

土壤及番茄中嘧肽霉素残留分析方法研究

魏 凤¹, 杨仁斌^{1*}, 蒋 波², 傅 强³, 周 焱¹

(1. 湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128; 2. 湘乡市环境保护局, 湖南 湘乡 411400; 3. 湖南化工研究院, 长沙 410128)

摘 要: 通过探索不同提取方法和提取剂对嘧肽霉素在土壤中的提取效果以及不同萃取剂和层析柱对嘧肽霉素在番茄中的净化效果, 建立了高效液相色谱法检测嘧肽霉素在土壤及番茄中的残留分析方法。土壤中的嘧肽霉素采用甲醇-水(3/7, V/V)直接振荡-超声提取; 番茄中的嘧肽霉素先采用甲醇匀质提取, 提取液经二氯甲烷萃取, 再经硅胶层析柱净化, 高效液相色谱检测分析。试验结果表明: 当嘧肽霉素在土壤、番茄中的添加浓度分别为 0.05~1.00 mg·kg⁻¹、0.5~5.00 mg·kg⁻¹ 时, 平均添加回收率分别为 87.00%~94.31%、89.96%~107.45%, 变异系数分别为 1.07%~3.98%、4.66%~9.12%, 最低检测浓度分别为 0.03 mg·kg⁻¹、0.1 mg·kg⁻¹。对湖南、广州、浙江两年三地的部分样品重复分析可知, 该分析方法在土壤中嘧肽霉素的测定变异系数为 1.88%~4.56%, 在番茄中嘧肽霉素的测定变异系数为 3.52%~4.10%。该分析方法均符合农药残留分析方法的检测要求。

关键词: 嘧肽霉素; 分析方法; 土壤; 番茄; 高效液相色谱

中图分类号: X592 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)02-0404-05 doi:10.11654/jaes.2014.02.027

Analysis of Cytosinepeptidomycin in Soil and Tomato

WEI Feng¹, YANG Ren-bin^{1*}, JIANG Bo², FU Qiang³, ZHOU Yan¹

(1. College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Xiangxiang Environmental Protection Agency, Xiangxiang 411400, China; 3. Hunan Research Institute of Chemical Industry, Changsha 410128, China)

Abstract: An analytical method of high performance liquid chromatography (HPLC) was developed to detect residues of cytosinepeptidomycin in soil and tomato through examining the effects of different extractants and extracting methods on extraction efficiency of cytosinepeptidomycin in soil and the effects of different extracting solvents and column chromatography on cytosinepeptidomycin extraction from tomato. Cytosinepeptidomycin in soil was extracted by the mixture of methanol and water (3/7, V/V), and detected by HPLC, while that in tomato was extracted by methanol, and further by methylene-chloride. The extracts were then purified with silica gel column and detected by HPLC. The average recoveries of cytosinepeptidomycin ranged from 87.00% to 94.31% and 89.96% to 107.45%, with the coefficient of variation from 1.07% to 3.98% and 4.66% to 9.12%, for soil at 0.05~1.00 mg·kg⁻¹ and tomato at 0.5~5.00 mg·kg⁻¹, respectively. The minimum detectable concentrations were 0.03 mg·kg⁻¹ for soil and 0.1 mg·kg⁻¹ for tomato. The method developed in the current study meets the requirements of detecting pesticide residue in soil and plant.

Keywords: cytosinepeptidomycin; analysis method; soil; tomato; HPLC

嘧肽霉素, 英文名为 Cytosinepeptidomycin, 化学名称: 6-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4,5-二羟基-3-(3-羟基-2-(2-(甲)乙酰氨基)丙酰胺)-四氢-2H-吡喃-2-酰胺^[1]。该农药是近年来由沈阳农业大学研发的一种抗病毒生物农药, 属胞嘧啶核苷类新型抗

病毒制剂, 对植株上的病毒病具有一定的防治作用^[2]。嘧肽霉素可以提高番茄、辣椒和烟草等多种植物抗病毒的能力, 对病毒病害具有良好的防治效果, 并且与环境有好的相容性^[3]。

目前, 国外还没有关于嘧肽霉素残留检测方法的报道。国内对嘧肽霉素的研究主要集中在生产、抗病机理及其抗生组分等方面, 如吴元华等^[4]对新型农药嘧肽霉素进行了研究, 王艳红等^[2]研究了嘧肽霉素抗病毒活性成分, 穆凌霄等^[5]应用高效液相色谱法分析了嘧肽霉素发酵液抗真菌组分。关于其在环境介质中

收稿日期: 2013-07-12

基金项目: 农业部农药残留基金项目(NC2011F097)

作者简介: 魏 凤(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境污染治理。E-mail: weifeng198904@163.com

* 通信作者: 杨仁斌 E-mail: yrb4806@163.com

的残留量检测方法报道甚少,李小芳等^[6]采用乙腈和水提取、PEP-SPE 固相萃取柱净化,HPLC 测定了嘧肽霉素在烟叶及土壤中的残留降解。嘧肽霉素在番茄中的残留检测方法未见报道。因此,本文对嘧肽霉素在番茄及土壤中的残留量检测分析方法进行系统研究,旨在为其使用后的环境行为及残留降解规律研究提供科学的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪(岛津-LC-20 AT 型,带紫外检测器和 LCsolution 化学工作站)、匀浆机 (HYD-6528)、旋转蒸发仪(RE-2000)、低温冷却液循环泵(DLSB-5 L/25)、具塞磨口三角瓶等实验室常用玻璃仪器。

1.2 试剂

嘧肽霉素标准品(纯度 99.0%,农业部农药检定所提供),娃哈哈饮用纯净水、蒸馏水,甲醇(色谱纯)和二氯甲烷、甲醇、石油醚(均为分析纯),硅胶(100~200 目)。

嘧肽霉素标准液的配制:准确称取嘧肽霉素标准品 0.025 g(精确至 0.000 2 g)于 50 mL 棕色容量瓶中,用色谱纯甲醇和纯净水混合液(1/4, V/V)溶解并稀释至刻度,贮存于冰箱中,备用。

1.3 样品预处理

土壤样品:将采集的土壤样品中的碎石、杂草等去除,充分混匀后过 20 目筛,采用四分法将样品装入封口样品容器中,并贴好标签。

番茄样品:将采摘的番茄样品沿纵向均匀地切成四瓣,收集不相邻的两瓣进行匀浆机匀浆,把样品装入封口样品容器中,并贴好标签。

1.4 色谱条件

色谱柱 Inertsil ODS-SP 5 μm 4.6 $\times$ 250 mm; 流动相为甲醇-水(1/24, V/V);流速:0.7 mL $\cdot$ min⁻¹;检测波长 250 nm;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 20 μL 。

1.5 分析方法

1.5.1 嘧肽霉素在土壤中的测定方法

准确称取已制备好的嘧肽霉素土壤样品 20 g(精确至 ± 0.1 g)于 250 mL 具塞三角瓶中,加入 50 mL 甲醇和蒸馏水的混合液(3/7, V/V),恒温振荡器振荡 1 h,超声提取 10 min,经布氏漏斗减压抽滤,将滤液无损失地全部转入 250 mL 具塞三角瓶中,在旋转蒸发仪上(80 $^{\circ}\text{C}$)浓缩至近干,用色谱纯甲醇和纯净水的混

合液(3/7, V/V)定容到 5 mL,过 0.45 μm 无机膜,待 HPLC 测定。

1.5.2 嘧肽霉素在番茄中的测定方法

准确称取已制备好的嘧肽霉素番茄样品 20 g(精确至 ± 0.1 g)于 250 mL 具塞三角瓶中,加入 60 mL 甲醇,高速匀质提取 1 min,经布氏漏斗减压抽滤,将滤液无损失地转入至 500 mL 分液漏斗中,用二氯甲烷 60、50、40 mL 萃取 3 次,弃去二氯甲烷相,取下层水相在旋转蒸发仪上(80 $^{\circ}\text{C}$)浓缩至近干,待硅胶柱净化。

1.5.3 净化

待净化的番茄提取液:加 10 mL 蒸馏水溶解并定量转移 1/10 至已制备好的硅胶层析柱(从下至上依次装填有少许脱脂棉、6 g 硅胶,在硅胶层析柱装好后,先用 20 mL 石油醚预淋洗,再用 5 mL 分析纯甲醇预淋洗),用 20 mL 蒸馏水洗脱液淋洗,收集全部洗脱液,于旋转蒸发仪上(80 $^{\circ}\text{C}$)浓缩至近干,用色谱纯甲醇和纯净水的混合液(3/7, V/V)定容到 5 mL,过 0.45 μm 无机膜,待 HPLC 测定。

1.6 检测

按照 1.4 中所述色谱条件对土壤和番茄待测样品进行检测,并计算其残留量和添加回收率。

2 结果与讨论

2.1 土样前处理方法

2.1.1 提取剂的选择

本研究比较了 50 mL 甲醇和蒸馏水的混合液(3/7, V/V),乙腈和蒸馏水的混合液(3/7, V/V),丙酮和蒸馏水的混合液(3/7, V/V)的提取效果,每个处理设置三个平行,在 1.4 所述的色谱条件下对样品进行测定并对其提取效果进行了比较。不同提取剂对土样中嘧肽霉素的添加回收率如表 1 所示。

由表 1 可知:丙酮和蒸馏水混合液的平均回收率最低,为 51.76%;甲醇和蒸馏水混合液与乙腈和蒸馏水混合液的提取效率较高,平均回收率为 86.74%、82.60%,考虑到乙腈的毒性相对较大,试验费用比甲

表 1 不同提取剂提取土样中嘧肽霉素的回收率($n=3$)

Table 1 Recovery of cytosinepeptidomycin extracted from soil by different extracting solvents

提取剂	平均回收率/%	标准偏差	CV/%
甲醇和蒸馏水的混合液(3/7, V/V)	86.74	1.24	1.43
乙腈和蒸馏水的混合液(3/7, V/V)	82.60	2.23	2.70
丙酮和蒸馏水的混合液(3/7, V/V)	51.76	6.92	13.38

醇高。因此,本研究选择甲醇-水(3/7, V/V)混合液作为提取剂。

2.1.2 提取方式的选择

本研究考察了振荡(1.5 h)提取、超声(15 min)提取和振荡(1 h)-超声(10 min)提取的提取效果。准确称取土壤样品 20 g(精确至 ± 0.1 g),加入 50 mL 甲醇-水(3/7, V/V)混合液提取剂,分别采取 3 种不同提取方式进行提取,每个处理设置三个平行,在 1.4 所述的色谱条件下对样品进行测定。结果表明:振荡提取和超声提取的平均回收率均较低,分别为 72.31%、68.14%;振荡-超声协同提取的平均回收率为 93.37%,农药色谱峰没有受到杂质干扰,如图 1 所示。因此,选用振荡-超声提取作为土壤中嘧肽霉素提取方法。

2.2 番茄样品前处理方法

2.2.1 萃取剂的比较

嘧肽霉素属于水溶性农药,基本不溶于一般有机试剂,而番茄汁中含有大量有机干扰物,根据相似相溶原理,研究各采用 60、50、40 mL 乙酸乙酯、二氯甲烷和三氯甲烷三种有机试剂萃取干扰物,萃取后弃有机相层,将水相层进行浓缩净化,分析比较不同萃取剂去除干扰物的效果。结果显示:用乙酸乙酯去除效果不明显,含有较大的杂质峰干扰目标峰;用二氯甲烷和三氯甲烷都可以去除一部分对目标峰干扰较强的干扰性物质,但由于三氯甲烷比二氯甲烷毒性大,确定采用二氯甲烷作为萃取剂。

2.2.2 层析柱的选择

将已制备好的含有目标物的浓缩液分别转移至中性氧化铝层析柱、硅镁吸附剂层析柱、硅胶吸附剂层析柱中,采用 20 mL 洗脱液淋洗,收集全部洗脱液,于旋转蒸发仪上(80 $^{\circ}\text{C}$)浓缩至近干,用色谱纯甲醇

和纯净水的混合液(3/7, V/V)定容到 5 mL,过 0.45 μm 无机膜,在 1.4 所述的色谱条件下对样品进行测定。检测结果表明:采用中性氧化铝层析柱净化含有目标物的番茄浓缩液时,杂质与目标物均被吸附,未检测到目标峰;用硅镁吸附剂和硅胶吸附剂净化浓缩液时,浓缩液中的大部分杂质已被吸附在层析柱中,与目标物分离效果好。但采用硅镁吸附剂对浓缩液净化时,目标物的平均回收率较低,为 57.74%,而用硅胶吸附剂对浓缩液净化时,目标物的回收率达 96.17%,且目标物与杂质的分离效果相对较好,分析方法可达到农药残留检测与分析的要求,如图 2 所示。因此,选用硅胶吸附剂层析柱作为层析净化柱。

2.3 方法的线性范围

采用外标法定量。用色谱纯甲醇和纯净水的混合液(3/7, V/V)梯度稀释嘧肽霉素的标准溶液,得质量浓度为 0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的工作液;在 1.4 所述色谱条件下,分别测定。以工作液质量浓度为横坐标、相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线图,线性方程为

$$y=48\ 895x-1\ 042.1(r^2=0.999\ 6)$$

线性方程表明嘧肽霉素在 0.05~5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内呈现出良好的线性关系,见图 3。

2.4 方法的回收率、精密度和检出限

2.4.1 土样中嘧肽霉素分析方法的回收率与精密度

于土壤空白样品中添加一定体积的嘧肽霉素工作液,使其添加浓度分别为 0.05、0.50、1.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每个添加浓度设 5 个平行,按 1.5.1 所述的分析方法进行样品的前处理操作,处理后的样品在 1.4 所述的色谱条件下进行测定。添加回收率见表 2。

由表 2 知,嘧肽霉素 3 个添加浓度的平均添加回收率在 87.00%~94.31%之间、变异系数在 1.07%~

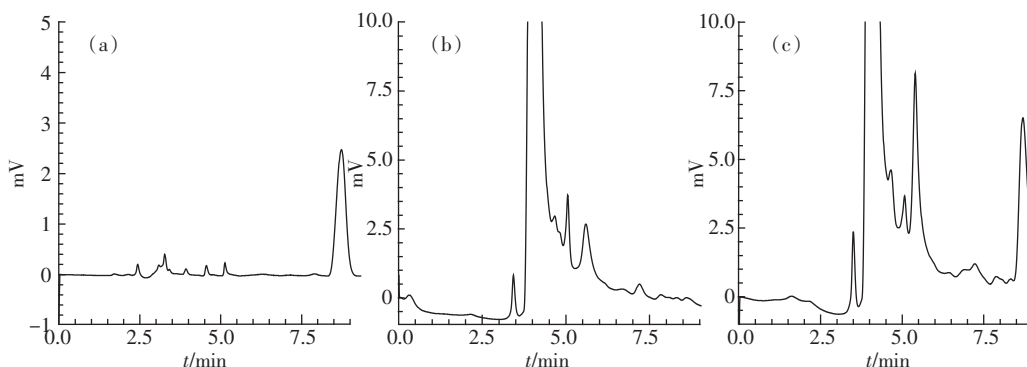
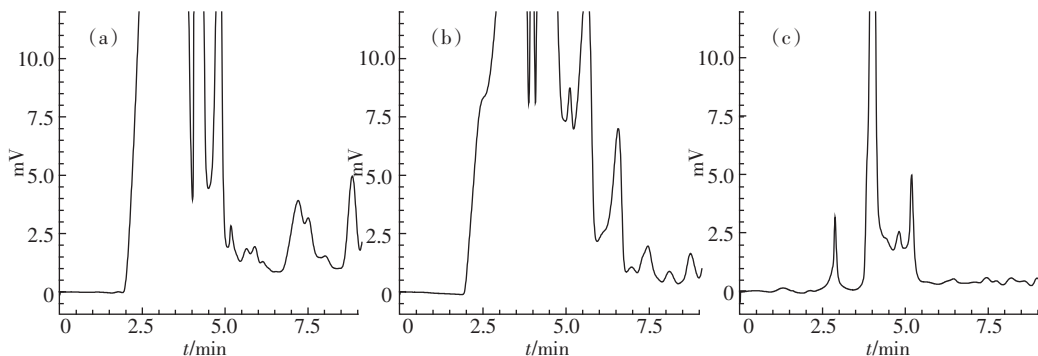


图 1 (a)嘧肽霉素标准溶液(1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、(b)土样空白、(c)土样添加(0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的色谱图

Figure 1 Chromatogram of (a) cytosinepeptidemycin standard solution(1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), (b) blank soil, (c) soil spiked with cytosinepeptidemycin(0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)



(a)硅胶;(b)硅镁;(c)中性氧化铝($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
(a)Silica gel, (b)Silicon magnesium, (c)Neutral alumina, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

图 2 不同层析柱对嘧肽霉素在番茄中的净化图

Figure 2 Chromatogram of cytosinepeptidemycin with different chromatographic column from tomatoes

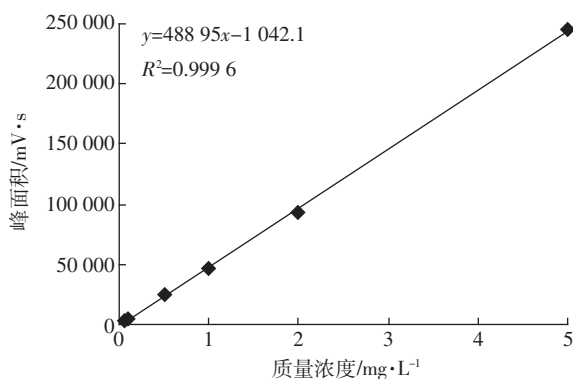


图 3 嘧肽霉素标准曲线

Figure 3 The standard curve of cytosinepeptidemycin

表 2 土壤中嘧肽霉素的添加回收率($n=5$)

Table 2 Recovery of cytosinepeptidemycin from soil spiked with standard concentrations

添加浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	添加回收率/%						CV/%
	1	2	3	4	5	平均值	
0.05	85.23	86.54	82.41	90.17	90.66	87.00	3.98
0.50	94.06	90.98	94.94	98.56	93.02	94.31	2.96
1.00	95.14	93.95	92.45	94.21	93.31	93.81	1.07

3.98%范围内,均符合农药残留分析方法的技术要求。

2.4.2 番茄中嘧肽霉素分析方法的回收率与精密度

于番茄空白样中添加一定体积的嘧肽霉素工作液,使其在番茄中的添加浓度分别为 0.5 、 1.0 、 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每个添加浓度设 5 个平行,按 1.5.2、1.5.3 所述的分析方法进行样品的前处理操作,处理后的样品在 1.4 所述的色谱条件下进行测定。添加回收率见表 3。

由表 3 可知,嘧肽霉素 3 个添加浓度的平均添加回收率在 $89.96\% \sim 107.45\%$ 之间、变异系数在 $4.66\% \sim$

表 3 番茄中嘧肽霉素的添加回收率($n=5$)

Table 3 Recovery of cytosinepeptidemycin from tomato spiked standard concentrations

添加浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	添加回收率/%						CV/%
	1	2	3	4	5	平均值	
0.5	103.01	83.18	93.71	83.61	94.74	91.65	9.12
1.00	118.90	101.25	98.42	111.42	107.27	107.45	7.60
5.00	91.98	92.00	93.66	83.05	89.09	89.96	4.66

9.12%范围内,均符合农药残留分析方法的技术要求。

2.4.3 方法的检出限

在上述分析方法检测条件下,以 3 倍信噪比计,仪器对嘧肽霉素的最小检出量为 $2 \times 10^{-10} \text{ g}$,嘧肽霉素在土样、番茄中的最低检测浓度分别为 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.5 方法的应用

于 2011 年至 2012 年分别在长沙、广州、杭州三地进行了农药嘧肽霉素的残留田间试验。采用建立的嘧肽霉素的残留分析方法,对上述两年三地的样品进行了检测,并对部分试验样品重复进行 5 次检测,结果表明:检测分析方法均符合农药残留检测要求。其具体检测结果如表 4 所示。

3 结论

(1)嘧肽霉素在土壤中的添加浓度为 $0.05 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,平均添加回收率为 $87.00\% \sim 94.31\%$ 、变异系数为 $1.07\% \sim 3.98\%$ 。用甲醇和水混合液(3/7, V/V)振荡-超声提取土壤中嘧肽霉素,高效液相色谱对样品进行测定。该分析方法可达到农药残留分析方法的技术要求,不仅减少了样品前处理过程中净化步骤,

表 4 噻肽霉素在番茄、土壤样品中的残留量
Table 4 Concentrations of cytosinpeptidemyacin in tomato and soil

样品编号	残留量/mg·kg ⁻¹					平均值	CV/%
	1	2	3	4	5		
11-M-T-D-C-1h	0.044 1	0.046 3	0.049 7	0.048 5	0.046 8	0.047 1	4.56
12-M-T-D-Z-1h	0.120 5	0.125 9	0.112 5	0.117 6	0.122 4	0.119 8	4.23
12-M-T-D-G-1h	0.062 2	0.059 8	0.064 7	0.058 7	0.060 1	0.061 1	3.89
11-M-T-D-CMT-1h	0.531 6	0.516 4	0.543 5	0.527 1	0.534 9	0.530 7	1.88
12-M-F-D-Z-1h	1.247 0	1.301 0	1.196 0	1.293 0	1.213 0	1.250 0	3.74
11-M-F-D-C-1d	0.827 4	0.795 6	0.853 1	0.805 7	0.779 8	0.812 3	3.52
12-M-F-D-G-5d	0.472 2	0.458 9	0.497 1	0.502 1	0.463 8	0.478 8	4.10
12-M-F-D-Z-7d	0.443 5	0.428 9	0.460 3	0.438 7	0.467 8	0.447 8	3.56

注:11:2011 年;12:2012 年;M:噻肽霉素;T:土壤;F:番茄;D:动态;C:长沙;Z:浙江;G:广州;CMT:长沙模拟土样样品;n=5

同时也降低了实验过程中的分析成本,有利于操作程序的简化和工作效率的提高。

(2)噻肽霉素在番茄中的残留检测方法为用甲醇匀质提取、二氯甲烷萃取、硅胶层析柱净化,最后应用高效液相色谱对样品进行测定。当噻肽霉素在番茄中的添加浓度为 0.5~5.00 mg·kg⁻¹ 时,平均添加回收率为 89.96%~107.45%、变异系数为 4.66%~9.12%,均可达到农药残留检测的技术要求。

参考文献:

[1] 噻肽霉素. 农药科学与管理[J], 2011, 32(4):61.
Cytosinpeptidemyacin. Pesticide science and administration[J], 2011, 32 (4):61.

[2] 王艳红, 吴元华, 朱春玉, 等. 噻肽霉素又一抗病毒活性成分的研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(1):44-47.
WANG Yan-hua, WU Yuan-hua, ZHU Chun-yu, et al. Studies on a new antiviral component of cytosinpeptide-mycin[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2006, 37(1):44-47.

[3] 杜春梅, 吴元华. 4%噻肽霉素水剂的毒性和防效[J]. 黑龙江大学自然科学报, 2005, 22(3):338-344.
DU Chun-mei, WU Yuan-hua. Study on the toxicity and control effect of Cytosintetidemyacin[J]. *Journal of Natural Science of Heilongjiang University*, 2005, 22(3):338-344.

[4] 吴元华, 杜春梅, 朱春玉, 等. 新型农药噻肽霉素研究进展[J]. 云南农业大学学报, 18(4):135-136.
WU Yuan-hua, DU Chun-mei, ZHU Chun-yu, et al. Advances in a

novel agroantibiotic of cytosinpeptidemyacin[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2003, 18(4):135-136.

[5] 穆凌霄, 伏颖, 吴元华. 噻肽霉素发酵液抗真菌组分的高效液相色谱分析[J]. 农药, 2011, 50(7):508-509.
MU Ling-xiao, FU Ying, WU Yuan-hua. Analysis of the antifungal ingredient in cytosinpeptidemyacin fermentation Broth by HPLC[J]. *Agrochemicals*, 2005, 22(3):338-344.

[6] 李小芳, 孙惠青, 徐光军, 等. 噻肽霉素在烟叶及土壤中的残留分析及消解动态[J]. 农药学报, 2013, 15(2):211-216.
LI Xiao-fang, SUN Hui-qing, XU Guang-jun, et al. Residue and decline dynamics of cytosinpeptidemyacin in tobacco and soil[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2013, 15(2):211-216.

[7] 徐荣娟, 朱鲁生, 王军, 等. 溴苯腈在土壤及水中残留分析方法的研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(5):1837-1842.
XU Rong-juan, ZHU Lu-sheng, WANG Jun, et al. Residue analysis of bromoxynil in soil and water[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(5):1837-1842.

[8] 刘双双, 杨仁斌, 陈海平, 等. 多菌灵在水稻及土壤中的消解动态和残留规律研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 31(2):357-361.
LIU Shuang-shuang, YANG Ren-bin, CHEN Hai-ping, et al. Residue and degradation of carbendazim in rice and soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 31(2):357-361.

[9] 郑立国, 杨仁斌. 虱螨脲在土壤生态系统中的检测方法及其持久性研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(11):2407-2411.
ZHENG Li-guo, YANG Ren-bin. Detection method and persistence of lufenuron in soil eco-system[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(11):2407-2411.