

高效薄层析技术测定 5 种磺酰脲类 除草剂方法有效性研究

张 蓉¹, 岳永德^{2*}, 花日茂¹, 汤 峰¹

(1. 安徽省农产品安全重点实验室, 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036; 2. 国际竹藤网络中心, 北京 100102)

摘 要:建立 5 种磺酰脲类除草剂甲磺隆、氯磺隆、苄嘧磺隆、氯嘧磺隆和苯磺隆残留的高效薄层析(HPTLC)测定方法; 2 种展剂为 A: 氯仿 + 丙酮 + 乙酸(90/10/0.75, V/V/V), B: 甲苯 + 乙酸乙酯(50/50, V/V), 并对建立的方法进行确证试验, 其中降解试验表明试验过程标准品及展开薄板不受酸、碱、氧化剂、热和光的影响, 稳定性达到了 ICH 的要求, 在测定中不需要做其他处理。试验对 HPTLC 检测 5 种磺酰脲类除草剂的展剂饱和与否, 展开方式和温度等影响因素进行了研究。同时用建立的方法测定土壤中氯磺隆、苄嘧磺隆、氯嘧磺隆, 样品可以不净化, 测定的水平为 0.05、0.1 和 0.5 mg·kg⁻¹, 回收率为 55% ~ 112%, 偏离系数为 4.01% ~ 12.86%, 方法简单快速。

关键词:高效薄层析(HPTLC); 分析有效性; 磺酰脲类除草剂; 影响因素

中图分类号: X132; S481.8

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2008)04-0544-06

Validation of the method of HPTLC on detecting five sulfonylureas

ZHANG Rong, YUE Yong-de, HUA Ri-mao, TANG Feng

(1. Key Laboratory of Anhui Agri-food Safety, School of Resource and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;
2. International Centre for Bamboo & Rattan, Beijing 100102)

Abstract: The methods of five sulfonylureas (metsulfuron-methyl, chlorsulfuron, bensulfuron-methyl, chlorimuron-ethyl, tribenuron-methyl) detected by HPTLC were established. The mobile phases were: A, chloroform + acetone + glacial acetic acid, 90 + 10 + 0.75, V/V/V; B, toluene + ethyl acetate; 50 + 50, V/V. Their validation was tested including the stabilities under the chemical and physical conditions. The results show that the methods were qualified for the ICH. The effects of the environmental factors, such as the way of the development, the pre-saturation, the temperature, on the development were studied. The methods were applied to determine the three sulfonylureas (chlorsulfuron, bensulfuron-methyl, chlorimuron-ethyl) in soil. The levels of the fortifications were 0.05, 0.1 and 0.5 mg·kg⁻¹. The recoveries were from 55% to 112%, and their RSDs were from 4.01% to 12.86%. The methods were simple and fast.

Key words: HPTLC; validation; sulfonylureas; factors

高效薄层色谱(high-performance thin-layer chromatography, HPTLC)始于 1975 年 Merck 公司高效商业预制薄板的出现, 与传统薄层色谱的区别在

于一系列不断更新的技术理论、计算机控制全自动化操作, 以及各种先进的点样、展开、扫描技术。HPTLC 快速、高率, 多个样品可同时分析, 并拥有高

收稿日期: 2008-06-23

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划“食品安全关键技术”重大项目食品中农药残留风险评估技术研究(2006BAK02A04)资助。

作者简介: 张蓉(1967-), 博士研究生; 讲师。E-mail: z_rong163@163.com

* 通讯作者(Corresponding author) E-mail: yueyd@icbr.an.cn

精确度和准确度。HPTLC 在水和土壤等环境样品及药品分析中应用非常广泛。国外应用 HPTLC 分析研究农药范围较广^[1-10],国内应用研究相对较少,且国内通常以分离目的居多^[11-18]。HPTLC 技术在薄板上展开,固定相一次性使用,没有二次污染;对于同一固定相,流动相的选择范围相对于高效液相色谱大。HPTLC 是开放性实验过程,受环境因素的影响较大,传统的薄层实验可重复性不好,怎样提高实验的重复性,使实验方法更具有效性,是 HPTLC 在应用过程需要重视的问题。目前有大量关于分析方法特别是关于色谱过程有效性的论述,但对平面色谱有效性的论述是非常有限的,国际一致化会议(international conference of harmonization, ICH)平面色谱方法指南对鉴定、杂质检测、含量测定的准确度、精确度、特异性、检测限、定量限、线性及范围均提出要求。

磺酰脲类除草剂大多为土壤处理剂,在环境中的行为突出表现在土壤中的转归,并通过土壤的淋溶进入水中。目前水和土壤中的磺酰脲类提取、净化和富集技术大多较为复杂或费用较大,寻求更为简单的方法测定环境中磺酰脲类除草剂是必要的。本研究试图建立 5 种磺酰脲类除草剂 HPTLC 测定的有效方法,并依据 ICH 对方法的有效性进行论证,同时研究环境因素对方法的影响;并将该方法用于土壤中的 3 种磺酰脲类除草剂的测定,以期达到该方法应用的目的。

1 材料与方 法

1.1 材料及仪器

HPTLC 硅胶 F₂₅₄(铝层或玻璃层),(德国,Merck 公司)。Linomat IV 半自动点样仪, Camag TLC Scanner 3, Camag HPTLC Vario 系统,水平展缸(20 cm × 10 cm),100 和 500 μL 点样针,标准双槽展开缸(20 cm × 10 cm,20 cm × 20 cm),紫外灯,AMD 展开系统(瑞士 Camag 公司)。N-EVAP™112 氮吹仪(美国,Organomation Associates, Inc.), LC₁₈ SPE 柱,VisiprepTMDL(美国 Supelco)。超声波清洗器(上海必胜信超声仪公司)。土壤为安徽利辛县黑砂浆土。

1.2 供试药品及试剂

甲磺隆(97.3%,杜邦公司),苯磺隆(96.5%,杜邦公司),氯磺隆(95%,杜邦公司),氯嘧磺隆(92.1%,杜邦公司);苄嘧磺隆(97.7%,浙江大学)。甲醇、乙腈、乙酸已酯,冰醋酸、36% H₂O₂、碳酸氢钠、丙酮、氯仿、冰醋酸、甲苯、磷酸、硫酸、二氯

甲烷(均为分析纯,上海试剂厂)。普通氮气 N₂(≥98.5%,合肥四方集团)。

1.3 标样制备

5.0 mg 的甲磺隆、苯磺隆、绿磺隆、苄嘧磺隆、氯嘧磺隆用乙腈溶解定容到 5 mL,得到 1.0 mg·mL⁻¹的标液,再取 5 种标液配成 0.1 mg·mL⁻¹混标液 10 mL,分步配成 2、4、8、10 和 16 μg·mL⁻¹的混标液各 5 mL。

1.4 方法

1.4.1 薄板预处理 点样前薄板用预洗溶液(氯仿 + 甲醇)(V/V, 1/1)预洗后,清洁空气吹干,110℃烘箱内活化 30 min。

1.4.2 展剂蒸汽对磺酰脲类除草剂展开的影响 展剂分别在不预饱和、预饱和 10、20、30、40 min 条件下进行展开。

1.4.3 方法确证试验 标准品分别在乙腈和丙酮中进行稳定性试验。强制降解试验中热降解试验条件为 120℃烘箱中加热 45 min;光降解实验用高压汞灯光照 15 min 和自然光照下 2、4、8、16 和 24 h。强酸、强碱、氧化剂降解试验在磷酸水溶液(1:10, V/V),碳酸氢钠 1%(W/W)水溶液,36% H₂O₂ 水溶液避光室温放置 4、24、48、76、96 h 和 20 d 后测定。

1.4.4 方法应用于土壤样品添加试验 室温干燥的黑砂浆土 10 g(安徽利辛)添加 3 mL 甲醇制成泥浆,将 10 mg·mL⁻¹的混标液各 50、100 和 500 μL 添加进样品中,制备 0.05、0.1 和 0.5 mg·mL⁻¹水平的样品,每个浓度制 3 个重复和 1 个空白,振荡混匀后,35℃下氮吹仪吹干甲醇。制好的土壤样加 10 mL 的 ACN/H₂O(90:10),用超声波振荡 15 min 萃取,2 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,氮吹仪 45℃下吹剩约 1 mL,加 3 mL 氯仿,超声波振荡 10 min,静置,取油相,35℃氮吹仪定容 1 mL 待测。用建立的方法测定。

2 结果与分析

2.1 方法及有效性确证

2.1.1 展剂条件 用薄层硅胶 F₂₅₄展板,优化后的 2 种展剂为 A:氯仿 + 丙酮 + 乙酸(V/V/V, 90/10/0.75),B:甲苯 + 乙酸已酯(V/V, 50/50)。使用展剂 A 必须在展开前对展缸和展板进行充分的预饱和,否则有严重的边缘效应,展剂 A 灵敏度高于展剂 B(见表 1),故在试验中使用展剂 A 展开。

2.1.2 5 种磺酰脲类除草剂检测限、定量测定、标准曲线及其回归方程 展剂 A 对 5 种磺酰脲类除草剂展开的 R_f见表 2。2 种展剂下检测限及回归方

程、定量测定限结果见表1和表3。

后吸附表面不小于1 h。试验结果表明,实验条件下24 h内5种磺酰脲类除草剂稳定,可以应用HPTLC测定。

2.1.3 5种磺酰脲类除草剂溶液及吸附剂表面稳定性试验 ICH标准要求试验过程中物质在溶液中稳定不小于1 h,展开前吸附表面不小于0.5 h,展开

表1 5种磺酰脲类除草剂HPTLC检测方法的检测限、定量限及工作范围(展剂A)

Table 1 Detection limits, quantitative limits and proposed work ranges of five sulfonylureas by HPTLC (Mobile phase A)

名称 Substances	检测限/ng LOD	定量限/ng QOD	建议工作范围/ng Work range
甲磺隆 Metsulfuron-methyl	5	16	15 ~ 160
氯磺隆 Chlorsulfuron	2	7	10 ~ 160
苄嘧磺隆 Bensulfuron-methyl	5	16	15 ~ 160
苯磺隆 Tribenuron-methyl	8	26	15 ~ 190
氯嘧磺隆 Chlorimuron-ethyl	4	13	10 ~ 160

表2 5种磺酰脲类除草剂 R_f 范围(展剂A)

Table 2 R_f ranges of five sulfonylureas (Mobile phase A)

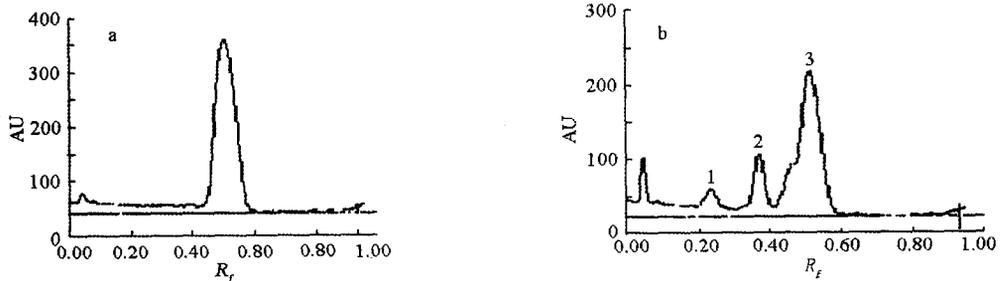
	甲磺隆 Metsulfuron-methyl	氯磺隆 Chlorsulfuron	苄嘧磺隆 Bensulfuron-methyl	氯嘧磺隆 Chlorimuron-ethyl	苯磺隆 Tribenuron-methyl
R_f	0.31 ~ 0.41	0.21 ~ 0.44	0.38 ~ 0.65	0.58 ~ 0.70	0.57 ~ 0.80

表3 5种磺酰脲类除草剂标准曲线回归方程(展剂A)

Table 3 Standard curve regression equations of five sulfonylureas (Mobile phase A)

名称 Substances	回归方程 Regression equations	r	$sdv / \%$	n
甲磺隆 Metsulfuron-methyl	$Y = 1.083 + 0.993x$	0.999 51	2.12	6
氯磺隆 Chlorsulfuron	$Y = 9.108 + 0.436x - 0.000x^2$	0.999 40	3.39	6
苄嘧磺隆 Bensulfuron-methyl	$Y = 13.514 + 1.825x - 0.004x^2$	0.999 60	1.78	8
苯磺隆 Tribenuron-methyl	$Y = 11.096 + 0.313x - 0.000x^2$	0.999 22	4.88	6
氯嘧磺隆 Chlorimuron-ethyl	$Y = 9.784 + 2.016x$	0.998 84	2.96	6

r : 回归系数 Regression coefficient; sdv : 斑点残余标准偏差 The residual standard deviation of the standard points; n : 独立浓度数 Independent concentration.



1,2: 热解产物 Productions of pyrogenation; 3: 苄嘧磺隆标准品 Bensulfuron-ethyl. 120°C, 45 min, 展剂 A Mobile phase A

a. 苄嘧磺隆标样 Standard of bensulfuron-methyl; b. 苄嘧磺隆热降解后色谱 Chromatographic map of besulfuron-methyl after pyrogenation

图1 苄嘧磺隆强热降解色谱图

Figure 1 Chromatogram of bensulfuron-methyl by pyrogenation

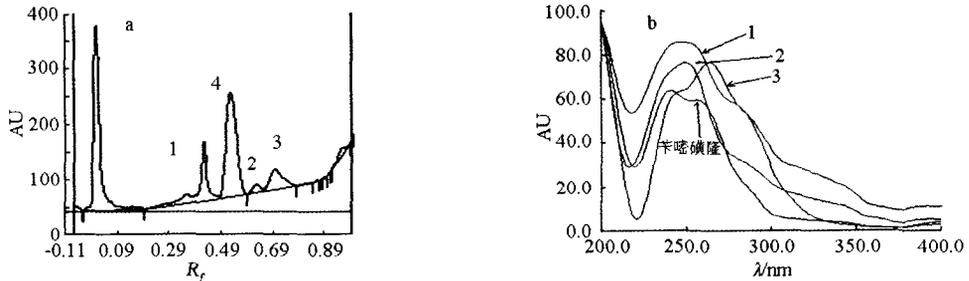
2.1.4 5种磺酰脲类除草剂强制降解试验 酸、碱及氧化剂作用下稳定性试验结果表明,24 h内5种

物质均不受氧化及酸、碱降解物作用影响。光热稳定性试验表明,5种目标物热解率依次为甲磺隆

71.1 %、苯磺隆 68.7 %、氯嘧磺隆 67.2%、苄嘧磺隆 43.1 %、氯磺隆 34.0 %。5 种物质的热解产物极性几乎都较原物质大。试验中明显地表现出来磺酰胺类除草剂本身是热不稳定化合物,再次说明用 GC 直接对这类化合物进行测定比较困难(见图 1)。4 h 日光照射下 5 种磺酰胺类除草剂没有光解,20 h 5 种磺酰胺类除草剂开始光解,但 24 h 内光解不足 1%,因此试验要求点样后薄板应避光保存并在 20 h

内完成展开扫描试验(见图 2)。

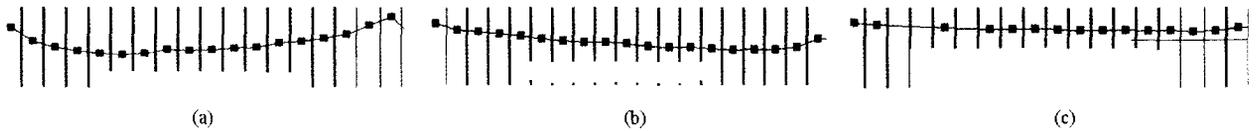
2.1.5 溶剂蒸汽的影响 试验中溶剂蒸汽对展开前沿的影响结果如图 3 所示。从图中可以看到展剂 A 的蒸汽饱和度对展开的影响比较大,但在饱和 30 min 后已经基本不再影响展开斑点的位置。展剂 B 则在饱和 15 min 后达到要求。本试验中用展剂 A 展板必须预饱和 15 min。



1,2,3:光解产物 Productions of photodecomposition;4:苄嘧磺隆 Bensulfuron-ethyl. 高压汞灯 H,15 min,展剂 A Mobile phase A
a. 苄嘧磺隆光解色谱 Photodecomposition chromatographic map of bensulfuron-methyl; b. 苄嘧磺隆及其光解产物光谱比较
Spectrum of bensulfuron-methyl and its photodecomposition products

图 2 苄嘧磺隆光解色谱图

Figure 2 Chromatogram of bensulfuron-methyl by photodecomposition



(a)展剂 A 不饱和展开斑点图 Developing spots using mobile phase A unsaturated;(b)展剂 A + 预饱和 10 min 展开斑点图
Developing spots using mobile phase A saturated for 10 min;(c)展剂 A 预饱和 30 min 展开斑点图 Developing spots using mobile phase A saturated for 30 min

图 3 展剂 A 蒸汽对展开的影响

Figure 3 Effects of mobile phases A evaporation on the chromatogram

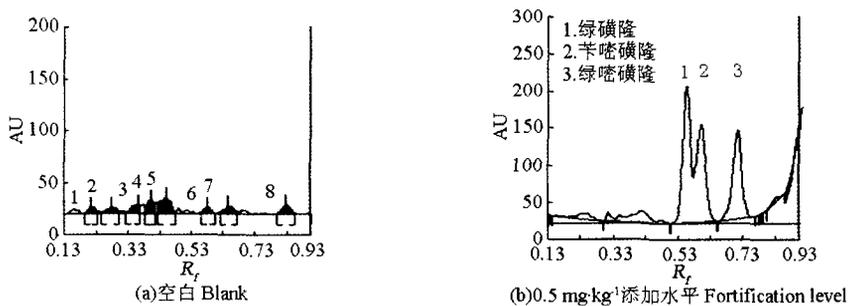


图 4 0.5 mg·kg⁻¹添加水平色谱图

Figure 4 Chromatogram obtained after extraction of soil fortified at 0.5 mg·kg⁻¹

2.1.6 展开方式与温度 试验表明垂直展开和水平展开对单剂、混剂展开没有影响。室温时(10 ~

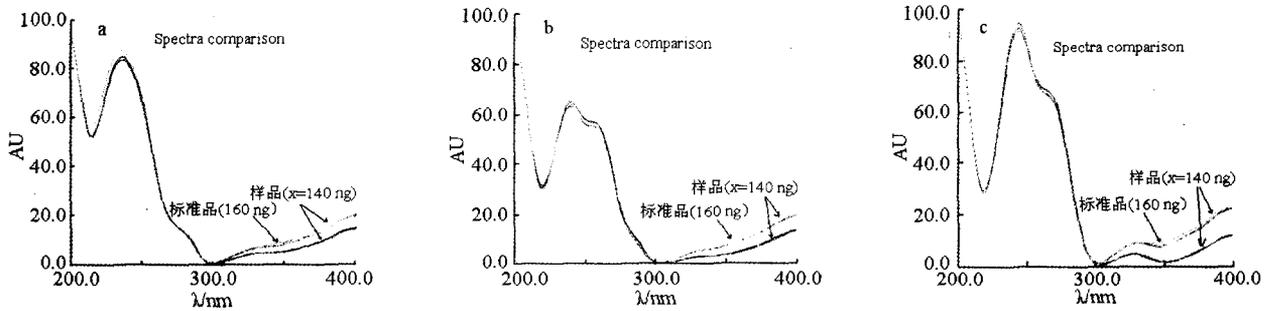
30 ℃)对展开影响较小,但室温超过 25℃应尽可能预饱和展剂,特别是使用展剂 A 进行展开。

有研究表明湿度对5种物质分离有明显影响^[19],5种除草剂的最佳展开湿度为18%~42%,苯磺隆和豆磺隆的分离应高于18%,但高于42%则不利于甲磺隆和氯磺隆、苄嘧磺隆、苯磺隆和豆磺隆的分离。实验室所处的地域四季湿度差异大(冬季平均湿度,梅雨季节平均湿度),不加控制,试验难以达到良好的重复性。

2.2 方法应用于土壤中3种磺酰胺类除草剂测定

试验用建立的方法对3种磺酰胺类除草剂(氯磺隆、苄嘧磺隆、氯嘧磺隆)在土壤中的残留进行测定,选定的目标物在湿度变化条件下的分离均较

好^[19]。试验中使用氯仿萃取土壤样品时,超声振荡萃取会出现乳化现象,一般静置会消除乳化。如仍有部分乳化物,可加少许无水硫酸钠去除。点样后3次展开,使样品中杂质与目标物分离,分离结果见图4,展开后的目标物质纯度相关性均为99.5%以上(图5)。方法精确度和准确度试验结果见表4和表5。用建立的方法测定土壤氯磺隆、苄嘧磺隆、氯嘧磺隆残留,测定的水平为0.05、0.1和0.5 mg·kg⁻¹,回收率55%~112%,回收率RSD为4.01%~12.86%。



a. 氯磺隆 Chlorsulfuron; b. 苄嘧磺隆 Bensulfuron-methyl; c. 氯嘧磺隆 Chlorimuron-methyl

图5 土样中3种磺酰胺类除草剂与随行标准品的光谱比较

Figure 5 Spectrum comparison of samples with standards in soil determination

表4 点样精确度

Table 4 The precision of soil determination

n	浓度/mg·kg ⁻¹ Concentration	测定水平/% Level	点样体积/μL Spot volume	CV/%			CV/% (ICH)
				氯磺隆 Chlorsulfuron	苄嘧磺隆 Bensulfuron-methyl	氯嘧磺隆 Chlorimuron-methyl	
6	0.05	<0.5	50	5.10	4.37	2.40	5

n: 点样重复次数 Repeated spotting times; CV: 偏离系数 Coefficient variation.

表5 土样添加回收(HPTLC板)

Table 5 Recoveries of soil determination (HPTLC plate)

添加水平/mg·kg ⁻¹ Level of fortification	氯磺隆 Chlorsulfuron		苄嘧磺隆 Bensulfuron-methyl		氯嘧磺隆 Chlorimuron-methyl		n
	R/%	CV/%	R/%	CV/%	R/%	CV/%	
0.05	112	4.53	125	11.98	89	4.01	4
0.1	69	10.81	78	1.37	55	6.01	4
0.5	88	10.49	99	12.21	74	12.86	4

n: 平行样品数 Parallel samples number; R: 回收率 Recoveries.

3 讨论

研究依据 ICH 平面色谱指南建立了5种磺酰胺类除草剂 HPTLC 测定方法,通过稳定性实验和一系列确证手段对方法进行了确证,并用建立的方法

对土壤中的氯磺隆、苄嘧磺隆、氯嘧磺隆进行了测定。结果表明在研究的色谱系统中5种磺酰胺类除草剂的检测限在2~8 ng之间,各项强降解性试验表明5种磺酰胺类除草剂可以使用研究建立的检测系统进行检测。用建立的方法对土壤中3种磺酰胺

类除草剂添加回收试验结果表明,基本满足该类除草剂在土壤中检测要求。同时 HPTLC 测定中不需要气相色谱测定前的衍生化,展剂较高效液相色谱的流动相选择范围广,样品可以不净化,并且可以在同一块薄板上同时进行 20 个样品分析,比其他仪器分析快速,简单,廉价。后续研究应针对方法最小检测浓度进行提高以期达到更为广泛的应用。

参考文献:

- [1] Sherma J. *Thin-layer chromatography encyclopedia of analytical chemistry* [M]. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.
- [2] Sherma J. Recent advances in thin-layer chromatography of pesticides [J]. *J AOAC Inter*, 1999, 82:48-53.
- [3] Sherma J. Recent advances in thin-layer chromatography of pesticides [J]. *J AOAC Inter*, 2001, 84:993-999.
- [4] Sherma J. *Planar chromatography* [J]. *Anal Chem*, 1996, 68:1R-19R.
- [5] Sherma J. *Planar chromatography* [J]. *Anal Chem*, 1998, 70:7R-26R.
- [6] Sherma J. *Planar chromatography* [J]. *Anal Chem*, 2000, 72:9R-15R.
- [7] Tuzimski T, Soczewinski E. Chemometric characterization of the R_F values of pesticides for Thin-Layer chromatographic systems of the type silica-nonpolar diluent + polar modifier, Part III [J]. *J Planar Chromatogr-Mod TLC*, 2000, 13:271-275.
- [8] Lekic M, Lorac F. Separation of organochlorine and organophosphorus insecticides by Thin-Layer chromatography [J]. *J Planar Chromatogr-Mod TLC*, 2000, 13:314-316.
- [9] Koeber R, Niessner R. Screening of pesticide-contaminated soil by supercritical fluid extraction (SFE) and high-performance thin-layer chromatography with automated multiple development (HPTLC/AMD) [J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry, Abstract Volume*, 1996, 354(4):464-469.
- [10] Reuke S, Hauck H E. Thin-layer chromatography as a pilot technique for HPLC demonstrated with pesticide samples [J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, Abstract Volume*, 1995, 351(8):739-744.
- [11] 司友斌,岳永德,汤峰,等. 磺酰脲类除草剂在硅胶 G 表面的光解 [J]. *环境科学学报*, 2002, 22:273-275.
- [12] 岳永德. 高效薄层析进行农药吸附态光解的研究 [J]. *环境科学*, 1995, 16(4):16-18.
- [13] 陈士夫,赵梦月. 太阳 TiO_2 薄层光催化降解有机磷农药的研究 [J]. *太阳能学报*, 1995, 16(3):234-239.
- [14] 李炳臣,巩景征. 薄层-溴量法测定甲辛复合乳油 [J]. *农药*, 1996, 35(3):21-22.
- [15] 吴桂英,姜文红. 氯氰菊酯在桔皮上残留量的薄层研究 [J]. *哈尔滨医药*, 1998, 18(4):35-36.
- [16] 谢碧海,张如心. 硫代磷酸酯、磷酸酯、氨基甲酸酯类杀虫剂薄层板快速检出技术 [J]. *中国卫生检验杂志*, 1998, 8(5):148-150.
- [17] 徐辉. 薄层-荧光法测定井冈霉素水剂 [J]. *上海农学院学报*, 1998, 16(2):148-151.
- [18] 张蓉,岳永德,花日茂,等. 磺酰脲类除草剂残留分析技术研究进展 [J]. *农药*, 2005, 44(9):388-390.
- [19] Zhang Rong, Yue Y D, Hua R M, et al. Separation of sulfonurea herbicides and determination of bensulfuron-methyl residues in tapwater by HPTLC [J]. *J Planar Chromatogr-mod TLC*, 2003, 16(2):127-130.