

# 浙江省科技计划项目 验收申请书

计划编号：2008F70062

项目名称：分散液液微萃取与液质联用在固体基质农残分析  
中的应用

计划类别：分析测试科技计划项目

起止年月：2008/1-2009/12

申请单位：温州医学院（盖章）

申请验收形式：材料验收

申请验收时间：2010/6/29

申请验收地点：

联系人及电话：王慧利/15057769199

浙江省科学技术厅

二〇〇六年制

一、项目简介（包括项目研究开发的主要内容，与国内外同类技术的比较等）：

本项目是从理论、方法和应用等方面对分散液液微萃取（DLLME）这一新型绿色环保分析技术进行系统、深入的研究，对相关过程的规律进行深入的探讨，并将其与液相色谱-质谱仪器联用，用于测定固体基质中（以土壤、蔬菜和食品等为研究对象）痕量 / 超痕量的农药残留，克服该技术仅限应用于水样的缺点，扩大了其应用范围，建立一种简便、灵敏、准确、无污染的痕量 / 超痕量农药残留分析新技术，大大提高农药残留分析的检测水平。

该技术与国内外同类技术相比主要的优点如下：（1）所使用的萃取剂用量特别少（仅微升级），是一种绿色环保的分析前处理技术；（2）克服了 DLLME 技术仅能应用于水样的限制，通过技术的改进可以应用于土壤、食品等固体样品的分析前处理，扩大了其应用范围。（3）成功地将该技术和固相萃取技术联用在一起，获得了高达近万倍的富集倍数，大大降低了农残的检出限。

二、项目合同规定的主要内容、技术经济指标及完成情况：

### 1、合同规定的主要研究内容

- （1）固体基质（包括土壤、蔬菜和各种食品等）提取试剂和提取方法的选择。
- （2）DLLME 实验的设计及和固体基质提取试剂的结合：要求固体基质的提取溶剂能够在 DLLME 中作为分散剂或水相使用，所设计的 DLLME 实验具有操作简便、萃取效率高、易于与各种检测技术联用等特点。
- （3）影响 DLLME 的因素：对影响 DLLME 的各种因素进行深入、系统的研究，优化液相微萃取条件，探索其规律性。这些因素包括：萃取方法，萃取溶剂的类型、体积，萃取时间，盐效应等。
- （4）HPLC/MS/MS 分析条件的选择：包括接口类型、正负离子模式、流动相和流量、温度等。
- （5）分析方法的建立及分析性能评价：将 DLLME 技术与 HPLC/MS/MS 联用，建立一种痕量 / 超痕量农药残留分析的新方法，并对其分析性能(包括检出

限、精密度、准确度、富集倍数和分析速度等)进行综合评价。

(6) 分析应用：在上述研究工作的基础上，将建立的新技术应用于实际样品中痕量 / 超痕量农药残留的测定。

## 2、项目主要技术、经济指标

(1) 每次用于提取的固体样品取样量小于 1g;

(2) DLLME 萃取剂的用量小于 50  $\mu\text{L}$ ;

(3) DLLME 的富集倍数大于 500;

(4) 提取回收率大于 85%;

(5) 所建立的分析方法对固体基质样品的农药残留量最低检知浓度达  $\text{pg/mL}$ - $\text{fg/mL}$  级

## 3、项目完成情况

项目组成员严格按照浙江省科技计划项目合同书的规定要求，圆满地完成了项目规定的各项预期目标，以有机磷（三唑磷）和氨基甲酸酯类（西维因）农药及环境中新型污染物多溴联苯醚为研究对象，成功的将分散液液微萃取(DLLME)技术应用于固体基质(土壤、蔬菜等)中农药残留物的萃取，克服了 DLLME 技术过去仅能应用于水样的限制，扩大了该技术的使用范围。具体内容如下：

### (1) 固体基质（包括土壤、蔬菜和各种食品等）提取试剂和提取方法的选择。

基于提取剂的选择要求，我们选取乙腈、丙酮和甲醇为提取剂进行筛选，结果显示甲醇的萃取效果要好于其它两种，故甲醇作为提取剂，

土样的萃取过程：准确称取1.0g土壤于50mL锥形瓶中，然后加入10mL甲醇；将锥形瓶放在恒温摇床上于250rpm下剧烈震荡30分钟进行萃取；将萃取后的土壤上清液（甲醇萃取液）过0.45 $\mu\text{m}$ 膜并转至试管中，取1.0mL甲醇萃取液进行DLLME萃取。

(2) **DLLME实验的设计及和固体基质提取试剂的结合**：要求固体基质的提取溶剂能够在**DLLME**中作为分散剂或水相使用，所设计的**DLLME**实验具有操作简便、萃取效率高、易于与各种检测技术联用等特点。

选取乙腈、丙酮和甲醇作为萃取剂进行试验，并考察了其对目标物回收率的影

响。实验结果见下表1，与乙腈和丙酮的萃取液相比，甲醇萃取液的杂质峰更少，对目标峰的干扰小。因此，我们选取甲醇作为土壤的萃取剂及DLLME中的分散剂。

表1 不同萃取剂对土样中西维因和三唑磷萃取回收率的比较

目标物	回 收 率 (%)		
	甲醇	乙腈	丙酮
	mean ± SD ( <i>n</i> =3)	mean ± SD ( <i>n</i> =3)	mean ± SD ( <i>n</i> =3)
西维因	99.1 ± 2.1	94.7 ± 2.7	91.2 ± 1.0
三唑磷	108.0 ± 1.2	96.9 ± 2.3	109.0 ± 2.3

(3) 影响 DLLME 的因素：对影响 DLLME 的各种因素进行深入、系统的研究，优化液相微萃取条件，探索其规律性。这些因素包括：萃取方法，萃取溶剂的类型、体积，萃取时间，盐效应等。

①DLLME 方法中萃取剂的选择（选择  $C_2H_2Cl_4$ ）

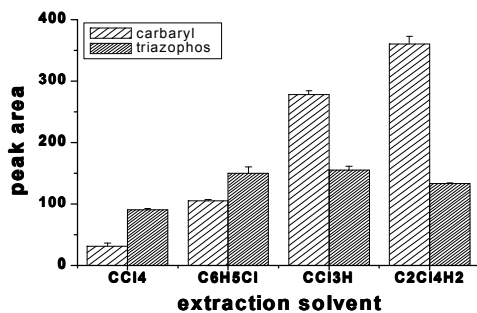


图1 DLLME中不同萃取剂对萃取效率的影响

②DLLME方法中萃取剂用量的选择（选择 $50\mu L$ ）

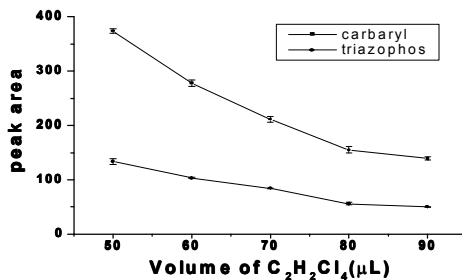


图2 萃取剂用量与萃取效率的关系

③DLLME 方法中分散剂用量的选择（选择1.0mL甲醇）

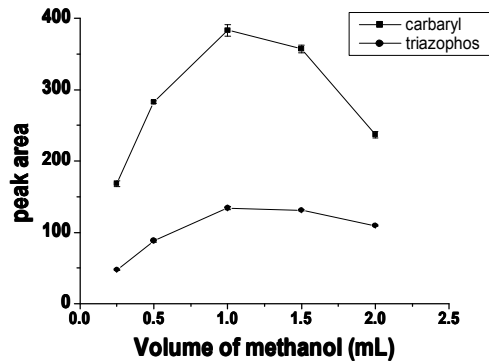


图3 分散剂用量对萃取效率的影响

④DLLME 方法中离子强度的影响（选择不加盐）

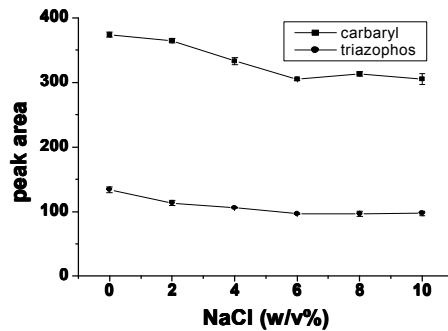


图4 离子强度对萃取效率的影响

⑤DLLME 方法中萃取时间的影响

在其他条件相同的情况下，本实验考察了 0-60 分钟内各目标化合物峰面积的变化。结果表明，峰面积随萃取时间的变化并不明显。该萃取能够迅速达到平衡状态，因此萃取时间短。

(4) **HPLC/MS/MS** 分析条件的选择：包括接口类型、正负离子模式、流动相和流量、温度等。

优化后条件：(1) 色谱柱型号为 YWG-C18，长、内径和粒径大小分别为 2.1mm、250 mm、10  $\mu\text{m}$  的色谱柱材料能实现上述农药的完全分离和较好的色谱性能；优化

后的流动相比比例为：甲醇：水=70：30；流速：0.2 ml/min。所用四极杆检测器的优化参数如下：离子模式：正离子模式；干燥气温度：350℃；毛细管电压：4000V；雾化气温度：350℃；干燥气流速：13L/min。

在上述优化条件下，可实现所分析农药的较低检出限、较宽的线形范围和较小的介质干扰。

**(5) 分析方法的建立及分析性能评价：**将 **DLLME** 技术与 **HPLC/MS/MS** 联用，建立一种痕量 / 超痕量农药残留分析的新方法，并对其分析性能(包括检出限、精密度、准确度、富集倍数和分析速度等)进行综合评价。

在上述优化的实验条件下，用于评价该方法的一些特征参数包括线性范围、检出限、重现性的实验结果列于表 2。

表 2 西维因与三唑磷分析方法的性能参数

目标分析物	相对标准偏差 RSDs(%) $n = 6$	线性范围 LR( $\text{ng g}^{-1}$ )	相关系数 $R^2$	检出限 LOD( $\text{pg g}^{-1}$ )
西维因	4.2	0.1-1000	0.9997	0.014
三唑磷	2.0	1-5000	0.9999	0.11

**(6) 分析应用：**在上述研究工作的基础上，将建立的新技术应用于实际样品中痕量 / 超痕量农药残留的测定。

为了评价该方法对实际样品的应用性和精确性，本实验用该方法分析了三种土样 A1, A2 和 A3。它们分别采自于鳌江附近的三块田地。对所采集土壤的检测结果表明：三种土样中均含有西维因和三唑磷。加标回收率在 80.8-111.1%之间。

另赵新娜硕士等成功地将 DLLME 技术应用于环境水样、果汁和蔬菜样品中多环芳烃类化合物 (PAHs) 的痕量残留分析，获得了满意的实验结果，见表 3。

刘秀娟博士等将常规的固相萃取 (SPE) 技术与 DLLME 技术联用，不仅克服了以往 DLLME 技术仅能应用于水样前处理的缺陷，将该技术扩展到土壤、食品等固体样品的前处理上，且获得了高达近万倍的高富集倍数 (6838-9405)，如下表 4。该成果发表在 Journal of Chromatography A。

表3 DLLME-LC测定PAHs的定量结果

多环芳烃	相对标准	富集	线性范围	相关	检出限
AnT	2.3	296	0.01-100	0.9998	0.001
FluA	1.0	349	0.02-200	0.9998	0.003
Pyr	1.7	433	0.01-500	0.9995	0.006
BaA	6.8	400	0.01-100	0.9998	0.001
Chr	6.0	448	0.01-10	0.9996	0.002
BbF	6.1	332	0.02-200	0.9998	0.01
BkF	4.6	411	0.01-10	0.9996	0.002
Bap	11.5	462	0.01-10	0.9996	0.002

表4 SPE-DLLME 萃取样品中的 PBDEs 的性能评价

Table 3  
Quantitative results of SPE-DLLME and GC-ECD of PBDEs from samples

Compounds	RSD <sup>a</sup> (%) n=5	RSD <sup>b</sup> (%) n=5	EF <sup>a</sup>	LR <sup>a</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	r <sup>2a</sup>	LOD <sup>a</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	LOD <sup>b</sup> (µg kg <sup>-1</sup> )
PBDE 28	4.2	9.9	8047	0.1-100	0.9980	0.03	0.05
PBDE 47	4.3	5.9	7936	0.1-100	0.9978	0.06	0.04
PBDE 100	6.2	7.8	7462	0.5-500	0.9994	0.09	0.08
PBDE 99	7.9	9.1	8015	0.5-500	0.9997	0.12	0.16
PBDE 85	6.8	8.6	9405	0.5-500	0.9992	0.15	0.11
PBDE 154	5.6	11.3	6838	0.5-500	0.9997	0.12	0.08
PBDE 153	5.4	6.0	7164	0.5-500	0.9995	0.13	0.16

a: Water sample

b: Plant sample

#### 4、技术、经济指标完成情况

- (1) 用于提取的固体样品取样量：付凌燕等在提取土壤中的农药残留过程中，优化得土壤的最佳取样量 1 g，刘等优化鱼样/植物样的最优提取量为 1g；
- (2) DLLME 萃取剂的用量：优化得萃取三唑磷和西维因最佳量为 50 µ L；
- 为了评价萃取剂体积对萃取效率的影响，选取 1.0 mL 甲醇含有不同体积的四氯乙烷（50.0，60.0，70.0，80.0，90.0 µL）进行实验。当萃取剂 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> 的体积从 50.0 µL 增加到 90.0 µL 时，沉积相的体积从 25.0 µL 增加到 67.7 µL，与此同时，目标物的相应信号却急剧下降（如图 1-3）。基于这些分析，为了取得较高的萃取效率和较低的检测限，选取 50.0 µL C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> 作为萃取剂的体积。

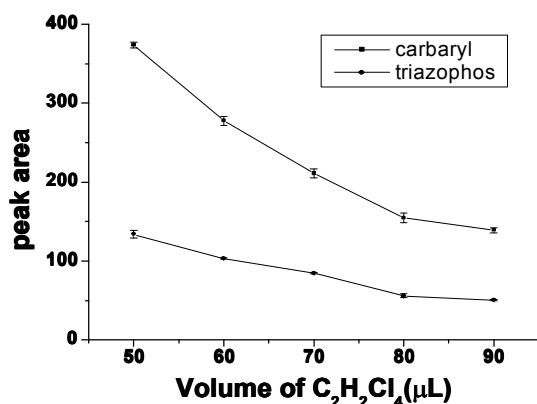


图 1-3 萃取剂用量与萃取效率的关系图

(3) DLLME 的富集倍数：赵新娜等萃取处理多环芳烃类物质富集倍数高达 462，而刘秀娟等将固相萃取与分散液液微萃取联用处理植物样品富集倍数则高达 6838-9405；

多环芳	相对标准	富集	线性范	相关	检出限
AnT	2.3	296	0.01-100	0.9998	0.001
FluA	1.0	349	0.02-200	0.9998	0.003
Pyr	1.7	433	0.01-500	0.9995	0.006
BaA	6.8	400	0.01-100	0.9998	0.001
Chr	6.0	448	0.01-10	0.9996	0.002
BbF	6.1	332	0.02-200	0.9998	0.01
BkF	4.6	411	0.01-10	0.9996	0.002
Bap	11.5	462	0.01-10	0.9996	0.002

(4) 提取回收率在 80.8-111.1%之间；

(5) 所建立的分析方法对固体基质样品的农药残留最低检知浓度西维因达 14pg/g，三唑磷为 110pg/g 级。

综上，项目组圆满完成了合同规定的内容，发表 SCI 论文 3 篇，培养研究生 3 名，09 年开展学术交流 2 次。具体证明材料可见发表 SCI 文章附件。

### 三、关键技术及创新点、获自主知识产权情况、成果应用和产业化情况

#### 1、关键技术创新点

将 DLLME 前处理技术应用于土壤、蔬菜和食品等固体基质中有机磷、氨基甲酸酯和磺酰脲类等农药的残留量分析，克服了过去该技术仅用于水样中有机污染物残留分析的限制，扩大了其使用范围；将该前处理技术与 HPLC-MS-MS 联用能大大提高痕量或超痕量农药残留的检出灵敏度；DLLME 前处理技术是对传统的液-液萃取技术的一次重大革新，必将推动萃取技术的新发展和新应用，如能用该技术取代常规的液-液萃取技术，将大大减少有机溶剂的消耗和对环境的污染，产生巨大的社会和经济效益。

#### 2、获自主知识产权情况

有关该技术目前正在申请国家专利一项。

#### 3、成果应用

项目建立的无污染的痕量、超痕量农药残留分析的新方法，对于农药残留分析技术的发展有着重要的学术意义，该技术同时可以拓展到其他复杂固体基质的污染物规模检测，为环保、环境监测站等相关部门提供一定的、及时的数据参考，以便更好的作出决策。

### 四、项目资金使用情况：

该项目的研究共投入研发经费 5.1 万元，其中省科技厅拨款 3.0 万元，学校配套经费 2.1 万元，经费使用情况如下：

- (1) 学校管理费用：1500 元
- (2) 材料与测试化验加工费：43069.8 元

上述费用见附件该项目经费本报销清单。

有关该项目经费使用：基本按照合同书所规定的项目经费支出预算进行。

五、提供验收的技术资料目录（按《浙江省科技计划项目验收管理暂行办法》规定提供验收资料，已通过鉴定（评审）的，需提供鉴定（评审）证书）：

所提供的验收资料包括：

- （1）浙江省科技计划项目验收申请书；
- （2）浙江省科技计划项目验收证书；
- （3）浙江省分析测试科技计划研究项目实施总结报告编写提纲；
- （4）附件：（A）所发表 3 篇 SCI 论文复印件；  
                  （B）浙江省科技计划项目合同书；  
                  （C）有关该项目经费的财务支出证明

六、归口管理部门审核情况（在对应栏中打√）：

申请内容		县(市、区)科技 行 政 部 门	省级厅局或市 科技行政部门	省科技厅主 管 业 务 处
一. 验收资料准备情况				
符合验收要求		√		
不符合验收要求(注明补充材料)				
二. 研发内容和指标完成情况				
完成(80%以上)		√		
基本完成(60-80%)				
未完成(60%以下)				
三. 经费收支情况				
省财政拨款经费	到位	√		
	基本到位			
	未到位			
市县、部门配套经费	到位	√		
	基本到位			
	未到位			
自筹经费	到位			
	基本到位			
	未到位			
经费使用对照合同预算要求	基本符合	√		
	不符合			
	有违规现象			

注：按合同规定应到位的经费，“到位”是指90%以上经费到位，“基本到位”是指50-90%的经费到位，“未到位”是指50%以上的经费未到位。经费使用对照合同预算要求，“基本符合”是指实际使用与单项预算误差在20%以内，“不符合”是指实际使用与单项预算误差超过20%，“有违规现象”是指经费支出不符合科技经费使用范围。

七. 归口管理部门审核意见:

(签名)

年 月 日 (盖章)

八、省科技厅业务处意见:

(签名)

年 月 日 (盖章)

九、省科技厅综合计划处意见:

(签名)

年 月 日 (盖章)

# 承 诺 书

本单位（或个人）承诺：

- 1、本申请书中所填写的各栏目内容真实、准确。
- 2、提供验收的技术文件和资料真实、可靠，技术（或理论）成果事实存在。
- 3、提供验收的实物（样品）与所提供鉴定的技术文件和资料一致，并事实存在。
- 4、本项目的知识产权或商业秘密明晰完整，未剽窃他人成果、未侵犯他人的知识产权或商业秘密。

若发生与上述承诺相违背的事实，由本单位（或个人）承担全部法律责任。

完成单位（盖章）温州医学院

（或个人）签字：

2010年6月

