

郑志福, 翁文婷, 谢晓兰. 芦柑果皮 2,4-二氯苯氧乙酸丁酯残留的 GC-ECD 快速筛查[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(20): 218-220.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.051

芦柑果皮 2,4-二氯苯氧乙酸丁酯残留 的 GC-ECD 快速筛查

郑志福, 翁文婷, 谢晓兰

(泉州师范学院化工与材料学院, 福建泉州 362000)

摘要:旨在建立气相色谱-电子俘获检测器快速测定芦柑果皮 2,4-二氯苯氧乙酸丁酯(2,4-DB)残留量的方法。以乙酸乙酯为溶剂超声波萃取果皮中的 2,4-DB, 蒸干后用丙酮定容至 50.00 mL, 气相色谱-电子俘获检测器法(GC-ECD)检测。方法的检出限为 0.20 $\mu\text{g/L}$, 定量限为 1.00 $\mu\text{g/L}$, 加标回收率为 71.0%~95.2%, 变异系数为 1.4%~9.9%。在所有样品中均检出 2,4-DB 残留, 芦柑浸泡 2,4-DB 后, 48 h 内吸收降解了 92.7%。

关键词:芦柑; 2,4-二氯苯氧乙酸丁酯; 气相色谱-电子俘获检测器法(GC-ECD)

中图分类号: TQ450.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0218-03

“中国芦柑之乡”福建省永春县是全国唯一的芦柑出口食品农产品质量安全示范区。现有果园约 6 667.67 hm^2 , 年产量约 18.5 万 t, 产值 14 亿元以上, 2015—2016 年产季出口芦柑超 4 万 t。因柑橘存在农药残留的问题, 难以进入欧美等高端市场, 一些国家更是凭借现代分析技术的优势, 提出更高的农药残留限量要求。印度尼西亚从 2012 年起对我国柑橘出口采取严格限制, 2017—2018 年产季更是被全面禁入。2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)类农药长期用于柑橘采摘前后的保鲜和防腐^[1]。2,4-D 溶解性小, 较早使用的 2,4-D 钠盐水溶性及稳定性较差, 近年来果农普遍改用 57% 2,4-D 丁酯(2,4-DB)乳油。2,4-DB 醇基只有 4 个碳原子, 沸点 146~147 $^{\circ}\text{C}$, 相比 2,4-D 的丁氧基乙酯(BEE)、2-乙基己基酯(2-EHE, 异辛酯)等长链酯, 2,4-DB 更易汽化挥发, 在大气中飘散, 对其他双子叶农作物造成毒害^[2]。GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[3]中规定, 2,4-D 在柑橘中的最大残留限量为 0.1 mg/kg 。2,4-DB 只允许在谷类和大豆中检出, 最大残留限量为 0.05 mg/kg , 未允许在柑橘中使用。2016 年农业部停止 2,4-DB 的田间试验及产品登记^[2], 2023 年起, 我国将全面禁止 2,4-DB 的生产和销售。大多数国家禁止使用 2,4-DB, 2000 年以后国内外只有 11 篇关于 2,4-DB 的研究报道^[4-14], 且主要集中在其作为植物生长调节剂及除草剂的应用上, 尚未发现 2,4-DB 防止柑橘果实脱落及腐烂的研究报道。2,4-DB 的检测方法主要有气相色谱-电子俘获检测器法(GC-ECD)^[7]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[9-12]、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)^[13-14]等,

而国标检测方法 GB/T 5009.165(GC-ECD、填充柱)在 2003 年颁布后未再更新。柑橘是我国产量第二大水果, 芦柑等宽皮柑橘占了出口量的 70%, 2,4-DB 在宽皮柑橘中已非法使用近 10 年, 却缺乏专门的研究。本研究建立了芦柑果皮乙酸乙酯超声波提取、GC-ECD 快速检测方法, 并对果皮中 2,4-DB 的降解速度进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

气相色谱(岛津 GC2014C, 配置 PECD 检测器、AOC-20i 自动进样器、LabSolutions LE V5.81 工作站); 超声波清器(昆山市超声仪器有限公司, 型号为 KQ-300VDB); 旋转蒸发器(北京莱伯泰科仪器有限公司, 型号为 EV321); 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司, 型号为 BS 224S)。

1.2 材料和试剂

2,4-DB 对照品(阿拉丁, 100 $\mu\text{g/mL}$, 正己烷), 用正己烷分别稀释到 10.00、20.00、60.00、80.00、100.00 $\mu\text{g/L}$ 作为标准曲线工作液。2,4-DB 农药(57% 乳油, 大连松辽化工有限公司)。甲醇、乙酸乙酯、丙酮、正己烷均为色谱纯。芦柑鲜果于 2017 年 11 月 18 日采摘于永春县一都镇果园, 市售 4 批样品于 2017 年 12 月购自当地农贸市场及超市。

1.3 样品前处理

将芦柑皮切成 0.3 $\text{cm} \times 2.0 \text{ cm}$ 的小条, 称取 5.00 g 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加 25.00 mL 乙酸乙酯, 超声波 20 min, 取上清液, 各用 5.00 mL 乙酸乙酯洗果皮 3 次。合并乙酸乙酯, 45 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸干, 丙酮+超声波溶解并定容至 50.00 mL。

1.4 气相色谱条件

汽化室 290 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 0.5 μL , 分流比 1:2; 载气(N_2)恒流 1.00 mL/min 。色谱柱: Agilent HP-5Ms (19091J-433, 30 $\text{m} \times 250 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$)。程序升温: 150 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 15 $^{\circ}\text{C/min}$ 上升至 225 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 20 $^{\circ}\text{C/min}$ 上升至 310 $^{\circ}\text{C}$ 保持 4.5 min; ECD 310 $^{\circ}\text{C}$, 电流 1.00 nA, N_2 尾吹 30 mL/min , 溶剂延迟 3 min。

收稿日期: 2018-07-16

基金项目: 福建省自然科学基金(编号: 2018Y0073); 福建省泉州市科技计划(编号: 2018N004); 泉州师范学院项目(编号: 2015KJ10)。

作者简介: 郑志福(1977—), 男, 福建永春人, 实验师, 主要从事天然产物提取和色谱分离研究。E-mail: zhengzhifu@189.cn。

1.5 标准曲线、检出限、定量限、回收率及芦柑 2,4-DB 残留量的测定

取“1.2”节的 2,4-DB 标准曲线工作液,按“1.4”节方法进行分($n=5$),绘制标准曲线。2,4-DB 用正己烷逐级稀释后按“1.4”节方法进行分析,计算检出限和定量限,平行 3 次。芦柑鲜果添加 100、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2,4-DB;市售芦柑样品 4 批,按“1.3”节方法前处理,按“1.4”节条件分析($n=3$),计算回收率及 2,4-DB 残留量。

1.6 芦柑果皮 2,4-DB 降解速度

芦柑鲜果采摘 7 d 后,用比例为 10 g : 10 L 的 2,4-DB 农药水浸泡 5 min,捞出后在阴凉处晾干,1.5、24、48、72、96 h 后按“1.3”节、“1.4”节方法分析检测($n=3$)。

2 结果与分析

2.1 前处理

2,4-DB 作为保鲜剂使用主要残留在果皮表面,芦柑果皮含多种有机物,用甲醇、乙酸乙酯、石油醚 3 种不同极性溶剂提取 2,4-DB,石油醚提取效果最差,甲醇的提取率只有乙酸乙酯的 43% ~ 51%,且杂质含量高于乙酸乙酯,本研究采用 5 倍橘皮质量的乙酸乙酯,超声波提取 20 min。乙酸乙酯提取液中含大量有机物(图 1),色谱检测前常采用固相萃取、QuEChERS 等方法净化。ECD 为选择性检测器,果皮 2,4-DB 残留量较大,在最佳柱温条件下,2,4-DB 与其他杂质完全分开(图 2),无需净化处理。果皮中含较多水分,乙酸乙酯提取液中含微量水,影响 ECD 检测。乙酸乙酯提取液于 45 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸干后用丙酮定容,过 0.25 μm 滤膜,用 GC-ECD 检测。2,4-DB 在果皮中不得检出,快速筛查时,提取液不蒸干,乙酸乙酯定容至 50 mL,过滤时加无水硫酸钠脱水,响应值下降 25% ~ 40%。

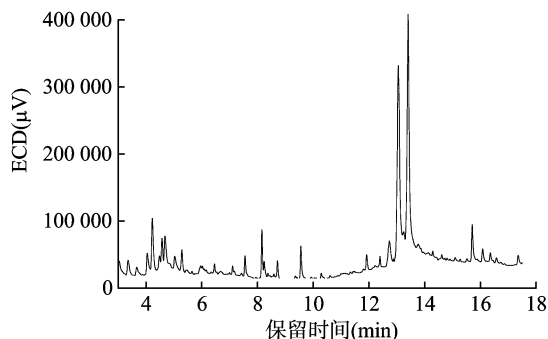


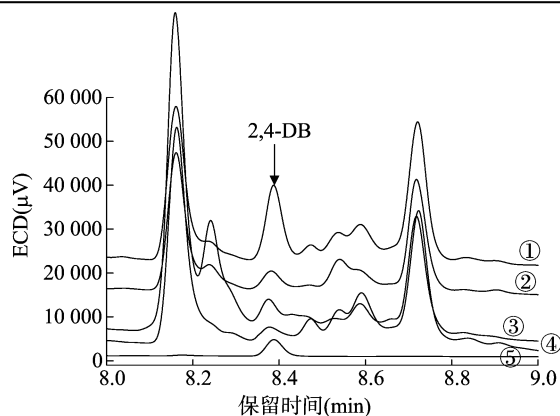
图1 芦柑鲜果皮 GC-ECD 色谱结果

2.2 GC 分离

芦柑皮用乙酸乙酯提取、定容后,不经净化处理直接进样。尽管 ECD 为选择性检测器,提取液中含大量杂质,特别是 13 ~ 14 min 有 2 个含量很高的杂质(图 1)。最佳柱温条件下,2,4-DB 在保留时间 8.37 min 处,与杂质完全分离(图 2),提取液无需净化处理。

2.3 2,4-DB 标准曲线及方法检出限

2,4-DB 对照品(阿拉丁,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,基体正己烷),用正己烷分别稀释到 10.00、20.00、60.00、80.00、100.00 $\mu\text{g}/\text{L}$,按“1.3”节方法进行 GC-ECD 检测。浓度由低到高,每个浓度测定 5 次,以峰面积(A)的平均值对浓度(C)作图(图 3)。



①—20.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 2,4-DB 正己烷溶液; ②—芦柑鲜果;
③—市售芦柑; ④—芦柑鲜果加 100.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2,4-DB;
⑤—芦柑鲜果加 500.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2,4-DB
图2 芦柑果皮加标 GC-ECD 色谱

线性方程: $A = 425.8C + 1\,911$, $r^2 = 0.9986$ 。进样 2,4-DB 稀溶液,1.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 2,4-DB 相对误差约为 10%,0.20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 2,4-DB 可手动积分,0.10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 2,4-DB 无法确定峰位置。方法检出限为 0.20 $\mu\text{g}/\text{L}$,定量限为 1.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。使用填充柱(1.7% OV-17 和 2% QF-1 混合固定液,2 m \times 3.2 mm),方法检出限为 0.025 mg/kg^[15],只比 GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中 2,4-DB 在谷类中允许的最大残留限量 0.05 mg/kg 稍低,GB/T 5009.165—2003《粮食中 2,4-滴丁酯残留量的测定》远落后于检测要求。毛细管柱分离效果更好,检出限及定量限降低 2 个数量级以上,本方法可作为谷物中 2,4-DB 残留量检测方法的参考。

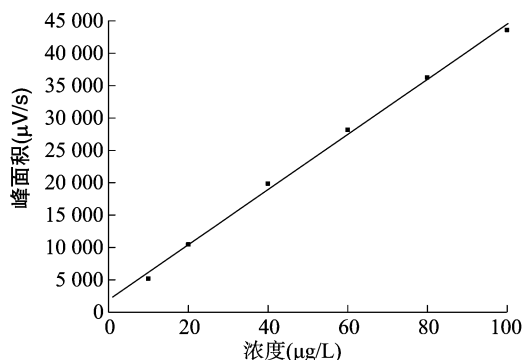


图3 2,4-DB 标准曲线

2.4 芦柑果皮 2,4-DB 残留量检测及 2,4-DB 降解速度

图 2 中由下往上 5 条色谱曲线依次为 20.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 2,4-DB 正己烷溶液、芦柑鲜果、市售芦柑、芦柑鲜果加 100.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2,4-DB、芦柑鲜果加 500.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2,4-DB。2,4-DB 除作为芦柑保鲜剂使用外,还可防止落果,在开花末期与第 1、第 2 生理落果期各要喷洒 1 次 2,4-DB。防止落果时,2,4-DB 无用药指导,2,4-D 钠盐的用药浓度为 1 g 农药加 100 kg 水稀释,而作为保鲜剂使用时,用药浓度为 1 g 2,4-D 钠盐加 4 kg 水稀释。芦柑种植过程需喷洒较低浓度 2,4-DB 防止果实脱落,从果园采摘的芦柑鲜果果皮中可检测出微量 2,4-DB 残留(图 2—②),本底浓度为 62.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。如表 1 所示,分别添加 100.0、500.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

2,4-DB,回收率分别为71.0%、95.2%。

市售4批芦柑,各取3个,取果实中部果皮,按“1.3”“1.4”节方法进行检测($n=3$),2,4-DB残留量分别为(100.7±6.0)、(111.7±15.0)、(123.2±1.5)、(139.3±11.8) μg/kg。根据GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》,2,4-DB在芦柑中禁止检出,但果园现采摘鲜果及市售芦柑的果皮中均检出2,4-DB残留,残留量比芦柑(全果)2,4-D最大残留限量100 μg/kg还高,说明在芦柑生长期喷洒2,4-DB防止落果、采摘后浸泡2,4-DB防止果实腐烂均是普遍行为。

表1 果皮中2,4-DB的添加回收率($n=3$)			
本底 (μg/kg)	添加水平 (μg/kg)	检测值 (μg/kg)	回收率 (%)
62.5	100.0	133.5±1.4	71.0
62.5	500.0	538.0±9.9	95.2

在初次试验中,芦柑采摘24 h后,用2.0~10 g 2,4-DB农药:10 kg水4个不同浓度2,4-DB药水浸泡,晾干,5 d后检测。不同用药浓度的芦柑2,4-DB残留量在88.3~111.4 μg/kg间,与芦柑鲜果2,4-DB本底残留量相差不大。芦柑浸泡保鲜剂后,果皮表面残留的2,4-DB在短期内迅速被吸收并降解。剩余少量芦柑鲜果在采摘后第7天用1 g/1 kg浓度药水处理。芦柑在药水中浸泡5 min后晾干,1.5、24、48、72、96 h后检测,2,4-DB残留量依次为(1370.3±10.7)、(449.7±21.3)、(94.7±9.0)、(94.8±10.8)、(101.5±14.5) μg/kg。2,4-DB含量在24 h内降低了67%,48 h后含量降低到约100 μg/kg的本底水平,48 h内2,4-DB被芦柑果皮吸收并降解了92.7%。不同芦柑果皮厚度及粗糙程度相差较大,造成试验数据的相对误差普遍较大。

2.5 芦柑2,4-D类农药的使用现状及后续研究计划

2,4-D类农药是目前世界上使用量最大的农药,对其监管日趋严格。2,4-D类农药可防止柑橘在生长期果实脱落、贮藏期果实腐烂,是柑橘种植、销售过程中必不可少的农药。2,4-D钠盐因水溶解性能不佳等原因,较早被市场弃用。2,4-DB是近10年我国较常见剂型,但2,4-DB挥发性较强,对其他农作物毒害性较大,2017年起被停止产品登记^[2]。目前市场上新出现的剂型是2,4-滴二甲胺盐(2,4-DD),GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》还新增了2,4-滴异辛酯(2,4-DE)。2,4-DD是2,4-D与二甲胺形成的络合物,相比2,4-D钠盐(固体,含量85%),能制成稳定乳油剂型,易于加水稀释。2,4-DB、2,4-DE是2,4-D分别与丁醇、异辛醇(2-乙基己醇)形成的酯,2,4-DE沸点396.9℃,远高于2,4-DB的147℃,不易挥发,但目前市场上没有单独2,4-DE剂型农药。2,4-D类农药都是在细胞内转化成2,4-D,进而发挥作用。目前对2,4-DD、2,4-DE的研究基本空白,即将被禁用的2,4-DB研究也很少。芦柑果皮2,4-DNa残留量^[16]为1040 μg/kg,2,4-DB比2,4-D低1个数量级。不同2,4-D类农药被

果皮细胞吸收效率、转化成2,4-D效率、保鲜效果、防止果实脱落等方面可能存在区别,有待进一步研究。

3 结论

本研究建立了GC-ECD测定柑橘2,4-DB残留量的方法,可快速筛查柑橘是否违规使用2,4-DB。尽管不被法规允许,2,4-DB在芦柑生产、销售过程中普遍使用。浸泡1 g/kg 2,4-DB农药后果实表面2,4-DB残留48 h内被吸收分解。在加强监管滥用2,4-DB的同时,应加快对2,4-DD、2,4-DE等替代2,4-D类农药使用的研究。

参考文献:

[1]刘蕊,李德红,李玲. 2,4-二氯苯氧乙酸的研究进展[J]. 生命科学研究,2004,8(增刊2):71-75.

[2]第八届全国农药登记评审委员会第十八次全体会议纪要[J]. 今日农药,2016(2):11-13.

[3]食品中农药最大残留限量:GB 2763—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.

[4]Sun F, Zhu T, Shang J, et al. Gas-phase reaction of dichlorvos, carbaryl, chlordimeform, and 2,4-D butyl ester with OH radicals[J]. International Journal of Chemical Kinetics, 2005, 37(12): 755-762.

[5]张淑花,周利军,张雪萍. 低质量浓度除草剂2,4滴丁酯处理对土壤动物群落结构的影响[J]. 生态环境学报,2013,22(10): 1706-1710.

[6]张小卫. 2,4-D丁酯对冬小麦安全性及产量的影响[J]. 小麦研究,2013,34(1):10-16.

[7]单娟,董崧,王文博. 气相色谱法测定玉米中乙草胺·莠去津·2,4-滴丁酯残留[J]. 农药,2011,50(8):582-584.

[8]杨忠,任月梅,郭瑞锋,等. 2,4-滴丁酯对谷子生长形态指标的影响[J]. 中国农学通报,2015,31(30):132-138.

[9]黄修柱,季颖. 2,4-滴丁酯原药及其杂质GC-MS分析研究[J]. 农药科学与管理,2005,26(8):3-7.

[10]匡华,侯玉霞,储晓刚,等. 气相色谱-质谱法同时测定大豆中14种苯氧羧酸类除草剂[J]. 分析化学,2006,34(12): 1733-1736.

[11]扎西次旦,潘虎,代艳娜,等. 气相色谱-串联质谱法测定青稞中除草剂2,4-D丁酯残留[J]. 现代农业科技,2015,22(4):139-142.

[12]张文华,谢文,侯建波,等. 气相色谱-串联质谱法测定豆芽与番茄中6种植物生长调节剂[J]. 分析测试学报,2016,35(10):1241-1247.

[13]姜楠,刘思洁,崔勇,等. 2015年吉林省市售水果中植物生长调节剂残留量监测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(1):33-38.

[14]李倩,房宁,王子剑,等. 2016年北京市大兴区主产水果中植物生长调节剂残留量监测分析[J]. 中国卫生检验杂志,2017,27(14):2089-2090,2094.

[15]粮食中2,4-滴丁酯残留量的测定:GB/T 5009.165—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[16]郑志福,李文杰,李国清. 衍生后SPE_{C18}-GC-FID测定芦柑2,4-D残留[J]. 亚热带农业研究,2013,9(3):191-195.