

脐橙果皮中三唑磷农药残留的表面增强拉曼光谱快速检测研究

李俊杰¹, 曾海龙², 刘木华¹, 吴瑞梅¹, 吴彦红¹, 王晓彬¹, 陈金印³

(1. 江西农业大学工学院, 江西南昌 330045) (2. 江西省出入境检验检疫局, 江西南昌 330002)

(3. 江西省果蔬保鲜与无损检测重点实验室, 江西农业大学农学院, 江西南昌 330045)

摘要: 采用表面增强拉曼光谱技术结合化学计量方法快速分析脐橙果皮中的三唑磷农药残留。利用乙腈快速提取脐橙果皮的提取液, 采用石墨化碳、C₁₈和PSA去除果皮提取液中色素等物质的干扰。以脐橙果皮提取液为基质, 配制不同浓度的三唑磷农药溶液, 进行拉曼信号采集, 得到的拉曼特征峰与三唑磷标准溶液的特征峰基本一致。建立脐橙果皮中三唑磷农药残留的偏最小二乘法预测模型, 结果表明, 以脐橙果皮提取液为基质的三唑磷溶液最低检测浓度为0.8 mg/L; 模型对预测集样本的预测均方根误差为1.60 mg/L, 相关系数为0.9669。再利用该方法检测脐橙中实际所含三唑磷农药残留, 其模型对样本的预测值与真实值的相对误差绝对值在0.08%~5.98%之间, 预测回收率为94.36%~104.36%, 模型预测能力和重现性良好。

关键词: 表面增强拉曼光谱; 三唑磷; 脐橙果皮; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2015)8-334-339

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.052

Rapid Detection of Triazophos Residues in Navel Orange Peel based on Surface-enhanced Raman Spectroscopy

LI Jun-jie¹, ZENG Hai-long², LIU Mu-hua¹, WU Rui-mei¹, WU Yan-hong¹, WANG Xiao-bin¹, CHEN Jin-yin³

(1. College of Engineering, Jiang Xi Agricultural University, Nanchang 330045, China) (2. Entry-Exit Inspection and Quarantine, Jiang Xi province, Nanchang 330002, China) (3. Jiangxi Key Laboratory for Postharvest Technology and Nondestructive Testing of Fruits & Vegetables, College of Agronomy, Jiang Xi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) combined with chemometrics method was used to rapidly detect triazophos residues in navel orange peel. Acetonitrile was used to rapidly produce navel orange peel extract. Graphite carbon, C₁₈ and Periodic acid-Schiff (PSA) were used to remove interferences, e.g., pigments from the navel orange peel extracts. The obtained extracts were used as the base to prepare triazophos solutions of different concentrations and their signals were collected by laser Raman spectrometer. The resultant Raman characteristic peaks were largely consistent with those of triazophos standard solution. A partial least-squares regression model was developed to predict residual triazophos content in navel orange peel. The results showed that the minimum detection concentration for triazophos in solutions of navel orange peel extract was 0.8 mg/L, the root mean square error of the model's prediction was 1.60 mg/L, and the correlation coefficient was 0.9669. When this method was used to detect the actual triazophos residue in navel orange peel, the absolute values of the relative error were between 0.08% and 5.98%, while the prediction recoveries were 94.36% to 104.36%. The results of this study demonstrated good predicting ability and reproducibility of the model.

Key words: surface-enhanced Raman spectroscopy; triazophos; peel of navel orange; rapid detection

三唑磷, 化学名称 O, O-二乙基-O-(1-苯基-1,

收稿日期: 2014-11-01

基金项目: 赣鄱英才 555 工程入选计划, 国家自然科学基金项目(31271612); 江西省学术带头人培养计划(20113BCB22001)

作者简介: 李俊杰(1989-), 男, 硕士研究生, 主要从事农产品质量安全光学检测研究

通讯作者: 陈金印(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向为果蔬采后生理与贮藏技术

3, 4-三唑-2-基) 硫代磷酸酯, 是一种广谱杀虫剂和杀螨剂。纯品为淡黄色液体, 不溶于水, 可溶于大多数有机溶剂^[1]。按照我国农药毒性划分标准, 三唑磷为中等毒性农药, 对高等动物毒性较高^[2]。由于三唑磷的半衰期较长, 长时间大量使用造成的农产品中残留问题就变得异常严重, 对人类健康和生态环境造成了严重的影响。目前三唑磷农药的检测方法主要有分光光度法^[3]、高效液相色谱法^[4]、气相色谱法及其联用技术

^[5]。分光光度法简单便捷、设备成本低,但其准确度和灵敏度较差,易产生较大偏差;色谱法准确、灵敏,但样品前处理复杂、测定过程耗时长,仅适用于高精度测定。

表面增强拉曼光谱技术(Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS)是一种纳米尺度上的分子光谱指痕鉴定方法^[6]。该技术将待测物分子吸附在粗糙的纳米金属材料表面,可使待测物的拉曼信号增强 $10^6\sim 10^{15}$ 倍,解决了普通拉曼光谱灵敏度低的问题^[7]。SERS技术具有简单、快速、灵敏度高的特点,在农产品中农药残留、食品添加剂、环境污染物等快速检测领域展现出了巨大的优势。Li等^[8]利用SERS技术结合化学计量学方法对水产品中的孔雀石绿和结晶紫进行定量分析,其最低检测浓度分别为1.0 $\mu\text{g/L}$ 和20 $\mu\text{g/L}$ 。Peron等^[9]采用一种合成的金单层溶胶的SERS活性基底,对环境污染物中的多环芳烃进行检测,发现对萘和芘的最低检测浓度可达到0.01 mg/L 。有文献报道,刘等^[10]利用共焦拉曼光谱技术对脐橙表面氧乐果农药残留进行了测定,建立了氧乐果残留模型,但其未去除脐橙基质的影响,要实现农残实时、快速检测还需要进一步的研究。

本研究以赣南脐橙果皮为对象,以商业化的纳米增强颗粒为基底,利用SERS技术对三唑磷的标准溶液和以脐橙果皮提取液为基质的三唑磷溶液进行定性与定量分析,结合偏最小二乘回归(partial least squares regression, PLSR)方法,探讨脐橙果皮表面三唑磷农药的快速检测方法,为实现农产品中农药残留的快速检测提供技术依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高灵敏度激光拉曼光谱仪 RamTracer-200-HS, Opto Trace Technologies, Inc.; Agilent GC 700 型三重四极杆气相色谱串联质谱仪、HP-5MS 30 $\text{m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ 石英毛细管柱,美国安捷伦科技有限公司;低速离心机 JW-1024 型,安徽嘉文仪器装备有限公司;电子天平 FA1004B 型,上海上平仪器有限公司,精度为0.1 mg ;搅拌机 MJ-BL25C3,广东美的精品电器制造有限公司;超声波清洗器 JK-50B 型,合肥金尼克机械有限公司;超纯水机 T10,湖南科尔顿水务有限公司。

三唑磷标准品,99%,Sigma-Aldrich 公司;乙腈,色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;无水硫酸钠,98%,分析纯,西陇化工股份有限公司;氯化钠,99.5%,

分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;石墨化碳,100~400 mesh, Agela Technologies; PSA,北京迪马科技有限公司;C18,粒径:50 μm ,济南博纳生物技术有限公司;纳米增强试剂,OTR202、OTR103,欧普图斯(苏州)光学纳米材料有限公司。脐橙选用赣州大余脐橙基地样本和江西省出入境检验检疫局提供样本。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

(1)标准溶液的配制:准确称取25 mg 三唑磷标准品,放入250 mL 棕色容量瓶中,用适量乙腈溶解,并定容到刻度,得到浓度为100 mg/L 的三唑磷标准储备液。再用乙腈将储备液分别稀释至20、15、12、10、8、5、3、2、1、0.8、0.5、0.3、0.2 和 0.1 mg/L 的标准溶液。密封,避光保存待测。

(2)脐橙果皮溶液的提取:挑选新鲜脐橙,用超纯水冲洗干净,晾干后将果皮剥离,放入搅拌机中粉碎;称取10 mg 碎皮加入装有适量氯化钠和无水硫酸镁的50 mL 离心管中,再加入10 mL 乙腈,涡旋混合均匀后放入离心机,以4200 r/min 的转速离心5 min 。

(3)脐橙果皮提取液的净化:取4 mL 上清液放入装有适量无水硫酸镁、石墨化碳、C18 和 PSA 的15 mL 离心管中,震荡均匀后,再以4200 r/min 的转速离心5 min ,将净化液过0.22 μm 有机滤膜。

(4)配制含果皮提取液的三唑磷溶液:以步骤(3)的净化液为基质,配制浓度分别为20、15、12、10、8、5、3、2、1、0.8、0.6、0.5 和 0.4 mg/L 的含果皮提取液的三唑磷溶液,待测。

1.2.2 气相色谱串联质谱条件

色谱条件:进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;升温程序:初始温度为150 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min ;以25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至280 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min ;升至300 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min 烘干色谱柱后进行下一个样本检测;载气:氦气(纯度 $\geq 99.999\%$);载气流速:2.25 mL/min ;进样量:1 μL ;进样方式:不分流进样。

离子源:EI源;离子源温度:230 $^{\circ}\text{C}$;四极杆温度:150 $^{\circ}\text{C}$;碰撞气:氦气(纯度 $\geq 99.999\%$);采集模式:多反应监测模式(MRM)。

图1是样本检测结果图,其中图1a为浓度0.5 mg/L 的三唑磷标准溶液的色谱图,从图中可知三唑磷化合物保留时间为7.755 min ,图1b为本试验使用脐橙样本果皮基质色谱图,从图中可知试验使用脐橙样本未含三唑磷农药,图1c为江西省出入境检验检疫局提供脐橙样本的色谱图,从图可知脐橙含有三唑磷农

药, 这些样本用于评价本方法的准确度。

1.2.3 表面增强拉曼光谱采集

取 1 个进样瓶, 依次向瓶中加入 500 μL OTR202 试剂、20 μL 待测液、100 μL OTR103 试剂混合后, 测试拉曼信号。激发光源波长为 785 nm, 功率为 200 mW, 光谱扫描范围 400~2000 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} , 积分时间为 10 s, 积分 2 次求平均。

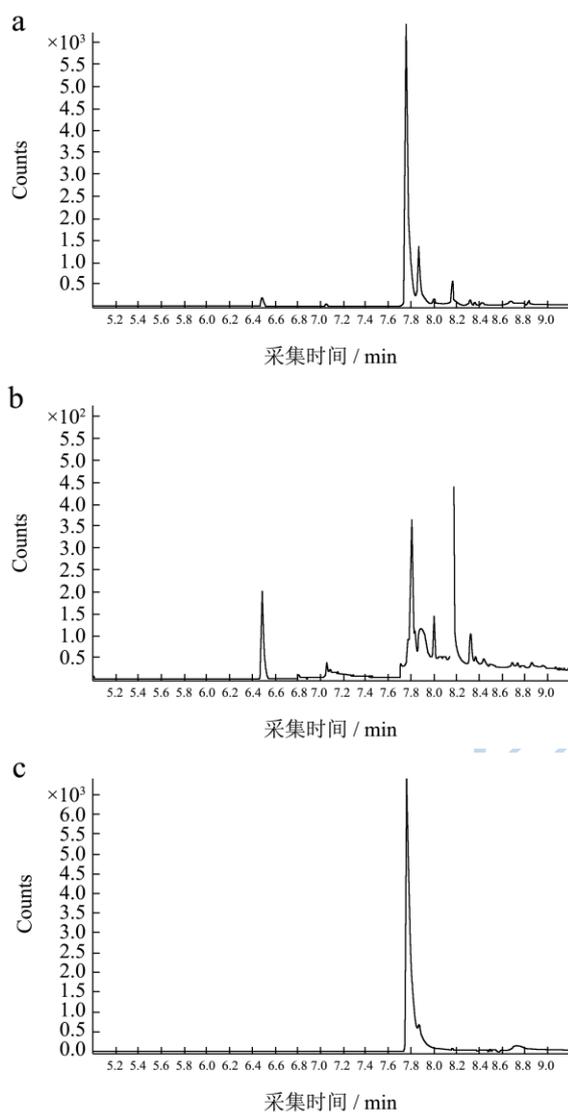


图 1 三唑磷农药(0.5 mg/L)的色谱图(a)、脐橙果皮基质色谱图(b)和含三唑磷农药脐橙果皮样品色谱图(c)

Fig.1 Gas chromatogram: a: Triazophos pesticide (0.5 mg/L), b: matrix of navel orange peel, c: Navel orange peel containing pesticides

对原始光谱数据进行二阶导数分析, 得到三唑磷农药分子的拉曼谱峰, 采用偏最小二乘回归方法建立脐橙果皮中三唑磷农药残留的预测模型。所有数据分析基于 Matlab2010 平台完成。

2 结果与讨论

2.1 三唑磷溶液的普通拉曼和表面增强拉曼光谱对比

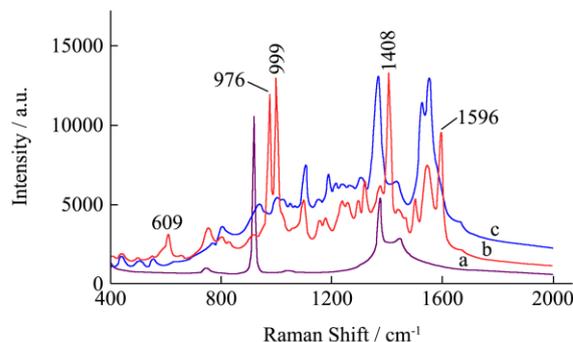


图 2 乙腈的普通拉曼图谱(a)、5mg/L 三唑磷溶液的 SERS 图谱(b)和 5mg/L 三唑磷溶液普通拉曼图谱(c)

Fig.2 Ordinary Raman spectrum of acetonitrile (a), SERS of 5 mg/L triazophos standard solution (b) and ordinary Raman spectrum of 5 mg/L triazophos standard solution (c)

图 2a 是乙腈溶剂的表面增强拉曼谱图, 图 2b 和 c 分别是浓度为 5 mg/L 三唑磷标准溶液的 SERS 谱图和普通拉曼谱图。对比图 2a、b 可看出, 乙腈溶剂的表面增强拉曼光谱存在部分 SERS 峰, 但其出峰的位置与三唑磷的谱峰位置不重合。由此可见, 三唑磷分子的拉曼谱峰不会受到乙腈溶剂背景信号的干扰。对比图 2b、c 可以看出, 三唑磷标准溶液的普通拉曼谱峰中只存少量的峰, 且经过归属发现并不是三唑磷的特征峰; 而其表面增强拉曼谱峰较多且强度较高, 说明纳米增强试剂能明显增强三唑磷分子的拉曼信号。

2.2 三唑磷标准溶液的表面增强拉曼光谱特征及定量分析

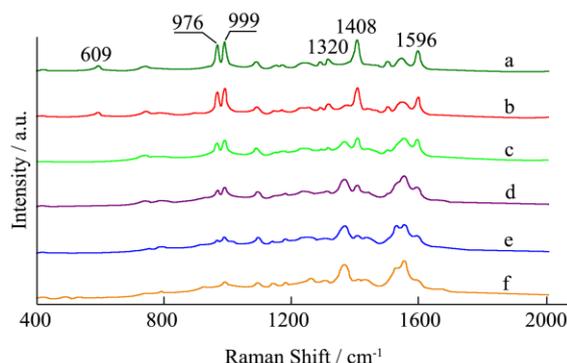


图 3 三唑磷标准溶液的 SERS 图谱

Fig.3 Surface-enhanced Raman spectroscopy SERS of triazophos standard solutions

注: a: 8 mg/L; b: 5 mg/L; c: 3 mg/L; d: 2 mg/L; e:

1 mg/L; f: 0.8 mg/L.

图3为不同浓度的三唑磷标准溶液的表面增强拉曼光谱,由图可知,在609、976、999、1320、1408和1596 cm^{-1} 处有明显的拉曼特征峰。对这6处特征峰进行谱峰归属^[11-12]:609 cm^{-1} 归属于P=S的伸缩振动;976 cm^{-1} 归属于C-N-N振动和苯环的弯曲振动;999 cm^{-1} 主要由苯环的呼吸振动引起;1320 cm^{-1} 归属于三唑环的伸缩振动;1408 cm^{-1} 的峰强最高,主要由C-N伸缩振动引起,并伴有C-H弯曲振动;1596 cm^{-1} 归属于苯环的伸缩振动。有图可看出,随着三唑磷浓度的增加,其特征峰强度逐渐增强,但不同特征谱峰的强度的增加量不同,这可能是由于三唑磷分子官能团在纳米基底的吸附位置、吸附形式,以及基底表面的不均匀性等因素有关^[13]。

2.3 脐橙果皮中三唑磷农药残留检测结果与分析

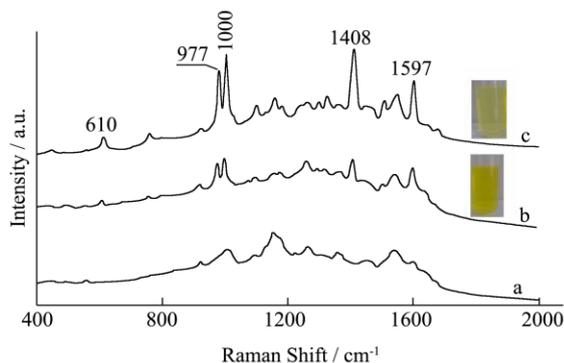


图4 脐橙果皮提取液的 SERS (a), 未净化的以脐橙果皮为基质的三唑磷溶液的 SERS (浓度为 12 mg/L) (b), 净化后的以脐橙果皮为基质的三唑磷溶液 SERS (浓度为 12 mg/L) (c)

Fig.4 Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) of navel orange peel extract (a), SERS of triazophos solution based on un-purified navel orange peel extract (12 mg/L) (b), SERS of triazophos based on purified navel orange peel extract (12 mg/L) (c)

图4是采用石墨化碳、 C_{18} 和PSA对脐橙果皮提取液进行净化前后的对比图,其中图4a为果肉提取液的SERS,图4b和c分别为净化前和净化后的以脐橙果皮提取液为基质三唑磷溶液(浓度为12 mg/L)的SERS。由图4b可以看出,净化前的溶液颜色较深,SERS谱图中三唑磷的特征峰均可以看到,但谱峰强度较低,这是因为脐橙果皮中含有的果胶、胡萝卜素、柠檬酸等物质,这些物质会产生荧光,从而削弱了三唑磷分子的拉曼信号^[14]。图4c是用石墨化碳、 C_{18} 和PSA对脐橙果皮提取液进行净化后的SERS图谱,净

化后溶液的颜色明显变淡,三唑磷的拉曼特征峰明显且强度较高,说明石墨化碳、 C_{18} 和PSA对脐橙果皮提取液达到了较好的净化效果。

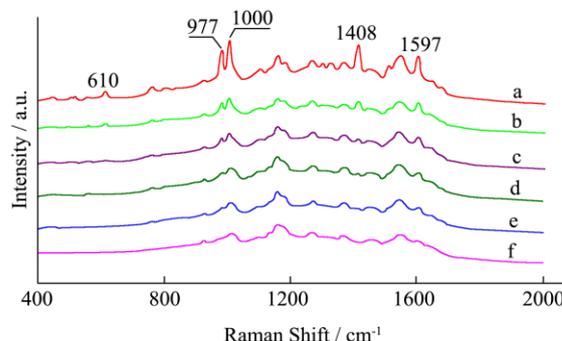


图5 脐橙果皮提取液中三唑磷的 SERS 图谱

Fig.5 Surface-enhanced Raman spectroscopy SERS of triazophos in navel orange peel extracts

注: a.12mg/L; b.8mg/L; c.5mg/L; d.1mg/L; e.0.8mg/L; f.空白; g.0.6mg/L。

图5为空白脐橙果皮提取液和不同浓度以果皮提取液为基质的三唑磷溶液的表面增强拉曼光谱。由图可以看出,随着三唑磷浓度的降低,其拉曼峰的出峰位置基本没有变化,但信号强度明显减弱。在浓度为0.8 mg/L时,610、1000和1597 cm^{-1} 处的特征峰强度很弱,几乎不能辨识,但位于977和1408 cm^{-1} 处的特征谱峰依然可以辨别。当浓度为0.6 mg/L时,其SERS信号与脐橙果皮提取液的SERS信号基本相同,未出现三唑磷分子的特征峰。因此,在该实验条件下,本方法对脐橙果皮中三唑磷的最低检测浓度为0.8 mg/L。国家标准中规定三唑磷在脐橙中的最大残留量为0.2 mg/L,本方法的最低检测浓度未能满足要求。

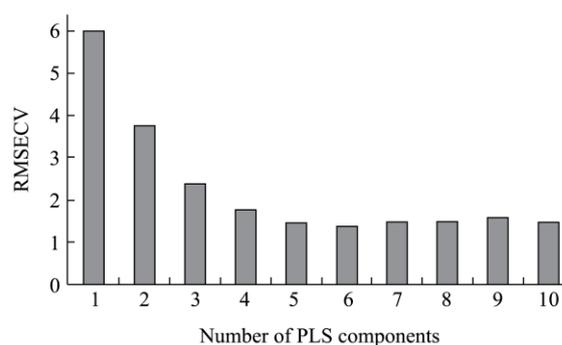


图6 采用不同主成分数建立 PLS 模型的 RMSECV 值

Fig.6 RMSECV of PLS models based on different numbers of components

本实验采用10个浓度梯度,分别为20、15、12、10、8、5、3、2、1和0.8 mg/L,每个浓度采集6个样本,共60组数据,采用偏最小二乘法建立脐橙果皮中三唑磷农药残留的预测模型,对三唑磷进行定量分

析。

图 6 是采用不同主成分数建立 PLS 模型的 RMSECV 值, 由图可见, 选用前 6 个主成分因子数时所建模型的 RMSECV 值最小, 为 1.38 mg/L。因此选择前 6 个主成分数建立模型, 模型对校正集样本的相关系数为 0.975, 交互验证均方根误差值为 1.38 mg/L, 对预测集样本的相关系数为 0.9669, 预测均方根误差为 1.60 mg/L。图 7 为所建模型对校正集和预测集样本的预测值与实际值之间的散点图。

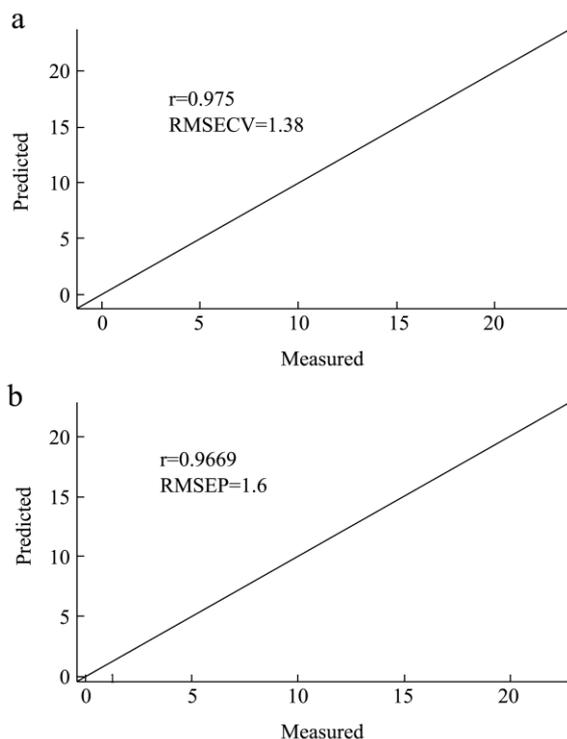


图 7 PLS 模型校正集和预测集的散点图

Fig.7 Scatter plots of PLS model calibration set (a) and prediction set (b)

2.4 方法预测回收率验证

表 1 脐橙果皮中三唑磷农药的预测值与真实值比较

Table 1 Predicted and measured value of triazophos in navel orange peel

样本 (n)	真实值 /(mg/L)	预测值 /(mg/L)	相对误差/%	预测回收率/%
1	2.429	2.292	-5.98	94.36
2	5.430	5.478	0.08	100.88
3	8.119	8.473	4.18	104.36

为了评价本方法的准确度, 利用上述所建模型对江西省出入境检验检疫局提供的含有三唑磷农药脐橙样本进行预测, 并与样本的标准化学方法(气相色谱串联质谱)测定结果进行比较, 结果见表 1。由表可知, 本方法与标准化学方法的检测结果基本一致, 3

个脐橙果皮样本中三唑磷农药的预测值与真实值相对误差的绝对值在 0.08%~5.98%之间, 预测回收率为 94.36%~104.36%, 说明该方法能初步进行脐橙果皮中三唑磷农药残留快速检测。

3 结论

采用表面增强拉曼光谱技术结合化学计量学方法对脐橙果皮中三唑磷农药残留进行快速检测, 找到了三唑磷农药的 6 处拉曼特征谱峰, 该方法对脐橙果皮中三唑磷农药的最低检测浓度为 0.8 mg/L, 建立了脐橙果皮中三唑磷农药残留的 PLS 模型。利用该模型预测 3 个未知浓度的脐橙果皮三唑磷农药残留, 并与化学方法实测值相比较, 其预测值与实测值的相对误差绝对值在 0.08%~5.98%之间, 预测回收率为 94.36%~104.36%, 说明模型具有较高的精度。但本方法的最低检测浓度未达到国家检测限要求, 这与脐橙果皮提取液中杂质的干扰和纳米基底的增强效果有关。今后进一步研究填料的配比以及适合于三唑磷农药分子的纳米增强基底以提高方法的检测限, 通过增加样本数量, 以提高模型的预测能力。

参考文献

- [1] 朱永和,王振荣,李布青.农药大典[M].北京:中国三峡出版社,2006:67-69
- [2] HE Yue-ping, GAO Cong-feng, CAO Ming-zhang, et al. Survey of susceptibilities to monosultap, triazophos, fipronil, and abamectin in chilo suppressalis [J]. Journal of Economic Entomology, 2007, 100(6): 1854-1861
- [3] 王棚.分光光度法检测蔬菜中有机磷农药残留的研究[J].现代农业科技,2010,11:168-169
WANG Peng. Study on Determination of organophosphorus pesticide in vegetables by spectrophotometry [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2010, 11: 168-169
- [4] WEI Lin-hong, WANG Lian, LIU Shu-zhao. Analysis of triazophos residue in rice by immunoaffinity chromatography-high performance liquid chromatography [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(5): 941-946
- [5] 钟志,刘琴,顾蓓乔,等.气相色谱法测定水产品中三唑磷农药残留量[J].浙江海洋学院学报(自然科学版),2006,25(2): 196-199
ZHONG Zhi, LIU Qin, GU Bei-qiao, et al. GC determine the triazophos pesticides residual in aquatic product [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2006, 25(2): 196-199
- [6] Liu Xiumin, Fang Pingping, Wu Yuanfei, et al. Theoretical

- study of conformations and raman spectra of p-aminothiophenol [J]. *The Journal of Light Scattering*, 2007, 19(4): 304-310
- [7] William E, Doering, Shuming Nie. Single-molecule and single-nanoparticles sers: examining the roles of surface active sites and chemical enhancement [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106(2): 311-317
- [8] Li Chunying, Lai Keqiang, Zhang Yuanyuan et al. Use of surface-enhanced raman spectroscopy for the test of residuals of prohibited and restricted drugs in fish muscle [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2013, 71(2): 86-91
- [9] Peron O, Rinnert E, Lehaitre M, et al. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon (pah) compounds in artificial sea-water using surface-enhanced raman scattering (SERS) [J]. *Talanta*, 2009, 79(2): 199-204
- [10] 刘燕德,叶冰.基于拉曼光谱技术的氧乐果含量定量分析[J]. *中国农机化学报*, 2014, 35(1): 88-91, 102
LIU Yan-de, YE Bing. Quantitative analysis of omethoate solution content based on raman spectrometer [J]. *J. Chin. Agri. Mech.*, 2014, 35(1): 88-102
- [11] Unal A, Eren B. FT-IR, dispersive Raman, NMR, DFT and antimicrobial activity studies on 2-(thiophen-2-yl) -1h-benzo[d]imidazole [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, 114: 129-136
- [12] 朱自莹,顾仁敖,陆天虹.拉曼光谱在化学中的应用[M].沈阳: 东北大学出版社, 1998
ZHU Zi-ying, GU Ren-ao, LU Tian-hong. Shenyang: Northeastern University Press, 1998
- [13] 翟福丽,黄轶群,王锡昌,等.应用表面增强拉曼光谱技术快速检测尿样中的 β -兴奋剂[J]. *分析化学*, 2012, 40(5): 718-723
ZHAI Fu-li, HUANG Zhi-qun, WANG Xi-chang, et al. Surface enhanced raman spectroscopy for rapid detection of β -agonist in swine urine. *Chin J. J. Anal. Chem.*, 2012, 40(5): 718-723
- [14] HUANG Shu-shi, LAI Jun-zhuo, LIANG Yu-fen, et al. Investigation of biochemical diversity of two species of trichomonads based on raman tweezers combined with multistatistical analysis [J]. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2011, 39(4): 521-527