

罗 婧, 施海燕, 彭文涛, 等. 恶唑酰草胺及其代谢物的残留分析方法[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 187-191.

恶唑酰草胺及其代谢物的残留分析方法

罗 婧, 施海燕, 彭文涛, 王鸣华

(南京农业大学植物保护学院农药科学系, 农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 建立了能同时测定水稻及环境中恶唑酰草胺及其3种代谢物残留量的高效液相色谱(HPLC)法。以乙腈和水的混合液作为提取溶剂, 硅胶层析柱净化, 采用高效液相色谱法以乙腈-水作为流动相, 梯度洗脱, 紫外检测器 224 nm 检测。结果表明: 恶唑酰草胺及其3种代谢物的线性范围为 0.5 ~ 20.0 mg/L, 相关系数达 0.999 3 ~ 0.999 9; 4种化合物在土壤、稻秆、糙米和稻壳中的最低检测浓度均为 0.10 mg/kg, 在稻田水中的最低检测浓度为 0.02 mg/kg, 平均回收率均为 78.2% ~ 106.9%, 变异系数为 2.0% ~ 11.7%, 符合农药残留测定要求。

关键词: 恶唑酰草胺; 水稻; 高效液相色谱; 残留分析

中图分类号: X592 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2010)01-0187-05

Residues Analytical Methods for Metamifop and Its Metabolites

LUO Jing, SHI Hai-yan, PENG Wen-tao, WANG Ming-hua

(Department of Pesticide Science, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: The high performance liquid chromatographic method was developed for the simultaneous determination of metamifop and three major metabolites in rice and environment. Residues were extracted with a mixture of acetonitrile and water, followed by cleanup with a silica gel column and determined by HPLC with a linear gradient elution program of acetonitrile and water as the mobile phase and ultraviolet detection at 224 nm. The results showed that the linear range of metamifop and its metabolites were from 0.5 mg/L to 20 mg/L, with the correlation coefficients being 0.999 3 to 0.999 9. The minimum detectable concentration of the 4 analytes in soil, rice straw, rice hulls and unpolished grain samples were all 0.10 mg/kg and 0.02 mg/kg in paddy water samples, respectively. Average recoveries were 78.2% to 106.9%, with the coefficients of variation ranging from 2.0% to 11.7%. The results meet the requirement of pesticide residue analysis.

Key words: metamifop; rice; high performance liquid chromatography (HPLC); residue analysis

恶唑酰草胺(Metamifop)是由韩国 Dongbu Han-nong 化学公司报道的一种新的芳氧苯氧丙酸酯类除草剂, 可极好地防除大多数一年生禾本科杂草, 并且对水稻安全, 可有效防除水稻田中的主要杂草, 如

稗草、千金子、马唐和牛筋草, 重点用于移栽和直播稻田除草^[1-2]。恶唑酰草胺低毒, 对环境安全, 有广泛的混性, 是一个很有发展前景的除草剂, 其在环境中主要有3个代谢产物, 分别为 HFMPA、HPFM-PA 和 6-CBO(图1)。目前恶唑酰草胺的相关报道很少, 曾仲武等曾报道过恶唑酰草胺的合成方法^[3], 恶唑酰草胺的作用机制也有一些报道^[4-6]; 但是关于恶唑酰草胺及其代谢产物的残留分析方法国内外均未见报道。探明恶唑酰草胺在稻田中的残留动态和水稻植株中的残留, 可为注册登记提供科学

收稿日期: 2009-06-10

基金项目: 大学生创新性实验计划(0702A04)

作者简介: 罗 婧(1981-), 女, 吉林吉林人, 硕士研究生, 从事农药残留检测研究。(E-mail) 2007102119@njau.edu.cn

通讯作者: 王鸣华, (Tel) 025-84395479; (E-mail) wangmha@njau.edu.cn

依据,本研究拟建立恶唑酰草胺及其代谢物在稻田

水体、土壤、稻秆、糙米和稻壳中的残留分析方法。

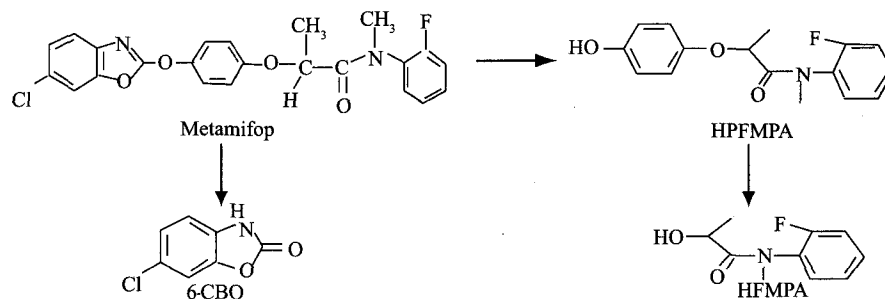


图1 恶唑酰草胺及其代谢产物的化学结构式

Fig.1 Chemical structures of metamifop and its metabolites

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(带可变波长紫外检测器,美国 Agilent 公司);色谱柱,即 Eclipse XDB-C₁₈柱(15.0 cm × 4.6 mm × 5.0 μm);HY-6 双层调速多用振荡器(江苏金坛市荣华仪器有限公司);R-200 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司);N-EVAP 111 氮吹仪(美国 Organomation 公司);BS110S 电子天平(北京塞多利斯天平有限公司);玻璃层析柱(10 mm × 140 mm)。

乙腈(色谱纯, Fisher Chemicals 公司);水为超纯水;丙酮、乙腈、二氯甲烷、氯化钠、无水硫酸钠(130 °C下烘 5 h,置于干燥器内备用)均为分析纯;柱层析硅胶(200 ~ 300 目,130 °C活化 4 h)。恶唑酰草胺标准品(质量分数 97%)、HPFMPA 标准品(质量分数 99.0%)、HFMPA 标准品(质量分数 99.0%)、6-CBO 标准品(质量分数 99.0%)均由韩国 Dongbu Fine 化学公司提供。

1.2 分析步骤

1.2.1 样品前处理方法 稻田水:量取 100 ml 水样于分液漏斗中,加入 5 g NaCl,分别加入 50 ml、40 ml 二氯甲烷萃取 2 次,合并提取液,经无水硫酸钠过滤,旋转蒸发仪浓缩近干,氮吹仪吹干,乙腈定容 5 ml。土壤:称取样品 20 g,加入 50 ml 乙腈和 10 ml 水,振荡提取 1 h,抽滤(乙腈 10 ml 洗涤滤渣)至盛有 5 g 氯化钠的具塞量筒中,剧烈震荡 1 min,静置 15 min,吸取上层有机相经无水硫酸钠过滤,旋转蒸发仪浓缩近干,氮吹仪吹干,乙腈定容至 2 ml。稻秆、糙米、稻壳:称取样品(稻秆 20 g、糙米 20 g、稻壳

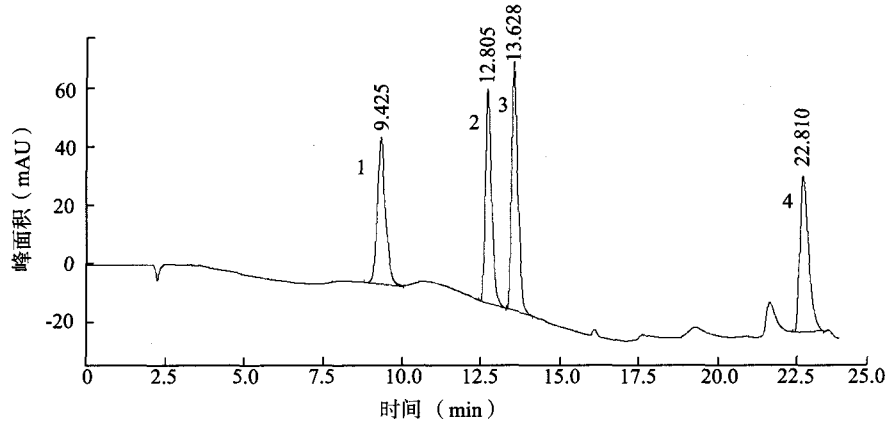
10 g),加入乙腈(稻秆 100 ml、稻壳 100 ml、糙米 50 ml),10 ml 水,振荡提取 1 h,抽滤(乙腈 10 ml 洗涤滤渣)至盛有 5 g 氯化钠的具塞量筒中,剧烈震荡 1 min,静置 15 min,吸取上层有机相经无水硫酸钠过滤,旋转蒸发仪浓缩近干,氮吹仪吹干,2 ml 二氯甲烷溶解待柱层析净化。依次用 2 cm 无水硫酸钠、3 g 硅胶、2 cm 无水硫酸钠装柱,先用 10 ml 二氯甲烷预淋柱子,待溶剂液面到达柱吸附层表面时立即将 2 ml 二氯甲烷溶解后的样品溶液加到层析柱上,当液面到达柱吸附层表面时再用 2 ml 二氯甲烷洗涤烧瓶倒入层析柱中,加入 20 ml 二氯甲烷淋洗层析柱,弃去淋出液。加入 20 ml 二氯甲烷:丙酮(体积比 8:2)洗脱,收集淋出液,旋转蒸发仪浓缩近干,氮吹仪吹干,乙腈定容至 2 ml。

1.2.2 高效液相色谱分析条件 以乙腈、水为流动相,采用梯度洗脱程序(表 1),流速为 0.8 ml/min,进样量 20 μl,紫外检测波长为 224 nm。在此色谱条件下,恶唑酰草胺及其 3 种代谢物的保留时间为:HFMPA, 9.4 min;6-CBO, 12.8 min;HPFMPA, 13.6 min;Metamifop, 22.8 min。色谱峰形及 4 种化合物分离度均较好(图 2)。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间 (min)	乙腈 (%)	水 (%)
0	15	85
4.00	32	68
6.00	32	68
12.00	60	40
14.00	75	25
24.00	75	25



1:HFMPA; 2:6-CBO; 3: HPFMPA; 4: 恶唑酰草胺。

图2 恶唑酰草胺及其代谢物混合标样色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of the mixed sample of metamifop and its metabolites

2 结果

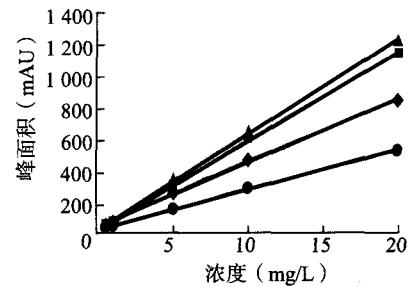
2.1 标准曲线与最小检出量

分别准确称取 50.0 mg (精确至 0.000 2 g) 恶唑酰草胺及其代谢物 HFMPA、HPFMPA、6-CBO 的标准样品至 100 ml 容量瓶中,用乙腈溶解定容配制标准储备溶液。再用乙腈梯度稀释为 0.5 mg/L、1.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L 的系列混合标准工作溶液,在 1.2.2 所述色谱条件下进行测定,以浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线。由标准曲线(图 3)可见,恶唑酰草胺及其代谢物 HFMPA、HPFMPA、6-CBO 在 0.5 ~ 20.0 mg/L 时,色谱峰面积与农药浓度呈线性关系,恶唑酰草胺及其代谢物 HFMPA、HPFMPA、6-CBO 的标准曲线回归方程分别为: $Y = 60.3850x - 5.6099$ ($r = 0.9999$)、 $Y = 26.7080x + 0.6730$ ($r = 0.9997$)、 $Y = 64.1780x + 2.3033$ ($r = 0.9996$)、 $Y = 43.1380x + 17.0510$ ($r = 0.9993$);按 3 倍噪音计算,最小检出量分别为 0.432 ng、0.502 ng、0.268 ng、0.317 ng,可满足定量分析需要^[7]。

2.2 添加回收率与相对标准偏差

在空白样品中添加恶唑酰草胺及其代谢物标准溶液,稻田水添加浓度为 0.02 mg/kg 和 1.00 mg/kg,土壤、稻秆、糙米和稻壳添加浓度均设置 0.10 mg/kg 和 2.00 mg/kg 2 个浓度,按照 1.2 所述提取及测定步骤,每个浓度设 5 个重复,进行添加回收率试验。结果(表 2)表明,恶唑酰草胺及其代谢物在稻田水、土壤、稻秆、糙米和稻壳中的平均回收率

为 78.2% ~ 106.9%,变异系数为 2.0% ~ 11.7%,在稻田水中的最低检测浓度为 0.02 mg/kg;在土壤、稻秆、糙米和稻壳中的最低检测浓度均为 0.10 mg/kg,符合农药残留分析要求^[8]。



—●— HFMPA; —◆— 6-CBO; —▲— HPFMPA; —■— 恶唑酰草胺

图3 恶唑酰草胺及其代谢物的标准曲线

Fig.3 The standard curve of metamifop and its metabolites

3 讨论

3.1 检测波长的选择

对恶唑酰草胺及其 3 种代谢物的乙腈溶液分别进行紫外扫描,得 HFMPA 的 $\lambda_{\max} = 223$ nm、6-CBO 的 $\lambda_{\max} = 234$ nm、HPFMPA 的 $\lambda_{\max} = 225$ nm、恶唑酰草胺的 $\lambda_{\max} = 238$ nm。分析紫外吸收光谱图,在 224 nm 处恶唑酰草胺及其 3 种代谢物均有很好的吸收,而且灵敏度高,故兼顾 4 者选择 224 nm 作为恶唑酰草胺及其 3 种代谢物的最佳检测波长。

3.2 流动相配比的选择

常用的流动相为甲醇/水^[9-10]或乙腈/水^[11-13],本研究在 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱上,选用了不同比

例的甲醇+水、乙腈+水、乙腈+甲醇+水作为流动相,对样品进行分离度试验,同时尝试在流动相中加入少量四氢呋喃或磷酸来改善峰形以及4种化合物之间的分离,但是流动相中加入四氢呋喃或者磷酸的效果并不理想。结果表明,用乙腈+水作流动相泵的操作压力低,色谱峰尖锐,分离时间短,并且分离效果较甲醇+水和乙腈+甲醇+水好。由于恶唑酰草胺与其3种代谢物之间的极性差异,导致恶唑酰草胺的保留时间太长,而其3种代谢物出峰又较早,并且保留时间彼此比较接近容易造成出峰重叠,因此

采用等度洗脱很难找到一个适宜的溶剂强度使极性相差很大的这4个化合物在合理的时间内全部流出色谱柱,并具有良好的分离度。所以,采用梯度洗脱不但使保留时间比较接近的3种代谢物能够很好地分离,而且能避开样品中杂质的干扰。为了在达到有效分离的情况下尽可能缩短分析时间,可在洗脱14 min后将乙腈比例加大至75%,使恶唑酰草胺能较快出峰(出峰时间为22.8 min),峰形尖锐,并且基线比较平稳,与其他杂质峰没有重叠。

表2 恶唑酰草胺及其代谢物的添加回收率($n=5$)

Table 2 Recovery rates of metamifop and its metabolites ($n=5$)

样品	添加浓度 (mg/kg)	恶唑酰草胺		HFMPA		HPFMPA		6-CBO	
		回收率 (%)	变异系数 (%)	回收率 (%)	变异系数 (%)	回收率 (%)	变异系数 (%)	回收率 (%)	变异系数 (%)
稻田水	0.02	86.5	6.75	106.9	5.6	86.5	9.9	101.7	7.8
	1.00	97.0	11.20	104.8	4.0	92.8	11.7	97.3	5.6
土壤	0.10	87.3	5.50	82.1	9.6	104.9	6.3	91.1	6.8
	2.00	94.2	7.36	94.2	8.9	97.4	4.3	96.0	6.4
稻秆	0.10	90.3	2.10	80.0	9.9	78.2	7.9	88.9	6.7
	2.00	95.0	2.00	82.1	9.3	89.0	8.2	80.6	5.9
糙米	0.10	91.5	7.30	85.8	6.7	88.9	7.7	80.2	5.4
	2.00	97.2	2.80	81.8	3.3	82.7	2.2	84.3	2.9
稻壳	0.10	89.0	10.60	87.3	10.7	85.2	11.4	88.5	8.5
	2.00	82.4	7.90	90.8	7.6	86.2	7.8	89.4	11.4

3.3 样品前处理方法的优化

3.3.1 提取溶剂的选择 根据恶唑酰草胺及其3种代谢物的性质,水样中分别选用二氯甲烷和乙酸乙酯进行液-液萃取。结果表明,使用二氯甲烷作提取溶剂时样品的添加回收率高于乙酸乙酯,提取液中的杂质峰较少,对目标峰无干扰,并且液-液萃取过程较简单,故选择二氯甲烷作为水样的提取溶剂。土壤、稻秆、糙米、稻壳样品分别选用丙酮-水、甲醇-水、乙腈-水的混合液进行振荡提取,试验结果表明,前2种提取剂对样品中的色素、脂类等杂质提取较多,而选用乙腈-水的混合液作提取剂可大大降低色素等杂质的提取量,既减少了杂质的影响,又具有较高的回收率。

3.3.2 净化方法的选择 在农药残留测定中,常用的净化方法有液-液分配法、柱层析法、固相萃取(SPE)法等^[14-18]。液-液分配法简单,但对植物样品的净化效果较差,因为稻秆、糙米和稻壳样品提取液中干扰杂质太多。本研究曾用 C_{18} (500 mg)固相萃

取小柱,以甲醇/水的体系进行淋洗,但不能从柱上完全洗脱恶唑酰草胺,回收率不理想。本研究选用硅胶柱层析进行净化,根据恶唑酰草胺及其3种代谢物的极性选用了二氯甲烷-丙酮、二氯甲烷-甲醇混合液进行淋洗试验。结果表明,二氯甲烷-甲醇混合液虽然能将恶唑酰草胺及其3种代谢物淋洗下来,但由于甲醇为强极性溶剂,淋洗下来的杂质对样品的干扰严重,影响样品的回收率;而采用二氯甲烷-丙酮混合液淋洗效果较好,反复试验,最后确定采用二氯甲烷:丙酮(体积比8:2)20 ml洗脱,不但净化效果比较理想,而且4种化合物均得到了比较满意的回收率。

本研究采用高效液相色谱法同时测定稻田水、土壤、稻秆、糙米和稻壳中的恶唑酰草胺及其3种代谢物的残留。该方法操作简便、快速,能同时提取、净化和检测恶唑酰草胺及其3种代谢物,且重现性好。该方法的灵敏度和准确度均能达到农药残留分析的要求。

参考文献:

- [1] 刘长令. 世界农药大全除草剂卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002:395.
- [2] 石小清, 柏亚罗, 顾 群. 2003年 BCPC 植保大会介绍的农药新品种[J]. 现代农药, 2004, 3(1):36-39.
- [3] 曾仲武, 姜雅君. 新稻田除草剂 Metamifop[J]. 农药, 2004, 43(7):327-328.
- [4] 苏少泉. ACCase 特性、功能及其抑制除草剂发展与杂草抗性[J]. 农药研究与应用, 2006, 10(6):1-8.
- [5] 刘远雄, 邹本勤, 柴宝山, 等. 除草剂研究开发的新进展与发展趋势[J]. 农药, 2007, 46(10):649-652.
- [6] CHO G Y, JANG H S, KIM J S, et al. Herbicide composition containing cyhalofop and metamifop as effective ingredient and method of controlling grassy weeds using same [P]. KR:2003071215, 2003-09-03.
- [7] 农业部农药检定所. 农药残留量实用检测方法手册[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995:28-31.
- [8] NY/T788-2004 农药残留试验准则[S].
- [9] 郑和辉, 叶常明. 环境样品中乙草胺和丁草胺的残留分析[J]. 中国环境科学, 2001, 21(3):217-220.
- [10] 余向阳, 骆爱兰, 储瑞武, 等. 高效液相色谱法测定葡萄中嘧霉胺的残留量[J]. 江苏农业学报, 2004, 20(4):268-270.
- [11] 陈 莉, 戴荣彩, 陈家梅, 等. 四唑嘧磺隆水分散粒剂在稻田环境中的残留动态[J]. 农药, 2006, 45(3):186-188.
- [12] 刁传芸, 孙立荣, 常有宏, 等. 梨中吡虫啉的高效液相色谱分析[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6):638-641.
- [13] LI F S, MARTENS D, KETTRUP A. Simultaneous determination of sixteen phenylurea herbicides in water by high performance liquid chromatography and solid phase extraction[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2001, 19(6):534-537.
- [14] 岳永德. 农药残留分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004:27-43.
- [15] 刘 莉, 罗 军. 基质效应对气相色谱分析有机磷农药残留的影响和解决方法[J]. 江西农业学报, 2009, 21(7):146-148.
- [16] 任晓萍, 余向阳, 蔺 经, 等. 桃中多菌灵残留动态和最终残留分析[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(3):665-667.
- [17] 张晓强, 武中平. 气相色谱法测定果汁中甲胺磷的残留量[J]. 江苏农业科学, 2009(3):348-349.
- [18] 迟志娟, 任晓萍, 徐敏清, 等. 青菜及甘蓝中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐残留动态研究[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(4):910-914.