

高效液相色谱法对环境样品中甲基托布津与甲霜灵残留的测定

何书海, 李腾崖, 陈 菲

(海南省环境科学研究院 海南省环境监测中心站, 海南 海口 570206)

摘 要: 建立了自动固相萃取/高效液相色谱法测定地表水和土壤中甲基托布津和甲霜灵残留的方法。地表水采用 C_{18} 固相萃取小柱进行富集、净化及浓缩; 土壤采用丙酮-二氯甲烷 (体积比 3:7) 溶液振荡萃取, 弗罗里硅土小柱净化和浓缩; 以乙腈和水为流动相, 于 230 nm 波长处对样品进行高效液相色谱检测。甲基托布津和甲霜灵在水中的检出限分别为 0.36、3.49 $\mu\text{g/L}$, 在土壤中的检出限分别为 0.03、0.18 mg/kg 。在优化实验条件下, 甲基托布津和甲霜灵在水样和土壤样品中的添加回收率为 77%~105%, 精密度为 1.2%~8.5%。方法可用于环境样品中甲霜灵和甲基托布津残留量的测定。

关键词: 甲基托布津; 甲霜灵; 自动固相萃取; 高效液相色谱法; 环境样品

中图分类号: O657.72; S482 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2010)02-0161-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.02.012

Residual Determination of Thiophanate-methyl and Metalaxyl in Environment by High Performance Liquid Chromatography

HE Shu-hai, LI Teng-ya, CHEN Fei

(Hainan Environmental Monitoring Centre, Hainan Research Academy of Environmental Sciences, Haikou 570206, China)

Abstract: A method for determination of thiophanate-methyl (TM) and metalaxyl (MEL) in surface water and soil have been developed by automatic solid-phase extraction (SPE) coupled with high performance liquid chromatography (HPLC). Water sample was cleaned up and concentrated by C_{18} cartridge, soil sample was firstly extracted by acetone-dichloromethane (3:7, by volume), then purified and concentrated by florisil solid-phase extraction cartridge. The detection of TM and MEL was performed by HPLC using acetonitrile-water as mobile phase and selecting 230 nm as detection wavelength. Under the optimal conditions, the calibration curves showed good linearity on certain concentration of TM and MEL with correlation coefficients not less than 0.999 5. The detection limits of TM and MEL were 0.36 $\mu\text{g/L}$ and 3.49 $\mu\text{g/L}$ in water, 0.03 mg/kg and 0.18 mg/kg in soil, respectively. Recoveries at three spiked concentration levels ranged from 77% to 105%. The relative standard deviations (RSDs) for real sample spiked with mixed standard were in the range of 1.2% to 8.5%. The SPE/HPLC method could be used to detect MEL and TM in environmental field.

Key words: thiophanate-methyl; metalaxyl; automatic solid-phase extraction; high performance liquid chromatography; environmental sample

甲基托布津 (1, 2-二 (3-甲氧羰基-2-硫脲基) 苯, 缩写为 TM) 和甲霜灵 (N-(2-甲氧基乙酰基)-N-(2, 6-二甲苯基)-D, L 丙氨, 缩写为 MEL) 是常用的杀菌剂。TM 是广谱高效内吸杀菌剂, 对各种经济作物的白粉病、菌核病、灰霉病等多种病害有保护和治疗作用^[1-2]。MEL 是一种易被植物吸收、上行传导的高效杀菌剂, 具有保护和治疗作用, 对卵菌纲引起的病害有特效^[3-5]; 由于其应用巨大, 使得它们在环境中广泛存在。因此, 有必要建立一种快速、简便的方法监测环境样品中的痕量杀菌剂。

MEL 和 TM 残留的测定方法主要有气相色谱法、液相色谱及色谱-质谱联用方法^[5-11]等, 但其前处理方法因使用大量的有机溶剂而带来污染, 且操作繁琐。固相萃取是一种有效的样品前处理技术, 具有回收率高、富集倍数大、有机溶剂用量少等特点, 并且操作简便、易于实现自动化^[12-13]。在国

收稿日期: 2009-11-03; 修回日期: 2009-12-20

第一作者: 何书海 (1981-), 男 (苗族), 海南万宁人, 助理工程师, 硕士, Tel: 0898-66758400, E-mail: heshuhai1981@163.com

外, 农药固相萃取技术已广泛应用于水果、蔬菜^[14]、土壤^[15-16]和植物^[17]样品, 国内相关应用也日趋增多。目前尚未有同时测定水和土壤中 MEL、TM 的报道。本文建立了自动固相萃取/高效液相色谱法同时测定环境中 MEL 和 TM 含量的方法, 并检测了海南地区土壤及地表水中的 MEL 和 TM 残留量, 为评价其在环境中的安全性提供了科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 液相色谱仪 (主要包括 2487 双波长紫外-可见检测器、柱温箱、自动进样器、自动脱气四元梯度泵等); 色谱柱: SunFireTM C₁₈ 250 mm × 4.6 mm × 5 μm (i. d.) 不锈钢柱; UV-2550 紫外可见分光光度计 (日本岛津); 自动固相萃取仪 Auto Trace SPE、自动浓缩仪 Turbo vap (美国 Zymark Corporation); 振荡均匀仪 SA300 (日本 Yamato Scientific 公司); C₁₈ 固相萃取小柱: 6 mL/500 mg 弗罗里硅土小柱: 6 mL/1 000 mg (美国安捷伦公司)。

二氯甲烷为色谱级; 甲醇、乙腈均为液相色谱级 (德国 Merck 公司); 无水硫酸钠 (优级纯) 在马弗炉中 700 °C 烘 6 h; 硅藻土、空白土壤均在马弗炉中 600 °C 烘 6 h; 空白水: 超纯水; 标准品 MEL、TM (纯度 99.0%, 德国 Ehrenstorfer Quality 公司)。

1.2 标准曲线制作

吸取 TM (100 mg/L) 和 MEL (1 000 mg/L) 标准溶液。水样标准曲线: TM 用甲醇稀释配成质量浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1.6、2.4、4.0 mg/L 的溶液, MEL 配成质量浓度分别为 2.0、4.0、8.0、16.0、24.0、40.0 mg/L 的溶液; 土壤标准曲线: TM 用甲醇稀释配成质量浓度分别为 0.25、0.50、1.0、2.0、10.0、16.0、20.0 mg/L 的溶液, MEL 配成质量浓度分别为 2.5、5.0、8.0、16.0、50.0、80.0、100 mg/L 的溶液。

1.3 样品的采集与保存

采集水源水样时, 应用棕色磨口玻璃瓶采集, 水样应完全注满, 不留空气。采集后的样品于 4 °C 冰箱内保存。

土壤样品需采集新鲜土样, 采集后用棕色磨口玻璃容器于 4 °C 以下避光保存, 采样时样品要充满容器, 并注意在采样和运输过程中避免样品的污染。

1.4 样品的提取及净化

水样的处理: 100 mL 水样过滤后, 用自动固相萃取仪 (大剂量型) 纯化和富集。C₁₈ 固相萃取柱经甲醇、水预淋洗后, 上 100 mL 水样, 富集后用甲醇洗脱, 洗脱液用氮气吹干, 定容至 1 mL, 待测。

土壤样品的处理: 准确称取土样 10 g 与适量硅藻土混匀 (根据土壤湿度添加 2~5 g 硅藻土), 置于 250 mL 具塞三角锥形瓶中, 加入 20 mL 丙酮-二氯甲烷 (体积比 3:7, 下同) 振荡提取 30 min, 将上清液移入锥形瓶中。残渣重复提取 1 次。合并有机相, 过无水硫酸钠, 滤液氮吹至约 1 mL 时, 用自动固相萃取仪 (小剂量型) 净化。弗罗里硅土固相萃取柱依次用 10 mL 丙酮-正己烷 (体积比 1:1, 下同) 预淋洗后, 加入浓缩液, 用 10 mL 丙酮-二氯甲烷洗脱, 收集洗脱液, 在氮气吹干仪上 40 °C 吹干, 用甲醇定容至 1 mL, 待测。

1.5 HPLC 测定条件

流动相: 乙腈-水 (体积比 60:40); 进样体积: 10 μL; 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C。

2 结果与讨论

2.1 固相萃取条件的优化

水样固相萃取条件的优化: 研究了 2 种 SPE 小柱 (C₈ 和 C₁₈ 小柱) 对 TM 和 MEL 的净化效果。在 100 mL 空白水样中加入 0.4 mg/L 的 TM 和 4.0 mg/L 的 MEL 混合标样, 考察了不同类型的萃取小柱及洗脱液用量对萃取率的影响。结果表明, C₈ 小柱对 TM 和 MEL 的萃取率仅为 37.6%、31.4%, 且重复性较差; C₁₈ 小柱对 TM 和 MEL 的萃取率高于 90.0%, 其原因是 C₁₈ 柱对分析物的保留强于 C₈ 柱, 含碳

量对分离效果和组分的保留时间有很大影响。因此，本实验选择 C₁₈小柱对样品进行处理，选择甲醇活化和洗脱。

土壤样品固相萃取条件的优化：在弗罗里硅土小柱中加入 1.0 mg/L 的 TM 和 10.0 mg/L 的 MEL 混合标样，考察了洗脱液对萃取率的影响。结果表明，固相萃取柱依次用 10 mL 丙酮 - 正己烷预淋洗后上样，用 10 mL 丙酮 - 正己烷洗脱，TM 和 MEL 的回收率分别达 83% 和 84%；固相萃取柱依次用 10 mL 丙酮 - 正己烷预淋洗后上样，用 10 mL 丙酮 - 二氯甲烷洗脱，TM 和 MEL 的回收率分别达到 98% 和 99%。因此，实验选择弗罗里硅土小柱对样品进行处理，选择丙酮 - 正己烷活化和丙酮 - 二氯甲烷洗脱。

2.2 检测波长的确定

精确称取适量 TM 和 MEL 的标准样品，用甲醇分别配成 1.0、10.0 mg/L 的溶液，用紫外分光光度计在 200~400 nm 范围进行全波长扫描，MEL 的最大吸收波长为 230 nm，TM 在 229、267 nm 处有 2 个吸收峰。综合考虑，确定检测波长为 230 nm，2 种物质均有较好的灵敏度。

2.3 色谱条件的选择

实验表明，流速为 0.6 mL/min 时在较短时间内得到较好的分离度。本实验采用乙腈 - 水流动相进行分离实验，随着水的体积分数增加，峰形变差，当水的体积分数为 40% 时有较好的出峰时间和峰形，采用乙腈 - 水 (60 : 40) 为最佳流动相。优化的色谱条件见 “1.5”。

图 1 为优化条件下，TM 和 MEL 混合标准溶液的色谱图。以响应峰面积为纵坐标，质量浓度 (mg/L) 为横坐标，绘制线性曲线，结果见表 1。

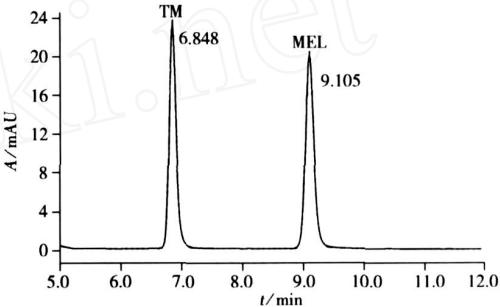


图 1 TM 与 MEL 混合标准溶液的色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of TM and MEL standard

表 1 TM 与 MEL 的保留时间、线性回归方程、线性范围及相关系数

Table 1 Retention times, regression equation, linear ranges and correlation coefficients of thiophanate-methyl (TM) and metalaxyl (MEL)

Sample	Compound	Retention time t/min	Regression equation	Linear range $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Correlation coefficient r
Water	TM	6.843	$y = 8.33 \times 10^4 x - 4.42 \times 10^4$	0.2 ~ 4.0	0.999 9
	MEL	9.106	$y = 8.66 \times 10^3 x - 2.65 \times 10^3$	2.0 ~ 40.0	0.999 9
Soil	TM	6.843	$y = 7.82 \times 10^4 x + 3.19 \times 10^4$	0.25 ~ 20.0	0.999 9
	MEL	9.106	$y = 7.79 \times 10^3 x + 2.17 \times 10^3$	2.5 ~ 100	0.999 5

2.4 检出限

在空白基质中添加接近方法检出限的标样，重复测定 7 次，计算标准偏差 (SD)。检出限 (MDL) = $SD t_{(n-1, 0.99)}$ ，一般加标样品测定平均值与 MDL 比值为 2~5，用于测定 MDL 的初次加标浓度较合适^[18]。在 100 mL 超纯水中加入 TM 和 MEL 标准品，测得环境水样的检出限分别为 0.36、3.49 $\mu\text{g/L}$ 。在 10 g 空白土壤中加入 TM 和 MEL 标准品，测得环境土壤样品检出限分别为 0.03、0.18 mg/kg (结果见表 2)。

表 2 环境样品中 TM 与 MEL 的检出限

Table 2 Detection limits of TM and MEL in environmental sample

Sample	Compound	Added	Found	Average	SD	MDL
Water	TM $\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	2.00	1.86, 1.73, 1.66, 1.61, 1.67, 1.53, 1.81	1.70	0.11	0.36
	MEL $\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	20.0	18.1, 17.8, 16.3, 15.7, 17.5, 16.0, 18.4	17.1	1.10	3.49
Soil	TM $w / (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.10	0.075, 0.083, 0.075, 0.097, 0.092, 0.072, 0.084	0.083	0.009 5	0.03
	MEL $w / (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	1.00	0.912, 0.893, 0.798, 0.863, 0.807, 0.759, 0.858	0.842	0.055	0.18

2.5 实际样品的回收率与精密度

在优化实验条件下，对实际样品进行检测。环境水样中甲基托布津、甲霜灵的加标回收率分别为 91%~105%、92%~102%，精密度分别为 6.5%~8.5%、5.1%~8.3%；环境土壤样品中甲基托布津、甲霜灵的加标回收率分别为 79%~102%、77%~97%，精密度分别为 1.2%~7.0%、3.7%~8.1% (结

果见表 3)。结果表明，方法的回收率及精密度满意。样品及样品加标的色谱图见图 2。

表 3 TM 与 MEL 的回收率及精密度
Table 3 Recoveries and relative standard deviations(RSDs) of TM and MEL

Sample	Compound	Original	Added	Recovery R / %	RSD (n = 5) s _r / %
River water	TM	- *	4. 00, 6. 00, 12. 0	91, 95, 105	8. 5, 6. 5, 7. 6
ρ / (μg · L ⁻¹)	MEL	-	40. 0, 60. 0, 120	92, 98, 102	8. 1, 8. 3, 5. 1
Soil ^{1#}	TM	-	0. 10, 0. 20, 1. 0	90, 83, 102	1. 2, 2. 7, 4. 7
w / (mg · kg ⁻¹)	MEL	-	1. 00, 1. 60, 5. 0	81, 95, 87	6. 4, 4. 3, 6. 3
Soil ^{2#}	TM	-	0. 10, 0. 20, 1. 0	79, 98, 82	3. 9, 5. 9, 7. 0
w / (mg · kg ⁻¹)	MEL	-	1. 00, 1. 60, 5. 0	77, 95, 97	7. 6, 3. 7, 8. 1

* no detected

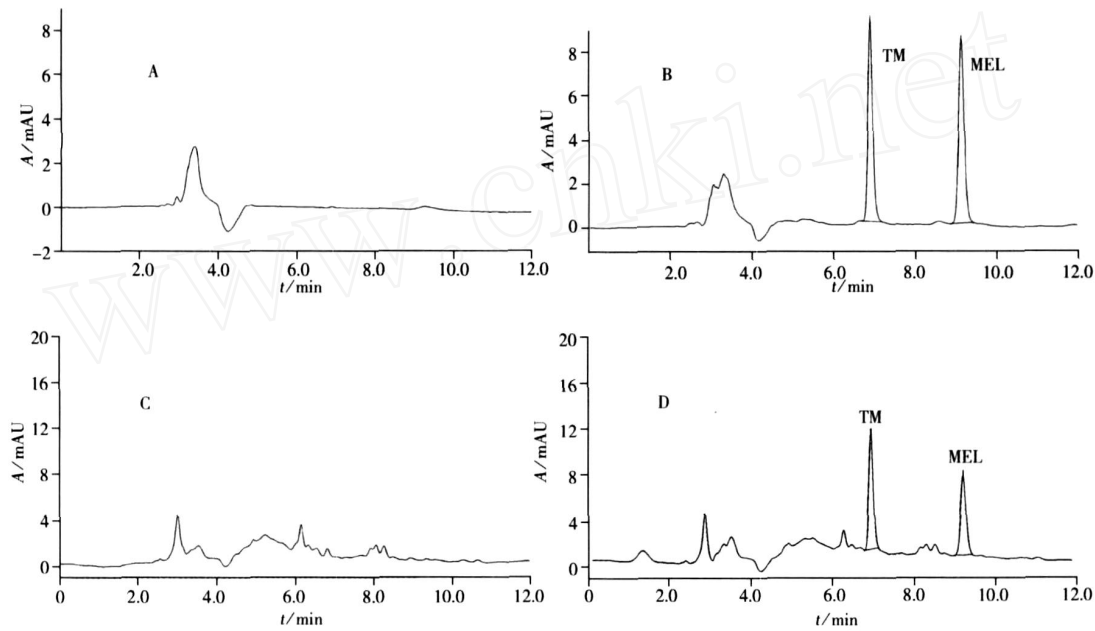


图 2 水样色谱图 (A)、水样加标色谱图 (B)、土壤^{1#}色谱图 (C)及土壤^{1#}加标色谱图 (D)
Fig.2 HPLC chromatograms of river water(A), spiked river water(B), soil^{1#} (C) and soil^{1#} spiked sample(D)
fig.B: 4.0 μg · L⁻¹ TM and 40.0 μg · L⁻¹ MEL; fig.D: 0.2 mg · kg⁻¹ TM and MEL

3 结 论

本文建立了同时测定环境水样和土壤样品中 TM 和 MEL 残留的方法，水样以全自动固相萃取法净化和浓缩样品 (C₁₈萃取小柱萃取)，土壤样品以丙酮 - 二氯甲烷 (3 : 7)溶剂振荡萃取 /半自动小剂量型固相萃取法净化和浓缩 (弗罗里硅土小柱)，用高效液相色谱法进行测定，具有较好的回收率和精密度，方法准确、可靠、灵敏度高，可满足环境行为研究中 TM 和 MEL 定性和定量测定的要求。

参考文献：

[1] 刘文杰, 万英, 庞新安, 等. 高效液相色谱法测定水果和蔬菜中残留的多菌灵、吡虫啉和甲基托布津 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(1): 133 - 135

[2] 林江丽, 张丽静, 张旭龙, 等. 高效液相色谱法同时测定甲基托布津和扑海因 [J]. 分析化学, 2001, 29(8): 933 - 935

[3] 王华, 彭小燕, 李继兰. 加速溶剂萃取结合 GC - MS法测定葡萄酒中甲霜灵的残留 [J]. 食品工业, 2008, (1): 71 - 74

[4] 常智慧, 韩烈保. 甲霜灵在高尔夫球场根系层和淋溶水中的残留 [J]. 草地学报, 2005, 13(2): 159 - 161

(下转第 170 页)

- [6] 杨忠桥, 徐子刚. 火焰原子吸收法快速测定烟草中的 13 种金属离子 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(8): 935 - 937.
- [7] 胡清源, 李力, 石杰, 等. 微波消解 - 电感耦合等离子体质谱法同时测定烟草中 27 种元素 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(6): 1210 - 1213.
- [8] 黄旭, 徐子刚. 微波消解 - 电感耦合等离子体质谱法测定烟草中的重金属元素 [J]. 浙江大学学报: 理学版, 2007, 34(6): 658 - 660.
- [9] 牟世芬, 刘克纳, 丁晓静. 离子色谱方法及应用 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 202 - 283.
- [10] 范云场, 朱岩. 离子色谱分析中的样品前处理技术 [J]. 色谱, 2007, 25(5): 633 - 640.
- [11] 钟志雄, 李攻科. 海产品中氟、溴、碘与硫的电导 - 紫外串联检测离子色谱法分析 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(5): 572 - 575, 580.
- [12] 赵士权, 查河霞, 林明珠. 离子色谱法测定水发食品中吊白块残留量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1787 - 1788, 1804.
- [13] 张思维, 郑波, 邹晓丽, 等. 高效阴离子色谱法测定保健食品中的盐酸氨基葡萄糖 [J]. 色谱, 2009, 27(1): 117 - 119.
- [14] AGNIESZKA K, VELCHKA KD, FELIX D, et al. Single-run ion chromatographic separation of inorganic and low-molecular-mass organic anions under isocratic elution: Application to environmental samples [J]. Talanta, 2009, 79(1): 16 - 21.
- [15] MURAD IH H, TAKASHIK. Ion chromatographic method for simultaneous determination of nitrate and nitrite in human saliva [J]. J Chromatogr. B, 2000, 744(2): 433 - 437.
- [16] 李国强, 孟建新, 邱瑞霞, 等. 人血浆中游离氨基酸的离子色谱/积分脉冲安培法分析 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(1): 94 - 96.
- [17] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 19616 - 2004 烟草成批原料取样的一般原则 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [18] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 2606.1 - 2004 卷烟第 1 部分: 抽样 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [19] 国家烟草专卖局. YC/T 31 - 1996 烟草及烟草制品 试样的制备和水分测定 烘箱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [20] 国家标准物质研究中心. GBW08514 - GBW08515 烟草成份分析标准物质 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.

(上接第 164 页)

- [5] 侯经国, 孟晓荣, 何天稀, 等. 农药甲霜灵对映体的高效液相色谱分离及手性拆分热力学研究 [J]. 分析化学, 2003, 31(3): 307 - 310.
- [6] 李锋格, 全晓盾, 龚辉, 等. 气相色谱 - 质谱法测定番茄酱中甲霜灵、苯霜灵、恶霜灵的残留量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 388 - 389.
- [7] 付新梅, 张丽静, 武荣兰, 等. 液相色谱 - 质谱法同时测定甜瓜样品中的噻菌灵、甲基托布津、扑海因 [J]. 分析化学, 2004, 32(8): 1047 - 1049.
- [8] 靳万贵. 25% 甲霜灵可湿性粉剂的气相色谱分析 [J]. 农药, 1998, 37(1): 24 - 25.
- [9] 曹鹏, 董杰, 孙福生. 液相微萃取 - 高效液相色谱测定水中甲霜灵残留的研究 [J]. 农药科学与管理, 2008, 29(1): 12 - 16.
- [10] 葛宝坤, 高建会, 左国华. 高效液相色谱法测定葡萄酒中 6 种防霉剂的残留量 [J]. 色谱, 2003, 21(3): 296.
- [11] POUS X, RUÍZ M J, PICÓ Y, et al. Determination of imidacloprid, metalaxyl, myclobutanil, prothiofos, and thienodan in fruits and vegetables by liquid chromatography - atmospheric pressure chemical ionization - mass spectrometry [J]. Fresenius J Anal Chem, 2001, 371(2): 182 - 189.
- [12] 盛凤景, 王海峰, 吕超, 等. 全自动固相萃取及气相色谱 - 质谱联用法对环境水样中 9 种有机紫外防护剂及人工合成香料的测定 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(8): 900 - 904.
- [13] 彭敏, 刘传生. 固相萃取 - 柱前衍生 - 气相色谱 - 质谱联用法测定水中 2, 4-滴和灭草松 [J]. 理化检验: 化学分册, 2009, 45(7): 791 - 793.
- [14] STAJNBAHER D, ŽUPANČIĆ - KRALJ L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry [J]. J Chromatogr. A, 2003, 1015(1/2): 185 - 198.
- [15] REDONDO M J, RUÍZ M J, BOLUDA R, et al. Optimization of a solid phase extraction technique for the extraction of pesticides from soil samples [J]. J Chromatogr. A, 1996, 719(1): 69 - 76.
- [16] PICÓ Y, FONT G, MOLTO J C, et al. Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides [J]. J Chromatogr. A, 2000, 885(1/2): 251 - 271.
- [17] NIESSNER G, BUCHBERGER W, ECKERSTORFER R. Multiresidue screening methods for the determination of pesticides in plant materials [J]. J Chromatogr. A, 1999, 846(1/2): 341 - 348.