

李国锋,魏瑞成,王 冉. 高效液相色谱法测定土壤中联苯与间羟基苯甲酸残留[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):316-318.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.108

# 高效液相色谱法测定土壤中联苯与间羟基苯甲酸残留

李国锋,魏瑞成,王 冉

(江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所/农业部农产品质量安全风险评估实验室(南京),江苏南京 210014)

**摘要:**为了监测土壤中有机化合物污染状况,建立同时测定土壤中联苯与间羟基苯甲酸残留量的高效液相色谱方法。土壤样品以甲醇和水(4:1)作为溶剂进行提取,漩涡混匀后再进行超声提取、离心过滤,在 240 nm 波长下对样品中联苯与间羟基苯甲酸进行测定。结果表明,间羟基苯甲酸与联苯得到很好的分离,标准曲线在 0.3~15.0  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内呈线性关系,相关系数 $\geq 0.99$ ,保留时间分别为 2.8、8.0 min;0.5~10.0  $\mu\text{g/mL}$  添加浓度范围内,联苯、间羟基苯甲酸在土壤中的平均回收率分别为 89.03%~103.04%、79.82%~100.48%,相对标准偏差为 0.76%~2.49%、1.16~4.57,该方法得到间羟基苯甲酸的定量限为 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ,联苯为 0.2  $\mu\text{g/mL}$ 。该方法适用于土壤中联苯与间羟基苯甲酸残留的同步快速检测。

**关键词:**农药;土壤;残留;联苯;间羟基苯甲酸;同时测定;高效液相色谱法

**中图分类号:** TQ450.2+63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0316-03

目前世界上化学农药年产量近 200 万 t,约有 1000 多种人工合成化合物被用作杀虫剂、杀菌剂、杀藻剂、落叶剂等类农药。施用于作物上的农药将附着于作物上,或散落在土壤、大气和水等环境中,环境残留农药中的一部分又会被植物吸收,造成农药污染问题。其中,联苯与间羟基苯甲酸是农业和化工生产中常用的一类有机物。联苯是 2 个苯基相连形成的化合物,为重要的有机原料,衍生物包括联苯胺、联苯醚、八溴联苯醚、多氯联苯等,其残留可对人体健康产生危害<sup>[1-3]</sup>,主要损害人体的神经系统和消化系统,高浓度接触对呼吸道和眼睛有明显刺激作用。间羟基苯甲酸用于制备除草剂、杀菌剂,对人体健康及生态环境会造成一定危害。目前,关于联苯与间羟基苯甲酸的液相、气相和质谱等检测方法主要集中在蔬菜<sup>[4]</sup>、水果<sup>[5-6]</sup>、尿液<sup>[7]</sup>、化妆品<sup>[8]</sup>和食品<sup>[9-11]</sup>中,且以单成分测定为主,而有关土壤中联苯与间羟基苯甲酸残留的检测方法少有报道。为了监测土壤中苯类化合物污染状况,本研究建立了同时测定土壤中联苯与间羟基苯甲酸残留的高效液相色谱方法,对农产品安全中关于苯类化合物污染问题的研究以及评价土壤风险具有重要的学术价值和现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱系统,配备 DAD 和 VWD 检测器(美国 Agilent 公司);KQ-100DE 数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司);XW-80A 涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司);HY-4 调速多用振荡器(江苏常州国华电器有限公司);DELTA 320 型 pH 计和 AL204 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Milli-Q 超纯水仪

(美国 Millipore 公司)。

联苯标准品,质量分数 $\geq 99.0\%$ ;间羟基苯甲酸标准品,质量分数 $\geq 99.0\%$ (美国 Sigma 公司);甲醇,色谱纯(美国 TEDIA 公司);乙腈,色谱纯(美国 ROE Scientific Inc.);磷酸二氢钠,分析纯(南京化学试剂有限公司);磷酸,分析纯(江苏南京化学试剂一厂);蒸馏水为双蒸水。

联苯与间羟基苯甲酸混合标准储备液的配制:精确称取联苯和间羟基苯甲酸标准品各 10.0 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配成标准储备液,质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光存放。

### 1.2 样品前处理

准确称取 2.0 g 试样于 50 mL 具塞离心管内,加入 2 mL 水和 8 mL 甲醇,涡旋 1 min 后,超声提取 20 min,3 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜后供高效液相色谱测定。

### 1.3 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ );流动相:0.05 mol/L 磷酸二氢钠(磷酸调 pH 值至 3.5):甲醇=35:65(V/V);流速:1.0 mL/min。检测器:二极管阵列检测器,波长为 240 nm;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积:20  $\mu\text{L}$ 。上述液相色谱操作条件,可根据不同仪器特点,适当调整操作参数以期获得最佳效果。

### 1.4 样品添加回收率和精密度测定

准确称取 2.0 g 空白土壤样品,置于 50 mL 具塞离心管内,分别加入一定体积的联苯与间羟基苯甲酸的混合标准溶液,配成 0.5、1.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  的加标样品,混匀后静置,按照“1.2”节的提取方法进行加标回收试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件优化

**2.1.1 检测波长的确定** 利用紫外分光光度计对联苯和间羟基苯甲酸标准品溶液进行全波长扫描(200~400 nm)。结

收稿日期:2014-02-05

基金项目:国家质检公益性行业科研专项(编号:201410235)。

作者简介:李国锋(1972—),男,江苏东台人,副研究员,从事科研管理和食品安全检测方法研究。E-mail: gflguofeng@126.com。

果表明,联苯与间羟基苯甲酸在 220 nm 处有最大吸收峰,通过在二极管阵列检测器(DAD)上设定 220、240、260、280 nm 对样品进行测定,发现 240 nm 作为检测波长时,样品基质干扰少,而仪器的响应值也较高。因此,为了获得准确的目标物和降低样品检测限,最终选择检测波长为 240 nm。

**2.1.2 流动相的选择** 试验比较了乙腈-磷酸二氢钠(0.05 mol/L)和甲醇-磷酸二氢钠(0.05 mol/L)二元体系作为流动相对目标化合物分离效果的影响。结果表明,在乙腈-磷酸二氢钠(0.05 mol/L)体积比为 65:35 时,联苯的出峰时间在 2.4 min 左右,间羟基苯甲酸的出峰时间在 4.7 min 左右,分离度一般。当加大磷酸二氢钠的比例后,联苯的出峰时间往后推移,而间羟基苯甲酸的出峰时间提前;当流动相乙腈-磷酸二氢钠(0.05 mol/L)体积比为 40:60 时,组分未能出峰。在甲醇-磷酸二氢钠(0.05 mol/L)体积比为 70:30 时,联苯的出峰时间在 7.9 min 左右,而间羟基苯甲酸则没有分离出来;在甲醇-磷酸二氢钠(0.05 mol/L)体积比为 65:35 时,间羟基苯甲酸和联苯的出峰时间分别为 2.8 min 和 8.0 min 左右;当甲醇-磷酸二氢钠(0.05 mol/L)体积比为 60:40 时,联苯的出峰时间在 11.4 min 左右,分析时间较长。流动相的 pH 值对目标化合物的分离有影响,用磷酸调整流动相中磷酸二氢钠溶液的 pH 值至 3.5 时,各组分保留时间稳定,且峰形好,分离度佳,10 min 内 2 组分可完全分离,有效地缩短了分析时间,因此选用甲醇-磷酸二氢钠(0.05 mol/L, pH 值为 3.5)体积比为 65:35 作为流动相组成,以提高检测的灵敏度和效率。

## 2.2 样品前处理条件的选择

**2.2.1 提取溶液的选择** 本研究参考文献[6,11-13]以及联苯、间羟基苯甲酸的理化性质,采用了多种溶剂及其组合对土壤添加样品进行提取效果比较。样品用体积比为 4:1 的乙腈和水提取时,提取液中杂质较多,杂质峰干扰严重;用体积比为 3:2 的甲醇和水提取时,提取率和回收率较低;用体积比为 4:1 的甲醇和水提取时,样品提取回收率高,杂质干扰少。根据上述结果,试验选择体积比为 4:1 的甲醇和水组合作为提取溶剂进行研究。

**2.2.2 提取条件的选择** 参照文献[14],比较加入提取溶液的土壤样品在振荡器振荡 20 min 和超声波提取 20、30 min 条件下的提取效果,结果表明超声波提取的效果要优于振荡器振荡,而超声波 20 min 和 30 min 的提取效果并无显著差异。试验采用超声波提取的方法。

## 2.3 方法的线性与样品色谱图

**2.3.1 标准曲线和线性关系** 将配置好的 100  $\mu\text{g/mL}$  联苯及间羟基苯甲酸的标准储备液稀释为 0.3、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0、15.0  $\mu\text{g/mL}$  的系列标准工作液,按“1.3”节所选定的色谱条件进行检测分析,每个浓度梯度的标准液重复测定 3 次,取平均值。以峰面积定量,对所测数据进行线性回归,结果见图 1 和图 2,表明联苯和间羟基苯甲酸在 0.3 ~ 15.0  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度范围内,峰面积( $y$ )与进样浓度( $x$ )线性关系良好,相关系数 $\geq 0.99$ 。

**2.3.2 色谱图和保留时间** 在试验选定的色谱条件下,测得间羟基苯甲酸与联苯的保留时间分别为 2.8、8.0 min。色谱峰形较好,杂质峰与分析物峰分离度较好(图 3)。

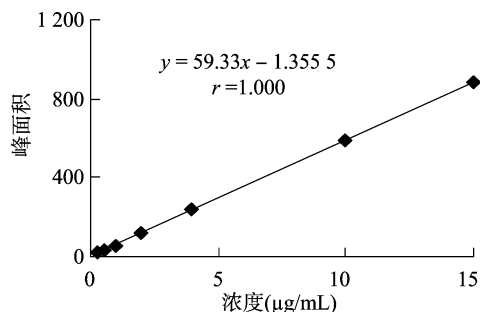


图1 联苯的标准曲线

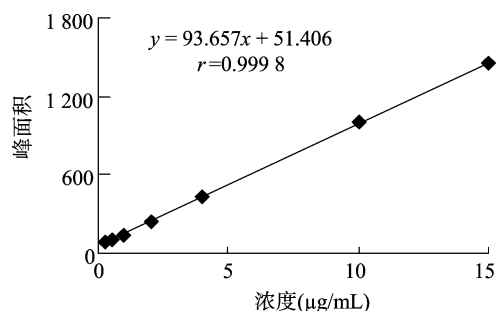
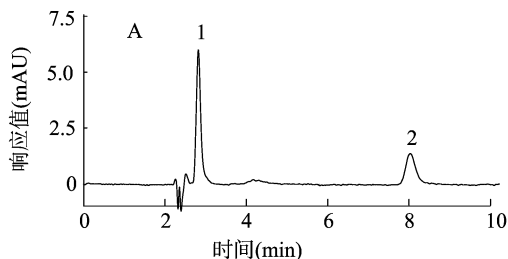
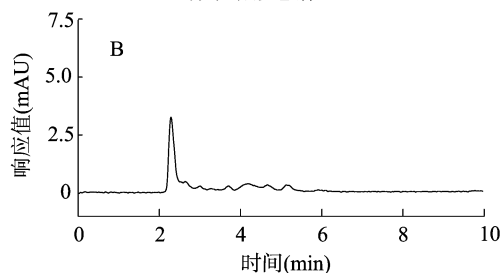


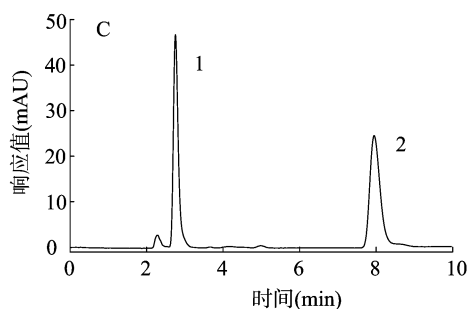
图2 间羟基苯甲酸的标准曲线



A. 标准溶液色谱



B. 土壤空白样品



C—土壤添加样品

1—间羟基苯甲酸;2—联苯

图3 联苯与间羟基苯甲酸标准溶液和样品的色谱图

2.4 方法的回收率、精密度和定量限

样品添加按照“1.4”节所述方法进行,每个浓度设 4 个重复。按“1.2”节所述前处理方法制备样品,按“1.3”节所述方法进行分析,结果见表 1、表 2,联苯回收率为 89.03% ~ 103.04%,间羟基苯甲酸回收率为 79.82% ~ 100.48%,相对标准偏差均小于 5%。分析方法在不同加标浓度下具有很好的回收率和稳定性。按照定量限的定义,即分析方法能够以合理的精确度和回收率从样品的背景信号中检测出待测物存在时需要的最低浓度<sup>[15-16]</sup>,本方法得到间羟基苯甲酸的定量限为 0.1 μg/mL,联苯为 0.2 μg/mL。

表 1 土壤样品中联苯的添加回收率

添加浓度 (μg/mL)	测定浓度 (μg/mL)	回收率 (%)	相对标准差 (%)
0.5	0.484 8	96.96	2.49
	0.503 4	100.67	
	0.508 4	101.69	
1.0	1.025 3	102.53	0.76
	1.030 4	103.04	
	1.015 2	101.52	
10.0	8.903 4	89.03	1.24
	8.967 6	89.68	
	9.121 3	91.21	

表 2 土壤样品中间羟基苯甲酸的添加回收率

添加浓度 (μg/mL)	测定浓度 (μg/mL)	回收率 (%)	相对标准差 (%)
0.5	0.490 2	98.05	1.41
	0.502 4	100.48	
	0.502 4	100.48	
1.0	0.976 4	97.64	1.16
	0.964 2	96.42	
	0.954 1	95.41	
10.0	7.981 6	79.82	4.57
	8.016 2	80.16	
	8.072 0	80.72	

3 结论

本研究建立了同步快速测定土壤中联苯与间羟基苯甲酸残留的高效液相色谱方法,用甲醇-水(体积比 4:1)和超声波的方法提取试样中残留的目标物,离心分离后供仪器测定,该方法前处理步骤简单,净化效果理想,分离度和重现性好。通过对实际样品的检测,验证了本方法的实用性,能为土壤中该类化合物残留检测新方法的建立提供参考价值。

参考文献:

[1]赵红斌,杨银书,刘旭东,等. 多氯联苯对大鼠睾丸 c - fos、

c - Myc 和 β - catenin 表达的影响[J]. 中华男科学杂志,2011,17 (2):126 - 130.

[2]马 慧,葛元新,喻文熙,等. 上海西郊农田土壤中多氯联苯分布特征及生态风险评估[J]. 北方环境,2011,23(11):54 - 55.

[3]Cachada A, Lopes L V, Hursthouse A S, et al. The variability of polychlorinated biphenyls levels in urban soils from five European cities[J]. Environmental Pollution,2009,157(2): 511 - 518.

[4]沈 静,李 明,艾尔肯·依不拉音,等. 高效液相色谱法测定果蔬中残留的噻苯咪唑、邻苯基苯酚及联苯[J]. 药物分析杂志, 2007,27(6):921 - 924.

[5]Saad B, Haniiff N H, Saleh M I, et al. Determination of ortho - phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection[J]. Food Chemistry, 2004, 84(2): 313 - 317.

[6]陈 皓,何乔桑,王萍亚,等. 固相萃取 - 高效液相色谱法测定水果和果酱中的 6 种对羟基苯甲酸酯[J]. 色谱,2009,27(6):804 - 808.

[7]Bravo R, Caltabiano L M, Fernandez C, et al. Quantification of phenolic metabolites of environmental chemicals in human urine using gas chromatography - tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification[J]. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2005,820(2): 229 - 236.

[8]沈昊宇,应丽艳,曹云峰,等. 固相萃取 - 气相色谱/质谱法同时测定化妆品中的邻苯二甲酸酯和对羟基苯甲酸酯[J]. 色谱, 2007,25(2):272 - 275.

[9]汪 隽,范必威,许淑霞. 固相萃取 - 液质联用法测定乳制品中对羟基苯甲酸酯[J]. 食品科学,2008,29(7):328 - 331.

[10]王萍亚,周 勇,黄 鹍,等. 高效液相色谱法测定酱腌菜中 6 种对羟基苯甲酸酯[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2008, 27(4):425 - 429.

[11]文 君,缪 红,王鲜俊. 高效液相色谱法测定酱油、醋中对羟基苯甲酸乙酯[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11(3):318 - 318.

[12]吴艳芳,徐家俊,李治国,等. 甲基磺草酮的高效液相色谱分析 [J]. 农药,2009,48(3):183 - 184.

[13]袁张荣,高永民,颜廷英. HPLC 法测定甲基磺草酮原药的含量 [J]. 河北化工,2008,31(11):71 - 72.

[14]李跃红,马永民. 高效液相色谱法同时测定牙膏中苯甲酸和 4 种对羟基苯甲酸酯[J]. 中国卫生检验杂志,2000,10(4):439 - 440.

[15]Boon V, Glass B, Nimmo A. High - performance liquid chromatographic assay of indomethacin in porcine plasma with applicability to human levels[J]. J Chromatogr Sci,2006,44:41 - 44.

[16]Wei R C, Ge F, Chen M, et al. Occurrence of ciprofloxacin, enrofloxacin, and florfenicol in animal wastewater and water resources[J]. Journal of Environmental Quality,2012,41(5):1481 - 1486.