

^1H NMR法定量测定土壤中 除草剂2,4-二氯苯氧乙酸

杨晓云 毛秋平 黄其亮 徐汉虹

华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

摘要 建立了一种用内标法快速、简便检测土壤中2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)的 ^1H NMR分析方法。土壤中样品经pH值2.0的酸性水溶液和丙酮提取、浓缩、定容,用布鲁克AV 600核磁共振仪检测;在25℃下,以甲醇为溶剂、内置氘代丙酮为锁场溶剂,均苯三甲酸为内标,观察频率在600.13 MHz,谱宽为9 001.95 Hz,90°脉冲宽度12.10 μs ,采集时间3 s,延迟时间3 s,累加次数128的条件下采集2,4-D试样的氢谱。线性范围为30.00~200.00 mg/L,最低检测限25.0 mg/kg。稻田土和果园土的平均添加回收率分别为83.54%~90.26%和85.26%~92.65%,变异系数分别为为3.82%~5.15%和2.32%~5.89%。

关键词 2,4-二氯苯氧乙酸;核磁共振氢谱;定量分析;土壤样品

中图分类号 S 151.9⁺5; O 657.61 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0348-04

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是一类非常重要的除草剂,已被广泛地应用于农业和林业中的杂草控制。虽然苯氧乙酸类除草剂毒性较小,但仍对人畜有一定的毒副作用,且能在土壤、水、作物、秸秆及果实中残留。2,4-D在自然条件下不容易降解,水溶性低,进入人体后能引起内分泌功能紊乱,对神经系统也有影响,并可能诱发膀胱癌^[1]。国外对2,4-D残留的研究包括环境中2,4-D残留的迁移、降解规律以及在蔬菜和水果中的残留检测^[2-3]。

国内研究2,4-D检测方法的文献大多是用气相色谱和液相色谱法检测^[4-5]。耿志明等^[6]建立了柑桔中2,4-D残留的高效液相色谱测定方法,其样品前处理较为繁杂,需经提取和硅胶固相萃取步骤。常文宇等^[7]研究豆芽中2,4-D残留量的凝胶渗透色谱净化—毛细管柱气相色谱测定的方法,其样品前处理亦较为复杂,需经提取、衍生化和净化等步骤。气相色谱法测定2,4-D需要衍生化和净化,分离难度较大,液相色谱法也需要较为复杂的分离净化步骤。本文采用 ^1H NMR法测定土壤中2,4-D,建立了一种用内标法快速、简便检测土壤中2,4-D的分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甲醇、丙酮、二氯甲烷均为分析纯;2,4-D和均苯三甲酸标准品均购自Sigma-Aldrich公司。布鲁克AV 600核磁共振波谱仪(配5 mm-TXI反式三共振探头),瑞士布鲁克-拜尔斯宾公司;旋转蒸发器,河南巩义市予华仪器有限责任公司。

标准溶液的配制:准确称取均苯三甲酸和2,4-D标准品,用甲醇分别配制400.00 mg/L标准溶液。土壤样品采自华南农业大学农场稻田土(褐土)和华南农业大学果园土(红土)。

1.2 样品采集及制备

1)样品采集。配制1%的2,4-D甲醇水溶液5 L,加入适量乳化剂,均匀喷施于稻田和果园15 m²试验小区。采用5点法采集土壤样品,然后混匀土壤样品。土壤样品除去石子和根等杂物,经风干后,研磨粉碎,过0.500 mm孔径筛,备用。

2)样品制备。称取搅细的土壤样品10.0 g于50 mL离心管中,加入5 mL水溶液,用1 mol/L磷酸溶液调节pH值至2.0,加入25 mL丙酮,旋涡振荡3 min,4 000 r/min高速离心25 min,取上清液

收稿日期:2010-12-04

基金项目:国家自然科学基金项目(31071702)和广东省自然科学基金项目(8151064201000029)

杨晓云,副教授.研究方向:农药残留分析和农药环境毒理研究. E-mail: yxyhyxy@scau.edu.cn

至250 mL分液漏斗中,加入适量NaCl,分别用30 mL二氯甲烷萃取2次,振荡混匀,静置15 min,合并提取液,旋转蒸发器除去二氯甲烷,甲醇分次定容至2 mL。取样加入5 mm核磁管中,待¹HNMR检测。

1.3 NMR分析方法

1) 试验条件。测定温度25℃,观察频率600.13 MHz,谱宽9 001.95 Hz,90°脉冲宽度12.10 μs,采集时间3 s,脉冲延迟时间3 s,累加次数128。

2) 2,4-D分析方法。取200 μL样品溶液和200 μL均苯三甲酸标准溶液加入到5 mm核磁管中,同时在2.5 mm核磁管中加入50 μL含0.5%四甲基硅烷(tetramethylsilane, TMS)的氘代丙酮用于锁场和校正化学位移,以TMS峰为δ=0.00 ppm。已知浓度的均苯三甲酸做内标物质。所有¹HNMR谱图都是在布鲁克AV 600超导傅里叶变换谱仪上进行测定,按照本文“1.3.1)”中所述条件进行测定,用TOPSPIN 2.0处理,自由衰减信号经傅里叶转换,线宽因子为1.0 Hz,谱图相位和基线校准。在上述试验条件下调整仪器参数,调谐、控温、匀场、采样,得到¹HNMR谱。对均苯三甲酸和2,4-D的定量峰进行积分,取平均值,得到积分结果。按¹HNMR内标法,用以下公式计算样品的含量^[8-9]。

$$W_s = \frac{(A_s/n_s) \times M_s \times m_r}{(A_r/n_r) \times M_r \times m_s} \times W_r$$

其中: A_s 为被测样品定量峰的积分面积, n_s 为被测样品定量峰包含的质子数, M_s 为被测样品的分子量, A_r 为内标物质定量峰的积分面积, n_r 为内标物质定量峰包含的质子数, M_r 为内标物质的分子量, m_r 为称取的内标质量, W_r 为内标的质量百分含量, m_s 为样质量。

2 结果与分析

2.1 样品前处理

以丙酮作为提取溶剂,在酸性条件下提取^[5],分别对稻田土和果园土进行提取试验,果园土中的回收率较优于稻田土。

2.2 NMR分析条件优化

1) 内标物质与2,4-D定量峰的选择。核磁定量的准确性与选作定量分析的特征峰质子的弛豫方式有很大关系。在确保所选的内标定量峰与样品定量峰完全分离的情况下,选择弛豫机制相同的质子作为定量峰,可保证质子峰面积的一致性。2,4-D苯

环上3位碳上的质子在甲醇中化学位移为6.866 ppm,峰型为双重峰(d峰),较为靠近低场,与样品中杂质分离较好,故可选为2,4-D的定量峰。均苯三甲酸苯环质子在甲醇中的化学位移为8.518 ppm,与样品定量峰完全分离且都为苯环上质子,故选取为内标物质。

2) ¹HNMR采集条件的优化。为了提高灵敏度,弛豫延迟时间必须满足质子完全弛豫。通过反转恢复法,分别测定了均苯三甲酸和2,4-D定量质子的自旋-晶格弛豫时间为3.529和6.032 s。另外增加采样次数亦可增加灵敏度。为了选择最优化的采样时间、弛豫延迟和采样次数,用100.0 mg/L的2,4-D甲醇溶液进行3种影响因素的比较测试。如表1所示,试验10和12为信噪比最大的,然而它们耗费的时间却较长。因此,为选取最佳时效比的测试条件,选择测试时间20 min左右的试验采样参数。其中试验2测试时间为13 min,灵敏度较高,符合要求。1个采样循环(采样时间与延迟时间之和)为6 s,非常接近2,4-D的定量峰的弛豫时间。采样时间过长也影响谱图的数字分辨率。综上所述,选择3个参数分别为采样时间3 s,弛豫延迟时间3 s,采样次数128。

表1 影响2,4-D峰面积的仪器参数的优化¹⁾

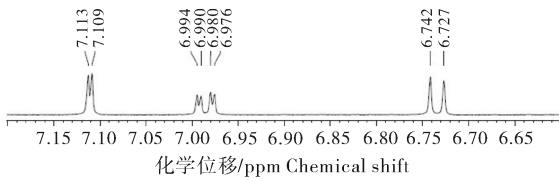
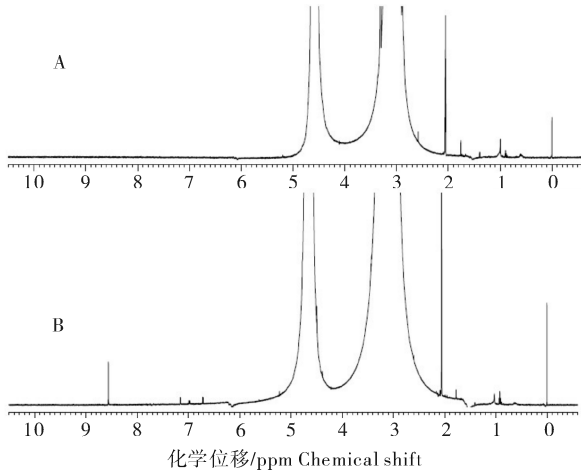
Table 1 Three factors optimization of 2,4-D determination

试验编号 Experiment No.	采样时间/s Acquisition time	延迟时间/s Delay time	采样次数 Scan	S/N	测试时间/ min Test time
1	3	2	128	527.86	10
2	3	3	128	661.01	13
3	3	4	128	575.75	15
4	3	5	128	539.67	17
5	3	7	128	551.69	21
6	3	10	128	582.77	28
7	5	2	256	693.47	30
8	5	3	256	744.13	34
9	5	4	256	681.44	38
10	5	5	256	745.79	43
11	5	7	256	729.02	51
12	5	10	256	744.48	64

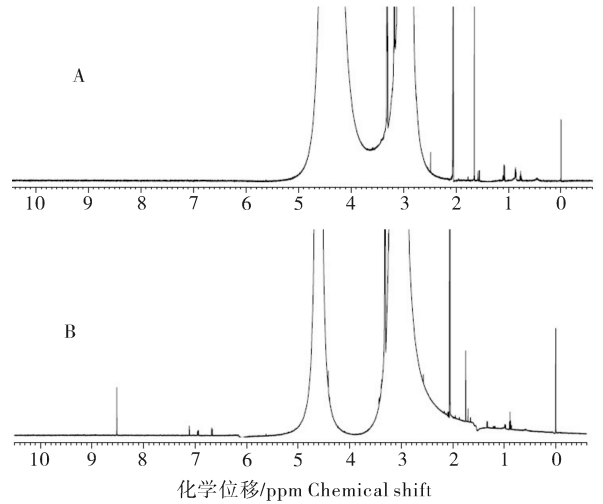
1) S/N: 信噪比 Signal/Noise.

2.3 2,4-D波谱图谱分析

图2-A和图3-A分别为褐土和红土空白样品在低场区¹HNMR波谱图,说明在5.5~10.0 ppm无杂质的干扰。2,4-D的¹HNMR谱峰归属为δ_H(ppm):7.111(d,2.4 Hz,H-3),6.990(dd,2.4 Hz,

图 1 2,4-D 标准样品¹H NMR 谱图Fig. 1 ¹H NMR spectra of 2,4-D standard sample

A. 褐土空白样品¹H NMR 谱图 ¹H NMR spectra of blank sample for brown soil; B. 褐土样品¹H NMR 谱图 ¹H NMR spectra of brown soil sample.

图 2 褐土样品与对照样品¹H NMR 谱图Fig. 2 ¹H NMR spectra of sample and CK for brown soil

A. 红土空白样品¹H NMR 谱图 ¹H NMR spectra of blank sample for red soil; B. 红土样品¹H NMR 谱图 ¹H NMR spectra of sample for red soil.

图 3 红土样品与对照样品¹H NMR 谱图Fig. 3 ¹H NMR spectra of sample and CK for red soil

9.0 Hz, H-5), 6.730(d, 9.0 Hz, H-6)。

2.4 线性与最小检测限

分别配制 2,4-D 标准液质量浓度为 30.0、60.0、80.0、100.0、200.0 mg/L 进行测定,峰面积 A 对质量浓度 ρ (mg/L) 回归计算,结果表明线性良好。其线性方程为 $y = 0.0954x + 0.3972$ ($r = 0.9986$)。在所设定的仪器条件下,2,4-D 最小进样

表 2 稻田土和果园土中不同添加量下 2,4-D 的回收率 ($n=3$)Table 2 The recovery of 2,4-D in paddy soil and garden soil ($n=3$)

土壤类型 Soils	样品加标质量浓度/(mg/L) Spiked concentration	实际测定质量浓度/(mg/L) Measured concentration	平均回收率/% Mean recovery	变异系数/% Coefficient of variation
稻田土 Paddy soil	10.0	8.354	83.54	4.63
	20.0	17.624	88.12	5.15
	40.0	36.104	90.26	3.82
果园土 Garden soil	10.0	8.576	85.76	5.34
	20.0	17.538	87.69	5.89
	40.0	37.061	92.65	2.32

量峰高为仪器噪音的 3 倍时,其最低检测限为 25.0 mg/kg。

2.5 精密度和回收率

应用本法对同一样品进行 5 次测定,计算得出 2,4-D 的测定结果的相对标准偏差为 2.46%。准确添加 2,4-D 标准溶液至土壤中,经过提取后进行样品处理,然后利用设定的 NMR 分析条件进行测定,得到样品加标回收率,结果见表 2。

2.6 样品测定

施药后 3 d 取样,按照本文“1.2”中所述制备样

品测定。通过对稻田土和果园土的测试分析,稻田土和果园图样品中检出 2,4-D 的含量分别为 105.05、123.62 mg/kg。

3 讨论

在农药残留检测试验中样品的前处理较为复杂^[10-11],对于一些农药还需衍生化才能进行色谱检测。本文用 pH 为 2.0 的酸性水溶液和丙酮提取土壤中 2,4-D,回收率较高,简化了样品前处理的过程。采用¹H NMR 法以均苯三甲酸为内标分别检测

稻田土和果园土中2,4-D的含量,在一定浓度范围内适用于土壤中2,4-D含量的测定,有较好的准确度和精密度,方法简便、省时。随着仪器技术的发展,更高磁场强度的谱仪和高性能探头的应用,¹H NMR法在农药残留特别是在复杂基质上农药残留检测方面的应用将会越来越广泛。

参 考 文 献

- [1] 王怀富,高鲁红. 除草剂2,4-二氯苯氧乙酸正丁基酯对小鼠甲状腺及睾丸功能的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2006,24(6):375-376.
- [2] BRILLAS E,CALPE J C,CABOT P L. Degradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by ozonation catalyzed with Fe²⁺ and UVA light [J]. Applied Catalysis B Environmental,2003,46:381-391.
- [3] ARANTE O P,BRITO N M,SANTOS T C R,et al. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis[J]. Talanta,2003,60:115-121.
- [4] 邹静,侯志广,王思威,等. 气相色谱法同时测定玉米中辛酰溴苯腈和2,4-D丁酯的残留[J]. 农药,2009,48(11):831-832.
- [5] 叶凤娇,孔德洋,单正军,等. 苯氧羧酸类除草剂土壤降解特性研究[J]. 环境化学,2010,29(6):1147-1151.
- [6] 耿志明,陈明,王冉,等. 高效液相色谱法测定柑橘中2,4-二氯苯氧乙酸残留量[J]. 江苏农业学报,2007,23(1):67-70.
- [7] 常宇文,吴晓宗,李伟,等. 凝胶渗透色谱—气相色谱法测定豆芽中2,4-二氯苯氧乙酸残留量[J]. 食品工业科技,2007,28(12):203-205.
- [8] 孙静霞,张正行. NMR在药物定量分析中的应用[J]. 药物分析杂志,2005,25(1):117-122.
- [9] 蒋文,苏敏,陈双全,等. 核磁共振氢谱内标法测定茼蒿地普隆的含量[J]. 分析化学,2008,36(3):385-388.
- [10] 秦改晓,袁科平,艾晓辉. 高效液相色谱法测定水产品中阿维菌素的残留量[J]. 华中农业大学学报,2009,28(1):84-88.
- [11] 陈小军,程东美,徐汉虹,等. 丁草胺在水稻上的降解动态与残留分析[J]. 华中农业大学学报,2009,28(3):286-290.

Quantitative detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid residue in soil using ¹H NMR

YANG Xiao-yun MAO Qiu-ping HUANG Qi-liang XU Han-hong

Key laboratory of Nature Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract An ¹H NMR method for quantitative detecting 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil with 1,3,5-benzenetricarboxylic acid(BTC) as internal standard was developed. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR) spectra were obtained in methanol and acetone-d₆ with a Bruker AV 600 MHz spectrometer at 25 °C. For each sample,128 scans were recorded with the following parameters:observing frequency (600.13 MHz),spectra width (9 001.95 Hz),90° pulses width (12.10 μs),acquisition time (3 s) and delay time (3 s). The linearity range is 30.00-200.00 mg/L,the minimum detection of 2,4-D was 25.0 mg/kg. The average recoveries of 2,4-D in paddy soil and garden soil were 83.54%-90.26% and 85.26%-92.65% with CVs of 3.82%-5.15% and 2.32%-5.89%, respectively.

Key words 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; proton nuclear magnetic resonance spectroscopy; quantitative analysis; soil sample

(责任编辑:陆文昌)