

大豆氧化乐果残留分析方法的研究^{*}

姜欣¹ 姜德峰² 张伟² 谢甫缙² 王海英² 陈振武²

(1. 沈阳化工研究院, 沈阳 110021; 2. 沈阳农业大学农学院, 沈阳 110161)

摘要 采用 HP1100 型液相色谱仪, 进行了大豆氧化乐果残留分析方法和分析条件的探讨, 结果表明, 以获取理想的分离度为目标, 综合各项因素, 最适宜的分析条件为: 色谱柱为 LUNA5 μ C18 150mm \times 4.6mm; 流动相为乙腈/水=6/94(V/V); 检测波长为 220nm; 进样量为 50 μ l; 流速为 1ml/min; 柱温为室温(\pm 25 $^{\circ}$ C)。用甲醇-水和丙酮-水做提取液, 用二氯甲烷做萃取剂从大豆及土壤中回收氧化乐果, 并用液相色谱紫外检测器外标法定量测定其残留量, 方法最小检出量低, 达 0.108ng, 最低检出浓度大豆植株和子粒可达 2 μ g/kg, 土壤可达 0.4 μ g/kg。添加回收率为 87.3%—101.5%; 变异系数为 0.99—16.98%。说明氧化乐果残留 HPLC 分析法是一个精度较高的新方法。

关键词 大豆; 氧化乐果; 残留分析

中图分类号 S 481+.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2004)04-0268-05

随着科学技术的不断进步, 分析手段和分析仪器不断出新, 农药残留测定的方法也不断更新。近年来, 我国科技工作者采用气-质联用、液-质联用、酶抑制等国际较先进的方法对有机磷农药残留进行了测定(路平等, 2002; 史延茂等, 2003)在有机磷杀虫剂中, 氧化乐果的毒性较大。国家有关部门对氧化乐果的使用已有严格的规定和管理要求。由于氧化乐果在我国是大吨位杀虫、杀螨剂, 每年约消耗 8000 吨左右。它适用范围广, 药效好, 价格低廉, 深受广大农民欢迎。为解决农民不按安全间隔期采收, 过量用药和滥用农药的问题, 满足无公害大豆生产的需要, 进行了氧化乐果残留分析方法的研究。

国标中氧化乐果含量测定的方法(GB/T6696-1986)为: 薄层-溴化法和气相色谱法。溴化法为化学滴定法, 操作较烦琐, 受外界因子干扰几率较大。可用于原药和乳油的分析, 但不适于残留的分析。采用气相色谱法测定氧化乐果含量时, 设定的柱温和气化检测温度远高于 150 $^{\circ}$ C, 而氧化乐果在 135 $^{\circ}$ C 时会发生分解, 在柱温和气化检测温度远远高于其分解温度的情况下, 对其含量的精确分析会造成怎样的影响, 没有相关的资料。鉴于此, 为了探索

新的、高效准确的、简便易行的分离和分析技术, 本研究尝试用液相色谱法测定氧化乐果含量。这种分析方法可使氧化乐果以活性分子结构的形式被检测, 若需要, 可在液相色谱后有选择的接收流动相, 蒸出溶剂后重新回收氧化乐果。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

氧化乐果: (1) 防除大豆蚜虫用 40% 乳油, 天津农药厂生产。(2) 97.4% 标准样品, 美国 Sigma-Aldrich 提供。

大豆品种: 沈农 6 号, 辽豆 14 号。

试剂: 甲醇、丙酮、二氯甲烷、无水硫酸钠, 均为分析纯, 及色谱纯乙腈及二次蒸馏水。

仪器: 美国产 HP1100 型双泵高效液相色谱仪, 带紫外检测器、原装色谱工作站数据处理系统; 液相色谱柱; 10.50 μ l 液相色谱专用微量进样器; 分析天平; 超声波振荡机; 旋转蒸发仪; 真空泵; 500ml 分液漏斗; 1000ml 圆底烧瓶; 10、100、1000ml 容量瓶; 500ml 碘量瓶; 1、10ml 移液管; 10ml 玻璃注射器; G4 砂芯漏斗; 布氏漏斗; 滤瓶; 青霉素小瓶; 研钵; 40

^{*} 收稿日期: 2004-03-09

基金项目: 本研究得到农业部种植业结构调整重大技术专项(2003-03-02A)的资助。

作者简介: 姜欣(1965-)女, 硕士, 高级工程师, 从事分析研究工作。

目筛; 0.45 μ 针头式溶剂过滤头; 溶剂过滤系统; 0.45 μ 水过滤膜; 0.45 μ 溶剂过滤膜。

1.2 试验方法

1.2.1 分析仪器的选择: 选定用液相色谱紫外检测器测定氧化乐果含量。

1.2.2 分析条件的选择

A: 根据氧化乐果的理化性质, 选择用反相色谱柱。液相色谱柱条件的选择范围: (1) SUPELCO SIL C8 150mm \times 4.6mm, 5 μ ; (2) LUNA5 μ C18 150mm \times 4.6mm; (3) LiChrosorb RP-18 10 μ , 200mm \times 4.6mm。

B: 检测波长筛选范围为: 210nm; 220nm; 230nm。

C: 流动相的选择范围: 甲醇/水(50/50; 30/70; 10/90); 乙腈/水(10/90; 6/94; 3/97)。

D: 流动相流速调整范围为 1ml/min 和 0.8ml/min。

1.2.3 氧化乐果残留的田间试验方案

试验地点: 沈阳农业大学农学实验地, 土壤为棕壤。土壤质地为中壤。供试大豆品种为: 沈农 6 号和辽豆 14 号。4 月 27 日播种, 5 月 9 日出苗。9 月 30 日收获。

试验小区: 试验共设 4 个处理, 即对照、每公顷用 40% 氧化乐果乳油 0.9、1.35、1.8L 的三个施药处理。试验按裂区设计, 小区面积 15m², 行距 60cm, 株距 11cm, 5 行区。种植密度每公顷 15 万株, 重复 3 次, 大豆的田间管理与当地管理措施相同。施药时间为 6 月 15 日, 7 月 1 日两个处理。施药方式为喷施。

1.2.4 残留分析样品的采集

采样时间: 分别在喷药后的 1, 15, 30, 60, 90 天采集样品。

植物样采集: 随机取样, 每个处理用多点取样法采集混合样, 分根、茎、叶、荚皮、子粒风干后称重, 粉碎, 过 40 目筛备提取处理。

土壤样品采集: 采耕层 15cm 土壤, 风干粉碎, 过 40 目筛备提取处理。

1.2.5 残留分析样品的提取和净化

土壤样品制备: 样品风干后碾碎, 除去沙砾和植物残骸, 充分混合, 过 40 目筛; 称取 100g 土样置于 500ml 碘量瓶中, 加入适当的溶剂或溶液浸泡。经超声振荡器振荡以期充分溶出活性组分, 用布氏漏斗抽滤, 瓶及残渣用溶剂洗 3-5 次后抽滤。滤液合并后装入 500ml 容量瓶, 用溶剂定容。取 250ml 溶

液放入 500ml 分液漏斗中, 用适量萃取溶剂分数次振荡提取, 静置分层。分出萃取溶液经盛有硫酸钠的砂芯漏斗脱水过滤入 1000ml 圆底烧瓶中, 于真空旋转蒸发仪中浓缩至干, 残留物用定量的溶剂溶解并无损转移至青霉素小瓶中冷藏备测。

植物样品的制备: 准确称取待测风干样 10g 置于 500ml 碘量瓶中, 加入适当的溶剂或溶液浸泡。经超声振荡器振荡以期充分溶出活性组分, 用布氏漏斗抽滤, 残渣重复上述操作再提取一次并抽滤。滤液合并后装入 1000ml 圆底烧瓶, 用真空旋转蒸发仪浓缩至约 100ml, 冷却后放入 500ml 分液漏斗中, 用适量萃取溶剂分数次振荡提取, 静置分层。分出萃取溶液经盛有硫酸钠的砂芯漏斗脱水过滤入 1000ml 圆底烧瓶中, 于真空旋转蒸发仪中浓缩至干, 残留物用定量的溶剂溶解并无损转移至小瓶中冷藏备测。

2 结果与讨论

2.1 分析条件的选定

2.1.1 液相色谱分离效果的比较

根据色谱柱本身的特性, 在其他条件相同的情况下, 比较了不同色谱柱的分离效果。结果表明, SUPELCO SIL 5 μ C8 (150mm \times 4.6mm) 柱出峰最快, LUNA5 μ C18 (150mm \times 4.6mm) 次之。LiChrosorb RP-18 10 μ (200mm \times 4.6mm) 柱出峰最慢。基于提高工作效率, 首先选用 SUPELCO SIL 5 μ C8 (150mm \times 4.6mm) 色谱柱做了进一步分析。结果表明在流动相、检测波长以及流速等检测条件的研究过程中, 目标物在该色谱柱上的分离效果始终未能达到预期目的。为了提高分离效率又分别考察了 LUNA5 μ C18 柱 (150mm \times 4.6mm) 和 LiChrosorb RP-18 10 μ 色谱柱 (200mm \times 4.6mm)。在下面选择的波长、流动相配比、流速相同的情况下, LUNA5 μ C18 柱 (150mm \times 4.6mm) 分离效果很好, 且出峰较快。相比之下, LiChrosorb RP-18 10 μ 色谱柱 (200mm \times 4.6mm) 虽然分离效果最好, 但保留时间长, 出峰慢。因此在保证分离效果的前提下, 兼顾工作效率, 应选用 LUNA5 μ C18 柱 (150mm \times 4.6mm)。

2.1.2 流动相及流速的选择

反相液相色谱法常用的流动相是甲醇和水或乙腈和水的混合液。在价格和化学试剂对工作环境的影响等方面甲醇均优于乙腈。故流动相先用甲醇/水=

50/50(V/V),流速为1ml/min。色谱柱为SUPEL-COSIL C8 150mm×4.6mm,5 μ 。但分离效果不好,氧化乐果与其它杂质峰不能分离。色谱柱不变,改变流动相配比为甲醇/水=30/70,10/90(V/V),效果仍不理想,因此不能采用SUPEL-COSIL C8 150mm×4.6mm,5 μ 色谱柱。

再用LUNA5 μ C18柱(150mm×4.6mm),流动相配比为甲醇/水=10/90(V/V)及流速为1ml/min的条件下,分离效果较好,但出峰较慢,峰形较宽。由于乙腈极性较甲醇大,而黏度小。为改善峰形和分离度,将流动相改为乙腈/水=10/90(V/V),对氧化乐果乳油样品分离效果很好,且出峰变快,峰形窄。但植物提取残留样的检测试验结果并不很理想。仍有个别样品中杂峰与氧化乐果峰混。将流动相配比改为乙腈/水=6/94(V/V),分离很好。为节省乙腈用量,先将流动相配比改为乙腈/水=3/97(V/V),出峰太慢,峰形不好。又用乙腈/水=6/94(V/V)的流动相,流速改为0.8ml/min,出峰也较慢。在流速定为1ml/min时,则分离度、出峰速度均很理想。氧化乐果与其它杂质峰分离完全,峰形对称,保留时间也比较适中。

为得到更好的分离度,在采用乙腈/水=6/94(V/V)的流动相,流速为1ml/min的条件下又用LiChrosorb RP-18 10 μ 色谱柱(200mm×4.6mm)进行试验,结果表明,分离效果虽然最好,但出峰慢。氧化乐果与其它杂质峰分离完全,但保留时间较长。

此时,若调整流动相配比,增加乙腈的比例可以加快各组分的出峰速度。但这样势必会提高分析成本,同时也增大了废液的毒性,又恐与其它杂峰分离度变坏,且与LUNA5 μ C18柱(150mm×4.6mm)相比对添加回收率值几乎没有影响。因此,LiChrosorb RP-18 10 μ 色谱柱(200mm×4.6mm)也不宜采用。

因为氧化乐果出峰后还有一些未知杂峰出峰速度较慢,为使分析速度加快,我们采用A泵为乙腈流动相,B泵为水流动相。首先在B泵比例为94%的情况下将仪器稳定好,进样。当氧化乐果峰完全出完后,工作站停止记录色谱图。立即将流动相换成B泵0%,这样可以加快出峰速度缩短分析时间。当杂峰出完后,将流动相换回B泵94%,稳定后再进下一个样品。

同时,为减小误差,降低最低检出浓度,进样量定为50 μ l。为减小溶剂出峰影响,植物及土壤样品备测液上机测试前用乙腈定容至10ml。

2.1.3 检测波长的考察

氧化乐果在220nm左右有较高的紫外吸收,通过对210、220、230nm波长的检测实验观察到:在210nm处,几乎所有峰响应值都很大,本底值较高,一些无关峰干扰测定。在220nm处,氧化乐果吸收峰较大,其它峰响应值明显变小,在氧化乐果保留时间范围内无其它峰干扰测定,是较为理想的检测波长。为降低其它非检测目标峰峰值,采用了230nm检测波长,但氧化乐果峰也有较大降低,这样会降低检测的灵敏度。综合利弊,宜选用220nm做检测波长。

2.2 样品中氧化乐果提取方法的研究

参考农残分析中介绍的样品提取和净化方法,结合经验和试验条件,试验对其提供的方法加以简化,由于添加回收率简化前平均为88.30%,简化后为88.28%,几乎无差异。故用简化后的提取和净化方法。减掉净化步骤可以减少工作量,节省分析时间,节约试剂用量,降低分析成本。

2.2.1 土壤样品:样品风干后碾碎,除去沙砾和植物残骸,充分混合,过40目筛,称取100g土样置于500ml碘量瓶中,加入100ml水和200ml丙酮,浸泡30分钟。在超声振荡器振荡15分钟,用布氏漏斗抽滤,瓶及残渣用丙酮洗3-5次并抽滤。滤液合并后装入500ml容量瓶,用丙酮定容,取250ml放入500ml分液漏斗中,用200、100、100、100ml二氯甲烷分4次振荡提取,静置分层。分出二氯甲烷液经盛有硫酸钠的砂芯漏斗脱水过滤入1000ml圆底烧瓶中,于真空旋转蒸发仪中浓缩至干,残留物用约5ml丙酮溶解并无损转移至小瓶中冷藏备测。

2.2.2 植物样品:准确称取待测风干样10g置于500ml碘量瓶中,加入水-甲醇混合液300ml(水:甲醇=1:2),浸泡30分钟。在超声振荡器振荡15分钟,用布氏漏斗抽滤,残渣重复上述操作再提取一次并抽滤。滤液合并后装入1000ml圆底烧瓶,用真空旋转蒸发仪浓缩至约100ml,冷却后放入500ml分液漏斗中,用250、250、250ml二氯甲烷分3次振荡提取,静置分层。分出二氯甲烷液经盛有硫酸钠的砂芯漏斗脱水过滤入1000ml圆底烧瓶中,于真空旋转蒸发仪中浓缩至干,残留物用约5ml丙酮溶解并无损转移至小瓶中冷藏备测。

备测样品上机前恢复至室温后用乙腈定容至10ml,仪器稳定后上机测定。采用外标定量。方法操作简单、速度较快,无需特殊设备。所用溶剂价格不贵,毒性相对较小,常规实验室均可实施。

2.3 分析方法精密度、准确度的检验

2.3.1 回收率的测定

回收率是考察分析方法准确度的重要指标。回收率越接近100%,表明测得数据越准。因为空白对照组的土壤、植物中应该没有氧化乐果。那么,在空白样品中定量加入氧化乐果标样,可计算其理论量。再实际检测,将测得值与理论值相比,即可计算出回收率。对标样、空白样品与添加氧化乐果后样品的图谱进行比较,结果表明,在选定的色谱条件下,氧化乐果标样出峰时间适中,峰形很好。且待测样品中氧化乐果出峰时间区段基本没有样品中的各杂质峰出现,因此,比较容易辨别氧化乐果峰,使残留测定更为方便。

根据残留测定要求,设定氧化乐果回收率的添加浓度植物样品为0.02、0.2、2mg/kg,土壤样品为0.004、0.04、0.4 mg/kg。具体操作方法为:称取50g植物样品和250g土壤样品(不喷施氧化乐果的大豆和土壤的参照样品)各三份。准确称取0.01g氧化乐果标样于1#100ml容量瓶中,用水定容后取1ml两份,各用水稀释10倍,分别均匀喷洒于一份土壤样品和一份植物样品。另移取1ml于100ml容量瓶中,用水定容后取两份10ml分别均匀喷洒于第二份土壤样品和植物样品。在2#容量瓶中取1ml两份,各用水稀释10倍,分别均匀喷洒于第三份土壤样品和植物样品。这样,植物样品中氧化乐果的含量分别达0.02、0.2、2mg/kg,土壤样品为0.004、0.04、0.4 mg/kg。将样品搅拌均匀后,充分吸附。计算出每10g植物样品和50g土壤样品中氧化乐果的量。2小时后将添加氧化乐果的样品按上文选定的提取方法进行预处理,上机分析,每个处理测定3次。结果表明,所采用的分析方法根部回收率为88.6%—100.5%;茎部回收率为89.5%—99.3%;叶部回收率为88.5%—101.4%;荚皮部回收率为94.5%—99.7%;豆粉回收率为87.3%—

101.5%;土壤回收率为87.7%—98.4%。药残留登记试验准则中要求添加回收率的范围在70%—110%,一般平均在80%以上。本文所采用的分析方法,完全符合残留分析精度要求。

2.3.2 最小检出量的测定

为检验分析精度,首先考察该检测方法的最小检出量,具体操作步骤如下:

在选定的分析条件下,待仪器稳定后,将配制成1ppm的氧化乐果标准溶液进样10 μ l,根据其测得峰高,将进样量减至1 μ l,还有较高出峰,将1ppm的氧化乐果标准溶液稀释10倍,再进样1 μ l,测得峰高较基线噪音高近3倍。再减小进样量,分辨不出氧化乐果峰。由此方法本文测得最小检出量为1.08 \times 10⁻¹⁰g。最低检出浓度计算公式为:

最低检出浓度(mg/kg)=

$$\frac{\text{最小检出量}(\text{ng}) \times \text{样本溶液定容体积}(\text{ml})}{\text{样本溶液进样体积}(\mu\text{l}) \times \text{称样重量}(\text{g})}$$

在称取待测样10g,样本溶液定容10ml,进样50 μ l情况下,大豆植株各部位最低检出浓度为2 μ g/kg。而土壤称样为100g,取浸出溶液的一半进行萃取,定容及进样量与植株相同,则最低检出浓度为0.4 μ g/kg。且液相色谱允许进样量更大(可达200 μ l或更多),所以最低检出浓度还可大大降低。

2.3.3 精密度的测定

精密度是考察检测方法精度最为重要的数据。为检验所选定分析方法测试数据的重现性,本研究对添加不同浓度氧化乐果标样的豆粉样品分别进行了6次平行测定,结果如表1。

表2据表明,本文所选定分析方法的变异系数在添加0.02mg/kg时为16.98%,添加0.2mg/kg时为7.35%,添加2mg/kg时为0.99%。而残留分析要求添加浓度在1—10、0.1—1、0.01—0.1 mg/kg时,变异系数应在10%—25%、25%—50%、50%—100%。本测定方法变异系数值在残留分析

表1 方法精密度数据

Table 1 Data for judging the precision of analysis method

1	2	3	4	5	6	标准偏差 Std. Deviation	变异系数(%) CV
0.152	0.195	0.213	0.253	0.175	0.164	0.0326	16.98
2.256	2.082	2.206	2.247	2.336	2.265	0.1642	7.35
21.928	22.243	21.876	21.981	22.046	21.722	0.2178	0.99

要求精度范围内。

2.3.4 线性相关性的分析

样品中氧化乐果的含量是用色谱图中氧化乐果

峰的峰高来计算的,为确定样品中氧化乐果含量与峰高之间的关系,特进行如下实验。配制0.05ppm、0.1ppm、0.2ppm、0.3ppm、0.4ppm五种不同浓度的

氧化乐果标样溶液,在要求的色谱条件下依次进样50 μ l,测得峰高与浓度对应值如表2。

表2 浓度与峰高测定数据

Table 2 Concentration and peak value

浓度 mg/L Concentration	0.065	0.130	0.216	0.324	0.432
峰高 mAU Peak	0.048	0.112	0.210	0.313	0.424

从测定值计算的回归方程为: $Y = 1.0258X - 0.018$, 相关系数为 0.9997, 达到及显著水平。表明选定方法在较宽浓度范围内浓度与峰高呈良好的线性相关性, 符合分析精度要求。

3 结论

3.1 以获取理想的分离度为目标, 综合各项因素, 最终选定的分析条件为:

采用美国 HP1100 型液相色谱仪, 带紫外检测器, 色谱工作站, 数据处理系统。色谱柱为 LU-NA5 μ C18 150mm \times 4.6mm; 流动相为乙腈/水=6/94(V/V); 检测波长为 220nm; 进样量为 50 μ l; 流速为 1ml/min; 柱温为室温(\pm 25 $^{\circ}$ C)。

3.2 用甲醇-水和丙酮-水做提取液, 用二氯甲烷做萃取剂从大豆及土壤中回收氧化乐果, 并用液相色谱紫外检测器外标法定量测定其残留量, 方法最小检出量低, 达 0.108ng, 最低检出浓度大豆植株和子粒可达 2 μ g/kg, 土壤可达 0.4 μ g/kg。添加回收率

为 87.3%—101.5%; 变异系数为 0.99—16.98%。说明氧化乐果残留 HPLC 分析法是一个精度较高的新方法。

参 考 文 献

- 1 汪文娟, 吴学田. 甲基异柳磷在大豆田残留动态研究[J]. 农药, 1990, 29(4), 29—30
- 2 张恒武, 张文芳, 宫百授, 等. 杂草莠在大豆上的残留试验[J]. 黑龙江农业科学, 1990, (4), 43—45
- 3 陈道文, 杨红. 氟啶黄隆在大豆田土壤中的残留动态研究[J]. 农药, 1993, 32(6), 40—41
- 4 于建奎, 赵德友, 刘炳海, 等. 乙草胺在大豆和土壤中的残留研究[J]. 农药, 1998, 37(1), 28—30
- 5 张浩, 张成文, 刘伊玲. 大豆中赛乐特残留量分析的研究[J]. 吉林农业科学, 1998, (1), 73—75
- 6 龙苏, 周毅刚. 固相萃取气相色谱法测定大米中多种有机磷农药残留量[J]. 实用预防医学, 2001, 8(5), 341—342
- 7 中华人民共和国农业部农药检定所, 农产品农药残留限量标准汇编[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001
- 8 吴春先, 慕立义. 我国农药残留分析技术发展概述[J]. 农药科学与管理, 2002, 23(2), 13—16
- 9 路平. 气-质联用法对蔬菜中农药残留量的分析[J]. 农药, 2002, 41(9), 23, 11
- 10 史延茂. 采用酶抑制法的农药残留速测技术[J]. 农药, 2003, 42(增刊), 53
- 11 M. Joyoda, K Adachi. Simple analytical method for OP pesticide residu in milk[J]. AOAC, 1990, 73(5)

STUDY ON ANALYSIS METHOD OF OMETHOATE RESIDUES IN SOYBEAN

Jiang Xin¹ Jiang Defeng² Zhang Wei² Xie Futi² Wang Haiying² Chen Zhenwu²

(1. Shenyang Research Institute of Chemical Industry, Shenyang 110021;

2. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract The method and conditions on analysing omethoate residues of soybean were studied with HPLC1100. The results showed that the superior analysis conditions were as follows: chromatographic pillar was LUNA5 μ C18 150mm \times 4.6mm, fluid solution was a mixture of CH₃CN/ water 6/94(V/V), measuring wavelength was 220nm; entering sample quantity was 50 μ l, flowing speed was 1ml/min, pillar temperature was \pm 25 $^{\circ}$ C. The method in this article was certificated to be applied with the minimum checking-out value of 0.108ng, the minimum concentration 2 μ g/kg in plants and seeds of soybeans as well as 0.4 μ g/kg in soil. The data by this method also showed that the recovery rate ranged from 87.3% to 101.5% and values of the CV were from 0.99% to 16.98%, which conformed that analysing omethoate residues of soybeans by HPLC was a new way with high precision.

Key words Omethoate; Soybean; Residue Analysis