

# 食品中敌菌灵残留量的 HPLC 测定方法研究

李 健, 刘 宁, 陈 平, 姚 微, 金龙哲

(哈尔滨商业大学食品工程学院 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘 要:** 建立了一套较为完善的检测食品中农药敌菌灵残留量的高效液相色谱外标法。采用乙腈-水溶液为流动相, 流速 1.0 ml/min。于 250 nm 用紫外检测器进行检测。其重复测定结果的 RSD 在 2.60%~4.80% 范围内, 回收率在 90.50%~103.66% 范围内。本方法适用于蔬菜和原粮中敌菌灵农药残留量的测定。

**关键词:** 农药; 敌菌灵; 残留量; 测定方法; 高效液相色谱法

HPLC Method for Determination of Anilazine Pesticides Residue Limits of in Foods

LI Jian, LIU Ning, CHEN Ping, YAO Wei, JIN Long-zhe

(Institute of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**Abstract:** A better method was presented by adopting an external standard method of high performance liquid chromatography for the determination of Anilazine pesticides residue in foods. The mobile phase was acetonitrile-water with a flow velocity of 1.0 ml/min. The samples were detected by an UV detector at 250 nm wavelength. The determination method RSD of Anilazine is 2.60%~4.80% and the recovery of Anilazine 90.50%~103.66%. This method is satisfactory for the determination of vegetable and grain residue of Anilazine.

**Key words:** pesticide; Anilazine; pesticides residue; determination method; high performance liquid chromatography  
中图分类号: TS207 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2007)01-0278-04

敌菌灵(Anilazine)是由邻硝基氯苯还原后得到的邻氯苯胺与三聚氯氰反应而得到的杀菌剂, 其化工产品学名为 2,4-二氯-6-(邻-氯代苯胺基)-均三氮苯。常用于防治蔬菜灰霉病、菌核病、斑枯病、早疫病、黑斑病、霜霉病、炭疽病、褐斑病、黄瓜黑星病、葱紫斑病、草莓蛇眼病、草莓轮斑病、茭白胡麻叶斑病、茭白纹枯病、香椿根腐病等。其具有低毒、内吸性、杀菌谱较广等优点。广泛应用于粮食蔬菜等农作物。一般为 50% 可湿性粉剂。敌菌灵在食物中达到一定的浓度后, 人或其他高等动物长期进食这些食物, 使农药在体内积累起来, 就会引起慢性中毒。由于敌菌灵无特殊解毒药, 需对症处理, 会严重损害人体的健康。我国是食品出口大国, 农药残留是影响我国食品质量安全的首要因素, 农药残留标准及相应的检验方法是技术性贸易壁垒的主要内容。因此, 起草、建立食品中敌菌灵农药残留的标准检验方法是尤为必要。对提高我国食品安全质量和促进我国食品出口具有重要意义并创造可观的经济效益<sup>[1-2]</sup>。

目前农药残留限量标准, CAC、欧盟和美国均有现行标准。CAC 规定食品农药残留限量中敌菌灵的标准

为最高限量禽蛋类 0.02 mg/kg (1999, 07)。中华人民共和国卫生部在 1994 年 8 月 10 日批准实施了食品中敌菌灵等农药最大残留现状标准 GB 15194-94, 这个标准参照采用国际标准 CAC CX-PR 2-1992《农药残留最大限量》, 其中, 敌菌灵的最大残留限量标准为: 原粮 0.2 mg/kg; 蔬菜 10 mg/kg。水果、食用油等方面未作具体规定。

敌菌灵具体的检测分析方法在国际农药分析协作委员会(CIPAC)出版的 CIPAC E 卷(1993 年)中有所记载, 是采用液相色谱法, 以保留时间定性, 内标法定量。1980 年 J Assoc Off Anal Chem 上也有对西红柿和马铃薯中敌菌灵的分析检测方法, 它采用气相色谱和高效液相色谱两种方法<sup>[3-4]</sup>。国内也有采用高效液相色谱方法和化学免疫法测定敌菌灵等农药残留量的报道。液相色谱方法已向专业化、普及化方向发展, 在合成产物的分析中得到广泛的应用, 更适合于检测机构和进出口检验。我们在比较和分析了上述几种检测方法的文献资料后, 用液相色谱法外标法来研究敌菌灵的检测方法, 反复进行条件试验和筛选, 在提高方法的准确度和精密度的同时, 力求方法简便省时、可操作性强、测定快速, 便于推广应用。

收稿日期: 2005-10-25

作者简介: 李健(1956-), 男, 教授, 研究方向为食品化学。

## 1 材料与方法

### 1.1 原理

食品中敌菌灵农药经提取制成甲醇溶液, 注入高效液相色谱仪, 经反相色谱分离, 根据保留时间定性, 与峰面积比较进行定量。

### 1.2 仪器

高效液相色谱仪; Waters515 泵; Waters 紫外可见波长检测器; KQ-100DB 型数控超声波清洗器; 离心机; 紫外-可见分光光度计。

### 1.3 试剂

重蒸馏水、乙腈、甲醇(色谱纯); 敌菌灵 美国 Supelco 公司。

敌菌灵标准贮备溶液: 准确称取 0.1000g 敌菌灵, 用甲醇溶解定容至 100ml, 此溶液 1ml 相当于 1.00mg 敌菌灵。

敌菌灵标准使用液: 临用时将上述溶液加甲醇稀释 10 倍, 经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 配成每毫升相当于 100  $\mu\text{g}$  的敌菌灵。

### 1.4 分析步骤

高效液相色谱参考条件: 色谱柱: Diamonsil™(钻石)  $\text{C}_{18}$  5  $\mu\text{m}$ , 200  $\times$  4.6mm 色谱柱(迪马公司产品); 流动相: 乙腈: 水 = 80: 20, 流速: 1.0ml/min, 进样量: 20  $\mu\text{l}$ ; 柱温: 室温; 紫外可变波长检测器:  $\lambda = 250\text{nm}$ 。

### 1.5 试样制备及测定

1.5.1 蔬菜 将蔬菜切碎混匀。称取 5.00 ~ 10.00g 样品置于 100ml 离心瓶中, 准确加入甲醇 50ml, 超声 30min, 离心, 取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜待上机测定。

1.5.2 原粮 将样品磨粉, 过 20 目筛, 混匀, 采用 4 分法或 6 分法取样 5.00 ~ 10.00g 置于 100ml 离心瓶中, 准确加入甲醇 50ml, 超声 30min, 离心, 取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜待上机测定。

1.5.3 标准曲线的绘制 准确吸取敌菌灵标准使用溶液 (1.3) 0.00、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00ml 分置于 10 毫升容量瓶中, 用甲醇稀释至 10ml, 此溶液相当于 0.00、10.00、20、40、60、80、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液系列, 供制作标准曲线。用微量注射器依次取不同浓度的敌菌灵测定液 20  $\mu\text{l}$ , 注入液相色谱仪, 以敌菌灵的浓度为横坐标, 峰面积的平均值为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.5.4 试样测定 用微量注射器取 1.5.1 处理后的试样溶液 20  $\mu\text{l}$  进行液相色谱分析, 测定其峰面积, 根据保留时间定性, 由外标标准曲线求得测定液中敌菌灵的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法的线性相关性考察

我们对敌菌灵在 0.00 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的范围内配制标准溶液系列 9 个点, 每标样进 3 针, 以标样的峰面积的平均值为纵坐标, 以标样的浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 并利用最小二乘法进行线性回归, 由表 1, 图 1 得到结果可知在 0.00 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内线性关系良好, 线性方程为:  $A = 37159C - 45341.05$ , 相关系数  $r = 0.9993$ 。

表 1 敌菌灵标准工作曲线测定结果  
Table 1 Results of calibration curve of Anilazine

序号	浓度 $C(\mu\text{g}/\text{ml})$	平均峰面积
1	0.00	0
2	10.00	290110
3	20.00	706193
4	40.00	1410729
5	60.00	2136520
6	80.00	3016010
7	100.00	3642270
8	120.00	3809531
9	200.00	5922072

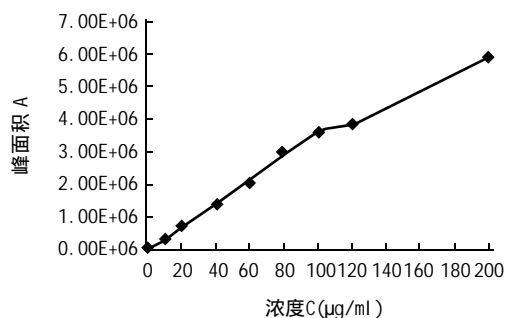


图 1 标准工作曲线图(0.00 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
Fig.1 The calibration curve of Anilazine(0.00 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

### 2.2 精密度、回收率的考察

称取一定量(5.00 ~ 10.00g)小麦、水稻、玉米、小白菜等样品 5 份, 分别添加一定量的标准溶液后, 按照样品的处理方法进行处理, 在上述色谱条件下进行测定, 根据结果计算精密度、回收率结果列于表 2 ~ 6。实际样品的平均加标回收率在 90.50% ~ 103.66% 范围内, 其变异系数在 2.60% ~ 4.80% 的范围内。

### 2.3 测定波长选择

用 UV-2000 紫外光谱仪, 对敌菌灵的标准溶液, 在 190 ~ 1100nm 的波长范围内进行了扫描分析, 结果见图 2 ~ 3。

如图 2 所示敌菌灵在波长 210nm 处有最大吸收峰、250nm 处有次吸收峰。空白样品(小白菜)溶于甲醇的紫外吸收图如图 3 所示, 在 210nm 附近有强吸收峰而在 250nm 处没有吸收峰, 因此本方法的波长选择在 250nm,

表2 在小麦中加标 0.200μg/ml 的回收率测定结果

Table 2 Results of recovery of 0.200μg/ml Anilazine was added to wheat

序号	样品中敌菌灵 含量(μg/ml)	添加标样量 (μg/ml)	敌菌灵实测 总含量(μg/ml)	实测含量 (μg/ml)	回收率 (%)
1	0	0.200	0.204	0.204	102.00
2	0	0.200	0.192	0.192	96.00
3	0	0.200	0.185	0.185	92.50
4	0	0.200	0.197	0.197	98.50
5	0	0.200	0.181	0.181	90.50
平均				0.192	95.90
RSD(%)				4.80	4.80

表3 在水稻中加标 0.500μg/ml 的回收率测定结果

Table 3 Results of recovery of 0.500μg/ml Anilazine was added to rice

序号	样品中敌菌灵 含量(μg/ml)	添加标样量 (μg/ml)	敌菌灵实测 总含量(μg/ml)	实测含量 (μg/ml)	回收率 (%)
1	0	0.500	0.493	0.493	98.60
2	0	0.500	0.507	0.507	101.40
3	0	0.500	0.473	0.473	94.60
4	0	0.500	0.477	0.477	95.40
5	0	0.500	0.516	0.516	103.20
平均				0.493	98.64
RSD(%)				3.77	3.77

表4 在玉米中加标 1.00μg/ml 的回收率测定结果

Table 4 Results of recovery of 1.00μg/ml Anilazine was added to maize

序号	样品中敌菌灵 含量(μg/ml)	添加标样量 (μg/ml)	敌菌灵实测 总含量(μg/ml)	实测含量 (μg/ml)	回收率 (%)
1	0	1.00	0.934	0.934	93.40
2	0	1.00	0.983	0.983	98.30
3	0	1.00	0.965	0.965	96.50
4	0	1.00	1.02	1.02	102.00
5	0	1.00	0.991	0.991	99.10
平均				0.979	97.86
RSD(%)				3.26	3.26

表5 在小白菜中加标 0.200μg/ml 的回收率测定结果(%)

Table 5 Results of recovery of 0.200μg/ml Anilazine was added to Chinese cabbage

序号	样品中敌菌灵 含量(μg/ml)	添加标样量 (μg/ml)	敌菌灵实测 总含量(μg/ml)	实测含量 (μg/ml)	回收率 (%)
1	0.0601	0.200	0.2614	0.0614	102.16
2	0.0602	0.200	0.2567	0.0567	94.19
3	0.0602	0.200	0.2587	0.0587	97.51
4	0.0602	0.200	0.2574	0.0574	95.35
5	0.0601	0.200	0.2603	0.0623	103.66
平均				0.0593	98.57
RSD(%)				4.23	4.23

此条件下空白样品(小白菜)溶解于甲醇中物质不干扰测定, 确保测定最为灵敏和准确。

2.4 流动相的选择

我们采用乙腈 - 水体系作流动相, 试剂价格便宜、

表6 在小白菜中加标 1.00μg/ml 的回收率测定结果

Table 6 Results of recovery of 1.00μg/ml Anilazine was added to Chinese cabbage

序号	样品中敌菌灵 含量(μg/ml)	添加标样量 (μg/ml)	敌菌灵实测 总含量(μg/ml)	实测含量 (μg/ml)	回收率 (%)
1	0.0602	1.00	1.0605	0.0605	100.50
2	0.0601	1.00	1.0598	0.0598	99.50
3	0.0602	1.00	1.0624	0.0624	103.65
4	0.0601	1.00	1.0587	0.0587	97.67
5	0.0601	1.00	1.0584	0.0584	97.17
平均				0.0600	99.70
RSD(%)				2.60	2.60

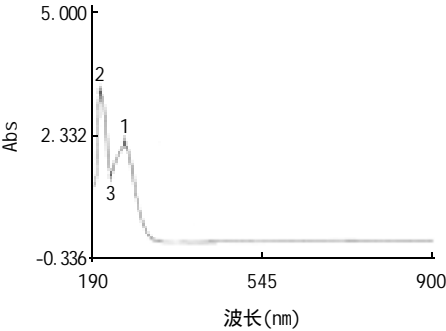


图2 敌菌灵紫外 - 可见光扫描图  
Fig.2 UV-VIS scanned picture of Anilazine

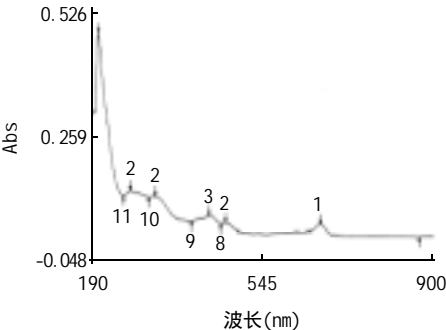


图3 样品 - 甲醇溶液紫外 - 可见光扫描图  
Fig.3 UV-VIS scanned picture of sample- methanol solution

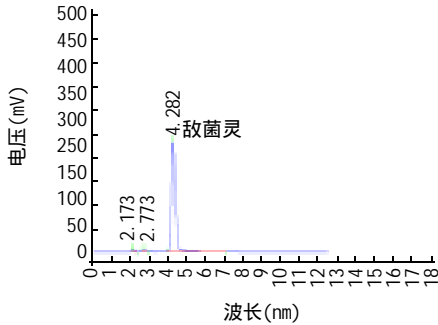


图4 标准色谱图  
Fig.4 Chromatogram of Anilazine standard

易得, 分离效果参见标准物色谱图 4 及样品色谱图 5。

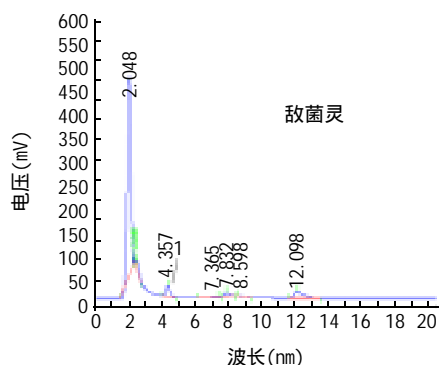


图5 样品中敌菌灵色谱图

Fig.5 Chromatogram of Anilazine in samples

### 2.5 最小理论塔板数的确定

根据理论塔板数的计算公式： $N=5.54(t_R'/W_{1/2})^2$ ，用标准溶液的调整保留时间和峰面积的半峰宽进行计算，在本实验条件下理论塔板数  $N=4444$ 。考虑到柱效的影响因素，确定最小理论塔板数应 2500。

### 2.6 最低检出浓度和检出限

本方法样品提取溶液的最低检出浓度可检测到  $20\mu\text{g/L}$ 。通过计算可知，当进样量相当于  $0.008\text{g}$  时，本方法的检出浓度为  $0.05\text{mg/kg}$ ，进样量  $20\mu\text{l}$ ，最小检出限为  $0.4\text{ng}$ 。

### 2.7 实际样品测定

对原粮、蔬菜进行了实际样品的检测，其中小麦 6 份、水稻 8 份、玉米 6 份、西红柿 7 份、菜花 6 份、

油菜 7 份、菠菜 7 份、韭菜 7 份、白菜 6 份，均未检出敌菌灵，在自种的小白菜上喷洒敌菌灵农药，进行检测后(见图 5)可以看出，用液相色谱法来研究敌菌灵，方法简便省时、可操作性强、测定快速，便于推广应用。

### 2.8 干扰实验

实验结果表明，在上述实验条件下，艾氏剂、狄氏剂、七氯对敌菌灵的测定没有干扰。

## 3 结 论

本方法的准确度和精密度的高，方法简便省时、可操作性强、测定快速，用 HPLC 外标法测定食品中敌菌灵农药残留量，由测定结果的标准偏差和回收率试验可看出，其方法的精密度好、准确度也较高，且简便省时、操作简单，便于推广应用，适用于食品中蔬菜与原粮的敌菌灵农药残留量的测定。

### 参考文献：

- [1] 葛宝坤, 高建会, 左国华, 等. 高效液相色谱法测定葡萄酒 6 种防霉剂的残留量[J]. 色谱, 2003, 5(3): 296.
- [2] 王以燕. 农药原药和制剂的分析—CIPACE 卷的分析方法摘要[J]. 农药译丛, 1995 (1): 47-52.
- [3] 罗腾飞. 免疫化学法与其他分析技术集成以测定杀虫剂残留(一)[J]. 医学情报杂志, 1998: 94-98.
- [4] 杨大进. 农药残留生物快速检验方法(综述)[J]. 中国食品卫生杂志, 1998 (2): 38-40.

## 信 息

## 以色列找到营养物质“传输工具” 为营养食品研发开辟了新途径

科技日报 2006 年 12 月 30 日讯，以色列研究人员最新研究发现，牛奶中的干酪素胶束承担着营养物的传递工作，研究人员利用这种物质首次成功地进行了营养物传输实验。

作为该研究项目的主持人，以色列理工学院生物和食品工程系的姚奥夫·利夫尼博士指出，干酪素是牛奶中的主要蛋白质，它以极小的纳米级颗粒排列在一起，被称之为“胶束”。干酪素胶束由许多分子组成，其中包括大约 31% 的蛋白质、67% 的水和各种矿物质等。其作用是，从母体向婴儿传递钙、蛋白质和磷酸盐等重要营养物。实际上，胶束是一种天然的营养物质传输工具。

为了深入研究这些胶束运输营养物质的机理，研究人员首次进行了胶束传输营养物的试验。他们选择对骨骼发育起重要作用的维生素 D 作为被传输物。这次试验的关键是设法将维生素 D 装入到干酪素胶束之中。研究人员将维生素 D 溶液加入到一种干酪素溶液之中，这样，维生素 D 就与蛋白质“捆绑”在了一起。之后，他们又向这种含有维生素 D 的干酪素溶液中，加入了与牛奶中含量相同的钙和磷酸盐。结果发现，在溶液中，除了那些已经携带维生素 D 的胶束之外，携带了各种蛋白质的胶束与在普通牛奶中发现的胶束相似。此外，研究人员还利用电子显微镜弄清了胶束的结构特征。

目前，研究人员正在研究能够大规模生产浓缩胶束的方法，以便将浓缩胶束添加到各种食品(特别是低脂肪食品)中。据此，不必食用高脂肪食品，人们就可以补充那些只有在脂肪中才含有的重要维生素。研究人员认为，这项技术为人类开发营养食品开辟了一条新的途径。