

牛鹏飞, 申远, 李帅, 等. 苹果中福美肿残留的 RP-HPLC 检测[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3): 706-710.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.033

苹果中福美肿残留的 RP-HPLC 检测

牛鹏飞, 申远, 李帅, 郭玉蓉

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 为定量检测苹果中福美肿残留, 建立一种基于紫外检测器的反相高效液相色谱检测方法。以苯为溶剂, 震荡萃取苹果中福美肿, 采用 C_{18} 色谱柱 (250.0 mm×4.6 mm ID, 5.0 μ m), 以 0.10% 三氟乙酸水溶液为溶剂配制乙腈含量为 10% 溶液作为 A 相, 100.00% 乙腈为 B 相 (A 相 : B 相 = 60 : 40, 体积比), 在流速 1.00 ml/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 波长 247 nm 条件下进行福美肿色谱分析。结果表明, 福美肿的加标回收率为 76.56%~100.22%, 变异系数 (CV) 为 4.86%~7.51%, 检出限 (LOD) 为 0.295 3 mg/kg, 定量限 (LOQ) 为 1.206 7 mg/kg。该方法可用于苹果中福美肿残留检测。

关键词: RP-HPLC 检测; 福美肿; 苹果

中图分类号: X836 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)03-0706-05

Determination of residual asomate in apple by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

NIU Peng-fei, SHEN Yuan, LI Shuai, GUO Yu-rong

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: A reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) separation method with ultraviolet detector was developed to determine the residual asomate in apple. Using benzene as solvent, the asomate in apple was extracted. The asomate was determined by RP-HPLC using C_{18} (250.0 mm×4.6 mm ID, 5.0 μ m) column and mobile phase consisting of A and B in the ratio of 60 : 40 (V/V) with a flow rate of 1.00 ml/min at 30 $^{\circ}$ C in 247 nm. A was 0.10% trifluoroacetic acid aqueous solution-acetonitrile, B was 100.00% acetonitrile. The results showed that spiked recovery rate of asomate ranged from 76.56% to 100.22%, and coefficient of variation (CV) ranged from 4.86% to 7.51%. The limit of detection (LOD) was 0.295 3 mg/kg, and the limit of quantification (LOQ) was 1.206 7 mg/kg in apple. This method can be successfully used to measure residual asomate in apple.

Key words: reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) determination; asomate; apple

福美肿是一种二硫代氨基甲酸酯类杀菌剂, 化学名称为三-N-二甲基二硫代氨基甲酸肿。其抗菌

性强并且具有持效期长, 在树皮死组织部位渗透力强的特点, 对多种农作物的多种病害均有防治效果, 尤其对苹果腐烂病有较好的防治作用^[1-2], 因此曾有比较广泛的使用, 尤其是在北方果树生产上有广泛应用^[2]。福美肿为中等毒性, 可通过呼吸道、胃肠道和皮肤吸收, 排泄出体外的过程长, 还会在体内转化成毒性可能更大的无机三价砷及其衍生物, 产生无机砷中毒症状, 对皮肤、粘膜亦有刺激作用, 一旦发生福美肿中毒, 其诊断、治疗均较困难^[3]。由

收稿日期: 2017-11-28

基金项目: 农业部苹果产业技术体系项目 (NYCYTX-08)

作者简介: 牛鹏飞 (1982-), 男, 陕西户县人, 博士研究生, 实验师, 研究方向为食品安全及检测技术。(Tel) 029-85310598; (E-mail) niupf0406@163.com

通讯作者: 郭玉蓉, (Tel) 029-85310471; (E-mail) guoyurong730@163.com

于在果园中使用福美肿,造成果树、环境甚至生态系统严重污染^[4-5],因此早在 2007 年以前,中国就已禁止砷制剂在果树生产中的使用^[6]。但在 2012 年,有媒体报道,在中国某苹果主产区,一种无任何标志、小作坊式生产的药袋被部分果农使用,这种药袋内部涂布福美肿和退菌特,并包裹在幼果上直至其成熟,而对于苹果中是否确实存在福美肿和退菌特,国内多家检测机构都表示无法检测。中国作为世界上最大的水果、蔬菜生产国和主要的出口国^[7],中国苹果的出口对全球苹果市场影响巨大^[8]，“药袋”事件对中国苹果产业产生的国际负面影响不容忽视。福美肿作为“药袋事件”的元凶之一,理应受到严格的监管。但目前国际上福美肿的药物残留检测尚属空白,因此福美肿残留检测方法的建立,尤其是确定苹果中福美肿残留的检测方法成为保证苹果产业安全的首要任务。国际上,二硫代氨基甲酸酯类农药的检测方法有 GC 法^[9]、GC-MS 法^[10]、HPLC-MS 法^[11-13]、酶联免疫吸附剂测定法^[14]以及衍生化结合 HPLC 法^[15],但上述方法均未涉及福美肿的检测。在国内,二硫代氨基甲酸酯类农药的检测多采用测定 CS₂含量的间接方法,即检测二硫代氨基甲酸根酸性水解释放出的 CS₂量^[16]。但因二硫代氨基甲酸酯类农药种类很多,酸性水解都会产生 CS₂,检测时无法区分 CS₂来源,因此无法定量检测福美肿^[17]。而检测食品中总砷^[18-19]、无机砷^[18-21]和有机砷^[22]的方法也都无法准确定量福美肿的残留量。目前,福美肿残留的定量检测仍是一个空白,国内外均无此类报道。本研究以此为切入点,拟建立苹果中福美肿残留的快速检测方法,解决苹果中福美肿无法定量检测的难题,以保障中国苹果产业健康发展。

1 材料与方 法

1.1 材 料

市售无公害鲜苹果

1.2 试 剂

福美肿标准品(纯度≥99.0%)购自河北冠龙农化有限公司,乙腈(色谱纯)购自美国 Fisher 公司,三氟乙酸(分析纯)购自上海科丰化学试剂有限公司,苯(分析纯)购自天津天力化学试剂有限公司,试验用水为超纯水。

1.3 标准品储备液制备

准确称取福美肿标准品 53.1 mg,乙腈溶解、定容至 100 ml 容量瓶,制成浓度为 531 mg/L 的福美肿标准储备液,置于冰箱中 4 ℃ 备用。

1.4 仪 器

高效液相色谱系统:P680 型泵(在线脱气机,梯度混合器及 20 μl 定量环)和 UVD 170U 型紫外检测器,美国 DIONEX 公司产品;Diamondsil™ 型二代 C₁₈ 色谱分析柱(250.0 mm×4.6 mm ID, 5.0 μm),DIKMA 有限公司产品;AT-330 型柱温箱,天津奥特赛恩斯仪器有限公司产品;U-3010 型紫外/可见分光光度计,日本 HITACHI 公司产品;DN-12A 氮气吹干仪,天津市东康科技有限公司产品;FW400A 高速万能粉碎机,北京科伟永兴仪器有限公司产品;SHZ-III 型循环水真空泵,上海亚荣生化仪器厂产品;AL204 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品。

1.5 色 谱 条 件

流速:1.0 ml/min,进样体积:20 μl,检测波长:247 nm,柱温:30 ℃,流动相:以 0.1% 三氟乙酸水溶液为溶剂配制乙腈含量为 10% 溶液作为 A 相,100% 乙腈为 B 相(A 相:B 相=60:40,体积比)。

1.6 样 品 的 前 处 理

苹果去梗,保留整果,高速粉碎成果泥状。准确称取 10.0 g 苹果泥置于 100 ml 磨口三角烧瓶中,加入 20 ml 苯,剧烈震荡提取 30 min,静止 5 min,取上清萃取液,重复萃取 4 次,合并萃取上清液于 100 ml 容量瓶中,用乙腈定容,充分摇匀,取 10 ml 萃取液,氮气吹干,用 2 ml 乙腈复溶,过 0.45 μm 有机滤膜,待分析。

1.7 标准溶液的色谱分离及检测系统稳定性的考察

采用方法 1.5 的色谱条件,对福美肿标准溶液进行分离和检测,同时对适当浓度的标准溶液连续进样 3 次,以峰系数(保留时间、峰值和峰面积)变异系数(CV)考察 HPLC 系统以及分析方法运行的日内稳定性。同时对保留时间的日间精密度(1 d 进样 2 次,共进样 3 d)进行分析,以 CV 评价色谱系统以及方法的日间稳定性。

1.8 标准曲线的建立

分别取福美肿标准品储备液 1 ml、2 ml、4 ml、6 ml、8 ml、10 ml 于 6 只 100 ml 容量瓶中,乙腈定容,过 0.45 μm 微孔有机滤膜,按方法 1.5 的色谱条件

进行测定,以峰面积对浓度进行线性回归。

1.9 检出限、定量限的测定

在同一批样品中添加不同浓度的福美肿标准品溶液,对样品进行处理,按方法 1.5 的色谱条件进行检测。

1.10 加标回收率的测定

在同一苹果样品中添加不同体积的福美肿标准品溶液,按方法 1.6 的方法进行处理,按方法 1.5 的色谱条件进行检测(重复 5 次),以评价样品前处理对福美肿回收率的影响。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

以乙腈为空白溶液,对浓度为 5.31 mg/L 福美肿标准品储备溶液进行紫外全波长扫描(图 1),试验结果表明,福美肿的最大吸光度在 247 nm 处。

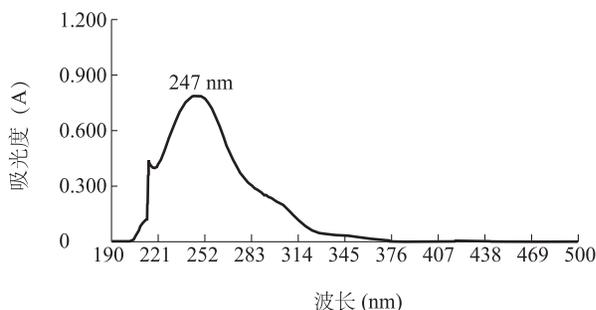


图 1 福美肿标准溶液的紫外扫描光谱图

Fig.1 Ultraviolet scanning spectra of standard solution of asomate

2.2 福美肿的分离

在相同的色谱条件下,对同一浓度的福美肿标准品溶液连续进样 3 次,记录保留时间、峰值以及峰面积值。如表 1 所示,福美肿保留时间、峰值以及峰面积的 CV ($n=3$) 均小于 2%,其中保留时间的日精密度 CV ($n=3$) 为 0.16%。由此可见,仪器和方法的稳定性均比较好。

表 1 福美肿检测系统的稳定性

Table 1 The stability of detection system of asomate

福美肿峰参数	保留时间 (min)	峰值 (mAU)	峰面积 (mAU×min)
一次进样	10.681	64.00	20.169 8
二次进样	10.682	65.19	20.227 5
三次进样	10.651	65.57	20.260 7
变异系数 (%)	0.16	1.26	0.22

连续进样 6 次(1 d 2 次,共 3 d),考察福美肿保留时间、峰值以及峰面积的日间精密度。如表 2 所示,福美肿保留时间、峰值和峰面积的日间精密度 CV 均小于 1%,表明仪器和方法的日间精密度可以满足检测要求。

表 2 福美肿检测方法的日间精密度

Table 2 The inter-day precision of determination method of asomate

进样次序	保留时间 (min)	峰值 (mAU)	峰面积 (mAU×min)
1	10.681	64.00	20.169 8
2	10.662	65.19	20.227 5
3	10.759	64.28	20.245 1
4	10.514	64.52	20.217 8
5	10.553	64.36	20.166 2
6	10.662	64.98	20.392 4

2.3 福美肿标准曲线

如图 2 所示,福美肿浓度与峰面积呈现良好的线性关系, $Y=0.378 0x-0.123 2$, $R^2=0.999 7$,线性范围:5.31 mg/L 至 53.1 mg/L。其中, Y 为福美肿的峰面积 (mAU·min); x 为福美肿质量浓度 (mg/L)。因此,用峰面积定量法对福美肿进行定量分析是可行的。

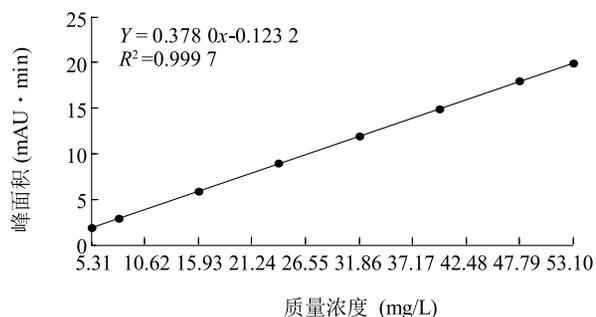


图 2 福美肿标准曲线

Fig.2 The standard curve of asomate

2.4 福美肿检测限

以 $S/N=3$ 定为检出限 (LOD),以 $S/N=10$ 定为定量限 (LOQ),测定苹果中福美肿的 LOD 为 0.295 3 mg/kg, LOQ 为 1.206 7 mg/kg。

2.5 福美肿加标回收率

按方法 1.10 的方法,在苹果样品中加入适当体积的福美肿标准品溶液后进行色谱分析。如图 3、

图 4 和图 5 所示,福美肿得到了良好的分离与检测。

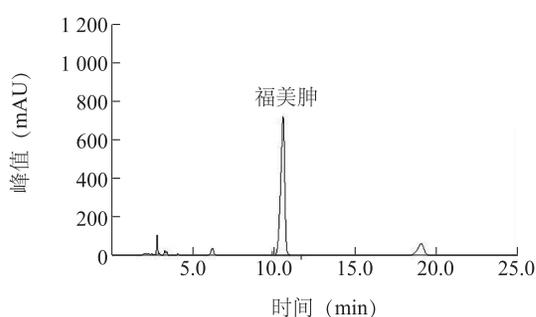


图 3 福美肿标准溶液的色谱图

Fig.3 The chromatogram of standard solution of asomate

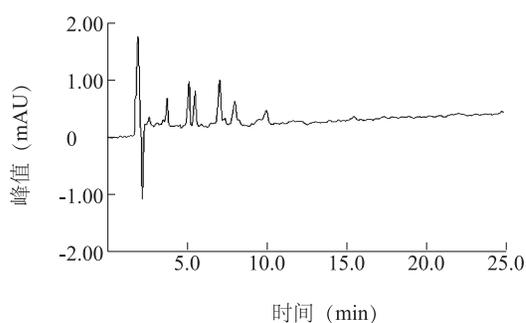


图 4 苹果空白样品色谱图

Fig.4 The chromatogram of blank apple sample

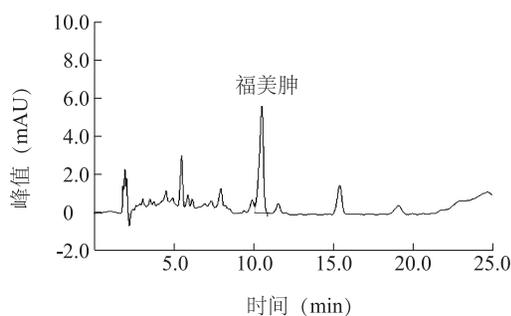


图 5 添加福美肿的苹果样品色谱图

Fig.5 The chromatogram of apple sample with asomate

参考福美双和福美锌在水果中的残留限量^[12],在苹果样品中添加不同剂量的福美肿标准品,进行色谱分析,计算其加标回收率。如表 3 所示,福美肿的加标回收率为 76.56%~100.22%,变异系数(CV)为 4.86%~7.51%。因此,该色谱分析方法对于苹果中福美肿残留的分析是准确、可靠的。

3 结论

本研究建立了定量检测苹果中福美肿残留的 RP-HPLC 方法。该方法在准确度、精密度以及回收率等方面均能满足国家对农药残留分析质量控制要求^[23],可以用于苹果中福美肿残留检测。

表 3 苹果样品中福美肿加标回收率(n=5)

Table 3 Spiked recovery rate of asomate in apple (n=5)

加标质量比 (mg/kg)	回收率 (%)		变异系数 (%)
0.51	77.65	82.15	4.86
5.02	82.96	90.25	7.51
50.05	76.56	79.89	6.52

参考文献:

- [1] 李庚飞,赵金龙. 苹果树腐烂病的药剂防治研究[J]. 渭南师范学院学报,2012,27(2):67-70.
- [2] 曹克强,国立耘,李保华,等. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查[J]. 植物保护,2009,35(2):114-116.
- [3] 陆翊平,刘建昌,修杰,等. 造纸厂工人农药中毒误诊及误报的教训[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2001,19(4):314.
- [4] 赵政阳,张翠花,梁俊,等. 施用农药福美肿对苹果果园砷污染的研究[J]. 园艺学报,2007,34(5):1117-1122.
- [5] MARGNI M, ROSSIER D, CRETTEZ P, et al. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems[J]. Ag-

riculture, Ecosystems & Environment, 2002,93(1):379-392.

- [6] 袁云香. 苹果树腐烂病的药物防治综述[J]. 吉林农业科学, 2012,37(5):48-51.
- [7] BLANKE M. Fruit consumption in China-Prices, sources and production[J]. Erwerbs-Obstbau,2011, 53(3): 93-98.
- [8] GOETZ L, GRETHE H. The entry price system for fresh fruit and vegetable export from China to China to the EU - Breaking a fly on the Wheel? [J]. China Economic Review,2010,21(3):377-393.
- [9] 秦曙,乔雄梧,王霞,等.气相色谱法检测 22 种基质中的 4 种二硫代氨基甲酸盐类农药残留[J]. 色谱,2010, 28(12): 1162-1167.
- [10] VRYZAS Z, PAPADAKIS E N, PAPADOPOULOU MOURKIDOU

- E. Microwave-assisted extraction (MAE)-acid hydrolysis of dithiocarbamates for trace analysis in tobacco and peaches.[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2002, 50(8):2220-2226.
- [11] FILIPE O M, SANTOS S A, DOMINGUES M R, et al. Photodegradation of the fungicide thiram in aqueous solutions. Kinetic studies and identification of the photodegradation products by HPLC-MS/MS[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(7):993-1001.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中华人民共和国农业部, 国家食品药品监督管理总局. 食品中农药最大残留限量:GB 2763—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口茶叶中二硫代氨基甲酸酯(盐)类农药残留量的检测方法液相色谱-质谱/质谱法:SN/T0711-2011[S].北京:中国标准出版社,2012.
- [14] QUEFFELEC A L, BOISDE F, LARUE J P, et al. Development of an Immunoassay (ELISA) for the Quantification of Thiram in Lettuce[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001, 49: 1675-1680.
- [15] FERNÁNDEZ O L, OTERO R R, BARREIRO C G, et al. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134 (1): 366 -374.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口茶叶中二硫代氨基甲酸酯总残留量检测方法:SN/T1541-2005[S].北京:中国标准出版社,2006.
- [17] VUIK J, DINTER R V, VOS R H. Improved sample pretreatment of the carbon disulfide evolution method for the determination of dithiocarbamate residues in lettuce[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40:604-606.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中总砷及无机砷的测定:GB/T5009.11-2014 [S].北京:中国标准出版社,2015.
- [19] IOANNIS N P, NIKOLAOS S T, EFROSINI A P. Determination of total arsenic, total inorganic arsenic and inorganic arsenic species in rice and rice flour by electrothermal atomic absorption spectrometry[J]. *Microchemical Journal*, 2013, 108: 1-6.
- [20] 陈少波,余雯静,赵玉兰. 食品中砷形态分析及无机砷测定[J]. *农产品加工(学刊)*, 2013(4):80-86.
- [21] LI X, WANG Z H. Determination of inorganic arsenic species by electrochemical hydride generation atomic absorption spectrometry with selective electrochemical reduction [J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2007, 25(3): 295-299.
- [22] WANG P L, ZHAO G L, TIAN J, et al. High-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry based method for the determination of organic arsenic feed additives and speciation of anionic arsenics in animal feed[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (9):5263-5270.
- [23] 国家质量监督检验检疫总局.国家质量监督检验检疫总局关于印发《残留分析质量控制指南》的通知[EB/OL]. (2002-03-19) [2017-9-28]. <http://www.chinalawedu.com/falvfagui/fg22016/40970.shtml>.

(责任编辑:姜华珏)