

粮谷中残留硝基苯的固相萃取前处理方法研究

刘 永, 杨长志, 张洪祥, 康庆贺

(黑龙江出入境检验检疫局技术中心, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: 根据不同种类粮谷的特点, 低脂肪含量的样品采用正己烷直接提取的模式, 高脂肪含量的样品先用乙腈作为提取剂, 然后进行液-液分配, 使硝基苯转移至正己烷相, 正己烷提取液再利用固相萃取技术进行净化和浓缩处理; 固相萃取选择氧化铝作为主要填料, 用 5ml 正己烷和 5ml 乙酸乙酯-正己烷(6+4)淋洗杂质, 最后乙酸乙酯进行洗脱并浓缩至 5ml, 使样品的浓缩和净化同步进行, 解决了前处理过程中不能浓缩的问题, 并用气相色谱-质谱进行了验证。实验本着简单、有效及节省成本的原则, 利用固相萃取技术, 解决了硝基苯净化和浓缩的问题, 建立了一套理想的前处理方法, 具有处理后杂质干扰少、实用性强等特点, 通过对方法回收率进行验证, 说明该方法准确、可靠, 符合前处理要求。

关键词: 硝基苯; 固相萃取; 前处理; 粮谷

Study on Pre-treatment Method of Nitrobenzene Residues in Grain by Solid Phase Extraction

LIU Yong, YANG Chang-zhi, ZHANG Hong-xiang, KANG Qing-he

(Technology Center, Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China)

Abstract: A pre-treatment method of nitrobenzene was studied by solid phase extraction in grain. According to characteristic of different kinds of grain, nitrobenzene in low fatty grain was directly extracted by n-hexane, and high fatty grain was extracted with acetonitrile in pre-treatment procedures, then extraction of acetonitrile was transferred into n-hexane by liquid extraction method. Aluminum oxide was used as main stuffing in solid phase extraction, and weaker polar impurity was washed with n-hexane and stronger polar particulate was washed with reagent of ethyl acetate-hexane (6+4) respectively. Elution of stronger polar reagent that 5 ml ethyl acetate was used because of concentration demand, and the effect was perfect. Concentration and purity of the determination method of nitrobenzene were isochronous and the loss problem was resolved in pre-treatment procedures of concentration. The pre-treatment method was also confirmed by gas chromatographic-mass spectrometry. A simple, available and economic pre-treatment method was established with the characteristics of low disturbance, convenience and high sensitivity in this study.

Key words nitrobenzene; solid phase extraction; pre-treatment; grain

中图分类号: TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0314-04

硝基苯是一种重要的化工原料, 主要用于染料、香料及炸药等化工行业, 易溶于乙腈、乙醚及正己烷等溶剂^[1-3], 对人体具有高毒性, 主要表现在形成高铁血红蛋白、溶血和肝脏损害等^[4]。2005 年 11 月吉化污染事故造成松花江流域水田和部分农田灌溉用水受到污染^[5], 而该地区是我国重要商品粮生产基地, 受硝基苯污染的水源会对农作物生长直接影响, 因此建立农作物中残留硝基苯的检测方法, 为研究硝基苯在粮谷中的残留动态提供检测手段, 对开展硝基苯污染事件环境评估及安全预警机制提供技术支持, 也为今后化工环境污染

事件中硝基苯类污染物的测定提供借鉴。

硝基苯性质稳定, 一般使用气相色谱或气-质联用技术进行测定, 方法简单, 灵敏度较高, 但硝基苯蒸汽压很低, 极易挥发, 样品前处理不能选用传统的浓缩方式, 实验发现, 选用旋转蒸发方式浓缩, 损失可达 85% 以上, 氮吹浓缩损失也在 80% 以上, 因此样品前处理是残留检测的关键。水体中(或水相为主体的液体)残留硝基苯的前处理方法一般采用溶剂直接提取(不浓缩)或顶空进样^[6-10], 植物样品含有脂肪、淀粉、蛋白等物质, 对检测有很大干扰, 不能采用水体中硝基苯

收稿日期: 2007-01-02

基金项目: 科技部“松花江水硝基苯污染对农牧渔业生产危害及其产品安全影响的研究”项目

作者简介: 刘永(1976-), 男, 工程师, 主要从事食品安全研究。E-mail: liuyhs@163.com

的检测方法,需要对样品进行净化处理,但净化后往往溶剂量较大,直接进样灵敏度不能满足要求;有学者使用水蒸汽蒸馏的方式,但无法找到好的吸附材料,用水相吸附则回收率低,有机溶剂吸附又无法浓缩处理,且前处理过程过于复杂,无法推广应用,目前植物样品中残留硝基苯的前处理方法未见报道。本实验对不同脂肪含量的粮谷类选择不同的提取试剂,利用液-液分配进行初步净化处理,再利用正相固相萃取技术使二次净化和浓缩步骤一步进行,解决了硝基苯的浓缩问题,建立了一套效果良好的前处理方法。本实验选择大米和大豆两种脂肪含量差别较大的粮谷作为主要实验材料,对其他粮谷类产品只进行了验证性实验。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890-5973N型气相色谱-质谱联用仪(配有离子电离源)、高速万能粉碎机、振荡器、固相萃取柱及250ml分液漏斗等。

硝基苯为色标级,纯度 $\geq 99.9\%$;乙腈、正己烷、乙酸乙酯为色谱纯;其他均为分析纯试剂;氧化铝及无水硫酸钠用马福炉 650°C 灼烧4h,于干燥器中冷却储存,用前在 200°C 活化2h,冷却至室温后使用。

氧化铝固相萃取柱为 1cm (内径) $\times 20\text{cm}$ (高)的注射器状玻璃管,在层析柱管底部塞入玻璃纤维,干法依次装入约 0.5cm 高的无水硫酸钠、 5g 处理过的氧化铝(约 5cm 高)、约 1cm 高的无水硫酸钠,每层要轻敲平、敲实后再加入下一层填料;用 10ml 乙酸乙酯及 20ml 正己烷依次预淋洗后,干涸前使用。

1.2 分析步骤

1.2.1 脂肪含量低的粮谷类(以大米为实验材料)

将样品粉碎后,称取 5g (准确至 0.01g)于 50ml 玻璃离心管中,加入 20ml 正己烷,振荡 10min , 4000r/min 离心 5min ,下层再加入 20ml 正己烷提取一次,合并上清液依次慢慢加入固相萃取柱(在柱中保持正己烷液面与无水硫酸钠层平齐前上样,全程不应使柱干涸),用 2ml 正己烷淋洗分液漏斗,一并注入固相萃取柱中。待样液完全流出后,用 5ml 正己烷及 5ml 乙酸乙酯-正己烷(6+4)洗涤固相萃取柱,弃去全部淋洗液,迅速用 5ml 乙酸乙酯洗脱固相萃取柱,收集并定容至 5ml 。

1.2.2 脂肪含量高的粮谷类(以大豆为实验材料)

将样品粉碎后,称取 5g (准确至 0.01g)于 50ml 玻璃离心管中,加入 10ml 乙腈,振荡 10min , 4000r/min 离心 5min 。上清液转移至 250ml 分液漏斗中,下层加入 10ml 乙腈再提取一次,合并上清液于同一分液漏斗中,加入 100ml 2%的硫酸钠水溶液,混匀后加入 20ml 正己

烷,振荡 3min ,静止分层,将下层水相部分转移至另一分液漏斗中,再用 20ml 正己烷提取一次,上层溶液中分别加入 2g 无水硫酸钠脱水后过固相萃取柱,以下同大米处理方法。

2 结果与分析

2.1 提取与相转移

硝基苯是一种具有硝基基团的化合物,由于硝基基团属亲电基团,具有电负性,硝基苯为有一定极性的化合物,能溶于乙腈、乙酸乙酯、及正己烷等有机溶剂^[1]。本实验对脂肪含量低的粮谷类选用正己烷提取的方式,直接固相萃取浓缩后提取效率在 95% 以上;对脂肪含量高的粮谷类选用乙腈作为提取试剂,通过液-液分配的方式将硝基苯转移至正己烷相,乙腈转移至水相弃去,正己烷相过固相萃取柱处理。

本实验对液-液分配效率进行了研究,在 20ml 乙腈中加入 $0.5\mu\text{g/ml}$ 的硝基苯标液 1.0ml ,再加入 100ml 2%的硫酸钠水溶液,分别用 20 、 20 、 20 和 20ml 正己烷分四次进行萃取,每次萃取量所占总添加量的百分比分别为 79.54% 、 14.34% 、 2.97% 和 1.02% (见表1),前两次萃取所占总量的比例为 93.88% ,萃取率已满足测定要求,因此选用两次萃取的方式。

表1 正己烷萃取次数与萃取量及萃取效率的关系
Table 1 Relationships between extraction times and extraction ratio with n-hexane

萃取次数	第一次	第二次	第三次	第四次	总量
萃取量(μg)	0.3977	0.0717	0.0148	0.0051	0.4893
萃取率(%)	79.54	14.34	2.97	1.02	97.87

2.2 净化和浓缩

以正己烷为介质,配制 $0.005\mu\text{g/ml}$ 的硝基苯溶液,取 40ml 过氧化铝固相萃取柱,再用 5ml 正己烷淋洗弱极性杂质, 5ml 乙酸乙酯-正己烷(6+4)淋洗极性杂质,弃去以上淋洗液;用 10ml 乙酸乙酯溶液作为固相萃取洗脱溶液,将洗脱液每毫升单独接收后分别上机测定,得到洗脱曲线(图1)。

由图1可以看出,洗脱液经固相萃取柱后从第 2ml 开始有硝基苯流出,第 3ml 达到最大值,然后迅速下降,第 6ml 全部洗脱,洗脱率为 97.28% ,其中第 2 、 3ml 洗脱量最大,占总添加量的 93.74% ,1至 5ml 占总添加量的 96.87% ,本实验取 $1\sim 5\text{ml}$ 洗脱样品混匀后进行测定,满足测定要求;实验过程中还可以通过减少洗脱量的方式来提高灵敏度,如只接收第 $2\sim 3\text{ml}$ 样品,检出限可提高 2.5 倍。正相固相萃取使净化和浓缩一步进行的方式,解决了传统浓缩方式损失过大的问题,使用气相色谱-质谱联用法对净化效果进行验证,净化效

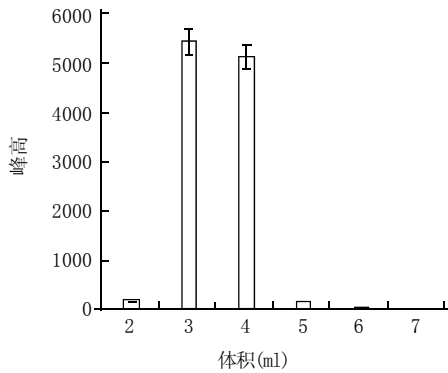


图1 固相萃取柱乙酸乙酯洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of ethyl acetate by solid phase extraction

果良好(图2、3)。

根据硝基苯的全扫描总离子流图, 以及欧盟 657 指

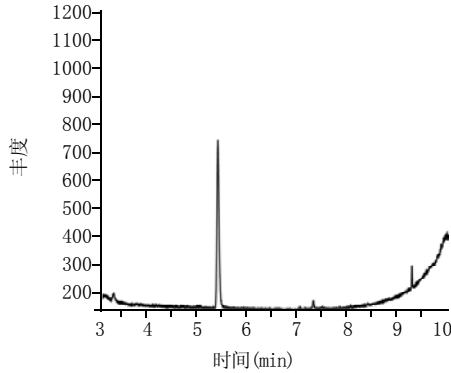


图2 大米中添加 0.05 µg/ml 硝基苯总离子流图
Fig.2 Total ion current chromatogram of 0.05 µg/ml nitrobenzene in rice sample

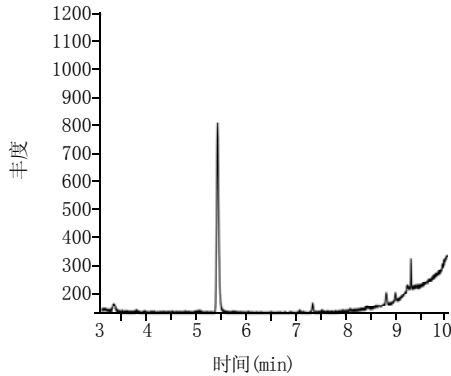


图3 大豆中添加 0.05 µg/ml 硝基苯总离子流图
Fig.3 Total ion current chromatogram of 0.05 µg/ml nitrobenzene in soybean sample

令提出的需要四个离子定性的要求, 在大豆样品介质存在条件下, 选择丰度较高的离子进行叠加实验(图4), 51、77、95、123m/z 四个质量数的离子碎片峰均无明显干扰物质。

2.3 前处理回收率

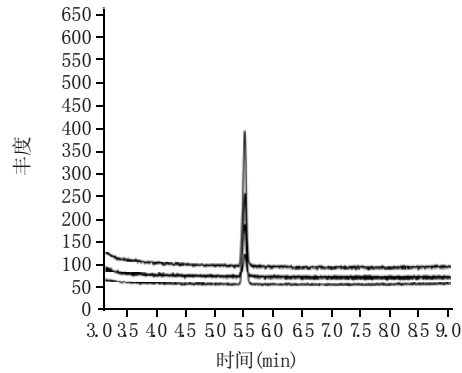


图4 大豆样品添加硝基苯的提取离子叠加图
Fig.4 Superposed extraction ion chromatogram of nitrobenzene in soybean sample

本实验以大米和大豆作为前处理样品, 采用标准添加法对添加样品分别进行回收率实验, 回收率实验选择 3 个不同水平, 每个水平测定 2 次(表 2), 添加回收率为 86.0%~93.2%。本方法的回收率实验结果符合前处理要求。

表2 大米和大豆中硝基苯回收率实验结果				
Table 2 Recovery of nitrobenzene in rice soybean and sample				
样品名称	添加水平(mg/kg)	测定值(mg/kg)	回收率(%)	平均回收率(%)
大米	0.005	0.0044	87.9	86.0
	0.005	0.0042	84.2	
	0.020	0.0185	92.6	90.8
	0.020	0.0178	89.1	
	0.100	0.0927	92.7	93.2
	0.100	0.0938	93.8	
大豆	0.005	0.0042	84.3	85.9
	0.005	0.0044	87.5	
	0.020	0.0171	85.6	88.1
	0.020	0.0181	90.6	
	0.100	0.0913	91.3	92.2
	0.100	0.0931	93.1	

3 讨论

由于固相萃取采用正相色谱的分配过程, 根据固相萃取的极性要求, 对脂肪含量低的样品采用正己烷直接提取的方式, 脂肪含量高的样品采用乙腈提取, 高效提取的同时减少了脂溶性杂质的提取, 然后用正己烷进行液-液分配。在相转移过程中, 由于乙腈在正己烷中溶解度很低, 正己烷萃取过程有效地除去乙腈, 有利于正相固相萃取过程中氧化铝对硝基苯的吸附, 萃取过程也有有效地除去了水溶性杂质。

固相萃取柱填料选择过程中, 分别对硅胶、弗罗里硅土和氧化铝进行了研究, 其中硅胶极性较弱, 对硝基苯的吸附差, 首先排除掉; 弗罗里硅土极性虽然比氧化铝弱, 但仅从吸附作用讲可以满足要求, 但弗罗里硅土去除脂肪作用稍差, 对脂肪含量较高的样品不能

取得较好的净化效果；氧化铝无论从吸附性还是去除脂肪效果方面都取得了良好的效果，因此选用氧化铝作为固相萃取柱填料。不过氧化铝吸附性强，杂质含量高于弗罗里硅土，对硝基苯的测定有一定影响，在柱活化时要首先用极性溶剂如乙酸乙酯洗掉极性杂质，再用正己烷改变其柱活性（乙酸乙酯存在使固相萃取柱对极性物质保留能力下降）。氧化铝活性是固相萃取的关键步骤，本实验分别用未去活、加1%水灭活和3%水灭活三种方式进行选择，由于本实验在柱吸附过程中需40ml左右的正己烷，加水后活性降低，不能满足浓缩的要求，未经灭活的氧化铝也应在三日内使用，超过三日应重新活化处理。

正相色谱分配过程除了固相萃取填料的选择外，淋洗液和洗脱液的选择也是固相萃取实验的关键步骤^[11]。粮谷中脂类杂质是影响硝基苯测定的主要干扰物，因此淋洗液和洗脱液一般不能使用极性太强的溶剂，防止脂类杂质随淋洗液或洗脱液流出，净化效果不理想。为保证硝基苯在固相萃取柱上的保留能力，上样液选择了极性较弱的正己烷作为介质，淋洗液的选择要用与上样液互溶，且能淋洗部分弱极性和极性较强杂质，本实验选用5ml正己烷淋洗弱极性杂质，5ml乙酸乙酯-正己烷(6+4)淋洗极性杂质；洗脱液一般选择有极性较大变化的溶剂，用丙酮、乙酸乙酯及其与正己烷的混合液进行洗脱实验，乙酸乙酯-正己烷(5+5)的混合液净化作用较好，不会把吸附的极性杂质一同洗脱下来，但所需20ml洗脱液才能完全洗脱，考虑到本实验需要固相萃取过程具有浓缩的作用，液-液分配过程已经进行初步净化，因此更多的考虑了浓缩的作用而牺牲部分净化功能，选择了的乙酸乙酯作为洗脱溶剂。另外，应在上样和洗脱过程保持液面与无水硫酸钠层平齐前上样，在洗脱过程中全程不应使小柱干涸，以避免所吸附物质挥发或吸附层下移。

在批量实验过程中，如果检出限允许的条件下，也可以减少极性淋洗液，将洗脱液加大到10ml，以防止氧化铝活性的差异或填装过程的不均匀性而造成被测物质的损失，另外需要说明的是，实验过程中在每个批次都要有质控样品，以保证实验的准确性。

4 结 论

本实验探讨粮谷中硝基苯的提取、净化和浓缩等前处理过程，对于低脂肪含量的样品采用正己烷直接提取

的模式，高脂肪含量的样品先用乙腈作为提取剂，然后进行液-液分配，使硝基苯转移至正己烷相，以利于正相固相萃取中硝基苯在氧化铝柱中的保留；固相萃取技术对硅胶、弗罗里硅土和氧化铝等填料进行了筛选，选择了极性最强的氧化铝作为主填料，然后对不同极性淋洗液进行了选择；洗脱液更多考虑了浓缩的要求，使用了极性较强的乙酸乙酯进行洗脱，取得了良好效果，并用气相色谱-质谱进行了验证。实验本着简单、有效及节省成本的原则，利用固相萃取技术，解决了硝基苯净化和浓缩的问题，建立了一套理想的前处理方法，具有处理后杂质干扰少，实用性强等特点，通过对方法回收率进行验证，说明该方法准确、可靠，符合前处理要求。实验过程中对其他常见粮谷类进行了验证，与所选两种样本没有明显差异，前处理方法适合大多数粮谷中残留硝基苯的检验，也可作为参考方法用于其他产品中残留硝基苯的测定。

参考文献：

- [1] 胡宏纹. 有机化学[M]. 北京：高等教育出版社，1995：194-199.
- [2] 崔榕，向夕品，殷钟意，等. 固定相络合萃取技术回收处理水中硝基苯[J]. 工业水处理，2005，25(10)：59-61.
- [3] 杨忆新，马军，秦庆东，等. 臭氧/纳米TiO₂催化氧化去除水中微量硝基苯的研究[J]. 环境科学，2006，26(10)：2028-2034.
- [4] 薛良义，李卢，周济胜. 硝基苯和氯苯对鲫鱼血细胞DNA损伤的研究[J]. 水利渔业，2005，25(3)：8-9.
- [5] 祝丽玲，徐宏恩，王明富，等. 松花江佳木斯段水污染硝基苯监测及影响后评价[J]. 黑龙江医药科学，2006，29(5)：7.
- [6] WADDELL R, DALE D E, MONAGLE M, et al. Determination of nitroaromatic and nitramine explosives from a PTFE wipe using thermal desorption-gas chromatography with electron-capture detection[J]. J Chromatogr A, 2005, 1062(1)：125-131.
- [7] 陈明，阴永光，邵超，等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用快速测定环境水样中的硝基苯、苯和苯胺[J]. 科学通报，2006，51(11)：1359-1362.
- [8] CASTLE L, PHILO M R, SHARMAN M. The analysis of honey samples for residues of nitrobenzene and petroleum from the possible use of from mixture in hives[J]. Food Chemistry, 2004, 84(4)：643-649.
- [9] BADER M, GOEN T, MULLER J, et al. Analysis of nitroaromatic compounds in urine by gas chromatography-mass spectrometry for the biological monitoring of explosives[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 710(1/2)：91-99.
- [10] CHEN K M, BAYOUMY K E, CUNNINGHAM J, et al. Detection of nitrated benzene metabolites in bone marrow of B6C3F1 mice treated with benzene[J]. Chemical Research in Toxicology, 2004, 17：370-377.
- [11] 绍俊杰，聂洪勇，叶永茂，等. 食品分析大全[M]. 北京：高等教育出版社，1997：339-344.