

固相萃取-高效液相色谱法测定胎菊中残留的胺苯磺隆

高倩妮^{1,2}, 陆宁^{1,2}, 许先猛^{1,2}, 张慧敏^{1,2},
王梦琦¹, 郑文秀¹, 王硕¹, 吴宝杰¹

(1. 亳州学院生物与食品工程系, 安徽 亳州 236800;
2. 亳州市天然产物分离纯化技术研究中心, 安徽 亳州 236800)

[摘要] 建立了测定胎菊中残留的胺苯磺隆的固相萃取-高效液相色谱法, 具体过程为: 样品粉碎, 经乙腈提取, E13-5006 SPE 固相萃取柱净化, Kinetex C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 5.0 μm) 分离, 高效液相色谱法检测, 外标法定量。色谱条件为: 乙腈和水为流动相梯度洗涤, 0 ~ 19 min: 体积分数为 5% ~ 20% 的乙腈, 20% 乙腈保持 1 min, 柱温为 35 °C, 流速为 1.20 mL/min, 检测波长为 220 nm。结果表明, 当固相萃取 4 mL 甲醇作为洗脱液时, 回收率显著提高, 胺苯磺隆在 10 ~ 200 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 $R^2 = 0.9921$, 方法的检出限 ($S/N=3$) 为 0.20 ~ 0.50 ng/g, 定量限 ($S/N=10$) 为 0.66 ~ 1.65 ng/g。在 50 ~ 200 ng/g 范围的室内回收实验中, 胺苯磺隆平均回收率为 86.3% ~ 103.2%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) ($n=6$) 为 3.77%。该方法前处理简单、灵敏, 适用于胎菊中残留的胺苯磺隆测定。

[关键词] 胎菊; 固相萃取; 胺苯磺隆; 农药残留; 高效液相色谱法

[中图分类号] TS 207.3

Determination of Ethametsulfuron Residues in Fetal Chrysanthemum by Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography

GAO Qianni^{1,2}, LU Ning^{1,2}, XU Xianmeng^{1,2}, ZHANG Huimin^{1,2},
WANG Mengqi¹, ZHENG Wenxiu¹, WANG Shuo¹, WU Baojie¹

(1. Department of Biotechnology and Food Engineering, Bozhou University, Bozhou 236800, China;

2. Bozhou City Natural Product Separation and Purification Technology Research Center, Bozhou 236800, China)

Abstract: A solid phase extraction-high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of ethametsulfuron residues in fetal chrysanthemum was established. That was, samples were crushed and extracted by acetonitrile, then purified by E13-5006 SPE column. The purification was separated by Kinetex C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 5.0 μm), and quantified by HPLC external standard method. Chromatographic conditions were acetonitrile and water as mobile phase gradient washing 0-19 min; the volume fraction of acetonitrile was 5%-20%, and 20% acetonitrile was kept for 1 min; the column temperature was 35 °C and the flow rate was 1.20 mL/min, and the detection wavelength was 220 nm. The results showed that the re-

[收稿日期] 2024-05-20

[基金项目] 安徽省高等学校科学研究项目 (2022AH052411, 2023AH052271); 科研平台专项研究项目 (BYP2021Z05); 校级一般教研项目 (2023XJXM023, 2023XJXM042)

[通信作者] 高倩妮 (1992—), 硕士, 讲师, 主要从事食品加工与质量安全研究。E-mail:1151988674@qq.com

covery was significantly improved, when solid extraction of 4 mL methanol was used as eluent. The linear relationship between ethametsulfuron was in the range of 10-200 mg/L. The correlation coefficient was $R^2 = 0.9921$ and the detection limit ($S/N = 3$) was 0.20-0.50 ng/g, and the limit of quantification ($S/N = 10$) was 0.66-1.65 ng/g. In the laboratory recovery experiments ranging of 50-200 ng/g, the average recovery rate of ethametsulfuron was 86.3%-103.2%, and the relative standard deviation (RSD) ($n = 6$) was 3.77%. The method is simple, sensitive and suitable for the determination of ethametsulfuron pesticide residues in fetal chrysanthemum.

Keywords: fetal chrysanthemum; solid phase extraction; ethametsulfuron; pesticide residues; high performance liquid chromatography

0 引言

近年来,在花草茶种植过程中,为减少病虫害造成的损失,农药的使用非常广泛。其中,胎菊作为典型的花草茶,其农药残留问题已引起国内外研究者的普遍关注^[1]。胺苯磺隆别名油磺隆,也称苯甲酸甲酯,是一种选择性内吸传导性的新型超高效除草剂^[2],其作用机制是通过抑制乙酰乳酸合成酶而发挥除草作用,具有高效、广谱、低毒、高选择性等特点。但微量胺苯磺隆残留即可对后茬作物造成危害^[3],而且在土壤中难降解,半衰期长,易于在环境中积累,可通过食物链在生物体内富集,对生态环境、动植物及人体健康造成较大的影响^[4]。胺苯磺隆作为常用除草剂,常残留于胎菊等花草茶和中药材中,因此对禁用农药残留胺苯磺隆的检测方法研究具有重要意义。

磺酰脲类除草剂残留的检测方法有高效液相色谱-质谱联用法^[5]、毛细管电泳法^[6]和高效液相色谱法^[7]。高效液相色谱-质谱联用技术是以高效液相色谱为分离手段,以质谱为鉴定工具的一种分离分析技术^[8],具备高效分离、高精确性、高精密度测试的功能,但其结构复杂、维护费用高,对专业技术人员的操作要求也较高,导致操作苛刻,适用性不强。毛细管电泳法具有高效、快速和微量的优点,但在迁移过程中,它的可靠性、采集精度和检测灵敏度都低于高效液相色谱法^[9]。高效液相色谱法能够将样品中的各种化合物分开,具有较高的分辨率和灵敏度,操作自动化,且样品制备简单^[10],可以进行定量分析,应用范围广。魏一婷^[11]建立了一种高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶、三七中胺苯磺隆和甲基胺苯磺隆的残留;王英等^[12]利用高效液相色谱-串联质谱法对三七中胺苯磺隆残留量的不确定度进行分析;赵国栋等^[13]建立了一种利用高效液相色谱法测定茶叶中磺酰脲类残留的方法。前人的这些研究缺少对样品前处理条件的优化,仅仅停留在色谱条件和方法的建立上,而目前针对胎菊中残留的胺苯磺隆高效液相样品前处理方法的研究却很少,且胎菊比普通的茶叶基质相对更复杂。因此,本文通过研究胎菊样品前处理条件如提取剂种类、固相萃取洗脱剂种类和洗脱体积等对样品分离效果和回收率的影响,优化胎菊中胺苯磺隆的检测方法,提高胺苯磺隆的回收率。

1 材料与方法

1.1 样品、仪器与试剂

供试样品:胎菊,直径为 1.5 cm,总苞片为 3 层,安徽三义堂中药饮片有限公司。

LC16 型高效液相色谱仪,岛津(上海)实验器材有限公司;SY-2110 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;GTR318C 型高速台式离心机,湖南可成仪器设备有限公司;KQ-800DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

乙腈中的胺苯磺隆标液,坛墨质检-标准物质中心,质量浓度为 1 g/L;甲醇、丙酮、乙腈均为色谱纯,安徽同洲维普科技有限公司;纯水,娃哈哈饮用纯净水。

1.2 实验方法

1.2.1 胺苯磺隆标准溶液的配制

准确吸取胺苯磺隆标准溶液 100 μL , 置于 2 mL 进样瓶中, 用流动相定容至 0.5 mL。准确移取储备液按梯度稀释配制成质量浓度为 10、20、50、80、100、200 mg/L 的标准系列工作液, 储备于冰箱中备用。

1.2.2 色谱条件优化

1.2.2.1 流动相梯度洗脱的确定

色谱柱为 Phenomenex Kinetex C_{18} 色谱柱 (50 mm \times 2.1 mm, 5.0 μm); 流动相的 A 相为纯乙腈, B 相为纯水; 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 220 nm, 进样量为 1.0 μL 。梯度洗脱程序设置 5 种不同梯度变化, 具体见表 1。

1.2.2.2 流速的确定

适宜的流速可以提高检测效果, 同时也可以有效防止拖尾现象。本实验选择 0.20、0.50、0.80、1.00、1.20 mL/min 等 5 种不同流速, 观察流速对分离效果的影响。

1.2.3 样品的处理条件优化

1.2.3.1 提取剂的确定

采用小型高效的粉碎机对胎菊样品进行细磨, 过筛。采用 3 种提取剂分别对样品进行提取。

1) 纯水。通过冷凝回流方式提取样品 2 g, 胎菊-水的料液比为 1: 10, 提取 2 次。第 1 次提取时间为 2 h, 第 2 次提取时间为 1.5 h。2 次提取液使用旋转蒸发仪进行浓缩, 蒸发至近干。

2) 乙腈。参照文献 [14], 取样品 2 g 于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 乙腈, 功率为 800 W 超声提取 20 min, 离心。将上清液在漏斗中过滤, 将残渣按上面步骤重复提取 1 次, 2 次的滤液收集到旋蒸瓶中, 在旋转蒸发仪中旋转蒸发至近干。

3) 乙腈和甲醇。参照文献 [15], 取样品 2 g 于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL φ (乙腈): φ (甲醇) = 9: 1 的混合液, 在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、功率为 100 W 条件下超声提取 20 min, 在温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、转速为 4 000 r/min 条件下离心 15 min。取上清液在漏斗中过滤, 将残渣按上面步骤重复提取 1 次, 2 次滤液收集到旋蒸瓶中, 在旋转蒸发仪中蒸发至近干。

1.2.3.2 净化方法的优化

1) 固相萃取洗脱液种类的确定。参照文献 [16], 10 mL 的 V (甲醇): V (水溶液) = 1: 4 混合液预淋洗活化 SPE 柱, 弃去流出液, 然后将含有胺苯磺隆的胎菊阳性样品粗提液经 SPE 柱净化, 选用不同种类洗脱液、甲醇、乙醇、丙酮和乙腈进行等体积洗脱。收集其余洗脱液, 水浴蒸近干, 2 mL 乙腈溶解过滤膜待测, 观察不同种类洗脱液对胺苯磺隆回收率的影响。

2) 固相萃取洗脱液体积的确定。参照文献 [16], 10 mL 的 V (甲醇): V (水溶液) = 1: 4 混合液预淋洗活化 SPE 柱, 弃去流出液, 然后将含有胺苯磺隆的胎菊阳性样品粗提液经 SPE 柱净化, 选用 2、4、8、12、16、18 mL 不同体积的甲醇进行洗脱。收集其余洗脱液, 水浴蒸近干, 2 mL 乙腈溶解过滤膜待测, 观察不同洗脱体积对胺苯磺隆回收率的影响。

表 1 胺苯磺隆梯度洗脱条件

Tab. 1 Gradient elution conditions of ethametsulfuron

梯度 种类	时间/min	流速/ (mL \cdot min $^{-1}$)	φ (乙腈)/%	φ (纯水)/%
1	0	1.20	5	95
	19.0	1.20	20	80
	19.1 ~ 20	1.20	20	80
2	0	1.20	5	95
	19.0	1.20	30	70
	19.1 ~ 20	1.20	30	70
3	0	1.20	5	95
	19.0	1.20	45	55
	19.1 ~ 20	1.20	45	55
4	0	1.20	50	95
	19.0	1.20	60	40
	19.1 ~ 20	1.20	60	40
5	0	1.20	5	95
	19.0	1.20	80	20
	19.1 ~ 20	1.20	80	20

2 实验结果及其分析

2.1 色谱条件

2.1.1 流动相梯度的确定

使用乙腈-水作为流动相时，胺苯磺隆标准物出峰的峰形尖锐，不拖尾。但不同体积比的乙腈和水会引起其他杂质的出现，梯度洗脱较等度洗脱的出峰效果更好，故本实验选择梯度洗脱。由图 1 可见，当乙腈-水的梯度洗脱 $\varphi(\text{乙腈}) = 5\% \sim 20\%$ 时，分离的效果较好，峰形尖锐且对称，周围未见其他杂峰，这也与候新茹等^[17]的超高效液相色谱-串联质谱法测定环境水中 7 种新烟碱类农药研究结果相符。而当梯度洗脱 $\varphi(\text{乙腈}) = 5\% \sim 30\%$ 、 $5\% \sim 45\%$ 、 $5\% \sim 60\%$ 、 $5\% \sim 80\%$ 时，目标物周围出现溶剂杂峰，可能是过高的乙腈比例作为流动相有助于易溶于乙腈的杂质保留，导致干扰基质较多，影响目标物分离及回收率。

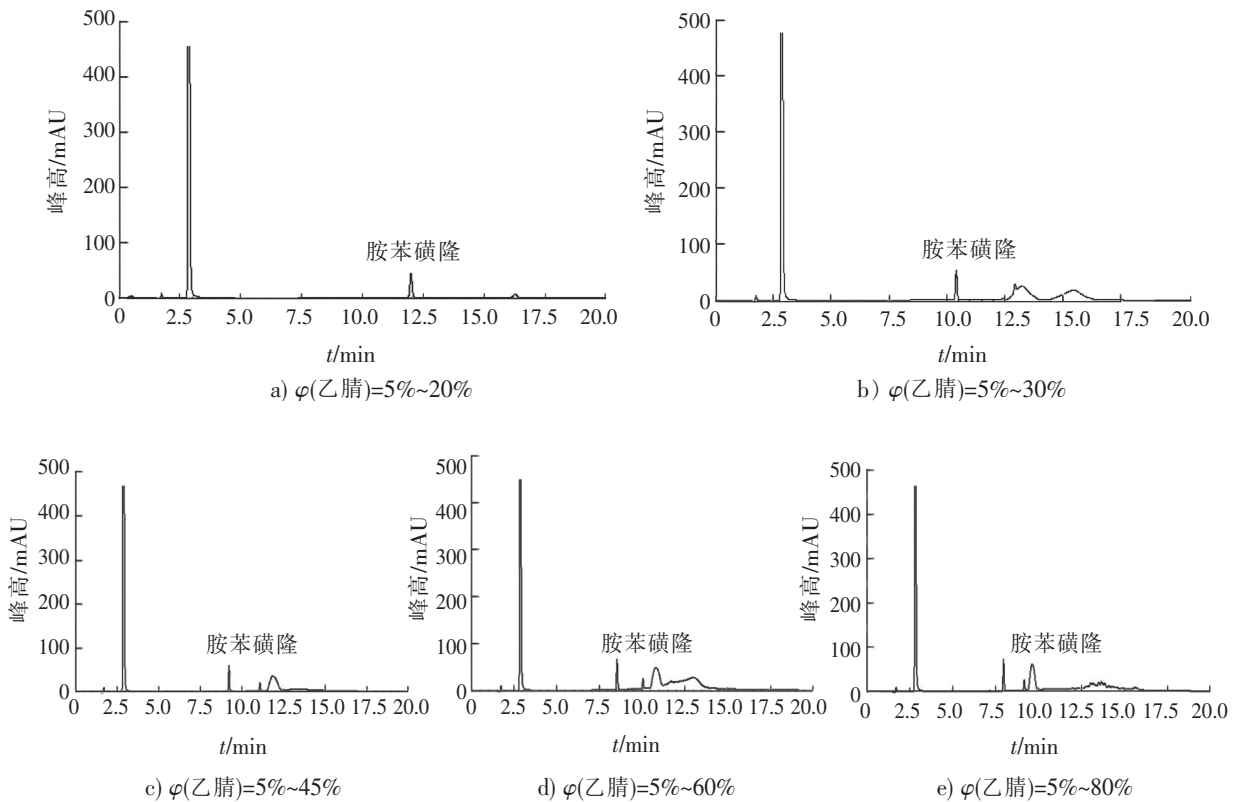


图 1 不同流动相梯度洗脱比例色谱图

Fig.1 Chromatograms of gradient elution ratios for different mobile phases

2.1.2 流速的确定

在同种流动相下，同一物质不同的流速在色谱柱中的保留时间也不同，流速增加有助于缩短保留时间，提高检测效率，同时还可以有效防止峰的拖尾，但是流速过快会导致目标峰的分离度降低^[18]。故本实验选取 0.20、0.50、0.80、1.00、1.20 mL/min 等 5 种不同流速，观察流速对基线稳定性和目标物出峰时间的影响。

由图 2 可见，当流速为 0.20、0.5 mL/min 时，出峰时间延后，溶剂峰和目标峰没有分离，峰形较宽；当流速为 0.8、1.0、1.2 mL/min 时，目标峰和溶剂峰完全分离，且随着流速的增加，出峰时间靠前，峰形对称。相比之下，当流速为 1.20 mL/min 时，出峰时间适宜，峰形尖锐，且无拖尾，峰形独立。因此，本实验最终选择流速为 1.20 mL/min。

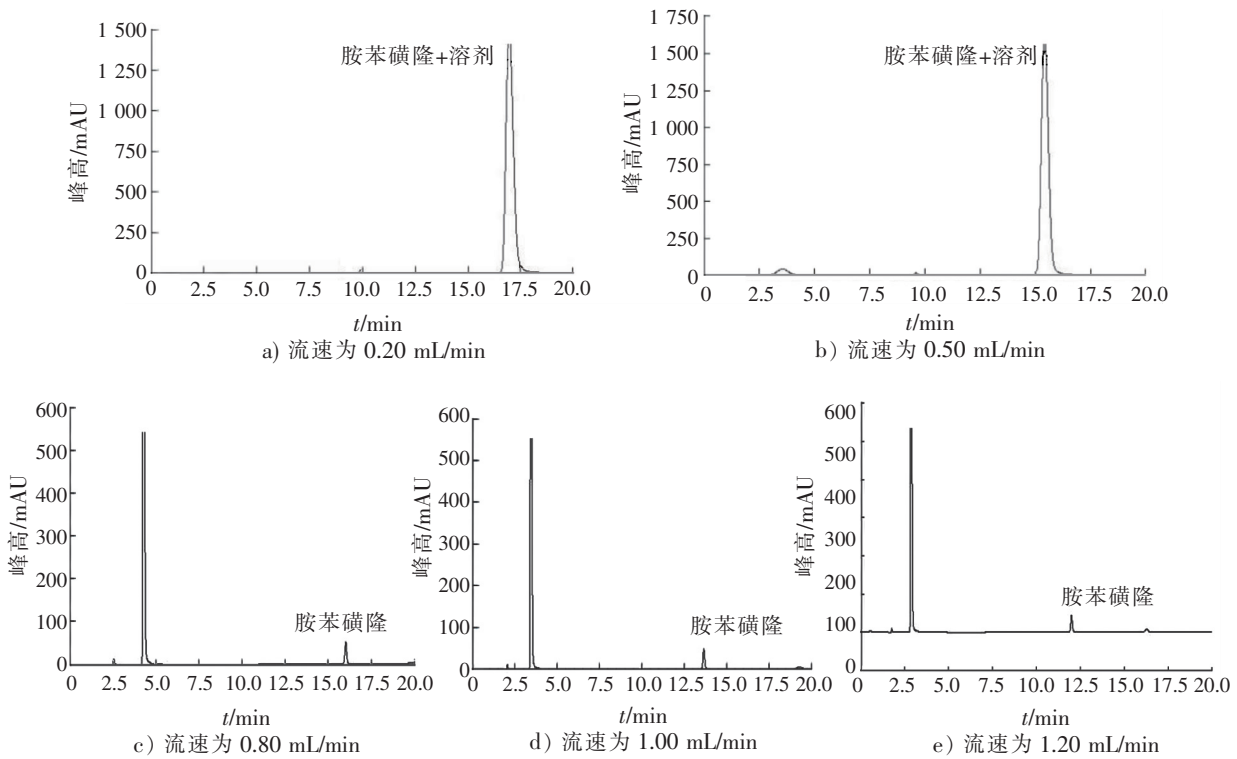


图2 不同流速下的色谱图
Fig.2 Chromatograms at different flow rates

2.2 样品前处理优化
2.2.1 提取剂的确定

以胎菊为原料, 选择水、纯乙腈和乙腈-甲醇作为提取液。由图 3、图 4 可见, 3 种提取剂对胺苯磺隆检测影响不显著, 但目标物在水中溶解性不好, 而纯乙腈作为提取液相对较简单, 且用乙腈作为提取剂的阳性样品, 其出目标物峰值高度适宜, 峰形尖锐, 且基线相对稳定, 加标回收率达到 54.9%。故本实验最终选择乙腈作为提取液提取样品, 但需要进一步净化处理。

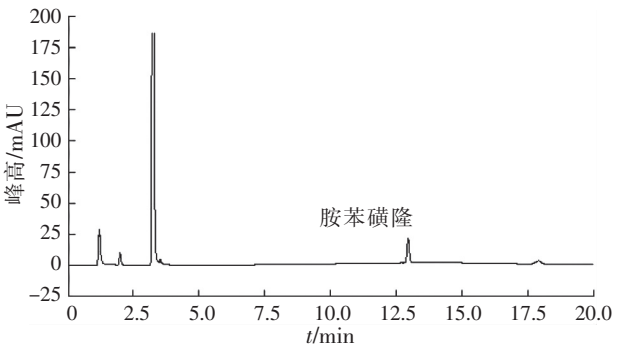


图3 乙腈作为提取液胎菊阳性样品色谱图
Fig.3 Chromatogram of fetal chrysanthemum samples with acetonitrile as extraction solution

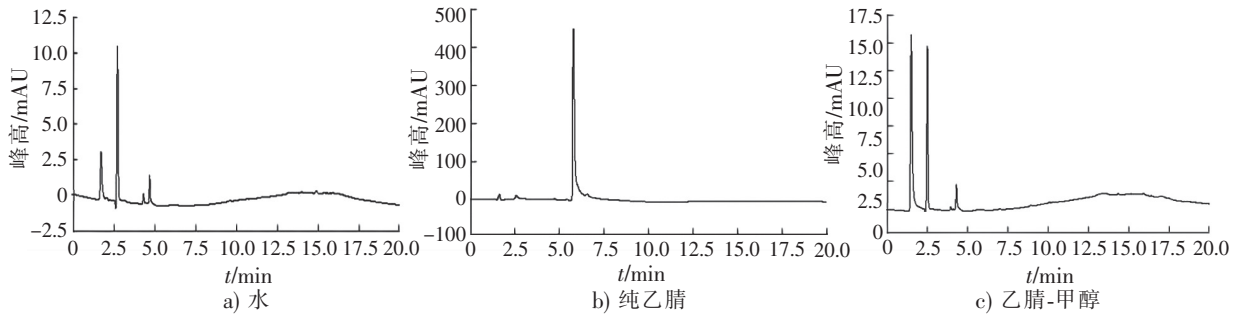


图4 不同提取剂下胎菊空白色谱图
Fig.4 Blank chromatogram of fetal chrysanthemum with different extractants

2.2.2 SPE 柱净化处理

2.2.2.1 固相萃取洗脱液种类的确定

固相萃取洗脱液的种类对目标物影响较大，本文选用甲醇、乙醇、丙酮和乙腈 4 种洗脱液进行洗脱，平行实验 3 次。由表 2 可见，随着洗脱液种类的变化，阳性胎菊样品中胺苯磺隆回收率差异显著，其中丙酮作为洗脱液的回收率只有 54.6%，而甲醇作为洗脱液的胺苯磺隆回收率可达 86.3%，故本实验选择纯甲醇作为洗脱液。

2.2.2.2 固相萃取洗脱液体积的确定

洗脱液体积对目标物回收率影响较大，本实验选择 2、4、8、12、16、18 mL 不同体积甲醇进行洗脱。由表 3 可见，随着洗脱液体积的增加，胺苯磺隆回收率先增加后降低，最大达到 86.3%，故本实验选择甲醇洗脱液体积为 4 mL。

表 2 不同种类洗脱液胎菊阳性样品的回收率

Tab.2 Recovery rates of fetal chrysanthemum samples with different eluents

单位: %		
洗脱液种类	平均回收率	相对标准偏差
甲醇	86.3	2.56
乙醇	66.5	3.55
丙酮	54.6	3.82
乙腈	80.4	4.13

表 3 不同体积洗脱液胎菊阳性样品的回收率

Tab.3 Recovery rates of fetal chrysanthemum with different volumes of eluents

洗脱液体积/mL	回收率/%	相对标准偏差/%
2	77.2	4.37
4	86.3	2.56
8	70.7	3.59
12	30.4	4.10
16	31.4	3.84
18	26.8	5.15

胎菊阳性样品提取浓缩液经过已活化好的 SPE 固相萃取柱，弃去流出液，用 4 mL 甲醇洗脱净化后，降低了原样品基质干扰，结果如图 5 所示。可见，样品色谱图基线相对稳定，且胺苯磺隆目标物出峰位置不再漂移，加标回收率为 86.3%，显著高于净化前阳性样品胺苯磺隆的回收率。

2.3 仪器方法验证

2.3.1 标准曲线及线性范围

将胺苯磺隆标准溶液逐步稀释为 10、20、50、80、100、200 mg/L，以目标峰面积为纵坐标、进样浓度为横坐标进行线性拟合，得到的标准曲线如图 6 所示。可见，在 10 ~ 200 mg/L 的范围内，标准曲线的方程为 $y = 7\,929.2x - 35\,525$ ，其线性良好 ($R^2 = 0.992\,1$)。以添加回收实验的信噪比考察方法的检出限为 0.20 ~ 0.50 ng/g，定量限为 0.66 ~ 1.65 ng/g。

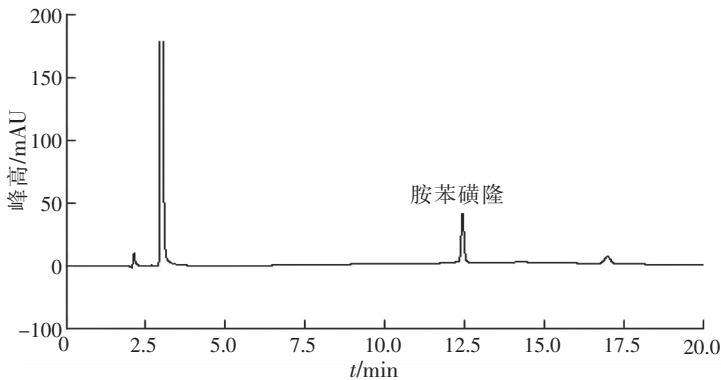


图 5 乙腈作为提取液胎菊阳性样品过 SPE 固相萃取柱色谱图
Fig.5 Chromatographic diagram of fetal chrysanthemum samples through solid phase extraction column when acetonitrile was used as extraction liquid

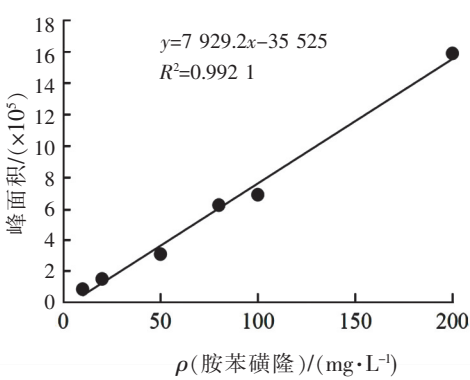


图 6 胺苯磺隆的标准曲线
Fig.6 Standard curve of ethametsulfuron

2.3.2 回收率实验

本实验的室内回收率和精密度实验以不含胺苯磺隆残留的胎菊为空白样品基质,添加 50、100、200 mg/L 等 3 个不同质量浓度的胺苯磺隆标准液,进行 6 次重复实验,测得的胎菊阳性样品胺苯磺隆的平均回收率为 86.3% ~ 103.2%,相对标准偏差为 3.77%,方法重现性好,可满足线性分析的要求。

3 结论

通过考察流动相不同梯度洗涤和不同流速对色谱分离效果的影响,得到的色谱条件为:乙腈和水作为流动相,梯度洗涤 0 ~ 19 min,乙腈体积分数为 5% ~ 20%,20% 乙腈保持 1 min,流速为 1.20 mL/min,分离效果好且保留时间短。在此条件下,考察了样品前处理条件如提取剂种类、固相萃取洗脱剂种类和洗脱体积对样品分离效果和回收率的影响,发现样品经过固相萃取柱净化后,目标物回收率由 54.9% 显著提高至 86.3%。使用固相萃取-高效液相色谱法测定胎菊中胺苯磺隆的残留,胺苯磺隆的保留时间为 12.028 min,胺苯磺隆在 10 ~ 200 mg/L 范围内线性关系良好,相关系数 $R^2 = 0.9921$,方法检出限 ($S/N=3$) 为 0.20 ~ 0.50 ng/g,定量限 ($S/N=10$) 为 0.66 ~ 1.65 ng/g。在 50 ~ 200 ng/g 范围内的室内回收实验中,胎菊中胺苯磺隆平均回收率为 86.3% ~ 103.2%,相对标准偏差 ($n=6$) 为 3.77%,可满足定量分析要求。

[参考文献]

- [1] 梁广坤. 除草剂药害的识别和对策[J]. 农业知识, 2022(12): 30-31.
- [2] 许贤, 刘小民, 李秉华, 等. 6 种除草剂对节节麦和雀麦的防治效果[J]. 杂草学报, 2019, 37(3): 42-46.
- [3] 许志远. 秸秆还田对稻田主要禾本科杂草生长发育及杂草与作物竞争关系的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [4] 吴志凤. 胺苯磺隆的药害情况与合理使用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(17): 5243.
- [5] 田苗, 宋欢, 薛园园, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定食品中胺苯磺隆农药残留[J]. 分析科学学报, 2010, 26(3): 284-288.
- [6] 柏海玲, 刘绍文, 柏连阳, 等. 不同浓度的胺苯磺隆对玉米和水稻生长的抑制作用[J]. 湖南农业科学, 2008(1): 69-70, 73.
- [7] 刘素如. 高效液相色谱法在药品检验中的应用[J]. 中国现代药物应用, 2023, 17(8): 173-175.
- [8] 关金龙. 高效液相色谱-质谱联用法在分析检测中的运用分析[J]. 机电信息, 2015(5): 40-42.
- [9] 卢华烨, 关瑾, 阎峰, 等. 毛细管电泳法测定水飞蓟宾的含量[J]. 当代化工, 2021, 50(1): 240-243.
- [10] 周挺, 肖顺, 陈涛, 等. 除草剂残留生物检测研究进展[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(11): 11-13, 17.
- [11] 魏一婷. 高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶、三七中胺苯磺隆和甲基胺苯磺隆的残留量[J]. 分析科学学报, 2023, 39(4): 492-496.
- [12] 王英, 吴思超, 李云飞, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定三七中胺苯磺隆残留量的不确定度分析[J]. 中南农业科技, 2023, 44(3): 42-45.
- [13] 赵国栋, 何丰瑞, 秦国富. 食品中磺酰脲类除草剂的高效液相色谱分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(18): 154-159.
- [14] 崔彭帝, 薛启隆, 程宇康, 等. 金银花提取液喷雾干燥过程的数值模拟[J]. 中草药, 2023, 54(15): 4832-4838.
- [15] 马锦陆. 高效液相色谱串联质谱法测定胺苯磺隆[J]. 新疆农业科技, 2016(4): 1.
- [16] 李江峰. 固安县蔬菜农药残留问题及对策研究[J]. 基层农技推广, 2016, 4(6): 80-81.
- [17] 侯新茹, 仝凯旋, 陈辉, 等. 分散液液微萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定环境水中 7 种新烟碱类农药[J]. 分析测试学报, 2024, 43(5): 738-745.
- [18] 杨丽华, 龚道新, 唐晶, 等. 高效液相色谱法同时测定稻田中吡啶磺隆和苯噻草胺残留[J]. 色谱, 2012, 30(1): 71-75.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)