

高效液相色谱法测定番茄中腐霉利和异菌脲的残留量

徐秋生*, 贺慧琳, 朱 吕, 吴爱红
(平湖市食品药品检测中心, 平湖 314200)

摘要: **目的** 建立固相萃取-高效液相色谱法测定番茄中腐霉利和异菌脲的残留量。**方法** 番茄样品用乙腈超声提取, 加入氯化钠进行盐析脱水, 提取液过 Florisil 柱净化, 用正己烷/丙酮(90:10, V:V)淋洗液洗脱, 洗脱液氮吹近干, 甲醇定容后经 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行分离, 以乙腈/水(60:40, V:V)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 采用二极管阵列检测器检测, 检测波长为 208 nm。**结果** 在 0.05~5.0 mg/L 浓度范围内, 腐霉利和异菌脲的质量浓度与其峰面积呈良好的线性关系($r^2 > 0.999$), 方法检出限均为 0.025 mg/kg, 在 0.05、0.5 和 1.0 mg/kg 3 个不同加标水平上, 腐霉利和异菌脲的加标回收率为 90.6%~102.4%, 精密度为 3.72%~6.55%。**结论** 该方法操作简单、准确, 可应用于番茄中腐霉利和异菌脲的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 番茄; 腐霉利; 异菌脲; 残留量

Determination of procymidone and iprodione residues in tomato by high performance liquid chromatography

XU Qiu-Sheng*, HE Hui-Lin, ZHU Lv, WU Ai-Hong
(Pinghu Food and Drug Inspection Center, Pinghu 314200, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of procymidone and iprodione residues in tomato by solid phase extraction-high performance liquid chromatography (SPE-HPLC). **Methods** After ultrasonic extraction with acetonitrile, the tomato extracts were added sodium chloride to salt out, purified by Florisil column, eluted by the purified solution with n-hexane/acetone (90:10, V:V), blown by nitrogen evaporator until it was almost dry and diluted with methyl alcohol to a constant volume. Then it was separated by a ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile/water (60:40, V:V) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min, and detected by diode array detector (DAD) at 208 nm. **Results** Procymidone and iprodione had good linear relationships between mass concentration and peak area ($r^2 > 0.999$) in the range of 0.05~5.0 mg/L. The detection limits of two pesticides were both 0.025 mg/kg. The recoveries spiked at 3 levels of 0.05, 0.5 and 1.0 mg/kg were 90.6%~102.4% with RSD of 3.72%~6.55%. **Conclusion** The established method is easy to operate and accurate, which can be applied for the detection of procymidone and iprodione in tomato.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; tomato; procymidone; iprodione; residue

*通讯作者: 徐秋生, 工程师, 主要研究方向为食品、农产品仪器分析检测。E-mail: xuqsh@163.com

*Corresponding author: XU Qiu-Sheng, Engineer, Pinghu Food and Drug Inspection Center, No.216, Ring Road North Two, Pinghu 314200, China. E-mail: xuqsh@163.com

1 引言

番茄(tomato)又称西红柿, 是茄科番茄属一年生或多年生草本植物, 最早起源于南美洲, 番茄的果实营养丰富, 在我国南北方广泛栽培。在番茄种植栽培过程中, 病虫害的繁衍越来越多, 种类繁多, 危害更加严重, 常见的番茄病虫害有灰霉病、叶霉病、早疫病、病毒病以及晚疫病等^[1]。腐霉利(procymidone)又名速克灵、杀霉利、二甲菌核利, 化学名称为 N-(3, 5-二氯苯基)-1, 2-二甲基环丙烷-1, 2-二甲酰基亚胺, 是一种广谱内吸式杀菌剂^[2]。异菌脲(iprodione), 又名扑海因、桑迪恩, 化学名称为 1-异丙胺基甲酰基-3-(3, 5-二氯苯基)乙内酰脲, 属于二甲酰亚胺类, 是一种广谱性触杀型保护性杀菌剂^[3]。腐霉利、异菌脲 2 种杀菌剂都属于有机杂环类, 主要用于番茄种植栽培过程中灰霉病的防治, 可选用 50%腐霉利可湿性粉剂 1500 倍液或 50%异菌脲可湿性粉剂 1000 倍液喷雾^[4]。

近年来研究发现, 一些环境化合物能与雄激素受体(androgen receptor, AR)相互作用, 被称为环境抗雄激素^[5], 可能对雄性生殖系统发育产生不良影响。腐霉利、异菌脲就是其中 2 种已被报道的具有环境抗雄激素的农药, 长期接触可能产生慢性毒性危害, 或致突变、致癌、致畸, 严重影响人类的健康和繁衍繁殖。欧盟、美国及日本的“肯定列表制度”中对于腐霉利、异菌脲都制定了明确的限量标准, 我国在 GB 2763-2014《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[6]中规定了蔬菜、水果、油菜籽等食品中最大残留限量(maximum residue limits, MRL), 其中番茄中腐霉利的 MRL 为 2 mg/kg、异菌脲的 MRL 为 5 mg/kg。在番茄的种植栽培过程中为了防治病虫害, 经常使用含有腐霉利、异菌脲成分的农药, 必然会带来农药的残留问题, 实验表明, 番茄中检出腐霉利等农药残留较普遍, 虽然多数未超过最大残留限量, 但由于番茄是大众消费的蔬菜品种, 涉及面广, 因此进行番茄中腐霉利、异菌脲残留量的日常监测具有非常重要的意义。

目前, 对于腐霉利、异菌脲残留量报道较多的检测方法主要有气相色谱法^[7,8]、气质联用法^[9,10]、液相色谱法^[11,12]和液质联用法^[13,14]等, 但这些方法的报道多以腐霉利或异菌脲单一农药进行检测, 或采用气相色谱法、气质联用法^[15-17]进行同时分析, 而采用液相色谱法同时测定果蔬中腐霉利、异菌脲残留量的研究报道并不多见。由于异菌脲热稳定性较差, 采用气相色谱法进行分析容易发生分解, 色谱峰拖尾现象严重, 影响最终测定结果的准确性。本研究采用固相萃取的净化方法, 并优化净化条件, 建立液相色谱法同时测定番茄中腐霉利、异菌脲残留量的分析方法, 以期对分析食品中腐霉利、异菌脲的残留量提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UltiMate 3000 高效液相色谱仪, 配有二极管阵列检测器(美国 Thermo Fisher 公司); TurboVapLV 型全自动定量浓缩仪(瑞典 Biotage 公司); PM4-1300TL 单频超声波清洗器(英国 Prima 公司); LD4-2A 离心机(北京医用离心机厂); BRAUN K600Q 多功能食品调理机(德国博朗公司); PL602E 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Vortex 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); Florisil 柱(1 g/6 mL, 天津博纳艾杰尔公司); 有机微孔滤膜(0.22 μm , 天津博纳艾杰尔公司)。

腐霉利、异菌脲标准品(纯度 $\geq 98.5\%$, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 氯化钠, 用前经 140 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 4 h, 冷却备用(分析纯, 国药集团); 超纯水(实验室自制)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

分别准确称取适量腐霉利、异菌脲标准品, 用甲醇溶解, 配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备液, -18 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用甲醇逐级稀释至 0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/L 的混合标准工作溶液。

2.2.2 样品制备与提取

取番茄样品擦去表面附着物, 切碎, 用多功能食品调理机捣碎成匀浆, 放入聚乙烯塑料容器中, -18 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。准确称取解冻后的番茄样品 25 g(精确至 0.01 g)于 100 mL 聚丙烯塑料离心管中, 加入 50 mL 乙腈, 室温下超声提取 30 min, 4000 r/min 离心 5 min, 上清液倒入预先称有 5~7 g 氯化钠的 100 mL 聚丙烯塑料离心管中, 拧紧盖子, 剧烈震荡 1 min, 4000 r/min 离心 5 min, 使乙腈相和水相分层。

2.2.3 样品净化

准确移取 10 mL 乙腈相至样品管中, 置于全自动定量浓缩仪 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮吹至近干, 加入 2 mL 正己烷涡旋混匀, 待净化。将 Florisil 柱(1 g/6 mL)置于固相萃取装置上, 依次用 5 mL 正己烷/丙酮(90:10, V:V)和 5 mL 正己烷预淋洗。当溶剂液面到达柱吸附层表面时, 关闭固相萃取装置流出液阀门, 分别装入样品接收管, 并倒入待净化液, 开启流出液阀门接收洗脱液, 再用 10 mL 正己烷/丙酮(90:10, V:V)分 2 次清洗样品管后淋洗 Florisil 柱。将收集有洗脱液的样品管置于全自动定量浓缩仪上, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮吹蒸发至近干, 加入 2.5 mL 甲醇涡旋混匀, 过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 上液相色谱测定。

2.2.4 液相色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 美国 Agilent 公司); 流动相: 乙腈/水(60:40, V:V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 208 nm; 进样量: 20 μL ; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择

分别取腐霉利、异菌脲农药标准工作溶液,进行紫外波长扫描,获得190~400 nm范围内的紫外吸收光谱图(见图1),从光谱图上可以看出腐霉利、异菌脲2种农药在208 nm波长附近均有较强的吸收峰,本方法最终选择208 nm作为检测波长。

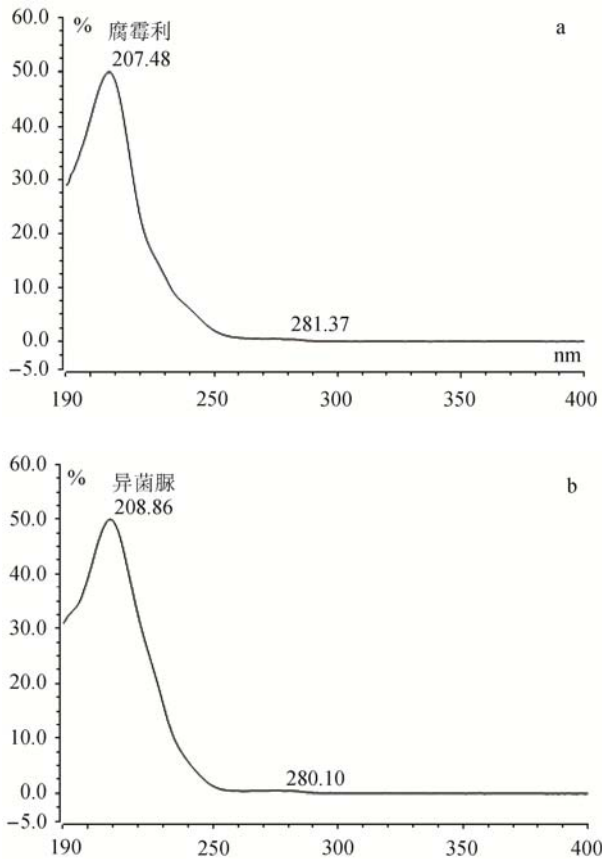


图1 (a)腐霉利和(b)异菌脲的紫外吸收光谱图

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrums of (a)procymidone and (b)iprodione

3.2 淋洗液量的选择

分别取腐霉利、异菌脲农药标准贮备液适量,加入2 mL正己烷涡旋混合均匀,过Florisisil柱(1 g/6 mL),Florisisil柱(1 g/6 mL)依次用5 mL正己烷/丙酮(90:10, V:V)和5 mL正己烷溶液预先活化,弃去正己烷流出液。当正己烷液面到达柱吸附层表面时,用15 mL正己烷/丙酮(90:10, V:V)淋洗液分3次进行淋洗,每次用5 mL淋洗液,依次收集3管洗脱液。洗脱液在50 °C水浴氮吹蒸发近干,用1 mL甲醇定容,进液相色谱分析后绘制淋洗柱形图(见图2)。从图2中可以看出,5 mL淋洗液已洗脱下大部分农药,10 mL淋

洗液农药已洗脱完全,15 mL淋洗液农药回收率未变化,无农药再洗脱下来。所以本方法最终选择正己烷/丙酮(90:10, V:V)淋洗液,淋洗液体积10 mL。

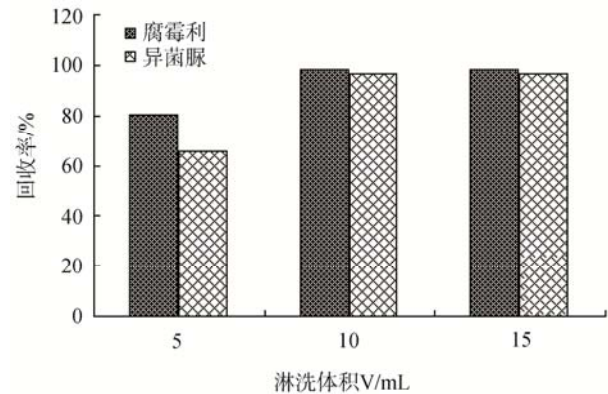


图2 Florisisil柱淋洗液量的选择

Fig. 2 Section of leachate amount of Florisisil column

3.3 流动相的选择

取1.0 mg/L腐霉利、异菌脲农药混合标准工作溶液上机分析,在流速为1.0 mL/min条件下,选择乙腈/水(70:30, V:V)、乙腈/水(60:40, V:V)、甲醇/水(70:30, V:V)和甲醇/水(60:40, V:V)4种不同的流动相进行等度洗脱。选择甲醇/水(70:30, V:V)和甲醇/水(60:40, V:V)流动相,干扰物质较多,基线波动较大,腐霉利和异菌脲2种农药不能有效分离。选择乙腈/水(70:30, V:V)和乙腈/水(60:40, V:V)流动相,腐霉利和异菌脲2种农药都能完全分离,而选择乙腈/水(70:30, V:V)流动相,腐霉利和异菌脲2种农药的出峰时间在6.5 min以内,流动相乙腈比例高,出峰时间较早,样品检测有杂峰干扰。所以本方法选择了乙腈/水(60:40, V:V)流动相,腐霉利、异菌脲农药的标准溶液色谱图见图3,出峰时间为异菌脲(9.5 min),腐霉利为(10.5 min),分离度大于1.5。

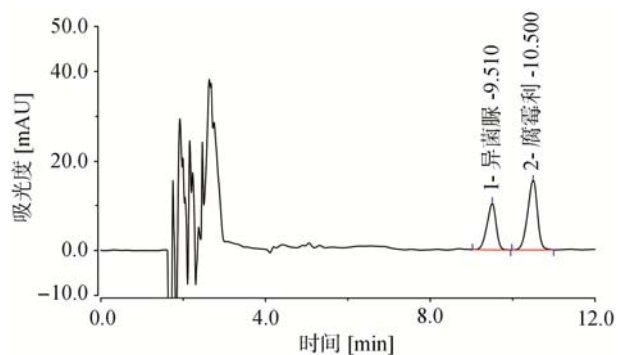


图3 腐霉利和异菌脲标准溶液的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of procymidone and iprodione standard solutions

表 1 标准曲线与线性相关性
Table 1 Standard curve and linear correlation

农药组分	线性范围(mg/L)	线性方程	相关系数 r^2	检出限(mg/kg)
腐霉利	0.05~5.0	$Y=3.4142X+0.0268$	0.9995	0.025
异菌脲	0.05~5.0	$Y=2.683X+0.0654$	0.9998	0.025

3.4 标准曲线与检出限

取 0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/L 系列腐霉利、异菌脲混合标准工作溶液进行上机测定, 以峰面积 Y 对标准工作液浓度 X 绘制标准曲线, 得线性回归方程。以 3 倍信噪比(S/N)计算仪器检出限, 并乘以方法的稀释倍数除以样品称样量计算方法检出限, 结果见表 1。从表 1 可知, 在 0.05~5.0 mg/L 浓度范围内, 腐霉利、异菌脲均具有良好的线性关系。

3.5 加标回收率与精密度试验

取制备均匀的空白番茄样品, 解冻后准确称取 25 g(精确至 0.01 g), 分别添加 0.05、0.5 和 1.0 mg/kg 3 个不同水平的腐霉利、异菌脲农药混合标准溶液, 按本方法确定的条件进行提取和净化, 经上机分析测定样品中各组分农药的含量, 每个添加浓度重复测定 6 次, 计算加标回收率和精密度, 测定结果见表 2。由表 2 可见, 各组分农药的加标回收率在 90.6%~102.4%之间, 精密度在 3.72%~6.55%之间, 符合农药残留分析要求。

表 2 回收率与精密度试验($n=6$)
Table 2 Recoveries and precision test ($n=6$)

农药组分	添加浓度 (mg/kg)	平均回收量 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
腐霉利	0.05	0.0512	102.4	5.68
	0.5	0.465	93.0	3.72
	1.0	0.956	95.6	4.66
异菌脲	0.05	0.0453	90.6	6.55
	0.5	0.489	97.8	5.02
	1.0	0.948	94.8	4.14

3.6 番茄样品的测定

将番茄样品和加标样品分别上机分析, 样品色谱图和加标色谱图分别见图 4、图 5。从色谱图中可见, 在上述色谱条件下, 腐霉利、异菌脲目标峰分离较好, 无杂质干扰, 该方法可以满足番茄中腐霉利、异菌脲残留量的测定。所测番茄样品检出腐霉利残留, 异菌脲未检出, 具体色谱图详见图 4。

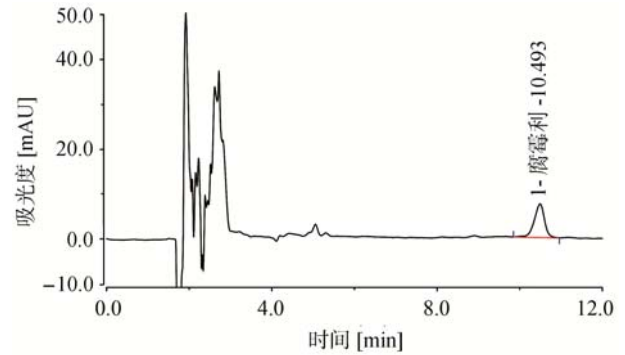


图 4 番茄样品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of tomato sample



图 5 番茄加标样品色谱图

Fig. 5 Chromatogram of tomato spiked sample

采用本方法对某蔬菜批发市场销售的番茄样品进行测定, 所检测的 10 批次番茄样品中, 检出腐霉利农残 3 批次, 异菌脲农残未检出, 腐霉利农残平均值 0.3 mg/kg, 符合 GB 2763-2014《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[6]最大残留限量要求。

4 结 论

采用固相萃取-高效液相色谱法测定番茄中腐霉利和异菌脲残留量, 各组分农药的加标回收率在 90.6%~102.4%之间, 精密度在 3.72%~6.55%之间, 符合农药残留分析要求。与气质联用法、液质联用法相比, 该方法虽在农药适用范围具有一定的局限性, 但操作简单方便、方法准确可靠、检测成本较低, 同时有效避免了采用气相色谱法测定异菌脲时易发生分解、色谱峰拖尾严重的

问题, 选用二极管阵列检测器能够对被测物质进行全波长扫描, 有效避免了杂质峰的干扰, 提高了检测的准确性, 使用本方法完全能够满足番茄中腐霉利和异菌脲残留量的日常监测需求。

参考文献

- [1] 梁桂勤, 黄善恩. 西红柿不同生长期病虫害防治技术[J]. 现代农业科技, 2015, (18): 132-133.
Liang GQ, Huang SE. Control techniques of diseases and insect pests in different growth stages of tomato [J]. Mod Agric Sci Technol, 2015, (18): 132-133.
- [2] 卢晓宇, 陈跃, 王金花, 等. 气相色谱-质联用法测定食品中腐霉利残留量[J]. 北京化工大学学报, 2008, 35(3): 35-38.
Lu XY, Chen Y, Wang JH, *et al.* Determination of procymidone residues in foods using gas chromatography/mass spectrum(GC/MS) [J]. J Beijing Univ Chem Technol, 2008, 35(3): 35-38.
- [3] 吴春红, 聂继云, 李静, 等. 基质分散固相萃取-高效液相色谱法测定水果中的异菌脲残留量[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 188-190.
Wu CH, Nie JY, Li J, *et al.* Combination of matrix solid phase dispersion extraction with high performance liquid chromatography for determination of iprodione residue in fruits [J]. Food Sci, 2009, 30(14): 188-190.
- [4] 夏英三. 棚室番茄主要病害的药剂防治[J]. 植物医生, 2001, 14(1): 17.
Xia YS. Chemical control of main diseases of tomato in greenhouse [J]. Plant Doctor, 2001, 14(1): 17.
- [5] 张国军, 郑一凡, 祝慧娟, 等. 菌核净的抗雄激素作用及机制的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(1): 15-18.
Zhang GJ, Zheng YF, Zhu HJ, *et al.* The antiandrogenic effect of dimethachlon and its mechanism [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2004, 22(1): 15-18.
- [6] GB 2763-2014 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763-2014 National food safety standards-Maximum residue limits of pesticides in food [S].
- [7] 曹鹏, 唐莉, 顾德宇, 等. MSPD-GC 法测定苹果和蔬菜中腐霉利农药残留[J]. 广州化工, 2012, 40(12): 129-130.
Cao P, Tang L, Gu DY, *et al.* Determination of procymidone pesticide residue in apples and vegetables by matrix solid phase dispersion-gas chromatography [J]. Guangzhou Chem Ind, 2012, 40(12): 129-130.
- [8] 赵子丹, 牛艳, 姜瑞, 等. 黄瓜及土壤中异菌脲残留量的气相色谱分析[J]. 湖北农业科学, 2015(10): 2483-2485.
Zhao ZD, Niu Y, Jiang R, *et al.* Detection of iprodione residue in cucumber and soil by GC [J]. Hubei Agric Sci, 2015, (10): 2483-2485.
- [9] 郑龙, 周敏. 气相色谱-质谱联用法测定蔬菜中的腐霉利残留试验[J]. 广东农业科学, 2009, (3): 155-156.
Zheng L, Zhou M. Determination of procymidone in vegetables by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Guangzhou Agric Sci, 2009, (3): 155-156.
- [10] 胡珅, 杨长志, 魏冬旭, 等. 气相色谱-质谱法测定植物源食品中异菌脲残留量[J]. 检验检疫学报, 2013, 23(4): 57-60.
Hu S, Yang CZ, Wei DX, *et al.* Determination of iprodione residues in foodstuffs of origin by GC-MS [J]. J Inspect Quarant, 2013, 23(4): 57-60.
- [11] 任刚, 廖卫波, 胡志成, 等. 人参提取物中腐霉利残留的 HPLC 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 107-110.
Ren G, Liao WB, Hu ZC, *et al.* Analysis of procymidone residues in ginseng extract by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 19(23): 107-110.
- [12] 郭藤, 李娜, 张洋, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定果蔬中异菌脲残留量[J]. 分析实验室, 2014, 33(7): 860-863.
Guo T, Li N, Zhang Y, *et al.* Determination of iprodione residues in fruits and vegetables by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2014, 33(7): 860-863.
- [13] 胡祥娜, 顾亚萍, 林慧纯, 等. 高效液相色谱串联四极杆质谱法同时测定豆芽中 7 种药物残留[J]. 食品科学, 2014, 35(20): 253-257.
Hu XN, Gu YP, Lin HC, *et al.* Simultaneous determination of seven drug residues in bean sprouts by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2014, 35(20): 253-257.
- [14] 梁林, 张爱娟, 潘金菊, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定黄瓜及番茄中异菌脲残留[J]. 农药科学与管理, 2014, 35(4): 45-48.
Liang L, Zhang AJ, Pan JJ, *et al.* Determination of iprodione residue in cucumber and tomato by UPLC-MS/MS [J]. Pest Sci Admin, 2014, 35(4): 45-48.
- [15] 王朝杰, 李倩, 胡玉霞, 等. 固相萃取-毛细管气相色谱法测定蔬菜中 14 种有机氯类农药残留量分析[J]. 现代农业科技, 2016, (5): 137-139.
Wang CJ, Li Q, Hu YX, *et al.* Study on Determination of 14 kinds of organochlorine pesticide residuals in vegetables by solid-phase extraction and capillary gas chromatography [J]. Mod Agric Sci Technol, 2016, (5): 137-139.
- [16] 徐国锋, 聂继云, 李静, 等. 苹果、香蕉和柑橘中腐霉利等 4 种防腐保鲜剂残留分析方法[J]. 农药学报, 2009, 11(3): 351-356.
XU GF, Nie JY, Li J, *et al.* Residue analysis of procymidone, imazalil, iprodione and prochloraz in apple, banana and citrus [J]. Chin J Pest Sci, 2009, 11(3): 351-356.
- [17] 蒋永祥, 谈金辉, 涂红艳, 等. 气相色谱-质谱法同时测定菠菜中 4 种二缩甲酰胺类杀菌剂的残留量[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, (7): 813-815.
Jiang YX, Tan JH, Tu HY, *et al.* Determination of 4 kinds of dicondensing-formylimine residues in spinach by GC/MS [J]. Phys Test Chem Anal Part B: Chem Anal, 2011, (7): 813-815.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



徐秋生, 工程师, 主要研究方向为食品、农产品仪器分析检测。
E-mail: xuqsh@163.com