

高效液相色谱法测定大豆中 13 种三嗪类除草剂多残留量

祁彦* 占春瑞 张新忠 杨强 2006-6-20 8:07:38 《分析化学》(新) 2006 年 6 月 第 6 卷 第 6 期

关键词: 多残留分析

摘要 建立了同时检测大豆中 13 种三嗪类除草剂多残留量的反相高效液相色谱(RP HPLC)方法。样品经乙腈提取, 凝胶渗透色谱和中性氧化铝 SPE 柱净化, 然后采用 RP HPLC 二极管阵列检测法测定, 外标法定量。对样品前处理和色谱分离条件进行了研究和优化。13 种三嗪类除草剂在 0.06~5.0 mg/L 范围内线性良好, 相关系数为 0.9998~0.9999。在 0.02~1.0 µg/g 浓度范围内, 平均加标回收率在 71.9%~101.9%之间, 相对标准偏差为 2.3%~10.7%。方法简便、快速, 净化效果较好, 可同时满足进、出口大豆中多种除草剂残留量的检验工作需要。

关键词 多残留分析, 除草剂, 三嗪类, 大豆, 高效液相色谱法

1 引言

大豆是植物蛋白食品及榨油的主要原料。由于大豆生长季节雨热同季, 大豆田杂草种类繁多, 危害严重, 杂草危害可使大豆减产达 40%~50%。因此, 在大豆田间使用化学除草技术已经得到了各国的广泛认可和重视。三嗪类除草剂在作物中的残留以及对人类健康和环境造成的毒害也越来越为人们所关注[1]。为此, 近年来国际上先后制定了大豆中多种三嗪类除草剂的残留限量: 欧盟对莠去津的最高残留限量为 0.1 mg/kg, 氰草津 0.05 mg/kg; 美国对噻草酮的最高残留限量为 0.3 mg/kg, 氰草津为 0.02 mg/kg; 日本对噻草酮(metribuzin)的最高残留限量为 0.1 mg/kg [2], 而我国大豆中三嗪类除草剂的残留检测方法仍然无法满足国际贸易的技术要求。因此, 建立大豆中除草剂残留量的灵敏的检测方法迫在眉睫。

文献报道了牛奶、环境等样品中三嗪类除草剂的检测方法[3,4]。本实验研究了大豆中西玛通、西玛津、氰草津、阿特拉通、噻草酮、西草净、莠去津、扑灭通、特丁通、莠灭净、特丁津、扑草净、异丙净 13 种三嗪类除草剂残留分析的样品前处理方法和 HPLC 分离条件, 建立了大豆中多种三嗪类除草剂同时检测的多残留 HPLC 法。结果表明, 本方法简便、快速, 净化效果好, 各项技术指标均符合残留检测的要求。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HP 1100 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；HP1100 二元泵、在线真空脱气机、二极管阵列紫外检测器、自动进样器以及 Chemstation 色谱工作站(Rev. 09.01)。Kromasil KR100 5C18 和 KR100 5C8 色谱柱（250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm, 瑞典 Eka Chemicals 公司）；凝胶渗透色谱仪：J2 scientific accuprep GPC cleanup system, series II pump, DVW 10 variable wavelength detector, Accuprep™ preparative LC system, Express™ column 100% methylene chloride 40g 和 Accuchrome 工作站。标准品：13 种三嗪类除草剂标准品的含量均高于 97.0%（Dr.Ehrenstorfer Co., 德国）。乙腈、甲醇（色谱纯）、正己烷、二氯甲烷、丙酮（农残级）（Scharlau Chemie S.A., 西班牙）；实验用水为 Milli-Q 高纯水。标准溶液：甲醇配制标准储备液（200 mg/L），用甲醇稀释成相应的标准工作溶液。大豆样品由辽宁出入境检验检疫局提供。

2.2 样品的提取和净化

称取磨碎大豆粉 10.00 g 置于 50 mL 具塞离心管中，加入乙腈 40 mL，旋涡 2 min 混匀，振荡 30 min，以 4000 r/min 离心 5 min，合并上清液，在约 32℃ 水浴中，120 r/min 下减压浓缩至约 1 mL，N₂ 吹干，用 10 mL 二氯甲烷溶解定容。由 J2 GPC 自动进样系统吸入上述提取样品液，以 100%二氯甲烷为流动相，流量 5 mL/min，检测波长 228 nm，收集 14 min 之后到 24 min 的馏分 50 mL，减压浓缩至约 4~5 mL。过 Al₂O₃ N SPE 柱（6 mL/1000 mg）进一步净化，上样，再加入 6 mL 二氯甲烷洗脱，流速均为 1 mL/min，收集全部流出液，N₂ 吹干，用 1 mL 甲醇-水（8:2, V/V）溶解定容，膜过滤，待测定。

2.3 色谱分离条件

色谱柱：Kromasil KR100 10C18（250 mm×4.0 mm i.d., 5 μm）。流动相：乙腈-水，梯度洗脱程序见表 1。流速 1.0 mL/min；柱温 30℃；检测波长 228 nm；进样量 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序（略）

Table 1 Gradient elution program

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择

能过二极管阵列检测器进行波长扫描, 结果表明: 13 种三嗪类除草剂的最大吸收波长分别为: 西玛通 218 nm, 西玛津 222 nm, 氰草津 220 nm, 阿特拉通 220 nm, 嗪草酮 208、234 和 294 nm, 西草净 224 nm、莠去津 224 nm, 扑灭通 218 nm, 特丁通 220 nm, 莠灭净 224 nm, 特丁津 224 nm, 扑草净 218 nm, 异丙净 220 nm。在保证待测化合物有较好响应的同时, 降低溶剂峰的干扰, 选取 228 nm 为检测波长, 实验结果表明: 13 种三嗪类除草剂在该波长下响应值均较为理想。

3.2 流动相的选择

实验中研究了不同配比的甲醇-水、乙腈-水为流动相体系, 结果表明: 采用乙腈-水体系分离较好。由于待分离的 13 种除草剂化学结构、性质以及在色谱柱中的保留相近, 采用等度洗脱不能将待测组分完全分离。为此, 经反复实验最终确定梯度洗脱(程序见表 1), 获得较好分离效果。此外, 还对质谱分离条件进行了优化, 获得了令人满意的结果。图 1 为 13 种三嗪类除草剂标准混合溶液的色谱图。

图 1 13 种三嗪类除草剂标准混合物的色谱图(略)

Fig.1 Chromatogram of the mixture of thirteen triazine herbicide standards (1.0 mg/kg)

1. 西玛通(simetone); 2. 西玛津(simazine); 3. 氰草津(cyanazine); 4. 阿特拉通(atraton); 5. 嗪草酮(metribuzin); 6. 西草净(simetryn); 7. 莠去津(atrazine); 8. 扑灭通(prometon); 9. 特丁通(terbumeton); 10. 莠灭净(ametryn); 11. 特丁津(terbuthylazine); 12. 扑草净(prometryn); 13. 异丙净(dipropetryn)。

3.3 样品前处理条件的选择

大豆的化学成分复杂，其中蛋白质和脂肪含量较高，样品基质将严重影响除草剂的测定，并使回收率降低。为此，对大豆样品的前处理方法进行了详细的研究和优化。

3.3.1 提取溶剂的选择 实验中分别采用丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙腈 水和乙腈作为提取溶剂，结果表明：二氯甲烷提取样品乳化现象非常严重。高速离心后，提取液仍然浑浊不清，影响下步实验的进行；丙酮和乙酸乙酯提取样品后，在液 液分配时出现不同程度的乳化现象，而且许多杂质也同时被提取，干扰后续的分析；水的介入将增加了后续净化的步骤；经反复实验最终选用乙腈作为提取剂。

3.3.2 SPE 柱与 GPC 净化的研究 先后采用 C18 柱 3 mL 500 mg、硅胶柱 1.5 g、硅胶+活性炭层析柱 2.0 g+0.5 g、SCX 柱 3 mL 500 mg、Florisil 6 mL 1000 mg、中性 Al₂O₃ 3 mL 500 mg 和 6 mL 1000 mg 柱进行净化实验。结果表明：C18 柱和硅胶柱的净化效果不好，杂质干扰测定；硅胶+活性炭层析柱、SCX 柱和 Florisil 杂质干扰较小，但是回收率较低，甚至有些除草剂根本没有回收；中性 Al₂O₃ 3 mL 500 mg 和 6 mL 1000 mg 柱净化，13 种除草剂回收均较好，但是样品基质仍干扰其中 2 种除草剂的测定。

凝胶渗透色谱（GPC）净化技术能够有效去除色素和脂肪等大分子，本实验研究了 GPC 净化的情况，绘制了流出曲线，将仅通过 GPC 的净化、回收情况与只进行中性 Al₂O₃ 6mL 1000 mg 柱净化比较，同时通过将两种净化方式联接实验，结果表明：只通过 GPC 净化无法去除的杂质，在通过中性 Al₂O₃ 柱时能很好的去除，而对中性 Al₂O₃ 不易去除的杂质，利用 GPC 依靠分子量的大小可以达到降低干扰甚至完全去除。因此，实验中采用 GPC 联合中性 Al₂O₃ 6 mL 1000 mg 柱净化除杂，不仅去除了杂质的干扰，而且 13 种除草剂均得到了理想的回收率。

3.4 线性关系

在确定的最佳色谱分离条件下，配制一系列不同浓度的混合标准溶液进行色谱测定，以各组分的峰面积（Y）对浓度（X，mg/L）绘制标准曲线,线性关系和相关系数见表 2。结果表明，13 种三嗪类除草剂在 0.06~5.0 mg/L 范围内线性良好，可以满足定量分析的需要（见表 2）。

表 2 线性关系与相关系数（略）

Table 2 Linear equations and correlation coefficients

3.5 回收率、精密度和检出限

表 3 为大豆空白样品中添加 4 个浓度水平的 13 种三嗪类除草剂混合标准溶液进行回收率实验的测定结果。由表 3 可见，在 $0.02\sim 1.0\ \mu\text{g/g}$ 浓度范围内，13 种三嗪类除草剂的回收率介于 $71.9\%\sim 101.9\%$ 之间；相对标准偏差为 $2.3\%\sim 10.7\%$ ，均符合残留检测的要求。大豆空白样品和添加浓度为 $0.2\mu\text{g/g}$ 的 HPLC 图见图 2。

表 3 大豆中 13 种三嗪类除草剂的添加回收率（略）

Table 3 The recoveries of thirteen triazine herbicides in soybeans

在保证仪器检出限和回收率稳定的前提下，大豆样品中 13 种三嗪类除草剂残留量检测方法的最低检出限均低于 $20\ \mu\text{g/kg}$ ，可以满足最大残留限量的检测要求。

图 2 $0.2\ \mu\text{g/g}$ 添加色谱图（A）和大豆样品空白色谱图（B）（略）

Fig.2 Chromatograms of soybean sample spiked with herbicide standards of $0.2\ \mu\text{g/g}$ (A) and blank sample (B)

1. 西玛通（simetone）； 2. 西玛津（simazine）； 3. 氰草津（cyanazine）； 4. 阿特拉通（atraton）； 5. 嗪草酮（metribuzin）； 6. 西草净（simetryn）； 7. 莠去津（atrazine）； 8. 扑灭通（prometon）； 9. 特丁通（terbumeton）； 10. 莠灭净（ametryn）； 11. 特丁津（terbuthylazine）； 12. 扑草净（prometryn）； 13. 异丙净（dipropetryn）。

References

1 Yi Xianzhong（衣先众）, Jiang Defeng（姜得峰）. Journal of Laiyang Agriculture College（莱阳农学院学报）, 1999, 16（1）: 25~27

2 Lin Weixuan (林维宣). The Compilation of Residue Limits Standards for Pesticides and Veterinary Drugs in Foodstuffs in the World (各国食品中农药残留兽药残留限量规定). Dalian (大连): Dalian Maritime University Press (大连海事大学出版社), 2002

3 Balduini L, Matoga M, Seilles E. J. Chromatogr. B, 2003, 794: 389~395

4 Krutz L J, Senseman S A, Sciumbato A S. J. Chromatogr. A, 2003, 999: 103~121

本文系科技部国家科技基础条件平台重点项目 (No.2003DIA6N003) 基金资助

(中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

(江西出入境检验检疫局, 南昌 330002)

(中国农业大学理学院, 北京 100094)