

气相色谱法检测苹果中氟环唑、咪鲜胺及其代谢物的残留

龙家寰, 高迪, 魏进, 张盈, 段婷婷*

(贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵阳 550006)

摘要: **目的** 建立气相色谱法检测苹果中咪鲜胺及其代谢物 2,4,6-三氯苯酚和氟环唑残留的分析方法。**方法** 匀浆样品加入 1%乙酸乙腈振荡, 再加入 3 g NaCl、2 g 无水 Na₂SO₄ 高速振荡 10 min, 以 5000 r/min 离心 5 min 提取, 之后经 N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)净化, 采用气相色谱法进行检测, 外标法定量。**结果** 苹果中 3 种农药在 0.01~2.0 mg/L 范围内呈良好线性($r^2=0.999$)。方法定量限为 10~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。平均回收率为 74%~108%, 相对标准偏差为 2.90%~9.55%。**结论** 该方法准确、快速、可靠, 适用于苹果中咪鲜胺及其代谢物 2,4,6-三氯苯酚和氟环唑残留量的检测。

关键词: 气相色谱法; 咪鲜胺; 2,4,6-三氯苯酚; 氟环唑; 苹果

Determination of epoxiconazole, prochloraz and their metabolites residues in apple by gas chromatography

LONG Jia-Huan, GAO Di, WEI Jin, ZHANG Ying, DUAN Ting-Ting*

(Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of prochloraz and its metabolites 2,4,6-trichlorophenol and epoxiconazole residues in apples by gas chromatography. **Methods** The homogenate sample was shaken with 1% acetic acid acetonitrile, and then 3 g NaCl and 2 g anhydrous Na₂SO₄ were added with 10 min shaking at high speed, centrifuged at 5000 r/min for 5 min, then purified with primary secondary amine (PSA), then detected by gas chromatography, and quantified by external standard. **Results** The linearities of the three pesticides in apple were good in the concentration range from 0.01–2.0 mg/L ($r^2=0.999$), and the limit of quantification was 10–20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries of three pesticides were in the range of 74%–108%, with relative standard deviations 2.90%–9.55%. **Conclusion** The method has advantages of accurate, rapid and reliable, which can be used to detect the residue of epoxiconazole, prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol in apples.

KEY WORDS: gas chromatography; prochloraz; 2,4,6-trichlorophenol; epoxiconazole; apple

基金项目: 黔科合支撑([2020]1Y175 号)、黔农科院青年基金([2017]16 号)

Fund: Supported by Department of Science and Technology of Guizhou Province ([2020]1Y175 号), and Guizhou Academy of Agricultural Sciences ([2017]16 号)

*通信作者: 段婷婷, 正高级实验师, 主要研究方向为农产品安全、农药残留检测。E-mail: 137829681@qq.com

*Corresponding author: DUNG Ting-Ting, Senior Experimenter, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Jiaxiu Road, Huaxi District, Guiyang 550006, China. E-mail: 137829681@qq.com

0 引言

咪鲜胺(prochloraz)是一种咪唑类广谱杀菌剂,对多种作物由子囊菌和半知菌引起的病害具有明显的防治效果^[1]。咪鲜胺本身生物毒性较低,但其在代谢和降解过程中,最终产物 2,4,6-三氯苯酚(2,4,6-trichlorophenol)是环境中的重要污染物之一,具有一定致癌性^[2-3]。GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[4]中规定,咪鲜胺残留量为咪鲜胺及其含有 2,4,6-三氯苯酚部分的代谢产物之和,以咪鲜胺表示。氟环唑(epoxiconazole)是一种具有防治效果的内吸性三唑类广谱杀菌剂,对禾谷类作物病害(立枯病、白粉病等)有较好的防治效果,同时还能防治花生、油菜、水稻及果树上的病害^[5]。氟环唑在动物体内蓄积性弱,对大鼠急性经口为中等毒性^[6]。我国国内农药使用存在不合理现象较多^[7-10],国家提倡“减施增效”,最大程度降低食品安全隐患,因此研究咪鲜胺及其代谢物和氟环唑在苹果中的农药残留水平对安全生产有重要意义。

目前,农产品中咪鲜胺及其代谢物和氟环唑残留量检测方法主要有超高效液相色谱串联质谱法、气相色谱法及气相色谱串联质谱法等^[11-12],上述方法中咪鲜胺及其代谢物残留分析前处理采用盐酸吡啶及油浴将咪鲜胺全部水解成 2,4,6-三氯苯酚进行检测,操作复杂且使用大量有机溶剂。吴琼等^[13]应用凝胶渗透色谱净化法(gel permeation chromatography, GPC)、气质联用仪对咪鲜胺及其代谢物进行检测,具有较好的回收率和重复性,但使用凝胶渗透色谱净化的前处理方法操作繁琐,不能达到快速检测的目的。张彦军等^[14]将辣椒样品经 1% 乙酸乙腈提取后,以 N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)净化,并利用气相色谱-串联质谱进行检测,结果表明咪鲜胺及其代谢物在线性范围内回收率和相对标准偏差均可达到残留实验要求,该方法便捷、安全、快速,但气相色谱-串联质谱仪造价高昂,不易获得,不适用于样本量较小的低成本检测机构。鉴于此本研究在 QuEChERS 前处理技术的基础上,采用目前较为普及的气相色谱仪作为检测仪器,建立苹果中咪鲜胺及其代谢物和氟环唑残留量的检测方法,可以同时定性、定量分析苹果中 2 种农药混剂残留,为苹果质量和农药的合理使用提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂与仪器

咪鲜胺(纯度 98.8%,北京和力顺科技有限公司);2,4,6-三氯苯酚(纯度 97.1%)、氟环唑标准品(纯度 98.0%)(国

家农药质检中心);乙腈、冰乙酸(分析纯,上海星可高纯溶剂有限公司);氯化钠(分析纯,成都金山化学试剂有限公司);无水硫酸钠(分析纯,天津永大化学试剂有限公司);正己烷(色谱纯,美国天地有限公司);N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)(天津博纳艾杰尔科技有限公司);实验用水为超纯水。

GC-6890N 气相色谱仪、HP-5 色谱柱(30 m×320 μm, 0.25 μm)(安捷伦科技有限公司);FW100 型微型组织粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);TG16 台式高速离心机(长沙迈佳科技有限公司);TG16-II 台式高速离心机(湖南平凡科技有限公司);CK2000 型高通量组织研磨器(北京托摩根生物科技有限公司);SK-1 漩涡混合器(江苏中大生物科技有限公司);HGC-24A 氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司);CP213 电子天平(0.001~200 g,奥豪斯仪器有限公司);BSA224S-CW 电子天平(0.1 mg~220 g,德国 Sartorius 公司);FilterUnit 滤膜(0.22 μm,天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

1.1.2 实验材料

实验所用苹果样品产于安徽。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取 2,4,6-三氯苯酚(0.0108 g)、咪鲜胺(0.0104 g)及氟环唑(0.0103 g)标准品,用正己烷做溶剂,分别配制成浓度为 100 mg/L 的单标储备液各 100 mL,储存于 4 °C 冷藏冰箱中待用,存放时间不超过 6 个月。临用前准确移取适量储备液,用正己烷稀释氟环唑为 1.0、0.5、0.1、0.05、0.01 mg/L 以及 2,4,6-三氯苯酚、咪鲜胺为 2.0、1.0、0.2、0.1、0.02 mg/L 系列浓度的混合标准溶液,准确移取各标准溶液 1.0 mL,用氮气将溶剂吹干,然后准确加入 1.0 mL 苹果空白基质提取液,得到相应系列基质混合标准溶液。

1.2.2 前处理方法

(1)提取

准确称取 10.0 g 苹果匀浆样品于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 1%(V/V)冰乙酸乙腈高速振荡提取 10 min,然后加入 3 g NaCl、2 g 无水 Na₂SO₄ 高速振荡 10 min,以 5000 r/min 离心 5 min。

(2)净化

取 2.0 mL 上清液于装有 150 mg 无水 Na₂SO₄、150 mg PSA 的 2 mL 离心管中,在涡旋仪上匀浆 1 min,以 5000 r/min 离心,准确移取 1.0 mL 上清液氮吹近干,然后用正己烷定容至 1.0 mL,过 0.22 μm 滤膜后待上机检测。

1.2.3 检测方法

气相色谱仪仪器条件:μ-ECD 电子捕获检测器;HP-5 色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm);进样口温度:280 °C;进样模式:不分流进样;进样体积:1.0 μL;载气:氮气;流速:1.3 mL/min;检测器温度:300 °C;程序升温:起始温度 80 °C,以 20 °C/min 升至 230 °C;以 7 °C/min 升至 280 °C,

保持 3 min。

2 结果与分析

2.1 仪器参数的确立

为获得最佳检测条件, 保证目标峰和杂质峰之间互不干扰, 提高方法检出限, 先分别配制 5 mg/L 的咪鲜胺、2,4,6-三氯苯酚和氟环唑单个标准溶液查找目标物的出峰时间, 再配制混合标准溶液进行色谱条件优化。选用安捷伦 HP-5(30 m×0.32 mm, 0.25 μm)毛细管柱, 当进样口温度为 280 °C, 检测器温度为 300 °C时, 在既定的升温程序模式下, 2,4,6-三氯苯酚的保留时间为 6.74 min 左右, 咪鲜胺的保留时间为 16.52 min 左右, 氟环唑的保留时间为 13.82 min 左右。从图 1 可见, 空白苹果基质的杂质峰对 3 个目标物色谱峰无干扰, 且目标峰峰形对称尖锐。

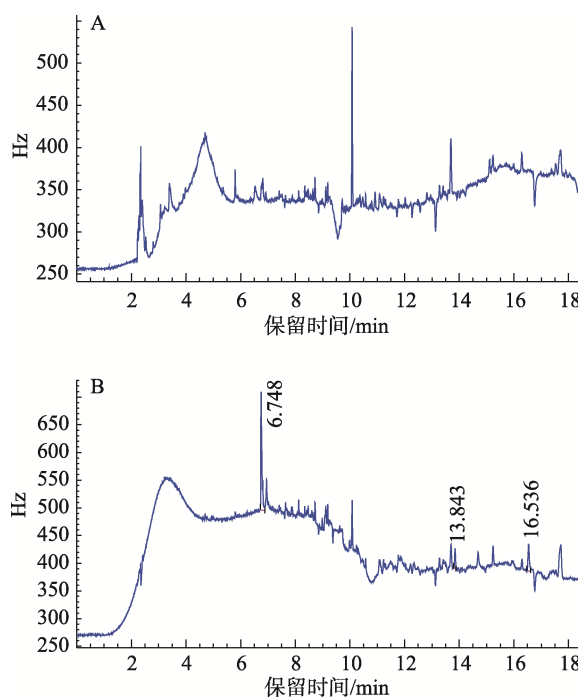
2.2 前处理方法的确定

净化吸附剂有很多种类, 由于苹果作为水果含糖量较高, 提取后呈透明色, 故选用对多糖、氨基酸和色素有强吸附作用的 PSA 即可, 为了保证目标物的保留无需添加其他吸附剂。本实验考察了不同 PSA 用量对净化效率的影响, 以添加水平咪鲜胺及其代谢物为 0.2 mg/kg、氟环唑为 0.1 mg/kg 进行加标回收实验, 根据表 1 结果显示, 净化剂 PSA 的用量对苹果中的目标物的回收率有影响, 其中 PSA 加入量为 150 mg 时回收率较高, 尝试加入 10 mg 石墨化炭黑(graphitized carbon black, GCB)对回收率无明显影响。因此实验最终确定净化剂 PSA 加入量为 150 mg, 可以达到良好的净化效果, 采取上述前处理方法检测单个样品从称取到上机检测约需 0.5~1 h, 相较于传统油浴法节省了大量时间, 且更为安全。

2.3 线性范围和检测限

按上述方法对 3 种农药的苹果基质标准溶液曲线进行测定, 以各农药的峰面积 Y 与对应各农药的进样浓度 $X(\mu\text{g/L})$ 作图, 经最小二乘法拟合得到咪鲜胺及其代谢物和

氟环唑的溶剂标准曲线和苹果基质标准曲线线性方程, 结果表明, 3 种农药的基质标准曲线浓度范围均在 0.01~2.0 mg/L 之间, 相关系数(r^2)均在 0.99 以上。本研究对目标化合物中可能存在的基质效应进行了分析和研究, 采用基质标准曲线斜率和溶剂标准曲线斜率之比(k)来评价基质效应:当 k 在 0.9~1.1 之间时, 基质效应不明显, 当 k 大于 1.1 时为基质增强效应, 小于 0.9 则是基质减弱效应^[15-16]。由表 2 可知, 2,4,6-三氯苯酚和咪鲜胺在苹果基质中表现为基质减弱效应, 氟环唑在苹果基质中表现为基质增强效应。以 2.4 回收率和精密度实验中的最小添加浓度确定苹果中 2,4,6-三氯苯酚、咪鲜胺和氟环唑的定量限分别为 0.02、0.02 mg/kg 及 0.01 mg/kg, 方法灵敏度高。



注: A: 苹果空白色谱图; B: 0.02 mg/L 咪鲜胺及 2,4,6-三氯苯酚、0.01 mg/L 氟环唑在苹果中添加色谱图。

图 1 优化条件后的色谱图

Fig.1 Chromatogram after optimized conditions

表 1 PSA 加入量对苹果中咪鲜胺及其代谢物和氟环唑回收率的影响($n=3$)
Table 1 Impact of PSA addition on recovery of epoxiconazole, prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol($n=3$)

PSA 加入量 /mg	GCB 加入量 /mg	2,4,6-三氯苯酚		咪鲜胺		氟环唑	
		平均回收率/%	相对标准偏差/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
50	0	81	7.52	70	6.24	84	8.15
150	0	87	10.96	76	13.44	87	9.58
200	0	88	5.38	75	7.19	85	7.72
150	10	85	5.11	72	3.68	80	6.65

表 2 3 种农药的线性范围、线性方程、相关系数
Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients(r^2) for three pesticides

名称	基质	线性范围/(mg/L)	线性方程	k 值	相关系数
2,4,6-三氯苯酚	溶剂	0.02~2.0	$Y=35982X-1020.3$	-	0.9992
	苹果	0.02~2.0	$Y=31099X-409.83$	0.86	0.9999
咪鲜胺	溶剂	0.02~2.0	$Y=11380X-189.88$	-	0.9996
	苹果	0.02~2.0	$Y=9530.4X-136.36$	0.84	0.9997
氟环唑	溶剂	0.01~1.0	$Y=5964.8X-55.98$	-	0.9995
	苹果	0.01~1.0	$Y=8385.8X+12.59$	1.40	0.9999

2.4 回收率和精密度

检测方法的准确度、精密度和灵敏度分别用添加回收率、变异系数和最低定量限衡量。根据 GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[4]规定苹果中咪鲜胺及其代谢物的最大残留量(maximum residue limits, MRLs)为 2.0 mg/kg, 氟环唑为 0.5 mg/kg, 本实验设置了 0.02、0.2、2.0 mg/kg 3 个浓度的咪鲜胺和 2,4,6-三氯苯酚添加水平以及 0.01、0.1、0.5 mg/kg 3 个浓度的氟环唑添加水平, 每个浓度设置 5 组重复, 结果见表 3。结果表明, 2,4,6-三氯苯酚在苹果基质中的平均回收率为 74%~88%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.90%~7.64%; 咪鲜胺平均回收率为 87%~108%, RSD 为 7.26%~9.55%; 氟环唑平均回收率为 92%~106%, RSD 为 4.37%~5.76%。各项指标均符合农药残留分析的要求。

表 3 苹果中 3 种农药加标回收率和精密度($n=5$)
Table 3 Recoveries and RSDs of three pesticides in spiked samples of apple($n=5$)

名称	苹果		
	添加水平/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
2,4,6-三氯苯酚	0.02	88	7.64
	0.2	76	6.43
	2.0	74	2.90
咪鲜胺	0.02	95	7.76
	0.2	87	9.55
	2.0	108	7.26
氟环唑	0.01	98	4.37
	0.1	92	5.76
	0.5	106	5.52

2.5 实际样品分析

按 1.2.2 当中的前处理方法对施用过含有咪鲜胺和氟环唑的供试药剂的苹果样品进行分析, 于施药后第 28 d 采

样, 从至少 4 棵果树上采集不少于 12 个果实, 切碎后采取四分法混匀, 制备 2 份平行样品, 每份最终留样 200 g。该样品中氟环唑平均残留量为 0.11 mg/kg, 咪鲜胺及含有 2,4,6-三氯苯酚部分的代谢产物之和平均残留量 0.070 mg/kg, 均低于中国农药最大残留限量苹果中咪鲜胺及其代谢物和氟环唑的 MRLs。

3 结论与讨论

本研究建立了采用乙酸乙腈提取、PSA 净化的 QuEChERS 前处理方法结合气相色谱法快速检测咪鲜胺及其代谢物和氟环唑在苹果中的残留的分析方法。该方法中 3 种目标化合物在对浓度范围之间呈现良好的线性关系, 回收率、变异系数均能满足农药残留分析要求。该方法简单快速, 较传统检测手段更为经济环保, 可操作性强, 能够满足苹果中咪鲜胺及其代谢物 2,4,6-三氯苯酚和氟环唑残留量的快速检测要求。

参考文献

- [1] 刘磊, 李娜, 李辉, 等. 测定葡萄中苯醚甲环唑、己唑醇和咪鲜胺代谢物残留量方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, (17): 4497-4502. LIU L, LI N, LI H, *et al.* Determination of difenoconazole, hexaconazole and prochloraz metabolite residues in grapes [J]. J Food Saf Qual, 2018, (17): 4497-4502.
- [2] 韩丽君, 钱传范, 江才鑫, 等. 气相色谱法测定杀菌剂咪鲜胺及其代谢物在水稻中的残留量[J]. 分析化学, 2005, (7): 1049. HAN LJ, QIAN CF, JIANG CX, *et al.* Determination of prochloraz and the metabolite residues in rice by gas chromatography [J]. Anal Chem, 2005, (7): 1049.
- [3] 姚加加. 30%烯酰吗啉·咪鲜胺悬浮剂在烟草上的残留分析和消解动态研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016. YAO JJ. Residues and dissipation dynamics of 30% dimethomorph·prochloraz suspension in rice field [D]. Guiyang: Guizhou University, 2016.
- [4] GB 2763—2019 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]. GB 2763—2019 National food safety standard-Maximum residue limit for pesticides in food [S].
- [5] 刘良柱, 徐应明, 黄永春, 等. 氟环唑在苹果及土壤中的残留动态研究[J]. 现代科学仪器, 2007, (1): 61-63.

- LIU LZ, XU YM, HUANG YC, *et al.* Residue dynamics of epoxiconazole in apples and soil [J]. *Mod Sci Instr*, 2007, (1): 61-63.
- [6] University of Hertfordshire. Pesticide properties data base [EB/OL]. [2020-11-24]. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/267.htm>
- [7] 方丽萍, 杜红霞, 李瑞菊, 等. 丙环唑、氟环唑在苹果中的残留及风险评估[J]. *山东农业科学*, 2015, 47(9): 127-131.
- FANG LP, DU HX, LI RJ, *et al.* Residue and risk assessment of propiconazole and epoxiconazole in apple [J]. *Shandong Agric Sci*, 2015, 47(9): 127-131.
- [8] 杨桂玲, 陆剑飞, 寿林飞, 等. 浙江省杨梅质量安全现状与风险隐患及对策[J]. *农产品质量与安全*, 2013, (1): 20-22.
- YANG GL, LU JF, SHOU LF, *et al.* Quality, safety status and risk assessment and countermeasures of waxberry in Zhejiang province [J]. *Qual Saf Agro-prod*, 2013, (1): 20-22.
- [9] 范定涛. 遵义市重点产茶区茶叶质量安全风险评估[J]. *农产品质量与安全*, 2018, (6): 23-29.
- FAN DT. The risk assessment of quality and safety in tea of key areas in Zunyi [J]. *Qual Saf Agro-prod*, 2018, (6): 23-29.
- [10] 解迎双, 张欢, 王溪桥, 等. 甘肃省出口苹果中农药残留风险性评价[J]. *农产品加工*, 2020, (6): 39-44.
- XIE YS, ZHANG H, WANG XQ, *et al.* Risk assessment of pesticide residues in apples exported from Gansu province [J]. *Food Prod Process*, 2020, (6): 39-44.
- [11] 范玉, 田迎迎, 刘新刚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)快速检测小麦和土壤中氟环唑的残留及消解[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(1): 197-202.
- FAN Y, TIAN YY, LIU XG, *et al.* Determination of epoxiconazole in wheat and soil using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2013, 32(1): 197-202.
- [12] 翟淑华, 张爱娟, 刘伟. 葡萄与土壤中咪鲜胺及其代谢物的残留分析[J]. *农药*, 2012, 51(10): 748-749, 757.
- ZHAI SH, ZHANG AJ, LIU W. Residue analysis of prochloraz and its metabolites in grapes and soil [J]. *Agrochemicals*, 2012, 51(10): 748-749, 757.
- [13] 吴琼, 吕岱竹, 韩丙军, 等. 咪鲜胺及 2,4,6-三氯苯酚在牛奶中的残留检测方法[J]. *山西农业科学*, 2017, 45(6): 937-939, 948.
- WU Q, LV DZ, HAN BJ, *et al.* Determination of prochloraz and 2, 4, 6-trichlorophenol residues in milk [J]. *Shanxi Agric Sci*, 2017, 45(6): 937-939, 948.
- [14] 张彦军, 洪霞, 钱滢文, 等. QuEChERS-气相色谱质谱联用法测定辣椒中的咪鲜胺及 2,4,6-三氯苯酚残留量[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(16): 95-99.
- ZHANG YJ, HONG X, QIAN YW, *et al.* Determination of prochloraz and 2, 4, 6-trichlorophenol in pepper using QuEChERS-Gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(16): 95-99.
- [15] MATUSZEWSKI BK, CONSTANZER ML, CHAVEZENG M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. *Anal Chem*, 2019, 40(16): 95-99.
- [16] 龙家寰, 杨利玉, 张盈, 等. 水稻中丙炔草酮、西草净和丁草胺的残留检测分析方法[J]. *农药*, 2020, 59(2): 122-126.
- LONG JH, YANG LY, ZHANG Y, *et al.* Determination of oxadiargyl, simetryn and butachlor residues in rice plant [J]. *Agrochemicals*, 2020, 59(2): 122-126.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

龙家寰, 助理研究员, 主要研究方向为农药残留检验检测。

E-mail: 188104985@qq.com

段婷婷, 正高级实验师, 主要研究方向为农产品安全、农药残留检测。

E-mail: 137829681@qq.com