

· 研究简报 ·

凝胶渗透色谱-固相萃取-高效液相色谱法 测定花生中的吡唑醚菌酯残留

吴迪^{*1}, 莘婧¹, 潘洪吉¹, 金红云², 张希跃¹, 罗雪婷¹, 范丽佳¹

(1. 北京市植物保护站, 北京 100029; 2. 北京市通州区植物保护站, 北京 101117)

摘要: 对吡唑醚菌酯在花生仁和花生壳中的残留分析方法进行了探讨。样品采用乙腈提取、凝胶渗透色谱(GPC)结合固相萃取-氨基(SPE-NH₂)小柱净化, 高效液相色谱-紫外检测器(HPLC-UV)检测。结果表明: 在花生仁及壳中分别添加吡唑醚菌酯标准品 0.05、0.5 和 1 mg/kg 时, 其平均回收率分别为 101.7%、86.5% 和 83.2% 和 98.1%、93.8% 和 85.3%, 相对标准偏差分别为 4.3% ~ 8.1% 和 4.2% ~ 6.0%。花生仁及壳中的最低检测浓度(LOQ)均为 0.05 mg/kg。

关键词: 吡唑醚菌酯; 凝胶渗透色谱; 固相萃取; 高效液相色谱; 花生仁; 花生壳

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2012.06.17

中图分类号: O657.72

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2012)06-0681-04

Determination of pyraclostrobin residues in peanut and peanut hull by gel permeation chromatography-solid phase extraction-high performance liquid chromatography

WU Di^{*1}, XIN Jing¹, PAN Hongji¹, JIN Hongyun², ZHANG Xiyue¹,
LUO Xueting¹, FAN Lijia¹

(1. Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China;

2. Tongzhou Plant Protection Station, Beijing 101117, China)

Abstract: A method for determination of pyraclostrobin residues in peanut and peanut hull was established. Target pesticide was extracted with acetonitrile, cleaned up with gel permeation chromatography(GPC) and solid phase extraction-amino(SPE-NH₂) column, then detected by high performance liquid chromatography-ultraviolet detector(HPLC-UV). Recoveries of the pesticide spiked at 0.05, 0.5 and 1 μg/g in peanut were 101.7%, 86.5% and 83.2% and in peanut hull were 98.1%, 93.8% and 85.3%. The limit of quantification reserched 0.05 mg/kg.

Key words: pyraclostrobin; gel permeation chromatography; solid phase extraction; high performance liquid chromatography; peanut; peanut hull

吡唑醚菌酯是德国巴斯夫公司于 1993 年开发的兼具吡唑结构的甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂^[1], 其作用机理为抑制线粒体呼吸作用^[2-3], 能够防治子

囊菌、担子菌、半知菌和卵菌纲真菌引起的叶枯病、锈病、白粉病、霜霉病等多种病害, 已被广泛用于葡萄、草莓、辣椒、番茄、谷物等作物上真菌病害的防治^[4]。

收稿日期: 2012-08-21; 修回日期: 2012-11-05.

作者简介: * 吴迪, 女, 满族, 通信作者(Author for correspondence), 硕士, 农艺师, 主要从事农药及农药残留检测, E-mail: bjica@sina.com

基金项目: 北京市农业局科技新星项目(PXM2012-036203-000011).

“日本肯定列表”中规定吡唑醚菌酯在干花生中的最大残留限量(MRL)值为0.05 mg/kg^[5],而我国尚未制定相关MRL标准。对于吡唑醚菌酯的残留检测方法目前已报道的主要有液相色谱-紫外检测法(LC-UV),液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS),以及气相色谱-电子捕获检测法(GC-ECD)^[5-11],且主要集中在蔬菜、水果和土壤中吡唑醚菌酯的残留研究,尚未见有关其在花生这类粮食兼油料作物中残留情况的研究报道。笔者采用凝胶渗透色谱-固相萃取-高效液相色谱(GPC-SPE-HPLC)建立了较为简便易行的检测花生壳和花生仁中吡唑醚菌酯残留的方法,旨在为我国建立吡唑醚菌酯在花生中的MRL标准提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器

97.0%吡唑醚菌酯(pyraclostrobin)标准品(德国Dr. Ehrenstorfer GmbH公司)。洗脱液为V(甲醇):V(二氯甲烷)=1:99的混合液;凝胶渗透色谱流动相为V(乙酸乙酯):V(环己烷)=70:30的混合液;氯化钠(分析纯)用前经140℃烘4h;其余试剂均为色谱纯。

LC-2010A_{HT}高效液相色谱仪(日本岛津公司);ExpressTM column 24g s-x3 BioBesds全自动凝胶渗透色谱仪(美国J2公司);T25 B高速匀浆机(IKA);N-1NW旋转蒸发仪(日本EYELA);VISIPREPTMDL固相萃取仪(SUPELCO),SPE-NH₂小柱(0.5 g/3 mL,美国安捷伦公司)。

1.2 样品前处理

1.2.1 提取 分别称取粉碎后的花生仁样品10g和花生壳样品5g,各加入7g氯化钠和50mL乙腈,匀浆提取2min,待净化。

1.2.2 净化与浓缩 将提取液静置,过滤后取25mL,40℃下旋转蒸发至1mL。用V(乙酸乙酯):V(环己烷)=70:30的混合液定容至10mL,在全自动凝胶渗透色谱仪上进样5mL,用上述乙酸乙酯-环己烷混合液洗脱分离。GPC流速为5mL/min,接收8.5~13min的流出液,30℃下旋转蒸发至2mL,氮气吹至近干。加2mLV(甲醇):V(二氯甲烷)=1:99的混合溶液溶解浓缩物。SPE-NH₂小柱预先用4mL上述甲醇-二氯甲烷混合溶液淋洗,弃去淋洗液;将样品溶解液上样至SPE-NH₂小柱,再用该甲醇-二氯甲烷混合液(2mL×2)淋洗小柱,接收全部洗脱液,50℃水浴下氮气

吹干,用甲醇定容至1mL,待测。

1.3 检测条件

VP-ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温30℃;紫外检测器;检测波长275 nm;流动相:甲醇-水;流速1 mL/min;梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 The gradient elution program of mobile phase

| 时间 Time/min | 花生仁(程序1) Peanut(Program 1) | 花生壳(程序2) Peanut hull(Program 2) |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | V(甲醇):V(水) V(Methanol):V(Water) | V(甲醇):V(水) V(Methanol):V(Water) |
| | 0~10.00 | 65:35 |
| 10.01~20.00 | 80:20 | 75:25 |
| 20.01~25.00 | 100:0 | 100:0 |
| 25.01~32.00 | 65:35 | 70:30 |

2 结果与讨论

2.1 净化方法的选择

由于花生中含有蛋白质、油脂、维生素、脂肪酸及多酚类物质等多种成分^[12-14],提取得到的基质较为复杂,净化难度较大。笔者先后尝试采用SPE-Florisil、SPE-NH₂、SPE-CARB-NH₂及GPC等方法进行净化,均未得到理想的除杂效果,最终采用GPC与SPE-NH₂小柱结合,先通过GPC去除相对分子质量较大的杂质,再利用SPE-NH₂小柱在非极性溶液(本实验中为二氯甲烷)预处理时能与含有-OH、-NH₂、-SH等基团的物质形成氢键^[15]而去掉部分极性干扰物的特性,对于花生仁和花生壳样品均获得了满意的净化效果。

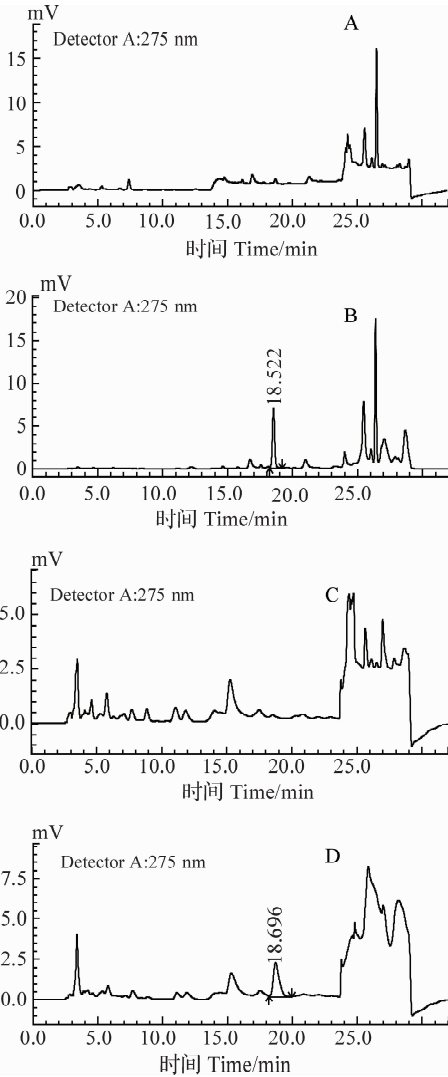
2.2 HPLC条件的优化

吡唑醚菌酯在紫外检测波长275 nm时响应值最大,0.02 μg/mL的标准溶液出峰明显,S/N>3。

花生仁和花生壳样品的添加图谱见图1。花生仁样品先以V(甲醇):V(水)=65:35为流动相运行10min,再调整其体积比为80:20进行测定,吡唑醚菌酯与杂质得到了良好的分离(见图1A,1B);而对于花生壳样品,该比例的流动相却不能使目标物与杂质很好地分离。通过优化,对花生壳样品溶液先以V(甲醇):V(水)=70:30为流动相运行10min,再调整其体积比为75:25进行测定,最终得到了良好的效果(见图1C,1D)。

2.3 线性关系

用甲醇配制一系列不同质量浓度的吡唑醚菌酯标准溶液,在选定HPLC的条件下进行检测,绘制峰



A. 花生仁空白样品(梯度洗脱程序1); B. 添加 $0.5 \mu\text{g/g}$ 吡唑醚菌酯的花生仁样品(梯度洗脱程序1); C. 花生壳空白样品(梯度洗脱程序2); D. 添加 $0.5 \mu\text{g/g}$ 吡唑醚菌酯的花生壳样品(梯度洗脱程序2)。

A. Blank peanut sample (gradient elution program 1); B. Peanut sample spiked with 0.5 mg/kg pyraclostrobin (gradient elution program 1); C. Blank peanut hull sample (gradient elution program 2); D. Peanut hull sample spiked with 0.5 mg/kg pyraclostrobin (gradient elution program 2).

图1 添加吡唑醚菌酯的花生仁和花生壳样品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of peanut and peanut hull samples spiked with pyraclostrobin

面积(y)对进样质量浓度(ρ)的标准曲线。结果表明,吡唑醚菌酯在 $0.02 \sim 5 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,线性方程为 $y = 79\ 287\rho + 1\ 092.9$,相关系数 $r = 0.999\ 9$,满足定量分析的需要(注:本文中提到的2种液相色谱梯度洗脱程序对于吡唑醚菌酯的峰

面积无影响)。

2.4 准确度、精密度与检出限

分别在花生仁和花生壳中添加不同质量浓度的吡唑醚菌酯标准品,每浓度重复5次,其添加回收率及相对标准偏差见表2和表3。该方法对吡唑醚菌酯的最小检出量为 $2 \times 10^{-11} \text{ g}$,在花生壳和花生仁样品中的最低检测浓度(LOQ)均为 0.05 mg/kg 。

表2 吡唑醚菌酯在花生仁和花生壳中的添加回收数据($n = 5$)

Table 2 Recovery of pyraclostrobin spiked into the peanut and peanut hull ($n = 5$)

| 样品 Samples | 添加水平 Spiked level/ (mg/kg) | 平均回收率 Average recovery/% | 相对标准偏差 RSD/% |
|--------------------|---|--------------------------------|-----------------|
| 花生仁 Peanut | 0.05 | 100.9 | 8.1 |
| | 0.5 | 86.5 | 4.3 |
| | 1 | 83.2 | 5.7 |
| 花生壳 Peanut hull | 0.05 | 99.3 | 5.1 |
| | 0.5 | 93.8 | 6.0 |
| | 1 | 85.3 | 4.2 |

表3 花生仁和花生壳中的日间添加回收率($n = 5$)

Table 3 Recovery inter-day of pyraclostrobin spiked into the peanut and peanut hull ($n = 5$)

| 样品 Samples | 添加水平 Spiked level/ (mg/kg) | 平均回收率 Average recovery/% | 相对标准偏差 RSD/% |
|--------------------|---|--------------------------------|-----------------|
| 花生仁 Peanut | 0.05 | 102.6 | 5.8 |
| | 0.5 | 89.1 | 5.4 |
| | 1 | 92.1 | 4.9 |
| 花生壳 Peanut hull | 0.05 | 101.4 | 4.2 |
| | 0.5 | 88.3 | 3.1 |
| | 1 | 88.7 | 2.7 |

3 结论

建立了吡唑醚菌酯在花生仁和花生壳样品中残留的HPLC分析方法。通过凝胶渗透色谱结合SPE- NH_2 小柱净化,有效去除了花生仁及壳中的蛋白质、脂肪酸、维生素等多种杂质。该方法的灵敏度、准确度及精密度均满足残留分析的要求,为研究吡唑醚菌酯在花生中的残留分析和消解动态提供了技术支持,并为相关残留限量标准的建立奠定了基础。本方法所需仪器及实验材料方便易得,适用于大规模监测吡唑醚菌酯在花生中的残留情况。

参考文献(Reference):

- [1] 陶贤鉴,罗亮明,黄超群,等.吡唑醚菌酯的合成研究[J].农药研究与应用,2009,13(1):16-17,21.
TAO Xianjian, LUO Liangming, HUANG Chaoqun, *et al.* Synthesis of pyraclostrobin [J]. *Agrochem Res Appl*, 2009, 13 (1):16-17,21. (in Chinese)
- [2] ANKE T, OBERWINKLER F, STEGLICH W, *et al.* The strobilurins are two antifungal antibiotics which were isolated from the mycelium of strobilurus tenacellus strain[J]. *J Antibiot*, 1977,30(10):806-810.
- [3] BARTLETT D W, CLOUGH J M, GODWIN J R, *et al.* Review: the strobilurin fungicides [J]. *Pest Manag Sci*, 2002, 58 (7): 649-662.
- [4] BASF. BASF crop protection[EB/OL]. [2012-06-10]. <http://www.agro.basf.com>
- [5] 日本厚生劳动省.食安发0328第1号通知[EB/OL].(2011-03-28)[2012-06-10].<http://www.tbt-sps.gov.cn/foodsafety/xlbz/Pages/japan.aspx>
Labor and Welfare. 0328 No. 1 notice by the Japanese Ministry of Health[EB/OL].(2011-03-28)[2012-06-10].<http://www.tbt-sps.gov.cn/foodsafety/xlbz/Pages/japan.aspx>(in Chinese)
- [6] De MELO ABREU S, CABONI P, CABRAS P, *et al.* Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 573-574:291-297.
- [7] De SOUZA C F, Da CUNHA A L M C, AUCÉLIO R Q. Determination of picoxystrobin and pyraclostrobin by MEKC with on-line analyte concentration [J]. *Chromatographia*, 2009, 70 (9-10):1461-1466.
- [8] ESTEVE-TURRILLAS F A, MERCADER J V, AGULLÓ C, *et al.* Development of immunoaffinity columns for pyraclostrobin extraction from fruit juices and analysis by liquid chromatography with UV detection [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218 (30): 4902-4909.
- [9] 张志勇,王冬兰,刘贤进.西瓜与土壤中吡唑醚菌酯残留的分析方法[J].安徽农业科学,2010,38(34):19386-19387.
ZHANG Zhiyong, WANG Donglan, LIU Xianjin. Determination of pyraclostrobin residues in watermelon and soil [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2010, 38 (34): 19386-19387. (in Chinese)
- [10] 王岩,姚威风,梁爽,等.甘蓝和土壤中吡唑醚菌酯·烯酰吗啉残留分析[J].农药,2011,50(1):46-47,57.
WANG Ya, YAO Weifen, LIANG Shuan, *et al.* Residues determination of pyraclostrobin dimethomorph in cabbage and soil [J]. *Agrochemicals*, 2011, 50(1):46-47,57. (in Chinese)
- [11] 李瑞娟,于建全,宋国春.葡萄和土壤中吡唑醚菌酯的高效液相色谱残留分析方法[J].农药科学与管理,2010,31(6):33-36.
LI Ruijuan, YU Jianlei, SONG Guochun. Determination of pyraclostrobin residues in grape and soil by HPLC[J]. *Pestic Sci Admin*, 2010, 31(6):33-36. (in Chinese)
- [12] 殷冬梅,张幸果,王允,等.花生主要品质性状的主成分分析与综合评价[J].植物遗传资源学报,2011,12(4):507-512,518.
YIN Dongmei, ZHANG Xingguo, WANG Yun, *et al.* Principal component analysis and comprehensive evaluation on quality traits of peanut parents [J]. *J Plant Genetic Resources*, 2011, 12 (4):507-512,518. (in Chinese)
- [13] 梅娜,周文明,胡晓玉,等.花生粕营养成分分析[J].西北农业学报,2007,16(3):96-99.
MEI Na, ZHOU Wenming, HU Xiaoyu, *et al.* Analysis on the nutrient composition of peanut meals [J]. *Acta Agric Boreali-Occident Sin*, 2007, 16(3):96-99. (in Chinese)
- [14] 万书波,封海胜,王秀贞.花生营养成分综合评价与产业化发展战略研究[J].花生学报,2004,33(2):1-6.
WAN Shubo, FENG Haisheng, WANG Xiuzhen. Synthetically evaluation on peanut nutrients and study on its industrialization development strategy [J]. *J Peanut Sci*, 2004, 33 (2): 1-6. (in Chinese)
- [15] 钱传范,刘丰茂,潘灿平,等.农药残留分析原理与方法[M].北京:化学工业出版社,2011.
QIAN Chuanfan, LIU Fengmao, PAN Chanping, *et al.* Principle and Method of Pesticide Residue Analysis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011. (in Chinese)

(责任编辑:金淑惠)