

高效液相色谱-荧光法测定水中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐*

史陶中 马鑫 花日茂** 汤锋 李学德 操海群 吴祥为 唐俊

(安徽农业大学资源与环境学院, 安徽省农产品安全重点实验室, 合肥, 230036)

摘 要 建立了水样中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(甲维盐)残留量的柱前衍生高效液相色谱测定方法. 水样经乙酸乙酯提取后, 运用 N-甲基咪唑-乙腈(NMIM-CAN)(1+1)、三氟乙酸酐-乙腈(TFAA-CAN)(1+1)在避光条件下进行柱前衍生化反应, 反应 20min 后, 用高效液相色谱-荧光检测器进行测定. 结果表明, 水中甲维盐添加浓度在 $0.0001\text{—}0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围, 方法的回收率为 78.4%—115.2%, 变异系数为 3.0%—11.3%, 方法的最低定量限为 $0.0036\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 方法的灵敏度、精密度和准确度完全满足农药残留分析的要求. 甲维盐在巢湖水中的残留量低于该方法的检出限, 稻田水中的残留量为 $0.54\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

关键词 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐, 高效液相色谱-荧光法, 水样, 残留分析.

甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(甲维盐)4"-脱氧-4"表-甲氨基阿维菌素 B_{1a}/B_{1b}苯甲酸盐, 是以阿维菌素为原料经过化学结构修饰得到的一种高效生物杀虫剂, 它含有 B_{1a}和 B_{1b}两种有效成分, 通常两种成分的含量比例为 90:10, 主要用于防治甘蓝、花椰菜等蔬菜田中的小菜蛾等害虫和鱼类养殖中的寄生虫^[1]. 近年来在我国农业生产中, 甲维盐作为高毒剧毒农药的替代品而大量用于蔬菜、水稻及其它农作物的害虫防治. 甲维盐对高等动物毒性中等, 经皮毒性较低, 但对鱼、虾、蝌蚪等非靶标水生生物高毒^[2, 3], 因此其在水环境中的残留不可忽视.

甲维盐分子量大, 极难气化, 而且尚无可行的气相色谱衍生化方法, 无法采用 GC 进行分析, 目前甲维盐的残留检测大多数以 HPLC 为手段来进行. 甲维盐分子结构中具有共轭二烯结构, 在 245nm 处有强的紫外吸收, 因此可建立液相色谱-紫外检测方法, 一般采用反相液相色谱法, 选用 C₁₈反相色谱柱, 甲醇与三乙胺水溶液作流动相, 检测波长为 245nm^[4]. 紫外检测器对甲维盐的最低检测量为 0.1—10ng^[4, 5], 而甲维盐使用剂量很小, 最高残留限量(MRLs)低, 同时, 紫外检测器检测选择性不高, 易受样品基体杂质干扰, 因此 HPLC-UV 法多用于制剂中甲维盐的检测^[6—8], 而很少用于残留检测. 与紫外检测器相比, 荧光检测器更灵敏, 因此对样品量很少或浓度非常低的痕量分析特别适用, 而且由于许多物质不发射荧光, 因此 HPLC-FLD 检测法受基体干扰少. 然而由于甲维盐本身不发射荧光, 不能直接用荧光检测器检测, 而只有经荧光衍生化后, 生成能发射荧光的衍生化产物后才能用荧光检测器检测. 常见的分析方法是液液萃取、固相柱萃取(SPE)等净化方法处理样品后, 用三氟乙酸酐和 N-甲基咪唑作为衍生化剂^[9, 10], 衍生后用 HPLC-FLD 进行检测. 与 HPLC-UV 比较, 此方法大大提高了检测限, 如在甘蓝中甲维盐的最小检出量为 0.04ng, 最低检出浓度为 $0.002\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[9], 荧光检测器(FLD)由于其良好的检测灵敏度和选择性, 成为目前甲维盐的残留分析主要手段.

甲维盐在农业生产上使用越来越多, 但甲维盐的残留分析报道国外多见于水产品 and 畜禽产品上的残留分析^[11—14], 国内多见于蔬菜中的残留分析^[4, 5, 9, 10, 15], 目前关于甲维盐在水体的残留分析方法尚未见报道. 本试验旨在建立一种操作简单、快速地检测水中甲维盐残留的分析方法.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与色谱条件

Agilent1200 高效液相色谱仪配荧光检测器; N-EVAPIM 112 氮吹仪 (Organomation Associates,

2009 年 4 月 10 日收稿.

*国家“十一五”科技支撑计划项目课题(2006BAK02A0403、2007BAD87B06)和安徽省“十一五”科技攻关(08010302166)资助.

**通讯作者, E-mail: rimaohua@ahau.edu.cn

Jnc); RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

甲维盐标准品 (97.6%, 由浙江天一农化有限公司提供), 乙腈 (GR, 天津市四友生物医学技术有限公司), 无水 Na_2SO_4 (AR, 国药集团化学试剂有限公司), 氯化钠 (AR, 上海市试剂一厂), 乙酸乙酯 (AR, 汕头市西陇化工厂有限公司), 丙酮 (AR, 上海振企化学试剂有限公司), N-甲基咪唑 (上海化学试剂研究所), 三氟乙酸酐 (上海天莲精细化工有限公司) 等。

色谱柱为 EclipseXDB-C8, 4.6mm \times 150mm; 柱温 30, 流动相为乙腈 水 = 93 7. 流速为 $1.0\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 荧光检测器激发波长为 365nm, 发射波长为 475nm, 进样体积为 $20\mu\text{l}$

1.2 样品前处理

取 100ml 水样于 250ml 分液漏斗中, 加入 10g 氯化钠充分溶解, 依次用 50、40、30ml 乙酸乙酯萃取, 乙酸乙酯相通过无水硫酸钠漏斗脱水后移入 250ml 圆底烧瓶中, 旋转蒸发仪于 40 左右减压浓缩近干, 用 6ml 丙酮转移至 10mL 容量瓶中, 氮气吹干, 用 0.5ml 乙腈溶解 (超声波助溶) 待衍生化。

1.3 光照对衍生化反应影响

取 10ml 容量瓶分别编号为 A, B 两组, 每组 3 个重复, 在每个容量瓶中加入 $0.5\text{mL } 2.0\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的甲维盐标准工作溶液然后加入 $500\mu\text{l}$ N-甲基咪唑-乙腈 (1+1) 试剂, 混旋 30 s; 再加入 $500\mu\text{l}$ 三氟乙酸酐-乙腈 (1+1) 试剂, 立即将盖子盖紧, 混旋 30 s; 将 A 组避光静置 30min 立即过 $0.45\mu\text{m}$ 滤头进行 HPLC 分析, B 组不避光静置 30min, 立即过 $0.45\mu\text{m}$ 滤头进行 HPLC 分析。

1.4 衍生化反应时间

取 $0.5\text{mL } 2.0\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的甲维盐标准工作溶液进行衍生化, 衍生化反应后在 0—540min 内每隔一定时间测定其峰面积。每个处理重复 3 次, 数据用 DPS 统计软件进行方差分析并用 LSD 法作多重比较。

1.5 衍生化试剂浓度

取 $0.5\text{mL } 2.0\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的甲维盐标准工作溶液, 分别加入 N-甲基咪唑 (NMM) + 乙腈 (CAN) = 3 + 7 和三氟乙酸酐 (TFAA) + 乙腈 (CAN) = 3 + 7、N-甲基咪唑 (NMM) + 乙腈 (CAN) = 1 + 1 和三氟乙酸酐 (TFAA) + 乙腈 (CAN) = 1 + 1、N-甲基咪唑 (NMM) + 乙腈 (CAN) = 7 + 3 和三氟乙酸酐 (TFAA) + 乙腈 (CAN) = 7 + 3、N-甲基咪唑 (NMM) + 乙腈 (CAN) = 1 + 0 和三氟乙酸酐 (TFAA) + 乙腈 (CAN) = 1 + 0 等不同稀释浓度的衍生试剂进行避光反应, 30min 后测定其峰面积。每个处理重复 3 次, 数据用 DPS 统计软件进行方差分析。

1.6 标准曲线及添加回收实验

准确称取一定量的甲维盐标准品于 10ml 容量瓶中, 用乙腈定容, 得浓度为 $100\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的甲维盐标准母液。取甲维盐标准母液, 用乙腈稀释配制成 0.02、0.1、0.2、1.0、 $2.0\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的标准工作液, 分析吸取不同浓度的甲维盐标准溶液 0.5ml 于 5 个 10ml 容量瓶中, 衍生化后进行 HPLC 分析。

在空白水样中添加一定量的甲维盐标准工作溶液, 使得水中添加浓度为 0.0001、0.001、0.01 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, 每处理重复 5 次, 同时设置空白对照, 样品处理同 1.2, 计算样品添加回收率和变异系数。

1.7 环境水样的测定

采集巢湖和稻田 (施用甲维盐后) 中水样, 利用已优化的实验方法进行分析测定。

2 结果与讨论

2.1 光照对衍生化反应影响

避光和不避光衍生化反应条件下, 测定甲维盐峰面积分别为: $542.9 \pm 22.5\text{LU}$ 和 $57.1 \pm 12.6\text{LU}$, 可见避光条件下, 甲维盐衍生化产物对应的峰值响应显著高于不避光条件, 说明光照对衍生反应有抑制作用, 故衍生化反应需避光进行。

2.2 衍生化的反应时间

衍生化反应时间实验结果如表 1 与表 2 所示, 可见衍生化反应 20min 后甲维盐峰面积达到最大, 方差分析结果表明不同衍生化时间峰面积差异极显著, 多重比较显示在 95% 置信区间内 10min—180min 内衍生化反应时间相比, 峰面积差异不显著。考虑提高响应值问题, 选择 20min 作为

衍生化反应时间较合适, 衍生化与进样间隔时间不要超过 3h

表 1 方差分析结果

Table 1 Results of ANOVA

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
处理间	114091.0	20	5704.5	5.07**	1.82	
处理内	47280.0	42	1125.7			2.53
总变异	161370.5	62				

表 2 LSD法多重比较结果

Table 2 Results of multiple comparisons by LSD

衍生化反应 时间 /min	峰面积均值 (n=3) (LU)	5%显著水平	1%极显著水平	衍生化反应 时间 /min	峰面积均值 (n=3) (LU)	5%显著水平	1%极显著水平
20	542.7 ±22.6	a	A	120	504.7 ±34.7	abcd	AB
30	541.5 ±20.0	a	A	150	493.8 ±35.0	abcd	ABC
10	535.1 ±16.4	ab	A	180	487.6 ±33.6	abcd	ABC
50	529.7 ±15.0	ab	A	0	485.0 ±25.8	bcde	ABC
60	527.4 ±20.2	ab	A	210	481.7 ±34.2	bcde	ABC
70	526.5 ±21.9	ab	A	270	471.1 ±35.6	cde	ABCD
80	524.8 ±34.1	abc	A	360	449.8 ±50.0	def	BCDE
90	523.8 ±32.4	abc	A	420	430.0 ±48.7	ef	CDE
100	520.7 ±29.1	abc	AB	480	404.7 ±42.3	f	DE
40	516.5 ±44.1	abc	AB	540	394.7 ±47.1	f	E
110	515.4 ±28.8	abc	AB				

2.3 衍生化试剂浓度的确定

由表 3所示, 并非衍生化试剂的浓度越高, 衍生化产物峰值越高, 相反, 在高浓度的衍生化试剂下, 衍生化产物的峰值下降, 可见高浓度的衍生化试剂对反应表现有一定抑制作用, 其作用机理有待进一步研究. 方差分析结果显示不同浓度衍生化试剂之间相比, 峰面积差异极显著. 因此, 本试验方法确定 N-甲基咪唑-乙腈 (1+1)和三氟乙酸酐-乙腈 (1+1)的配比是最佳衍生化试剂使用浓度.

表 3 衍生化试剂浓度与峰面积关系

Table 3 Relationship between the concentration of derivatization reagent and peak area

衍生化试剂浓度	NM M-CAN (3+7)	NM M-CAN (1+1)	NM M-CAN (7+3)	NM M-CAN (1+0)
	TFAA-CAN (3+7)	TFAA-CAN (1+1)	TFAA-CAN (7+3)	TFAA-CAN (1+0)
峰面积均值 (LU)	562.4 ±2.7	576.9 ±4.4	506.9 ±5.2	453.0 ±8.1

2.4 标准曲线与方法的灵敏度

采用外标法对甲维盐进行定量计算, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 其线性回归方程为: $Y = 27.655X - 1.6901$, $R^2 = 0.9998$ 在 $0.02-2.00\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系. 以 $S/N = 3$ 时测出检出限, 仪器对甲维盐的检测限为 $0.0032\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$; 以 $S/N = 10$ 时测出方法的定量限为 $0.0036\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

表 4 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在水样中的添加回收率 (n=5)

Table 4 Recoveries of emamectin benzoate from water (n=5)

样 品	添加浓度 / $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	平均回收率 /%	变异系数 /%
水样	0.0001	115.2 ±3.5	3.02
	0.001	82.0 ±4.1	4.94
	0.01	78.4 ±8.9	11.32

2.5 方法的准确度与精密度

添加回收试验结果如表 4 所示, 添加浓度在 $0.0001\text{—}0.01\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 方法的回收率在 78.4%—115.2% 之间, 变异系数在 3.02%—11.32% 之间, 符合农药残留分析要求, 样品空白和添加样品的液相色谱图分别见图 1.

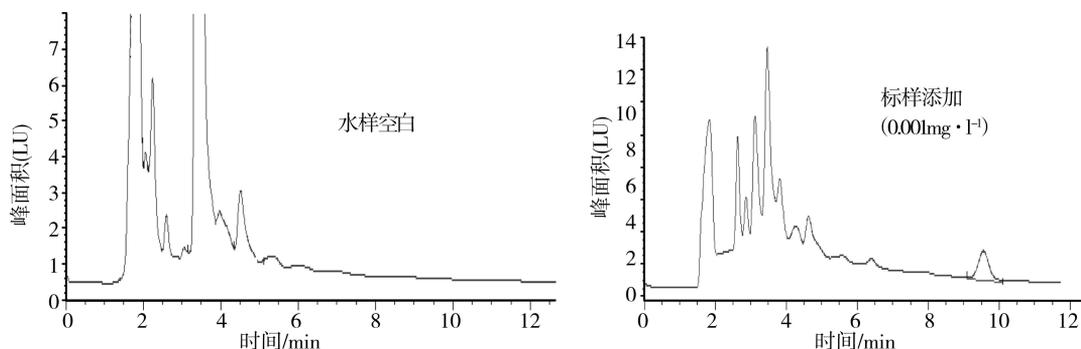


图 1 甲维盐液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of emamectin benzoate

2.6 环境样品检测

在优化的实验条件下, 测定巢湖水和稻田水中甲维盐实际含量, 实验表明甲维盐在巢湖水中的残留量低于该方法的检出限, 稻田水中的残留量为 $0.54\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

3 结论

本方法采用 N-甲基咪唑-乙腈 (NM M-CAN) (1+1)、三氟乙酸酐-乙腈 (TFAA-CAN) (1+1) 在避光条件下进行柱前衍生化, 反应 20min 后用高效液相色谱-荧光检测器测定水中甲维盐残留量, 采用荧光检测手段提高了方法的选择性, 而且前处理方法方便快捷, 衍生化反应快速稳定. 方法灵敏度、准确度、精密度均能满足农药残留分析要求.

参 考 文 献

- [1] 李本昌, 农药残留量实用检测方法手册 (第二卷). 北京: 化学工业出版社, 2001, 644
- [2] 苍涛, 赵学平, 吴长兴等, 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐对 4 种非靶生物毒性及安全性评价 [J]. 农药, 2007, 46 (7) 481—483
- [3] 魏方林, 朱金文, 李少南等, 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐乳油对环境生物的急性毒性研究 [J]. 农药科学与管理, 2008, 29 (03) 19—24
- [4] 王小丽, 王素利, 陈振山等, 黄瓜及其栽培土壤中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的残留动态研究 [J]. 农业环境科学学报, 2005, 24 (增刊) 307—310
- [5] 刘丰茂, 明九雪, 赵玉珍等, 甘蓝中甲氨基阿维菌素残留测定方法研究 [C]. 农药残留研究进展, 中国农业出版社, 2003, 176—181
- [6] 毕富春, 赵建平, 高效液相色谱法定量分析甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 [J]. 农药科学与管理, 2003, 24 (3) 13—14
- [7] 康占海, 徐妍, 陈铁春等, 4.5% 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐·高效氯氰菊酯 ME 的高效液相色谱分析 [J]. 农药, 2007, 46 (5) 328—329
- [8] 周爱英, 舒红英, 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐高效液相色谱分析 [J]. 江西化工, 2003, 4 122—124
- [9] 孙明娜, 万宇, 朱传明等, 液相色谱-荧光法测定甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在甘蓝和土壤中的残留 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (18) 7533—7534
- [10] 张艳, 吴银良, 胡继业等, 高效液相色谱-荧光检测法测定蔬菜中残留的甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 [J]. 色谱, 2008, 26 (1) 110—112
- [11] Farer L J, Hayes J, Rosen J et al., Determination of Emamectin Benzoate in Medicated Fish Feed [J]. AOAC Int., 1999, 82 (6) 1281—1287
- [12] Kim-Kang H, Bova A, Crouch L S et al., Tissue Distribution, Metabolism, and Residue Depletion Study in Atlantic Salmon Following

- Oral Administration of [3H] Emamectin Benzoate [J]. *Agric Food Chem.*, 2004, **52** (7) 2108—2118
- [13] Kim-Kang H, Crouch L S, Bova A et al., Determination of Emamectin Residues in the Tissues of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Using HPLC with Fluorescence Detection [J]. *Agric Food Chem.*, 2001, **495** 294—302
- [14] Christopher L W, Mohammad M, Terry F et al., Metabolism of $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -labeled 4"-deoxy-4"-epimethylaminoemectin B_{1a} Benzoate in Chickens [J]. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998, (26) 786—794
- [15] 王立君, 杨挺, 赵健等, 高效液相色谱法同时测定甘蓝中阿维菌素类农药的残留 [J]. *分析试验室*, 2007, **26** (增刊) 44—46

DETERMINATION OF EMAMECTIN BENZOATE RESIDUES IN WATER BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION

SHI Tao-zhong MA Xin HUA Rimao TANG Feng LI Xue-de
CAO Hai-qun WU Xiang-wei TANG Jun

(Resources and Environmental College of Anhui Agricultural University, Key Lab of Agricultural Food Safety of Anhui Province, Hefei, 230036, China)

ABSTRACT

The residue analysis method for determination of emamectin benzoate in water with HPLC-FLD after pre-column derivatization was developed. Emamectin benzoate was extracted with ethyl acetate, and the extract was derivatized with NM M-CAN (1 + 1) and TFAA-CAN (1 + 1) for 20 minutes under the dark. The derivative was detected by HPLC. The results showed that, the recoveries of emamectin benzoate was 78.4% — 115.2% and the method coefficient of variation was 3.0% — 11.3%, for spiked water samples at the concentration of 0.0001—0.01 mg · l⁻¹ emamectin benzoate. The limit of quantification (LOQ) was 0.0036 mg · l⁻¹. The residue of emamectin benzoate in the water of Chaohu lake was below the detection limit of this method, while in the water of paddy field was 0.54 mg · l⁻¹.

Keywords: emamectin benzoate, HPLC water samples, residue analysis