

柱前衍生高效液相色谱法测定白菜及小麦中草甘膦残留量

马为民, 林小虎, 张 燕, 张珊珊, 周印富

(河北科技师范学院, 河北 秦皇岛 066004)

摘 要: 运用荧光衍生试剂FMOC-Cl 衍生草甘膦后, 利用双聚合氨基柱 HPLC 测定了白菜及小麦中草甘膦的含量, 该方法灵敏度高, 可靠性强。通过试验, 找到了最佳衍生条件和色谱条件。该方法通过测定蔬菜及小麦样品得到了确证, 在添加草甘膦标样 1 mg/kg 时, 最低检出限为 0.3 mg/kg, 平均回收率为 82.4%, 变异系数为 10.3%。

关键词: 草甘膦; FMOC-Cl; 高效液相色谱法; 聚合氨基柱; 柱前衍生

中图分类号: Q 94-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)06-0028-03

草甘膦是世界上应用最广泛的除草剂之一, 它是一种广谱、非选择性的除草剂, 已经被使用了 30 多年。草甘膦使用范围的不断扩大推动了草甘膦残留测定技术的发展。

草甘膦分析方法主要包括薄层色谱法、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)。草甘膦的离子特征, 使得 HPLC 要优于 GC。但是由于草甘膦分子中不含有发色团或荧光团, 因此在对草甘膦进行测定时, 首先需要对其进行衍生后才能使用紫外-可见检测器或荧光检

测器进行检测。荧光衍生物可通过柱前使用 FMOC-Cl 或柱后使用邻苯二甲醛-巯基乙醇衍生试剂产生。有很多研究报道利用柱后衍生测定草甘膦的分析方法^[1-2], 柱后衍生试剂只能与伯胺反应, 而不能与仲胺反应, 因此草甘膦在与衍生试剂反应之前要首先水解, 这种方法仪器操作很烦琐。而 FMOC-Cl 作为柱前衍生试剂既可以与伯胺进行反应又可以与仲胺反应, 能够在柱外很好的控制衍生反应的进行, 却不受流动相搭配的影响。但是这个反应的缺点是 FMOC-Cl 与水反应生成 FMOC-OH 副产物, 为了充分得到反应产物, 可以加入过量的衍生试剂, 尽管草甘膦柱前荧光衍生反应研究了很多年, 但是至今基本没有被大家认可的草甘膦与 FMOC-Cl 合适反应比例。

使用 FMOC-Cl 试剂的主要缺点之一, 是在进行草甘膦衍生物的测定时, 在草甘膦色谱峰之前出现一个很大的 FMOC-OH 副产物的峰, 两峰重叠, 干扰了草甘膦

第一作者简介: 马为民(1970-), 女, 硕士, 实验师, 现从事农药残留分析工作。E-mail: kycmwm@sina.com.cn

通讯作者: 周印富。E-mail: zhouyinfu@126.com

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大资助项目(2006BA02A08-9)。

收稿日期: 2008-01-29

[9] 唐延林, 黄敬峰, 王秀珍, 等. 水稻、玉米、棉花的高光谱及其红边特征比较[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 29-35.

[10] 唐延林, 王秀珍, 王人潮. 玉米高光谱及红边特征分析[J]. 山地农业

生物学报, 2003, 22(3): 189-194.

[11] 刘国顺, 李向阳. 利用冠层光谱估测烟草叶面积指数和地上生物量[J]. 生态学报, 2007, 27(5): 1763-1771.

The Study on Hyperspectral Sensing Estimation Models about LAI of Processing Tomato

DU Pei-lin¹, TIAN Li-ping¹, XUE Lin², FAN Ke-yan¹, BAI Li¹, WEI Yan-liu³

(1. College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 2. Institute of Vegetable Science, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 3. Shenmu Middle School, Shenmu, Shaanxi 719300, China)

Abstract: Studied the relationships between processing tomato canopy spectral parameters under the difference of the nitrogenous nutrition level and water level and LAI. The results showed that there were significant correlations between the canopy spectral parameters(NDVI, VARI_{green} and VARI₇₀₀) and LAI. And established the hyperspectral sensing estimation models about LAI of processing tomato.

Key words: LAI; Processing tomato; Canopy spectral parameters; Estimate models

的测定。曾有报道利用 C18 和氨基柱双柱转换技术, 将 FMOC-OH 与草甘膦分开, 但是强碱性条件下, 这种硅基氨基柱的性质会降低, 在试验中利用了一种聚合氨基柱, 它能够接受较宽的 pH 范围, 而且可以再生。

聚合氨基柱由于其很好的机械强度、化学稳定性和较宽的 pH 范围 (2~13), 能够很好的解决试验中的问题。试验主要达到以下目的: 优化草甘膦柱前荧光衍生条件; 研究草甘膦在聚合氨基柱上的保留行为; 研究测定蔬菜及小麦中草甘膦的高效液相色谱条件。

1 材料与方法

1.1 化学药品和试剂(未注明均为分析纯)

99%草甘膦标准品(125 Market St. New Haven, CT 06513, USA), 乙腈(色谱纯), 二氯甲烷, 磷酸二氢钾, 氢氧化钾, 四硼酸钠, 盐酸; 标准储备液: 1 000 $\mu\text{g/mL}$, 标准工作溶液: 0.1~100 $\mu\text{g/L}$ (均用超纯水溶解置于聚丙烯瓶中); 缓冲溶液: pH 9(0.125 M)与 pH 8(0.025 M)四硼酸钠缓冲溶液; FMOC-Cl 溶液: 0.1~100 mM 的 FMOC-Cl 乙腈溶液; 流动相: 第一流动相为乙腈; 50 Mm 磷酸缓冲溶液 (pH 10) (55 : 45, V/V), 流动相 pH 用 6 M KOH 调节, 第二流动相为乙腈: 水 (60 : 40, V/V)。

1.2 仪器设备

高效液相色谱系统(含有 Waters510 泵, Waters420 荧光检测器); 色谱数据工作站(杭州英谱科技开发有限公司); 聚合氨基柱 (250 \times 4.6 mm, 美国); 固相萃取柱(强阳离子交换柱, 1 000 mg, 4 mL, Alltech); 旋转蒸干仪(德国 Heidolph 公司); 超声波振荡器(上海超声波有限公司); 搅碎机(中国)。

1.3 样品的分析

将蔬菜及小麦及小麦样品切碎及粉碎后, 准确称取 2 g 放入聚丙烯瓶中, 加入 40 mL 超纯水置于超声波振荡器中超声提取 10 min, 将提取液转移到 250 mL 聚丙烯分液漏斗, 并加入 20 mL 二氯甲烷液萃取, 去掉有机溶剂层, 将水层转到 250 mL 圆底瓶中, 加 1 mL pH 9 硼酸缓冲溶液蒸干, 水温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。蒸干样品中加入 10 mL 超

纯水, 并用浓盐酸调节 pH 值为 1。取 3 mL 提取液进行阳离子柱净化, 用 40 mL 0.1 M HCl 洗脱并收集, 洗脱液用 3 mL 1 M NaHCO₃ 与 1 mL 硼酸缓冲溶液调节 pH 7。蒸干后用 5 mL 超纯水溶解样品, 取 0.5 mL 进行衍生。

在 0.5 mL 样品溶液中加入 2 mL 0.5 mM FMOC-Cl 衍生溶液与 0.3 mL pH 值为 9 的硼酸缓冲溶液(为避免 FMOC-Cl 沉淀, 在样品中事先加入少量水), 添加水让反应混合物达 4 mL, 在室温下衍生反应保持至少 30 min。为了去掉过量 FMOC-Cl, 向反应物混合物中添加乙酸乙酯萃取, 每次 1 mL, 共 3 次。上机前过 0.45 μm 滤膜。

1.4 高效液相色谱条件

色谱柱: 聚合氨基柱 (250 \times 4.6 mm), 流速: 0.8 mL/min, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 第一流动相为乙腈: 50 Mm 磷酸缓冲溶液 (pH 10) (55 : 45, V/V), 第二流动相为乙腈: 水 (60 : 40, V/V); 荧光检测器: 发射波长为 266 nm, 激发波长为 315 nm。

前 18 min 从第一柱洗脱出来的为 FMOC-Cl 衍生反应的副产物, 自动转为废物, 接着洗脱下来的草甘膦衍生物进入第二柱进行分析。下次分析之前, 用第二流动相冲洗 10 min, 然后再用第二流动相平衡 15 min。

2 结果与讨论

2.1 草甘膦与 FMOC-Cl 的柱前衍生反应

2.1.1 草甘膦与 FMOC-Cl 分子比例对反应的影响
曾见报道有研究草甘膦与 FMOC-Cl 的最佳反应分子比例。在试验中发现其最佳反应摩尔比为 1 : 3×10^3 , 再增加 FMOC-Cl 浓度对反应产物已经没有多大的影响, 通过检测信号强度增加的幅度可以看得出来。在衍生反应中需要过量的衍生试剂的原因是 FMOC-Cl 与水 and 样品中其它含有氨基基团(伯胺或仲胺)化合物的反应。见图 1, 当反应混合物中乙腈与水的体积比为 50 : 50 时, 检测信号强度随着 FMOC-Cl 浓度的增加而增强, 但达到 0.5 mM 时, 信号强度基本无多大变化。此时草甘膦与 FMOC-Cl 摩尔比为 1 : 3×10^3 。

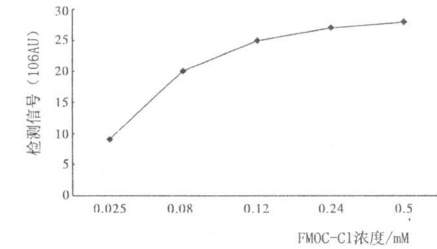


图 1 FMOC-Cl 浓度对检测信号的影响

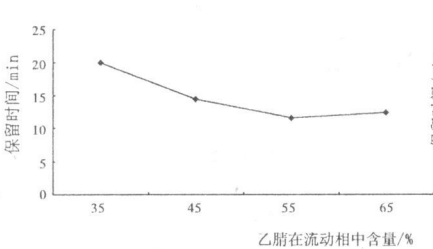


图 2 流动相中乙腈含量对保留时间的影响

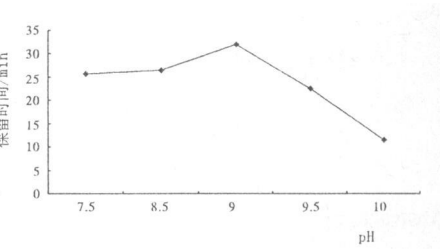


图 3 流动相中 pH 变化对保留时间的影响

2.1.2 衍生反应中水的影响 研究水的含量主要是考虑到 FMOC-Cl 与草甘膦在衍生反应的乙腈/水混合溶

液中的溶解性, 草甘膦溶于水而不溶于有机溶剂, 而 FMOC-Cl 溶于乙腈而不溶于水, 但却与水反应生成

FMOC-OH 副产物。当乙腈在反应混合物中的量超过 65% 时, 就会发现沉淀现象, 这可能是由于溶剂对草甘膦的溶解性降低造成的。当 FMOC-Cl 的浓度超过 0.5 mM 时, 同样有沉淀现象发生。试验中找到了乙腈与水的最佳比例为 50 : 50 (V/V), 这个比例可以很好地解决草甘膦与 FMOC-Cl 溶解性的问题。

2.1.3 反应温度与反应产物的稳定性 衍生反应在 20~30℃ 条件下反应 30 min 即可完成, 衍生物在 0~5℃ 冰箱中可以保存 5 个月。在升高反应温度后, 通过上机观察, 衍生物的信号减弱, 这是因为 FMOC-Cl 与水反应加剧而生成更多的 FMOC-OH 的缘故, 而草甘膦的衍生反应却反而减弱。

2.2 色谱条件的确定

2.2.1 乙腈对洗脱的影响 从图 2 可以看出, 随着乙腈浓度的增加, 草甘膦洗脱能力增强, 当乙腈的浓度增加到 65% 时, 洗脱能力降低, 保留时间延长, 而且峰有些扭曲变形, 这可能是由于缓冲溶液在流动相中的溶解性降低造成的。当乙腈在流动相中比例为 55% (V/V) 时, 洗脱效果最佳, 乙腈含量为 35% 时, 草甘膦保留时间延长, 这是由于流动相的洗脱能力减弱而使草甘膦不易被洗

脱下来的缘故。

2.2.2 流动相的 pH 对洗脱的影响 当流动相为乙腈 : 50 mM 磷酸缓冲溶液 = 55 : 45 (V/V), 从图 3 可以看出, 草甘膦的保留时间随流动相 pH 变化的情况。起初保留时间随着 pH 增加而增加, 当 pH 值为 9 时, 保留时间随 pH 增加而减少。明显可以看出, pH 值在 7.5~9 范围内, 待测物与柱有较强的离子作用, pH 值在 9~10 范围内这种离子作用降低。考虑到峰形与柱子的保护作用, 选择了 pH 为 10。

2.3 对蔬菜及小麦样品的分析检测

用聚合氨基柱对蔬菜及小麦样品测定收到了良好的效果。将前 18 min 分离出来的 FMOC-Cl 副产物弃掉, 不再进入第二柱, 进而使草甘膦得到了很好的分离测定, 见图 4、5。通过添加草甘膦标样, 草甘膦回收率为 82.4%, 最低检出限 0.3 mg/kg (见表 1)。

表 1 蔬菜及小麦样品测定结果 (n=6)

待测物	草甘膦
添加量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	1
平均回收率 / %	82.4
变异系数 / %	10.3

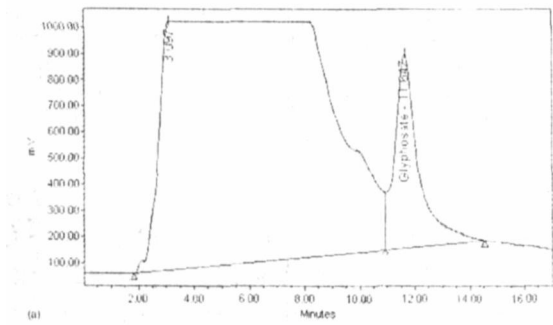


图 4 使用单一柱时的色谱图

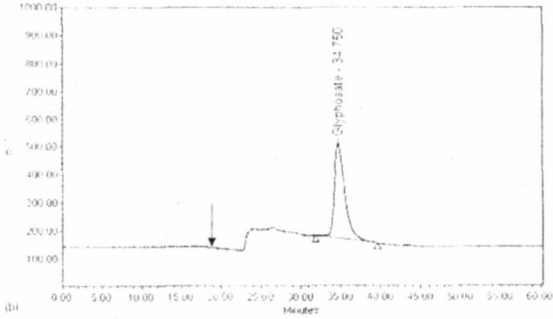


图 5 使用双柱时的色谱图 (箭头所指时间是洗脱液进入第二柱时的时间)

参考文献

[1] Patsias J, Papadopoulou A, Papadopoulou Mourkidou E. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization[J]. Journal of

chromatography A. 2001, 932(1-2): 83-90.
[2] Abdullah M P, Daud J, Hong K S, Yew C H. Improved method for the determination of glyphosate in water[J]. Journal of Chromatography A. 1995, 697(1-2): 363-369.

HPLC Method for Determination of Glyphosate on Chinese Cabbage and Wheat

MA Wei-min, LIN Xiao-hu, ZHANG Yan, ZHANG Shan-shan, ZHOU Yin-fu
(Technique Teacher's Training College of Hebei Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: This paper described a robust and sensitive HPLC method for determination of glyphosate on vegetable material after pre-derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) using coupled polymeric amino columns. New findings about optimization of the derivatisation reaction and chromatographic behaviour. The method was validated using grass samples spiked at the level of 1 mg/kg and gave a detection limit of 0.3 mg/kg for glyphosate and a recovery of 82.4% with RSD of 10.3%.

Key words: Glyphosate; FMOC-Cl; HPLC; Polymeric amino column; Pre-column derivatisation