

秋葵中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐残留及消解动态

李红艳, 钱 训, 陈勇达, 赵旭东, 李安英, 郑振山*

[河北省农林科学院遗传生理研究所, 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(石家庄), 石家庄 050051]

摘要: 目的 建立高效液相色谱-串联质谱法测定秋葵中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐残留量的分析方法, 并研究其在秋葵中的消解动态规律和最终残留。**方法** 样品采用乙腈进行提取, N-丙基乙二胺(n-propyl ethylenediamine, PSA)净化, 以 0.05%甲酸水-甲醇作为流动相梯度洗脱分离, 在选择反应检测扫描(selective reaction monitoring, SRM)模式下扫描定性, 标准曲线外标法定量, 分析了河北、贵州的消解动态和最终残留样品。**结果** 在浓度为 0.001~1.00 mg/kg 的添加水平下, 秋葵中的甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的回收率为 104.7%~107.5%, 变异系数为 0.73%~1.26%, 检出限(limit of detection, LOD)为 1.0×10^{-12} g, 定量限(limit of quantification, LOQ)为 0.001 mg/kg。2018年在河北、贵州两地进行的消解动态试验表明, 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在秋葵上的半衰期分别为 13.3、8.3 d, 最终残留试验结果显示不同收获期秋葵中甲氨基阿维菌素苯甲酸盐最高残留量为 0.010 mg/kg。**结论** 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐用于防治秋葵中斜纹夜蛾等害虫, 推荐使用 3.4%甲维盐微乳剂, 施药剂量 3.0 g a.i./hm², 最多施药 2 次, 安全间隔期 3 d, 收获期的秋葵食用安全。

关键词: 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐; 秋葵; 残留消解; 安全间隔期;

Residue and degradation dynamics of emamectin benzoate in okra

LI Hong-Yan, QIAN Xun, CHEN Yong-Da, ZHAO Xu-Dong, LI An-Ying, ZHENG Zhen-Shan*

[Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products (Shijiazhuang), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shijiazhuang 050051, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of emamectin benzoate in okra by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and study the degradation dynamics and final residue of emamectin benzoate in okra. **Methods** The samples were extracted with acetonitrile, purified by n-propyl ethylenediamine, using 0.05% formic acid water-methanol as the mobile phase for gradient elution separation, the samples were identified by scanning in selective reaction monitoring (selective reaction monitoring, SRM) mode and quantified by standard curve external standard method. The degradation dynamics and final residual field samples in Hebei and Guizhou were analyzed. **Results** At the added level of 0.001–1.00 mg/kg, the recoveries of emamectin benzoate in okra were 104.7%–107.5%, the coefficient of variation was 0.73%–1.26%, the limit of detection (LOD) of emamectin benzoate was 1.0×10^{-12} g and the limit of quantification (LOQ) was 0.001 mg/kg. The digestion dynamic tests in Hebei and Guizhou in 2018 showed that the half-life of emamectin benzoate in okra were 13.3 days and 8.3 days. In the final residual test, the largest residues of emamectin benzoate in okra in different harvest periods was 0.010 mg/kg. **Conclusion** Emamectin benzoate is used to control *Spodoptera litura* and other pests in okra. It is

*通信作者: 郑振山, 副研究员, 主要研究方向为农药残留实验及农产品质量安全。E-mail: zhenshanzheng@126.com

*Corresponding author: ZHENG Zhen-Shan, Associate Professor, Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China. E-mail: zhenshanzheng@126.com

recommended to use 3.4% emamectin benzoate microemulsion with an application dosage of 3.0 g ai/hm². with a maximum application time of 2 times and a safe interval of 3 days. The okra is safe to eat in harvest .

KEY WORDS: emamectin benzoate; okra; residues digestion; safety interval

0 引言

秋葵,锦葵科一年生草本植物,含有大量的维生素、矿物质、黄酮和生物碱等,具有非常高的食用价值和药用价值,被誉为最佳的保健蔬菜之一^[1-3],深受消费者的喜爱,具有广阔的开发前景。但是,秋葵种植以分散农户为主,管理缺少规范,导致秋葵的生长过程中容易发生病虫害,严重影响秋葵的品质和产量。当前,我国农业主管部门没有用于秋葵的农药登记品种,因而无法满足秋葵中病虫害的防治需要,也给秋葵的食用安全带来了潜在的风险。氨基阿维菌素苯甲酸盐,简称甲维盐,是以微生物的发酵产品阿维菌素为基础合成的一种杀虫、杀螨剂^[4]。它具有超高效、低毒、低残留等生物农药的特点^[5]。其作用机制是增强神经递质的作用,让大量的氯离子进入神经细胞,使细胞功能丧失并扰乱神经传导,当幼虫与药剂接触后会很快停止取食,产生不可逆转的麻痹^[6],对果蔬、棉花、烟草和水稻等作物上的多种害虫、尤其是鳞翅类具有良好的防治效果^[7-9],还能用于防治秋葵中斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、烟青虫等虫害。

随着甲维盐在蔬菜上的使用量逐年增加,其残留问题已引起人们越来越多的关注。目前,已有甲维盐在烟草、水稻、小青菜等作物中的残留量分析方法方面的研究^[10-11],前处理方法多采用丙酮-水或乙酸乙酯提取,经硅胶和活性炭混合物层析柱净化^[12]或者 PCX 固相萃取柱净化^[13]等,测定用到液相色谱仪^[14-15]、液相色谱-质谱仪^[16-17]等,但未见甲维盐在秋葵中的残留检测的研究。因此,本研究采用 QuEChERS(quick、easy、cheap、effective、rugged、safe)方法来进行秋葵中的甲维盐提取和净化,结合高效液相色谱-串联质谱技术,实现了秋葵中甲维盐的准确检测,该方法步骤简单,分析周期快,有机溶剂用量少,对环境和人员危害小,准确度和精密度符合残留试验准则要求,可用于农产品中甲维盐残留检测,以期对甲维盐在秋葵上的合理使用提供技术支撑,并评估甲维盐在秋葵上的安全性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

TSQ Quantum Ultra 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);DT5-2 离心机(北京时代北利离心机有限公司);UMV-2 多功能漩涡混合器(北京优

晟联合科技有限公司);YP502N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

甲维盐[97.7%,(B_{1a}: 94.6%, B_{1b}: 3.1%, 以下甲维盐含量均以甲维盐 B_{1a} 计)](沈阳农药检验中心);乙腈(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司);甲酸(色谱纯,天津市光复精细化工研究所);无水硫酸镁、氯化钠(分析纯,天津市永大化学试剂有限公司);N-丙基乙二胺(分析纯,天津欧姆尼基因科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验

2018年在河北省石家庄市、贵州省贵阳市2地设置试验小区开展消解动态和最终残留田间试验。每个试验处理设置3个重复小区,面积15 m²,另设对照小区。

秋葵消解动态试验按推荐剂量4.5 g a.i./hm²在秋葵虫害发生初期施药,施药1次,施药后0、1、3、7、14、21、30 d采集样品;最终残留试验设2个施药剂量,低剂量为3.0 g a.i./hm²,高剂量为4.5 g a.i./hm²,施药2、3次,末次施药后1、3、5、7 d采集秋葵样品和对照样品。

1.2.2 标准溶液配制

将甲维盐标准品用乙腈配制成100 μg/mL的标准储备液,样品分析时用乙腈稀释储备液制成标准工作溶液。

1.2.3 样品提取与净化

称取5.0 g匀浆后的样品于50 mL离心管中,加入5 mL水、10 mL乙腈,2500 r/min剧烈震荡1 min,加入4.0 g无水硫酸镁、1.0 g氯化钠摇匀、2500 r/min剧烈震荡1 min,3400 r/min下离心5 min。

取上清溶液1 mL,加入150 mg无水硫酸镁、25 mg PSA混匀,在2500 r/min剧烈震荡1 min,3400 r/min下离心5 min,经0.22 μm微孔滤膜过滤后,供高效液相色谱-质谱联用仪测定。

1.2.4 仪器条件

色谱条件色谱柱:Atlantis® T3(150 mm×2.1 mm, 3 μm);柱温:30 °C;进样量:5 μL;流动相:A:0.05%甲酸水溶液,B:甲醇,梯度洗脱程序见表1。

质谱条件离子源正离子(electron spray ionization, ESI+);离子源温度:350 °C;毛细管温度:350 °C;电喷雾电压:3800 V;雾化气体:氮气;雾化气体压力:鞘气35 Arb,辅助气:15 Arb;碰撞气体:氩气;碰撞气压力:1.5 mTorr。质谱检测参数如表2。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0.0	0.2	90	10
2.5	0.2	70	30
6.0	0.2	0	100
10.0	0.2	0	100
10.1	0.2	90	10
15.0	0.2	90	10

2 结果与分析

2.1 方法优化

本研究考察了水-甲醇和水-乙腈 2 种流动相体系对甲维盐色谱保留行为的影响,并研究了不同浓度甲酸对甲维盐质谱信号响应强度的影响。研究表明,水-甲醇体系洗脱时甲维盐的峰形要优于水-乙腈体系,见图 1 和图 2,在水中添加体积分数为 0.05~0.2%的甲酸后,可以改善甲维盐离子化效率,因而信号强度更高,而不同浓度的甲酸对于离子化效率的影响差别不大,因此最终选择了 0.05% 甲酸水溶液-甲醇的流动相。在试验中还研究了不同梯度洗脱条件下,在 1.2.4 液相色谱条件进行洗脱,获得的甲维盐色谱峰峰型对称。

表 2 甲维盐离子检测参数
Table 2 Conditions of emamectin benzoate ion pair

化合物名称	保留时间/min	定量离子对(m/z)	定性离子对(m/z)	源内碎裂电压/V	碰撞气能量/V
甲维盐	9.28	886.4/158.0	886.4/126.0	28	163/163

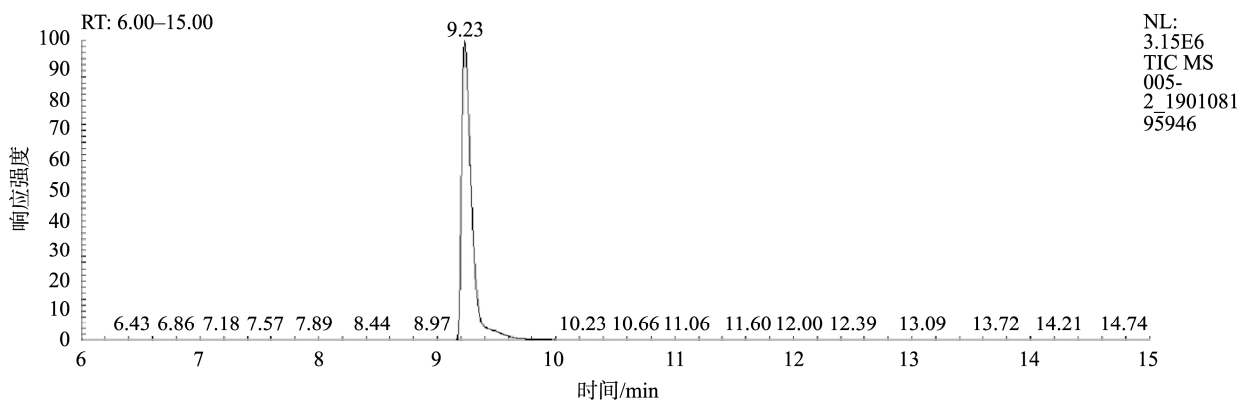


图 1 水-甲醇体系中甲维盐色谱图

Fig.1 Chromatogram of emamectin benzoate in water-methanol system

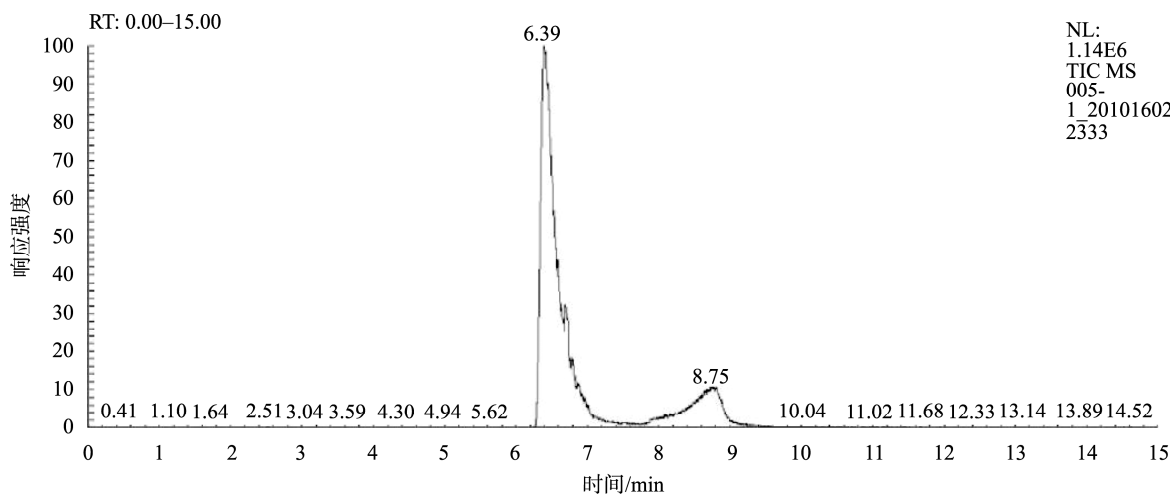


图 2 水-乙腈体系中甲维盐色谱图

Fig.2 Chromatogram of emamectin benzoate in water-acetonitrile system

2.2 方法线性范围、准确度及精密度

用乙腈稀释甲维盐储备液至浓度为 0.0005、0.005、0.05、0.1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液, 开展线性试验。在 0.0005~0.5 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内, 甲维盐的峰面积(Y)对质量浓度(X, $\mu\text{g/mL}$)作图, 见图 3。线性回归方程为 $Y=5.36e^8X+1.13e^6$, $r^2=0.9995$, 线性关系良好, 按 3 倍信噪比($S/N=3$)计算, 甲维盐的仪器检出限(limit of detection, LOD)为 1.0×10^{-12} g。

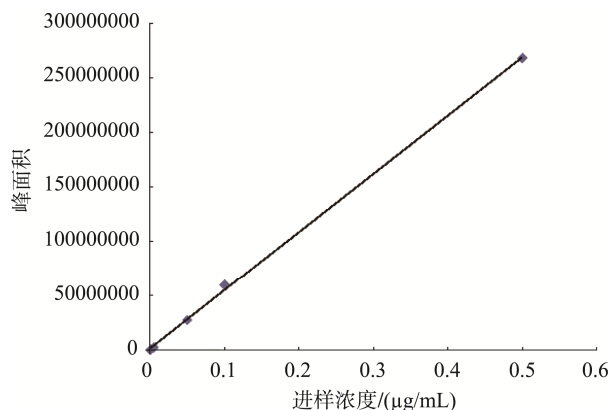


图 3 甲维盐标准曲线

Fig.3 Standard curve of emamectin benzoate

取秋葵空白样品, 开展添加回收率试验, 添加质量浓度为 0.001、0.010 和 1.000 mg/kg 等 3 个水平, 见表 3, 结果显示甲维盐在秋葵中的回收率在 105%~108%之间, 相对标准偏差在 0.73~1.26%之间。根据添加回收率试验, 在秋葵中的甲维盐的最低检出浓度(LOQ)为 0.001 mg/kg, 方法准确度和精密度均能满足 NY/T 788—2018《农药残留试

验准则》^[18]的要求, 秋葵空白基质添加甲维盐的色谱图见图 4, 可以看出甲维盐色谱峰无干扰, 能够用于秋葵中甲维盐残留量的分析测定。

表 3 甲维盐在秋葵中的添加回收率($n=5$)
Table 3 Recoveries of emamectin benzoate in okra ($n=5$)

添加浓度/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
0.001	107.0	0.78
0.010	107.5	1.26
1.000	104.7	0.73

2.3 甲维盐在秋葵中的消解动态

2018 对河北和贵州 2 地的消解动态试验样品进行了分析测定(结果见表 4)。2 地消解动态试验样品残留量检测结果均符合一级动力学特征, 河北试验点施药当天甲维盐在秋葵上的原始沉积量为 0.007 mg/kg, 残留量按 $C=0.00313e^{-0.0522t}$, 相关系数 $r=-0.7363$, 半衰期为 13.3 d; 贵州试验点药当天甲维盐在秋葵上的原始沉积量为 0.012 mg/kg, 残留量按 $C=0.00700e^{-0.0835t}$, 相关系数 $r=-0.8928$, 半衰期为 8.3 d。2 组试验数据显示甲维盐在秋葵样品中的消解速率有一定的差异, 可能与河北、贵州 2 地不同的温度、湿度相关, 但甲维盐在 2 地的半衰期均较短, 属于易降解农药, 2 地施药 7 d 后的秋葵样品中的消解率分别达到 86%和 75%, 14 d 后甲维盐在秋葵样品中的残留量降至 0.001 mg/kg 以下。

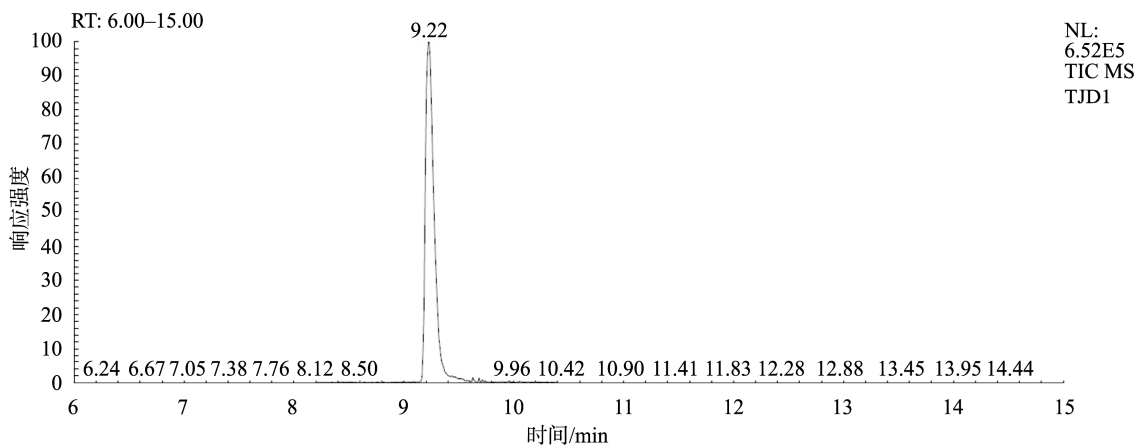


图 4 秋葵添加甲维盐色谱图

Fig.4 Chromatogram of emamectin benzoate spiked in okra

2.4 甲维盐在秋葵中的最终残留试验

按登记最高剂量3 g a.i./hm²以及1.5倍剂量4.5 g a.i./hm², 施药2~3次, 施药间隔7 d, 距最后1次施药后1、3、5、7 d 分别进行采集分析, 最终残留结果见表5, 结果显示, 秋葵中甲维盐的残留量均较低, 河北试验样品最终残留值为<0.001~0.010 mg/kg, 贵州试验样品最终残留值为<0.001~0.008 mg/kg, 2地残留值均低于我国标准中规定甲维盐在茄果类蔬菜上的最大残留限量值(maximum residue limit, MRL)为0.02 mg/kg^[19], 表明甲维盐在秋葵中使用是安全的。

3 结论与讨论

本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法测定甲维盐

残留量的方法, 并采用该方法分析了秋葵施用甲维盐后的消解动态和最终残留样品, 消解动态试验结果表明: 秋葵中甲维盐的残留量随着取样天数的增加逐渐降低, 其消解动态规律符合一级动态学方程, 甲维盐在秋葵上的半衰期分别为: 河北点13.3 d、贵州点8.3 d, 较易降解。河北、贵州2地最终残留结果显示, 甲维盐在秋葵中的残留量为<0.001~0.010 mg/kg。我国GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[19]规定甲维盐的在茄果类蔬菜上的MRL值为0.02 mg/kg, 而秋葵中最终残留量低于此MRL值, 建议3.4%甲维盐微乳剂在秋葵上使用时, 药剂量2.25~3 g a.i./hm², 最多施药2次, 安全间隔期3 d, 食用秋葵有安全保障。

表4 秋葵中甲维盐的消解动态
Table 4 Degradation dynamic of emamectin benzoate in okra

时间/d	河北		贵州	
	残留量/(mg/kg)	消解率/%	残留量/(mg/kg)	消解率/%
0	0.007	—	0.012	—
1	0.004	43	0.008	33
3	0.002	71	0.005	58
7	0.001	86	0.003	75
14	<0.001	>86	<0.001	>91
21	<0.001	>86	<0.001	>91
30	<0.001	>86	<0.001	>91

表5 秋葵中甲维盐的最终残留量
Table 5 Final residues of emamectin benzoate in okra

施药剂量/(g a.i./hm ²)	施药次数/次	采收间隔期/d	河北/(mg/kg)	贵州/(mg/kg)
3.0	2	1	0.007	0.008
		3	0.008	0.005
		5	0.001	0.006
		7	0.005	0.005
		1	0.005	0.004
	3	3	0.004	0.001
		5	0.002	0.001
		7	<0.001	<0.001
		1	0.003	<0.001
		3	0.001	<0.001
4.5	2	5	0.001	<0.001
		7	<0.001	<0.001
		1	0.007	0.004
	3	3	0.010	0.002
		5	0.002	0.001
		7	<0.001	0.001

参考文献

- [1] 王芳, 吴越, 马浪, 等. 五种秋葵营养成分及活性物质含量的分析比较[J]. 食品工业科技, 2017, 38(10): 356-359.
WANG F, WU Y, MA L, *et al.* Analysis and comparison of nutrients and active substances in five kinds of okra [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(10): 356-359.
- [2] 张鲜艳, 崔红利, 焦稚雅, 等. 不同秋葵品种营养成分分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(2): 1-7.
ZHANG XY, CUI HL, JIAO ZY, *et al.* The nutritional composition of different okra varieties [J]. *J Shangxi Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 2020, 40(2): 1-7.
- [3] 曹雪慧, 张方方, 赵宇婷, 等. 包装材料对秋葵冷藏品质的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(11): 28.
CAO XH, ZHANG FF, ZHAO YT, *et al.* Effect of packaging film on quality of okra during cold storage [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2019, 19(11): 28.
- [4] 李瑞娟, 于建奎, 宋国春, 等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸酯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): 272-277.
LI RJ, YU JL, SONG GC, *et al.* Residue and application safety assessment of emamectin benzoate in cabbage and soil [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, 27(21): 272-277.
- [5] 毕富春, 徐凤波. 甲氨基阿维菌素苯甲酸酯研究概述[J]. 农药科学与管理, 2002, 23(3): 31-33.
BI FC, XU FB. Review of research on emamectin benzoate [J]. *Pest Sci Admin*, 2002, 23(3): 31-33.
- [6] 曹爱华, 孙惠青, 徐金丽, 等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸酯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): 72-76.
CAO AH, SUN HQ, XU JL, *et al.* Residue analysis of emamectin benzoate in tobacco and soil [J]. *Chin Tob Sci*, 2010, 31(4): 72-76.
- [7] 张侃侃, 胡德禹, 张钰萍, 等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸酯在水稻环境中的残留及消解动态[J]. 农药学报, 2010, 12(2): 85-89.
ZHANG KK, HU DY, ZHANG YP, *et al.* Residue and decline study of emamectin benzoate in rice field [J]. *Chin J Pest Sci*, 2010, 12(2): 85-89.
- [8] WILLIS KJ, LING N. The toxicity of emamectin benzoate, an aquaculture pesticide, to planktonic marine copepods [J]. *Aquaculture*, 2003, 221(1-4): 289-297.
- [9] WILLIS KJ, GILLIBRAND PA, CROMEY CJ, *et al.* Sea lice treatments on salmon farms have no adverse effects on zooplankton communities: A case study [J]. *Marine Poll Bull*, 2005, 50(8): 806-816.
- [10] 柳王荣, 杨仁斌, 黄尧, 等. 甲维盐在水稻环境中的残留分析方法[J]. 农药, 2011, 50(5): 362-364.
LIU WR, YANG RB, HUANG R, *et al.* Residue analysis of emamectin benzoate in rice field [J]. *Agrochemicals*, 2011, 50(5): 362-364.
- [11] 陈海燕, 唐俊, 刘晓薇, 等. 甲维盐在小青菜中残留消解动态研究[J]. 合肥工业大学学报:自然科学版, 2012, 35(2): 142-145.
CHEN HY, TANG J, LIU XW, *et al.* Dynamic study of emamectin benzoate residue degradation in greengrocery [J]. *J Hefei Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2012, 35(2): 142-145.
- [12] 王梅, 尹显慧, 杨商海, 等. 高效液相色谱法测定甲维盐和吡虫啉在番茄及其土壤中的残留量[J]. 贵州农业科学, 2014, (11): 123-126.
WANG M, YIN XH, YANG SH, *et al.* Residual amount of emamectin benzoate and imidacloprid in tomato and soil determined by HPLC [J]. *Gouzhou Agric Sci*, 2014, (11): 123-126.
- [13] 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酯的残留量[J]. 分析测试学报, 2014, 33(1): 78-82.
LI ZM, ZHAO SC, LIANG JY, *et al.* Determination of emamectin benzoate in paddy field by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2014, 33(1): 78-82.
- [14] 孙明娜. 液相色谱-荧光法测定甲氨基阿维菌素苯甲酸酯在甘蓝和土壤中的残留[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7533-7534.
SUN MN. Determination of the residual of emamectin benzoate in cabbage and soil with HPLC fluorescence detection [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2008, 36(18): 7533-7534.
- [15] 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酯[J]. 色谱, 2008, 26(1): 117-119.
ZHANG Y, WU YL, HU JY, *et al.* Determination of emamectin benzoate residue in vegetables by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Chin J chromatogr*, 2008, 26(1): 117-119.
- [16] 赵莉, 谢显传, 占绣萍. 高效液相色谱-荧光法同时检测蔬菜中阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸酯和伊维菌素的多残留量[J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3467-3472.
ZHAO L, XIE XC, ZHAN XP. Multi-residues determination of abamectin, emamectin benzoate and ivermectin in vegetables by HPLC-FD [J]. *Sci Agric Sin*, 2010, 43(16): 3467-3472.
- [17] 杨德毅, 周小军, 虞森, 等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸酯在茭白中的残留动态[J]. 农药, 2016, 55(3): 45-47.
YANG DY, ZHOU XJ, YU M, *et al.* Residue dynamics of emamectin benzoate in water bamboo [J]. *Agrochemicals*, 2016, 55(3): 45-47.
- [18] NY/T 788—2018 农药残留试验准则[S].
NY/T 788—2018 Guideline for the testing of pesticide in crops [S].
- [19] GB 2763—2019 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763—2019 National food safety standard-Maximum residue limits for pesticides in food [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李红艳, 助理研究员, 主要研究方向为农药残留实验及农产品质量安全。
E-mail: 57946481n@qq.com

郑振山, 副研究员, 主要研究方向为农药残留实验及农产品质量安全。
E-mail: zhenshanzheng@126.com