

• 研究论文 •

甲基化衍生-高效液相色谱法检测代森锰锌在花生中的残留量

马婧玮¹, 董姝君¹, 游文字¹, 张敬平², 钮伟民², 潘灿平^{* 1}

(1. 中国农业大学 理学院, 北京 100094; 2 无锡市疾病预防控制中心, 江苏 无锡 214023)

摘要: 建立了简单、快速测定花生中杀菌剂代森锰锌的残留检测方法。花生样品用 L-半胱氨酸盐酸盐和 EDTA-2Na 的混合溶液振荡提取, 在 pH= 6.5~8.5 时, 用 0.05 mol/L 的碘甲烷与三氯甲烷-正己烷 (3:1, 体积比) 的混合溶液进行甲基化反应。有机层经浓缩后, 用乙腈定容, 采用高效液相色谱仪在 272 nm 处进行检测。色谱柱为 Agilent TC-C₁₈, 流动相为乙腈-水 (50:50, 体积比), 以 1.0 mL/min 的流速等梯度洗脱。结果表明, 代森锰锌的添加浓度在 0.05~2.00 mg/kg 范围内, 平均回收率为 76.1%~86.2%, 变异系数分别为 0.7%~10.2%, 均在农药残留测定所允许的范围。该方法的最低检出限 (LOD) 为 0.02 mg/kg, 最低检测浓度 (LOQ) 为 0.05 mg/kg。

关键词: 甲基化; 代森锰锌; 花生; 高效液相色谱; 农药残留

中图分类号: O 657.72 X 592

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)03-0297-04

Determination of Residual Mancozeb in Peanuts Sample by Methylation Derivation-High Performance Liquid Chromatography

MA Jing-wei¹, DONG Shu-jun¹, YOU Wen-zu¹,
ZHANG Jing-ping², NIU Wei-min², PAN Can-ping^{* 1}

(1. College of Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2 Wuxi Municipal Center for Disease Control and Prevention, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China)

Abstract A simple and rapid method was developed for the residue determination of mancozeb. Mancozeb in peanuts sample was extracted by the mixed solution of L-cysteine and EDTA-2Na. After that 0.05 mol/L methyl iodide in trichloromethane-hexane (3:1, V/V) was added into the extracts. Then the organic layer was taken out and concentrated and dissolved in acetonitrile for HPLC by λ 272 nm. In the method, mancozeb was analyzed on a Agilent TC-C₁₈ column, using a mixture of acetonitrile-water (50:50 V/V) as the mobile phase at the ambient temperature with a flow rate of 1.0 mL/min. The average recoveries of mancozeb in peanuts at 0.05, 0.5 and 2.0 mg/kg fortification level were 76.1%~86.2%, and the coefficient of variation were 0.7%~10.2%. The limit of detection (LOD) was 0.02 mg/kg and the limit of quantitation (LOQ) was 0.05 mg/kg.

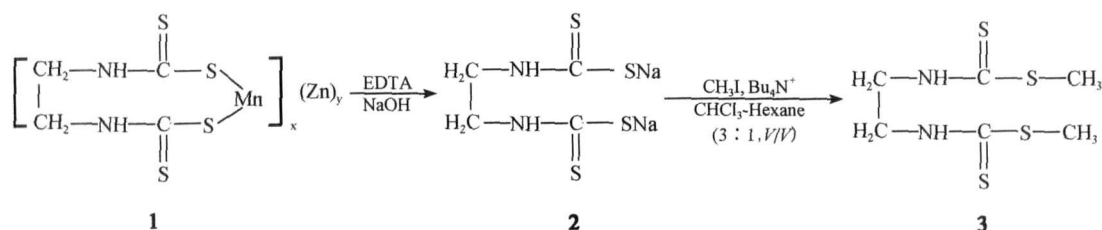
Key words methylation; mancozeb; peanuts; high performance liquid chromatography; pesticide residue

收稿日期: 2007-04-10 修回日期: 2007-07-08

作者简介: 马婧玮 (1983-), 女, 硕士研究生, E-mail: jingwei@126.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 潘灿平 (1970-), 男, 湖南新邵县人, 博士, 教授, 从事农产品安全与残留分析方面的研究. 联系电话: 010-62733219 E-mail: canping@cau.edu.cn

基金项目: 卫生部科研基金课题 (W K J2006-2-10).

代森锰锌为乙撑二硫代氨基甲酸酯(盐)类杀菌剂(EBDCs)中的重要品种之一,具有高效、低毒、广谱等特点,主要用于防治蔬菜、果树、花卉及其他经济作物由藻菌纲和半知菌类引起的霜霉病、斑病、赤霉病等病害^[1]。有关代森锰锌在作物中的残留分析报道大多是采用顶空技术^[2~8],即以CS₂的检测量计算,但因为检出的是所有化合物产生的CS₂的总量,故缺乏专一性,且测定结果的稳定性和重现性也不好。因此建立简单快速的代森锰锌在复杂基质——花生中残留量的检测方法,在食品安全领域具有重要意义。



1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1100高效液相色谱仪,配二级管阵列检测器(DAD)和可变波长检测器(VWD)(美国Agilent公司);色谱柱为Agilent TC-C₁₈(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);Sartorius天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);离心机(Sigma公司);HM S-350小型旋涡振荡器(天津市恒奥科技发展有限公司);HZQ-C空气浴机械振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);Millex针头式过滤器,0.45 μm;超纯水器MILLIQ(美国Millipore公司)。

代森锰锌(mancozeb)标样(纯度75%)(中国农业大学理学院应用化学系农药分析室提供);乙腈(色谱纯);碘甲烷、L-半胱氨酸盐酸盐、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)、四丁基硫酸氢铵等试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 将2.5 g L-半胱氨酸盐酸盐与46.73 g EDTA-2Na及500 mL水、9 g氢氧化钠于烧杯中溶解,配制成pH=9.5~9.6的L-半胱氨酸盐酸盐和EDTA-2Na混合溶液备用(下称溶液I);将氯仿225 mL、正己烷75 mL和碘甲烷1 mL混合,制得0.05 mol/L碘甲烷与氯仿-正己烷(3:1,体积比)混合溶液备用(下称溶液II)。

准确称取代森锰锌标样0.0333 g(准确至0.2 mg)于25 mL容量瓶中,用溶液I溶解并定

作者参考Gustafsson等报道的在福美双含量分析中采用的衍生化原理^[9],建立了代森锰锌在花生中残留量的分析方法。该方法具有较好的特异性,采用液相色谱进行定性和定量,具有较好的应用推广价值。

该分析方法的原理为:在碱性条件下,用乙二胺四乙酸二钠(EDTA)将代森锰锌(1)转化为代森钠(2),后者再与碘甲烷发生甲基化反应,得到甲基化产物(3),由HPLC检测该甲基化产物。

其反应式如下:

容,配成浓度为1000 mg/L的标样储备液,于冰箱中储存(现配现用)。

1.2.2 样品处理 取20 g捣碎的花生样品于250 mL三角瓶中,加入100 mL溶液I,密封,20℃恒温条件下使用空气浴机械振荡器在150 r/min下,剧烈振荡10 min,转移至离心管中,再在3800 r/min下离心5 min,转移上清液于250 mL三角瓶中;样品残渣再用50 mL溶液I涡旋2 min提取,步骤同上。合并上清液于250 mL三角瓶中,搅拌下用6 mol/L的盐酸调pH=8.0,加5 mL 0.41 mol/L的四丁基硫酸氢铵水溶液,调节pH=7.0,搅拌下加入40 mL溶液II,剧烈振荡10 min,静置10 min,弃水层,转移下层有机相于100 mL离心管中,于3800 r/min下离心5 min,弃水层,有机相用少量无水硫酸钠干燥,上清液转移至100 mL旋蒸瓶中,加5 mL 1,2-丙二醇-二氯甲烷(1:4,体积比)溶液,于30℃水浴中旋蒸浓缩,残留物用1 mL乙腈溶解,摇匀,经0.45 μm过滤器过滤后进HPLC分析。

1.2.3 色谱条件 色谱柱Agilent TC-C₁₈柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);柱温:25℃;流速1.0 mL/min;进样量:20 μL;VWD波长选用272 nm作为代森锰锌甲基化化合物的检测波长;流动相为乙腈-水=50:50(体积比);仪器为四元泵配置,采用等梯度流动相洗脱。

待仪器稳定后,重复进标样至有效成分前后

峰面积值的相对偏差 $< 1.5\%$, 以标样、样品、样品、标样顺序进行。

2 结果与讨论

2.1 实验原理

在甲基化反应中, 以阳离子表面活性剂四丁基硫酸氢铵作为相转移催化剂, 使代森钠由水相转移到有机相中, 使反应得以顺利进行。

根据文献报道和实验证明, L-半胱氨酸盐酸盐是有效的抗氧化剂。碘甲烷的浓度在 $0.01 \sim 0.10 \text{ mol/L}$ 范围内, 回收率是恒定的; 当以体积比为 $3:1$ 的氯仿-正己烷为溶剂时, 回收率最高。

2.2 标准曲线制作

在 1.2.3 节条件下, 花生样品中代森锰锌甲基化衍生物 (3) 的色谱峰与溶剂峰及干扰峰完全分离, 见图 1 和图 2。化合物 3 的保留时间为 $9.2 \sim 9.3 \text{ min}$ 。

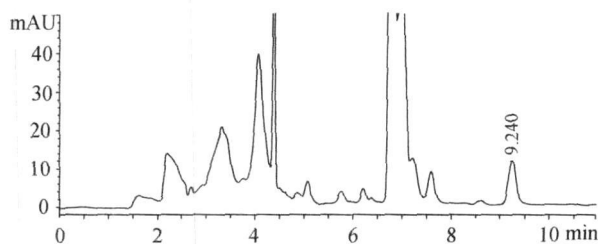


图 1 花生中 0.5 mg/kg 代森锰锌标样添加液相色谱图 ($20 \mu\text{L}$ 进样)

Fig. 1 HPLC chromatograph of peanuts sample fortified with mancozeb of 0.5 mg/kg ($20 \mu\text{L}$ for injection)

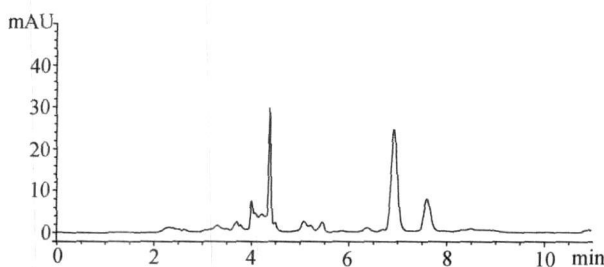


图 2 空白花生样品的液相色谱图 ($5 \mu\text{L}$ 进样)

Fig. 2 HPLC chromatograms of peanuts blank sample ($5 \mu\text{L}$ for injection)

将 1.2.1 节配制的代森锰锌标准溶液分别稀释成 $50, 10, 5, 1 \text{ mg/L}$, 分别取 1 mL 于 250 mL 三角瓶中, 按 1.2.2 节的方法操作。在 1.2.3 节色

谱条件下进样, 以代森锰锌标样的浓度 (c) 为横坐标, 以其甲基化衍生物对应的峰面积 (A) 为纵坐标作图得标准曲线, 线性回归方程为 $c = 20311A + 10648$, 线性相关系数 $r^2 = 0.9992$ 。可见在 $1 \sim 50 \text{ mg/L}$ 范围内响应峰面积值与药物浓度呈良好的线性关系。代森锰锌标准样品甲基衍生物色谱图见图 3。

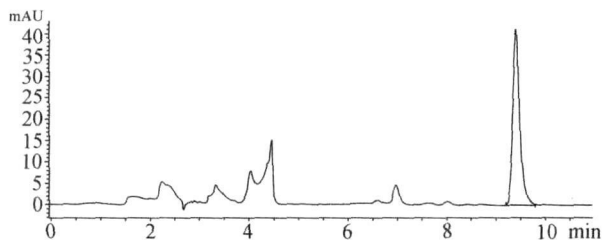


图 3 代森锰锌标样的液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograph of mancozeb standard sample

2.3 精密性、准确度和重现性

采用同一供试样品溶液, 在相同色谱条件下, 连续进样 5 次, 测定其峰面积, 多次测定的峰面积相对标准偏差为 2.3% , 说明本方法有较好的精密性。

在花生空白样品中准确加入一定量的代森锰锌标准品, 按同样的操作步骤进行提取、衍生化、测定, 计算回收率, 结果列于表 1。添加浓度在 $0.05 \sim 2.00 \text{ mg/kg}$ 范围内时, 回收率为 $76.1\% \sim 86.2\%$, 变异系数为 $0.7\% \sim 10.2\%$, 均在农药残留测定所允许的范围内。

分别以噪音信号的 3 倍和 10 倍确定方法的最低检出限 (LOD) 为 0.02 mg/kg , 最低检测浓度 (LOQ) 为 0.05 mg/kg (均以代森锰锌含量计)。

取同一花生空白样品 5 份, 进行 0.5 mg/kg 水平添加, 按同样的方法进行提取、衍生化、测定, 所得回收率平均为 79.2% , 相对标准偏差为 8.5% , 表明方法准确度和重现性较好。

2.4 讨论

由于代森锰锌不溶于水和几乎所有有机溶剂, 因而只能采用间接方法测定, 已报道的方法中有 GC 法、GC-MS 法、TLC 法及行业标准 HG 2315—92 法等, 其中大多是根据代森锰锌的衍生产物来计算代森锰锌含量, 但方法的准确性和重现性不好。本方法利用代森锰锌在碱性条件下与 EDTA-2Na 水溶液作用转化为代森钠, 再用碘甲烷引入甲基, 最后由 HPLC 测定该甲基化产物, 取得了满意的结果。

表 1 花生样品中代森锰锌标样添加回收结果

Table 1 Average recovery and relative standard deviation of mancozeb in peanuts at 0.05, 0.5 and 2.0 mg/kg fortification level (n = 3)

添加水平 Fortification level/(mg/kg)	回收率 Recoveries(%)			平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	最低检出限 LOD/(mg/kg)	最低检测浓度 LOQ/(mg/kg)
	1	2	3				
0.05	84.4	74.6	69.2	76.1	10.2		
0.5	81.9	76.5	79.9	79.4	3.4	0.02	0.05
2.0	86.9	85.7	86.2	86.2	0.7		

作者在此原理基础上,以高效液相色谱为工具通过检测代森锰锌甲基化衍生物的方法,建立了代森锰锌在花生样品中的残留检测方法。实验表明,添加浓度在 0.05~2.00 mg/kg 范围内时,回收率在 76.1%~86.2%,变异系数在 0.7%~10.2% 之间,均在农药残留测定所允许的范围。

本方法无需复杂的净化处理,直接使用液相色谱检测,即可达到残留分析的目的。且简单易行,缩短了样品前处理的时间,分离效果好,结果可靠,远远优于目前常用的顶空技术。

参考文献:

[1] LÖCHER F J, LORENZ G, BEETZ K J. Resistance Management Strategies for Dicarboximide Fungicides in Grapes Results of Six Years Trial Work [J]. Crop Protection, 1987, 6(3): 139-147.

[2] LOWEN W K. Determination of Dithiocarbamate Residues on Food Crops [J]. Anal Chem, 1951, 23(12): 1846-1850.

[3] KEPPEL G E. Modification of the Carbon Disulfide Evolution Method for Dithiocarbamate Residues [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1969, 52(1): 162-167.

[4] MCLEOD H A, MCCULLY K A. Head Space Gas Procedure

for Screening Food Samples for Dithiocarbamate Pesticide Residues [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1969, 52(3): 1226-1230.

[5] ENGST R, SCHNAAK W. Residues of Dithiocarbamate Fungicides and their Metabolites on Plant Foods [J]. Residue Reviews, 1974, 52: 45-67.

[6] FENG Xiu-qiong(冯秀琼), LI Hu(李琥), ZHAO Qiu-xia(赵秋霞), et al. 代森锰锌及其代谢物乙撑硫脲在苹果及土壤中的残留研究 [J]. Pesticide(农药), 1997, 36(5): 31-33.

[7] MA Heng-lin(马恒麟), JI Ran(纪然), ZHANG Yong-gang(张永刚). 西瓜、瓜叶及土壤中代森锰锌残留气相色谱分析方法的研究 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2000, 2(2): 63-70.

[8] JIN Yi(金怡), SHI Li-li(石利利), SHAN Zheng-jun(单正军). 代森锰锌及其代谢产物在荔枝与土壤中的残留动态 [J]. Rural Eco-Environment(农村生态环境), 2005, 21(2): 58-61.

[9] GUSTAFSSON K H, THOMPSON R A. High-pressure Liquid Chromatographic Determination of Fungicidal Dithiocarbamates [J]. J Agric Food Chem, 1981, 29: 729-732.

(Ed. JIN SH)

• 会议信息 •

第七届 FAO/WHO 关于农药标准的联席会议以及第 50 届 CIPAC/FAO/WHO 联席公开会议将于 2008 年 6 月 5 日至 13 日在德国不伦瑞克 (Braunschweig) 召开。详情请查看以下网址:
<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/meetings/meetings.htm>

关于“全球小作物使用”的高级会谈将于 2007 年 12 月 3 日至 7 日在 FAO 总部, 意大利的罗马召开。详情请查看网址: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/MPR/GMUS/GMUS.htm>

(王静、潘灿平提供)