

· 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<sup>1</sup>, 董姝君<sup>1</sup>, 游文字<sup>1</sup>, 张敬平<sup>2</sup>, 钮伟民<sup>2</sup>, 潘灿平<sup>\*1</sup>

(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-C<sub>18</sub>, 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内。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-wei<sup>1</sup>, DONG Shu-jun<sup>1</sup>, YOU Wen-yu<sup>1</sup>,  
ZHANG Jing-ping<sup>2</sup>, NIU Wei-min<sup>2</sup>, PAN Can-ping<sup>\*1</sup>

(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 272 nm. In the method, mancozeb was analyzed on a Agilent TC-C<sub>18</sub> 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.

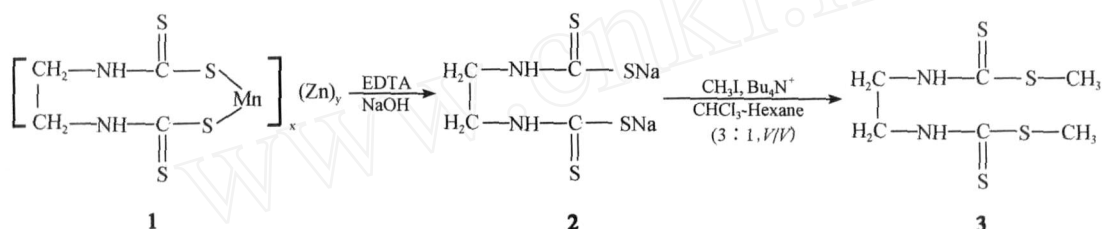
**Key words:** methylation; mancozeb; peanuts; high performance liquid chromatography; pesticide residue

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: jingweim a819@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: canpingp@cau.edu.cn

基金项目: 卫生部科研基金课题 (W KJ2006-2-10).

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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2~8]</sup>,即以CS<sub>2</sub>的检测量计算,但因为检出的是所有化合物产生的CS<sub>2</sub>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。



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<sup>[9]</sup>,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:

## 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-C<sub>18</sub>(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);HMS-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 MILLI-Q(美国 Milliporeco 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);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)。

准确称取代森锰锌标样 0.033 3 g(准确至 0.2 mg)于 25 mL 容量瓶中,用溶液 溶解并定

容,配成浓度为 1 000 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,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 3 800 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 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,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 3 800 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-C<sub>18</sub> 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  $9.2 \sim 9.3 \text{ min}$ 。

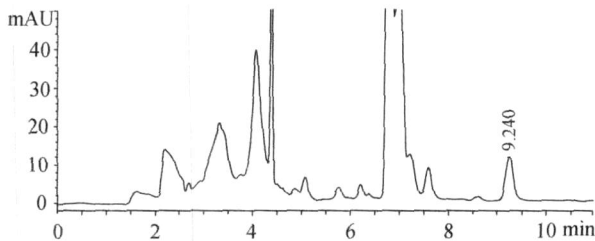


图 1 花生中  $0.5 \text{ mg/kg}$  代森锰锌标样添加液相色谱图 ( $20 \mu\text{L}$  进样)

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

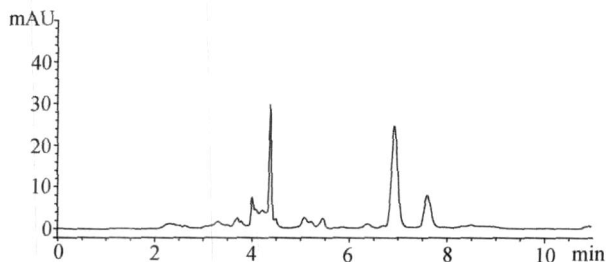


图 2 空白花生样品的液相色谱图 ( $5 \mu\text{L}$  进样)

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  $1 \text{ mL}$  于  $250 \text{ mL}$  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  $c = 20.311A + 10.648$ , 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。

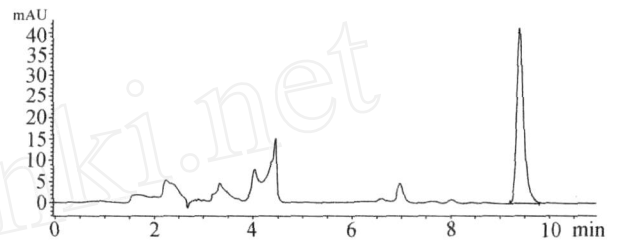


图 3 代森锰锌标样的液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograph of mancozeb standard sample

### 2.3 精密度、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度。

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  $0.02 \text{ mg/kg}$ ,最低检测浓度 (LOQ) 为  $0.05 \text{ mg/kg}$  (均以代森锰锌含量计)。

取同一花生空白样品 5 份,进行  $0.5 \text{ mg/kg}$  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 HG2315—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  $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$  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 S H)

### ·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/JM PR/GMUS/GMUS.htm>

(王静、潘灿平提供)