Hans Journal of Agricultural Sciences 农业科学, 2016, 6(2), 16-22
Published Online April 2016 in Hans. http://www.hanspub.org/journal/hjas
http://dx.doi.org/10.12677/hjas.2016.62003

Determination of Mefenoxam Residue in Cucumber and Soil by LC

Xiyue Zhang, Di Wu

Beijing Plant Protection Station, Beijing
Email: 439405107@qq.com

Received: Mar. 15th, 2016; accepted: Apr. 8th, 2016; published: Apr. 12th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

Abstract

This work examined metalaxyl-M residue in cucumber and soil using acetonitrile extraction, amino extraction column purification, and LC-UV detection. The results showed that recovery of pesticide spiked in cucumbers, at 0.02, 0.5 and 1 μg/g, was 84.20%, 81.02%, and 87.73%, respectively; and in soil, when spiked at 0.02, 0.5 and 1 μg/g, recovery was 71.50%, 92.86%, and 90.82%, respectively. Digestion dynamic equation of metalaxyl-M was obtained by field test sample detection, of which the half-life period was 11.5 d in cucumber and 13.9 d in soil. The minimum determination concentration was 0.02 mg/kg in this sample, and the detectable limit of metalaxyl-M was estimated to be 4×10^{-11} g.

Keywords

Metalaxyl-M, Residue, Cucumber, Soil, Degradation Dynamics

液相色谱法测定黄瓜和土壤中精甲霜灵的残留

张希跃，吴　迪

北京市植物保护站，北京
Email: 439405107@qq.com

收稿日期：2016年3月15日；录用日期：2016年4月8日；发布日期：2016年4月12日

摘　要

本文对精甲霜灵(Metalaxyl-M)在黄瓜和土壤上采用乙腈提取、Amino萃取小柱净化、LC-紫外进行检测。

文章引用: 张希跃, 吴迪. 液相色谱法测定黄瓜和土壤中精甲霜灵的残留[J]. 农业科学, 2016, 6(2): 16-22.
http://dx.doi.org/10.12677/hjas.2016.62003

试验结果表明：黄瓜上添加标准品0.020、0.50、1.0 μg/g，回收率分别为84.20%、81.02%、87.73%；土壤中添加标准品0.02、0.5、1.0 μg/g，回收率分别为71.50%、92.86%、90.82%。通过田间试验样品检测得到的精甲霜灵的消解动态方程，其在黄瓜中半衰期为11.5 d，在土壤中半衰期为13.9 d。精甲霜灵在样品中最低检测浓度为0.02 mg/kg，最小检出量为4×10^{-11} g。

关键词

精甲霜灵，残留，黄瓜，土壤，消解动态

1. 引言

精甲霜灵，英文通用名为 Metalaxyl-M，分子式 $C_{13}H_{21}NO_4$。又称旋光甲霜灵，是外消旋物甲霜灵的 R 型异构体，其化学名称为：N-(2,6-二甲苯基)-N-(甲氧基乙酰基)-D-丙胺酸甲酯[1]。精甲霜灵是世界上第一个商品化的具有立体旋光活性的杀菌剂，可用于种子、土壤处理及茎叶处理，主要用于防治瓜果、蔬菜的霜霉病、疫病及马铃薯晚疫病等[2]-[4]。甲霜灵在果树上主要用于防治苹果疫病、根瘤病、茎腐病；葡萄霜霉病。

目前国内外有关于气相色谱法[5]-[9]、液相色谱法[10]-[13]与高效液相色谱法[14] [15]等分别测定精甲霜灵残留量的报道，其中，精甲霜灵在农作物中的残留分析方法采用氧化铝填充柱并用正己烷与石油醚混合液作为淋洗液净化[16]。而本实验中选用乙腈为提取液，采用填料为硅胶上键合丙氨基的氨基固相萃取柱，甲醇和二氯甲烷为淋洗液做净化处理，实验中所用试剂、材料等使用广泛、易得并对人体危害性小，方法简便、高效。

2. 材料与方法

2.1. 材料、试剂和仪器

黄瓜(产地：北京)。44%精甲霜灵·百菌清悬浮剂(广州植物龙生物技术有限公司)；精甲霜灵标准品(99.5%，美国 Chemservice 公司)；洗脱液(甲醇-二氯甲烷(1/99, v/v)，流动相乙腈为农残级，甲醇、二氯甲烷(均为色谱纯，迪马公司)。氯化钠(140℃，烘 4 h) (分析纯，北京化学试剂公司)。

液相色谱仪(Shimadzu LC-2010)；多用途台式恒温振荡器 DDHZ-300 (江苏太仓市实验设备厂)；旋转蒸发仪 N-1NW (日本 EYELA)；固相萃取仪 VISIPREP™ DL (SUPELCO)，Amion 氨基萃取柱(500 mg/3mL，美国安捷伦公司)。

2.2. 方法

2.2.1. 样品前处理

黄瓜

称取 20.0 g 黄瓜，加入约 10 g NaCl 和 40 mL 乙腈，用高速匀浆机匀浆 1 min，静置 10 min。

用滤纸过滤，滤液收集到装有 10g 氯化钠的 100 mL 具塞量筒中，收集滤液 30 mL~40 mL，盖上塞子，剧烈震荡 1 min，在室温下静置 30 min，使乙腈相和水相分层。取 20 mL 上清液至 100 mL 圆底烧瓶中，40℃旋转蒸发，浓缩至 2 mL，加入 2 mL 甲醇-二氯甲烷(1/99, v/v)。待上柱。

用 2 mL 甲醇-二氯甲烷(1/99, v/v)两次，将氨基柱预洗条件化，当溶剂液面到达柱吸附层表面时，立即加入上述待净化溶液，用 10 mL 离心管收集洗脱液，用 2 mL 甲醇-二氯甲烷(1/99, v/v))洗烧杯后过柱，并重复一次，将离心管置于氮吹仪上，水浴温度 50℃，氮吹蒸发至近干，用甲醇准确定容到 2.0 mL。在

混合器上混匀后 0.22 微米滤膜过滤，待测。

土壤

准确称取 20.0 g 土壤放入烧杯中，加入 5 mL 水，加入 10 g 氯化钠和 40.0 mL 乙腈，30℃下 200 r/min 震荡 1 h，静置 10 min。

其余同黄瓜样品检测步骤。

2.2.2. 色谱条件

Shimadzu LC-2010 液相色谱仪配置 DAD 检测器，色谱柱 Shim-pack VP-ODS (250 × 4.6 mm, 5 μm)；柱温：35℃；流动相：乙腈 + 水(50 + 50)；流速：0.7 mL/min ；进样量：20 μL；运行时间：30 min；保留时间：12.10 min。

2.2.3. 标准曲线

准确称取 99.5%精甲霜灵标准品 0.0205 g (精确至 0.0001 g)，用甲醇溶解至 50 mL，得到 1000 mg/L 的甲醇母液。再用甲醇逐级稀释至 0.020、0.050、0.10、0.20、0.50、1.0、2.0、5.0 mg/L 的系列标准溶液，在上述色谱条件下分别进样，2 次重复，精甲霜灵标准溶液进样得到标准工作曲线。

2.3. 添加回收率测定

黄瓜和土壤空白样品中，添加质量分数为 0.02、0.5、1.0 mg/kg 的精甲霜灵标准液，依上述方法提取、净化、测定，获得全流程回收了结果，每个处理重复 5 次。

2.4. 气候条件、土壤类型

北京怀柔试验点地处大陆性季风型半湿润气候，土壤为砂壤质，土质中性略偏碱，pH 为 7.75，土壤有机质含量 7.38%。试验期间降雨量为 3962 mm。

山东烟台试验地点处于温带海洋性气候，土壤类型为粘土，pH 为 7 左右，土壤有机质含量 10%。试验期间降雨量为 292.2 mm。

广东广州试验点地处亚热带季风气候，土壤为粘土，试验期间降雨量为 292.2 mm。

2.5. 田间实验设计

本试验是按照《农药登记残留试验准则》(NY/T 788-2004)的规定进行，在北京、山东、广东三地进行最终残留试验和消解动态试验，试验地前茬均不得使用与供试农药类型相同的农药。试验均设空白对照区、低剂量(推荐剂量)试验区、高剂量(推荐剂量的 1.5 倍)试验区以及消解动态试验区。最终残留试验小区面积 30 m^2，每个处理重复 3 次，同时，黄瓜和土壤采样方法按照 NY/T 788-2004 进行。

2.5.1. 消解动态试验

实验小区面积为 30 m^2，设 3 个重复试验小区。以 180 g a.i./kg 处理，药液兑水 750 L/hm，黄瓜生长至成熟个体一半大小时，开始对黄瓜整个植株手动喷雾处理，保证施药均匀。药后分别间隔 2 h 以及 1、3、5、7、14、21、28 d 随机于试验区内上、中、下、左、右不同部位，采集 6 条以上(不少于 2 kg)确保已着药(施药时需标记)、生长正常、无病害的黄瓜，混匀后缩分留 250 g 样品。

选取试验小区无植被土地 30 m^2，以有效成分用量 180 g a.i./kg 处理，按照药后 2 h 以及 1、3、5、7、14、21、28、45、60 d 采土样测定(用专用取土工具，取土深度 0~10 cm)，多点取样 1.0 kg，过 1 mm 孔径筛，混匀后，分取 300 g 装入塑料袋中。同时采集对照区空白样品。所有样品用塑料袋封装、标记、编号，贮存于−20℃冰柜中待测。

2.5.2. 最终残留试验

按照推荐剂量为：90 g a.i./ha (推荐剂量)和 135 g a.i./ha (推荐剂量的 1.5 倍)。于黄瓜生长中期按照实际生产中的处理方式均匀喷雾施药，施药次数为 3、4 次，每次施药间隔 7d，末次药后间隔 1、2、3 和 5 d 分别采样。用随机的方法，在试验小区上、中、下、左、右不同部位，采集 6 条以上(不少于 2 kg)、生长正常、无病害的黄瓜。同时采集对照区空白样品。将田间样品用不锈钢刀切成 1~2 cm 大小的碎块，于不锈钢盆中充分混匀，用四分法缩分，分取 200 g 样品。所有样品用塑料袋封装、标记、编号，贮存于−20℃冰柜中待测。

3. 结果与分析

3.1. 线性相关性测定

准确称取 99.5%精甲霜灵标准品 0.0205 g (精确至 0.0001 g)，用甲醇溶解至 50 mL，得到 1000 mg/L 的甲醇母液。再用甲醇逐级稀释至 0.020、0.050、0.10、0.20、0.50、1.0、2.0、5.0 mg/L 的系列标准溶液，在上述色谱条件下分别进样，2 次重复，精甲霜灵标准溶液进样得到标准工作曲线。以峰高 y 对进样浓度 x (mg/L)作图，得到精甲霜灵标准溶液工作曲线。其直线方程为 $y = 86475\ x - 165.4$，$r^2 = 0.9999$

3.2. 灵敏度、准确度和精确度

分别在黄瓜和土壤中添加 3 种浓度的精甲霜灵标准溶液，每个浓度重复 5 次添加回收，用上述分析方法测定回收率。方法对精甲霜灵的最小检出量为 4×10^{-11} g，在黄瓜和土壤样品中最低检测浓度均为 0.02 mg/L，测定回收率与变异系数见表 1。

3.3. 方法净化效果

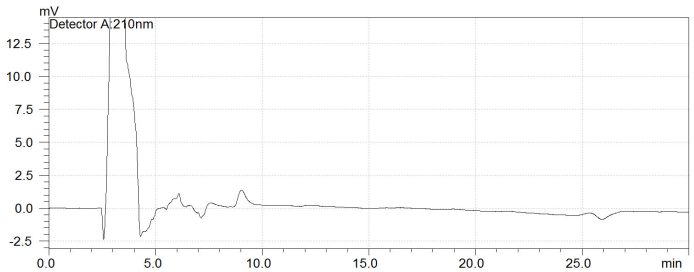
精甲霜灵在大多数有机溶剂中有良好的溶解性，实验选用乙腈提取，甲醇-二氯甲烷(1/99, v/v)进行淋洗。实验结果表明：通过本方法处理的黄瓜、土壤空白样品和添加样品，在分析过程中排除了杂质干扰，说明本方法有良好的净化效果(见图 1)。

3.4. 残留消解动态

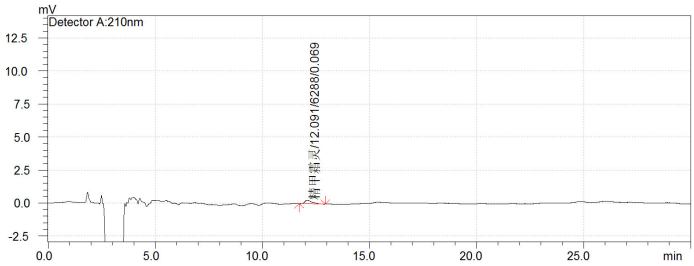
根据 2011 年对北京、山东、广州黄瓜上精甲霜灵的残留降解研究，精甲霜灵在黄瓜和土壤中的降解曲线均符合一级动力学方程。精甲霜灵在黄瓜中的消解曲线(见图 2)，求得精甲霜灵在北京、山东、广州 3 地黄瓜中的降解方程分别为 $C = 0.1426e^{-0.06r}$ ($r^2 = 0.8524$)、$C = 0.1772e^{-0.175t}$ ($r^2 = 0.926$)、$C = 0.2579e^{-0.196t}$ ($r^2 = 0.8971$)，半衰期分别为 11.6、4.1、3.6 d。精甲霜灵在土壤中的消解曲线(见图 3)，求得

Table 1. Recoveries and relative standard deviations of mefenoxam in cucumber and soil
表 1. 精甲霜灵在黄瓜和土壤中的添加回收率与变异系数

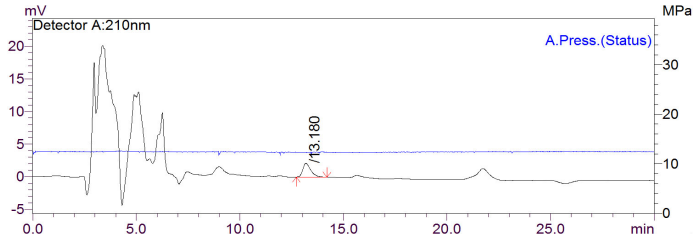
样品名称	添加浓度/(mg/kg)	回收率/%					平均值/%	变异系数/%
		1	2	3	4	5		
黄瓜	0.02	94	77	75	91	84	84.2	7.9
	0.5	81.16	82.44	86.52	78.52	76.48	81	4.8
	1	88.02	87.58	86.12	90.08	86.84	87.7	1.7
土壤	0.02	71	72	72	75	71	72.2	2.3
	0.5	94.28	94.48	93.36	86.92	95.28	92.9	3.7
	1	83.74	94.94	85.04	100.1	93.3	92.8	7.5



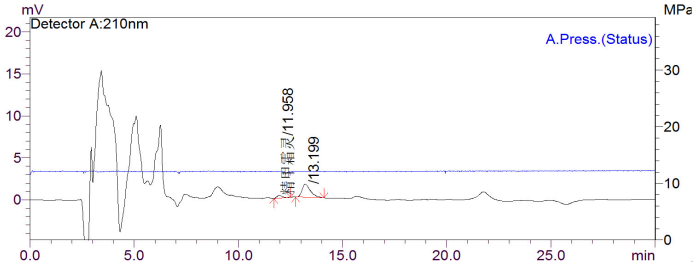
(a) 土壤空白样品谱图



(b) 土壤添加 0.02 mg/kg 精甲霜灵样品谱图



(c) 黄瓜空白样品谱图



(d) 黄瓜添加 0.02 mg/kg 精甲霜灵样品谱图

Figure 1. Samples of different chromatogram
图 1. 不同样品色谱图

精甲霜灵在北京山东、广州 3 地土壤中的降解方程分别为 $C = 0.3843e^{-0.057t}$ ($r^2 = 0.9017$)、$C = 0.1119e^{-0.09t}$ ($r^2 = 0.7881$)、$C = 0.1833e^{-0.046t}$ ($r^2 = 0.8405$)。半衰期分别为 13.5、7.7、13.9 d。由此可见，精甲霜灵在黄瓜中的降解速率较快于土壤中。

3.5. 最终残留

44%精甲霜灵·百菌清悬浮剂，精甲霜灵有效成分用药量 90~180 g a.i/ha，施药 3~4 次，施药间隔 7~10 天，采收间隔期为 1、2、3、5 天，精甲霜灵在黄瓜中的残留量范围为 0.022 mg/kg~0.250 mg/kg；在土壤中的最终残留量为未检出(即小于等于 0.02 mg/kg)~0.420 mg/kg；田间试验结果表明：精甲霜灵在黄瓜和土壤中的残留量随施药剂量和施药次数的增加而增加，随采收间隔期的延长而降低(见表 2)。

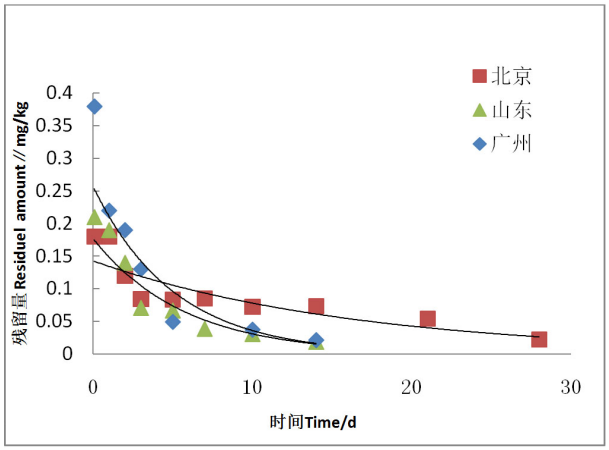


Figure 2. Degradation of mefenoxam in cucumber
图 2. 精甲霜灵在黄瓜中的消解曲线

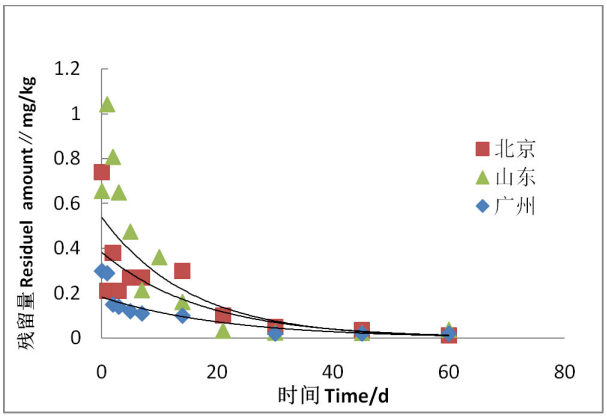


Figure 3. Degradation of mefenoxam in soil
图 3. 精甲霜灵在土壤中的消解曲线

Table 2. Fine armor frost spirit eventually residue in cucumber and soil data
表 2. 精甲霜灵在黄瓜和土壤中的最终残留数据

时间	施药剂 (g a.i./hm^2)	施药次数	北京		山东		广州	
			黄瓜	土壤	黄瓜	土壤	黄瓜	土壤
1	90	3	0.049	0.045	0.053	0.026	0.130	0.160
		4	0.054	0.047	0.091	0.057	0.150	0.230
	135	3	0.083	0.077	0.091	0.058	0.250	0.150
		4	0.081	0.220	0.150	0.070	0.220	0.120
2	90	3	0.022	0.160	0.046	0.029	0.100	0.110
		4	0.041	0.110	0.095	0.069	0.140	0.110
	135	3	0.074	0.097	0.073	0.052	0.180	0.250
		4	0.060	0.360	0.100	0.057	0.200	0.400
3	90	3	0.044	0.097	0.060	0.024	0.100	0.140
		4	0.061	0.160	0.077	0.047	0.150	0.120
	135	3	0.085	0.084	0.072	0.420	0.110	0.110
		4	0.085	0.097	0.110	0.067	0.170	0.150
5	90	3	0.040	0.051	0.052	≤0.02	0.180	0.080
		4	0.048	0.074	0.055	≤0.02	0.120	0.076
	135	3	0.074	0.081	0.100	0.025	0.087	0.120
		4	0.075	0.110	0.110	0.040	0.190	0.180

4. 结论

试验结果表明：精甲霜灵在黄瓜中的降解率速度较快于土壤中。黄瓜中的精甲霜灵半衰期为 4~12 d，土壤中的精甲霜灵半衰期为 8~14 d。精甲霜灵的施药次数、剂量和采收间隔期决定了它们在黄瓜中的残留量。在施药后 1 d，北京、山东、广州 3 个地区精甲霜灵在黄瓜中的最终残留量均低于 0.5 mg/kg (CAC 规定精甲霜灵在黄瓜中 MRL 值为 0.5 mg/kg)。因此，建议组分含量为 4%精甲霜灵按 180 g a.i./hm^2 的剂量喷施在黄瓜上，喷药 3 次，安全间隔期为 1 d。

本试验建立了精甲霜灵在黄瓜和土壤中残留检测方法：采用甲醇-二氯甲烷(1/99, v/v)作为洗脱液，氨基萃取柱净化，液相色谱法(紫外检测器)对黄瓜和土壤中精甲霜灵残留量进行分析。试验前处理方法简单、回收率高、重现性好，符合农药残留检测的要求，可用于其在黄瓜和土壤中残留量的检测分析。

参考文献 (References)

[1] 农业部农药检定所. 企业版农药电子手册 [DB/OL]. http://www.ny100.cn/, 2008-07-21

[2] 周防震. 番茄采后病害拮抗酵母菌的筛选和应用[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[3] Latorre, B.A., Spadaro, I. and Rioja, M.E. (2002) Occurrence of Resistant Strains of *Botrytis cinerea* to Anilinopyrimidine Fungicides in Table Grapes in Chile. *Crop Protection*, **21**, 957-961. http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00074-1

[4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 214-215.

[5] 丁蕊艳, 陈子雷, 李瑞菊, 等. 马铃薯及土壤中精甲霜灵残留动态[J]. 农药学学报, 2008, 10(4): 450-454.

[6] 韩丙军, 汤建彪, 彭黎旭, 等. 精甲霜灵在西红柿上的降解残留研究[J]. 热带农业科学, 2009, 29(1): 4 p.

[7] 陈莉, 朱晓丹, 贾春虹, 等. 精甲霜灵与百菌清在黄瓜和土壤中的残留降解规律研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16626-16628, 16647.

[8] 韩丙军, 陈丽霞, 汤建彪, 等. 精甲霜灵在热带气候土壤中的残留及消解动态研究[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(1): 190-192.

[9] 丁蕊艳, 李明立, 陈子雷, 等. 精甲霜灵在济南地区马铃薯中的残留消解动态[J]. 农药, 2008, 47(10): 752-753.

[10] 陈莉, 贾春虹, 戴荣彩, 等. 精甲霜灵水分散粒剂在葡萄和土壤中的残留试验[J]. 农药, 2008, 47(3): 195-197.

[11] 曹爱华, 李义强, 孙慧青, 等. 烟草及土壤中精甲霜灵残留分析方法和降解规律研究[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(3): 35-37, 42.

[12] 陈莉, 贾春虹, 朱晓丹, 等. 精甲霜灵在西瓜和土壤中的残留动态[J]. 农药, 2010, 49(4): 282-283.

[13] 丁蕊艳, 陈子雷, 李瑞菊, 等. 马铃薯及土壤中精甲霜灵残留动态[J]. 农药学学报, 2008, 10(4): 450-454.

[14] 张松光, 吴梦颖, 李鹏, 等. 40g/L 精甲霜灵·60 g/L 苯醚甲环唑悬浮种衣剂的高效液相色谱分析[J]. 中国农药, 2013(6): 28-30.

[15] 钱训, 王莉, 张少军, 等. 20%精甲霜灵悬浮种衣剂手性液相色谱分析[J]. 农药, 2015(1): 42-44.

[16] 李雪生, 黄辉晔, 林明珍, 等. 精甲霜灵柱层析净化淋洗液的改进研究(英文) [J]. 南方农业学报, 2006, 37(1): 52-55.