

HPLC 测定水体中毒死蜱及其有毒降解产物 TCP

韩 畅, 朱鲁生, 王 军, 王金花, 谢 慧, 苏 郡

(山东农业大学资源与环境学院, 山东 泰安 271018)

摘 要:通过比较不同的提取溶剂和使用量,就水体中毒死蜱和 TCP 残留提取的效果及不同的流动相组成和比例对毒死蜱和 TCP 测定的影响,建立了水体中毒死蜱及 TCP 的 HPLC 残留分析方法。结果表明,水体中毒死蜱和 TCP 最佳提取溶剂为乙酸乙酯,提取次数为 2 次,用量分别为 50 和 30 mL。色谱条件为:流动相为甲醇:水=90:10 或乙腈:水=90:10,流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;紫外检测波长 300 nm。当流动相为甲醇:水=90:10 时,毒死蜱和 TCP 的保留时间分别为 6.4 和 3.6 min;当流动相为乙腈:水=90:10 时,其保留时间分别为 5.6 和 2.5 min。毒死蜱和 TCP 的检出限分别为 0.5 和 0.15 ng。当毒死蜱和 TCP 在水中的添加浓度为 $0.01\sim 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,标准添加回收率分别为 91.4%~105.1%和 90.6%~105.4%,变异系数分别为 0.99%~4.12%和 0.29%~9.33%。水样中毒死蜱和 TCP 的最小检出浓度分别为 2 和 $0.6\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

关键词:毒死蜱;TCP;残留;水体;HPLC

中图分类号:X830.2 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2009)07-1552-05

Residue Analysis of Chlorpyrifos and Its Toxic Metabolite TCP in Water by HPLC

HAN Chang, ZHU Lu-sheng, WANG Jun, WANG Jin-hua, XIE Hui, SU Jun

(College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: A method was developed for analysis the residues of chlorpyrifos and its toxic metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) in water. In this method, different conditions of mobile phase, different kinds of extraction solvents and different amount of extraction solvents were studied. Ethyl acetate, dichloromethane, chloroform and petroleum ether were tested as the extraction solvent, respectively. And the best extraction was obtained when using ethyl acetate as extraction solvent. Water samples were extracted by two step liquid-liquid distribution, 50 mL ethyl acetate was used in the first partitioning step, and 30 mL was used in the second. The detection method was based on using high-performance liquid chromatography (HPLC) with reversed-phase C_{18} column, and gradient UV detector. The column was maintained at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a mobile phase flow rate of $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The mobile phase was consisted of methanol-water (90:10, V/V) or acetonitrile-water (90:10, V/V). Chlorpyrifos and TCP were all detected at 300 nm. The retention times of chlorpyrifos and TCP were 6.4 min and 3.6 min when using methanol-water (90:10, V/V) as mobile phase, and 5.6 min and 2.5 min when using acetonitrile-water (90:10, V/V). The detection limits for chlorpyrifos and TCP were found to be 0.5 ng and 0.15 ng, respectively. When adding chlorpyrifos and TCP at the concentration of $0.01\sim 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the average recoveries of chlorpyrifos and TCP from water samples were about 91.4%~105.1% and 90.6%~105.4%, and the relative standard deviation ranged from 0.99%~4.12% to 0.29%~9.33%. The lowest detectable concentration of chlorpyrifos and TCP in water sample were $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $0.6\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The results showed that the method met the demands of pesticide residue analysis.

Keywords: chlorpyrifos; TCP; residues; water; HPLC

毒死蜱是世界上应用最广泛的有机磷杀虫剂之一,作为农用杀虫剂可有效防治粮食、苹果、蔬菜等多种作物的百余种害虫,作为卫生杀虫剂可用来防治白蚁和蟑螂等。毒死蜱在环境中的残留会污染土壤、地表

水和地下水,最终对环境生物和人体健康产生影响。

目前国内关于毒死蜱的残留、毒性及降解方面的研究报道较多^[1-7]。已有研究表明,毒死蜱在环境中的主要有毒代谢产物是 3,5,6-三氯吡啶-2-酚(3,5,6-trichloro-2-pyridinol, TCP)^[8]。TCP 的水溶性较大,约为 $49.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,而毒死蜱的水溶性只有 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[8],因此,TCP 比毒死蜱更容易渗入地下水,从而污染水体和土壤。Armbrust 等^[9]的研究表明,高尔夫球场施用了毒死蜱后,在球场的沥出液中可检测到 TCP,其浓度

收稿日期:2008-11-05

基金项目:国家自然科学基金项目(20477022,40801203)

作者简介:韩 畅(1984—),女,山东嘉祥人,硕士研究生,研究方向为农药残留和环境毒理。

通讯联系人:朱鲁生 E-mail:lushzhu@sdau.edu.cn

为 $0.15\sim 1.77\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 对周围的水环境存在潜在风险。已有报道指出 TCP 对土壤微生物的毒性影响比毒死蜱更高, 在 Microtox 系统中 TCP 对土壤细菌群落的毒性($EC_{50}=18.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)是毒死蜱的 2.5 倍($EC_{50}=46.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)^[10]。然而, 从目前的报道来看, 以水体等环境介质为研究对象, 并同时测定毒死蜱和 TCP 的研究还很少。因此, 建立一个水体中毒死蜱和 TCP 残留的测定方法, 及时了解水体的受污染状况, 是非常必要的。

关于毒死蜱和 TCP 的测定方法的研究, 大都是以血液及尿液样品作为研究对象, 包括液相色谱(HPLC)^[11]、气相色谱(GC)^[12]、酶联免疫(ELISA)以及液质(LC-MS)和气质(GC-MS)方法等^[13-15]。

本研究拟建立采用液相色谱对环境水样中的毒死蜱和 TCP 同时测定的分析方法, 为研究毒死蜱及其有毒降解产物 TCP 在环境水体中的行为提供测定方法基础。

1 材料和方法

1.1 仪器设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪; Eclipse XDB-C₁₈ 250×4.6 mm 色谱柱; 紫外检测器; ZFQ-81 旋转蒸发器; SHB-3 循环水式多用真空泵; 电子分析天平及其他小型玻璃仪器等。

1.2 药品试剂

毒死蜱和 TCP 标准品, 纯度分别为 99.5% 和 99.3%, 均购于美国迪马公司; 甲醇、乙腈为色谱纯; 乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷和石油醚均为分析纯, 经全玻璃装置重蒸后使用; 氯化钠和无水硫酸钠均为分析纯。

毒死蜱与 TCP 标准液的配制采用乙腈作为溶剂。

1.3 分析方法

1.3.1 高效液相色谱条件

流动相为甲醇:水=90:10 或乙腈:水=90:10, 流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测波长 300 nm 。使用外标法定量。

1.3.2 毒死蜱和 TCP 在水中的提取方法

1.3.2.1 不同提取溶剂的提取效果对比

取 100 mL 河水置于 500 mL 分液漏斗中, 加入 20.0 g 氯化钠, 振荡使其溶解后, 再分别加入 50 mL 乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷或石油醚, 充分振荡静置分层, 收集有机相, 然后再用 30 mL 上述溶剂分别进行第 2 次萃取。将有机相通过无水硫酸钠后用旋转

蒸发器浓缩至 $1\sim 2\text{ mL}$, 用甲醇定容至 10 mL , 高效液相色谱测定。

1.3.2.2 不同提取溶剂使用量的提取效果对比

通过提取效果的对比确定了提取溶剂为乙酸乙酯后, 使用不同量的乙酸乙酯对水样中的毒死蜱和 TCP 进行提取, 提取次数为 2 次, 乙酸乙酯的使用量分别为: 处理 1 为 50 和 30 mL ; 处理 2 为 30 和 30 mL ; 处理 3 为 30 和 20 mL 。

1.3.3 液相色谱条件的优化

根据前人的研究报道^[11,16-17], 使用液相色谱测定毒死蜱与 TCP 时, 流动相中最常用的有机溶剂是乙腈和甲醇。将乙腈或甲醇分别与水按照不同的比例组成流动相, 进行 HPLC 分析测定, 根据毒死蜱和 TCP 的出峰情况, 确定流动相的组成。

1.3.4 可靠性试验

对分析方法的准确性以全过程标准添加回收率来衡量, 方法的精密度以测定结果的变异系数来衡量。向水样中添加毒死蜱和 TCP 标准溶液, 使水样中毒死蜱和 TCP 的浓度分别为 0.01 、 0.10 、 1.00 和 $5.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 按照 1.3.2 中第一部分的方法处理, 并计算不同添加浓度的水样中毒死蜱和 TCP 的平均回收率及其变异系数。

2 结果与讨论

2.1 毒死蜱和 TCP 在水中提取方法的确定

2.1.1 毒死蜱和 TCP 在水中提取溶剂的确定

石油醚、二氯甲烷等是进行毒死蜱提取等步骤的常用试剂, 在有关 TCP 测定的报道中, 最常用的提取溶剂是乙酸乙酯^[16]。为了确定水中毒死蜱和 TCP 的最佳提取溶剂, 研究比较了乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷和石油醚这 4 种有机溶剂对水中毒死蜱和 TCP 的提取效果, 结果见表 1。

从表 1 可知, 这 4 种有机溶剂对水中毒死蜱的提取效果均能达到农药残留分析的要求; 但是对于 TCP, 只有乙酸乙酯能够将其从水中提取出来, 提取效果也能达到残留分析的要求, 其他 3 种溶剂均不能将其从水中提取出。因此, 选择了乙酸乙酯作为毒死蜱和 TCP 在水中的提取溶剂。

2.1.2 毒死蜱和 TCP 在水中提取溶剂使用量的确定

对比了不同提取次数下提取溶剂使用量对水中毒死蜱和 TCP 提取的效果, 结果见表 2。

从表 2 可以看出, 提取溶剂的使用量变化对毒死蜱的提取效果并没有明显的影响, 但随着提取溶剂使

表 1 不同萃取溶剂从水中提取毒死蜥和 TCP 的回收率($n=4$)

Table 1 Recovery of chlorpyrifos and TCP from water using different extraction solvents($n=4$)

提取溶剂	毒死蜥		TCP	
	平均回收率/%	变异系数/%	平均回收率/%	变异系数/%
乙酸乙酯	97.5	2.19	92.7	4.69
二氯甲烷	100.3	2.16	ND	—
三氯甲烷	97.8	1.14	ND	—
石油醚	96.2	0.76	ND	—

注:ND,未检出(not detected)。

表 2 不同使用量提取溶剂从水中提取毒死蜥和TCP 的回收率($n=4$)

Table 2 Recovery of chlorpyrifos and TCP from water using different amount of extraction solvent($n=4$)

溶剂体积/mL		毒死蜥		TCP	
第 1 次提取	第 2 次提取	平均回收率/%	变异系数/%	平均回收率/%	变异系数/%
50	30	98.9	3.44	91.7	5.43
30	30	101.2	1.16	86.1	4.84
30	20	102.0	2.24	80.7	3.78

用量的减小,TCP 的提取效果越来越差。所以,本研究最终选择了第 1 次提取使用 50 mL 乙酸乙酯,第 2 次提取使用 30 mL。

2.2 高效液相色谱法条件的确定

很多测定毒死蜥和 TCP 的报道采用了梯度洗脱方法^[11, 17],但从本研究的结果看,不使用梯度洗脱也可以使毒死蜥和 TCP 得到较好的分离。另外,与使用梯度洗脱的分析方法相比,还能使毒死蜥和 TCP 的保留时间提前,节省分析时间。

在本实验中研究发现,使用乙腈和水作为流动相,当乙腈的比例为 75%时,TCP 的出峰情况很好,峰型较高较窄,但是毒死蜥的出峰情况不好,峰型很宽,而且毒死蜥的保留时间较长,约为 13 min;将乙腈的比例提高至 90%后,与乙腈比例为 75%时相比,TCP 的峰高大约下降 1/5,但是毒死蜥的峰高提高了 1 倍,同时毒死蜥和 TCP 的保留时间均提前,因此选择乙腈:水=90:10 为流动相,如图 1 中的 A 图。

使用甲醇和水作为流动相,当甲醇比例为 75%时,毒死蜥和 TCP 的出峰效果都不好,峰型宽而矮;将流动相中甲醇的比例提高至 90%后,与甲醇比例为 75%时相比,毒死蜥和 TCP 的出峰情况均有较大的改善,峰高提高了约 3 倍,同时毒死蜥和 TCP 的保留时间也均有提前。因此,选择甲醇:水=90:10 为流动相,如图 1 中的 B 图。

根据以上结果最终确定了毒死蜥和 TCP 的检测条件:流动相为乙腈:水=90:10 或甲醇:水=90:10 均可,流速为 1 mL·min⁻¹,柱温为 25 ℃,检测波长 300

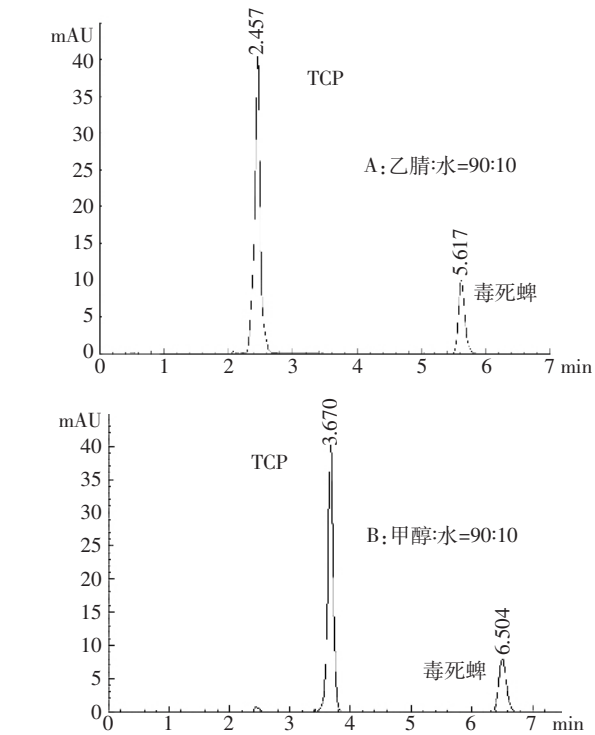


图 1 不同流动相条件下毒死蜥和 TCP 的色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of chlorpyrifos and TCP in different conditions of mobile phase

nm。

配制 0.1~100 mg·L⁻¹ 共 7 个不同浓度的毒死蜥和 TCP 标准液,在上述确定的检测条件下进行测定,得到毒死蜥和 TCP 的回归方程和相关系数等,见表 3。

表 3 毒死蜱和 TCP 的回归方程和检出限

Table 3 Regression equations and limits detections of chlorpyrifos and TCP

流动相条件	检测对象	线性范围/ng	回归方程	相关系数	检出限/ng
乙腈:水=90:10	毒死蜱	0.50~2 500	$y=0.523\ 2x+4.143\ 6$	0.999\ 9	0.50
	TCP	0.15~2 500	$y=1.602\ 3x-9.902\ 9$	0.999\ 7	0.15
甲醇:水=90:10	毒死蜱	0.50~2 500	$y=0.556\ 5x-0.054$	0.999\ 9	0.50
	TCP	0.15~2 500	$y=1.963\ 4x-7.869\ 8$	0.999\ 9	0.15

2.3 方法的可靠性验证

向河水样品中添加一定量的毒死蜱和 TCP 标准液,使其在水中的浓度分别为 0.01、0.10、1.00、5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每个浓度做 5 次重复,按照确定的水中毒死蜱和 TCP 残留分析的方法操作,选择甲醇:水=90:10 作为流动相对样品进行测定。样品的色谱图见图 2,回收率结果见表 4。

表 4 水中的毒死蜱和 TCP 的添加回收率($n=5$)Table 4 Recovery of chlorpyrifos and TCP from water($n=5$)

添加浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	毒死蜱		TCP	
	平均回收率/%	变异系数/%	平均回收率/%	变异系数/%
0.01	105.1	4.03	105.4	9.33
0.10	91.4	4.12	93.3	2.38
1.00	98.6	1.79	90.6	1.80
5.00	97.7	0.99	94.4	0.29

从图 2 可以看出,在以上的检测条件下,河水中的杂质对毒死蜱和 TCP 的定性和定量分析并没有影响,从而保证了毒死蜱和 TCP 的顺利测定。

从表 4 可以看出,毒死蜱 4 个添加浓度的回收率为 91.4%~105.1%,变异系数为 0.99%~4.12%;TCP 的 4 个添加浓度的回收率为 90.6%~105.4%,变异系数为 0.29%~9.33%。均符合残留分析的要求,该方法可靠。以取河水水样 100 mL,定容体积为 10 mL,进样量 25 μL 计,该方法测得的毒死蜱和 TCP 的最小检出浓度分别为 2 和 0.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3 结论

(1)毒死蜱和 TCP 在水中的残留提取方法为采用乙酸乙酯作为提取溶剂,液-液分配提取 2 次,第 1 次提取使用量为 50 mL,第 2 次使用量为 30 mL。

(2)水中毒死蜱和 TCP 的适合检测条件为:色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ 250×4.6 mm,流动相为甲醇:水=90:10 或者乙腈:水=90:10 均可,流速 1.00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 300 nm。

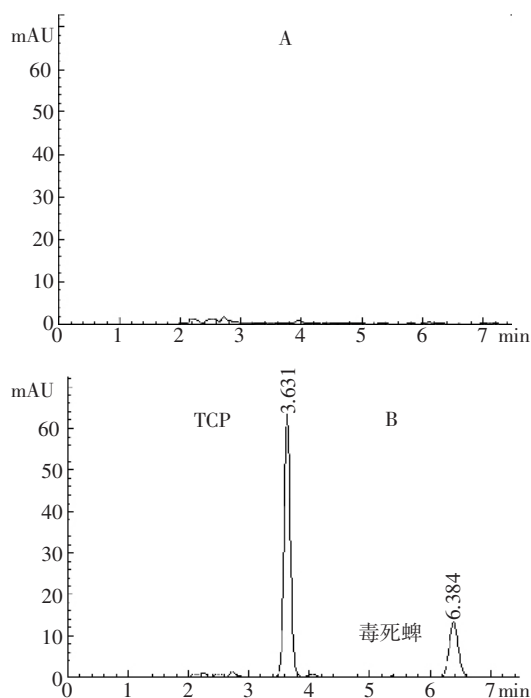


图 2 空白水样(A)和添加毒死蜱与 TCP 水样(B)的色谱图

Figure 2 HPLC chromatogram of untreated water sample(A) and water spiked with chlorpyrifos and TCP(B)

(3)当毒死蜱和 TCP 在水体中的浓度为 0.01~5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,毒死蜱的添加回收率为 91.4%~105.1%,变异系数为 0.99%~4.12%;TCP 的添加浓度的回收率为 90.6%~105.4%,变异系数为 0.29%~9.33%。水样中毒死蜱和 TCP 的最小检出浓度分别为 2 和 0.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。均符合残留分析的要求。

参考文献:

- [1] 陈振德,陈雪辉,冯明祥,等.毒死蜱在菠菜中的残留动态研究[J].农业环境科学学报,2005,24(4):728-731.
CHEN Zhen-de, CHEN Xue-hui, FENG Ming-xiang, et al. Residue dynamics of chlorpyrifos in spinach[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(4): 728-731.
- [2] 袁玉伟,司朝光,林 桓,等.毒死蜱、氰戊菊酯和高效氯氰菊酯在甘

- 蓝中的残留动态研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(3):1199-1202.
- YUAN Yu-wei, SI Chao-guang, LIN Huan, et al. Residual dynamics of chlorpyrifos, fenvalerate and beta-cypermethrin in cabbage[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(3): 1199-1202.
- [3] Serrano R, Hernández F, López F J, et al. Bioconcentration and depuration of chlorpyrifos in the marine mollusc *mytilus edulis*[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1997, 33:47-52.
- [4] Barron M G, Woodburn K B. Ecotoxicity of chlorpyrifos[J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 1995, 144:1-94.
- [5] 刘国光, 徐海娟, 王莉霞, 等. 毒死蜥对淡水原生动物群落的急性毒性[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(4):814-817.
- LIU Guo-guang, XU Hai-juan, WANG Li-xia, et al. Acute toxicity of chlorpyrifos to freshwater protozoa community[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(4):814-817.
- [6] 谢 慧, 朱鲁生, 李文海, 等. 利用降解酶去除蔬菜表面农药毒死蜥残留[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(5):1245-1249.
- XIE Hui, ZHU Lu-sheng, LI Wen-hai, et al. Removal of chlorpyrifos residue on the surface of vegetables using degrading enzyme[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(5):1245-1249.
- [7] 钱 博, 朱鲁生, 谢 慧, 等. 毒死蜥降解细菌 XZ-3 的分离及降解特性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(12):2827-2832.
- QIAN Bo, ZHU Lu-sheng, XIE Hui, et al. Isolation and degrading characters of chlorpyrifos degrading bacteria XZ-3[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(12):2827-2832.
- [8] Racke, K D. Environmental fate of chlorpyrifos[J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 1993, 131:1-150.
- [9] Armbrust K L. Chlorothalonil and chlorpyrifos degradation products in golfcourse leachate[J]. *Pest Management Science*, 2001, 57(9):797-802.
- [10] Baskaran S, Kookana R S, Naidu R. Contrasting behaviour of chlorpyrifos and its primary metabolite, TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), with depth in soil profiles[J]. *Australian Journal of Soil Research*, 2003, 41(4):749-760.
- [11] Aqel W A Q, Mohamed B A. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the quantification of chlorpyrifos, pyridostigmine bromide, N,N-diethyl-m-toluamide and their metabolites in rat plasma and urine[J]. *Journal of Chromatography B*, 2001, 754(2):533-538.
- [12] Bakiamoh S B, Maimait R, McGowin A E. Supercritical fluid extraction of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol from garden compost[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 862(1):105-112.
- [13] Mauriz E, Calle A, Manclús J J, et al. On-line determination of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in human urine samples by surface plasmon resonance immunosensing [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387 (8):2757-2765.
- [14] Chuang J C, Van Emon J M, Reed A W, et al. Comparison of immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry methods for measuring 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in multiple sample media[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 517(1-2):177-185.
- [15] Bicker W, Lämmerhofer M, Genser D, et al. A case study of acute human chlorpyrifos poisoning: Novel aspects on metabolism and toxicokinetics derived from liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of urine samples[J]. *Toxicology Letters*, 2005, 159(3):235-251.
- [16] Ay R, Karaca I, Secilmis H. Determination of the residue levels of some insecticides commonly used in apple orchards in Isparta province by HPLC[J]. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 2003, 27(4):293-304.
- [17] 郭春华, 郑力行, 何永华, 等. 尿中毒死蜥及其代谢产物的分析[J]. 复旦学报医学版, 2007, 34(3):423-426.
- WU Chun-hua, ZHENG Li-xing, HE Yong-hua, et al. Simultaneous determination of chlorpyrifos and its metabolite in human urine by HPLC-DAD[J]. *Fudan University Journal of Medical Science*, 2007, 34(3):423-426.

更正

由于投稿人疏忽,本刊 2008 年第 2 期第 778~782 页《淀粉基粘结剂在垃圾堆肥加工颗粒有机复混肥中的应用研究》一文中,第二作者应为“徐鹏翔”,参考文献[10]、[12]的第一作者均为徐鹏翔。特此更正。

《农业环境科学学报》编辑部