

# 食品中百菌清残留检测方法研究进展

王玲玲<sup>1,2</sup>, 侯玉泽<sup>1,\*</sup>, 职爱民<sup>2</sup>, 李文君<sup>1</sup>, 胡晓飞<sup>2</sup>, 邓瑞广<sup>2</sup>

(1.河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003;

2.河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450003)

**摘要:** 百菌清(CTN)是一种广泛、保护性有机氯杀菌剂, 常用于防治蔬菜、瓜果、花生、水稻、小麦等作物真菌病害, 但因其毒性及残留问题对环境和人体健康的危害, 对其残留检测日益受到人们的重视。本文就CTN的性质与应用、毒性及残留检测方法等进行阐述, 旨在为CTN的检测研发提供一定的参考。

**关键词:** 百菌清; 毒性; 残留检测方法

## A Review: Determination of Chlorothalonil in Food

WANG Ling-ling<sup>1,2</sup>, HOU Yu-ze<sup>1,\*</sup>, ZHI Ai-min<sup>2</sup>, LI Wen-jun<sup>1</sup>, HU Xiao-fei<sup>2</sup>, DENG Rui-guang<sup>2</sup>

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Key Laboratory of Animal Immunology, Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract:** Chlorothalonil (CTN) is a broad-spectrum, protective organic chlorine bactericide, commonly used to control fungus diseases of vegetable, fruit, peanuts, rice, wheat and other crop. For its hazards to environment and human health, determination of CTN residue has attracted increasing attention of people. The physical and chemical properties, application and detection methods of CTN are reviewed here, in order to provide some reference for further development of CTN detection methods.

**Key words:** chlorothalonil(CTN); toxicity; residue determination

中图分类号: TQ455.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0326-04

百菌清(chlorothalonil, CTN)是一种高效、低毒的非内吸性广谱有机氯杀菌剂, 对多种作物的真菌病害有良好的预防作用, 被广泛应用于蔬菜、果树、经济作物和豆类、水稻、小麦等作物及森林等多种作物病害的防治, 工业上用作防霉涂料、添加剂, 其被涂在船舶上用来防治水藻等<sup>[1]</sup>。百菌清对植物体具有良好的黏着性, 而导致百菌清及其代谢产物在果蔬、土壤及水中均有较大的残留, 直接对生态环境和人类健康造成严重的危害<sup>[2]</sup>。百菌清在土壤中经光、酶或微生物等作用后转化为羟基百菌清, 其毒性和稳定性增加, 且能溶于水, 对环境和食品安全造成更严重的威胁。美国国家环境保护总署(U.S.EPA)已经把百菌清列为可能使人类致癌的物质之一, 其对环境和食品安全具有潜在威胁<sup>[3]</sup>。因此, 很多国家都制定了百菌清在农产品中的最高残留限量, 我国2010年新颁布的《食品中百菌清等12种农药最大残留限量》规定番茄和黄瓜中百菌清的最大残留限量为5mg/kg<sup>[4]</sup>, 且国家标准GB 5749—2006《生活饮用水卫生标准》也将百菌清规定

为水源水、饮用水的必检项目<sup>[5]</sup>。为了充分认识CTN的理化性质, 研究出快速简便的检测方法, 建立有效的监控系统和控制标准, 本文对CTN的性质与应用、毒性及残留检测方法等进行简要阐述, 旨在今后为CTN的检测研发提供一定的参考。

## 1 CTN的理化性质及应用

CTN化学名称为2,4,5,6-四氯-1,3-苯二腈, 分子式为C<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>, 相对分子质量为265.91, 其化学结构见图1。CTN纯品为白色结晶, 无臭味, 易燃。沸点350℃, 熔点250~251℃, 微溶于水, 溶于二甲苯、丙酮、二甲基甲酰胺等有机溶剂。在常温贮存条件下稳定, 对弱碱或弱酸性介质及光照稳定, 在强碱介质中分解。工业品纯度>98%, 略有刺激臭味。CTN是一种保护性茎叶喷洒取代苯类杀菌剂, 有多种剂型, 主要用于果树、蔬菜上锈病、炭疽病、白粉病、霜霉病的防治, 国内外已广泛使用。

收稿日期: 2012-07-18

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201003008-09)

作者简介: 王玲玲(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测。E-mail: wangling0374@163.com

\*通信作者: 侯玉泽(1956—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品安全。E-mail: houyuze@126.com

随着百菌清的广泛应用,其进入水环境的机会日益增多,主要通过雨水冲刷进入地表水体环境,但它在自然条件下很难降解,水溶性极低,因此其引起的安全问题不容忽视<sup>[6]</sup>。

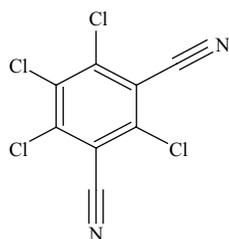


图1 CTN的化学结构

Fig.1 Chemical structure of CTN

## 2 CTN的作用机理与毒性

### 2.1 作用机理

CTN是一种非内吸性的广谱杀菌剂,对多种真菌病害具有良好的预防作用,防止真菌的侵染。其可以破坏酶的活力,使真菌细胞的新陈代谢受到破坏而丧失生命力,作用机理是与真菌细胞中的3-磷酸甘油醛脱氢酶发生作用,酶体中含有半胱氨酸的蛋白质被结合。然而CTN没有内吸传导作用,不易被植物体吸收,对病菌侵入植物体的杀菌作用较小<sup>[7]</sup>,但是喷洒到植物体之后,能在植物体有良好的黏着性,不易被雨水冲刷掉,因此药效期很长。在防腐研究方面,文献[8-11]报道百菌清是通过结构中腈基与菌体的原生质和酶蛋白中的巯基进行作用而致效,有时也可以作为偶合剂,抑制氧化磷酸化反应而致效。

### 2.2 CTN的毒性

CTN属于低毒杀菌剂,在通常情况下,百菌清原粉大鼠急性经口和兔急性经口LD<sub>50</sub>均大于10000mg/kg,大鼠1h急性吸入LD<sub>50</sub>>4.7mg/L。但有研究证明百菌清具有诱导细胞发生突变的作用,并且能在一定的剂量条件下诱导小鼠骨髓淋巴细胞姊妹染色单体发生交换。同时百菌清对鱼类和两栖动物也都具有很大的毒性,是一种能使水生生物、两栖生物和植物细胞发生遗传性突变的化学物质<sup>[12-14]</sup>。在毒性研究中发现其对人体有一定的致敏作用,临床表现为接触者胸部、面部呈烧灼感、充血、发痒,出现粟粒样的红色丘疹,眼睑有明显水肿,持续2d后消退<sup>[15]</sup>。水体中残留的百菌清对海洋哺乳动物也会产生很明显的伤害。2008年,Moazzachio等<sup>[16]</sup>研究发现百菌清与致癌发病率有一定关系。百菌清在自然界中主要代谢物质之一的3-羟基-2,4,5-三氯间苯二腈(TPN-OH),其毒性是母体毒性的30倍,且移动性和持久性也远远大于母体,它的毒性已引起人们的重视<sup>[17]</sup>。

## 3 CTN残留检测方法研究进展

对CTN的残留检测方法,一直是全球领域内科学家的研究热点,已建立的方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱法(GC)和联用分析法等。

### 3.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法原理是利用荧光检测器,将样品通过提取、净化、衍生、测定等步骤。具有分辨率高、快速、准确性好、灵敏度高、检测限低等优点,近年越来越多的用于百菌清的检测。Galera等<sup>[18]</sup>采用高效液相色谱法对地下水及土壤中包括百菌清在内的共10种农药的残留量进行了分析。流动相为乙腈、水的体积比为70:30;流速为1mL/min。结果表明地下水及土壤样品百菌清的加样回收率分别在90.5%~111.5%及89.8%~107.0%之间。纪淑娟等<sup>[19]</sup>利用高效液相色谱法检测蔬菜中百菌清残留量,丙酮作为提取剂,经硅胶柱净化浓缩后用适量的甲醇定容,利用紫外检测器,以C<sub>18</sub>色谱柱分离,流动相为甲醇、水的体积比为90:10,流速0.7mL/min,240nm波长处进行检测。实验结果显示,百菌清线性检测范围为0.05~10mg/kg,加标回收率为83.5%~121.3%,检测限为0.012mg/kg。HPLC精确度高,重复性好,但是样品前处理比较麻烦,而且需要昂贵的仪器设备,不易于普及和基层检测。

### 3.2 气相色谱法

百菌清本身含有电负性较强的氯原子,在采用气相色谱法进行分析时通常选用电子捕获检测器测定。唐彦君等<sup>[20]</sup>采用毛细管气相色谱法测定蔬菜中百菌清、氯氰菊酯、溴氰菊酯等残留量,色谱条件为弹性石英毛细柱、气化室温度260℃、柱室温度240℃、检测器温度300℃。通过添加回收实验表明,当添加百菌清标品质量浓度为0.1μg/mL时,回收率为87.38%,变异系数为3.382%,最低检测限为0.31μg/kg。谢艳丽等<sup>[21]</sup>研究并建立了百菌清、联苯菊酯等残留量的气相色谱法,共检测豇豆、苦瓜、包菜和白菜4种蔬菜,平均添加回收率为81.5%~110.1%,变异系数为2.3%~6.1%,检出限为0.00014~0.00260mg/kg。GC法具有高选择性、高灵敏度、高分离效能等优点,是目前检测百菌清含量及残留应用较多的一种方法。

### 3.3 联用分析法

近年来,为了得到更好的检测效果,研究者联用各种分析技术,优势互补,以获得理想的分析检测结果。气相色谱-质谱(GC-MS)等是常用的联用技术<sup>[22-24]</sup>。陈红平等<sup>[25]</sup>采用气相-质谱法,对茶叶中包括百菌清在内的72种农药残留进行了研究,最终确证结果准确可靠。孙福生等<sup>[26]</sup>建立液相微萃取(LPME)-反相液相色谱(RPLC)

法来检测环境水样中百菌清的残留量,并优化了液相萃取的各种条件:采用环己烷为萃取剂,搅拌速度350r/min,萃取时间40min,水溶液温度35℃。结果表明该方法的线性检测范围为1.0~50.0 $\mu\text{g/L}$ ,水样富集倍数为427,检出限为0.02 $\mu\text{g/L}$ ,相对标准偏差为6.1%,运用此方法检测环境水样中百菌清的残留量,其水样添加标准物的回收率为98.2%~106%。此方法具有选择性强、准确度高和灵敏度强的优点,完全能满足水中百菌清的检测分析。

#### 4 CTN残留快速检测方法研发进展

目前,快速检测药物残留的方法即免疫分析法发展迅速,也取得了较大的成功。此方法是以抗原与抗体的特异性、可逆性结合反应为基础的分析技术。近年来,无显著毒害作用的酶联免疫吸附实验(ELISA)<sup>[27-28]</sup>和胶体金免疫分析法(GICA)<sup>[29]</sup>应用日益广泛。

##### 4.1 酶联免疫吸附法(ELISA)

ELISA法是一种既特异又敏感的检测方法,是建立在抗原与抗体免疫学反应的基础上具有特异性,又由于酶标记抗原或抗体是酶分子与抗原或抗体分子的结合物,它能够催化底物分子发生反应产生放大作用,从而使该方法具有很高的敏感性。该方法的基本原理是:抗体或抗原物理性地吸附于固相载体表面,并保留原有的免疫活性。在检测时,把待测样品和酶标抗原或抗体按先后顺序与固相载体表面的抗原或抗体反应,然后洗涤,最后结合在固相载体上的酶量与待检样品中受检抗原或抗体的量成一定比例。加入酶反应底物,酶把底物催化为有色产物,根据颜色反应来判定是否有免疫反应的存在,而且颜色反应的深浅与待检样品中的相应抗原或抗体的量直接相关,因此可根据颜色的深浅定性或定量分析。郭乃菲等<sup>[30]</sup>利用琥珀酸酐法制备百菌清人工抗原免疫新西兰大白兔获得多克隆抗体,建立了百菌清间接竞争ELISA检测方法,来检测蔬菜中百菌清及其代谢产物的残留量。结果显示,该方法对百菌清的检出限(IC<sub>20</sub>)为0.0123ng/mL,回收率为87%~92%,对百菌清的结构类似物交叉反应率均小于0.01%。Jahn等<sup>[31]</sup>用血孔匙蛋白(CTNH-KLH)的免疫原免疫BALB/c小鼠,应用细胞融合技术及建立杂交瘤细胞株制备了抗CTN的单克隆抗体,采用间接竞争ELISA对番茄表皮进行检测,半数抑制所需的质量浓度(IC<sub>50</sub>)值为6ng/mL,在添加百菌清标准质量浓度为4~80 $\mu\text{g/L}$ 时,回收率为89%~95.2%,检测下限为0.7ng/mL。

##### 4.2 胶体金免疫分析法(GICA)

GICA检测的免疫学原理是一种双抗体夹心法,当待测样品(血清或尿液)加到试纸条一端的样品吸收垫上,样

品中的液体首先溶解胶体金垫中含有的胶体金标记的鼠源性单克隆抗体,其次样品中待测抗原与胶体金颗粒标记的鼠源性单克隆抗体结合,形成抗原-抗体 $\times$ 胶体金复合物,并靠毛细作用向前移动。在硝酸纤维薄膜的检测线上固定有另一鼠源性单克隆二抗,当样品层析至检测线时,可以进一步形成抗体-抗原-抗体 $\times$ 胶体金双抗体夹心复合物,聚集在检测带上,通过可目测的胶体金标记物得到直观的显色结果。而游离标记物则越过检测带,达到与结合标记物自动分离的目的。目前国内河南农业科学院动物免疫学实验室已经采用该法研制出克伦特罗和莱克多巴胺的试纸条<sup>[32-33]</sup>,用于百菌清检测的试纸条有待研究。GICA法特异、敏感、快速、简便、直观,但其缺陷是不易定量。

##### 4.3 其他快速检测方法

免疫分析法除了ELISA、GICA之外,还有放射免疫分析、荧光免疫分析、发光免疫分析、无标记免疫分析、仪器免疫分析等。1959年建立的放射免疫分析被认为是免疫分析的建立标志<sup>[34]</sup>,并获得了1977年的诺贝尔医学奖。但因其需要放射性标记,做相应的防护处理,实验要求比较高,限制了其在药物残留分析上的广泛应用。

## 5 结语

由于传统分析检测技术存在样品前处理复杂、耗时、成本高等问题,免疫分析技术具体不可比拟的优越性。它不但能够弥补传统检测技术的不足,而且具有快速、敏感、特异、准确、成本低等优点。目前国内免疫分析技术在百菌清残留检测方面的研究还较少,但在某些农药杀菌剂、兽药残留检测中已取得一定进展,近年来陆续有一些兽药检测试剂盒的相关报道<sup>[35-36]</sup>。免疫分析技术将会是今后优先发展的检测技术,最终实现检测范围更广、检测限更低、灵敏度和特异性更高、适合多组分快速检测,解决农产品中药物残留的快速检测问题。盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺等试剂盒已在国内市场上市,而CTN试剂盒尚未见报道。可以通过免疫动物生产效价高、特异性好的小鼠脾细胞与杂交瘤细胞融合制备CTN单克隆抗体,建立CTN免疫学快速检测方法和研制相应产品,解决食品中百菌清残留的快速检测问题。

#### 参考文献:

- [1] 李云成,孟凡冰.加工过程对食品中农药残留的影响[J].食品科学,2012,33(5):401-405.
- [2] DALY G L, LEI Y D, TEIXEIRA C, et al. Pesticides in western Canadian mountain air and soil[J]. Environ Sci Technol, 2007, 41(17): 6020-6025.
- [3] LAWYRUK T S, GUECO A M, JOURDAN S W, et al. Determination

- of chlorothalonil in water and agricultural products by a magnetic particlebased enzyme immunoassay[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(5): 1413-1419.
- [4] 中华人民共和国卫生和农业部, 国家标准化管理委员会. 食品中百菌清等12种农药最大残留限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [5] 中华人民共和国卫生部, 国家标准化管理委员会. 生活饮用水卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [6] 乙小娟, 朱加叶. 高效液相色谱法快速测定大米中的4种烟碱农药残留量[J]. *食品科学*, 2011, 32(6): 233-235.
- [7] 王会锋, 冯书惠. 香菇中40种农药残留量的气相色谱法测定[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 612-615.
- [8] 何岸飞, 周尊隆. 设施番茄植株中百菌清和毒死蜱残留分析方法研究[J]. *环境科学与技术*, 2011, 34(7): 148-151.
- [9] 王多加, 胡祥娜. 深圳市水果农药残留污染状况调查[J]. *食品科学*, 2003, 24(8): 244-246.
- [10] PATTERSON J M, NOKES S E. Incorporation of chlorothalonil persistence on processing tomato into TOM-CAST[J]. *Agricultural Systems*, 2010, 64(3): 171-187.
- [11] SHERRARD R M, MURRAY CL, RODGERS J H, et al. Comparative toxicity of chlorothalonil: *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56(6): 327-333.
- [12] 唐明德, 易义珍. 百菌清诱导小白鼠骨髓淋巴细胞姊妹染色单体交换的研究[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2008, 23(4): 348-350.
- [13] ROSA A, CORDOVA J, LILLIAM L, et al. Use of spent substrate after *Pleurotus pulmonarius* cultivation for the treatment of chlorothalonil containing wastewater[J]. *Journal of Environmental Management*, 2011, 92(5): 948-952.
- [14] WANG Huili, WANG Chengjun, CHEN Fan, et al. Anaerobic degradation of chlorothalonil in four paddy soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(2): 1000-1005.
- [15] LU Qiuling, YANG Guang, GU Hao. Phase quantification of two chlorothalonil polymorphs by X-ray powder diffraction[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 538(7): 291-296.
- [16] MOZZACHIO A M, RUSIECKI J A, HOPPIN J A, et al. Chlorothalonil exposure and cancer incidence among pesticide applicator participants in the agricultural health study[J]. *Environ Res*, 2008, 108(3): 400-403.
- [17] SHANE S, QUE H, HANAA Z. Permeation of chlorothalonil through nitrile gloves: collection solvent effects in the closed-loop permeation method[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 179(11): 57-62.
- [18] GALERA M N, VIDAL J M N, FRENICH A G. Evaluation of multiwavelength chromatograms for the quantification of mixtures of pesticides by high-performance liquid chromatography-diode array detection with multivariate calibration[J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, 778(3): 139-149.
- [19] 纪淑娟, 郭乃菲, 齐小辉, 等. 高效液相色谱法检测蔬菜中百菌清及其代谢产物的方法研究[J]. *食品工业科技*, 2011(7): 397-399.
- [20] 唐彦君, 王桂华, 牛广财. 毛细柱气相色谱法测定蔬菜中百菌清及拟除虫菊酯农药残留[J]. *中国酿造*, 2010, 221(8): 162-163.
- [21] 谢艳丽, 梁振益, 章程辉. 气相色谱法检测蔬菜中百菌清·联苯菊酯·氟氯氰菊酯残留量[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(5): 2678-2679.
- [22] PEÑUELA G A, BARCELÓ D. Photodegradation and stability of chlorothalonil in water studied by solid-phase disk extraction, followed by gas chromatographic techniques[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 823(1/2): 81-90.
- [23] CHEN S F, SU Y S, JEN J F. Determination of aqueous chlorothalonil with solid-phase microextraction and gas chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 896(4): 105-110.
- [24] CHAVES A, SHEA D, DANEHOWER D. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(4): 629-638.
- [25] 陈红平, 刘新. 气相色谱-质谱法同时测定茶叶中72种农药残留量[J]. *食品科学*, 2011, 32(6): 321-325.
- [26] 孙福生, 董杰, 沈英. 液相微萃取-反向液相色谱测定环境水样中百菌清农药残留[C]//王国清编. 中国环境科学学会学术年会论文集. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2009: 434-438.
- [27] WATANABE E, MIYAKE S, ITO S, et al. Reliable enzyme immunoassay detection for chlorothalonil: fundamental evaluation for residue analysis and validation with gas chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1129(2): 273-282.
- [28] 郭乃菲, 纪淑娟. 百菌清酶联免疫吸附检测方法的影响因素[J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 259-263.
- [29] LI X, ZHANG G, LIU Q, et al. Development of immunoassays for the detection of sulfamethazine in swine urine[J]. *Food Addit Contam: Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2009, 26(3): 314-325.
- [30] 郭乃菲, 纪淑娟, 周艳明, 等. 蔬菜中百菌清及其代谢产物残留的ELISA检测方法研究[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(9): 883-887.
- [31] JAHN C, SCHWACK W. Determination of cutin-bound residues of chlorothalonil by immunoassay[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2009, 49(3): 1233-1238.
- [32] 张改平, 李学伍, 王选年, 等. 盐酸克伦特罗快速检测试纸条: 中国, ZLO2202033. O[P]. 2002.
- [33] 李学伍, 张改平, 王自良, 等. 莱克多巴胺残留快速检测试纸条: 中国, ZL200620031416. O[P]. 2008.
- [34] YALOW R S, BERSON S A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods[J]. *Nature*, 1959, 184: 1648-1649.
- [35] 张海棠, 王自良, 邓瑞广, 等. 莱克多巴胺单克隆抗体的研制及阻断ELISA检测方法的建立[J]. *核农学报*, 2008, 22(6): 904-908.
- [36] 刘庆堂, 职爱民, 李青梅, 等. 磺胺嘧啶残留阻断ELISA试剂盒的研制及鉴定[J]. *河南农业科学*, 2009(11): 122-125.