

实验技术与方法

免疫亲和柱净化 - 气相色谱质谱法测定花生和大蒜中乙草胺残留量

裴道国¹ 崔淑华¹ 王 雄² 王 莲² 惠小敏²

(1. 临沂出入境检验检疫局, 山东 临沂 276034; 2. 北京中检维康技术有限公司, 北京 100044)

摘 要:目的 建立花生和大蒜中乙草胺的残留分析方法。方法 试样中的乙草胺用甲醇提取,经乙草胺免疫亲和柱净化后,用气质联机方法在选择离子监测模式下分析检测。结果 最低检测限为 5 ng/g。在 10、20、40 ng/g 3 个添加水平,花生试样的平均回收率为 94.6%~106.3%,相对标准偏差为 4.7%~8.9%,大蒜试样的平均回收率为 97.2%~105.2%,相对标准偏差为 3.8%~7.4%。结论 方法检测结果准确可靠,符合定量要求,前处理方法重复性好,速度快,可以用于花生和大蒜实际样品的日常检测。

关键词:乙胺类;花生;大蒜;色谱法;亲和;碎片质谱法

Determination of Acetochlor Residue in Peanut and Garlic by Gas Chromatography-Mass Spectrometry After Purification by Immunoaffinity Chromatography

PEI Dao-guo, CUI Shu-hua, WANG Xiong, WANG Lian, HUI Xiao-min

(Linyi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shandong Linyi 276034, China)

Abstract: **Objective** To determine acetochlor residue in peanut and garlic by gas chromatography-mass spectrometry after purification by immunoaffinity chromatography. **Method** The acetochlor of samples were extracted with methanol and then purified with immunoaffinity chromatography, and determined by gas chromatography-mass spectrometry at the selected ion monitoring mode. **Results** The limit of determination was 5 ng/g. The average recoveries ranged from 94.6%~106.3% for peanut when fortified 10, 20, 40 ng/g and the relative standard deviations were from 4.7% to 8.9%. The average recoveries ranged from 97.2%~105.2% for garlic at the same level and the relative standard deviations were from 3.8% to 7.4%. **Conclusion** The method could be accurate, reliable, rapid and repetitive and could be applied to determine acetochlor in peanut and garlic. It could meet the requirements for quantitative determination.

Key word: Ethylamines; Arachis hypogaea; Garlic; Chromatography; Affinity; Mass Fragmentography

乙草胺^[1],一种新型旱田芽前选择性酰胺类除草剂,通用名为 Acetochlor,化学名称为:2-乙基-6-甲基-N-(乙氧甲基)-2-氯代乙酰替苯胺,主要用于玉米、大豆、棉花、甘蔗及多种菜田。乙草胺主要通过杂草的幼芽及幼根吸收,抑制发芽种子细胞的蛋白质合成,特别是抑制赤霉素所诱导的蛋白酶和 α -淀粉酶的形成,使杂草死亡。由于它选择性好、药效高、价格较低,因此在全世界被广泛使用。乙草胺具有较长的降解周期,对人、动植物有一定的毒害作用^[2]。乙草胺已经被美国环境保护局定为B-2类致癌物,并规定地下水中的乙草胺残留量不得超过0.10 $\mu\text{g/L}$ 。日本进口食品对其限量实行“一律标准”,即不超过0.010 mg/kg。因此,建立快速准确的乙草胺残留测定方法是非常必要的。该类除草剂残留分析大多是采用固相萃取柱净化,气相色谱-质谱(GC-ECD-MS)、高效液相色谱-二极管阵列检测/质谱(HPLC-DAD-MS)法^[3,4]测定样品中乙草

胺。如田丰等采用GC-MS法测定大豆蛋白粉中乙草胺残留量^[5]。这些文章中报道的样品处理方法大多步骤繁琐,特异性不强,分离效果不佳。本文采用免疫亲和柱对花生和大蒜中的乙草胺进行净化,然后用GC-MS选择离子监测模式对其残留量进行测定分析。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890N GC/5975B inert XL EI/CIMS 气相色谱-质谱联用仪,HP-5(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm) MS毛细管柱(美国安捷伦公司),配7683自动进样器;IKAT18 Basic型均质器、AE-240型电子天平(Mettler公司)、乙草胺免疫亲和柱(北京中检维康技术有限公司)、氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司)、水(去离子水)、甲醇(色谱纯,美国J. T. Baker公司)、丙酮(色谱纯,天津科密欧科技有限公司)、乙草胺标准物质(含量 $\geq 97.3\%$, Sigma公司)、吐温-20(Reagent Grade, Amresco公司)、 N_3Na

作者简介:裴道国 男 工程师

(含量 $\geq 99.0\%$, Fluka 公司)。

1.2 乙草胺标准溶液的配制

准确称取适量的标准品,用丙酮配成浓度为 0.010 mg/ml 的标准储备液。根据需要用丙酮将乙草胺标准储备液配置成 5 、 10 、 20 、 40 、 100 、 200 ng/ml 系列浓度,进行色谱测定,并绘制校正曲线。

1.3 试样提取

称取 25.0 g 粉碎的花生(大蒜)试样置于均质杯中,加入 125 ml 甲醇,高速均质 120 s 。用滤纸过滤,取滤液 25 ml (相当于 5 g 样品)置于 100 ml 梨形瓶中,于旋转蒸发器在 45°C 水浴中减压浓缩至约 2.5 ml ,加入 $22.5\text{ ml } 0.010\text{ mol/L pH } 7.4$ 的磷酸盐缓冲液(PBS),即得 25 ml 溶液(含甲醇约为 10%)。将上述溶液用玻璃纤维滤纸过滤,取 20 ml 滤液(相当于 4 g 样品)待净化。

1.4 净化

取上述提取液 20 ml (即 4 g 样品)过免疫亲和柱(IAC),以 1 滴/s 的速度过柱,直至空气进入到亲和柱中。用 10 ml 含 0.01% 吐温-20 的 $\text{pH } 7.4$ 磷酸盐缓冲液(PBST)淋洗 IAC,以 1 滴/s 的速度过柱,并用空气吹干。再用 10 ml 纯水淋洗 IAC,以 1 滴/s 的速度过柱,并用空气吹干。最后用纯甲醇 1 ml 洗脱,以 1 滴/2s 的速度过柱,并用空气吹干,将所有试样洗脱液(1 ml)收集于玻璃试管中,用氮气吹干。准确加入丙酮 1 ml 溶解残渣,供气相色谱质谱测定。

使用过的 IAC 可用 PBS 液再生, 60 min 后重新使用。方法是加 PBS 液以自然流速流经 IAC,最后尽可能赶出亲和柱中的气泡,用含 0.02% N_3Na 的 PBS 液封装保存。

1.5 仪器条件

载气为氦气(纯度 99.999%),进样口温度 250°C ,进样量 $2\text{ }\mu\text{l}$,脉冲不分流进样,脉冲压力 40 psi ,延时 0.5 min ;色谱柱为 HP-5 ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) MS 毛细管柱,温度程序: 70°C 保持 1 min ,然后以 25°C/min 升温至 150°C ,再以 3°C/min 升温至 200°C ,再以 20°C/min 升温至 280°C ,保持 5 min 。柱流速 1.0 ml/min 。

色谱-质谱接口温度 280°C ,离子源温度 230°C ,四级杆温度 150°C ;离子化方式 EI;电子能量 70 eV ;选择离子(m/z)检测(SIM):选择 1 个定量离子, 3 个定性(阳性确证)离子。

2 结果与讨论

2.1 乙草胺的净化方法

目前文献报道的净化试样中乙草胺的方法主要是采用弗罗里硅土柱进行净化。这种方法不仅不能

够完全去除杂质,而且针对不同试样,还需要摸索相应的洗脱条件。本试验采用免疫亲和色谱方法纯化花生、大蒜中的乙草胺,简便高效、去杂质效果良好。首先,由于本方法是利用抗原和抗体间特异性反应的原理^[6],使试样中其他物质不被亲和柱上的抗体所识别吸附,所以简单洗涤后即可大大消除杂质干扰。其次减少了洗脱溶剂的体积,只要 1 ml 甲醇就可使抗体变性,将亲和柱上富集的乙草胺洗脱下来。相比图 5 田丰、杨长志等用中性氧化铝和氟罗里硅土混合柱净化大豆蛋白粉中乙草胺得到的色谱图^[5],本实验中得到的色谱图中杂质相对要少(图 3),而且即使针对花生等含油较高的试样,采用同样简单的处理也能够得到比较理想的色谱分离效果。因此,用免疫亲和色谱来纯化试样具有一定的优势。

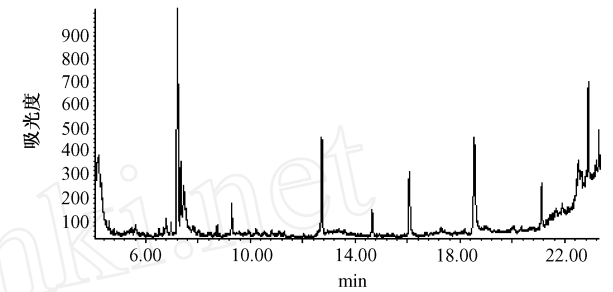


图 1 花生的空白色谱图

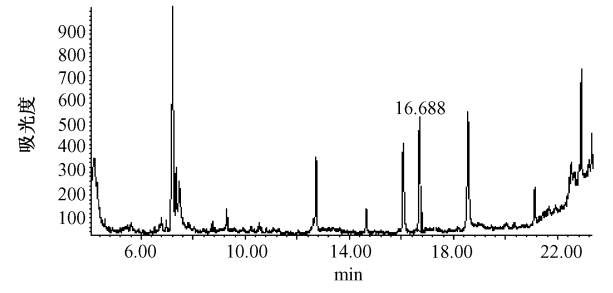


图 2 花生中添加 20 ng/g 乙草胺的色谱图

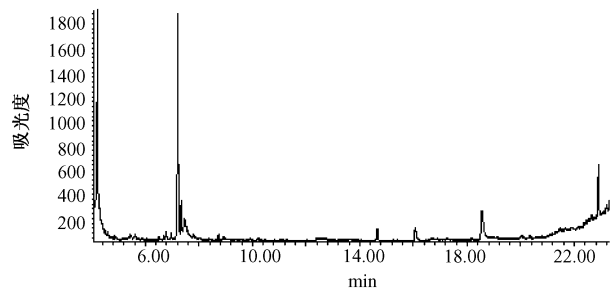


图 3 大蒜空白的色谱图

2.2 乙草胺的检测

在设定的色谱条件下,首先进行全扫描方式(GC-MSD/SCAN)检测,做出总离子流色谱图。然

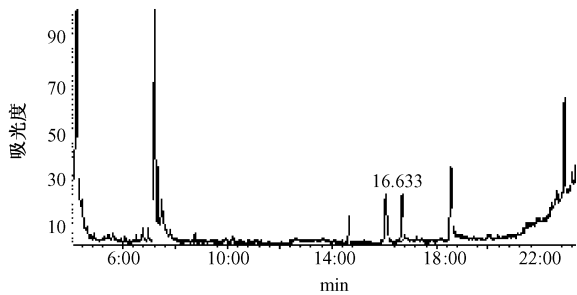


图 4 大蒜中添加 10 ng/g 乙草胺的色谱图

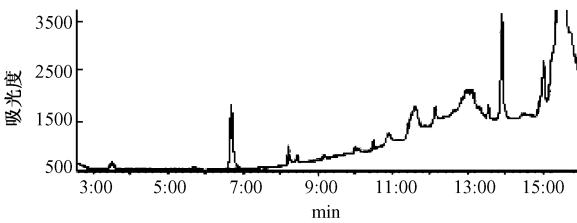


图 5 中性氧化铝和氟罗里硅土混合柱
净化的大豆粉空白色谱图

后参照文献^[7],根据质谱图中的碎片离子选择丰度相对较高、分子量较大及特异性较强的碎片离子,分别选择一个定量离子,3 个定性离子,即 m/z 146、132、162、223 离子作为其测定和确证的特征目标监测离子。

根据样液中乙草胺预估含量,选定浓度相近的标准工作溶液。对标准工作液与样液等体积进样测定,外标法定量。

2.3 线性范围及检测限

以乙草胺浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制校正曲线,并作线性回归,见图 6。结果表明,当标准品浓度在 5 ~ 200 ng/ml 的范围内呈良好线性关系,回归方程为: $y = 304.21x - 867.19$; $R^2 = 0.9991$ 。

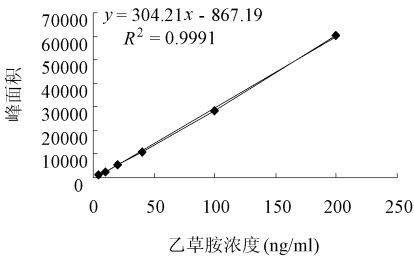


图 6 乙草胺校正曲线

根据 GC - MSD 检测的灵敏度 ($S/N \geq 3$) 及试样前处理方法,得出乙草胺在本方法中的最低检测限是 5 ng/g。完全满足国内外最高残留限量 (MRL) 对乙草胺的检测需要。

2.4 方法回收率和精密度

在实际样品中分别添加 3 个浓度水平,按照方法进行处理,每个处理重复 10 次,其回收率和精密度见表 1。

表 1 花生、大蒜添加乙草胺的回收结果和

名称	样品空白 (ng/g)	方法的精密度 (n = 10)		
		添加水平 (ng/g)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
花生	0	10	97.7	8.9
	0	20	94.6	4.7
	0	40	106.3	6.4
大蒜	0	10	103.1	3.8
	0	20	105.2	5.3
	0	40	97.2	7.4

注: n 为测定次数。

由表 1 可见,在花生中乙草胺的平均回收率为 94.6 % ~ 106.3 %,相对标准偏差为 4.7 % ~ 8.9 %。在大蒜中平均回收率为 97.2 % ~ 105.2 %,相对标准偏差为 3.8 % ~ 7.4 %。完全符合残留分析质量控制指南的要求。

免疫亲和色谱 (immunoaffinity chromatography, IAC) 技术具有重要应用价值及其特殊的优点: (1) IAC 的高选择性使样本前处理过程大大简化,分析质量得到改善。一次层析即可使待测组分得到高度净化,洗脱液通常可直接进样分析,避免了反复萃取和浓缩等操作,能节省大量有机溶剂,降低分析成本 and 环境污染,且回收率高。(2) IAC 对待测组分有很强的保留和浓缩能力,不受上样体积的影响。(3) 对组分净化的同时提供定性信息。(4) 水相操作,且 IAC 柱能重复使用。经试验表明,该 IAC 柱经有效再生后,可重复使用 10 次以上。

参考文献

[1] 陆梅,丁清波. 酰胺类除草剂的检测[J]. 环境研究与监测, 2005,18(4):35.

[2] 姚宝玉,王捷,于峰,等. 乙草胺致癌病理学试验的评价[J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14(4):216.

[3] 秦冬梅. 水中莠去津、乙草胺残留量检测方法研究[J]. 农药, 1999,(12):17.

[4] 郑萍,谢笑天,刘频. 高效液相色谱法同时测定三元混配除草剂中的甲黄隆、苄嘧黄隆与乙草胺[J]. 色谱, 1999,15(6):539.

[5] 田丰,杨长志. GC - MS 法测定大豆蛋白粉中乙草胺残留量[J]. 检验检疫科学,2006,16(4):23.

[6] YAKOVLEVA J N. Production of antibodies and development of specific polarization fluoroimmunoassay for acetochlor[J]. J Environ Anal Chem, 82(11-12):851.

[7] 黄修柱,季颖. 乙草胺原药及其杂质 GC - MS 分析研究[J]. 农药科学与管理,2004,25(12):5.

[收稿日期:2008 - 05 - 26]