

高效离子排斥色谱法测定蔬菜中的马来酰肼

潘广文^{1*}, 赵增运², 胡忠阳¹, 叶明立¹

(1. 戴安中国有限公司应用研究中心上海实验室, 上海 201203 ;

2. 江苏省出入境检验检疫局, 江苏 南京 200001)

摘要 :建立了马铃薯、洋葱、大蒜中马来酰肼(MH)的高效离子排斥色谱(HPIEC)检测方法。样品经提取、净化、过滤后进行色谱分析,以3 mmol/L 甲酸水溶液-乙腈(70:30, v/v)为流动相,流速0.8 mL/min,采用Ionpac ICE-AS1(250 mm×9 mm)HPIEC色谱柱分离,紫外检测波长205 nm,外标法定量。结果表明,MH的线性范围为0.006~1.0 mg/L,相关系数为0.999 9,回收率为91%~103%,相对标准偏差(RSD)均小于3%,检出限为0.002 mg/L(S/N=3)。该方法灵敏度高,前处理简便,可用于马铃薯、洋葱、大蒜中MH的检测。

关键词 :高效离子排斥色谱法;马来酰肼;蔬菜

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)07-0712-04

Determination of maleic hydrazide in vegetables by high performance ion-exclusion chromatography

PAN Guangwen^{1*}, ZHAO Zengyun², HU Zhongyang¹, YE Mingli¹

(1. Shanghai Laboratory of Application and Research Center, Dionex China Limited, Shanghai 201203, China ;

2. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 200001, China)

Abstract : A new method was developed for the determination of maleic hydrazide (MH) in potatoes, onions and garlies by high performance ion-exclusion chromatography (HPIEC). The sample was extracted with acidic methanol, and then analyzed by HPIEC. The analytical column was IonPac ICE-AS1 (250 mm×9 mm) and a mixture of 3 mmol/L formic acid water solution-acetonitrile (70:30, v/v) was used as the eluent at a flow rate of 0.8 mL/min. The detection was performed at 205 nm by an Ultimate 3000 VWD. The quantitative analysis of external standard calibration curves was used. The linear range of the method for MH was 0.006–1.0 mg/L ($r=0.9999$). The average recoveries were 91%–103% with relative standard deviations (RSDs) less than 3%. The detection limit was 0.002 mg/L for MH. The method is simple, effective, precise, sensitive, reproducible and selective. It can be used to determine the residue of MH in potatoes, onions and garlies.

Key words : high performance ion-exclusion chromatography (HPIEC); maleic hydrazide (MH); vegetables

马来酰肼又称抑芽丹,化学名称为顺丁烯二酰肼(maleic hydrazide, MH),是一种植物生长抑制剂和选择性除草剂。MH可阻碍植物细胞分裂和降低光合作用效率,因此常被用于抑制蔬菜如马铃薯、洋葱和大蒜等贮藏期发芽,也用于烟草种植中控制烟叶腋芽的生长。有研究称MH是一种诱变致癌剂,一定剂量下会导致细胞染色体断裂,从而产生细胞毒

性^[1],因此对MH残留量的检测日益受到关注。

MH的残留分析方法有多种:蒸馏-分光光度法(AOAC)^[2]、高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)^[3]、高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)^[4]、气相色谱法^[5]、毛细管电泳法^[6]、极谱法^[7]等,另外也有流动注射法^[8,9]和脉冲伏安法^[10]等方法。其中最常用的是前3种分析方法。

* 通讯联系人:潘广文,硕士,工程师,主要从事离子色谱应用研究工作。Tel:(021)58957001, E-mail:sallyp2004@yeah.net.

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 20775070和No. J0830413)。

收稿日期:2010-03-09

前3种方法中的AOAC法对蒸馏装置要求高,样品前处理复杂,操作繁琐,耗碱量大,仪器腐蚀严重。而HPLC-UV法中MH很难与样品中的干扰杂质分开,无法满足实际样品的检测要求。使用HPLC-MS法测定MH的仪器成本则相对较高^[4]。

离子排斥色谱(HPIEC)是以磺化的苯乙烯-二乙烯基苯阳离子交换树脂为固定相,酸或有机溶剂为淋洗液的一种离子色谱分离模式^[11],主要用于无机弱酸^[12]、有机酸^[13]和醇的分离。HPIEC近年来在环境、食品和生化等领域的应用非常活跃^[14-16]。Ionpac ICE-AS1色谱柱作为HPIEC色谱柱,常被用来分析有机弱酸。MH呈弱酸性,常与二乙醇胺、钾、钠等成盐。基于MH的弱酸性和HPIEC法的原理,本文采用HPIEC法测定MH,并应用于实际样品测试。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Dionex ICS-1500离子色谱仪,配UltiMate 3000 VWD可变波长检测器和Chromeleon色谱工作站(美国戴安公司)。Barnstead-Nanopure纯水机(美国Barnstead公司),Anke TDL80-2B离心机(上海安亭科学仪器厂),KQ3200DE超声波清洗器。Ion-Pac ICE-AS1(250 mm × 9 mm)色谱柱,OnGuard II RP(2.5 mL)固相萃取柱,0.22 μm尼龙滤膜过滤头(美国戴安公司)。

MH标准品(>99%,进口分装);甲醇(德国Fisher公司)、乙腈(德国Merck公司)均为色谱纯;甲酸(98%,瑞士Fluka公司)、盐酸(分析纯,中国上海国药集团化学试剂有限公司);实验用水为大于18.2 MΩ·cm的二次去离子水。

马铃薯、洋葱和大蒜样品均为市售。

1.2 实验步骤

1.2.1 标准溶液配制

称取MH标准品适量,用50%(v/v)甲醇溶液配制400 mg/L的MH标准储备液,保存于冰箱冷藏室中。使用时稀释成10 mg/L标准溶液。分别准确移取MH标准溶液各0、0.06、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0 mL于100 mL容量瓶中,用水准确定容至刻度,配制成0、0.006、0.02、0.05、0.1、0.5、1.0 mg/L不同质量浓度的标准工作溶液。

1.2.2 样品制备

选取马铃薯、洋葱和大蒜样品,于食品粉碎加工机中粉碎至糊状,分别准确称取10 g,置于具塞三角瓶中,加入30 mL酸性甲醇溶液(1.2 mol/L盐酸-

甲醇,pH<1),于超声机中超声提取30 min。超声提取后将样品转移至50 mL容量瓶中,加水准确定容至刻度。混匀,置于离心机中在转速为3 000 r/min条件下离心10 min,上清液先经OnGuard II RP柱过滤,再经0.22 μm尼龙滤膜过滤,弃去初滤液,续滤液供色谱测定。

1.2.3 色谱条件

淋洗液:3 mmol/L甲酸水溶液-乙腈(70:30, v/v)流速为0.8 mL/min,进样体积10 μL,紫外检测波长205 nm,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 实验条件考察

2.1.1 提取条件的考察

根据文献[15]报道,酸性溶液对MH的提取效率较好。本实验选用水、碱液、酸水、淋洗液、酸性甲醇对样品中的MH进行提取,结果提示1.2 mol/L的酸性甲醇溶液的提取效率最令人满意。但所得提取液经0.22 μm滤膜过滤后进样分析时,MH的峰形不理想,严重影响定量。考虑到马铃薯、洋葱和大蒜样品均是生物样品,可能存在有机物杂质干扰,尝试采用固相萃取(SPE)技术除去部分有机物。经实验,提取液经OnGuard II RP柱纯化后再进样分析,杂质减少,MH色谱峰附近无杂质干扰,加标回收率达到91%,MH在OnGuard II RP柱上基本无保留(见图1)。

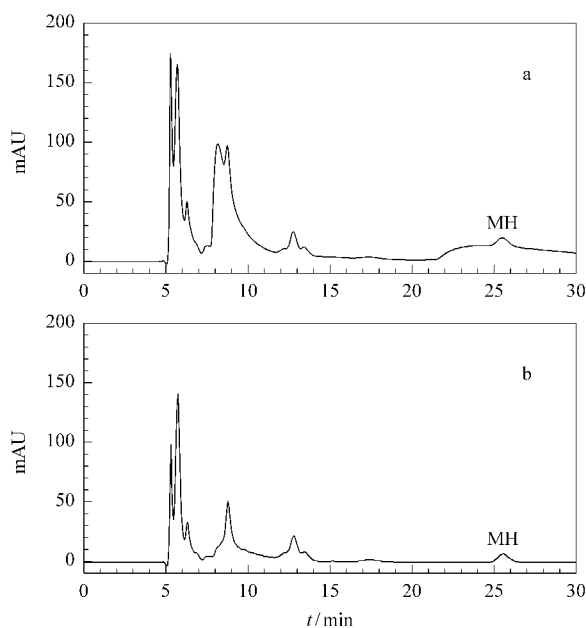


图1 (a)未经RP柱纯化的加标样品与(b)经RP柱纯化的加标样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of spiked sample (a) without purified process and (b) with purified process

2.1.2 色谱条件的考察

IonPac ICE-AS1 (250 mm × 9 mm) 是以苯乙烯-二乙烯基苯为基质,磺酸为功能基团的 HPIEC 色谱柱,常用的淋洗液是无机酸(如 HCl、H₂SO₄)和有机酸(如烷基磺酸、全氟羧酸和芳香酸)。在 HPIEC 中淋洗液的作用主要是改变溶液的 pH 值,调节酸的离解,使酸性离子在磺酸化的阳离子交换树脂上被分离,分离机理主要包括 Donnan 效应、空间排阻和吸附过程^[11]。在本实验条件下, IonPac ICE-AS1 固定相上的磺酸功能基在酸性条件下形成 Donnan 膜, MH 具有弱酸性,其离解型和未离解型之间存在动态平衡,未离解的 MH 可通过 Donnan 膜并与固定相反应,相对流动相的流速而言,溶质 MH 被延迟,从而与其他杂质分开。加入 30% 的乙腈后, MH 在固定相上的吸附作用减弱,加快了在色谱柱上的淋洗过程。MH 在 IonPac ICE-AS1 柱上的保留行为正是基于 Donnan 效应以及吸附解吸的原理。

采用 IonPac ICE-AS1 色谱柱,在不含有有机溶剂的情况下,直接用 3 mmol/L 甲酸水溶液作为淋洗液, MH 在 40 min 左右出峰,分析时间较长,且色谱峰较宽,需加入有机溶剂以缩短保留时间。IonPac ICE-AS1 色谱柱推荐乙腈最高使用限量为 50%,因此在淋洗液中分别加入 10%、20%、30% 和 40% (v/v) 的乙腈,结果随着乙腈含量的增加, MH 的保留时间呈缩短趋势。但乙腈加入量达到 30% 后,保留时间的变化不再明显。与含 30% 乙腈的淋洗液相比,含 40% 乙腈的淋洗液使 MH 的保留时间稍有提前。考虑到高分子树脂填料的性质和方法的稳定性,选取 30% 的乙腈和 0.8 mL/min 的推荐流速。

pH 值是影响组分保留的主要因素^[11]。实验考察了不同种类的酸对 MH 色谱行为的影响。其中硫酸会导致 MH 的峰形较差,盐酸对不锈钢管路有腐蚀作用,烷基磺酸、全氟羧酸等有机酸类相对价格较高,因此没有选用。实验考察了流动相中不同浓度的甲酸对 MH 保留时间的影响,发现甲酸的浓度降低时, MH 在色谱柱上的保留时间无明显缩短。最终选择了 3 mmol/L 甲酸水溶液。

大蒜、洋葱、马铃薯等蔬菜中含有多种有机酸,而有机酸会在 HPIEC 色谱柱中保留和分离。但干扰实验表明,在实验条件确定的情况下,蔬菜中常见的有机酸,如草酸、柠檬酸、酒石酸、苹果酸和琥珀酸等的保留时间分别为 4.847、5.300、5.607、5.973、6.413 min,出峰时间均在 8 min 以前,对 MH 的测定无干扰。同时蔬菜的组成复杂,在波长为 205 nm

的末端吸收处有很多干扰杂质,在实际样品的测定过程中, 20 min 处仍可见未知的色谱峰。为了排除杂质的干扰,保持色谱条件的稳定性和实用性,综合上述因素,选取 1.2.3 节所述色谱条件。在此条件下检测样品, MH 与其他杂质的分离度良好,其保留时间约为 25 min(见图 2)。

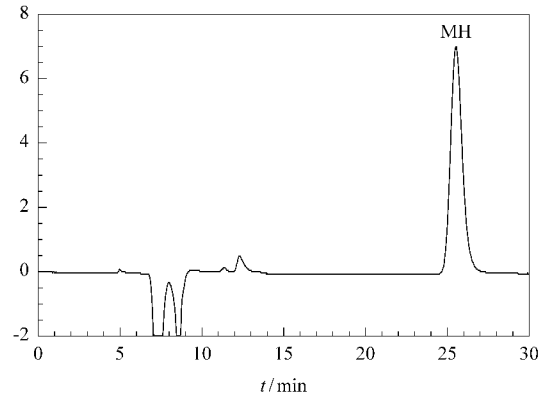


图 2 MH 标准溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of MH standard solution (1.0 mg/L)

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系与方法检出限

取 MH 标准工作溶液,按 1.2.3 节所述色谱条件进行测定。以峰面积(Y)对质量浓度(X , mg/L)进行线性回归,线性方程为 $Y = 6.0221X - 0.0202$,相关系数为 0.9999, MH 在其质量浓度为 0.006 ~ 1.0 mg/L 时线性关系良好。以信噪比为 3 确定 MH 的方法检出限(LOD)为 0.002 mg/L。

2.2.2 方法的重复性

取同一样品,按 1.2.2 节所述样品制备方法平行处理 8 份样品,按 1.2.3 节所述色谱条件测定各样品,考察方法的重复性。MH 的保留时间、峰面积、峰高和含量的相对标准偏差(RSD)分别为 0.31%、1.13%、1.26%和 1.67%,均小于 2%。

2.2.3 回收率

准确称取空白蔬菜样品 10 g,分别加入高、中、低 3 种不同浓度的 MH 标准溶液,按 1.2.2 节所述样品制备方法制备样品,按 1.2.3 节所述色谱条件测定样品,计算回收率,结果见表 1。各样品的回收率范围为 91% ~ 103%, RSD 均小于 3%。

表 1 实际样品中 MH 的加标回收率($n = 6$)

Table 1 Recoveries of the MH from spiked samples ($n = 6$)

Sample	Original/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
Potato	0	0.060	0.055	91.7	2.09
Onion	0	0.100	0.103	102.6	1.22
Garlic	0	0.600	0.595	99.2	1.85

2.3 样品测定

按 1.2.2 节所述样品制备的方法,对市售 4 号马铃薯样品进行处理,按 1.2.3 节所述色谱条件测定其 MH 的含量。测得该样品中 MH 的质量浓度为 0.522 2 mg/L;经计算,市售 4 号马铃薯样品中 MH 的含量为 2.61 $\mu\text{g/g}$ (见图 3)。

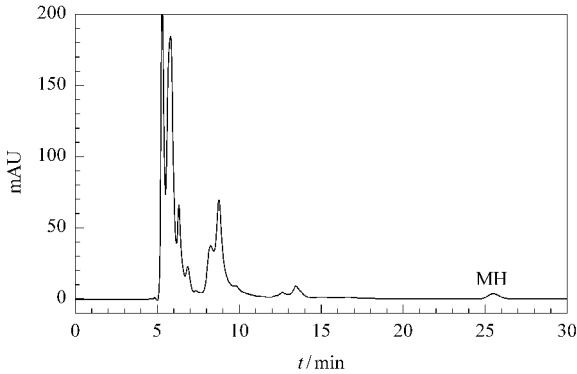


图 3 市售 4 号马铃薯样品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of the MH in the potato sample 4

3 结语

以含 30% (v/v) 乙腈的甲酸溶液为流动相,利用 MH 的弱酸性,采用 HPIEC 进行分离,紫外法检测,可对马铃薯、洋葱和大蒜中的 MH 含量进行测定。本方法快速、准确、灵敏,重现性和选择性都比较好,样品处理步骤简单,分析周期短,不受杂质干扰,适用于大量样品的测定,可推广应用到其他如烟草、食品和污水等样品中 MH 的检测。本方法是对酰肼类化合物的一种新的分离分析方法。同时本方法的淋洗液条件完全可应用于常规 HPLC 中,并且

可与质谱检测器联用,为探索环境样品中 MH 及其他农药残留的分析提供了一种思路。

参考文献:

- [1] Marcano L, Carruyo I, Del C A, et al. *Envir Res*, 2004, 94(2): 221
- [2] AOAC, Official Method 963. 24
- [3] Pei M L, Jiang Z H, Wang Q S, et al. *Journal of Instrumental Analysis* (裴明黎, 蒋振辉, 王秋霜, 等. 分析测试学报), 2009, 28(5): 611
- [4] John L D, Barnes K A, Wilkinson K, et al. *J Chromatogr A*, 1996, 750(1/2): 391
- [5] Yang S S. *J Chromatogr A*, 1992, 595(1/2): 346
- [6] Renaud J M, Keller I, Vuillaume G. *J Chromatogr A*, 1992, 604(2/3): 243
- [7] Tang J H, Li R F. *Journal of Kunming Medical College* (汤健华, 李儒发. 昆明医学院学报), 1990, 11(1): 38
- [8] Fang Y J, Yan S L, Ning B A, et al. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(8): 2323
- [9] Li L, Zhou M, Fang Y J, et al. *Food Science and Technology* (李莉, 周敏, 房彦军, 等. 食品科技), 2008, 3 : 223
- [10] Alberto S A, Esperanza B, Manuel C, et al. *Talanta*, 2007, 71(1): 430
- [11] Mou S F, Liu K N, Ding X J. *Ion Chromatographic Method and Its Application*. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press (牟世芬, 刘克纳, 丁晓静. 离子色谱方法及应用. 2 版. 北京: 化学工业出版社), 2005
- [12] Mori M, Iwata T, Satori T, et al. *J Chromatogr A*, 2008, 1213(2): 125
- [13] Dias J C, Suzuki E, Cibele L, et al. *J Pharm B*, 2009, 49(4): 1128
- [14] Geng Z M, Jiang R, Chen M. *J Food Comp*, 2008, 21(2): 178
- [15] Nakatani N, Kozaki D, Masuda W, et al. *Anal Chim Acta*, 2008, 619(1): 110
- [16] Iwata T, Mori M, Itabashi H, et al. *Talanta*, 2009, 79(4): 1026