

小麦中苯氧羧酸类除草剂残留量的 GC-MS/MS 研究

李 波¹, 郭德华¹, 韩 丽¹, 杨景贤¹, 张 锴²

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要:探讨了小麦中 2,4-DP、2,4-D、2,4,5-TP、2,4,5-T、2,4-DB 五种苯氧羧酸类除草剂残留量的测定方法。方法采用溶剂加速萃取技术(ASE)提取,甲酯化反应后,用气相色谱(GC)-离子阱质谱仪(MS/MS)进行定性和定量分析。方法最低检出限均为 0.01 μg/g,其相对标准偏差为 4.02%~8.16%,在小麦样品中添加浓度为 0.05~1.00 μg/g 范围的标准品,回收率在 76.0%~97.0% 范围内,在浓度为 0.10~4.00 μg/mL 范围内,呈良好线性相关。该方法完全能满足残留检测要求。

关键词:除草剂; 2,4-DP; 2,4-D; 2,4,5-TP; 2,4,5-T; 2,4-DB; 溶剂加速萃取(ASE), 三氟化硼-甲醇
中图分类号: O 657.6 文献标识码: A

文章编号: 0367-6358(2005)09-524-05

Determination of Chlorophenoxy-herbicide Residues in Wheat by GC-MS/MS

LI Bo¹, GUO De-hua¹, HAN Li¹, YANG Jing-xian¹, ZHANG Kai²

(1. Shanghai Entry-exit Inspection & Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China;

2. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The determination of chlorophenoxy-herbicide residues in wheat was studied. In this method, accelerated solvent extraction (ASE) was used to extract the herbicides, which were then methylated with borontrifluoride and the esters were analyzed quantitatively and qualitatively by gas chromatography with ion trap mass spectrometry (GC-MS/MS). The limit of detections of the five herbicides were all 0.01 μg/g. The relative standard deviation were in the range of 4.02%~8.16%. The recoveries in wheat samples were between 76.0% and 97.0% at concentration level of 0.05~1.00 μg/g for chlorophenoxy-acids. The method is simple and sensitive.

Key words: herbicide; 2,4-DP; 2,4-D; 2,4,5-TP; 2,4,5-T; 2,4-DB; accelerated solvent extraction (ASE); boron trifluoride-methanol

杂草是种植业中的一大危害,随着农业生产的现代化,以除草剂为代表的化学除草方式迅速发展起来,除草剂的应用使人类与杂草危害斗争中取得了巨大成就,不仅节省了大量繁重的除草体力劳动和机械除草作业,更重要的是减少和挽回了巨额的因草害造成的粮、棉、果、菜等农产品的产量和品质的损失及其可观的经济社会效益。

除草剂种类有苯氧羧酸类、取代脲类、酰胺类、氨基甲酸酯类、均三氮苯类、杂环类等。本文研究的 2,4-二氯苯氧基丙酸(2,4-DP)、2,4-二氯苯氧基乙酸

(2,4-D)、2,4,5-三氯苯氧基丙酸(2,4,5-TP)、2,4,5-三氯苯氧基乙酸(2,4,5-T)、2,4-二氯苯氧基丁酸(2,4-DB)五种除草剂为苯氧羧酸类除草剂,是目前常用的农用除草剂,这些物质的不合理使用将直接导致农产品中的除草剂残留超标,影响消费者食用安全和农产品的贸易。在农产品国际贸易的技术壁垒中,农业环境和农产品质量安全监测一直都起着极其重要的作用,因此,研究如何有效地检测食品中除草剂残留量是极其必要的。

1 实验部分

收稿日期: 2004-09-23; 修回日期: 2005-07-02

作者简介: 李 波(1965~),女,上海人,学士,副主任技师,主要从事食品残留分析。

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 仪器

戴安(Dionex) ASE200 溶剂加速萃取仪;

Varian CP 3800/ Saturn 2200G 气质联用仪

1.1.2 试剂

正己烷、二氯甲烷、甲醇、丙酮(农药残留级);

异辛烷、磷酸、硫酸、氯化钠(分析纯);

三氟化硼乙醚(化学纯,47.0%~47.7%);

2,4-DP、2,4-D、2,4,5-TP、2,4,5-T、2,4-DB,纯度均大于99%,购自 Chem Service;

无水硫酸钠:在650℃下烧烤4h,密闭备用;

溶剂加速萃取液:二氯甲烷/丙酮(1:2)中,加入4%磷酸/水溶液(1:1);

三氟化硼乙醚-甲醇:取50 mL 三氟化硼乙醚,慢慢倒入150 mL 甲醇中,混匀;

标准储备液:分别配制浓度为0.50 mg/mL 的五种标准溶液,避光保存于冰箱中;

混合标准使用液:0.1 μg/mL、2 μg/mL,避光保存在冰箱中,备用。

1.2 仪器工作条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱:CP-SL8 Low Bleed/MS 型毛细管柱,60 m × 0.25 mm × 0.25 μm;

载气:氦气,纯度 99.999%,流速 1.0 mL/min;

程序升温:初始温度 70℃,保持 1 min,以 10℃/min 的速度升温到 190℃,保持 2 min,再以 5℃/min 的速度升温到 250℃,保持 10 min;

进样口温度:260℃,进样方式:不分流进样,进样量:1 μL

1.2.2 质谱条件

温度条件:Transferline:250℃,Manifold:45℃,Trap:200℃;灯丝电流:80 μA;质谱范围:40~350 u;扫描速度:0.5 s/scan,2 μs/scan;

MS/MS 分为六个时段:溶剂延迟时段、2,4-DP MS/MS 时段、2,4-D MS/MS 时段、2,4,5-TP MS/MS 时段、2,4,5-T MS/MS 时段、2,4-DB MS/MS 时段。

1.2.3 溶剂加速萃取工作条件

加热温度:100℃;压力:14 MPa;加热时间:5 min;静止时间:5 min;氮气:1 MPa 持续 60 s;

1.3 检测方法

1.3.1 样品的前处理

称取研磨均匀的小麦样品约 10.0 g 于溶剂加速萃取液专用罐中,经 ASE 萃取后,40℃水浴浓缩至近干。依次加入 10 mL 饱和氯化钠水溶液、5 mL

甲醇,并用 10% 的硫酸溶液调溶液 pH 1,然后用 30 mL 二氯甲烷提取,移取有机相于 100 mL 梨形瓶中,再用 30 mL 二氯甲烷提取两次,合并有机相,在 40℃水浴下浓缩至约 1 mL,用氮气吹干^[1]。

加入 2 mL 三氟化硼乙醚-甲醇混合液,70℃水浴酯化 15 min。冷却,加入 2 mL 2% 硫酸钠溶液和 3 mL 正己烷,振荡,离心 5 min(1800 r/min)。有机相过无水硫酸钠柱,收集于试管。再用 3 mL 正己烷重复提取 2 次。合并正己烷提取液,加入 1 mL 异辛烷,浓缩至干,用正己烷定容到 1 mL,供气质联用仪分析^[2]。

1.3.2 五种除草剂标准曲线的绘制

吸取浓度为 0.1 μg/mL 混合标准使用液 0.00、1.00 mL 和浓度为 2 μg/mL 混合标准使用液 0.25、0.50、1.00、2.00 mL,分别置于 10 mL 具塞试管中,用氮气吹干。在各试管中加入 2 mL 的三氟化硼乙醚-甲醇混合液进行甲酯化反应,其后处理同 1.3.1。通过气质联用仪测定得到 2,4-D、2,4-DB、2,4,5-T、2,4,5-TP 和 2,4-DP 各浓度的相对峰面积,绘制标准曲线,同时建立回归方程。

2 结果与讨论

2.1 溶剂加速萃取与普通提取的比较

在样品提取中,本实验采用了溶剂加速萃取法(ASE)进行样品的前处理操作。该技术是一种新颖且合理的萃取方法,其工作原理是将萃取溶剂用泵加压注入一个装有样品的专用萃取罐,在高温高压环境中,进行几分钟的提取,将目标残留物从加热罐萃取至一个收集瓶中以用于净化和分析。整个提取过程自动完成,而且耗时短,溶剂用量少。例如:本研究中的 ASE 萃取每份耗时约为 12 min,溶剂消耗量约为 15 mL。

与 ASE 相比,如使用普通的溶剂提取方法必须要使用大量的溶剂。而如今,环境部门已在全世界范围内都对溶剂的使用量进行了严格的限制。例如,美国最近要求其本国实验室减少 50%~90% 的溶剂使用量,而 ASE 恰恰迎合了这一要求。此外,在分析苯氧羧酸类除草剂时使用 ASE 提取与美国 EPA 方法 8150A 中提到使用手摇方式提取所获得的回收率是基本一致的,因此 ASE 已被美国环境保护署认可为测定环境样品中苯氧羧酸类除草剂残留量的前处理手段。综上所述,ASE 利用其在提取过程中的加热和加压程序,达到溶剂使用少、自动化程度高、提取效率完全和过程损失少的目的,对于检测不溶于水或水溶性较差的苯氧羧酸类除草剂是相当适用的。

2.2 衍生化方法的选择

衍生化是分析除草剂成分的一个重要环节。由于这些化合物极性大,挥发性差,并且有多个官能团,所以必须要通过衍生反应来使这些活跃的化合物转化为稳定的,易挥发的衍生物,这样才能进行气相色谱分析。此外衍生化步骤还能增加检测的灵敏度和选择性,有利于快速确证除草剂。目前,衍生化分为酯化、烷基化、硅烷化、全卤化和光化学等。

对于苯氧羧酸类除草剂,有文献提到选择 2,2,2-三卤乙醇作为衍生化试剂,但它对 2,4-D 却不起作用,这是由于电子俘获器(ECD)对于单氟化除草剂的反应特别微弱。因此若采用 ECD 分析,就必须要用五氟苯甲基酯(PFB)。而五氟苯甲基酯过程会使在净化提取物过程中产生大量的干扰物质。且一些净化过程需要长时间的液-液分配,在转移过程中可能会损失目标化合物。五氟苯甲基酯另一个问题是衍生化反应需要较长的时间(室温条件下反应 5 h 以上)。用方法 8150 推荐使用重氮甲烷作为甲酯化反应的试剂^[3,4],但这种试剂潜在爆炸和致癌的危险。

我们选择三氟化硼—甲醇作为实验的衍生化试

剂^[5],酯化过程简单、快速、有效、安全。从图 1 中可看出五种除草剂在气质联用仪上都完全分离,且杂质峰很少,说明甲酯化过程产生较少的干扰物质。

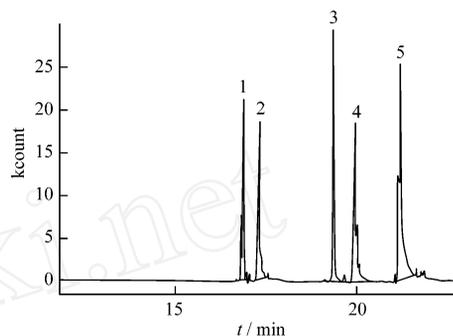


图 1 五种除草剂的 MS/MS 色谱图

1. 2,4-DP; 2. 2,4-D; 3. 2,4,5-TP; 4. 2,4,5-T; 5. 2,4-DB

2.3 MS/MS 条件的优化

为了提高二级质谱的特异性,我们先用 GC-MS/EI 确定各组分的保留时间,设计出各分析时段。表 1 显示的是这些化合物甲酯化产生的主要分子离子碎片。本方法选择了有结构代表性的基峰作为母离子,对每种成分的母离子分别用 AMD 法确定优化 CID 电压,建立 MS/MS 分析条件,见表 2。

表 1 甲酯化的苯氧羧酸类除草剂经 GC-MS/EI 所产生的主要离子碎片

除草剂(甲酯化)	除草剂(甲酯化)结构式	m/z	离子碎片
2,4-DP		248(基峰)	$[M]^+$
		189	$[M-COOCH_3]^+$
		162	$[M-CH(CH_3)COOCH_3]^+$
2,4-D		199(基峰)	$[M-Cl^{35}]^+$
		234	$[M]^+$
		175	$[M-COOCH_3]^+$
2,4,5-TP		282(基峰)	$[M]^+$
		247	$[M-Cl^{35}]^+$
		223	$[M-COOCH_3]^+$
		196	$[M-CH(CH_3)COOCH_3]^+$
2,4,5-T		233(基峰)	$[M-Cl^{37}]^+$
		268	$[M]^+$
		235	$[M-Cl^{35}]^+$
2,4-DB		101(基峰)	$[CH_2CH_2CH_2COOCH_3]^+$
		262	$[M]^+$
		59	$[COOCH_3]^+$

表2 二级质谱参数

化合物	相对分子质量	甲酯化后的相对分子质量	分析时段 /min	保留时间 /min	CID 电压 /V	母离子 m/z	定量离子 m/z
2,4-DP	234	248	16.00 ~ 17.10	16.824	1.05	248	162
2,4-D	220	234	17.10 ~ 18.00	17.299	0.65	199	156
2,4,5-TP	268	282	18.00 ~ 19.60	19.286	0.55	282	196
2,4,5-T	254	268	19.60 ~ 20.40	19.905	1.00	233	190
2,4-DB	248	262	20.40 ~ 22.00	21.104	0.50	101	59

2.4 质谱分析的选择

样品经提取、衍生化后,分别用 GC-ECD、GC-MS 法及 GC-MS/MS 法分析。GC-ECD 法杂峰干扰多,需要经过柱净化后才能测定。GC-MS 法有背景干扰峰,结合质谱图检索可达到定性目的,但由于背景干扰对灵敏度有明显的影响。相应地,GC-MS/MS 法能根据质谱特征碎片排除可能出现在相同保留时间的干扰峰,因此,GC-MS/MS 法测定苯氧羧酸类除草剂是种既可定性又可定量的确证方法,它避免了气相色谱方法需要使用双柱或双检测器来确证的麻烦,而且此方法对样品前处理的净化要求也比 GC-ECD 法低,在甲酯化后无需再进行过柱净化,仍能得到杂质峰较少、分离效果好的谱图。

2.5 五种除草剂的标准曲线

由表3可得出五种除草剂(2,4-DP、2,4-D、2,4,5-TP、2,4,5-T和2,4-DB)在浓度0.10~4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的标准曲线,除草剂浓度与峰面积呈正比,线性相关。

2.6 检出限

此方法测得的五种除草剂的最低检出限均为0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$,低于各国规定的最高残留限量 MRL 值,因此该方法完全能满足实际检测需要。

2.7 回收率试验

小麦本底样品中未检出五种除草剂,在此样品

中添加不同浓度的标准,得到数据见表4。用本方法检测该五种除草剂残留量的回收率为76.0%~97.0%,对微量分析而言此方法的准确性能满足残留分析测试要求。实验结果也证明了用二氯甲烷提取有较高的回收率,因为二氯甲烷有较高的介电常数,并且在水中的溶解度远小于乙醚和乙酸乙酯。

表3 标准曲线及相关系数

除草剂标准品浓度 / $\mu\text{g mL}^{-1}$	峰面积				
	2,4-DP	2,4-D	2,4,5-TP	2,4,5-T	2,4-DB
0.10	6222	5678	7001	5436	6727
0.50	23085	23869	26867	22233	37806
1.00	38275	41669	49112	36539	69810
2.00	52783	65481	76616	57377	126516
4.00	99499	139248	132501	127219	311241
r	0.9923	0.9972	0.9937	0.9959	0.9948

2.8 精密度实验

以10.0 g小麦为样品做了6个平行实验,添加浓度水平为0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。由表5可以看到2,4-DP、2,4-D、2,4,5-TP、2,4,5-T、2,4-DB五种除草剂的相对标准偏差分别为4.02%、6.90%、6.25%、8.16%和4.46%,就残留分析而言,此方法的精密度可以满足小麦中的这五种苯氧羧酸类除草剂残留的测定需要。

表4 小麦样品的回收率

除草剂	添加0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ 标样		添加0.50 $\mu\text{g}/\text{g}$ 标样		添加1.00 $\mu\text{g}/\text{g}$	
	实测值/ $\mu\text{g g}^{-1}$	回收率 $R/\%$	实测值/ $\mu\text{g g}^{-1}$	回收率 $R/\%$	实测值/ $\mu\text{g g}^{-1}$	回收率 $R/\%$
2,4-DP	0.040	80	0.44	88	0.87	87
2,4-D	0.038	76	0.38	76	0.81	81
2,4,5-TP	0.040	80	0.40	80	0.89	89
2,4,5-T	0.044	88	0.41	82	0.92	92
2,4-DB	0.045	90	0.48	96	0.97	97

表 5 精密度及标准偏差

除草剂	测定值/ $\mu\text{g g}^{-1}$						平均值 / $\mu\text{g g}^{-1}$	SD	ASD	RSD / %
	1	2	3	4	5	6				
2,4-DP	0.046	0.044	0.045	0.047	0.049	0.048	0.047	0.00187	0.00076	4.02
2,4-D	0.042	0.047	0.041	0.046	0.046	0.040	0.044	0.00301	0.00123	6.90
2,4,5-TP	0.031	0.036	0.031	0.031	0.032	0.031	0.032	0.00200	0.00082	6.25
2,4,5-T	0.032	0.039	0.033	0.033	0.036	0.032	0.034	0.00279	0.00114	8.16
2,4-DB	0.042	0.043	0.041	0.039	0.043	0.039	0.041	0.00183	0.00075	4.46

3 结 论

本研究应用溶剂加速萃取法(ASE)萃取和气质联用仪(GC-MS/MS)测定小麦中的五种苯氧羧酸类除草剂,方法提取效率高,酯化过程简单,无须进行可能造成损失的净化过程,快速、有效、安全,且可同时达到定性、定量的目的,可靠性更好,是小麦中该类除草剂残留的一种可行的检测方法。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国进出口商品检验行业标准. SN 0661-1997 出口粮谷中 2,4,5-TP 残留检验方法[S].
[2] Pena A L S, Silveira M I N. Determination of chlorophenoxy

herbicides in waters by capillary gas chromatography with ion trap detection [J]. J Chromatogr A, 1997, 758: 324-331.

- [3] Method 8151A, Chlorinated herbicides by GC using methylation or pentfluorobenzoylation derivatization [S]. US EPA, Revision 1, 1994.
[4] Allan J. The Determination of residues of 2,4-D in post-emergence-treated triticale [J]. Pestic Sci 1990, 30: 141-147.
[5] Brunete C S, Valcarcel A I G, Tadeo J L. Determination of residues of phenoxy acid herbicides in soil and cereals by gas chromatography-ion trap detection [J]. J Chromatogr A, 1994, 675:213-218.

(上接第 520 页)

异构体存在,保留时间稍有差异所致。由于价格昂贵,暂时无法一一用标准物质对它们分别进行定性、定量分析。

2.4 植酸钠水解率的计算

按 1.2 所述方法,改变植酸钠的浓度、温度、反应时间等因素进行水解实验,采集水解产物的 HPIC 数据,得到水解产物中的磷酸根含量,根据公式:

$$\text{植酸钠的水解率} / \% = \frac{\text{水解后生成的磷酸根的物质质量}}{\text{原溶液中植酸钠的物质质量}} \times 6 \times 100 \%$$

计算植酸钠的水解率。2.3 中图 1 中 a, b, c, d 所对应的反应中植酸钠的水解率依次为 9.5%, 25.6%, 80.8%, 96.1%。实验结果表明,植酸钠水解是逐步进行的,检测水解率可以粗略预测水解产物的成分,以选择适当的分离方法得到所需要的肌醇磷酸盐,也可用于工业上采用植酸钠水解制备肌醇时反应终点的判断。

3 结 论

用抑制型离子色谱,采用三元碱性梯度淋洗体

系可以较准确地测定植酸钠非酶水解时产生的磷酸根含量,确定植酸钠的水解率。该方法操作简单、快速、精密度较高,灵敏度较好,亦可用于检测多种植物性食物样品中植酸及磷酸根的含量分析。

参考文献:

- [1] Raboy V. Molecules of interest myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate[J]. Phytochemistry, 2003, 64:1033-1043.
[2] Shen X T, Xiao H, Ranallo R, et al. Modulation of ATP-dependent chromatin remodeling complexes by inositol polyphosphates[J]. Science, 2003, 299:112-114.
[3] Greiner R, Larsson A M. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by phytases of cereals[J]. Food Biochem, 2001, 25:229-248.
[4] Skoglund E, Carlsson N G, Sandberg A S. High-performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange columns [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46:1877-1882.