

◆ 加工与分析 ◆

超临界流体色谱分析苯菌灵准确含量的可行性探索

田茂英¹, 万宏剑², 唐丽莉¹, 郭天³, 杨新磊^{3*}

(1. 山东潍坊润丰化工股份有限公司, 山东潍坊 262737 2. 江苏省农药研究所股份有限公司, 南京 210046 3. 安捷伦科技(中国)有限公司, 上海 200080)

摘要:建立了一种可以直接测定苯菌灵原药含量的超临界流体色谱方法。利用超临界流体色谱的特点以及改性剂和添加剂的优化,避免了苯菌灵在仪器分析过程中的降解,通过样品溶剂的选择以及温度的控制来减缓苯菌灵在溶液中降解,最终实现苯菌灵含量的准确测定。该方法可在8 min完成一次样品分析,在2 h的稳定期内,可以利用自动进样器完成12次样品分析。取3份苯菌灵原药,每份样品重复进样2次,苯菌灵峰面积相对标准偏差为1.2%,保留时间相对标准偏差为0.1%。结果表明,本方法可操作性强、分析速度快,测定结果准确,利于在质控实验室实现多样品的自动分析。

关键词:超临界流体色谱;苯菌灵;分析

中图分类号:S 482.2 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2021.05.006

Feasibility Study on the Accurate Determination of Benomyl Using Super-critical Fluid Chromatography

TIAN Maoying¹, Wan HongJian², Tang Lili¹, GUO Tian³, YANG Xinlei^{3*}

(1. Shandong Weifang Rainbow Chemical Co., Ltd., Shandong Weifang 262737, China; 2. Jiangsu Pesticide Research Institute Co., Ltd., Nanjing 210046, China; 3. Agilent Technologies (China) Co., Ltd., Shanghai 200080, China)

Abstract: A super fluid chromatography method was developed to directly determine the content of benomyl. The degradation within instrument analysis process was avoided by the intrinsic characteristics of super-critical fluid chromatography (SFC) as well as the optimization of modifiers and additives. The degradation of sample solution was also retarded by the sample solvent selection and temperature control, and finally the content of benomyl was determined accurately. The single run was completed in 8 minutes and overall 12 injections could be finished in serial using auto sampler in a stable period of 2 h. The relative standard derivation (RSD) of peak area and retention time of benomyl was 1.2% and 0.1% obtained by three samples with two parallel injections each, respectively. It demonstrated that the developed method was suitable for the automatic sample analysis in QC labs with benefits of easy operation, fast analysis and accuracy.

Key words: super-critical fluid chromatography; benomyl; analysis

苯菌灵具有高效、广谱、内吸和低毒等特性,对杀菌和杀螨卵作用良好,在植物体内代谢为多菌灵及具有挥发性的异氰酸丁酯^[1]。异氰丁酸酯易与叶果

表皮的角质层、蜡质层结合,所以药效常优于多菌灵。目前国内登记注册的苯菌灵原药和剂型厂家约有15家,每年的产量约为1 000 t^[2]。

收稿日期:2021-01-28

作者简介:田茂英(1980—),女,山东潍坊人,本科,技师,主要从事农药合成加工与农药制剂技术分析,以及质量控制技术工作。

E-mail: tianmy@rainbowagro.com

通信作者:杨新磊(1982—),男,安徽六安人,硕士,主要从事液相色谱、超高效液相色谱、超临界流体色谱、二维液相色谱等分离应用研究工作。

E-mail: xin-lei.yang@agilent.com

(C)1994-2021 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

苯菌灵为白色结晶固体,在常温下固体状态稳定,但是在水溶液及常规有机溶剂中易降解为多菌灵。这对于苯菌灵原药或可湿性粉剂的质量控制造成极大的困难。目前关于苯菌灵的分析方法有液相色谱法^[3-8]、分光光度法^[9]、气相色谱质谱联用法^[10]、液相色谱质谱联用法^[11-12]等。液质联用法多用于瓜果蔬菜和环境水样的残留。对于产品质量控制,大多企业采用高效液相色谱方法。其中,间接方法是先将苯菌灵降解成多菌灵,通过测定多菌灵的含量来反推算出苯菌灵的结果。这种方式需要考察苯菌灵的转化速率,必须完全转化才能保证测定结果的准确性,然而产品本身存在的多菌灵也会对测定结果产生影响。另外一种方法是直接测定法,该法必须保证苯菌灵溶液的稳定性,采用的是在苯菌灵溶液中加入一定量的异氰酸丁酯抑制苯菌灵的降解^[6],但异氰酸丁酯具有与多菌灵反应生成苯菌灵的可能性,造成苯菌灵测定结果偏高^[4]。

超临界流体色谱(SFC)是近年重获新生的一种绿色分析技术,主要利用超临界二氧化碳流体为主要流动相,加入一些改性剂和添加剂来完成不同类型化合物分析。SFC作为实验室常规液相和气相的补充分析技术,已经在食品、药品、天然产物等领域发挥了重要作用^[13-16]。相比于液相色谱,SFC对手性化合物、结构类似物、易分解化合物和脂溶性化合物都显示出了非常大的优势。笔者则利用防止待测物降解这一特点开发了一种简单、快速、准确的苯菌灵分析方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 Infinity II超临界流体色谱系统,配置超临界流体模块、二元泵、自动进样器(含温控模块)、柱温箱、二极管阵列检测器、Openlab CDS 2.4数据处理系统,美国安捷伦科技有限公司。Zorbax Rx-SIL不锈钢色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),美国安捷伦科技有限公司;Vortex-Genie 2涡旋振荡器,美国Scientific Industries;ME204分析天平,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;KQ-250V超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司。

二氧化碳(钢瓶气,纯度99.995%),液化空气(中国)投资有限公司;乙腈、甲醇、四氢呋喃、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯(色谱级),德国默克公司;二乙胺(色谱级),迪马公司;0.45 μm尼龙滤膜,美国安捷伦公司;苯菌灵标样(质量分数>95.0%),多菌

灵标样(质量分数99.0%),山东潍坊润丰化工股份有限公司;去离子水为Milli Q纯水机新制。

1.2 SFC分析方法

笔者采用Zorbax Rx-SIL(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)为分析柱,柱温为30℃。二氧化碳为流动相A;流动相B为乙腈并加入0.2%二乙胺作为添加剂,采用梯度洗脱(表1)。流速为3 mL/min,进样量为5 μL,采用乙腈为feed溶剂,速率为400 μL/min;自动进样器温控为10℃;检测波长为290 nm(带宽16 nm),参比波长为360 nm(带宽80 nm);系统反压控制器压力设置为150 bar;二氧化碳出口喷嘴温度设定为60℃。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	二氧化碳/%	乙腈/%
0	90	10
3.0	70	30
5.0	70	30
5.1	10	10
8	10	10

1.3 样品制备

称取10.0 mg苯菌灵原药,加入10 mL放置于4℃冰箱的二氯甲烷溶液后,涡旋1 min,取2 mL过0.45 μm尼龙滤膜(提前放置于4℃冰箱)至进样小瓶,2 h内完成分析。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱法

苯菌灵的不稳定性导致质量分析面临很大挑战。参考CIPAC方法,采用含3%(V/V)异氰酸正丁酯的乙腈溶液来萃取苯菌灵,利用异氰酸正丁酯来抑制苯菌灵的降解。实际分析中,苯菌灵仍有降解现象,如色谱图1A显示。多菌灵和苯菌灵色谱峰之间的基线明显抬高,该现象是由于分析过程中的降解引起的。将3%(V/V)正丁基异氰酸酯乙腈溶液温度降低到-15℃来溶解苯菌灵,现配后快速进行液相色谱分析,柱温设为5℃,较常温状态有所好转,但苯菌灵在分析过程中仍有分解现象(图1B)。结果表明,由于流动相水的存在,采用高效液相色谱法会导致苯菌灵在分析过程中降解,不利于得到苯菌灵的准确定量结果。

2.2 采用SFC方法抑制苯菌灵降解

SFC采用超临界状态二氧化碳为主要流动相,并使用有机溶剂作为改性剂,可以避免使用水溶

液。这一特性有利于分析遇水易分解化合物。Liu等^[17]利用SFC-QQQ准确测定了银杏内酯及其降解产物,避免了银杏内酯在反相分析过程中的水解现象。笔者首先尝试了甲醇作为改性剂来分析不同溶剂体系(甲醇、乙腈、四氢呋喃、二氯甲烷、乙酸乙酯)溶解的苯菌灵样品,发现氯仿溶解的样品,苯菌灵的百分含量最高,但是放大色谱图后仍然可以发现基线抬高的现象,表明分析过程中的降解依然存在。为进一步消除分析过程中的降解现象,将SFC改性剂由甲醇更换为乙腈。从色谱表现上看,样品中苯菌灵色谱峰与多菌灵色谱峰之间的基线和空白基线吻合,没有抬高迹象(图2)。相比于甲醇,乙腈是一种非质子化溶剂,更利于待测物的稳定性。因此选择乙腈为SFC方法的改性剂。

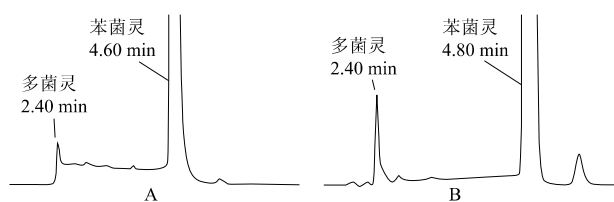


图1 苯菌灵的HPLC分析色谱图

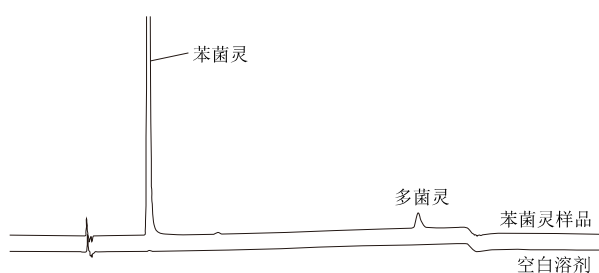


图2 SFC分析苯菌灵原药色谱图

2.3 SFC添加剂的选择

超临界流体色谱分析常常需要在改性剂中加入一定量的酸、碱或有机盐类来增加超临界流体对化合物的溶剂能力并起到改善峰型的作用。当乙腈中不添加任何改性剂时,苯菌灵色谱峰型对称,多菌灵无法从色谱柱中洗脱下来。实验考察了三氟乙酸、氨水、二乙胺在不同浓度下对多菌灵的洗脱效果,发现二乙胺添加后多菌灵峰型最好,其他有关杂质分离效果最佳,因此选择乙腈中二乙胺的添加量为0.2%(V/V)作为最终浓度。

2.4 样品溶剂的选择及稳定性考察

根据2.2实验结果,将苯菌灵溶解在不同的有机溶剂中后立即进样。如图3所示,在二氯甲烷溶液中得到的苯菌灵百分含量最高(96.3%),甲醇中的含量最低(78.3%)。虽然苯菌灵在二氯甲烷溶液中的

含量最高,但仍无法确定3%左右的多菌灵杂质是来源于产品本身还是在配制过程中的降解。笔者参考CIPAC方法,将苯菌灵原药和多菌灵原药分别溶解在含3%(V/V)异氰酸正丁酯的二氯甲烷溶液后采用SFC分析,结果表明苯菌灵样品纯度达到99.6%且未发现多菌灵峰存在,但多菌灵样品溶液色谱图中也未发现多菌灵峰,只有苯菌灵峰,说明异氰酸正丁酯已经快速地将多菌灵反应成苯菌灵。另一方面,用放置于4℃下的二氯甲烷和常温下的二氯甲烷分别溶解苯菌灵后进样,结果并无明显差异,但随着进样次数的增加,在自动进样器不控温情况下,常温二氯甲烷溶解的苯菌灵降解速度明显高于4℃溶解的样品。为进一步考察苯菌灵样品连续分析的可行性,笔者采用4℃二氯甲烷溶液配制样品后,放于10℃控温的自动进样器,每10 min进样一次,前2 h苯菌灵含量保持不变,随后开始慢慢降低,表明样品溶液可以稳定放置2 h。

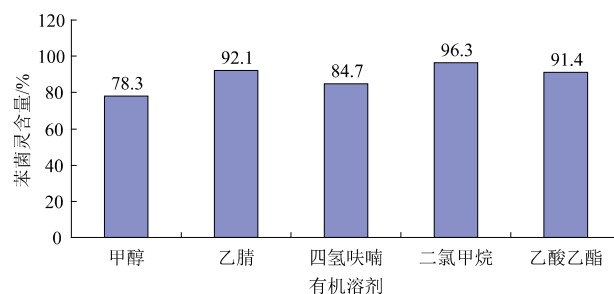


图3 苯菌灵在不同有机溶剂溶解下的百分含量结果

2.5 重复性

考虑到企业QC实验室主要以面积归一化方法来测定苯菌灵含量,所以笔者只考察了重复性结果。分别称取3份苯菌灵原药,按“1.3 样品制备”后放入自动进样器,以“2.2 SFC分析方法”进行分析,每个样品重复进样2次,然后以每针结果中苯菌灵的百分含量和保留时间来考察方法稳定性。结果显示苯菌灵百分含量的相对标准偏差为1.2%(n=6),保留时间相对标准偏差为0.1%(n=6),表明该方法稳定性良好,适合于苯菌灵原药质量的准确控制。

3 结论

苯菌灵作为一种光谱低毒杀菌剂,在国内应用广泛,但是由于其溶液稳定性极差,其质量分析方法很难操作,结果误差也较大。笔者首先利用超临界流体色谱所用流动相具有惰性、无水的特点,先从分析过程避免苯菌灵的降解,再考察了不同有机溶剂溶解后苯菌灵的稳定性,最终建立了苯菌灵超

临界流体色谱分析方法。相比于目前采用的液相色谱方法,本方法可操作性强,虽然样品溶液只能保证2 h的稳定性,但已经可以通过自动进样的方式大幅提高样品分析的便捷性。另外,通过本文结果验证了异氰酸正丁酯会造成苯菌灵结果测定的误差,建议企业重新考察样品溶剂的影响。

参考文献

- [1] 吴成,王蕾,赵志强. 对国家标准GB 2763—2014中多菌灵、苯菌灵和甲基硫菌灵残留规定存在问题分析[J]. 农产品质量与安全, 2016, 4: 69-71.
- [2] 中国农药信息网. 行业数据[DB/OL]. [2021-3-15]. <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>
- [3] RAJ P S. Determination of benomyl and its degradation products by chromatographic methods in water, wettable powder formulations, and crops[J]. Journal of Chromatography, 1993, 643(1): 249-260.
- [4] 汤森荣. 液相色谱法直接测定可湿性制剂苯菌灵[J]. 分析化学, 1999, 27(7): 802-805.
- [5] 湖南国发精细化工科技有限公司企业标准. Q/JXTZ018-2017 苯菌灵原药[S]. 长沙: 湖南国发精细化工科技有限公司, 2017.
- [6] 山东省地方标准. DB37/T 3032—2017 化妆品中苯菌灵和多菌灵的测定 液相色谱-串联质谱法[S]. 济南: 山东省质量技术监督局, 2017.
- [7] MARTIJN A, DOBRAT W. Analysis of Technical and Formulated Pesticides[M]. England: Black Bear Press Ltd., 1988:14-16.
- [8] 何强,孔祥虹,赵洁,等. 固相萃取-离子交换色谱法测定浓缩苹果汁中的苯菌灵、多菌灵、噻菌灵[J]. 色谱, 2008, 26 (5): 563-567.
- [9] 孙克. 苯菌灵的柱层析与分光光度法分析[J]. 农药, 1990, 29(3): 27.
- [10] 陈晓水,边照阳,唐纲岭,等. 气相色谱-串联质谱技术分析烟草中的132种农药残留[J]. 色谱, 2012, 30(10): 1043-1055.
- [11] IGNACIO M, NATALIA G, MARIELA P, et al. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC-MS and LC-MS/MS using the same QuEChERS procedure[J]. Food Chemistry, 2017, 227: 227-236.
- [12] 曹雪琴,杨飞,陈国通,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中10种保鲜剂残留量[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 319-324.
- [13] LETICIA P M, MARIA C G, MARIA R C, et al. Evaluation of supercritical fluid chromatography accurate mass spectrometry for neonicotinoid compounds determination in wine samples [J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1620: 460963.
- [14] LOSACCO G L, VEUTHEY J L, GUILLARME D. Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry: recent evolution and current trends[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2019, 118: 731-738.
- [15] HUANG Y, WANG T J, FILLET M, et al. Simultaneous determination of amino acids in different teas using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 9: 254-258.
- [16] JIANG Z M, WANG L J, LIU W J, et al. Development and validation of a supercritical fluid chromatography method for fast analysis of six flavonoids in citri reticulatae pericarpium[J]. Journal of Chromatography B, 2019, 1133: 1-7.
- [17] LIU X G, QI L W, FAN Z Y, et al. Accurate analysis of ginkgolides and their hydrolyzed metabolites by analytical supercritical fluid chromatography hybrid tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1388: 251-258.

(责任编辑:徐娟)

我国科研人员研制出可通过感知酸碱度来释放有效成分的控释农药

近日,中科院合肥物质科学研究院技术生物所专家成功研制出一种可通过感知酸碱度来释放有效成分的控释农药,据测算能够有效提高农药利用率20%,从而减少施药频次,并且还能利用磁场回收残留农药,降低农药引发的面源污染。

该项目由中科院合肥物质科学研究院技术生物所研究员吴正岩课题组完成,相关成果已被国际知名学术期刊《化学工程》接收发表。

当前,我国每年农药使用量高达百万t,利用率却不足40%。大部分农药通过径流、渗漏等途径流失,这不仅造成农残超标,而且引发严重的农业面源污染,直接威胁人畜健康。如何提高农药利用率、降低农药用量已成为我国乃至世界农业和环境领域亟待解决的关键问题。

课题组利用硅藻土、四氧化三铁等制备出一种复合纳米材料,并以此为载体研制出可控释放、可回收的智能农药。该农药对于酸碱度具有较强的敏感性,可通过酸碱度调控农药释放,使释放速度与需求速度同步,同时还能有效提高农药在植物叶面的附着力,从而显著减少流失,提高农药利用率,延长持效期。

此外,这项技术还可以利用外加磁场来回收残留农药及载体,大幅降低农药对环境的危害。

(来源:农业科技报)