

基质固相分散萃取-气相色谱法同时检测人参中五氯硝基苯及其代谢物残留

李 晶, 董丰收, 刘新刚, 姚建仁, 郑永权

(中国农业科学院植物保护研究所, 农业部农药化学与应用技术重点开放实验室, 北京 100094)

摘 要: 采用基质固相分散萃取-气相色谱(MSPD-GC)技术, 建立了人参中五氯硝基苯(PCNB)及其代谢物五氯苯胺(PCA)和甲基五氯苯基硫醚(PCTA)残留的多残留分析方法。将人参样品与弗罗里硅土(*m/m*, 1:2)充分研磨 5 min 后装入 10 mL 玻璃注射器内, 通过正己烷:丙酮(*V/V*, 5:5)混合溶液洗脱实现了人参中五氯硝基苯及其代谢物的同时提取和净化。结果表明, 应用该方法测定人参中五氯硝基苯、五氯苯胺及甲基五氯苯基硫醚, 回收率为 89.41%~104.42%, 相对标准偏差为 3.73%~7.43%, 五氯硝基苯及其代谢物的方法检出限均小于 $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

关键词: 基质固相分散-气相色谱法; 人参; 残留; 五氯硝基苯; 代谢物

中图分类号: X830.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)01-0216-05

Simultaneous Determination of Pentachloronitrobenzene Residue and Its Metabolites Pentachloroaniline and Pentachlorothioanisole in Ginseng Based on Matrix Solid Phase Dispersion and Gas Chromatography

LI Jing, DONG Feng-shou, LIU Xin-gang, YAO Jian-ren, ZHENG Yong-quan

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Pesticide Chemistry & Application Technology, Ministry of Agriculture, Beijing 100094, China)

Abstract: An effective and simple method for simultaneous determination of pentachloronitrobenzene (PCNB) residue and its metabolites pentachloroaniline (PCA), pentachlorothioanisole (PCTA) in ginseng was developed based on matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. Dry ground ginseng samples and florisil sorbent (1:2) were homogenized in a mortar for 5 min and then packed into a 10 mL of glass syringe. Eluted with hexane/acetone=5:5 (*V/V*) solution, pentachloronitrobenzene and its metabolites were simultaneously extracted and cleaned up. The qualitative and the quantitative analysis of samples was accomplished using gas chromatography with ECD (electronic capture detector). The average recovery and relative standard deviation of PCNB, PCA and PCTA in ginseng at the spiked levels of 0.01, 0.05 and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ was within 89.41%~104.42% and 3.73%~7.43% respectively. The limits of detection (LOD) of the method were 1.88, 1.50, $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for PCNB, PCA and PCTA respectively. The proposed method was successfully applied to the determination of PCNB and its metabolites PCA and PCTA in ginseng with satisfactory results.

Keywords: MSPD-GC; ginseng; residues; pentachloronitrobenzene; metabolites

人参中有机氯农药污染一直受到关注。自从国家对六六六和滴滴涕农药的禁产和禁用后, 其在人参中的残毒逐渐降低。但五氯硝基苯(PCNB)近年来施用量较大, 普遍有残留检出^[1-3]。据文献报道, 在土壤微生物作用下, 五氯硝基苯能被降解为多种成分, 其中五氯苯胺(PCA)和甲基五氯苯基硫醚(PCTA)是五氯硝

基苯的两种主要代谢产物^[4]。目前研究人参中有机氯农药的前处理方法主要有索氏提取、浸渍萃取、机械振荡提取^[5]、超声波萃取^[6]、加速溶剂提取^[2]等。然而, 这些方法存在费时费力、溶剂使用量及对仪器要求苛刻等缺点。目前关于利用基质固相分散(Matrix solid phase dispersion, MSPD)对人参中五氯硝基苯及其代谢产物进行前处理的方法未见报道。

基质固相分散是 Barker 首次提出并给予理论解释的一种样品处理技术^[7], 其基本操作是将样品(固态或液态)直接与固相萃取材料一起混合研磨, 使样

收稿日期: 2008-04-03

作者简介: 李 晶(1984—), 男, 湖北十堰人, 在读硕士研究生, 主要从事农药残留分析研究。E-mail: lijing2011@126.com

通讯作者: 郑永权 E-mail: yqzheng@ippcaas.cn

品均匀分散于固定相颗粒的表面,形成一个独特的色谱固定相,装柱后依靠所选定的溶剂洗脱样品。基质固相分散法浓缩了传统样品均化、组织细胞裂解、提取、过滤、净化等过程,使样品的预处理变得简便,同时也避免了目标物的损失。由于该方法的简便、样品和溶剂用量少等优点,已被广泛应用于蔬菜、水果和植物中农药、杀虫剂等残留的分析^[7-9]。本文以基质固相分散原理为基础,建立了一种人参中五氯硝基苯残留及其代谢产物——五氯苯胺和甲基五氯苯基硫醚的同时提取,净化及检测方法,并对洗脱分离条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

仪器:Variain-3400 型气相色谱仪配电子捕获检测器(北京分析仪器厂),色谱柱为 SE-54 毛细管柱(250 mm×4.6 mm i.d.,0.25 μm)。SHZ-C 型循环水式多用真空泵(巩义市予华仪器有限公司);KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DSY-II 型自动快速浓缩仪等(北京金科精华苑技术研究所);RE-2000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);玻璃研钵,10 mL 玻璃注射器(北京玻璃仪器厂)。电子天平(1/10 g、1/10 000 g)。

正己烷、丙酮、乙酸乙酯均为分析纯(北京化工试剂公司),无水硫酸钠(分析纯);弗罗里硅土(分析纯),粒度 0.150~0.250 mm,使用前 130 ℃烘 8 h,加质量分数 5%的重蒸水去活;层析用中性氧化铝(分析纯),粒度 0.150~0.250 mm,使用前 130 ℃烘 8 h,加质量分数 8%的重蒸水去活;石墨化碳黑,粒度 0.045~0.150 mm; C_{18} ,粒度 0.040~0.060 mm(Supelco 公司);人参样品(中国医药保健品有限公司)。

PCNB、PCA、PCTA 购于国家农药质量检测中心,纯度均为 99%;用丙酮配制成 100 mg·kg⁻¹ 混合标准储备液,储存于-20 ℃冰箱。临用时用丙酮将标准储备液稀释成适当含量的混合标准液。

1.2 实验方法

1.2.1 基质固相分散法实验步骤

准确称取 1 g 空白人参样品,2 g 弗罗里硅土置于玻璃研钵中。用玻璃杵研磨 5 min,使样品与填料均匀混合;取 10 mL 玻璃注射器,在下端垫一片滤纸,依次装入 1 g 无水硫酸钠、0.5 g 样品混合物和 1 g 无水硫酸钠,轻轻敲实压紧。上面加盖一片滤纸。用 20 mL 正己烷:丙酮(V/V,1:1)混合淋洗液洗脱,

适当减压,控制洗脱液流出速度在 5 mL·min⁻¹ 左右,当洗脱液流出停止后,柱内剩余的洗脱液用空气加压的方式去除。收集淋出液于 50 mL 平底烧瓶,40 ℃水浴浓缩近干,用正己烷定容至 1 mL,气相色谱检测。

1.2.2 色谱分析条件

载气:He(纯度为 99.999%);进样口温度:250 ℃;检测器温度:300 ℃;载气流速:2 mL·min⁻¹;不分流进样 2 μL;SE-54 柱升温程序:初始温度 70 ℃,保持 1 min,以 20 ℃·min⁻¹ 的速率升至 200 ℃,保持 1 min;再以 5 ℃·min⁻¹ 的速率升至 250 ℃;保持 1 min;再以 10 ℃·min⁻¹ 的速率升至 280 ℃,保持 2.5 min;全过程分析时间:25 min。

1.3 定性和定量

根据色谱图的保留时间,ECD-气相色谱图定性。配制一系列不同浓度的标样,用峰面积对浓度做标准曲线,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 基质固相分散法的条件选择及优化

2.1.1 固相分散剂种类的选择

在基质固相分散中,固相分散剂同时起着支持剂、吸附剂和净化剂的作用,它的选择非常重要。MSPD 法中常用的吸附剂有弗罗里硅土、反相 C_{18} 、中性氧化铝、石墨化碳黑等^[10-11]。本实验首先考察了弗罗里硅土、反相 C_{18} 、中性氧化铝和中性氧化铝的加样回收率,如表 1 所示,用弗罗里硅土做吸附剂,五氯硝基苯及其代谢产物五氯苯胺和甲基五氯苯基硫醚的回收率均在 90%左右;以中性氧化铝为吸附剂,PCNB、PCA 的回收率为 80%左右,PCTA 较低,但二者都高于反相 C_{18} ;但中性氧化铝的活性易受含水量变化的影响,在相同的条件下,其对色素的吸附能力比弗罗

表 1 使用不同类型吸附剂时的回收率($n=3$)

Table 1 Recoveries of pesticides from different sorbents(3 replicates)

吸附剂	平均回收率/%		
	五氯硝基苯	五氯苯胺	甲基五氯苯基硫醚
C_{18}	20.25±0.08 c	19.85±0.17 b	21.70±0.09 c
弗罗里硅土	89.55±0.02 a	91.15±0.04 a	90.95±0.02 a
中性氧化铝	81.70±0.03 b	85.95±0.03 a	62.20±0.06 b
石墨化碳黑	10.16±0.13 d	9.56±0.19 c	8.43±0.22 d

注:结果为平均值±相对标准偏差, $n=3$;采用 DUNCAN 多重比较法对同一列数据分别进行比较,具有不同字母的数据间存在显著差异($P<0.05$),下同。

里硅土弱。因此,最终选定弗罗里硅土为本方法的固相分散剂。

2.1.2 固相分散剂用量的选择

在 MSPD 法中,固相分散剂的用量是一个至关重要的因素,用量过少,不仅待测物回收率低,而且净化效果也差;用量过多,则消耗较多的溶剂,增加成本。弗罗里硅土用量对五氯硝基苯及其代谢产物五氯苯胺和甲基五氯苯基硫醚的回收率的影响如表 2 所示。弗罗里硅土与人参基质的质量比为 1:1 时回收率最低,弗罗里硅土不能够将人参完全分散,有机氯农药被人参吸附。当质量比为 3:1 和 4:1 时,虽然回收率较高,但消耗了更多的弗罗里硅土。综合考虑实验的提取效率及成本,选择弗罗里硅土与人参的质量比为 2:1 较为合适。

表 2 弗罗里硅土与人参不同质量比时的回收率($n=3$)

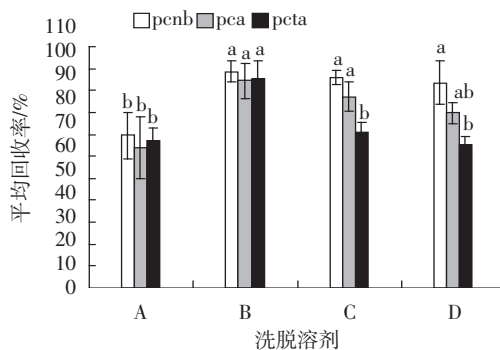
Table 2 Recoveries of pesticides from different combinations of florisoril and ginseng (3 replicates)

弗罗里硅土:人参 (g/g)	平均回收率/%		
	五氯硝基苯	五氯苯胺	甲基五氯苯基硫醚
1:1	66.27±0.12 c	71.43±0.13 b	66.97±0.15 bc
2:1	98.73±0.05 a	94.60±0.08 a	95.50±0.09 a
3:1	80.67±0.11 bc	70.07±0.07 b	61.73±0.06 c
4:1	94.73±0.09 ab	80.27±0.06 b	78.83±0.07 b

2.1.3 洗脱溶剂极性的选择及其用量

传统残留分析中样品前处理存在着诸如操作烦琐、多次萃取、转移及对提出物的化学处理等缺点,使测定结果不稳定或被测残留物流失。而用 MSPD 方法提取样品中残留物克服了上述缺点,使样品中多种组分吸附在比表面达 $297 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 的弗罗里硅土吸附剂上,并利用极性不同的溶剂进行选择洗脱,使提取比较彻底。同时, MSPD 方法所需样品量及溶剂量极少^[12]。

多数有机氯农药可以很好地溶解在正己烷、乙酸乙酯、丙酮溶剂中。本实验分别以正己烷、乙酸乙酯、正己烷+乙酸乙酯(V/V, 4/6)、正己烷+丙酮(V/V, 5/5)为淋洗剂,各取 20 mL 用量来考察对 3 种农药的洗脱回收率。图 1 是采用不同洗脱溶剂获得的目标物的回收率。由图 1 可以看出,正己烷作为洗脱液时,对 3 种目标物的洗脱强度均较弱,回收实验结果不理想;乙酸乙酯、正己烷+乙酸乙酯(V/V, 4/6)对甲基五氯苯基硫醚(PCTA)的洗脱效果不佳;正己烷+丙酮(V/V, 5/5)对目标物洗脱效果最好,可以将 3 种目标物均洗脱下来,且 3 种目标物的添加回收率均大于 90%,完全满



洗脱溶剂: A. 正己烷, B. 正己烷:丙酮 5:5, C. 乙酸乙酯, D. 正己烷:乙酸乙酯=4:6

Elution solvents: A: Hexane; B: Hexane:acetone=5:5; C: Ethyl acetate; D: Hexane:Ethyl acetate=4:6

图 1 不同洗脱溶剂下的实验回收率

Figure 1 Percent recoveries of pesticides using different elution solvents elution

足残留分析要求。

在选定最佳洗脱溶剂的条件下,用 35 mL 洗脱液考察了最佳洗脱用量。图 2 为不同洗脱体积下,正己烷+丙酮(V/V, 5/5)的洗脱曲线图,可明显发现 20 mL 洗脱液可以把 90% 的目标物洗脱下来。随着洗脱液体积进一步增大,加标回收率增加程度不明显,但共洗脱杂质增多,因此,综合分析洗脱溶剂的提取效果及成本因素,最后确定最佳洗脱剂为正己烷+丙酮(V/V, 5/5),用量为 20 mL。

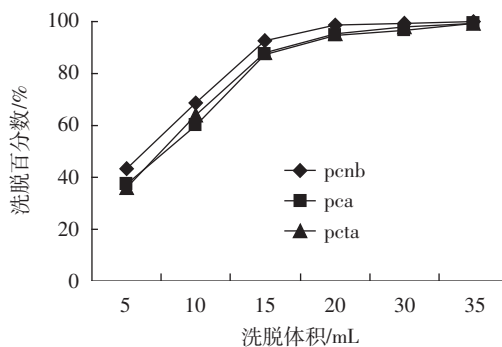


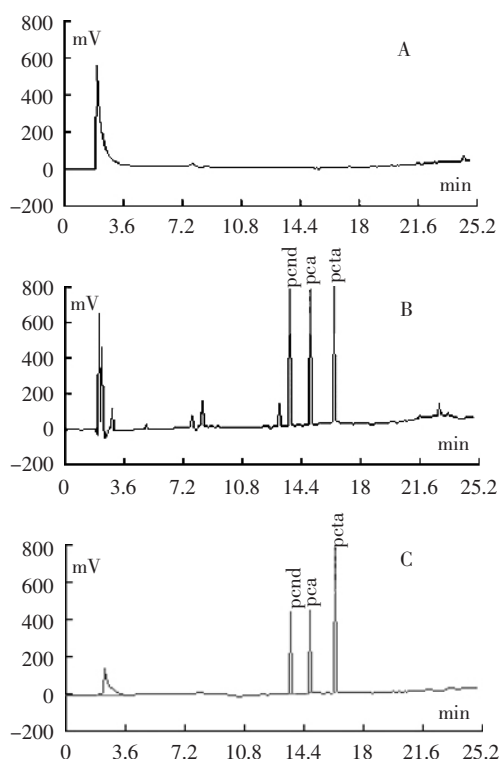
图 2 正己烷+丙酮(V/V=5/5)洗脱曲线

Figure 2 Cumulative recoveries of pesticides eluted by hexane:acetone=5:5

2.2 方法的线性范围及检出限

据报道,色谱法测定农药残留时会因为样品基质的存在而使添加的同种浓度的农药响应值比其在纯溶剂中的高,此现象被称为基质增强效应。虽然有机氯农药的基质效应较其他类型的农药低,但对农药的

定量仍有较显著的影响^[13],PCNB、PCA 和 PCTA 的基质效应见图 3。



(A.空白人参洗脱基质;B.空白人参洗脱基质中添加 0.1 mg·L⁻¹ 农药混标;C.0.1 mg·L⁻¹ 农药混标在正己烷中)
(A.ginseng sample;B.ginseng sample spiked at 0.1 mg·L⁻¹;C.standard mixture solution in hexane at 0.1 mg·L⁻¹)

图 3 GC-ECD 测定 3 种农药的基质效应色谱图

Figure 3 Matrix effect observed in the GC-ECD analysis of PCNB,PCA and PCTA

为提高定量准确性,本实验采用基质匹配标准校正方对基质效应进行补偿,用空白人参洗脱基质准确配制含量分别为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg·kg⁻¹ 的 PCNB、PCA 和 PCTA 混合标准品,以峰面积对进样浓度绘制标准曲线,结果见表 3。线性相关系数均在 0.996 以上。

2.3 回收率及方法的精密度

分别向空白人参中添加 0.01、0.05 和 0.10 mg·kg⁻¹

3 个水平的农药混合标准溶液,按照 1.2.1 和 1.3 的程序对其进行处理测定,每处理重复 5 次,结果见表 4。可见,平均回收率为 89.41%~104.42%,相对标准偏差为 3.73%~7.43%。

表 4 人参中 PCNB、PCA 和 PCTA 的回收率及标准偏差(n=5)

Table 4 Average recovery and relative standard deviation(RSD) in fortified ginseng samples(5 replicates)

化合物	添加浓度/mg·kg ⁻¹	平均回收率/%	相对标准偏差/%
五氯硝基苯	0.01	103.96	5.41
	0.05	100.48	6.85
	0.1	100.75	5.75
五氯苯胺	0.01	104.42	3.73
	0.05	97.36	5.54
	0.1	92.50	5.22
甲基五氯苯基硫醚	0.01	102.68	5.63
	0.05	96.25	7.43
	0.1	89.41	6.36

2.4 样品测定

随机购买三份市售生晒参样品(样品 A、样品 B 及样品 C),按照 1.2.1 的程序进行测定,每个样品重复 5 次,样品中 PCNB、PCA 和 PCTA 残留量检测结果见表 5。其中 C 样品中 3 种农药均有检出,且总量超过 0.1 mg·kg⁻¹,见图 4。

3 结论

本文以基质固相分散(MSPD)为样品前处理方

表 5 样品中三种农药残留量测定结果(n=5)

Table 5 Quantity of 3 pesticides residues detected in samples(5 replicates)

人参样品	样品中的农药残留量/mg·kg ⁻¹		
	五氯硝基苯	五氯苯胺	甲基五氯苯基硫醚
样品 A	0.062±0.11	<0.002	<0.002
样品 B	0.058±0.07	0.027±0.13	<0.002
样品 C	0.071±0.08	0.063±0.09	0.026±0.13

注:结果为平均值±相对标准偏差,n=5。

表 3 农药的线性范围、回归方程、相关系数及方法检出限

Table 3 Linear range, regression equation, correlative coefficient and LOD

农药	线性范围/mg·kg ⁻¹	线性方程(Y=bx+a)	相关系数 R ²	方法检出限/μg·kg ⁻¹
五氯硝基苯	0.005~0.5	Y=8.498×10 ⁵ x-8.415×10 ⁴	0.998 2	1.88
五氯苯胺	0.005~0.5	Y=9.308×10 ⁵ x-1.027×10 ⁵	0.996 3	1.50
甲基五氯苯基硫醚	0.005~0.5	Y=1.186×10 ⁷ x-5.825×10 ⁴	0.999 1	1.25

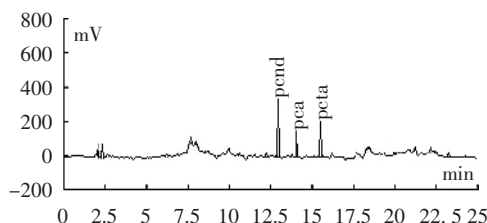


图 4 C 样品中 PCNB, PCA 和 PCTA 残留量检测色谱图

Figure 4 Chromatogram of residues of pcnb, pca, pcta detected in sample C

法, 利用 GC-ECD 测定了人参中五氯硝基苯及其代谢物五氯苯胺和甲基五氯苯基硫酸酯残留量, 方法的准确度和精密度很好, 回收率为 89.41%~104.42%, 相对标准偏差为 3.73%~7.43%, 五氯硝基苯及其代谢物的方法检出限均小于 $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

与传统的前处理方法相比, 基质固相分散萃取简便、快捷, 有机溶剂用量很少, 成本低, 方法准确可靠, 检出限低。实验表明, 本方法适用于人参中五氯硝基苯及其代谢物残留的快速检测。

参考文献:

- [1] 成启刚, 寇登民, 张 静, 等. 气相色谱法测定人参-黄芪中有机氯农药的残留[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2004, 37(2): 125-128.
CHENG Qi-gang, KOU Deng-min, ZHANG Jing, et al. Determination of residue of organochlorine pesticide in Ginseng by gas chromatography[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2004, 37(2): 125-128.
- [2] 陈 溪, 宋文斌, 孙玉岭, 等. 人参样品及制品中多种有机氯农药残留量测定方法的研究[J]. 现代科学仪器, 2007(3): 87-91.
CHEN Xi, SONG Wen-bin, SUN Yu-ling, et al. Study on the determination method of organochlorine pesticide multi-residues in Ginseng[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2007(3): 87-91.
- [3] 赵晓松, 王玉军, 孙安娜, 等. 五氯硝基苯在土壤中的降解[J]. 农业环境保护, 1999, 18(6): 260-262.
ZHAO Xiao-song, WANG Yu-jun, SUN An-na, et al. Degradation of PCNB in soil[J]. *Agro-environmental Protection*, 1999, 18(6): 260-262.
- [4] Torres R M, Grosset C, Alary J. Liquid chromatographic analysis of pentachloronitrobenzene and its metabolites in soils [J]. *Chromatographia*, 2000, 9(51): 526-530.
- [5] 赵云峰, 陈建民, 王绪卿. GC-MS 分析法在人参有机氯农药残留检测中的应用[J]. 卫生研究, 1999, 28(1): 53-54.

ZHAO Yun-feng, CHEN Jian-min, WANG Xu-qing. Application of gas chromatography-mass spectrometry for determination of the organochlorine pesticide residues in Ginseng[J]. *Journal of Hygiene Research*, 1999, 28(1): 53-54.

- [6] 阎 正, 封 棣, 赵亚奎, 等. 固相萃取-毛细管气相色谱法测定中草药及其土壤中多种有机氯农药残留量[J]. 分析实验室, 2005, 24(10): 8-12.
- [7] YAN Zheng, FENG Di, ZHAO Ya-kui, et al. Determination of organochlorine pesticide residues in Chinese medicine and soil by solid-phase extraction and capillary gas chromatography[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2005, 24(10): 8-12.
- [7] Barker S A. Matrix solid-phase dispersion [J]. *Journal of chromatography A*, 2000, 885: 115-127.
- [8] 杨 容, 傅承光. 基质固相分散-高效液相色谱法测定玉米中痕量呋喃丹[J]. 分析测试学报, 1994, 13(5): 72-75.
YANG Rong, FU Cheng-guang. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) and high performance liquid chromatographic determination of trace carbendazim in corn[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 1994, 13(5): 72-75.
- [9] 胡小钟, 储小刚, 余建新, 等. 基质固相分散和气相色谱-质谱法测定浓缩苹果汁中 22 种有机氯农药和 15 种拟除虫菊酯农药的残留量[J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 38-42.
HU Xiao-Zhong, CHU Xiao-gang, YU Jian-xin, et al. Determination of 22 organochlorine and 15 pyrethroid pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2004, 23(5): 38-42.
- [10] LING Y C, HUANG I P. Multi-residues matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection [J]. *Journal of chromatography A*, 1995, 695: 75-82.
- [11] 陈章玉, 缪明明, 孔维松, 等. 基质固相分散-高效液相色谱法同时测定烟草中的有机酸[J]. 中国烟草学报, 2007, 13(1): 11-14.
CHEN Zhang-yu, LIAO Ming-ming, KONG Wei-song, et al. Determination of six organic acids in tobacco by high-performance liquid chromatography based on matrix solid phase dispersion[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2007, 13(1): 11-14.
- [12] HU X Z, CHU X G, YU J X, et al. Determination of multiclass pesticide residues in apple juice by gas chromatography-mass selective detection after extraction by matrix solid-phase dispersion[J]. *AOAC Int*, 2004, 87(4): 972-985.
- [13] Erney D R, Poole C F. A study of single-compound additives to minimize the matrix induced chromatographic response enhancement observed in the gas chromatography of pesticide residues[J]. *High resolution chromatography*, 1993, 16: 501-503.