

• 研究论文 •

基质固相分散-高效液相色谱法测定玉米中 7种苯氧羧酸类除草剂的残留

洪海燕¹, 殷培军², 魏艳¹, 郝双红^{*1}

(1 青岛农业大学 化学与药学院 山东省农业仿生应用工程技术研究中心, 山东 青岛 266109)

(2 黄岛出入境检验检疫局, 山东 青岛 266555)

摘要: 采用基质固相分散-高效液相色谱法(MSPD-HPLC)测定了7种苯氧羧酸类除草剂在玉米中的残留。玉米样品与基质固相分散介质C₁₈化学键合硅胶(ODS)一起研匀得到基质固相分散体系, 将其填入事前装有弗罗里硅土的净化柱中, 以环己烷洗去油脂等杂质, 再用乙酸乙酯洗脱得到分析液; 在反相高效液相色谱(RP-HPLC)柱上, 分析液经ODS柱以甲醇-水(体积比65:35)为流动相洗脱, 用紫外检测器检测, 以外标法定量。在0.1和1.0 mg/kg添加水平下, 7种苯氧羧酸类除草剂在玉米中的添加回收率为80%~110%, 相对标准偏差RSD为3.6%~10.3%, 检出限在7.9~12.6 µg/kg之间。

关键词: 基质固相分散; 高效液相色谱; 苯氧羧酸类除草剂; 玉米; 残留分析

DOI 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.03.19

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2010)03-0344-05

Residual analysis of 7 phenoxyacid herbicides in corn by MSPD-HPLC

HONG Hai-yan¹, YIN Pei-jun², WEI Yan¹, HAO Shuang-hong^{*1}(1 College of Chemistry and Pharmaceutical Research Center of Agro-bionic Engineering
and Technology of Shandong Province, QAU, Qingdao 266109 Shandong Province, China;

2 Huangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266555, Shandong Province, China)

Abstract A rapid method based on matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction with octadecyl silane (ODS) and co-column purification with florisil was developed for the determination of 7 phenoxyacid herbicides in corn using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detector, quantified with external standard calibration method. The column was eluted with cyclohexane to remove the impurities, and then eluted with ethyl acetate to get the analytes which were analyzed by HPLC. The chromatographic separation was performed on an ODS column using mobile phases based on mixtures of methanol water (35:65 V/V). At the fortified levels of 0.1 and 1.0 mg/kg, the average recoveries ranged from 80% to 110%, with relative standard deviations between 3.6% and 10.3%. Limits of detection for corn ranged from 7.9 to 12.6 µg/kg.

Key words matrix solid phase dispersion; high performance liquid chromatography; phenoxyacid herbicides; corn; residual analysis

收稿日期: 2010-02-04 修回日期: 2010-06-14

作者简介: 洪海燕(1985-), 女, 山东临沂, 在读硕士研究生, E-mail honghaiyan08@126.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 郝双红(1974-), 男, 陕西三原, 博士, 副教授, 主要从事农药化学相关教学及研发工作, E-mail doubledred74@sina.com

基金项目: 山东出入境检验检疫局科技项目 (SK200706).

苯氧羧酸类除草剂是第一类投入商业生产的选择性除草剂, 对植物有强烈的生理活性, 至今仍占有巨大市场^[1-2]。该类除草剂易溶于地表水中, 导致周围环境被污染进而危害人类安全。有研究表明: 2, 4-D 类除草剂具有潜在致突变性, 对内分泌系统有干扰^[3], 可损伤动物的肝脏和脑组织^[4]; 2 甲 4 氯类除草剂在土壤中持留时间较长, 对地下水存在潜在污染^[5], 可对人类造成危害^[6-7]; 2, 4, 5-T 在合成中由于会产生致癌性杂质二噁英已被禁用, 许多国家规定食品中不得检出^[8]。目前各国都在努力开发可靠的苯氧羧酸类除草剂残留的检测方法, 并制订了主要使用对象中的最大允许残留限量 (MRL 值)^[9]。

国外对玉米中该类除草剂的残留限量已制订了很多标准^[10], 而我国目前相关标准尚属空白。玉米中有关苯氧羧酸类除草剂残留的研究在国内外亦未见报道。有关该类化合物的残留分析方法, 通常可以采用气相色谱法 (GC) 或者气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 检测技术, 但采用这两种方法测定的样品需进行衍生化, 操作繁杂^[11]; 也可以采用高效液相色谱法 (HPLC) 或高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS)^[12], 但由于提取纯化多为常规方法, 故易造成被测残留物的流失^[13]; 也有报道可以采用酶联免疫分析技术^[14], 如对 2 甲 4 氯的检测, 但其抗体制备较困难。基质固相分散 (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD) 是 Barker 等^[15]在固相萃取的基础上提出的样品前处理方法。该方法集提取、过滤、净化于一步完成, 操作简单, 准确度和精密度较高。国内外已将其应用于食品中药物和有害物质的残留分析^[16-19]。本研究建立了一种先利用 MSPD 进行样品前处理, 再采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 检测玉米中 7 种苯氧羧酸类除草剂残留的分析方法, 方法准确度、精密度等均较理想。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-10AT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 配有紫外检测器 (SPD-10AT) 和 N2000 工作站; SK 1200H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); ZK-82B 型电热真空干燥器 (上海实验仪器厂有限公司); FW-100 型高速万能粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司); DELTA 320 精密酸度计 (梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D, 98.0%), 2-甲基-

4-氯苯氧乙酸 (MCPA, 98.0%), 2, 4-二氯苯氧丙酸 (2, 4-DP, 98.0%), 2-甲基-4-氯苯氧丙酸 (mecoprop, 99.0%), 2, 4-二氯苯氧丁酸 (2, 4-DB, 99.0%), 2-甲基-4-氯苯氧丁酸 (MCPB, 99.5%), 2, 4, 5-三氯苯氧乙酸 (2, 4, 5-T, 98.5%) 均购于德国 Dr. 公司; 甲醇为色谱纯, 乙酸乙酯、二氯甲烷为分析纯, 使用前重蒸; 水为超纯水; C₁₈ 化学键合硅胶 (Waters 公司, 40~55 μm), 使用前依次用正己烷、二氯甲烷和甲醇洗涤, 真空干燥, 贮于磨口玻璃干燥器内备用; 弗罗里硅土, 650 °C 灼烧 4 h, 冷却后加入质量分数为 5% 的水减活, 贮于磨口玻璃干燥器内备用; 无水硫酸钠, 620 °C 灼烧 4 h, 用前 140 °C 烘干 2 h, 趁热加 5% 水减活, 贮于磨口玻璃干燥器内备用。

1.2 苯氧羧酸类除草剂标准溶液的制备

分别准确称取 2, 4-D、MCPA、2, 4-DB、2-甲基-4-氯苯氧丙酸、MCPB、2, 4-DB 和 2, 4, 5-T 标准品各 0.01 g, 置于 7 个 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 得到质量浓度为 100 mg/L 的各样标准储备液, 将储备液逐级稀释至 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 和 0.10 mg/L 制得各种标准品工作液, 于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.3 样品前处理方法

取干玉米样品约 500 g 用万能粉碎机粉碎, 过 40 目 (孔径 0.425 mm) 筛后混合均匀, 密封于广口瓶中于 4 °C 冰箱中保存备用。准确称取 0.125 g (精确至 0.001 g) 粉碎的玉米样品于玻璃研钵中, 加入 0.5 g C₁₈ 化学键合硅胶, 研磨均匀得分散体系。在玻璃注射器中加入适量玻璃棉挡住出口, 依次装填 0.5 g 无水硫酸钠、0.5 g 弗罗里硅土、0.625 g C₁₈ 键合硅胶与玉米的均匀混合物和 0.5 g 无水硫酸钠, 不断敲打, 用真空泵抽实, 加盖滤纸。先用 10 mL 环己烷分 3 次洗涤研钵和研锤, 用洗涤液 (环己烷) 淋洗, 控制淋洗速度约 1 mL/min, 弃去洗脱液; 再用 15 mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液, 室温下用干净的空气流吹干, 用甲醇定容至 0.25 mL, 过 0.45 μm 滤膜后得分析液, 进行高效液相色谱分析。

1.4 色谱条件

Waters ODS 色谱柱 (250 mm × 3.9 mm (i.d.), 5.0 μm); 柱温 30 °C; 流动相为甲醇-水 (体积比 65:35, 磷酸调 pH 值为 4.8), 流速 0.5 mL/min; 检测波长 230 nm; 进样量 20 μL。在此色谱条件下, 2, 4-D、MCPA、2, 4, 5-T、2, 4-DB、mecoprop、MCPB 和 2, 4-DB 的保留时间分别为 11.3, 13.6, 15.1, 16.8, 20.4, 41.2 和 42.8 min。经过上述前处理后

的空白玉米样品和添加 0.1 mg/kg 该类除草剂标准品的玉米样品的液相色谱图分别为图 1 和图 2。

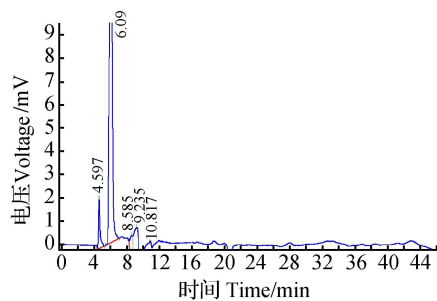


图 1 空白玉米样品液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of the control sample

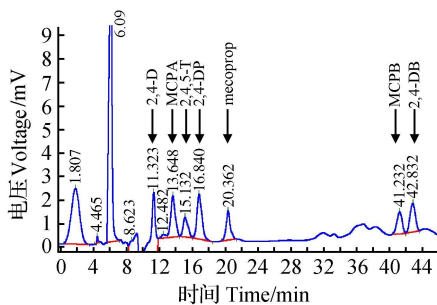


图 2 玉米样品添加 0.1 mg/kg 7 种除草剂液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of corn fortified with 0.1 mg/kg of herbicides

1.5 回收率和检出限的测定

称取玉米样品 0.125 g(精确至 0.001 g), 添加适量各标准储备液, 使样品中 7 种除草剂的质量分数均分别为 1.0 和 0.1 mg/kg。每个处理重复 5 次, 按样品前处理方法处理后进行液相色谱分析, 测得各组分峰面积, 根据工作方程计算出分析液质量浓度 (mg/L), 求出回收率及相对标准偏差; 分别以信噪比的 3 倍和 10 倍确定方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

1.6 固相分散基质及其用量的研究

实验比较了 C₁₈键合硅胶和弗罗里硅土两种固相分散剂对回收率和净化效果的影响, 最终确定以 C₁₈键合硅胶为分散剂, 以弗罗里硅土为净化固定相。固定弗罗里硅土的质量为 0.5 g 以及 C₁₈键合硅胶和玉米样品的质量比为 4:1 不变, 选择 C₁₈键合硅胶和弗罗里硅土的质量比分别为 1:2, 2:3, 1:1 和 2:1, 考察其对回收率及净化效果的影响, 最终确定 C₁₈键合硅胶和弗罗里硅土的质量比。固定 C₁₈键合硅胶的质量为 0.5 g, C₁₈键合硅胶和弗罗里硅土的质量比为 1:1, 选择 C₁₈键合硅胶与玉米样品的质量比分别为 6:1, 4:1 和 2:1, 考察其对回收率的影响, 以确定 C₁₈键合硅胶与玉米样品的质量比。

1.7 洗脱剂及其用量的研究

按上述前处理方法装好基质柱, 用 10 mL 环己烷洗去油脂等杂质, 考察甲醇、乙酸乙酯和二氯甲烷 3 种不同极性洗脱剂及其用量对苯氧羧酸类除草剂洗脱效果的影响, 确定合适的洗脱剂及其用量。

2 结果与讨论

2.1 紫外检测波长的选择

据文献报道^[20], 苯氧羧酸类除草剂在波长 220 和 230 nm 下有两个吸收峰, 其中后者的吸收强度大于前者。在本研究选定的色谱条件下, 分别在波长 220 和 230 nm 下进行检测。结果表明, 在 230 nm 下检测的峰型尖锐对称, 较 220 nm 下的效果好, 故选 230 nm 为检测波长。

2.2 标准曲线

在上述色谱条件下, 分别测定各工作液的色谱图, 以工作液质量浓度为横坐标 x (mg/L), 对应各组分色谱峰面积为纵坐标 y (μV · s), 绘制标准曲线, 得到 7 种除草剂的线性回归方程及其相关系数 R², 结果见表 1。可以看出 7 种除草剂在质量浓度 0.008~10 mg/L 范围内具有良好的线性关系。

表 1 7 种苯氧羧酸类除草剂的线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of 7 phenoxyacid herbicides

除草剂 Herbicides	线性回归方程 Linear regression equations	相关系数 R ² Correlative coefficients
2,4-D	y = 8.335x + 510.31	0.994 6
MCPA	y = 300.642x + 2051.2	0.999 9
2,4-DP	y = 901.1x - 1.921 5	0.998 8
2-甲基-4-氯-苯氧乙酸 mecoprop	y = 255.502x - 2.368. 5	0.999 6
MCPB	y = 304.886x + 4.888. 6	0.998 6
2,4-DB	y = 8.442. 7x + 334. 35	0.995 1
2,4,5-T	y = 237.831x + 7.971. 5	1.000 0

2 3 固相分散基质及其用量的选择

C_{18} 键合硅胶和弗罗里硅土两种固相分散剂对回收率和净化效果的影响实验结果表明: 使用 C_{18} 键合硅胶时回收率较高(达 80% 以上), 但对样品中色素等杂质的吸附效果较差; 弗罗里硅土对样品中色素等杂质的净化效果较好, 但研磨后粒径减小, 吸附能力增强, 回收率仅约 35%。故确定以 C_{18} 键合硅胶为分散剂, 以弗罗里硅土为净化固定相。

C_{18} 键合硅胶和弗罗里硅土的质量比对回收率及净化效果的影响实验结果见图 3。结果表明, 随着 C_{18} 键合硅胶质量分数的增大, 添加回收率不断增加, 但干扰杂质同时增多; 仅当比例为 1:1 时, 回收率及净化效果均满足分析要求。故确定 C_{18} 键合硅胶和弗罗里硅土的质量比为 1:1。

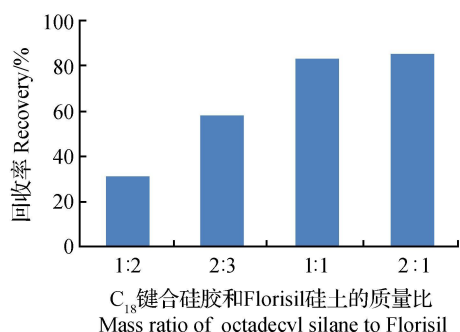


图 3 C_{18} 键合硅胶和弗罗里硅土的质量比对回收率的影响

Fig 3 Effect of mass ratio of octadecyl silane to Florisil on recovery

C_{18} 键合硅胶与玉米样品的质量比对回收率的影响实验结果见图 4。结果表明, 当质量比为 6:1 时, 回收率仅 50% 左右; 质量比为 4:1 时, 回收率达 80% 以上; 质量比为 2:1 时, 回收率符合要求, 但净化效果差。故确定 C_{18} 键合硅胶与玉米样品的质量比为 4:1。

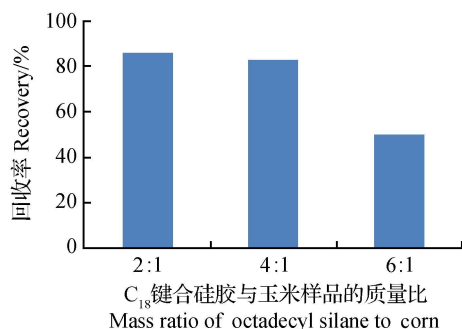


图 4 C_{18} 键合硅胶和玉米的质量比对回收率的影响

Fig 4 Effect of mass ratio of octadecyl silane to corn on recovery

2 4 洗脱剂及其用量的选择

当洗脱剂体积为 15 mL 时, 甲醇淋洗液颜色深, 杂质多, 对分析产生干扰; 乙酸乙酯淋洗液中杂质较少, 回收率符合要求; 用二氯甲烷洗脱时, 回收率较低, 这可能是由于二氯甲烷的极性较小, 无法完全将除草剂洗脱下来。故确定用乙酸乙酯作为洗脱剂。

图 5 为不同体积乙酸乙酯对 7 种供试除草剂 (1.0 mg/kg) 回收率的影响。可见: 回收率均随洗脱剂体积的增大而增加; 当洗脱剂体积为 10 mL 时, 只有 MCPA 和 2,4-DP 基本满足分析要求, 其他除草剂回收率均低于 60%; 当洗脱剂体积为 15 mL 时, 回收率有所提高; 当洗脱剂体积为 20 mL 时, 会洗下过多杂质而使分析受到干扰。故确定洗脱剂乙酸乙酯的体积为 15 mL。

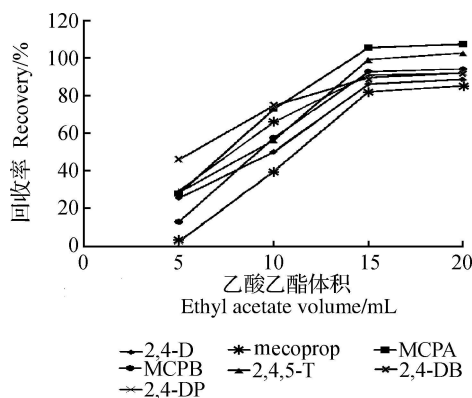


图 5 不同体积乙酸乙酯对 7 种苯氧羧酸类除草剂回收率的影响

Fig 5 Effect of ethyl acetate volumes on the recoveries of 7 phenoxyacid herbicides

2 5 回收率和检出限

由表 2 可知, 样品中 7 种除草剂的添加回收率在 80% ~ 110% 之间, 相对标准偏差 RSD 在 3.6% ~ 10.3% 之间, 方法的检出限在 7.9 ~ 12.6 $\mu\text{g/kg}$ 之间。

3 结论

本研究建立了用 MSPD-HPLC 方法测定 7 种苯氧羧酸类除草剂在玉米中残留的分析方法。采用 MSPD 方法, 集提取、过滤、净化于一步完成, 样品预处理简单, 避免了样品乳化等操作带来的损失, 提高了方法的准确度和精密性。7 种苯氧羧酸类除草剂在 0.1 ~ 2.0 mg/kg 范围内具有良好的线性关系, 在

表 2 7种苯氧羧酸类除草剂在玉米中的添加回收率 (n = 5)
Table 2 Spiked recovery of 7 phenoxyacid herbicides in com(n = 5)

除草剂 Herbicides	添加水平 Fortified level/(mg/kg)	回收率(平均值±标准偏差) Recovery(Average±SD) %	相对标准偏差 RSD %	检出限 LOD /(μg/kg)	定量限 LOQ /(μg/kg)
2,4-D	1.0	88.5±4.9	5.6	11.9	39.6
	0.1	85.7±6.1	7.2		
MCPA	1.0	100.8±7.8	7.7	12.6	41.5
	0.1	93.2±8.5	9.1		
2,4-DP	1.0	96.7±3.5	3.6	7.9	26.1
	0.1	96.8±5.4	5.5		
2-甲基-4-氯-苯氧丙酸 mecoprop	1.0	90.8±4.9	5.4	12.4	41.3
	0.1	91.1±7.8	8.6		
MCPB	1.0	84.9±4.9	5.5	8.7	28.7
	0.1	86.4±6.2	7.2		
2,4-DB	1.0	90.0±4.1	4.6	10.6	34.8
	0.1	89.5±9.2	10.3		
2,4,5-T	1.0	87.3±4.8	5.5	9.6	31.4
	0.1	90.8±4.3	4.7		

0.1和1.0 mg/kg添加水平下,回收率为80%~110%,RSD在3.6%~10.3%之间,检出限在7.9~12.6 μg/kg之间。

参考文献:

[1] ZHANG Yi-bin(张一宾). 2004年世界农药品种市场概况及2009年各类农药市场趋向[J]. J China Agrochem (中国农药), 2006, (4): 13-17.

[2] ZHANG Yi-bin(张一宾). 世界除草剂的发展及趋向:兼论我国有发展前途的新除草剂[J]. Chemical Intermediate(化工中间体), 2004, 1(2): 7-9.

[3] KEITHL H. Environmental Endocrine Disruptors A Handbook of Property Data Wiley, New York, 1997.

[4] PURCELL V, NEAUL J F, MALONGA H, et al. Interactions of atrazine and 2,4-D with human serum albumin studied by gel and capillary electrophoresis and FTIR spectroscopy[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1548: 129-138.

[5] 地面水农药污染[EB/OL]. [2007-01-09]. <http://stuff.avech.com.cn/new s/2007/1/9/10060293.shtml>

[6] CSERHATI T, FORGACSE. Phenoxyacetic acid separation and quantitative determination[J]. J Chromatogr B, 1998, 717: 157-178.

[7] MILLER W R, SHARPE R M. Environmental oestrogens and human reproductive cancers[J]. J Endocrine-Related Cancer, 1998, 5: 69-96.

[8] ZHANG Zh-heng(张志恒). Regulation on the Rational Use of Pesticides and Maximum Residue Limit in its Standards (农药合理使用规范和最高残留限量标准)[M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2007: 74-126.

[9] SN/T 1392-2004 Determination of MCPA and MCPB residues in meat and meat products for import and export (进出口肉及肉制品中2-甲-4-氯及2-甲-4-氯丁酸残留量检验方法)[S]. 2004.

[10] European Parliament Council Regulation EC/149/2008[R/OL]. 2008-03-01.

[11] XIN Guo-bin(辛国斌), TAN Jia-yi(谭家镒), YAO Li-juan(姚丽娟), et al. 固相萃取-衍生化-气相色谱法测定血液中的3种苯氧羧酸类除草剂[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2008, 26(1): 116-118.

[12] MOU Ren-xiang(牟仁祥), CHEN Ming-xue(陈铭学). 稻米中13种苯氧羧酸类除草剂多残留的高效液相色谱-质谱测定[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2008, 27(9): 973-976.

[13] ZUO Feng(左凤), XIA Min(夏敏), GU Xue-xin(谷学新). 高效液相色谱法检测两种苯氧乙酸类除草剂[J]. Modern Scientific Instrument(现代科学仪器), 2003(4): 63-64.

[14] SHI Hai-yan(施海燕), WU Hui-ming(吴慧明), CHENG Jing-li(程敬丽), et al. 2-甲-4-氯人工抗原的合成与鉴定[J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2004, 6(2): 20-24.

[15] BARKER S A. Matrix Solid-phase Dispersion[J]. J Chromatogr A, 2000, 885: 115-127.

[16] WU Ri-na(乌日娜), LI Jian-ke(李建科). 基质固相分散在食品安全分析中的应用[J]. Food Sci(食品科学), 2005, 26(6): 266-268.

[17] FENG Xi-ping(奉夏平), CHEN Wei-guo(陈卫国), WANG Zhi-yuan(王志元). 基质固相分散-气相色谱法同时测定蔬菜水果中多种农药残留[J]. Food Sci(食品科学), 2005, 26(7): 194-196.

[18] ADRIANO A, SANDRO N. MSPD procedure for determination of carbofuran, pyrimethanil and tetraconazole residues in banana by GC-MS[J]. Chromatographia, 2009, 70: 1265-1269.

[19] THAE F S, ADRIANO A, HAROLDO S D, et al. MSPD procedure for determining buprofezin, tetradifon, vinclozolin and bifenthrin residues in propolis by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Analytical Bioanalysis, 2008, 390: 1425-1430.

[20] CHU Xiao-gang(储晓刚). Study on qualitative and quantitative analysis technology for herbicide residues in soybean (大豆中除草剂残留定性定量检测技术研究)[D]. Wuxi(无锡): Jiangnan University(江南大学), 2007.

(责任编辑: 金淑惠)