

高效液相色谱 – 荧光法测定甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在烟叶及土壤中的残留及消解动态

徐金丽, 尤祥伟*, 王秀国, 徐光军, 郑晓, 陈丹, 李义强

(中国农业科学院烟草研究所, 烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室, 山东青岛 266101)

摘要 [目的]建立柱前衍生高效液相色谱 – 荧光法测定烟叶和土壤中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐残留量的方法。[方法]样品经乙腈提取, 分散固相萃取净化, 以 N – 甲基咪唑和三氟乙酸酐进行柱前衍生, 衍生物用高效液相色谱 – 荧光法测定。[结果]当添加浓度为 0.000 5 ~ 1.000 0 mg/kg 时, 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的平均添加回收率均超过 90%, 相对标准偏差(RSD)为 2.3% ~ 5.5%。在鲜烟叶、干烟叶和土壤中, 方法最低检出浓度(LOQ)分别为 0.004、0.008 和 0.000 5 mg/kg。采用所建方法测定了 2014 ~ 2015 年山东、四川烟叶和土壤样品中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的消解动态及最终残留, 结果表明, 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在烟叶和土壤中消解半衰期为 4.4 ~ 5.4 和 1.6 ~ 2.6 d。按照 2.25 和 3.375 g a.i./hm² 用量, 分别施药 2 ~ 3 次, 采收间隔期 7 d 时, 烤后烟叶样品中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐残留量低于 0.2 mg/kg。[结论]该方法操作简便, 有机溶剂用量少, 符合农药残留检测技术对灵敏度、准确度及精密度的要求。

关键词 高效液相色谱 – 荧光法; 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐; 烟叶; 土壤; 残留; 消解

中图分类号 S482.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)17-070-03

Dissipation and Residue of Emamectin Benzoate in Tobacco and Soil Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to Fluorescence Detection

XU Jin-li, YOU Xiang-wei*, WANG Xiu-guo et al (Tobacco Research Institute of CAAS, Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring Controlling & Integrated Management, Qingdao, Shandong 266101)

Abstract [Objective] To establish a high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) method for the determination of emamectin benzoate residue in tobacco leaves and soil. [Method] The sample was extracted by acetonitrile and then cleaned up by dispersive solid phase extraction. After pre column derivatization with N-methyl imidazole and three trifluoroacetic anhydride, the derivatives were determined by HPLC-FLD. [Result] In the range of 0.000 5 ~ 1.000 mg/kg, the average recoveries of emamectin benzoate were higher than 90%, with the relative standard deviation (RSD) 2.3% ~ 5.5%. The limits of quantification (LOQ) of emamectin benzoate in fresh tobacco leaves, cured tobacco leaves and soil were 0.004, 0.008 and 0.000 5 mg/kg, respectively. The dissipation and residue levels of emamectin benzoate in Shandong and Sichuan in 2014 ~ 2015 were investigated using the established method. The field trials results showed that the half-lives of emamectin benzoate in tobacco leaves and soil were 4.4 ~ 5.4 day and 1.6 ~ 2.6 day, respectively. When applied at the dosage of 2.25 and 3.375 g a.i./hm² for 2 ~ 3 times, the terminal residues of emamectin benzoate in cured tobacco leaves with a pre-harvest interval of 7 days were lower than 0.2 mg/kg. [Conclusion] This method has the characteristics of simple operation, small dosage of organic solvent, which meets the requirements of sensitivity, accuracy and precision of pesticide residues detection technology.

Key words HPLC – FLD; Emamectin benzoate; Tobacco leaf; Soil; Residue; Degradation

甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(简称甲维盐)是以阿维菌素为原料,经化学合成的一种高效杀虫杀螨剂^[1],其作用机理为阻碍害虫运动神经系统传递而使其麻痹死亡,具有胃毒、触杀和一定的渗透作用。甲维盐对鳞翅目、鞘翅目、同翅目等害虫具有显著防效,在水果、蔬菜、烟草以及大田作物中得到了广泛应用^[2]。

目前,甲维盐的分析方法常采用高效液相色谱分离,紫外检测器(UV)^[3-5]或荧光检测器(FLD)^[6-7]进行检测。当使用紫外检测器(UV)进行检测时,由于杂质干扰大、灵敏度低,需要进行较为复杂的净化和浓缩步骤,程序繁琐,消耗大量有机溶剂^[8-9]。而目前报道的衍生化方法中,应用范围也以蔬菜、水果和土壤为主^[10-13]。笔者首次将分散固相萃取净化与荧光检测相结合,建立了烟草和土壤中甲维盐的分析方法,具有快速、简便、灵敏、可靠的特点,并采用所建方法研究 3.4% 甲维盐悬浮剂在烟草上应用时的消解动态与最终残留水平,为推荐该农药制定合理使用规范提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 烟草试验品种: NC89(山东青岛)、CF27

作者简介 徐金丽(1963 –),女,山东潍坊人,实验师,从事农药残留方面的研究。*通讯作者,助理研究员,博士,从事农药残留方面的研究。

收稿日期 2016-05-11

(四川西昌)。

1.2 药品、试剂及主要仪器 甲维盐(emamectin benzoate)标准品(99.0%,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司);乙腈(分析纯)、乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、去离子水、氯化钠(分析纯);衍生化试剂:N – 甲基咪唑(NMIM)、三氟乙酸酐(TFAA)和 N – 丙基乙二胺键合固相吸附剂(PSA)。3.4% 甲维盐悬浮剂(陕西上格之路生物科学有限公司)。

Waters Alliance e 2695/2475 高效液相色谱仪 – 荧光检测器(HPLC – FD)(Waters 公司);Waters Sun Fire™ C₁₈ 色谱柱(5.0 μm, 4.6 mm × 150.0 mm, Waters 公司);超声波振荡机(RSQ – 60AS, 宁波荣顺公司);千分之一电子天平(SHIMADZU – UW 420 H, 日本 Shimadzu 公司);万分之一电子天平(ER – 182 A, 日本 Tokyo 公司);回旋式振荡器(BLUD PARD WSZ – 200 A, 上海蓝豹);旋转蒸发仪(HEIDOLPH – ADVANTAGE, 德国海道尔夫)。

1.3 试验方法

1.3.1 烟叶动态试验 设 30 m² 烟田为一小区,每个处理 3 次重复。在烟草旺长中后期,按照甲维盐 3.375 g a.i./hm² 叶面喷雾,施药时保证烟叶均匀着药。于施药后 1 h、1、3、5、7、14、21、28、35、42 d 采集烟叶样品。将采集的烟叶样品去除烟梗,切成 1 cm² 左右,混匀后采用四分法留样 200 g,装入样

本容器中,粘好标签,贮存于-20℃冰柜中保存。

1.3.2 土壤动态试验。选一块15 m²的空白地块,按照甲维盐3.375 g a.i./hm²地面均匀喷雾,于施药后1 h,1、3、5、7、10、14、21、28、35、42 d 随机取点5~10个,用土钻采集0~10 cm土壤1~2 kg,除去土壤中的碎石、杂草和植物根茎等杂物,混匀后采用四分法留样300 g,装入样本容器中,粘好标签,贮存于-20℃冰柜中保存。

1.3.3 最终残留量试验。在烟草旺长后期,设30 m²烟田为一小区。按照甲维盐2.250、3.375 g a.i./hm²2个剂量叶面喷雾,分别施药2、3次(交叉施药次数和剂量,共4个处理),施药间隔期7 d。分别于最后一次施药后7、14、21 d 采集烟叶样品,在试验小区内随机采集上、中、下部正常成熟的烟叶样品不少于100片,烟叶经三段式烘烤工艺(不超过68℃)烘烤、去主脉,粉碎混匀后,采用四分法留样200 g。同时采集土壤样品,用土钻采集0~15 cm的土壤1~2 kg,除去土壤中的碎石、杂草和植物根茎等杂物,混匀后采用四分法留样300 g。分别装入样本容器中,粘好标签,贮存于-20℃冰柜中保存。每个处理重复3次,另设清水空白对照,处理间设保护带。

1.4 分析方法

1.4.1 提取。鲜烟叶:称取鲜烟叶10.0 g,盛于250 mL三角瓶中,加入80 mL乙腈,振荡提取1 h,加入6 g NaCl,振荡15 min,静置,滤纸过滤,准确量取40 mL,45℃浓缩至近干,用2 mL乙腈定容,待净化。

干烟叶:称取干烟叶2.0 g,盛于250 mL三角瓶中,加8 mL蒸馏水,轻摇使样品润湿,静置10 min。加入60 mL乙腈,振荡提取1 h,加入6 g NaCl,振荡15 min,静置,滤纸过滤,准确量取30 mL,45℃浓缩至近干,用2 mL乙腈定容,待净化。

土壤:称取土壤20.0 g,盛于250 mL三角瓶中,加入适量蒸馏水,轻摇使样品润湿,静置10 min。加入60 mL乙腈,回旋式振荡器振荡提取1 h,加入6 g NaCl,再振荡15 min,静置,滤纸过滤,准确量取30 mL,45℃浓缩至近干,用2 mL乙腈定容,经0.22 μm微膜过滤至样品瓶中,再准确吸取0.5 mL于棕色样品小瓶中,待衍生化。

1.4.2 净化。移取提取液上清液1.5 mL于盛有150 mg无水硫酸镁和25 mg PSA的1.5 mL离心管中,于漩涡混合振荡仪上漩涡振荡2 min,再以6 000 r/min离心2 min,上清液经0.22 μm有机相滤膜过滤至样品瓶中,再准确吸取0.5 mL于棕色样品小瓶中,待衍生化。

1.4.3 柱前衍生化。为避免强光照射,向待衍生化的棕色样品瓶中,分别加入0.25 mL N-甲基咪唑(NMIM)和0.25 mL三氟乙酸酐(TFAA),立即盖上瓶盖,用手振荡摇匀,避光衍生化20 min后,进行HPLC-FLD测定。

1.4.4 检测条件。Waters Alliance e 2695/2475 高效液相色谱仪-荧光检测器(HPLC-FLD);Waters Sun FireTMC₁₈色谱柱(5.0 μm,4.6 mm×150 mm);流动相:乙腈:水溶液(95:5,V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:荧光激发波

长365 nm,发射波长:475 nm;进样量:10 μL。在此条件下,甲维盐的相对保留时间16 min左右。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制 采用外标法定量。准确称取0.01 g甲维盐标准品,用乙腈溶解并定容至100 mL,配制成100 mg/L的甲维盐母液;以100 mg/L标准品母液用乙腈逐级稀释成质量浓度分别为0.002、0.020、0.100、0.200、1.000、2.000、10.000 mg/L系列标准溶液,采用“1.4.3”的方法进行衍生化,以进样浓度为横坐标,所对应的色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。线性方程 $Y=58\,715\,037X-1\,769\,997$,相关系数 $r=0.999\,8$,其中,Y为甲维盐测定峰面积,X为甲维盐进样浓度。

2.2 方法灵敏度、准确度及精密度

2.2.1 灵敏度。以最小添加浓度作为方法的最低检测浓度(LOQ),则甲维盐在鲜烟叶、干烟叶和土壤中LOQ分别为0.004、0.008、0.000 5 mg/kg。

2.2.2 准确度及精密度。用鲜烟叶、干烟叶和土壤的空白样品分别进行3个不同浓度的添加回收率试验,每个水平重复5次。按样品处理方法提取、净化、衍生后用外标法进样测定。结果表明,当添加浓度在0.004~1.000 mg/kg时,鲜烟叶中甲维盐平均添加回收率为90.7%~93.5%,RSD为2.4%~5.0%;当添加浓度在0.008~0.200 mg/kg时,干烟叶中甲维盐平均添加回收率为90.5%~92.2%,RSD为2.9%~5.5%;当添加浓度在0.000 5~0.1000 mg/kg时,土壤中甲维盐平均添加回收率为90.4%~92.5%,RSD为2.3%~4.9%(表1)。这表明该方法的准确度及精密度均符合农药残留分析要求。

表1 甲维盐农药残留检测方法的准确度及精密度

Table 1 Accuracy and precision of the detection method of emamectin benzoate residues

样品 Sample	添加浓度 Added concentration//mg/kg	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
鲜烟叶 Fresh tobacco leaf	0.004	90.7	5.0
	0.100	93.5	2.4
	1.000	93.2	2.8
干烟叶 Cured tobacco leaf	0.008	90.5	5.5
	0.020	92.2	4.3
	0.200	92.2	2.9
土壤 Soil	0.000 5	90.4	4.9
	0.010 0	91.4	3.0
	0.100 0	92.5	2.3

2.3 甲维盐在烟叶及土壤中的消解动态 于2014~2015年在山东青岛、四川南昌进行^[14]。甲维盐在山东、四川两地烟叶及土壤中的残留消解结果表明,甲维盐在烟叶和土壤中的消解曲线均符合一级动力学方程,其消解动力学参数见表2。由表2可知,甲维盐在烟叶和土壤中的半衰期均较短,分别为4.4~5.4和1.6~2.6 d,降解速率较快。

2.4 甲维盐在烟叶中的最终残留量 2014~2015年的最终残留试验结果表明,3.4%甲维盐悬浮剂按照2.250、3.375

表 2 甲维盐在烟叶和土壤中的消解动态

Table 2 Degradation dynamics of emamectin benzoate in tobacco leaves and soil

样品 Sample	试验地点 Test site	消解方程 Degradation equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	半衰期 Half life//d
烟叶 Tobacco leaf	山东	$y = 0.029 3e^{-0.128 2x}$	0.844 3	5.4
	四川	$y = 0.012 2e^{-0.157 8x}$	0.931 5	4.4
土壤 Soil	山东	$y = 0.003 8e^{-0.435 6x}$	0.953 6	1.6
	四川	$y = 0.001 5e^{-0.265 x}$	0.954 7	2.6

g a.i./hm² 分别施药 2、3 次,施药间隔期 7 d,于最后一次施药后 7、14、21 d 采集烟叶样品,并按照三段式烘烤工艺烘烤。山东、四川 2 年烟叶和土壤最终样品中甲维盐残留量均小于方法 LOQ(烟叶 0.008 mg/kg,土壤 0.000 5 mg/kg)。

3 结论

采用分散固相萃取净化、柱前衍生、高效液相色谱-荧光法测定甲维盐在烟叶及土壤中的残留量,结果表明,该方法操作简便,有机溶剂用量少,符合农药残留检测技术对灵敏度、准确度及精密度的要求。

该试验对甲维盐在烟叶和土壤中的残留消解动态及最终残留量进行了研究,结果表明,甲维盐在烟叶和土壤中降解速率较快,半衰期分别为 4.4~5.4 和 1.6~2.6 d。按照 2.250 和 3.375 g a.i./hm² 于烟草旺长中后期喷雾施药 2~3 次,安全间隔期 7 d 时,烤后烟叶样品中甲维盐残留量均低于 0.008 mg/kg。国际烟草合作研究中心(CORESTA)尚未规定甲维盐在烟草上的指导性残留限量。GB 2763—2014 规定阿维菌素在干辣椒中的最大残留限量(MRL)为 0.2 mg/kg^[15]。由于干辣椒和烟草的膳食结构比例相似,以阿维菌素在干辣椒中的 MRL(0.2 mg/kg)为参考进行风险评估,甲维盐在烟草上的使用剂量和方法用于烟草烟青虫的防治,其残留量是安全的。

参考文献

[1] 王圣印,周仙红,张安盛,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐研究进展[J]. 江西农业学报,2012,24(12):123-126.

[2] 李增梅,赵善仓,梁京芸,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水稻

田中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的残留量[J]. 分析测试学报,2014,33(1):78-82.

[3] 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,2008(21):307-310.

[4] 曹爱华,孙惠青,徐金丽,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在烟草及土壤中残留分析方法的研究[J]. 中国烟草科学,2010,31(4):64-68.

[5] SINGH G, CHANHIL G S, JYOT G, et al. Degradation dynamics of emamectin benzoate on cabbage under subtropical conditions of Punjab, India [J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2013, 91(1): 129-133.

[6] 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.

[7] 李瑞娟,于建奎,宋国春,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐微乳剂在甘蓝和土壤中的残留研究及安全使用[J]. 中国农学通报,2011,27(21):266-271.

[8] 张侃侃,胡德禹,张钰萍,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在水稻环境中的残留及消解动态[J]. 农药学报,2010,12(2):190-194.

[9] 程永,苗建强,杨凯凯,等. 加工剂型对土壤中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐检测方法及降解动态的影响[J]. 农业环境科学学报,2011,30(12):2526-2532.

[10] 于沛博,侯志广,马晓亮,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在大白菜及土壤上的残留动态研究[J]. 吉林农业(学术版),2011(4):88-90.

[11] 罗成玉,查玉兵,任俊华,等. 高效液相色谱荧光检测法测定植物性食品中阿维菌素类药物[J]. 分析仪器,2012(3):31-35.

[12] 李洪奎,陈子雷,孙平,等. 甲氨基阿维菌素在韭菜上残留研究[J]. 农药科学与管理,2013(7):30-32.

[13] XIE X, YAO F, WU Y, et al. Simultaneous analysis of three avermectins in soils by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. International journal of environmental analytical chemistry, 2012, 92(12):1417-1428.

[14] 中华人民共和国农业部农药检定所. 农药登记残留田间试验标准操作规程[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

[15] 中华人民共和国卫生部. 食品中农药最大残留限量:GB 2763—2014[S]. 北京:中国农业出版社,2014.

(上接第 20 页)

增加会有有一个最大值,但负突变可能会在 1 个峰值出现后继续增大。

4 结论

在设计对枯草芽孢杆菌进行紫外线诱变提高产品产量的试验时,常在 20~30 cm 处以 15~20 W 的功率进行间隔照射,对菌液照射到的话间隔时长大多为 10~20 s,有时也可用梯度间隔,设置 6~10 个间隔,选取致死率为 70%~80% 的存活菌种进行培养,最终产物的产量大约会提升 50% 左右,且后代基本保持稳定不变。

参考文献

[1] HUI M, DOU L N, TIAN Q, et al. Advances in application research of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2008, 36(27):11623-11624, 11627.

[2] MING L, BAO S. Progress and application of *Bacillus subtilis* in different fields [J]. Journal of northeast agricultural university, 2009, 40(9):

111-114.

[3] 马明,杜金华. 枯草芽孢杆菌酶在工业生产中的应用[J]. 山东科学, 2006,19(3):35-38.

[4] BAO Z G. Study on breeding of phytase-producing *Bacillus subtilis* and its fermentation products from cottonseed meal source [D]. Shihezi: Shihezi University, 2013:1.

[5] NIU C H, GAO Y, LI Y Q, et al. Selections of high protease-producing strain of *Bacillus subtilis* by UV mutation [J]. China brewing, 2011, 12: 67-69.

[6] XIE F X, ZHAO Y J, ZHOU K, et al. The isolation, screening and ultraviolet mutation breeding of *Bacillus subtilis* strains producing extracellular amylase [J]. ATCA agriculture boreali-sinica, 2009, 24(3):78-82.

[7] WANG Z, YANG C Y. The mutation effect of UV irradiation on a strain *Bacillus subtilis* producing α -acetolactate decarboxylase [J]. Chinese agricultural science bulletin, 2007, 23(4):95-97.

[8] YIN M H, XU H, CHENG D L, et al. Selection of high acetoin-producing strain of *Bacillus subtilis* by UV mutation [J]. China brewing, 2010(4):76-77.

[9] XU X H, SHI J H, ZHAO G G, et al. UV mutation of *Bacillus subtilis* for breeding of glucose-1-phosphate high-producing strain [J]. China dairy industry, 2011, 39(9):21-23.