

高效液相色谱法对水果中多菌灵与福美双残留的同时测定

田宏哲, 周艳明

(沈阳农业大学 分析测试中心, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 建立了高效液相色谱同时测定水果中多菌灵和福美双残留量的方法。样品经二氯甲烷提取, Oasis HLB 固相萃取柱净化后, 经 C_{18} 色谱柱分离, 甲醇 - 0.05 mol/L 甲酸铵溶液 (60 : 40, 体积比) 洗脱, 紫外检测器进行检测。结果表明, 多菌灵、福美双的线性范围分别为 0.01 ~ 10.0、0.05 ~ 10.0 mg/kg, 相关系数分别为 1.0、0.999 9, 检出限分别为 0.005、0.03 mg/kg, 平均加标回收率为 80% ~ 109%。该方法成功用于市售水果样品的测定。

关键词: 高效液相色谱; 杀菌剂; 多菌灵; 福美双; 残留

中图分类号: O657.72; S482.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2010)01 - 0093 - 04

doi: 10.3969/j.issn.1004 - 4957.2010.01.022

Simultaneously Analysis of Residue of Carbendazim and Thiram in Fruits by High Performance Liquid Chromatography

TAN Hong-zhe, ZHOU Yan-ming

(Analysis and Testing Center, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: A specific high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for simultaneous determination of two fungicides including, carbendazim and thiram, in fruit samples. Residue of two fungicides was extracted from fruits with dichloromethane, cleaned up by Oasis HLB solid-phase extraction (SPE), and separated on a C_{18} column (250 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μ m) using methanol - 0.05 mol/L ammonium formate (60 : 40, by volume) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 285 nm. The method showed good linearity over the concentration range of 0.01 - 10.0 mg/kg for carbendazim with correlation coefficient of 1.0, and 0.05 - 10.0 mg/kg for thiram with correlation coefficient of 0.999 9. The limit of detections for carbendazim and thiram were 0.005 mg/kg and 0.03 mg/kg, respectively. The average recoveries of two fungicides in spiked samples were between 80% and 109%. The developed method was successfully applied to detect the target compounds in real samples.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); fungicide; carbendazim; thiram; residue

多菌灵为苯并咪唑类广谱、高效、低毒的内吸性杀菌剂, 福美双是有机硫类保护性广谱杀菌剂, 对葡萄孢菌、黑星病菌、疫霉菌、根霉菌等均有活性。这两种杀菌剂已广泛应用于植物中多种病害的预防和治疗^[1], 但由于单一农药的抗药局限性, 目前已经开发出含有这 2 种成分的混合农药, 该混合剂具有速效、长效、减少耐药性等优点, 在植物病虫害防治方面具有广阔的应用前景。

关于多菌灵、福美双的液相色谱法分析已有很多报道, 但均限于对原药中单个成分或两种混合成分的测定^[2-4], 或对农产品中单个成分残留的测定^[1, 5], 而同时测定农产品中多菌灵和福美双残留, 在国内未见报道。目前测定多菌灵残留的方法有液相色谱法^[5-8]、紫外分光光度法、液相色谱 - 串联质谱法^[9-10]等; 而福美双残留的测定多采用液相色谱法^[11-13]、紫外分光光度法、气相色谱法^[14], 后两种方法均需对福美双进行衍生, 相对较为复杂。本文采用反相高效液相色谱法首次建立了水果中多

收稿日期: 2009 - 10 - 10; 修回日期: 2009 - 11 - 20

基金项目: 沈阳农业大学校内青年基金资助项目 (20070203)

第一作者: 田宏哲 (1972 -), 女, 黑龙江哈尔滨人, 讲师, 博士, Tel: 024 - 88492682, E - mail: tthz2@yahoo.com.cn

菌灵和福美双残留的同时测定方法, 采用二氯甲烷提取待测样品中的目标组分, Oasis HLB 固相萃取柱净化, 排除样品基质和杂质成分的干扰, 对目标组分进行准确性及定量。通过对实际样品中 2 种杀菌剂残留量的测定, 对该方法进行了评价。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

多菌灵 (纯度 97.0%)、福美双 (纯度 98.0%) 购自沈阳化工研究院, 甲醇 (色谱纯, Fluka 公司), 实验用水为“娃哈哈”纯净水 (杭州娃哈哈集团), 其它试剂均为分析纯。

Agilent 1100 液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 配有四元梯度泵、自动进样器、二极管阵列检测器 (DAD) 等; Oasis HLB 固相萃取柱 (30 mg/1 mL, Waters 公司); Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm i. d. × 5 μm, Dikma 公司); 配制的流动相均过 0.45 μm 微孔滤膜; KQ-300DE 型医用数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 标准溶液配制

称取多菌灵标准品 62.5 mg 于 25 mL 容量瓶中, 用 1 mL 0.8% HCl 溶液溶解, 用甲醇定容, 配成 25 g/L 的储备液; 称取福美双标准品 62.5 mg 于 25 mL 容量瓶中, 用 1 mL 冰乙酸溶解, 甲醇定容, 配成 25 g/L 的储备液备用。

1.3 样品制备

称取 10 g 匀浆水果样品于 150 mL 锥形瓶中, 用 20 mL 二氯甲烷超声提取 15 min 后, 抽滤; 残渣中再分 2 次分别加入 20 mL 二氯甲烷, 超声提取 10 min 后抽滤, 合并滤液。向滤液中加入无水 Na₂SO₄, 脱水后将提取液转移至蒸发瓶中旋转蒸发, 35 °C 水浴浓缩近干。加入 2 mL 甲醇 - 水 (体积比 50 : 50) 重新溶解, 待净化。

Oasis HLB 固相萃取柱净化: 依次用 2 mL 甲醇、2 mL 水活化萃取柱, 加入试样提取液, 用 1 mL 甲醇 - 水 (60 : 40) 淋洗, 然后用 2 mL 甲醇 - 0.5% 乙酸 (体积比 90 : 10) 溶液洗脱。收集洗脱液于蒸发瓶中, 35 °C 水浴浓缩至近干, 加入 1.0 mL 甲醇重新溶解, 过 0.45 μm 滤膜, 待分析。

1.4 液相色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm), 流动相为甲醇 - 0.05 mol/L 甲酸铵 (体积比 60 : 40) 溶液, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 40 μL, 检测波长 285 nm。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

考察了甲醇、乙腈、丙酮、丙酮 - 二氯甲烷混合溶剂、乙酸乙酯、二氯甲烷等提取溶剂对 2 种杀菌剂的提取效率。实验发现, 甲醇、乙腈对多菌灵的提取效率很高, 但对福美双的提取率较低, 不能满足方法要求; 丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷等虽对多菌灵的提取率不及甲醇和乙腈, 但对福美双有较高的提取率 (见图 1)。综合考虑, 实验选择二氯甲烷为提取溶剂, 可保证 2 种组分均有较高的提取效率; 另一方面, 由于二氯甲烷沸点低, 可在较低的温度 (35 °C) 下蒸发, 从而避免了蒸发温度高而导致的福美双分解。

2.2 洗脱溶剂的选择

采用二氯甲烷提取水果中的多菌灵和福美双, 与丙酮相比, 经二氯甲烷提取的基质中的色素较少, 干扰相对较低, 但仍有较多的基质成分被提取, 严重影响待测组分的分离效果和定性定量结果, 降低检测灵敏度。因此, 在采用二氯甲烷提取时, 还需采用必要的净化手段。考虑到多菌灵与福美双的理

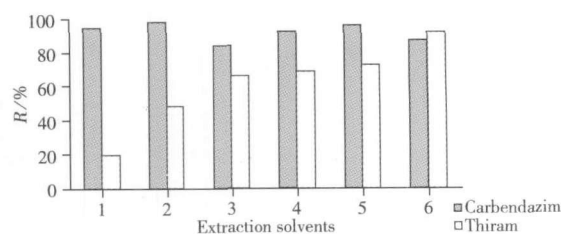


图 1 不同提取溶剂对杀菌剂提取效率的影响

Fig. 1 Effect of different extraction solvents on extraction efficiency of fungicides

1. methanol, 2. acetonitrile, 3. acetone, 4. acetone - dichloromethane, 5. ethyl acetate, 6. dichloromethane

化性质, 选择 Oasis HLB 固相萃取柱对水果样品进行净化。考察了体积比分别为 90:10、80:20、70:30 的甲醇-0.5% 乙酸溶液为洗脱溶剂时, 对 2 种杀菌剂萃取效率的影响。结果表明, 不同比例的甲醇-0.5% 乙酸溶液对多菌灵的萃取率影响不大, 但由于在反相萃取模式中福美双的保留强于多菌灵, 当洗脱溶剂中甲醇体积分数低于 90% 时, 福美双的回收率明显降低, 所以选择体积比 90:10 的甲醇-0.5% 乙酸溶液为洗脱溶剂。

2.3 色谱条件的优化

考察了甲醇-醋酸钠、甲醇-甲酸铵、甲醇-磷酸盐、甲醇-醋酸铵等不同流动相对 2 种杀菌剂分离的影响。结果表明, 4 种流动相均能将其完全分离, 但在分离实际样品时, 只有甲醇-甲酸铵能够在最短时间内将待测组分与水果中的基质成分完全分开, 本文选择甲醇-甲酸铵为流动相。

在 190~400 nm 内对 2 种杀菌剂进行了紫外吸收波长扫描, 发现 2 种杀菌剂在 216、280 nm 均有较高响应。其中, 福美双和多菌灵在 216 nm 处的响应比 280 nm 处更强, 但在 216 nm 检测时基线波动较大, 噪声较高, 反而降低了检测灵敏度。而在分析实际样品时, 基质中的部分组分在 280 nm 测定时也有较强吸收, 为避免对目标组分的干扰, 本文选择 285 nm 作为检测波长, 标准样品的谱图见图 2A。

2.4 方法评价

采用桃子为基质进行方法验证 (加标谱图见图 2B), 考察了 2 种杀菌剂的检出限 ($S/N=3$)、线性方程以及加标回收率和重复性, 结果见表 1。由表 1 可知多菌灵与福美双的检出限分别为 0.005、0.03 mg/kg, 与目前欧盟、美国及日本等国对水果中 2 种杀菌剂最大残留限量 (多菌灵和福美双在水果中的最大残留限量分别为 0.5、0.1 mg/kg^[15]) 要求相比, 本方法完全满足现有标准对这 2 种杀菌剂的检测要求。

目标杀菌剂的添加水平分别为 0.2、0.5、1.0 mg/kg, 每个添加水平进行 3 次平行实验, 2 种杀菌剂的平均加标回收率为 80%~109%, 相对标准偏差为 5.0%~8.8% (见表 1), 本方法的准确度和精密度均符合农药残留分析的要求。

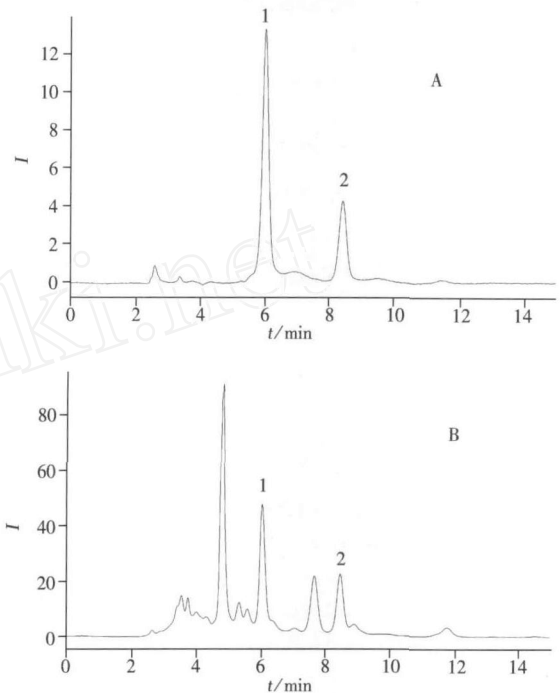


图 2 标准样品 (A) 与加标桃子样品 (B) 的色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixture standard (A) and spiked peach sample (B)

1. carbendazim, 2. thiram; mass concentration of carbendazim and thiram in mixture were 2.0 mg/L and in spiked sample were 1.0 mg/kg

表 1 多菌灵与福美双的分析参数及加标回收率*

Table 1 Analytical parameters and spiked recoveries of carbendazim and thiram*

Compound	Linear range $w/(mg \cdot kg^{-1})$	Linear equation	r	Detection limit $w/(mg \cdot kg^{-1})$	Added 0.2 mg/kg		Added 0.5 mg/kg		Added 1.0 mg/kg	
					Recovery $\bar{R}/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $\bar{R}/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $\bar{R}/\%$	RSD $s_r/\%$
Carbendazim	0.01~10.0	$y=65.72x$	1.0	0.005	86	8.5	103	6.5	109	5.0
Thiram	0.05~10.0	$y=39.38x$	0.999 9	0.03	80	8.8	84	7.6	88	6.1

* $y(mV \cdot s)$: peak area, $x(mg/kg)$: sample content

2.5 实际样品测定

将本方法用于 4 种市售水果样品的分析, 在桃子和葡萄样品中检出多菌灵, 残留量分别为 0.059、0.150 mg/kg; 在苹果和梨中未检出 2 种杀菌剂。表明该法可用于实际水果样品中多菌灵和福美双残留量的测定。

参考文献:

- [1] 宋国春, 于建垒, 赵德友, 等. 福美双在棉花和土壤中残留规律研究 [J]. 山东农业科学, 2000, (4): 32 - 33
- [2] 黄永忠, 魏东, 杨彩玲. 15%福美双·吡虫啉·烯啶醇悬浮种衣剂的 RP-HPLC 分析 [J]. 农药, 2008, 47(2): 114 - 115
- [3] 陈丹, 初丽伟, 范志先. 福美双混剂 HPLC 分析方法的研究 [J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(3): 101 - 103
- [4] 李薇, 徐晖, 孙铁刚, 等. 50%多菌灵·福美双可湿性粉剂高效液相色谱分析 [J]. 分析试验室, 2008, 27(2): 92 - 95
- [5] 沈菁, 刘军, 刘建. 高效液相色谱法测定柑橘和土壤中残留的多菌灵 [J]. 色谱, 2009, 27(3): 308 - 312
- [6] 刘文杰, 万英, 庞新安, 等. 高效液相色谱法同时测定土壤中多菌灵、吡虫啉和甲基托布津的残留 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(1): 133 - 135
- [7] THARSIS N, PORTILLO J L, BROTO - PUIG F, et al Simplified reversed-phase conditions for the determination of benzimidazole fungicides in fruits by high-performance liquid chromatography with UV detection [J]. J Chromatogr. A, 1997, 778(1/2): 95 - 101.
- [8] WU Qihua, LI Yunpeng, WANG Chun, et al Dispersive liquid - liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography - fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples [J]. Anal Chim Acta, 2009, 638(2): 139 - 145.
- [9] BLASCO C, FERNÁNDEZ M, PICÓ Y, et al Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography - mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2002, 461(1): 109 - 116
- [10] BEAN K A, HENDON J D. Determination of carbendazim in soil and lake water by immunoaffinity extraction and coupled-column liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr. A, 1997, 791(1/2): 119 - 126
- [11] EKROTH S B, OHLIN B, OSTERDAHL B G Rapid and simple method for determination of thiram in fruits and vegetables with high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(12): 5302 - 5304
- [12] 王会利, 陈长龙, 胡继业, 等. 百菌清和福美双在蘑菇上的残留研究 [J]. 农药学学报, 2006, 8(3): 283 - 287
- [13] SUZUKI T, YAGUCHI K, KANO I Screening methods for asulam, oxine-copper and thiram in water by high-performance liquid chromatography after enrichment with a minicolumn [J]. J Chromatogr. A, 1993, 643(1/2): 173 - 179.
- [14] ROYER A, MÉNAND M, GR MAULT A, et al Development of automated headspace gas chromatography determination of dithiocarbamates in plant matrices [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(5): 2152 - 2158
- [15] 主要贸易国家和地区食品中农兽药残留限量标准编委会. 主要贸易国家和地区食品中农兽药残留限量标准 (农兽药卷上册) [M]. 北京: 中国标准出版社, 2004: 882 - 884.

(上接第 92 页)

分量的大小, 可为质量控制提供参考依据, 即要控制引入不确定度分量大的因素。如尽量选择不确定度分量小的标准物质; 使制定的标准曲线的相关性尽量接近 1, 减少由于曲线拟合带来的不确定度等。对于采样体积引入的各不确定度分量, 质量控制的关键是皂膜流量计的示值误差, 应选择稳定性、准确度好的流量计。因此, 在目前的检测水平下, 应采取各种措施提高不确定度引入分量的质量控制, 从而提高检测精度。

参考文献:

- [1] 国家质量监督检验检疫总局, 卫生部, 国家环境保护总局. GB/T18883 - 2002 室内空气质量标准 [S]. 2002 版.
- [2] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局, 中华人民共和国建设部. 民用建筑工程室内环境污染控制规范 [M]. 2006 年版. 北京: 中国计划出版社, 2006: 31 - 34
- [3] 曾令平, 马天, 罗张怡. 空气采样技术及不确定度分析 [J]. 中国测试技术, 2004, 30(6): 26
- [4] 国家质量技术监督局计量司. 测量不确定度评定与表示指南 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2000: 34, 42
- [5] 左钢. 转子流量计示值误差测量结果的不确定度评定 [J]. 计量与测试技术, 2005, 32(4): 38 - 39.
- [6] 徐鑫. 气相色谱直接进样法测定空气中丙酮的不确定度分析 [J]. 职业与健康, 2004, 20(10): 52
- [7] 于乃海, 彭川荣. 气相色谱仪校准测量结果不确定度的评定 [J]. 山东电力技术, 2006, 148(2): 22 - 25.
- [8] 王承霞, 黄晓天, 王喜元. 室内空气测量不确定度评定进展 [J]. 化学分析计量, 2006, 6(2): 65 - 67.
- [9] 殷晓梅, 马玉善, 任胜楠. 空气中 TVOC 浓度测量不确定度评定 [J]. 计量与测试技术, 2007, 34(4): 48 - 49.