

气相色谱法测定黄瓜中吡唑萘菌胺及其代谢物

郑振山, 陈勇达, 张少军*, 王莉, 钱训

(河北省农林科学院农产品质量安全研究中心, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(石家庄), 石家庄 050051)

摘要: **目的** 建立黄瓜中吡唑萘菌胺及其降解产物残留的气相色谱分析方法。**方法** 样品用丙酮提取, 二氯甲烷萃取, 固相萃取弗罗里硅土小柱净化, 气相色谱仪氮磷检测器检测, 外标法定量。**结果** 吡唑萘菌胺及其降解产物在 0.5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好($r = 0.998$), 黄瓜中的吡唑萘菌胺及其降解产物的添加浓度为 0.02、0.10、1.0 mg/kg 3 个水平时, 回收率在 73.5%~110%之间, 相对标准偏差在 1.63%~13.5%之间; 吡唑萘菌胺及其降解产物的检出限均达到了 0.02 mg/kg 。**结论** 该方法操作简单, 准确度和回收率能满足残留测定需要, 适合黄瓜中吡唑萘菌胺其降解产物的残留分析。

关键词: 气相色谱法; 吡唑萘菌胺; 黄瓜; 农药残留; 降解产物

Determination of isopyrazam residues and its degradation products in cucumber by gas chromatography

ZHENG Zhen-Shan, CHEN Yong-Da, ZHANG Shao-Jun*, WANG Li, QIAN Xun

(Research Center of Quality and Safety of Agro-products, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products (Shijiazhuang), Ministry of Agriculture, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of isopyrazam residues and its degradation products in cucumber by gas chromatography. **Methods** Samples were extracted with acetone, followed by extraction with methylene dichloride and cleaned up by SPE (florisil column), then determined by gas chromatography with nitrogen phosphorus detector (GC-NPD) and quantified by external standard method. **Results** Each compound showed a good linear relationship in the concentration range of 0.5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The recoveries for cucumber spiked with 3 different levels of isopyrazam and its degradation products at 0.02, 0.10 and 1.0 mg/kg ranged from 73.5% to 110%, with RSD between 1.63% and 13.5%, and the limit of quantitation (LOQ) for all of them was 0.02 mg/kg . **Conclusion** This method is simple, the accuracy and recovery rate can meet the needs of the residue determination, and it can be applied for the detection of isopyrazam residues and its degradation products in cucumber.

KEY WORDS: gas chromatography; isopyrazam; cucumber; pesticide residue; degradation products

1 引言

吡唑萘菌胺是由先正达公司研发的新型琥珀酸

脱氢酶抑制剂, 通过抑制线粒体内膜上电子传递链中的琥珀酸脱氢酶, 使得病原真菌无法经由呼吸产生能量, 进而瓦解病菌的生长, 对病原孢子发芽、发

*通讯作者: 张少军, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: zhangshj601@163.com

*Corresponding author: ZHANG Shao-Jun, Professor, Research Center of Quality and Safety of Agro-products, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products (Shijiazhuang), Ministry of Agriculture, Shijiazhuang 050051, China. E-mail: zhangshj601@163.com

芽管的生长及吸附器的形成具有较强的抑制作用, 对少部分真菌也具有抑制菌丝生长及孢子形成的作用, 可用于防治黄瓜上的根腐病、白粉病等^[1-5]。吡唑萘菌胺纯品由其顺式异构体(SYN534969)和反式异构体(SYN534968)组成, 在环境和作物体内首先降解为 SYN545364 和 SYN545449 两种有毒降解产物。国际粮农组织和世界卫生组织的农药残留联席会议(JMPR)提供的吡唑萘菌胺的每日允许摄入量(ADI)为 0~0.06 mg/kg, 美国规定吡唑萘菌胺在苹果中的限量为 0.7 mg/kg, 在花生中的限量为 0.01 mg/kg^[6], 而我国暂无吡唑萘菌胺的最大残留限量标准。

在我国, 农药的不合理使用导致的农产品及其加工制品中的农药残留问题时有发生, 对消费者的健康构成了威胁; 此外, 农药残留问题也是影响农产品出口贸易的一个重要因素。目前, 张红芬等测定了吡唑萘菌胺的异构体^[7], 陈祥准等测定了不同样品基质中的吡唑萘菌胺残留^[8-10], 但未见报道吡唑萘菌胺及其降解产物在黄瓜中的残留分析方法。为评价吡唑萘菌胺在黄瓜上使用后的安全性, 以及对食品中的吡唑萘菌胺的残留进行监管, 本研究建立了黄瓜中吡唑萘菌胺及其降解产物的残留检测方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

仪器: Agilent 6890N 气相色谱仪, 带氮磷检测器(NPD)和色谱工作站(Agilent 6890N, 美国安捷伦公司); 超声波清洗器(KQ3200DE, 昆山市超声仪器有限公司); 固相萃取仪(SUPELCO, 北京康林科技有限责任公司); 氮吹仪(MTN-2800W, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

试剂: 丙酮、二氯甲烷、正己烷、甲苯、石油醚(60~90℃)、乙酸乙酯(色谱纯, Thermo fisher 公司); 氯化钠、无水硫酸钠(分析纯, 北京化工厂); 弗罗里硅土固相萃取(SPE)小柱(1 g, 6 mL, 天津博纳艾杰尔科技有限公司)。吡唑萘菌胺标准品: 99.4%, 吡唑萘菌胺降解产物一(SYN545364)标准品: 96%, 吡唑萘菌胺降解产物二(SYN545449)标准品: 98%(先正达(中国)投资有限公司)。

2.2 样品前处理

准确称取黄瓜样品 10.0 g, 加入 30 mL 丙酮, 匀

浆, 抽滤, 40℃下减压蒸除大部分丙酮, 转至分液漏斗, 加入 40 mL 10%氯化钠溶液, 摇匀, 依次用 20、15、15 mL 二氯甲烷萃取。二氯甲烷萃取液经无水硫酸钠脱水, 40℃减压浓缩近干, 用 3~5 mL 石油醚溶解于试管中, 待净化。

弗罗里硅土 SPE 小柱依次用 5.0 mL 丙酮、5.0 mL 正己烷预淋, 转移样品上柱, 用 5.0 mL 正己烷/甲苯(65:35, V:V)淋洗, 弃去淋出液; 用 5.0 mL 甲苯淋洗, 弃去淋出液; 依次用 5.0 mL 甲苯/丙酮(95:5, V:V)和 5.0 mL 甲苯/丙酮(8:2, V:V)洗脱, 收集洗脱液。合并洗脱液, 50℃水浴氮吹至近干, 用乙酸乙酯定容至 2 mL, 待气相色谱测定。

2.3 仪器条件

色谱柱: HP-5MS 毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm)。进样口温度: 290℃, 不分流进样。柱温: 起始温度 80℃, 持续 1 min, 以 25℃/min 速率升温, 升至 300℃, 保持 5 min。载气: N₂(含量 99.999%), 流量 2 mL/min, 尾吹 58 mL/min。氢气: 3.5 mL/min; 空气: 65 mL/min; 氮磷检测器温度: 300℃; 进样量: 1 μL。

保留时间: 吡唑萘菌胺顺式异构体的保留时间约 9.1 min, 吡唑萘菌胺反式异构体的保留时间约 9.4 min, 吡唑萘菌胺降解产物一(SYN545364)保留时间约 9.5 min, 吡唑萘菌胺降解产物二(SYN545449)保留时间约 9.9 min。

3 结果与讨论

3.1 净化条件选择

为了达到对黄瓜样品的净化, 本研究考察了 C₁₈ 固相萃取小柱和弗罗里硅土固相萃取小柱的净化效果, 发现弗罗里硅土小柱净化效果优于 C₁₈ 小柱; 在样品洗脱溶剂的遴选中, 考察了甲苯/丙酮在体积比为 95:5、80:20、65:35、50:50 时, 吡唑萘菌胺及其降解产物的洗脱效率, 实验结果见表 1。从数据可以看出, 在甲苯/丙酮体积比为 95:5 和 80:20 时, 吡唑萘菌胺及其降解产物的洗脱效率接近百分之百, 故选择甲苯/丙酮体积比为 95:5 和 80:20 作为固相萃取洗脱溶剂。

3.2 方法的线性关系和最小检出量

用乙酸乙酯做溶剂, 将吡唑萘菌胺、吡唑萘菌胺降解产物一(SYN545364)、吡唑萘菌胺降解产物

二(SYN545449)分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液,再用乙酸乙酯稀释成 0.5、1、2、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准系列溶液,在上述仪器条件下进样,以进样量(ng)对峰面积作图,对吡唑萘菌胺及其代谢物进行线性拟合,实验结果见表 2。从表 2 结果可以看出,4 种化合物线性关系良好。在上述仪器条件下,吡唑萘菌胺及其代谢物的最小检出量均为 0.01 ng 。

3.3 方法的准确度和精密度

取空白黄瓜样品,按上述实验方法做添加回收

率实验,添加浓度为 0.02、0.10、1.00 mg/kg ,每个浓度做 5 个平行实验,实验中吡唑萘菌胺以两种异构体的和计算回收率(见表 3)。实验结果显示其回收率在 73.5%~110%之间,相对标准偏差在 1.63%~13.5%之间,说明该方法的准确度和精密度均符合农药残留测定的要求。吡唑萘菌胺的相关谱图见图 1 和图 2,从图 2 可以看出,吡唑萘菌胺及其代谢物与样品基质中其他干扰组分能够实现基线分离,谱图和添加回收率实验证明该方法能够用于黄瓜中吡唑萘菌胺及其降解产物残留量的分析测定。

表 1 不同比例洗脱溶剂洗脱效率

Table 1 The efficiency of elution with different ratio of solvents

分析目标物	洗脱液组成(甲苯/丙酮, V:V)			
	95:5	80:20	65:35	50:50
吡唑萘菌胺顺式异构体(%)	72	68	60	65
吡唑萘菌胺反式异构体(%)	27	32	40	35
吡唑萘菌胺代谢物一(SYN545364)(%)	0	0	0	0
吡唑萘菌胺代谢物二(SYN545449)(%)	0	0	0	0

表 2 吡唑萘菌胺及其降解产物的线性范围及相关系数

Table 2 The linear range and correlation coefficient of isopyrazam and its degradation products

化合物	线性方程	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数
吡唑萘菌胺顺式异构体	$Y=11.282X-0.3892$	0.5~10	0.9993
吡唑萘菌胺反式异构体	$Y=1.272X+0.8336$	0.5~10	0.9985
吡唑萘菌胺降解产物一(SYN545364)	$Y=10.309X+0.9565$	0.5~10	0.9995
吡唑萘菌胺降解产物二(SYN545449)	$Y=10.125X-1.1942$	0.5~10	0.9984

表 3 吡唑萘菌胺及其降解产物在黄瓜中的添加回收率

Table 3 The average recovery of isopyrazam and its degradation products in cucumber

化合物	添加浓度(mg/kg)	回收率(%)					平均	变异系数(%)
		1	2	3	4	5		
吡唑萘菌胺(异构体之和)	0.02	74.5	110	96.6	110	106	99.4	13.5
	0.10	87.8	76.5	84.8	87.0	81.7	83.6	4.92
	1.00	82.9	83.6	89.4	85.4	89.5	86.2	3.26
吡唑萘菌胺降解产物一 SYN545364	0.02	74.6	102	102	82.9	97.5	91.8	12.1
	0.10	99.2	86.2	82.8	88.0	89.8	89.2	6.18
	1.00	79.0	80.9	83.9	81.2	84.7	81.9	2.54
吡唑萘菌胺降解产物二 SYN545449	0.02	89.6	106.2	99.6	106.2	86.3	97.6	8.50
	0.10	101	100	91.5	98.1	105	99.1	4.47
	1.00	73.5	75.6	76.2	74.8	77.1	75.4	1.63

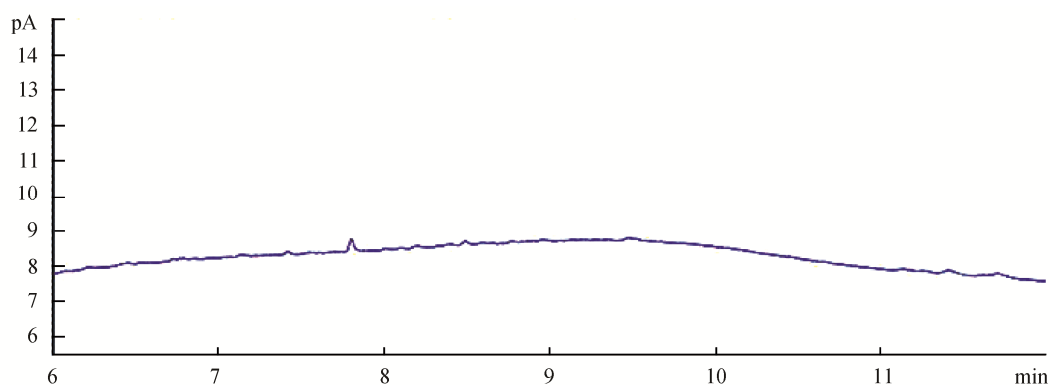


图 1 黄瓜空白样品图

Fig. 1 Chromatogram of blank cucumber

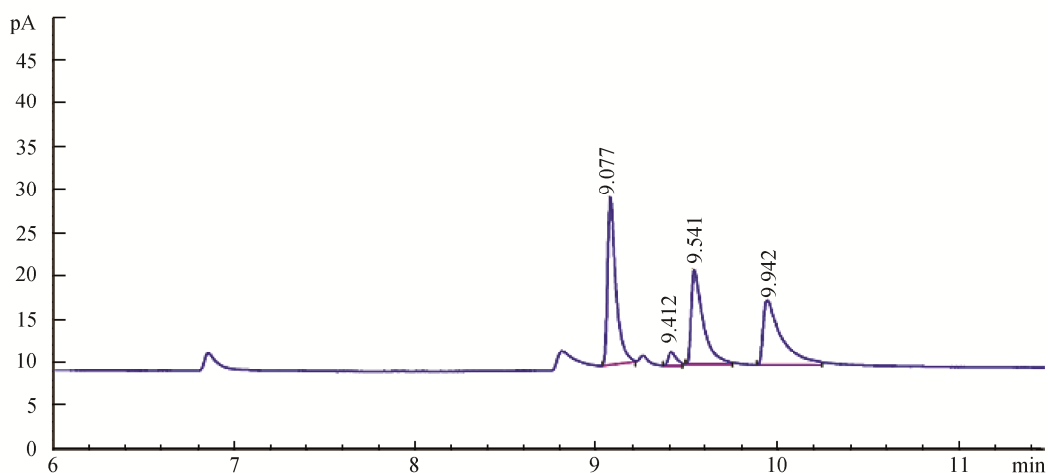


图 2 吡唑萘菌胺及其降解产物的黄瓜样品添加色谱图

Fig. 2 Chromatogram of isopyrazam and its degradation products spiked in cucumber

注: 吡唑萘菌胺顺式异构体, 保留时间约 9.07 min; 吡唑萘菌胺反式异构体, 保留时间约 9.41 min; 吡唑萘菌胺降解产物一(SYN545364), 保留时间约 9.54 min; 吡唑萘菌胺降解产物二(SYN545449), 保留时间约 9.94 min。

Note: Syn-isopyrazam, Rt=9.1 min; Anti-isopyrazam, Rt=9.4 min; SYN545364, Rt=9.54 min; SYN545449, Rt=9.94 min

4 结 论

本研究建立了用于测定黄瓜中吡唑萘菌胺及其降解产物的气相色谱法, 该法前处理步骤简单、灵敏度高, 可用于准确定性和定量, 满足黄瓜中吡唑萘菌胺及其降解产物残留量的测定要求, 可以在此基础上开展其他基质中吡唑萘菌胺的分析方法开发, 为我国食品中吡唑萘菌胺的检测提供技术支撑。

参考文献

- [1] 申瑞平, 宋莹莹, 王秋红, 等. 两种新型琥珀酸脱氢酶抑制剂
- [2] Tiphaine D, Matias P, Friederike P, *et al.* Differences between the succinate dehydrogenase sequences of isopyrazam sensitive zymoseptoria tritici and insensitive Fusarium graminearum strains [J]. Pestic Biochem Phys, 2013, 105(1): 28-35.
- [3] Harp TL, Godwin JR, Scalliet G, *et al.* Isopyrazam, a new generation cereal fungicide [J]. Aspects Appl Biol, 2011, 106: 113-120.
- [4] Laurence HH, Robin GO. The behavior of isopyrazam in aquatic ecosystems: Implementation of a tiered investigation [J]. Environ

的抑菌活性比较[J]. 农药科学与管理, 2014, 35(8): 52-57.

Shen RP, Song YY, Wang QH, *et al.* Comparison of fungistasis of two succinate dehydrogenase inhibitor [J]. Pest Sci Admin, 2014, 35(8): 52-57.

- Toxicol Chem, 2011, 106: 113–120.
- [5] 申瑞平. 吡唑萘菌胺的抑菌谱及其对黄瓜白粉病的防治作用 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
Shen RP. Antifungal spectrum and control effect of isopyrazam to cucumber powdery mildew [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014.
- [6] E-CFR 180.654 Isopyrazam: tolerances for residues [S]
- [7] 张红芬, 余世超, 史建华, 等. 吡唑萘菌胺顺反异构体分离测定[J]. 现代农药, 2015, 04: 30–31.
Zhang HF, She SC, Shi JH, *et al.* Determination of *cis*- and *trans*-isomers of isopyrazam [J]. Mod Agrochem, 2015, 04: 30–31
- [8] 陈祥准, 夏碧琪, 黄芙蓉, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定葡萄酒中 6 种吡唑类杀菌剂[J]. 分析测试学报, 2015, 11: 1311–1314.
Chen XZ, Xia BQ, Huang FZ, *et al.* Simultaneous Determination of six pyrazole fungicides in grape wine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2015, 11: 1311–1314
- [9] Kim JY, Kim JY, Ham HJ, *et al.* Method development and validation for analysis of isopyrazam residues in agricultural products [J]. Korean J Pest Sci, 2013, 17(2): 84–93.
- [10] Antonio AF, Josep VM, Antonio AS, *et al.* Determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407: 4207–4211.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



郑振山, 助理研究员, 主要从事食品安全风险评估工作。

E-mail: zhenshanzheng@126.com



张少军, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: zhangshj601@163.com