$,其中, y 为 3-苯氧基苯甲酸峰面积, mAU/min; x 为 3-苯氧基苯甲酸进样浓度, mg/L。3-苯氧基苯甲醛标准曲线回归方程为 $y = 2.514x - 0.137$, $r^2 = 0.9993$,其中, y 为 3-苯氧基苯甲醛峰面积, mAU/min; x 为 3-苯氧基苯甲醛进样浓度, mg/L。

2 结果与分析

2.1 双水相萃取优化试验方案设计

试验选取可能影响高效氯氰菊酯萃取的 3 个因素进行 Plackett-Burman 试验,3 个因素分别为乙腈 (A)、振荡时间 (B) 和氯化钠量 (C),每个因素选取高水平 1 和低水平 -1 (表 1),以高效氯氰菊酯回收率为响应值 (表 2),利用 Minit-

able 软件对试验结果进行分析,得出各因素的 t 值和可信度水平。由表 3、图 1、图 2 可见,乙腈加入量对萃取有显著影响,乙腈加入量越少,萃取回收率越高,当乙腈:样品溶液 = 1:1 时,高效氯氰菊酯回收率最高,达到 98.0%; 当乙腈:样品溶液 = 5:1 时,回收率仅为 84.4%。其他 2 个因素对试验没有显著影响。因此,采用乙腈:样品溶液 = 1:1、振荡时间 3 min、氯化钠:样品溶液 = 1 g:1 mL 为乙腈-氯化钠-水双水相萃取高效氯氰菊酯的最优条件。

表 1 Plackett-Burman 试验因素水平及编码

水平	A:乙腈与样品溶液比 (mL: mL)	B:振荡时间 (min)	C:氯化钠量与样品溶液比 (g: mL)
-1	2:1	3	1:1
1	5:1	5	2:1

表 2 Plackett-Burman 试验方案与结果

序号	A	B	C	回收率 (%)
1	-1	1	-1	93.21
2	1	-1	1	90.98
3	-1	-1	-1	92.64
4	-1	1	1	96.05
5	1	-1	1	90.98
6	1	1	1	90.83
7	1	1	-1	88.63
8	-1	-1	1	93.70
9	-1	1	1	90.03
10	-1	-1	-1	96.05
11	1	-1	-1	92.64
12	1	1	-1	88.63

表 3 Plackett-Burman 试验分析

因素	效应	系数	系数标准误	t 值	P 值
常量		92.029	0.560 8	164.1	0.000
A	-3.164	-1.582	0.560 8	-2.82	0.022
B	-1.600	-0.800	0.560 8	-1.43	0.192
C	0.127	0.064	0.560 8	0.11	0.912

响应值为回收率, $\alpha=0.05$

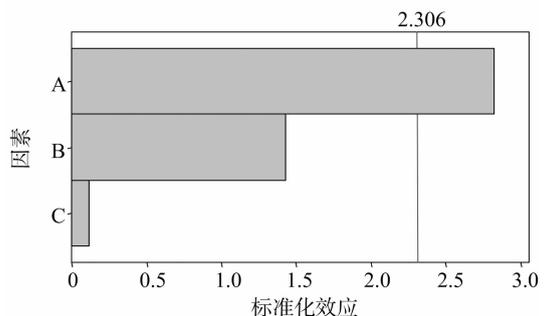


图 1 标准化效应的 Pareto 图

2.2 回收率的测定

高效氯氰菊酯生物降解体系分别为菌体降解体系与酶降解体系,菌体降解在无机盐培养基中进行,酶降解在磷酸缓冲溶液中进行,分别考察无机盐培养基和磷酸缓冲溶液中高效氯氰菊酯及其降解产物 3-苯氧基苯甲酸和 3-苯氧基苯甲醛的双水相萃取法效果。由表 4 可见,对 10、100 mg/L 高效氯氰菊酯、3-苯氧基苯甲酸和 3-苯氧基苯甲醛的平均回收

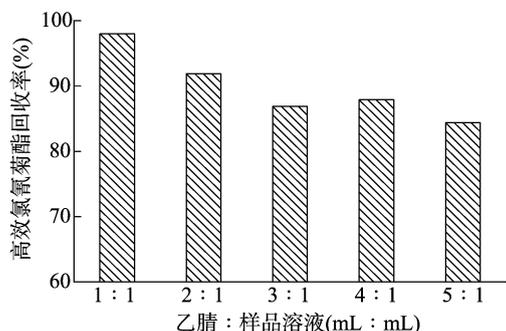


图2 不同体积比乙腈对高效氯氟菊酯回收率的影响

率为94.6%~98.3%、变异系数为2.1%~3.4%。有文献报道,平均回收率为90%~96%、变异系数为1.1%~3.9%,即

表4 双水相萃取高效氯氟菊酯、3-苯氧基苯甲酸和3-苯氧基苯甲醛的回收率

体系	目标物质	初始浓度 (mg/L)	回收率(%)							平均	变异系数 (%)
			样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7		
无机盐培养基	高效氯氟菊酯	10	98.3	101.2	94.5	99.5	95.8	96.4	93.2	97.0	2.9
		100	96.5	98.4	91.8	93.7	95.6	92.8	93.3	94.6	2.5
	3-苯氧基苯甲酸	10	96.5	97.8	93.2	99.9	92.4	98.1	95.6	96.2	2.8
		100	94.5	96.7	93.1	97.3	94.5	98.7	92.3	95.3	2.6
	3-苯氧基苯甲醛	10	93.5	96.7	95.5	98.1	96.4	95.1	99.7	96.4	2.1
		100	98.9	95.4	95.3	97.1	93	98.2	92.3	95.7	2.6
磷酸盐缓冲溶液	高效氯氟菊酯	10	98.1	99.5	103.2	95.3	95.4	97.1	92.9	97.4	3.4
		100	93.2	92.3	96.9	98.3	96.7	93.1	98.4	95.6	2.7
	3-苯氧基苯甲酸	10	97.6	96.4	102.1	94	95.4	94.2	93.6	96.2	3.1
		100	96.8	98.5	92.4	94.3	93.1	95.2	93.6	94.8	2.2
	3-苯氧基苯甲醛	10	99.6	103.5	95.4	94.3	98.7	96.8	99.8	98.3	3.2
		100	97.6	98.9	93.4	94.2	98.5	98.2	95.3	96.6	2.3

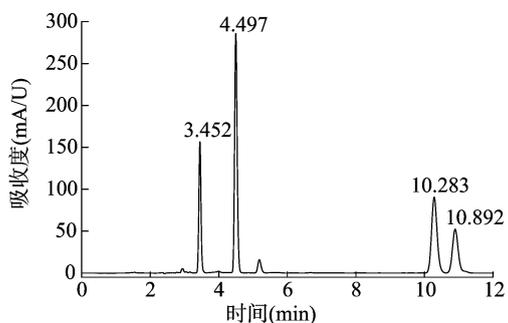
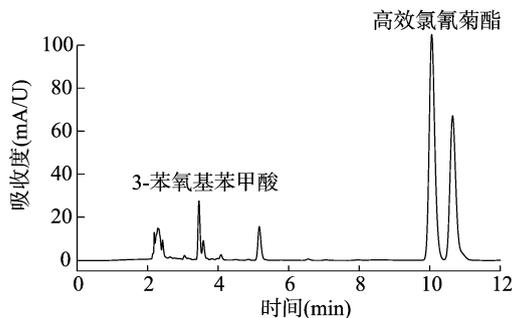
图3 3-苯氧基苯甲酸($t_R=3.452$ min)、3-苯氧基苯甲醛($t_R=4.497$ min)、高效氯氟菊酯($t_R=10.283$ 、 10.892 min)标准品高效液相色谱图

图5 菌株GF31降解高效氯氟菊酯高效液相色谱图

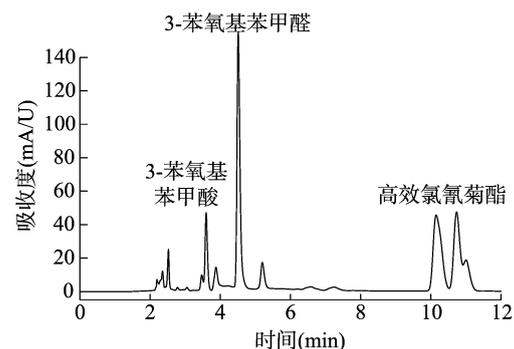


图4 胞外粗酶降解高效氯氟菊酯高效液相色谱图

认为检测方法比较精确^[9]。因此,本试验方法可精确定量测定高效氯氟菊酯、3-苯氧基苯甲酸和3-苯氧基苯甲醛。

2.3 降解体系中高效氯氟菊酯及其降解产物的检测

由图3可见,高效氯氟菊酯、3-苯氧基苯甲酸和3-苯氧基苯甲醛标准品在12 min内可以实现完全分离,符合分析要求。根据标准曲线,在实际酶降解体系中,可以同时定量检测底物高效氯氟菊酯与其降解产物3-苯氧基苯甲酸与3-苯氧基苯甲醛(图4)。同理,菌降解体系中各物质也可以定量检测(图5),但是仅检测到3-苯氧基苯甲酸,未检测到3-苯氧基苯甲醛,这可能是由于降解产生的3-苯氧基苯甲醛被菌体迅速转化为3-苯氧基苯甲酸。Tallur等发现,微生物(*Micrococcus* sp.) CPN 1可以把3-苯氧基苯甲醛转化为3-苯氧基苯甲酸^[10],这与本试验结论一致。

3 结论

微生物降解拟除虫菊酯类农药具有速度快、操作简单、减少二次污染、成本低廉等优点,具有良好的发展前景,目前已有较多关于微生物降解拟除虫菊酯的报道。3-苯氧基苯甲酸与3-苯氧基苯甲醛是高效氯氟菊酯、甲氧菊酯等多种拟除虫菊酯的主要代谢产物,是研究此类农药降解进程及降解机理的重要标的物。目前,研究者采用不同方法分别检测拟除虫菊酯和其降解产物3-苯氧基苯甲酸与3-苯氧基苯甲酸^[11-12],操作复杂,费时费力。

本研究建立了一种乙腈-无机盐-水双水相萃取系统,用于高效液相色谱法检测生物降解体系样品中高效氯氟菊酯及其降解产物,具有萃取与净化的优点,操作简便,结果准确,能同时检测氯氟菊酯生物降解体系中底物与降解产物,这为

马高庭,蒋万春,申艳光. 基于关联规则的肉鸡产品质量安全预警模型[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):271-274.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.089

基于关联规则的肉鸡产品质量安全预警模型

马高庭¹, 蒋万春², 申艳光¹

(1. 河北工程大学信息与电气工程学院,河北邯郸 056038; 2. 河北工程大学农学院,河北邯郸 056038)

摘要:针对肉鸡生产过程中的安全问题,基于改良关联规则挖掘算法(APTPPA)建立肉鸡产品质量安全预警模型。该模型以肉鸡养殖及屠宰过程中危害分析、关键控制点(HACCP)的异常数据为处理对象,采用模式指导树并频繁项集挖掘算法(APTPPA),构造关联路径树,找寻最大频繁项集,提取预警关联规则,挖掘影响肉鸡产品安全的因素,通过试验验证预警模型的有效性。

关键词:肉鸡产品;质量安全;预警模型;关联规则;APTPPA;HACCP

中图分类号: TS207.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0271-04

食品安全问题的频繁发生,引起了众多国家的高度重视^[1]。发达国家早已开始研究构建一套广泛有效的食品安全预警模型。畜禽产品在日常养殖、加工过程中面临更多更复杂的安全风险,监管难度很大。因此国内外学者较为关注对畜禽产品质量安全预警模型的探讨和研究。我国肉鸡产业发展迅速,但产品品质参差不齐。如不及时改善产品质量,提高预警能力,国内肉鸡产业将难以抗衡外来企业^[2]。

数据挖掘在食品安全领域的应用较少,而食品安全日常事务所产生的大量时序数据非常适合做数据分析,从中可挖掘出有效的预警条目^[3]。选择合适、高效的挖掘算法对食品

安全预警模型的精确度至关重要。本研究采用的关联规则挖掘算法最早由 Agrawal 等提出^[4],其中以 Apriori 算法最为经典^[5],后续学者提出的改进算法大多以 Apriori 算法为基础。由于 Apriori 算法存在固有缺陷,随后 Han 等提出基于 FP-tree 来生成频繁项目集的 FP-growth 算法^[6]。近些年其他类型的关联规则挖掘算法也相继问世^[7,8],明显进步于早期算法,但在食品安全领域的适用性并不理想。肉鸡养殖、屠宰的安全因素具有多值性、倾斜性、稠密性和负相关性等特点,使传统挖掘算法构建预警模型变得尤为困难。本研究针对食品安全因素的固有问题,结合 HACCP 管理体系,采用 Association Path Tree Pattern Parallel Algorithm(APTPPA)算法构建了肉鸡产品质量安全预警模型。

1 肉鸡产品质量安全预警模型框架

本研究的预警模型是肉鸡产品质量控制与可追溯系统中的一个模块。该系统基于 B/S 架构,囊括肉鸡产品安全信息

收稿日期:2014-05-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:61075053);河北省自然科学基金(编号:G2014402027)。

作者简介:马高庭(1990—),男,浙江绍兴人,硕士研究生,主要从事数据挖掘研究。E-mail:magaoting@msn.com。

其他拟除虫菊酯类农药和环境污染物的检测提供了借鉴。

参考文献:

- [1] Mehler W T, Li H Z, Lydy M J, et al. Identifying the causes of sediment-associated toxicity in urban waterways of the Pearl River Delta, China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(5):1812-1819.
- [2] Li H Z, Mehler W T, Lydy M J, et al. Occurrence and distribution of sediment-associated insecticides in urban waterways in the Pearl River Delta, China [J]. *Chemosphere*, 2011, 82(10):1373-1379.
- [3] Shafer T J, Meyer D A, Crofton K M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113(2):123-136.
- [4] Garey J, Wolff M S. Estrogenic and antiprogesteragenic activities of pyrethroid insecticides [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 251(3):855-859.
- [5] Wijngaarden R P A V, Brock T C M, Brink P J V D. Threshold levels for effects of insecticides in freshwater ecosystems: a review [J]. *Ecotoxicology*, 2005, 14(3):355-380.

- [6] 谢海. 双水相萃取技术研究现状 [J]. *化学工业与工程*, 2006, 23(5):463-466.
- [7] 邓凡政,魏迎,陈影,等. 双水相体系中 Cu(II), La(III), U(VI), Ce(IV) 光谱行为及萃取分离 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2004, 24(12):1637-1639.
- [8] 贾凤燕,王文文,刘振波,等. 乙腈-无机盐-水双水相体系萃取-气相色谱法检测鱼肉中拟除虫菊酯 [J]. *化学学报*, 2012, 70(4):485-491.
- [9] 刘新,尤民生,廖金英,等. 甲胺磷降解菌的分离与降解效能测定 [J]. *武夷科学*, 2001, 17(1):51-55.
- [10] Tallur P N, Megadi V B, Ninnekar H Z, et al. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN 1 [J]. *Biodegradation*, 2008, 19(1):77-82.
- [11] Wang B Z, Ma Y, Zhou W, et al. Biodegradation of synthetic pyrethroids by *Ochrobactrum tritici* strain pyd-1 [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(10):2315-2324.
- [12] Chen S H, Hu Q B, Hu M Y, et al. Isolation and characterization of a fungus able to degrade pyrethroids and 3-phenoxylbenzaldehyde [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17):8110-8116.