

◆ 环境与残留 ◆

申嗪霉素在稻田环境中的HPLC残留 分析方法研究

占绣萍¹, 赵莉¹, 樊晓青¹, 邹耀华²

(1. 上海市农业技术推广服务中心, 上海 201103; 2. 杭州市药品检验所, 浙江 310014)

摘要: 建立了一种用高效液相色谱仪分析稻田环境(水和土壤)中的申嗪霉素残留量的快速、简便方法。土样以丙酮和乙酸混合溶液提取, 水样中添加少许乙酸, 用三氯甲烷萃取, 浓缩、定容, 最后用液相色谱 DAD 检测器测定。该方法条件下, 申嗪霉素的最小检出量为 0.2 ng, 在水和土壤中最低检测浓度分别为 0.001、0.01 mg/kg, 申嗪霉素在样品中的回收率在 82.6%~111.6% 之间, 变异系数(CV)为 1.3%~10.5%, 满足农药残留分析要求。

关键词: 申嗪霉素; 液相色谱; 残留; 土壤; 水

中图分类号: TQ 450.2+63 文献标识码: A 文章编号: 1671-5284(2009)02-0039-03

Study on Analysis of M18 Residue in Paddy Water and Soil by HPLC

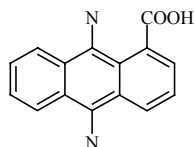
ZHAN Xiu-ping¹, ZHAO Li¹, FAN Xiao-qing¹, ZOU Yao-hua²

(1. Shanghai Agriculture Technical Extension Service Center, Shanghai 201103, China; 2. Hanzhou Institute of the Control of Drug, Hangzhou 310014, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the determination of phenazine-1-carboxylic acid (M18) in paddy water and soil. The residues of soil sample were extracted with acetone and acetic acid mixture, and paddy water was added a little acetic acid, and was extracted and cleaned up with chloroform, and condensed to dry. Determinations of analytes were completed using HPLC with DAD detection at 250 nm. Under HPLC conditions, the detectable limit of M18 was estimated to be 0.2 ng, and the minimum determination concentration was 0.001 mg/kg in paddy water, and 0.01 mg/kg in soil respectively. The fortified recoveries of M18 in paddy water and soil were in range of 82.6% to 111.6%, with relative standard deviations of 1.3% to 10.5%.

Key words: M18; HPLC; residue; soil; paddy water

抗菌剂申嗪霉素 (phenazine-1-carboxylic acid, M18) 商品名农乐霉素, 化学结构式为:



M18 是从农作物的根际土壤中筛选出多株双重功能细菌, 进而研制成的一种新型生物农药。主要用于防治黄瓜和西瓜的枯萎病、甜瓜的蔓枯病、辣椒的根腐病、水稻纹枯病等, 它对各种枯萎性病

害防治效果达 75%左右, 能基本上控制枯萎性病害的发生。为了搞清该农药使用后在环境中的行为, 首先必须对该农药在土壤和水环境中的残留分析方法进行研究。作为一种新型生物农药, 申嗪霉素的残留研究在国内外报道很少, 仅查询到一篇申嗪霉素在辣椒及其土壤中的残留分析方法研究^[1]以及相关残留动态研究^[2-3]。本文通过比较使用不同提取剂、不同振荡时间, 筛选出优化简便的前处理方法, 并且采用高效液相色谱仪外标法对稻田土壤和水中的申嗪霉素残留量进行了测定。结果表明本方法

收稿日期: 2008-12-18

作者简介: 占绣萍 (1983—), 女, 江西乐平人, 农药学硕士, 从事农药残留分析研究。Tel: 021-64052181

简便、快速、准确，完全满足对稻田环境中的申嗉霉素测定要求。

1 材料与分析方法

1.1 仪器

HP1100G 液相色谱仪 (美国安捷伦公司)、C18 反相色谱柱: 固定相为 YWG - C₁₈, 10 μm, 柱长 250 mm×4.6 mm; 制样机、国际型振荡器、旋转蒸发仪 2FG - 85A 型、离心机等。

1.2 试验材料与试剂

试验材料: 采自上海市浦东郊区水稻田土壤、水样; 申嗉霉素 (含量 99.9%), 上海农乐生物制品股份有限公司提供。

试剂: 丙酮、冰醋酸、三氯甲烷、无水硫酸钠、氯化钠, 均为国产分析纯; 乙腈 (色谱纯); 蒸馏水, 去离子水。

1.3 色谱条件^[4]

色谱柱: 25 cm×4.6 mm×5 μm 不锈钢柱, 内填 Discovery^R C - 18; 柱温: 50℃; 流动相为乙腈和 0.2%冰醋酸水溶液 (v/v)。采用梯度洗脱程序, 0 min 时, 冰醋酸水溶液 100%; 5 min 时, 冰醋酸水溶液、乙腈之比为 40 : 60; 8 min 时, 冰醋酸水溶液、乙腈之比为 20 : 80; 10 min 后, 乙腈为 100%。整个分析过程中, 流速为 0.9 mL/min, 进样量 20 μL, 停止时间 15 min, 冰醋酸水溶液与乙腈之比为 30 : 70, 延迟 3 min。使用紫外检测器, 检测波长 250 nm。

1.4 样品制备

取回土壤样品自然晾干后, 在粉碎机中将土壤打细, 装到带盖的塑料瓶中保存; 水样无需处理。

1.5 提取方法

土样: 称取 25 g 土壤样品加入到 250 mL 三角瓶中, 加丙酮和冰醋酸 (49 : 1) 的混合溶剂 50 mL 振荡提取 2 h, 将提取液转移至离心试管中, 以 3 000 r/min 的速度离心 5 min, 吸取上清液 10 mL。在 50℃ 的水浴温度下, 氮吹蒸发至近干, 最后用乙腈定容, 混匀后用 0.45 μm 滤膜过滤, 待测。

水样: 量取 50 mL 水样至 500 mL 的分液漏斗中, 加入 1 mL 冰醋酸, 摇匀, 再加入 50 mL 5% NaCl 盐水, 用 40、30、20 mL CHCl₃ 分 3 次萃取, 有机相经无水硫酸钠脱水后, 浓缩近干, 用乙腈定容待测。

2 结果与讨论

2.1 样品中提取溶剂选择

土壤中提取溶剂: 分别用丙酮、丙酮+冰醋酸 (49 : 1)、甲醇+冰醋酸 (49 : 1)、乙腈+冰醋酸 (49 : 1) 进行提取, 振荡 100 min。结果 (表 1) 表明, 含酸的溶剂提取回收率明显高于不含酸的溶剂提取效果, 其中以丙酮加酸的回收率略高于乙腈加酸的回收率, 甲醇加酸的回收率最差。从申嗉霉素的化学结构式可以看出它含有一个羧基, 其在弱酸性或中性条件下稳定。又介于乙腈毒性更大, 因此本文选择了丙酮加酸作为提取剂。

表1 土壤中不同提取溶剂的回收率比较

提取溶剂	土样回收率/%			
	R1	R2	R3	平均 R
丙酮	47.3	30.5	42.9	40.2
丙酮+酸	86.9	87.2	81.4	85.2
乙腈+酸	84.1	84.2	80.9	83.1
甲醇+酸	66.8	60.0	60.5	62.4

水样中萃取溶剂: 萃取前不加酸, CH₂Cl₂ 萃取; 萃取前加酸, CH₂Cl₂ 萃取; 萃取前加酸, CHCl₃ 萃取。结果 (见表 2) 表明, 加酸后 CHCl₃ 萃取效果明显优于其他溶剂萃取, 因此本文选择 CHCl₃ 作为萃取水样中申嗉霉素的溶剂。

表2 水样中不同萃取溶剂的回收率比较

萃取剂	水样回收率/%			
	R1	R2	R3	平均 R
二氯甲烷	30.5	29.8	37.1	32.5
先加酸后用二氯甲烷	60.8	66.2	71.3	66.1
先加酸后用三氯甲烷	104.3	99.8	101.9	102.0

2.2 土壤样品中振荡提取时间的选择

添加 0.5 mg/L 的 M18 标样到 25 g 土壤样品中, 加入丙酮和冰醋酸的混合溶剂 50 mL 分别振荡 60 min、90 min、120 min 进行比较, 结果 (表 3) 表明, 振荡 2 h 的回收率稳定, 提取效果好, 所以最后选择振荡 120 min 进行提取。

表3 土壤在不同振荡时间下的回收率比较

振荡时间/min	土样回收率/%			
	R1	R2	R3	平均 R
60	72.5	73.8	69.5	71.9
90	84.5	79.1	83.2	82.3
120	96.5	93.3	94.7	94.8

2.3 标准曲线、最小检出量与最低检出浓度

称取 0.05 g (纯度 99.9%) 申嗒霉素标样, 乙腈定容至 50 mL, 配制 1000 mg/L 的母液, 取一定量的母液, 分别稀释成 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 mg/L 7 个不同浓度的标准溶液, 摇匀, 按照 1.3 仪器检测条件, 以峰面积对进样绝对量做标准曲线, 检测线性范围为 0.2 ng~200 ng, 得到线性回归方程为 $y=11.289x+5.9361$, 相关系数为 $R^2=1$ 。标准曲线图见图 1。仪器最小检出量 0.2 ng, 在水和土壤中的最低检测浓度分别为 0.001, 0.01 mg/L。

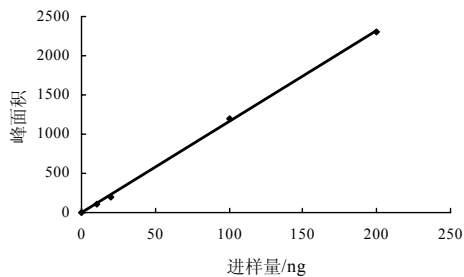


图 1 M18 标样标准曲线

2.4 回收率实验

分别在空白土壤、水样品中加入 3 种浓度的申嗒霉素标样, 按上述方法对样品进行提取、净化、色谱测定后, 计算添加回收率, 结果如表 4 所示。申嗒霉素在土壤样品之间的平均添加回收率 82.6%~92.0%; 在水样中的平均添加回收率为 84.3%~111.6%。变异系数 (CV) 为 1.3%~10.5%。

表 4 稻田土壤、水样中方法回收率

样品	添加浓度/(mg/L)	重复/%			平均值/%	变异系数
		R1	R2	R3		
土壤 (25 g)	0.8	99.8	86.9	89.3	92.0	7.4
	0.4	91.4	89.4	89.6	90.2	1.3
	0.04	84.1	78.9	84.8	82.6	3.9
水 (50 mL)	1	116.0	115.4	103.3	111.6	6.4
	0.1	104.3	107.0	87.6	99.7	10.5
	0.02	84.2	87.9	80.8	84.3	4.2

2.5 色谱条件选择

本文比较了甲醇和 0.2%冰醋酸水溶液、乙腈和 0.2%冰醋酸水溶液做流动相, 结果表明选取后者灵敏度更高。采用梯度洗脱, 申嗒霉素标样能与土壤、水中的杂质干扰区分开。申嗒霉素标样出峰时间为 7.99 min。标样、样品色谱图见图 2。

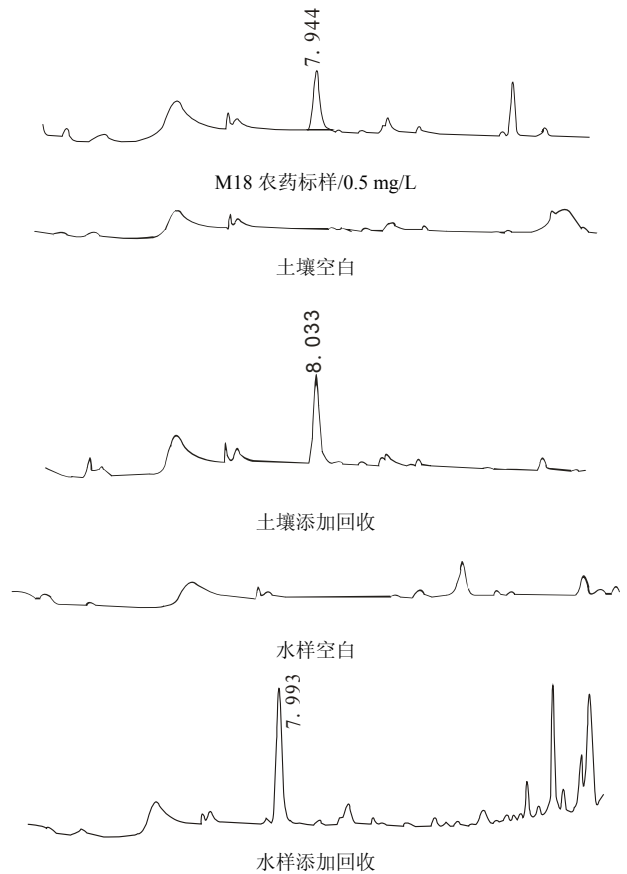


图 2 M18 农药标样、土样空白、土样回收率、水样空白、水样回收率色谱图

3 小结

研究并建立了一种采用高效液相色谱仪测定稻田环境 (土壤和水) 中残留量的分析方法。该方法具有干扰少、操作简便、准确度和灵敏度较高的特点。在三档添加浓度下, 本方法的平均回收率在 82.6%~111.6%, 均满足残留测定要求。目前, 尚未有文献报道申嗒霉素在稻田环境中的残留分析方法, 本研究将为申嗒霉素在稻田环境中的生态风险和安全性评价提供检测依据。

参考文献

- [1] 赵莉, 杨廷. 申嗒霉素在辣椒和土壤中的残留分析方法 [J]. 农药, 2006, 45 (12): 838 - 839.
- [2] 张耀中, 周力, 李向阳, 等. 申嗒霉素在辣椒及土壤中残留动态的研究 [J]. 化学分析计量, 2006, 15 (6): 48 - 50; 98.
- [3] 赵莉, 沈秋光, 杨廷. 申嗒霉素在辣椒和土壤中的残留动态 [J]. 农药, 2008, 47 (04): 277 - 278; 285.
- [4] 赵莉, 陈雪松. 1%申嗒霉素悬浮剂的高效液相色谱分析 [J]. 农药, 2005, 44 (2): 72 - 73.