

· 研究论文 ·

百菌清和福美双在蘑菇上的残留研究

王会利, 陈长龙, 胡继业, 陈旭艳, 李建中*

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要:建立了杀菌剂 30% 菇丰(12% 百菌清和 18% 福美双)可湿性粉剂在蘑菇中的残留分析方法,并用该方法研究了其在蘑菇中的消解动态和最终残留。样品分别经 GC-ECD 和 HPLC-UV 检测。方法的添加回收率分别为 90.19%~99.11%和 73.94%~86.47%;变异系数分别为 0.9%~3.2%和 2.6%~15.8%;最小检出量分别为 1×10^{-12} g 和 6×10^{-9} g 最低检测浓度分别为 0.01 和 0.3 mg/kg。田间残留动态试验结果表明,百菌清和福美双在蘑菇中的半衰期分别为 2.5 d 和 4.2 h。在最高推荐剂量(1800 g/hm²)和推荐剂量 2 倍条件下,施药 1~2 次,施药后第 5 d 蘑菇中百菌清残留量高于我国规定的 MRL 值(1 mg/kg);而施药后 2 d 福美双残留量已低于 MRL 值(3 mg/kg)。试验结果表明,百菌清不适用于在蘑菇中使用,而福美双则可以使用。

关键词: 杀菌剂; 百菌清; 福美双; 蘑菇; 残留试验

中图分类号: X592

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)03-0283-05

Research on Residues of Chlorothalonil and Thiram in Mushroom

WANG Hui li CHEN Chang-long HU Ji ye CHEN Xu-yan LI Jian-zhong*

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract The methods were developed to determine the residues of chlorothalonil and thiram in mushroom, their dissipation rates and final residues were also studied. Chlorothalonil was determined by GC with ECD-detector, and thiram was determined by HPLC with UV-detector. The average recoveries and coefficient variation of the methods were 90.19%~99.11% and 0.9%~3.2% for chlorothalonil and 73.94%~86.47% and 2.6%~15.8% for thiram, respectively. The limit of detection for chlorothalonil and thiram were 1×10^{-12} g and 6×10^{-9} g and the limit of quantification were 0.01 mg/kg and 0.3 mg/kg respectively. The results showed that the half lives of chlorothalonil and thiram in mushroom were 2.5 days and 4.2 hours respectively at double of the recommended dosage. The study revealed that the residues of chlorothalonil in mushroom were above the MRL in China (1 mg/kg) after 5 days at the recommended dosages (1800 g/hm²) and double of that however the residues of thiram in mushroom were below the MRL (3 mg/kg) after 2 days. The results indicated that chlorothalonil is unsuitable for mushroom in a greenhouse, but thiram is permitted to apply on mushroom.

Key words fungicide; chlorothalonil; thiram; mushroom; residue test

收稿日期: 2006-07-04 修回日期: 2006-08-31.

作者简介: 王会利(1976),女,博士研究生,主要从事农药残留与环境毒理方面的研究; *通讯作者: 李建中(1963),男,博士,副研究员,主要从事生物农药的开发及应用研究. 联系电话: 010-62849385 E-mail: bok99@263.net

江苏省农业科学研究所食用菌研究开发中心研制的 30% 菇丰可湿性粉剂 (12% 百菌清 + 18% 福美双) 用于蘑菇等食用菌上以防治真菌及细菌性病害, 在我国已取得临时登记。其中百菌清 (chlorothalnil) 已广泛用于防治多种真菌性植物病害, 但因其具有较强的“三致”作用及对皮肤和眼睛有严重的刺激性, 已被列为大棚中使用的危险级农药^[1]。此外王静等报道日光温室蔬菜中的百菌清已严重超标^[2]。虽然有关百菌清在蔬菜中的残留分析方法已有报道^[3-7], 但多数方法较繁琐, 有机溶剂使用量大。福美双 (thiram) 属于有机硫类保护性广谱杀菌剂, 可直接喷雾或拌种用于多种作物上。蔬菜和水果中的酶可以使福美双快速降解^[8], 国外多使用检测二硫代氨基甲酸酯的水解产物——CS₂的方法来进行检测, 即通过酸性水解使福美双分解为 CS₂, 从而检测蔬菜中福美双的残留量^[9-10]。但该方法需通过水解反应, 且凡是二硫代氨基甲酸酯类杀菌剂均可水解生成 CS₂, 不易确定单一福美双的残留量; 此外也有直接检测果蔬中福美双残留的方法^[8-11-12]。但目前尚未见有关百菌清和福美双在蘑菇中残留分析方法的报道。

本研究建立了简单快速的百菌清、福美双的残留分析方法, 并对温室大棚蘑菇中两种药剂的残留消解动态及最终残留进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

VARIAN GC 3800 气相色谱仪, ECD 检测器及色谱工作站 (美国 VARIAN 公司); 1100 高效液相色谱仪、紫外检测器及色谱工作站 (美国 Agilent 公司); N-1000 旋转蒸发仪 (日本 EYELA 公司); SHB-III 循环式多用真空泵 (郑州长城科贸有限公司); 高速匀浆机 (江苏金坛仪器厂); KQ-100B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 12 孔固相萃取装置 (美国 Supelco 公司); C₁₈ 固相萃取柱 (500 mg/3 mL) (美国 Supelco 公司)。

百菌清 (chlorothalnil) 标准品 (99.9%), 福美双 (thiram) 标准品 (99.8%) 购于百灵威化学技术有限公司; 30% 菇丰 (百菌清 + 福美双) 可湿性粉剂由江苏省苏科农化公司提供; 甲醇为色谱纯, DKMA 公司产品; 其余试剂为市售分析纯。实验用水为二次蒸馏水和娃哈哈纯净水。

1.2 分析方法

1.2.1 样品前处理

1.2.1.1 百菌清前处理方法 取 100 g 左右缩分后的蘑菇样品, 切碎混匀, 准确取其 2.0 g 于 100 mL 具塞三角瓶中, 加入 25 mL 正己烷-丙酮-浓硫酸 (98%) - 水 (40 : 20 : 1 : 1, 体积比) 混合液, 在高速匀浆机中搅碎。用 10 mL 丙酮冲洗匀浆机, 合并提取液, 超声提取 20 min, 抽滤。用少量丙酮洗涤滤渣, 滤液转移至分液漏斗中静置, 弃水层。有机层过无水硫酸钠, 40℃ 减压浓缩。用氮气吹干, 用甲醇-水 (20 : 80, 体积比) 定容至 2 mL, 待净化。C₁₈ 固相萃取柱分别用甲醇和水各 5 mL 预淋活化。加入上述提取液 1 mL, 使其以 1~2 滴/s 的速度通过 C₁₈ 小柱, 用 2.5 mL 水淋洗, 通空气使柱干燥。最后用 3 mL 二氯甲烷洗脱, 洗脱液用氮气吹干, 乙酸乙酯定容至 1 mL, 待 GC 分析。

1.2.1.2 福美双前处理方法 准确称取 1.2.1.1 节中已切碎混匀的蘑菇样品 10.0 g 放入具塞三角瓶中, 加入 30 mL 二氯甲烷, 超声提取 5 min, 抽滤后, 残渣用 20 mL 二氯甲烷再次超声提取 5 min, 合并提取液。由于二氯甲烷提取的蘑菇样品中杂质较少, 无需进一步净化。将提取液用 K-D 浓缩器吹干后用乙腈定容至 1 mL, 待 HPLC 分析。

1.2.2 色谱条件

1.2.2.1 气相色谱条件 色谱柱为毛细管柱, DIKMA DM-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 进样口温度 300℃; 载气为氮气, 流速 0.5 mL/min; 程序升温初始温度 150℃, 保留 1 min, 25℃/min 升温至 250℃, 保留 5 min; 检测器温度 300℃; 进样量 1 μL 分流进样, 分流比 20。

1.2.2.2 液相色谱条件 色谱柱为 GL Sciences Inc (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) C₁₈ 柱; 检测波长 254 nm; 流动相为甲醇-水 (60 : 40 体积比); 流速 0.6 mL/min; 进样量 20 μL。

1.2.3 标准曲线制作 准确称取百菌清标准品配制成 700 mg/L 的百菌清乙酸乙酯标准溶液, 将其稀释成 6 个浓度梯度 (0.005, 0.01, 0.1, 0.2, 1, 2 μg/mL), 分别进样, 以峰面积对进样绝对量作标准曲线。

用乙腈配制 500 mg/L 的福美双标准溶液, 依次稀释成 0.3, 1, 3, 10, 30 μg/mL 的浓度梯度, 分别进样, 以峰面积对进样绝对量作标准曲线。

1.2.4 方法的添加回收率试验 准确添加百菌清和福美双的标准溶液于空白蘑菇中, 分别设

3个添加浓度, 每浓度设3个重复。振荡平衡15 min后, 按上述方法进行测定。

1.3 田间试验

1.3.1 试验材料 30% 菇丰可湿性粉剂, 推荐使用剂量为 $600 \sim 1\,800 \text{ g}/\text{hm}^2$ (商品量, 下同)。温室大棚位于北京农学院试验地, 供试作物为平菇。

1.3.2 消解动态试验 每个小区面积 30 m^2 , 设3个重复和1个空白对照。以推荐使用剂量的2倍, 即 $3\,600 \text{ g}/\text{hm}^2$ 施药, 选择蘑菇长势均匀的时机, 喷药一次。施药后的蘑菇用红绳标记。百菌清的采样时间为施药后 0、1、2、3、5、7、9 d 福美双为施药后 0、4、8、12、24 h, 随机取做好标记的蘑菇。每个小区取样3份, 每份按四分法缩分至 100 g 左右, 聚乙烯袋密封后, -20°C 冰箱保存。

1.3.3 最终残留试验 设高浓度、低浓度区和空白对照区, 每区设3个重复, 每个小区面积为 30 m^2 。以推荐剂量 $1\,800 \text{ g}/\text{hm}^2$ 和 2倍剂量 $3\,600 \text{ g}/\text{hm}^2$ 施药 1~2次, 施药间隔期为 7 d 最后一次施药后, 于 0、1、2、3、5 d 采集蘑菇样品, 四

分法缩分后将所有样品放入冰箱中 -20°C 保存。

2 结果与讨论

2.1 分析方法的评价

2.1.1 线性范围 以 1.2.3 节中所配制的百菌清和福美双的浓度梯度分别进样, 获得标准曲线方程分别为 $y = 399\,414x - 7\,220\,6$ 和 $y = 5\,038\,4x - 82\,588$; 相关系数为 $R^2 = 0.999\,3$ 和 $R^2 = 0.996\,0$ 。

2.1.2 准确度 测定结果 (表 1) 表明, 百菌清添加回收率范围在 $90.19\% \sim 99.11\%$ 之间, 福美双的为 $73.94\% \sim 86.47\%$, 均符合农药残留分析的要求。色谱图分别见图 1 和图 2。由于在操作过程中福美双易被植物体中的酶所分解^[8], 导致其添加回收率降低, 如果用甲醇或乙腈配制标样, 其添加回收率只有 50% 左右, 本试验用二氯甲烷配制福美双标准溶液, 平均回收率达到农残分析要求。

Table 1 The recoveries of chlorothalonil and thiram in mushroom ($n = 3$)

Pesticides	Spiked concentration / (mg/kg)	Recoveries (%)				RSD (%)
		1	2	3	Mean	
Chlorothalonil	0.01	97.15	92.61	91.47	93.74	3.2
	0.1	99.94	98.16	99.22	99.11	0.9
	5	90.00	89.14	91.43	90.19	1.2
Thiram	0.3	74.73	62.22	93.57	76.84	15.78
	3	89.73	94.93	74.75	86.47	10.48
	30	73.26	76.81	71.73	73.94	2.61

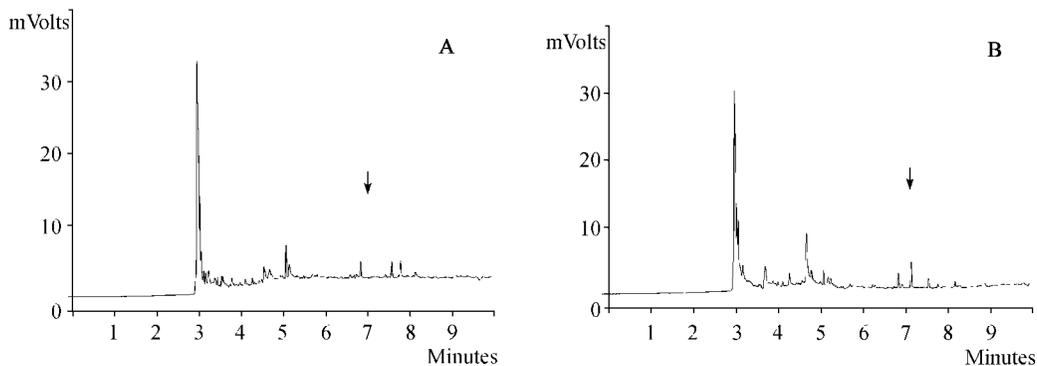


Fig 1 Chromatogram of chlorothalonil

(A) control mushroom sample (B) fortified mushroom sample at 0.01 mg/kg

2.1.3 精密度和灵敏度 从表 1 可以看出, 百菌清添加浓度在 $0.01 \sim 5 \text{ mg/kg}$ 范围内, 变异系数在 $0.9\% \sim 3.2\%$ 之间; 以 3倍基线噪音作为其最小检出限 (LOD), 其 LOD 为 $1 \times 10^{-12} \text{ g}$ 最低定

量限 (LOQ) 为 0.01 mg/kg 福美双添加浓度在 $0.3 \sim 30 \text{ mg/kg}$ 范围时, 变异系数在 $2.61\% \sim 15.78\%$ 之间, 其 LOD 和 LOQ 分别为 $6 \times 10^{-9} \text{ g}$ 和 0.3 mg/kg 均达到农业部农药残留分析的要求。

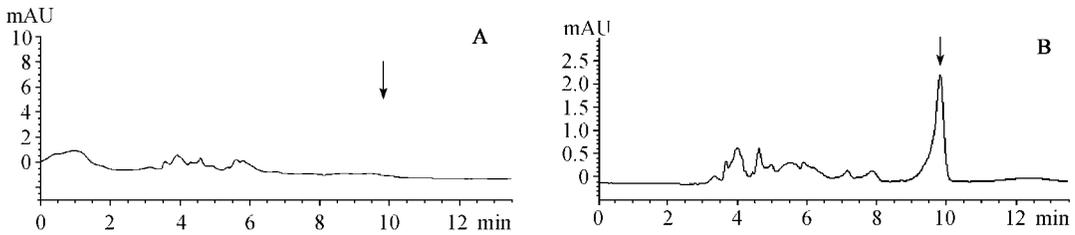


Fig 2 Chromatogram of thiram

(A) control mushroom sample (B) fortified mushroom sample at 0.3 mg/kg

2.2 田间试验

2.2.1 消解动态试验 试验结果见表 2。百菌清和福美双的消解均遵循一级动力学规律,百菌清在蘑菇中的半衰期为 2.5 d,消解动态方程为 $C_t =$

$14.548e^{-0.2802t}$, $r=0.9967$;福美双在蘑菇中的半衰期为 4.2 h,消解动态方程为 $C_t = 7.1123e^{-0.1664t}$, $r=0.9847$ (计算时未加 24 h 时的数据)。

Table 2 The residue dynamics of chlorothalonil and thiram in mushroom

Sampling day	Chlorothalonil		Sampling hour	Thiram	
	Residue concentration $(\mu\text{g}/\text{kg})$	Dissipation rate (%)		Residue concentration $(\mu\text{g}/\text{kg})$	Dissipation rate (%)
0	15.47	--	0	7.77	--
1	11.2	27.6	4	3.49	55.1
2	7.82	49.5	8	1.58	79.7
3	5.64	63.5	12	1.10	85.8
5	4.01	74.1	24	0.80	89.7
7	1.96	87.3	-	-	-
9	1.19	92.3	-	-	-

2.2.2 最终残留试验 试验结果见表 3。在商品用量 $1800 \sim 3600 \text{ g}/\text{m}^2$ 的剂量下,施药 1~2 次,百菌清在施药后 5 d 的残留量仍均高于我国和其他一些国家所制定的 MRL 值(中国 $1 \text{ mg}/\text{kg}^{[13]}$, 欧盟 $2 \text{ mg}/\text{kg}$, 加拿大 $1 \text{ mg}/\text{kg}$, 日本 $1 \text{ mg}/\text{kg}$, 美

国 $1 \text{ mg}/\text{kg}^{[14]}$);而福美双于施药后第 2 d 其残留量已低于我国的 MRL 值 ($3 \text{ mg}/\text{kg}^{[14]}$)。考虑到蘑菇生长较快,采摘周期较短(2 d 左右),因此建议百菌清不宜在蘑菇中使用,而福美双在蘑菇中消解较快,适于在蘑菇中使用。

Table 3 The terminal residues of chlorothalonil and thiram in mushroom

Dosage (g/hm^2)	Treatment times	Chlorothalonil			Thiram		
		Sampling day	Residue concentration $(\mu\text{g}/\text{kg})$	RSD (%)	Sampling day	Residue concentration $(\mu\text{g}/\text{kg})$	RSD (%)
1800	1	1	5.04	0.8	0	4.13	2.5
		3	3.17	2.3	1	0.33	0.6
		5	2.27	2.5	2	≤ 0.30	-
	2	1	9.86	1.1	0	6.80	2.6
		3	5.44	1.4	1	0.98	0.2
		5	3.72	4.6	2	≤ 0.30	-
3600	1	1	10.32	0.7	0	10.87	3.8
		3	5.27	1.1	1	3.36	1.6
		5	3.52	2.2	2	≤ 0.30	-
	2	1	17.82	0.6	0	24.56	3.5
		3	9.08	1.7	1	6.54	1.3
		5	5.05	2.8	2	1.21	0.3

3 结论

建立了百菌清和福美双在蘑菇中的残留检测方法, 方法的准确度、精密度和灵敏度均达到农业部农药残留检测的要求。百菌清用酸性正己烷和丙酮(2:1, 体积比)混合溶剂超声提取, 用 C₁₈固相萃取柱净化, 省略了液液分配过程, 减少了有机溶剂的使用, 简便、快速, 符合农药残留分析发展的方向。由于在操作过程中福美双易被植物体中的酶所分解, 本试验用二氯甲烷提取, 回收率达到农残分析要求, 且不需进一步净化, 目标化合物与杂质峰完全分开, 既省略了检测 CS₂ 确定福美双残留量方法中的水解反应, 又避免了二硫代氨基甲酸酯类杀菌剂对福美双的叠加效应, 该方法的各项指标均达到农药残留分析的要求。

田间残留试验研究表明, 百菌清和福美双在蘑菇中的半衰期分别为 2.5 d 和 4.2 h, 均降解较快。但根据 2005 年北京的残留试验数据, 在残留试验剂量 1 800 ~ 3 600 g/hm² 条件下, 施药 1 ~ 2 次, 施药后第 5 d 百菌清的残留量均明显高于我国的 MRL 值 (1 mg/kg)。考虑到蘑菇生长较快, 采摘周期较短 (2 d 左右), 因此建议百菌清不宜在蘑菇中使用。福美双在蘑菇中降解较快, 施药后 2 d 各施药次数和浓度下, 其残留量均消失了 90% 以上, 且低于我国所制定的 MRL 值 (3 mg/kg), 因此福美双适于在蘑菇中使用。对于 30% 菇丰可湿性粉剂而言, 由于蘑菇收获时百菌清的残留量明显高于 MRL 值, 因此认为其不宜在蘑菇上使用。而目前菜农普遍使用百菌清防治蘑菇病害的现象也应受到有关农药监督管理部门的足够重视。

参考文献:

- [1] ZHANG Da di (张大地), ZHANG Xiao hong (张晓红), CHEN Pei qing (陈佩青). Assessment and selection of pesticides fit for plastic shed vegetable [J]. *Shanghai Environ Sci* (上海环境科学), 1998 17(5): 5-9
- [2] WANG Jing (王静), XUE Mang (薛芒), CHEN Xin xin (陈欣欣), et al. Chlorothalonil residues in greenhouse growing vegetables and corresponding impact resulted from different treatments [J]. *J Safety and Environ* (安全与环境学报), 2005 5(2): 79-82
- [3] LOU Jian (楼健), ZHAO De sheng (赵德生). The method for determination of chlorothalonil residues in vegetables with gas chromatography [J]. *Environmental and Pollution and Control* (环境污染与控制), 1993 15(5): 38-39.
- [4] SHI Jian (石健). The residues of chlorothalonil smoke agent in vegetables in green house [J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 1991 14(2): 60-64
- [5] SONG Zheng ping (宋政平), WANG Dong hui (王东晖). Residue analysis method of chlorothalonil in vegetables by gas chromatography with the capillary column [J]. *Gansu Agric Sci and Tech* (甘肃农业科技), 2006 (1): 51-53
- [6] Dalu M G, Stephen M W. Rapid liquid chromatographic analysis of chlorothalonil in fresh produce using photoconductivity and UV detectors in tandem [J]. *J Agric Food Chem*, 1988 36: 957-961.
- [7] Gambacorta G, Faccia M, Lamaccia G et al. Pesticide residues in tomato grown in open field [J]. *Food Control* 2005 16: 629-632.
- [8] Heise S, Weber H, Adler L. Reasons for the decomposition of the fungicide thiram during preparation of fruit and vegetable samples and consequences for residue analysis [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2000 366: 851-856.
- [9] Malk A K, Kaul K N, Lark B S et al. Simple and sensitive method for determination of tetramethylthiuram disulphide (thiram) [J]. *Pestic Sci* 1998 53: 104-106.
- [10] Zisis V E, Emmanouil N R, Euphemia P M. Microwave assisted extraction (MAE)-acid hydrolysis of dithiocarbamates for trace analysis in tobacco and peaches [J]. *J Agric Food Chem*, 2002 50: 2220-2226
- [11] Ekroth S B, Ohlin B, Osterdahl B G. Rapid and simple method for determination of thiram in fruits and vegetables with high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. *J Agric Food Chem*, 1998 46: 5302-5304
- [12] Queffelec A L, Boide F, Larue J B et al. Development of an immunoassay (ELISA) for the quantification of thiram in lettuce [J]. *J Agric Food Chem*, 2001 49: 1675-1680
- [13] GB 18406.4-2001 The Safe Quality of Agricultural Product—The Request of Safe Quality of Innocuous Vegetables (农产品安全质量无公害蔬菜安全质量要求) [S].
- [14] LN Wei xuan (林维宣). The Compilation of Residue Limits Standards for Pesticides and Veterinary Drugs in Foodstuffs in the World (各国食品中农药兽药残留限量规定). Dalian (大连): Dalian Maritime University Press (大连海事大学出版社), 2002.

(Ed. JIN S H)