

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00845

• 技术方法 •

微波辅助-固相萃取-高效液相色谱法测定稻谷中苯噻草胺残留量

汪涛, 宓鹤鸣*, 柴逸峰, 范国荣

第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

[摘要] 目的: 建立测定稻谷中苯噻草胺残留量的微波辅助-固相萃取-高效液相色谱法(MAE-SPE-HPLC)。方法: 以丙酮-乙腈(体积比 3 : 7)为提取剂, 采用微波辅助萃取稻谷中残留的苯噻草胺, 经弗罗里硅土固相萃取小柱净化后, 用高效液相色谱-二极管阵列检测器检测。以乙腈-水为流动相, 流速 1.0 ml/min, 217 nm 检测。结果: 苯噻草胺在 0.198~9.900 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好的线性关系, 最低检测限为 0.039 6 $\mu\text{g/ml}$ 。稻壳添加平均回收率为 90.8%, RSD 为 1.8%; 糙米添加平均回收率为 85.6%, RSD 为 2.5%。结论: MAE-SPE-HPLC 法简便、快速, 可用于稻谷中苯噻草胺残留量的测定。

[关键词] 微波辅助萃取; 固相萃取; 高压液相色谱法; 苯噻草胺; 水稻

[中图分类号] R 917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0845-03

High performance liquid chromatography combined with microwave-assisted extraction and solid phase extraction in determination of mefenacet residues in rice

WANG Tao, MI He-ming*, CHAI Yi-feng, FAN Guo-rong

Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a method by combining microwave-assisted extraction(MAE), solid phase extraction(SPE) and high performance liquid chromatography(HPLC) for determination of the mefenacet residues in rice. **Methods:** Acetone and acetonitrile(3 : 7) were used as extraction solvent. Microwave-assisted extraction was used to extract mefenacet residues in the rice. The extracts were then cleaned up with a Florisil cartridge and then subjected to Hypersil C₁₈ column(5 μm , 4.6 mm \times 200 mm), with acetonitrile : water(50 : 50, V/V) solution as mobile phase and with a flow rate of 1.0 ml/min; the ultraviolet detection wavelength was at 217 nm. **Results:** Good linear correlation for mefenacet was found within a concentration range of 0.198-9.900 $\mu\text{g/ml}$. The detection limit was 0.039 6 $\mu\text{g/ml}$ for mefenacet(S/N=2). The average recovery rate of rice hull and brown rice were 90.8% (RSD 1.8%) and 85.6% (RSD 2.5%), respectively. **Conclusion:** The present method is simple and rapid; it can be used for the determination of mefenacet residues in rice.

[KEY WORDS] microwave-assisted extraction; solid phase extraction; high pressure liquid chromatography; mefenacet; *Oryza sativa*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 845-847]

苯噻草胺是由德国拜耳公司于 20 世纪 70 年代末创制并于 20 世纪 80 年代中期开发的酰胺类选择性内吸传导型除草剂, 其作用机制是抑制细胞的生长与分裂, 主要用于防除水稻田以稗草为主的禾本科杂草^[1]。随着这类除草剂的大量使用, 农作物遭受药害的问题已日益显露。酰胺类除草剂通过一系列酶反应会生成具有致癌作用的二烷基脲亚胺^[2], 所以它们在作物中的残留受到人们的广泛关注。

目前对苯噻草胺的测定主要采用液相色谱法, 但是传统的样品处理过程却存在着很多的缺陷, 如提取时间长、消耗大量有机溶剂、分析前处理过程冗长。本研究采用微波辅助萃取(MAE)来提取样品中的农药, 然后用固相萃取(SPE)净化

该样品, 建立 MAE-SPE-HPLC 测定稻谷中苯噻草胺残留量的分析方法, 并对其进行方法学评价, 以寻求操作简便、快速、灵敏、准确, 适合于稻谷中苯噻草胺残留量测定的新方法。

1 仪器和试剂

CW-2000 型超声-微波协同萃取仪(新拓微波溶样测试技术有限公司); Waters HPLC 系统(上海申生科技有限公司)组成: Waters 515 HPLC Pump, Waters 996 Photodiode Array Detector, Millennium³² 色谱管理系统; Senco R 系列旋转蒸发器; DK-S22 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); KUDOS SK5200H 超声清洗器(上海科导超声仪器

[收稿日期] 2007-12-07 **[接受日期]** 2008-03-28

[作者简介] 汪涛, 硕士生. E-mail: lizzywt@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070389-88, E-mail: mhm19470718@sina.com

有限公司);JLMJ 砉米机(上海嘉定粮油仪器有限公司)。固相萃取真空多歧管装置(美国 Supelco 公司)。丙酮为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),甲醇、乙腈均为色谱纯(Fisher Scientific),Florisil 固相萃取小柱(1 g,6 ml,Waters 公司)。稻谷来自上海崇明,采样时间为 2006 年 11 月,水稻收获期;稻粒样品采集成熟稻穗,为多点采集,混合而成。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为依利特公司 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm×200 mm,5 μm) HPLC 柱,流动相为乙腈-水溶液(50:50),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 217 nm,进样量为 10 μl,柱温为室温。

2.2 供试液的制备

2.2.1 样品的提取 稻谷阴干后脱壳,分别收集糙米与稻壳,再分别粉碎,过 40 目,得糙米样与稻壳样,备用。分别称

取 10 g 稻壳、糙米样品于 250 ml 的萃取罐中,加入 150 ml 的丙酮-乙腈溶液(体积比为 3:7),微波温度为 72℃,辐射时间为 10 min,超声为开启。微波加热结束后,取出萃取罐,冷却至常温,萃取液过滤后在旋转蒸发仪上 40℃ 水浴浓缩至约 1 ml。

2.2.2 样品的净化 用 15 ml 正己烷预淋洗 Florisil 固相萃取小柱,将上述样品浓缩液转移到小柱中,上柱结束后用 5 ml 洗脱液(正己烷-丙酮体积比 4:1)进行洗脱,调节洗脱速度为每 5~6 s 滴 1 滴,收集洗脱液于刻度试管中,在 40℃ 空气流下吹至近干,用乙腈溶解残渣并定容至 1.0 ml,过 0.45 μm 微孔滤膜后,待测。

2.3 方法学考察

2.3.1 方法专属性 色谱图(图 1)结果表明:本实验条件下样品中的杂质不干扰苯噻草胺的测定。

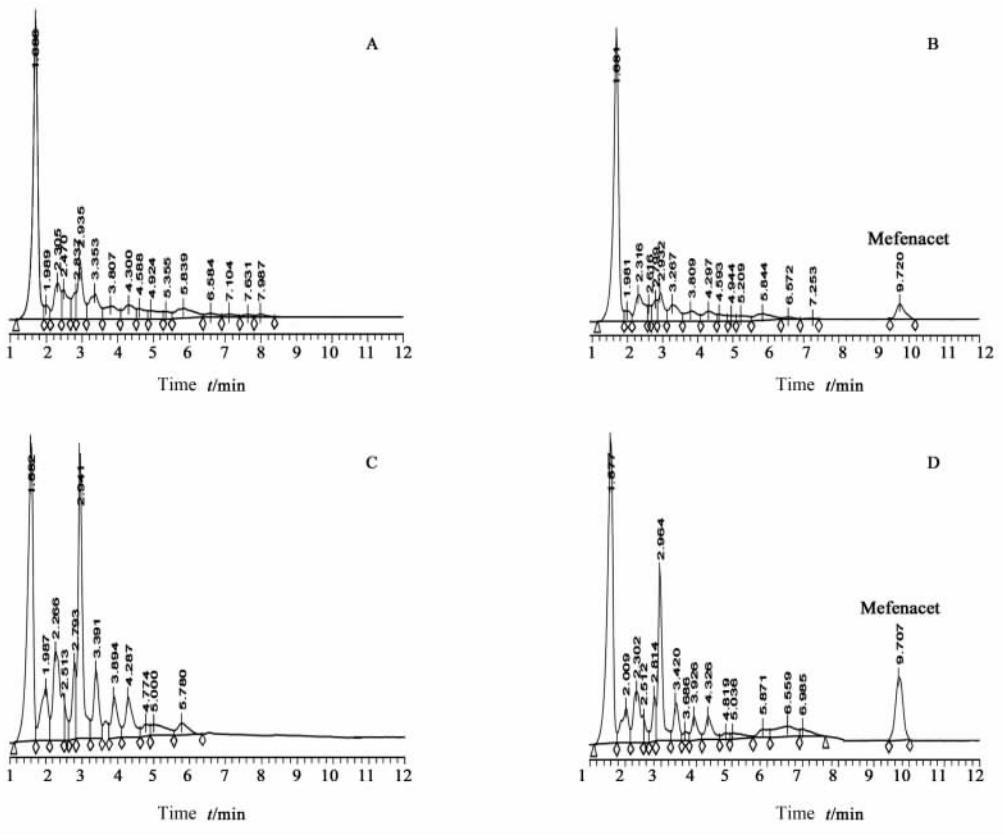


图 1 稻壳样品(A、B)和糙米样品(C、D)色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of rice hull(A,B)and brown rice(C,D)

A:Blank rice hull;B:Blank rice hull added mefenacet;C:Blank brown rice;D:Blank brown rice added mefenacet

2.3.2 标准曲线的绘制 苯噻草胺标准溶液:精密称取苯噻草胺标准品 0.010 0 g(纯度 99%,购于美国 Chemservice 公司),用乙腈溶解定容至 100 ml,配制成质量浓度为 99 μg/ml 的标准储备溶液。分别精密吸取标准品溶液 0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 ml,各置 10 ml 容量瓶中,加乙腈至刻度,摇匀,制成浓度为 0.198、0.495、0.990、1.980、4.950、9.900 μg/ml 的溶液。在上述色谱条件下,各重复进样 3 次,记录峰面积。以标准品峰面积 Y 对质量浓度 X 作图,

绘制标准曲线并计算回归方程。线性方程为 $Y=46\ 598 X+8\ 242.7$, $r=0.999\ 5$,表明苯噻草胺在 0.198~9.900 μg/ml 浓度范围内具有良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 取浓度为 9.900 μg/ml 的标准品溶液 10 μl,于 1 d 内重复测定 6 次,连续测定 6 d,计算日内、日间精密度。日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 2.14% 和 3.62%,表明方法的精密度良好。

2.3.4 准确度试验 以未受农药污染的稻谷样品为本底,

分别添加相当于样品中含苯噻草胺 0.05、0.10 和 1.00 $\mu\text{g/g}$ 的标准溶液,与 2.2 项下处理方法相同,在上述色谱条件下重复测定 3 次,记录峰面积。依法同时做平行实验 3 份,将峰面积代入回归方程,计算平均回收率。稻壳添加平均回收率为 90.8%,RSD 为 1.8%;糙米添加平均回收率为 85.3%,RSD 为 2.5%。

2.3.5 最低检测限和最低定量限 最低检测限为 0.039 6 $\mu\text{g/ml}$ ($S/N=2$),最低定量限为 0.198 $\mu\text{g/ml}$ ($S/N=10$)。

2.4 样品的测定 测定了来源于农贸市场的大米样品中苯噻草胺农药残留量,结果样品中并未检出该农药。

3 讨论

3.1 样品前处理方法的考察

3.1.1 样品提取方法的选择 农药残留样品的前处理主要包括萃取和净化等步骤,需要尽可能完全提取其中的待测组分,同时要尽可能除去与目标物同时存在的杂质,以减少对检测结果的干扰,避免对色谱柱和检测器等的污染。传统提取净化方法有索氏提取、机械振荡等技术,这些技术费时费力、容易引起较大误差;且大量使用有机溶剂,易污染环境^[3]。MAE 是一种新的少溶剂样品前处理方法^[4],其基本原理是利用微波强化溶剂效率,使固体或半固体试样中的某些有机物成分(或有机污染物)与基体物质分离。与传统方法相比,MAE 具有溶剂用量少、操作容易、目标物损失少等优点,易得到推广^[5]。本研究采用 MAE 来提取样品中的残留农药,结果表明该法灵敏度高、准确度好、净化效果好。

3.1.2 样品净化方法的选择 SPE 技术是成熟的样品制备技术,是基于液相色谱原理的分离、纯化方法。其萃取剂一般为液相色谱固定相,当待测物通过萃取剂时,其中某些痕量目标物质就被吸附在萃取剂上,然后采用适宜的选择性溶剂将其洗脱下来,即可得到富集、纯化的目标物。该方法操作简便,能在短时间内处理大量样品,且能有效去除样品中杂质的干扰,是公认的用于液体样品浓缩、富集最为有效的前处理技术之一^[6]。目前,这种净化方法越来越多地应用于食品及环境中有机污染物的残留分析^[7],其在国外已逐渐取代了传统的液液萃取而成为样品前处理可靠而有效的方法。本研究结合 MAE 和 SPE 这两种前处理新技术,对稻谷中的苯噻草胺农药进行了有效的提取、净化和浓缩,建立了一种结果准确、回收稳定、样品处理简便、净化效果好的液相色谱检测方法。

3.2 样品前处理条件的考察

3.2.1 提取溶剂的选择 农药残留分析方法中最广泛的提取剂有乙腈、丙酮、苯、氯仿、二氯甲烷等。一般是用乙腈提取脂溶性或油性样品,因此在本研究中采用乙腈作为提取溶剂。然而选择提取溶剂还需考虑溶剂是否易被蒸发,乙腈挥发性较差,若单用乙腈提取样品,会浪费时间并导致回收率降低。丙酮因无毒、价廉、易蒸发等优势已成为良好的提取溶剂。故本实验选用丙酮-乙腈混合溶液(体积比为 3:7)作为提取剂。

3.2.2 净化条件的选择 实验选用弗罗里硅土柱作为净化柱,对苯噻草胺标准溶液进行洗脱剂的选择实验,依次用不同丙酮含量(10%、20%、30%、40%和 50%)的正己烷溶液各 10 ml 作为洗脱液进行淋洗并分别收集流出液,然后用空气流吹干,再用流动相溶解并定容,上机进行测定,计算相对峰面积。从结果可以看出:随着洗脱液中丙酮含量的增加,洗脱强度增大(10%丙酮-正己烷溶液,相对峰面积 79.50%;20%丙酮-正己烷溶液,相对峰面积 20.50%),用 20%丙酮-正己烷溶液洗脱时,苯噻草胺基本可以完全洗脱,因此最后选用 20%丙酮-正己烷作为洗脱剂。

取空白样品,加入 9.900 $\mu\text{g/ml}$ 苯噻草胺的标准溶液,分别用不同体积(1、2、3、4、5 ml)的洗脱液进行洗脱,结果经 5 ml 洗脱剂洗脱后,再用甲醇洗脱萃取小柱,收集洗脱液进行测定,未检测出苯噻草胺残留。所以选用 5 ml 洗脱剂洗脱 Florisil 固相萃取小柱。

3.3 色谱分离条件的优化 通过二极管阵列检测器的波长扫描,该农药在 217 nm 处有最大吸收,因此选择 217 nm 作为检测波长。考察不同配比的甲醇-水、乙腈-水的流动相体系,结果发现:采用乙腈-水作为流动相,体系基线平稳,色谱峰尖锐,峰形对称,分离效果较好。乙腈是较好的有机修饰剂,它于低波长处的 UV 透光率高且黏度较小,可使工作压力较低、塔板数较高。选择不同的流速(0.6、0.8、1.0、1.2 ml/min)进行分析,结果发现:流速低时,保留时间长,峰形变宽,有拖尾现象;流速较高时,较快出峰,但有杂质干扰峰,泵压高;当流速为 1.0 ml/min 时,分离效果较好。

综上所述,本研究所建立的、用于测定稻谷中残留苯噻草胺含量的微波辅助-固相萃取-高效液相色谱法,分析速度快、操作简单、检测限低、精密度和准确度均符合要求,适用于稻谷中苯噻草胺残留量的检测。

[参考文献]

- [1] 褚明杰. 除草剂苯噻草胺的 RP-HPLC 测定[J]. 安徽化工, 2007,33:67-68.
- [2] 李建中,储晓刚,蔡会霞,安娟,杨强. 高效液相色谱法同时测定大豆中 12 种酰胺类除草剂的残留量[J]. 色谱,2006,24:585-588.
- [3] 袁宁,余彬彬,张茂升,曾景斌,陈曦. 微波辅助萃取-固相萃取-气相色谱法同时测定茶叶中的有机氯和拟除虫菊酯农药残留[J]. 色谱,2006,24:636-640.
- [4] Ganzler K, Salgo A, Valkó K. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography[J]. J Chromatogr, 1986,371:299-306.
- [5] 孟辉,官胜臣,梁鹏,于艳. 微波萃取气相色谱法测定小白菜中的有机磷农药[J]. 西北农业学报,2007,16:277-280.
- [6] 庞新安,晋玉霞,刘文杰,马玲,张莉莉. 固相萃取-毛细管气相色谱法测定小白杏中拟除虫菊酯类农药多残留[J]. 现代食品科技,2007,23:79-82.
- [7] 陈天文. 固相萃取-高效液相色谱法(SPE-HPLC)测定环境水体中拟除虫菊酯农药残留[J]. 福建分析测试,2007,16:16-18.

[本文编辑] 尹茶