

基质分散萃取-高效液相色谱分析大豆植株、籽粒及豆田土壤中咪唑乙烟酸残留

李广领,董丽红,刘博,郭文举,陈锡岭

(河南科技学院,河南新乡 453003)

摘要:对确立的以甲醇为分散萃取溶剂,乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)、十八烷基硅烷键合相(C₁₈)和石墨化碳黑(GCB)为基质分散材料的大豆植株、籽粒及豆田土壤咪唑乙烟酸残留基质分散萃取前处理方法,进行了乙腈等度洗脱的高效液相色谱(HPLC)残留样品外标定量方法条件的优化。结果表明:优化色谱条件下,咪唑乙烟酸的色谱保留时间为6.97 min,在0.01~10.0 mg·L⁻¹质量分数范围内与对应色谱峰积分面积线性响应良好,回归方程为 $y = 4.0038x - 0.2756$ ($R^2 = 0.9995$),回收率均在85%以上,相对标准偏差均小于9%;该色谱条件下仪器检出限为0.104 ng,方法的最低检测浓度分别为0.024(植株),0.033(籽粒)和0.026 mg·kg⁻¹(豆田土壤),表明该残留样本前处理方法和样品检测方法简便、高效、经济、可靠,可满足咪唑乙烟酸在大豆植株、大豆籽粒及豆田土壤中残留定量检测要求。

关键词:咪唑乙烟酸;大豆植株;大豆籽粒;豆田土壤;分散固相萃取;残留分析

中图分类号:S481.8

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2015.03.0480

Residue Analysis Method of Imazethapyr in Soybean Plants, Seed and Soybean Field by QuEChERS-HPLC

LI Guang-ling, DONG Li-hong, LIU Bo, GUO Wen-ju, CHEN Xi-ling

(Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: A method based on dispersive solid phase extraction determining Imazethapyr residue in soybean plants, seed and soybean field by HPLC-UVD was developed. The target analysis was quantified by external standard method and matrix-matched standard solution used to compensate for matrix effect. The sample was extracted by methanol and cleaned up by dispersive solid phase extraction using primary secondary amine(PSA) and C₁₈-bonded silica dispersant sorbent. Under the optimal conditions, the retention time of Imazethapyr was 6.97 min, the calibration curves showed good linearity ($y = 4.0038x - 0.2756$, $R^2 = 0.9995$) from 0.01 to 10.0 mg·L⁻¹ concentration of Imazethapyr, the average recoveries were determined in soybean plants, soybean and soybean field blank spiked at 0.05, 0.1 and 0.5 mg·kg⁻¹ and the overall recovery rates were over 85%, with the relative standard deviations(RSD) less than 9%. The detection limit of Imazethapyr was 0.104 ng, and the limit of quantification was 0.024, 0.033 and 0.026 mg·kg⁻¹ in soybean plants, seed and soybean field respectively. The results indicated that the sample pretreatment method and the residue sample detection method were simple, good effect, low operation cost, and stable reliability.

Keywords: Imazethapyr; Soybean plant; Soybean seed; Soybean field soil; Dispersive solid phase extraction; Residue analysis

咪唑乙烟酸(Imazethapyr)属咪唑啉酮类除草剂,化学名称为(RS)5-乙基-2-(4-异丙基-4-甲基-5-氧代-2-咪唑啉-2-基)烟酸,是美国氰胺公司(现BASF公司)于1984年成功研发的高效、低毒、广谱、持效的大豆田内吸选择性苗后除草剂^[1],广泛应用于大豆田杂草防除。咪唑乙烟酸作为乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂,被植物吸收后,因ALS活

性受抑制,导致细胞有丝分裂停滞于间隙(G1与G2)阶段,影响蛋白质的生物合成,植物生长受抑制而死亡^[2]。豆科植物体内ALS活性较高能迅速代谢和降解咪唑乙烟酸,而敏感植物无法代谢或代谢效率低而受其残留危害^[3,4]。目前,咪唑乙烟酸使用量和使用范围有日益增大趋势,然而研究发现^[5]其在土壤中残留期较长,按田间常规剂量使用后52

收稿日期:2014-11-17

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201203098);国家级大学生创新训练计划项目(20121046701703);河南省教育厅科学技术研究重点项目(13B210003)。

第一作者简介:李广领(1976-),男,硕士,高级实验师,主要从事农产品农药残留分析及农药环境毒理学方面的研究。E-mail: liguangling@hist.edu.cn。

通讯作者:陈锡岭(1962-),男,教授,硕导,主要从事农药环境毒理学方面的研究工作。E-mail: chenxiling@hist.edu.cn。

周, 土壤中仍有 20% ~ 40% 的残留量。一些发达国家已经制定了严格的残留限量标准^[6], 这些标准的实施, 给大豆种植和大豆产品的出口设置了新的技术壁垒, 为从源头解决该问题, 加强大豆生产过程中的咪唑乙烟酸科学合理使用的重要性日益迫切。

QuEChERS 样品前处理方法于 2003 年由 Anastassiades 等^[7]提出, 主要应用于含水量较高的果蔬类样品的提取净化, 其核心技术是有机溶剂提取、MgSO₄ 盐析分层和分散固相萃取 (DSPE) 净化, 因其具有快速、简单、廉价、有效、可靠、安全等特点而得名 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)。近年来, 我国学者运用该技术进行了谷物、水果、蔬菜和土壤等多种类型残留样品的前处理研究, 并取得了系列研究成果^[8-12]。目前国内外咪唑乙烟酸残留样品的前处理及检测方法主要有液液萃取 - 液相色谱检测法^[13]、超声提取 - 毛细管电泳检测^[14]、固相萃取 - 液相色谱检测法^[15-17]、微波辅助萃取 - 气相色谱检测法^[18]、超临界液体萃取 - 液相色谱检测法^[19]和加速溶剂萃取 - 液相色谱检测法^[20-21]等, 但这些方法普遍存在样品前处理步骤繁琐、有机溶剂用量大、劳动强度高和样品易挥发损失等问题。基于此, 本研究拟通过对大豆植株、大豆籽粒和豆田土壤咪唑乙烟酸残留的 QuEChERS 简易样品前处理程序制得的分析样品高效液相色谱检测条件的优化, 为大豆生产中咪唑乙烟酸的科学合理使用和残留规律研究提供便捷的检测技术。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器、试剂和样品

Agilent-1260 型 HPLC, 带自动进样器和紫外检测器 (美国 Agilent 公司), TDL5000B 低速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器科学仪器公司), KH19A 型台式高速离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司), EA10048 型电子分析天平 (上海佑科仪器仪表有限公司), Genius-3 型涡旋仪 (德国 IKA 公司), Milli-Q 高纯水发生器 (美国 Millipore 公司)。咪唑乙烟酸标准品 (纯度 99.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司), N-丙基乙二胺 (PSA)、C₁₈ 和石墨化炭黑 (GCB) (天津博纳艾杰尔科技有限公司), AR 级甲醇、冰乙酸、氯化钠、无水硫酸钠、碳酸钠等, HPLC 级乙腈, 实验用水均为高纯水 (经 Milli-Q 超纯水器纯化)。

方法研究所用大豆植株、大豆籽粒和豆田土壤样品均来自河南科技学院大豆育种实验田, 且 3 年

内无咪唑乙烟酸用药历史。植株样品用高速组织捣碎机均质化, 风干的籽粒样品用研钵研碎, 土壤样品自然风干、过 20 目筛。

1.2 标准样品溶液配制

准确称取 2 mg 咪唑乙烟酸标准品, 用色谱纯乙腈溶解并定容至 200 mL, 得质量分数为 10 mg·L⁻¹ 的标准储备液, 取适量标准储备液用乙腈逐级稀释成系列质量分数的工作标样待用。

1.3 样品前处理方法

大豆植株样品: 准确称取 5 g 均质化大豆植株样品于 50 mL 聚四氟乙烯具塞离心管, 加入 15 mL 甲醇和 1% 的冰乙酸水溶液混合液 (V: V = 10: 1), 涡旋提取 3 min; 加入 6 g 氯化钠, 涡旋提取 3 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取上层有机相 2 mL 于 2 mL 聚四氟乙烯具塞离心管中, 分别加入 50 mg C₁₈、50 mg PSA、20 mg GCB 和 200 mg 无水硫酸镁, 涡旋 3 min, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 转移上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 待测。

大豆籽粒样品: 准确称取 5 g 均质化大豆籽粒样品于 50 mL 聚四氟乙烯具塞离心管, 加入 10 mL 甲醇和 0.1 mL 甲酸, 涡旋提取 3 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取上层有机相 2 mL 于 2 mL 聚四氟乙烯具塞离心管中, 分别加入 50 mg PSA 和 200 mg 无水硫酸镁, 涡旋 3 min, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 转移上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 待测。

豆田土壤样品: 准确称取 10 g 过筛、混匀的土壤样品于 50 mL 聚四氟乙烯具塞离心管, 加入 15 mL 甲醇和 1 mol·L⁻¹ 的 Na₂CO₃ 水溶液混合液 (V: V = 1: 1), 涡旋提取 3 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取上层有机相 2 mL 于 2 mL 聚四氟乙烯具塞离心管中, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 为 2, 再分别加入 50 mg C₁₈ 和 200 mg 无水硫酸镁钠, 涡旋 3 min, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 转移上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 待测。

1.4 色谱条件

以 Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, i. d = 5 μm) 为分离、分析柱, 以乙腈为色谱流动相, 通过调整流动相 pH、比例及柱温条件, 改善分离效果, 确定样品中咪唑乙烟酸残留的最佳色谱分离、分析条件。

1.5 方法的线性检测范围

将质量分数为 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 和 10 mg·L⁻¹ 的咪唑乙烟酸系列工作标样, 按照确定的色谱条件, 对各浓度样品分别重复进样 3 次, 得对应的色谱图, 以峰面积 (3 次重复的平均值) 为纵坐标,

以进样浓度为横坐标进行线性回归,绘制标准曲线,得咪唑乙烟酸在确定色谱条件下的线性检测范围。

1.6 样品添加回收率试验

采用模拟添加法,分别对大豆植株、籽粒和大豆田土壤空白样品进行 0.05, 0.1 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个添加水平的咪唑乙烟酸加标回收率实验,各添加水平做 3 个平行处理。添加后涡旋 3 min 使其与样品充分混合,静置 30 min,使其达到物理吸附平衡,然后按确定的样品前处理方法和优化的色谱检测条件进行提取、净化、检测,计算相应的添加回收率及相对标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 色谱分析条件

实验发现,以 Agilent ZORBAX Extend- C_{18} 柱分离分析柱,当流动相为纯乙腈和水时,不论二者体积比如何调整咪唑乙烟酸标准样品色谱峰均有明显拖尾现象,而在室温条件下进样,则样品色谱保留时间又不稳定,当调整为一定 pH 的弱酸性复合

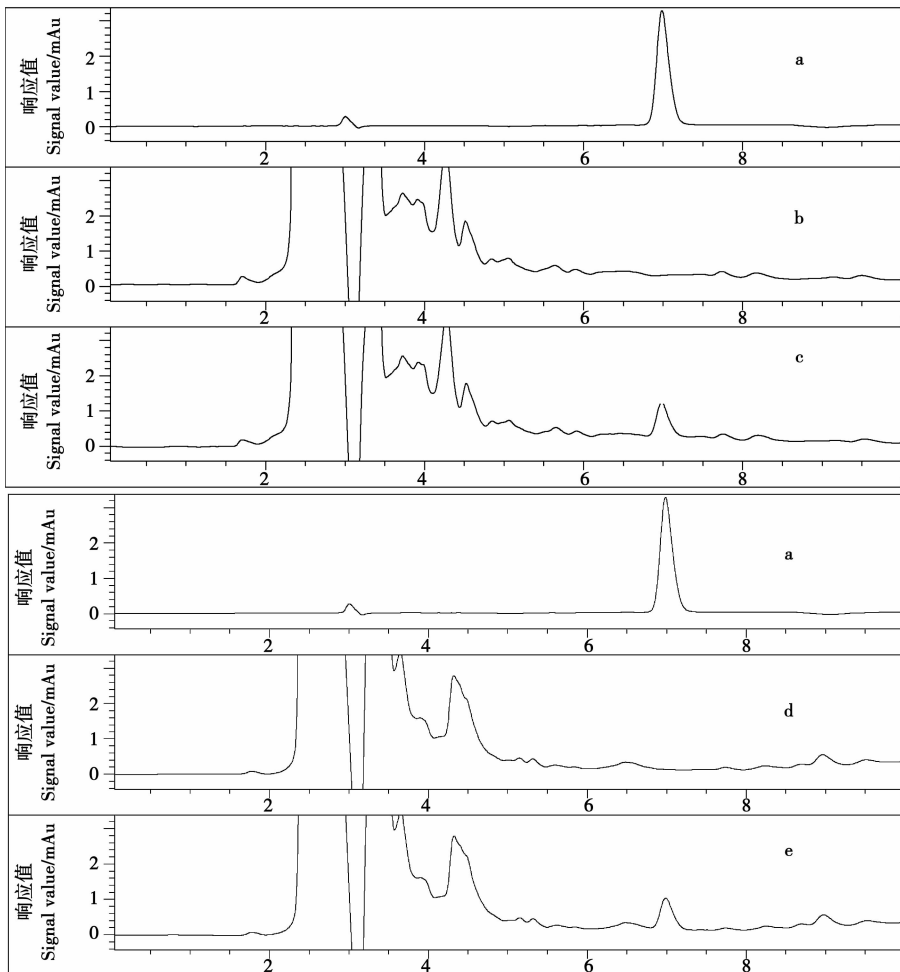
流动相,即流动相为 V_A 液(0.05% 冰乙酸乙腈): V_B 液(0.4% 冰乙酸水溶液) = 40:60,柱流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 40°C ,进样量 $10 \mu\text{L}$,检测波长 254 nm 时,可获得大豆植株、大豆籽粒和豆田土壤样品中咪唑乙烟酸稳定、良好的分离效果,其中咪唑乙烟酸标准样品的色谱保留时间为 6.98 min,且与大豆植株、大豆籽粒和豆田土壤基质无干扰(图 1)。

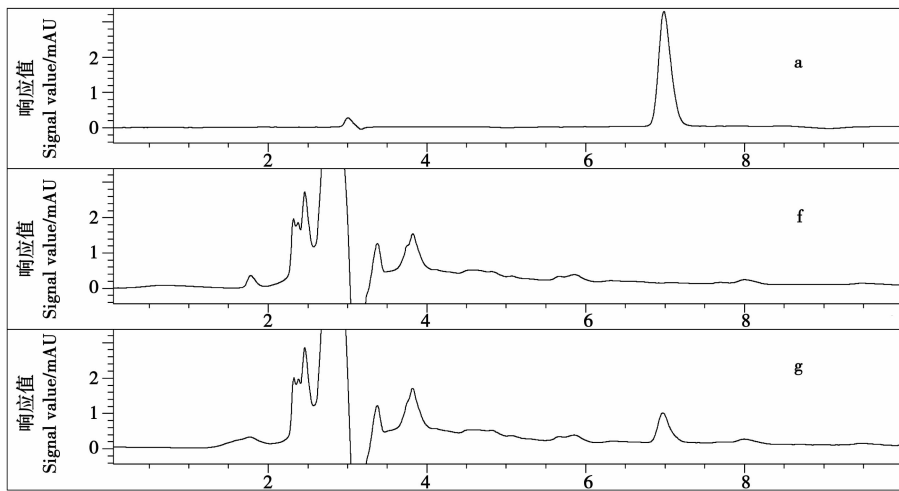
2.2 分析方法的线性相关性

由图 2 可以看出,咪唑乙烟酸样品的不同质量分数与峰面积线性响应良好,其回归方程为 $y = 4.0038x - 0.2756$ ($R^2 = 0.9995$) (图 2)。以 3 倍 S/N 计算得方法的最低检测限(LOD)为 0.104 ng。

2.3 分析方法的回收率

由表 1 可以看出,大豆植株、籽粒和大豆田土壤中咪唑乙烟酸标准样品分别 3 个添加水平的平均回收率均在 85% 以上,且各添加水平 3 次重复处理间的 RSD 均小于 9%,说明该方法的准确性和重复性符合农药残留分析要求。以 10 倍 S/N 计算得的方法 LOQ 分别为 $0.024 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (大豆植株)、 $0.033 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (大豆籽粒)和 $0.026 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (豆田土壤)。





a: 咪唑乙烟酸标样; b: 大豆植株空白; c: 大豆植株 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标样添加; d: 大豆籽粒空白; e: 大豆籽粒 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标样添加; f: 豆田土壤空白; g: 豆田土壤 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标样添加。

a: Imazethapyr standard sample; b: Soybean plant blank; c: Soybean plant + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ standard sample; d: Soybean seed blank; e: Soybean seed + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ standard sample; f: Soybean field soil blank; g: Soybean field soil + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ standard sample.

图 1 优化条件下咪唑乙烟酸标准样品、样品空白及样品添加的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of Imazethapyr standard sample, sample blank, and spiked Imazethapyr in the sample blank under the optimal chromatographic conditions

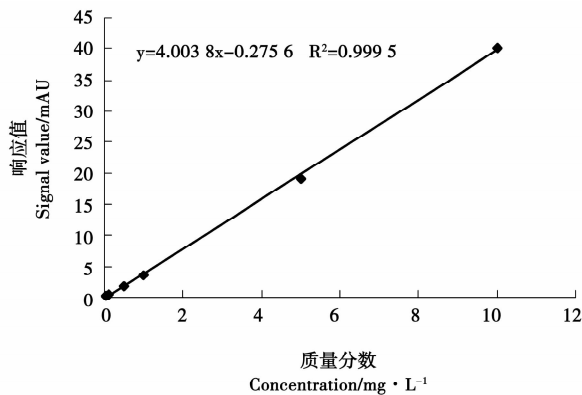


图 2 优化色谱条件下不同质量分数咪唑乙烟酸的响应曲线

Fig. 2 Calibration curve of Imazethapyr under the optimal chromatographic conditions

表 1 不同咪唑乙烟酸添加水平测得的回收率

Table 1 Recovery ratios and precision of Imazethapyr detection (n = 3)

样本基质 Sample matrix	添加水平 Spiked levels / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	平均回收率 Average recovery ratio/%	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
大豆植株 Soybean plants	0.05	102.6	6.9
	0.10	100.1	5.1
	0.50	99.8	7.8
大豆籽粒 Soybean seeds	0.05	97.6	7.4
	0.10	88.1	6.5
	0.50	92.8	4.8
豆田土壤 Soybean field soils	0.05	98.2	8.4
	0.10	96.4	4.9
	0.50	89.6	5.4

2. 4 基质效应分析

对空白大豆植株、籽粒和豆田土壤样品采用 1.3 所述前处理方法进行提取、净化,按 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行标样添加,配制样品的基质标样,与等质量分数溶剂标样对比,计算其基质效应^[22]。得大豆植株、大豆籽粒和豆田土壤样品基质因子分别为 1.084, 0.968 和 0.895 8,说明基质效应均不明显。

3 结 论

本文根据分散固相萃取的基本原理,采用甲醇涡旋提取,PSA、 C_{18} 和 GCB 吸附剂净化,利用高效液相色谱 - 紫外检测器对大豆植株、大豆籽粒和豆田土壤中咪唑乙烟酸残留样品前处理和残留量分析方法进行了系统研究。建立和优化了残留样品的分散固相萃取简易前处理程序和仪器检测条件。结果表明,该样品前处理技术操作简便、提取溶剂

用量少、省时省力、净化效果好,高效液相色谱检测方法线性范围宽、检测灵敏度高。可满足咪唑乙烟在大豆植株及豆田土壤中残留定量检测要求。

参考文献

- [1] 赵爽, 叶非. 咪唑啉酮类除草剂的应用及降解[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 15-19. (Zhao S, Ye F. Applications of imidazolinone herbicide and its degradation [J]. Plant Protection, 2009, 35(2): 15-19.)
- [2] Garcia J C, Takashima K. Photocatalytic degradation of imazaquin in an aqueous suspension of titanium dioxide [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2003, 155 (1-3): 215-222.
- [3] Shaner D L, Singh B K. Acetohydroxyacid synthase inhibitors [M]// Roe R M, Burton J D, Kuhr R J, et al. Herbicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology. Amsterdam, the Netherlands: IOS Press, 1997:69-110.
- [4] 苏少泉. 抗咪唑啉酮类除草剂作物的发展与未来[J]. 现代农药, 2006, 5(1): 51-54. (Su S Q. The development and future of imidazolinone herbicide-resistant crops[J]. Modern Agrochemical, 2006, 5(1): 51-54.)
- [5] Goetz A J, Lavy T L, Gbur E E. Degradation and field persistence of imazethapyr[J]. Weed Science, 1990, 38(4-5): 421-428.
- [6] 李成, 锁然, 王凤池, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定红小豆中残留的6种咪唑啉酮类除草剂[J]. 色谱, 2008, 26(6): 726-730. (Li C, Suo R, Wang F C, et al. Simultaneous determination of residues of six imidazolinone herbicides in adzuki beans by high performance liquid chromatography-electrospray ion trap tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2008, 26(6): 726-730.)
- [7] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction partitioning and dispersive solid phase extraction for the determination of pesticide residues in produce [J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(2): 412-431.
- [8] 张盈, 李晓刚, 徐军, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法快速检测大豆及土壤中氟磺胺草醚残留[J]. 环境化学, 2012, 31(9): 1399-1404. (Zhang Y, Li X G, Xu J, et al. Determination of fomesafen residues in soybean and soil using QuEChERS and UPLC-MS/MS[J]. Environmental Chemistry, 2012, 31(9): 1399-1404.)
- [9] 李春风, 沈伟健, 蒋原. 分散固相萃取气相色谱-负化学离子源质谱法测定大豆和玉米中20种农药的残留量[J]. 色谱, 2009, 27(2): 179-180. (Li C F, Shen W J, Jiang Y. Determination of 20 kinds of pesticide residues in soybeans and corn using gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry coupled with offline dispersive solid-phase extraction[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2009, 27(2): 179-180.)
- [10] 林海丹, 邹志飞, 秦燕, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱法快速测定果蔬中的6种保鲜剂残留量[J]. 色谱, 2013, 31(2): 170-173. (Lin H D, Zou Z F, Qin Y, et al. Rapid determination of six preservation residues in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography using dispersive solid phase extraction[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(2): 170-173.)
- [11] 王连珠, 周昱, 陈泳, 等. QuEChERS样品前处理-液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中66种有机磷农药残留量方法评估[J]. 色谱, 2012, 30(2): 146-153. (Wang L Z, Zhou Y, Chen Y, et al. Evaluation of QuEChERS methods for the analysis of 66 organophosphorus pesticide residues in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(2): 146-153.)
- [12] 张志勇, 龚勇, 单炜力, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定黄瓜和土壤中甲基硫菌灵和多菌灵[J]. 色谱, 2012, 30(1): 91-94. (Zhang Z Y, Gong Y, Shan W L, et al. Determination of thiophanate-methyl and carbendazim in cucumber and soil by QuEChERS-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(1): 91-94.)
- [13] Vischetti C. Measured and simulated persistence of imazethapyr in soil[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1995, 54(3): 420-427.
- [14] Han L, Guo B Y, Feng J H, et al. Study on the enantioselective degradation of imazethapyr in soil by CE[J]. Chromatographia, 2008, 68(11/12): 1071-1073.
- [15] Faria A M, Maldaner L, Santana C C, et al. Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 582(1): 34-40.
- [16] 张昌朋, 刘新刚, 徐军, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定土壤中咪唑乙烟酸的残留量[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(10): 2041-2044. (Zhang C P, Liu X J, Xu J, et al. Determination of imazethapyr residues in soil using SPE and UPLC-MS/MS[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(10): 2041-2044.)
- [17] Lazic S, Bursic V, Vukovic S. Methods of imazethapyr extraction from soil and cleaning up by solid phase extraction[J]. Pesticidi i Fitomedicina, 2007, 22(4): 311-315.
- [18] Stout S J, Dacunha A R, Allardice D G. Microwave-assisted extraction coupled with gas chromatography-electron capture negative chemical ionization mass spectrometry for the simplified determination of imidazolinone herbicides in soil at the ppb level[J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(4): 653-658.
- [19] Pace P F, Senseman S A, Ketchersid M L, et al. Supercritical fluid extraction and solid-phase extraction of AC 263, 222 and imazethapyr from three Texas soils[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1999, 37(4): 440-444.
- [20] 陈婷婷, 崔兆杰, 李强, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱法测定土壤中咪唑乙烟酸残留量[J]. 分析实验室, 2007, 26(9): 95-98. (Chen T T, Cui Z J, Li Q, et al. Determination of imazethapyr residues in soil by accelerated solvent extraction-HPLC [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2007, 26(9): 95-98.)
- [21] Guo F P, Yong M L, Chun L F, et al. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 384(6): 1366-1408.
- [22] 许鹏军, 高晓莎, 陶晔, 等. 分散固相萃取-气相色谱四极杆质谱法测定9种果品中的螺螨酯残留[J]. 分析化学, 2008, 36(11): 1515-1520. (Xu P J, Gao X S, Tao B, et al. Determination of spirodiclofen residue in nine fruits by gas chromatography-quadrupole mass spectrometry with dispersive solid phase extraction[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2008, 36(11): 1515-1520.)