

高效液相色谱柱后衍生法测定谷物中 9 种 氨基甲酸酯类农药及 3 种代谢物残留量*

于文莲 王 超 储晓刚

(中国进出口商检研究所食检中心 北京 100025)

提 要 研究了用 Waters Carbamate 分析系统柱后衍生化荧光检测器测定谷物中氨基甲酸酯类农药残留量的方法。用 Waters Carbamate Analysis Column 对 9 种农药和 3 种代谢产物进行分离, 碱液水解, OPA 柱后衍生, 有很好的选择性、重现性和灵敏度, 最低检出限为 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

关键词 高效液相色谱法, 柱后衍生化, 谷物, 氨基甲酸酯类农药

分类号 O658/TQ45

1 前言

氨基甲酸酯类农药属于高效、广谱类杀虫剂, 许多国家对此类农药在食品中的残留量都制定了严格的限量规定^[1]。近年来国外报道了许多用液相色谱柱后衍生法同时测定此类农残的方法^[2-4]。国内虽也有报道^[5], 但测定的品种有限, 而且灵敏度和重现性均不理想。为此, 本文采用 OPA 柱后衍生法测定了谷物中 9 种氨基甲酸酯类农药及 3 种代谢物的残留量, 获得了满意的分离效果和极高的灵敏度, 用于粮谷中氨基甲酸酯类农药残留量的测定, 结果令人满意。本法的建立是基于此类农药均带有甲胺基团 ($-\text{NHCH}_3$), 先经过色谱柱分离, 进入柱后反应装置, 碱液水解产生甲胺的特性, 甲胺在反应管中与 OPA 反应生成一种强荧光物质 1-(2-羟乙基) 硫基-2-甲基异吲哚, 用荧光检测器进行检测。

2 实验部分

柱后反应荧光检测系统如图 1 所示。

2.1 仪器与试剂

仪器 Waters Carbamate Analysis System, 配有 474 荧光检测器、600E 泵(四元梯度)、717Plus 自动进样器、Millennium 2010 数据处理系统、Waters PCRS 蠕动泵、RXN™ 柱后反应装置、Milli-Q 超纯水器, 旋转蒸发器, 谷物磨碎机, 振荡器。

试剂 丙酮、二氯甲烷、乙腈、正己烷、氯化钠、四硼酸钠、邻苯二甲醛(OPA)为分析纯, 氢氧化钠、盐酸为优级纯, 巯基乙醇(ME)为化学纯, 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水。

农药标准品 涕灭威亚砷、涕灭威砷、杀线威、

灭多威、3-OH 克百威、涕灭威、残杀威、克百威、西维因、抗蚜威、异丙威、灭虫威为日本和光试剂。

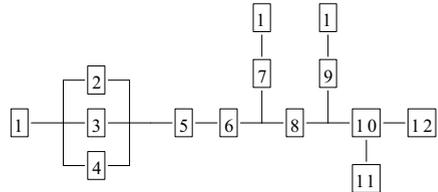


图 1 柱后反应荧光检测系统图

Fig. 1 Schematic diagram of the carbamates analysis system

1. 泵, 2. 水, 3. 甲醇, 4. 乙腈, 5. 进样器, 6. 柱子, 7. NaOH, 8. 反应管, 9. OPA, 10. 检测器, 11. 废液, 12. 数据处理器。 1. pump, 2. water, 3. methanol, 4. acetonitrile, 5. injector, 6. column, 7. NaOH, 8. reactor, 9. OPA, 10. detector, 11. waste, 12. data-processing system.

2.2 实验方法

试液配制 OPA 衍生剂: 称取 19.1g 四硼酸钠, 溶于 1 000mL 超纯水中备用。称取 50mg 邻苯二甲醛, 用 5mL 甲醇溶解, 转移至 500mL 容量瓶中。用四硼酸钠溶液稀释至刻度, 混匀, 用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 超声脱气, 加入 $25\mu\text{L}$ 巯基乙醇, 混匀, pH 9.3, 避光保存。最好是当天配制。0.05mol/L NaOH 溶液: 称取 1.0g NaOH 溶于 500mL 超纯水中, 用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 用前超声脱气。农药标准液: 准确称取各农药标准品 50mg, 用乙腈溶解并定容至 50mL, 使各农药溶液浓度为 1 000mg/L, 并将其作为储备液。从中各移取适量, 用甲醇稀释成 10mg/L 的混合标准溶液, 其中抗蚜威为 100mg/L, 作为添加标液。

* 本文收稿日期: 1997-05-30, 修回日期: 1997-10-05

样品提取 准确称取 20.0g 试样(磨碎,过 40 目筛),放入 500mL 具塞三角瓶中,加入 30mL 水,放置 2h 后加入 200mL 丙酮,振荡 30min 过滤,滤液经 40℃ 减压浓缩至约 30mL,残液转移至 250mL 分液漏斗中。加入 0.8mol/L 氯化钠溶液 150mL,用 100mL 二氯甲烷分两次提取。合并二氯甲烷层,用无水硫酸钠脱水后减压浓缩。残渣用 25mL 正己烷溶解,转移至 150mL 分液漏斗中。用 90mL 乙腈(正己烷饱和)分 3 次提取,合并乙腈层转移至 150mL 分液漏斗中,加入 50mL 正己烷(乙腈饱和)脱脂,弃掉正己烷层,将乙腈层减压浓缩至干。残渣用色谱纯甲醇定容至 10mL,经 0.5 μ m 滤膜过滤后进行色谱测定。

液相色谱条件 色谱柱: Waters Carbamate Column n(3.9mm \times 150mm); 色谱柱温度 30℃, 反应管温度 80℃; 流动相: 水-甲醇-乙腈(500mL 乙腈+25 μ L 巯基乙醇), 梯度洗脱条件见表 1; 流速: 1.5mL/min, 氢氧化钠溶液流速 0.5mL/min, OPA 衍生剂流速 0.5mL/min, 荧光检测器的激发波长和发射波长分别为 339nm 和 445nm, 进样量 40 μ L。

表 1 梯度条件

Table 1 Gradient condition				
时间(m in)	水(%)	甲醇(%)	乙腈(%)	曲线
Time	Water	MeOH	ACN	Curve
0.00	88.0	12.0	0.0	0
4.00	88.0	12.0	0.0	1
4.10	68.0	16.0	16.0	3
16.10	30.0	35.0	35.0	10
19.10	88.0	12.0	0.0	9

3 结果与讨论

3.1 农药的分离及反应条件的选择

在实验中,使用国产流动相梯度洗脱时基线不稳定,有杂峰出现,影响分离效果。经过反复实验,在乙腈中加入一定量的巯基乙醇能使上述现象消失。适宜的浓度是 500mL 乙腈加入 25 μ L 巯基乙醇。浓度过高不仅不能消除上述现象,反而会使背景噪声增大,干扰测定。

3.2 方法重现性的研究

此类农药结构相近, t_R 非常接近, t_R 的漂移将直接影响定性结果。实验表明在泵的流速和梯度的准确度、精确度一定的条件下, t_R 的重现性受柱温和环境温度的影响较大。温度的变化会影响溶质在流动相中的溶解度及流动相的粘度,使 t_R 漂移。因此必须保持柱温和环境温度的相对恒定。在柱温 30.0℃

$\pm 0.1^\circ\text{C}$ 、环境温度 26.0℃ $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 的条件下,同一标准溶液连续进样 10 次,12 种农药的 t_R 的 RSD 均在 0.003%~0.350% 之间,重现性相当好。

3.3 方法的灵敏度和线性关系

在上述实验条件下,抗蚜威的柱中最低检出量为 2ng,其它 11 种农药均为 0.4ng。按取样 20g、定容 10mL、进样量 40 μ L 计算,抗蚜威的测定低限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其它 11 种农药为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,远低于国际上对此类农药的限量要求。标准色谱图见图 2。

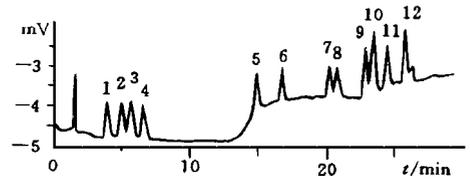


图 2 氨基甲酸酯农药标准色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of 12 carbamates

1. 涕灭威亚砷, 2. 涕灭威砷, 3. 杀线威, 4. 灭多威, 5. 3-OH 克百威, 6. 涕灭威, 7. 残杀威, 8. 克百威, 9. 西维因, 10. 抗蚜威, 11. 异丙威, 12. 灭虫威。1. aldicarb sulfoxide, 2. aldicarb sulfone, 3. oxamyl, 4. methomyl, 5. 3-OH carbofuran, 6. aldicarb, 7. propoxur, 8. carbofuran, 9. carbarby, 10. pirimicarb, 11. isoprocarb, 12. methiocarb.

移取一定量的混合标准溶液,用 pH 3(用盐酸调)的超纯水稀释成 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的溶液,测得各农药的标准曲线线性关系良好。得线性回归方程(X 为进样柱中溶液绝对量, ng; Y 为峰面积, mV): 涕灭威亚砷为 $Y = 1.62X + 5.42$ ($r = 0.984$), 涕灭威砷为 $Y = 1.73X + 6.48$ ($r = 0.993$), 杀线威为 $Y = 4.51X + 7.26$ ($r = 0.974$), 灭多威为 $Y = 1.96X + 7.51$ ($r = 0.991$), 3-OH 克百威为 $Y = 1.85X + 6.32$ ($r = 0.982$), 涕灭威为 $Y = 1.09X + 4.82$ ($r = 0.984$), 残杀威为 $Y = 3.56X + 5.85$ ($r = 0.981$), 克百威为 $Y = 5.59X + 7.12$ ($r = 0.995$), 西维因为 $Y = 3.38X + 6.65$ ($r = 0.982$), 抗蚜威为 $Y = 3.00X + 1.69$ ($r = 0.992$), 异丙威为 $Y = 1.11X + 3.29$ ($r = 0.988$), 灭虫威为 $Y = 1.29X + 3.04$ ($r = 0.966$)。

准确称取谷物样品 20.0g, 添加回收标液(抗蚜威 100mg/L, 其它农药 10mg/L)0.2mL, 放置 30min 后, 按样品提取方法做回收实验, 结果见表 2。糙米、小麦样品色谱图见图 3。

4 结论

用液相色谱柱后衍生法测定多残留氨基甲酸酯类农药有很高的灵敏度和重现性, 检测限远低于

国际上对此类农药的限量要求。近几年来已经检测了近百个出口糙米样品, 获得了很好的效果。

表 2 回收实验结果($n=4$)

Table 2 Recovery of carbamate pesticides added to cereal($n=4$)

农 药 Pesticide	添加值 Standard added(μg)	回收率 Recovery (%)					
		糙 米 brown rice	精 米 polished rice	小 麦 wheat	大 豆 soybean	荞 麦 buckwheat	玉 米 maize
Aldicarb sulfoxide	2	32±5.1	43±6.5	45±3.3	73±3.8	84±2.0	62±6.9
Aldicarb sulfone	2	79±5.7	80±7.3	44±1.8	80±3.0	79±1.3	63±8.2
Oxamyl	2	89±4.5	79±3.4	44±2.5	92±7.0	87±3.5	77±7.8
Methomyl	2	87±5.6	83±6.9	91±8.5	77±7.8	84±6.5	87±7.2
3-OH Carbofuran	2	85±5.5	87±4.8	88±5.4	67±5.3	85±4.9	80±4.9
Aldicarb	2	98±3.9	95±6.1	108±6.1	54±2.9	50±5.7	82±7.1
Propoxur	2	91±3.8	90±4.7	88±3.9	60±2.8	79±7.3	71±3.6
Carbofuran	2	90±3.4	92±2.5	86±3.0	83±3.4	93±6.4	76±5.9
Carbaryl	2	90±5.6	92±3.1	97±2.8	95±1.3	92±3.5	96±5.6
Pirimicarb	20	90±5.2	89±7.1	83±1.2	86±5.1	72±1.2	83±0.8
Isoprocarb	2	91±5.4	99±2.9	107±6.0	76±7.2	91±4.4	98±1.6
Methiocarb	2	93±5.8	90±8.3	87±4.2	67±7.5	74±5.8	61±4.3

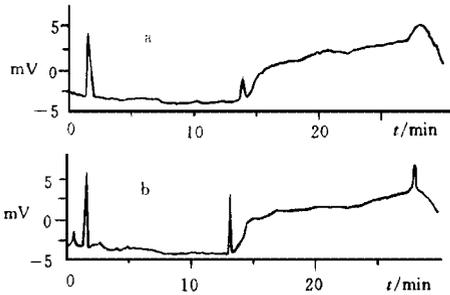


图 3 糙米(a)和小麦样品(b)色谱图
Fig. 3 Chromatogram of extract from brown rice (a) and wheat (b)

参 考 文 献

- 1 庄无忌主编. 各国食品和饲料农药兽药残留限量大全. 北京: 中国对外经济贸易出版社, 1995
- 2 Toshihiro N, Maki K, Hiroko S et al. 食卫志(Japan), 1994, 35(5): 470-478
- 3 Ali M S, White J D, Bakowis R S et al. JAOAC Int, 1993, 76(4): 907-910
- 4 Kok A D, Hiemstra M. JAOAC Int, 1992, 75(6): 1063-1072
- 5 蒋新明, 蔡道基, 华晓梅. 色谱, 1994, 12(1): 32~ 34

Simultaneous Determinations of Carbamate Pesticides in Cereal by High Performance Liquid Chromatography with Post-Column Fluorescence Derivatization

Yu Wenlian, Wang Chao and Chu Xiaogang

(China Import & Export Commodity Inspection Technology Institute, Beijing, 100025)

Abstract A liquid chromatographic method for the simultaneous determination of carbamate pesticides in cereal by Waters Carbamate Analysis System with post-column fluorescence derivatization is described. The cereal sample homogenate was extracted with acetone and water. The extract was partitioned between 5% sodium chloride solution and dichloromethane. The dichloromethane layer was concentrated to dryness. The residue was dissolved in *n*-hexane and extracted with acetonitrile (saturated with *n*-hexane). The acetonitrile layer was decreased with *n*-hexane (saturated with acetonitrile), then the acetonitrile layer was concentrated to dryness. The residue was dissolved in methanol. It's the test solution for HPLC. Nine carbamate pesticides and their three metabolites were separated by Waters Carbamate Column with gradient elution. Two steps underwent in the post-column system: hydrolysis by NaOH solution and the reaction of the product with *o*-phthalaldehyde and 2-mercaptoethanol. The resulting fluorescence derivative was detected at 445nm (excitation at 339nm). The selectivity, reproducibility and sensitivity of proposed method are better than those reported with other methods. The detection limits was 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of samples.

Key words high performance liquid chromatography, post-column fluorescence derivatization, cereal, carbamate pesticides