

## 超高效液相色谱法测定土壤中多杀菌素和乙基多杀菌素的残留

吴琼\*, 李建国, 吕岱竹, 钱程, 范琼

(中国热带农业科学院 分析测试中心/海南省热带果蔬产品质量安全重点实验室 海口 571101)

**摘要:**建立了土壤中多杀菌素(spinosad) A和D以及乙基多杀菌素(spinetoram) J和L残留量的超高效液相色谱(UPLC)检测方法。土壤样品经乙腈-5%氯化钠溶液-1 mol/L氢氧化钾溶液提取,固相萃取柱净化,UPLC检测,外标法定量。结果表明:土壤中多杀菌素和乙基多杀菌素的定量限分别为0.1和0.05 mg/kg;最小检出量分别为 $8.0 \times 10^{-7}$ 和 $2.8 \times 10^{-7}$  g;在0.1~2 mg/kg添加水平下,多杀菌素在土壤中的平均回收率为89%~96%,相对标准偏差(RSDs)为2.1%~4.9%;在0.05~0.5 mg/kg添加水平下,乙基多杀菌素在土壤中的平均回收率为86%~93%,RSDs为1.2%~8.1%。该方法提取效果好,具有良好的灵敏度、回收率和重复性。

**关键词:**超高效液相色谱;固相萃取;多杀菌素;乙基多杀菌素;土壤;残留  
中图分类号:O657.7 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2015)01-0111-04

### Determination of spinosad and spinetoram residues in soil by ultra performance liquid chromatography(UPLC)

Wu Qiong\*, Li Jianguo, Lü Daizhu, Qian Cheng, Fan Qiong

(Analysis & Testing Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Hainan Provincial Key Laboratory of Quality and Safety for Tropical Fruits and Vegetables, Haikou 571101, China)

**Abstract:** An ultra performance liquid chromatography (UPLC) method was established for the determination of spinosad (A and D) and spinetoram (J and L) residues in soil. The soil samples were extracted with acetonitrile-5% NaCl-1 mol/L KOH and purified by SPE tube. The final extract was injected into UPLC and quantified by external standard method. According to the results of experiments, the limits of quantification (LOQs) were 0.1 and 0.05 mg/kg for spinosad and spinetoram respectively, and the limits of detection of spinosad and spinetoram were  $8.0 \times 10^{-7}$  and  $2.8 \times 10^{-7}$  g respectively. The recoveries of spinosad spiked in soil were 89%–96% with the relative standard deviations (RSDs) ranging from 2.1% to 4.9%, and the recoveries of spinetoram spiked in soil were 86%–93% with the RSDs ranging from 1.2% to 8.1%. The results have demonstrated that the proposed method is sensitive and accurate for the determination of spinosad and spinetoram in soil.

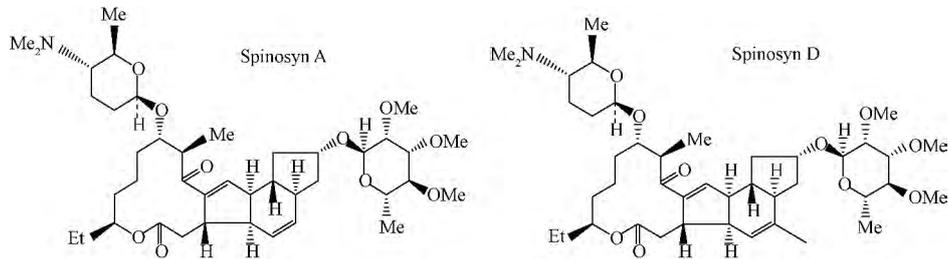
**Keywords:** ultra performance liquid chromatography; solid-phase extraction; spinosad; spinetoram; soil; residue

收稿日期:2014-09-12; 录用日期:2014-11-08.

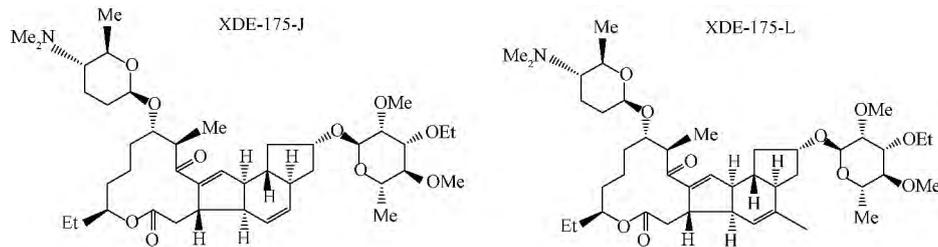
作者简介: \* 吴琼, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 助理研究员, 从事农药残留试验研究, E-mail: joan627@126.com

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201303088-43).

多杀菌素 (spinosad) 是由土壤放线菌 *Saccharopolyspora spinosa* 经有氧发酵产生的胞内次级代谢产物<sup>[1-2]</sup>, 以多杀菌素 A (Spinosyn A) 和多杀菌素 D (Spinosyn D) 为主要成分 (其含量分别约占 85% 和 15%), 结构式见 Scheme 1。乙基多杀菌素 (spinetoram) 是刺糖菌素类杀虫剂的一个新成



Scheme 1 多杀菌素 (spinosad)



Scheme 2 乙基多杀菌素 (spinetoram)

目前,关于多杀菌素和乙基多杀菌素的原药及其在水体、蔬菜、水稻等基质中的残留分析方法已有不少报道,主要采用的是高效液相色谱法和高效液相色谱-质谱联用法等<sup>[4-12]</sup>,而在基质较为复杂的土壤中同时测定多杀菌素和乙基多杀菌素残留的方法尚未见报道。超高效液相色谱 (UPLC) 具有分析速度快、灵敏度高等特点,用于农药的痕量分析更具有优势。为此,笔者采用超高效液相色谱法对土壤中多杀菌素和乙基多杀菌素的残留量进行了定性、定量分析,旨在为评价与监测土壤中刺糖菌素类杀虫剂农药残留状况,合理而有效地使用此类农药提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与主要试剂

Waters ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪,EmpowerII 软件,美国 Waters 公司; R-210 型旋转蒸发器,上海申生科技有限公司; XW-80A 微型旋涡混合仪,上海沪西分析仪器有限公司; CNW Strata NH<sub>2</sub> (55 μm, 70 Å) 500 mg/3 mL 固相萃取小柱,上海安谱科学仪器有限公司。

员,由美国陶氏益农公司开发<sup>[3]</sup>,以乙基多杀菌素 J (XDE-175-J) 和乙基多杀菌素 L (XDE-175-L) 为主要成分 (其含量分别约占 75% 和 25%), 结构式见 Scheme 2。乙基多杀菌素是多杀菌素的换代产品,二者在结构上的差别仅在于吡喃环上的甲氧基和乙氧基取代不同,其性质较为相近。

多杀菌素标准品 (纯度 99.7%, Spinosyn A 和 Spinosyn D 质量比 7:3) 和乙基多杀菌素标准品 (纯度 97.5%, XDE-175-J 和 XDE-175-L 质量比 4:1), 购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,用甲醇溶解并稀释至适当浓度供试。提取和净化用乙腈、甲醇和二氯甲烷均为分析纯; 色谱纯甲醇和乙腈购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 氢氧化钾于 80 °C 下真空干燥 8 h, 氯化钠经 140 °C 烘烤 4 h 后使用。

供试土壤样品取自海南省海口市美兰区加乐村,土壤类型为砖红壤,质地为壤土, pH 值 5.7, 有机质质量分数 17.4%。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 500 g, 于 -20 °C 冰柜中保存待用。

### 1.2 样品前处理

1.2.1 提取 称取 20.00 g 土壤样品,用 40.0 mL 乙腈、8 mL 5% 的氯化钠溶液和 2.5 mL 1 mol/L 的氢氧化钾溶液超声提取 5 min, 在 4 000 r/min 下离心 5 min。准确吸取上清液 10.0 mL 于 100 mL 圆底烧瓶中,减压浓缩 (40 °C) 至近干,残留物用 2 mL 甲醇溶解,待净化。

1.2.2 净化 固相萃取小柱先用 3 mL V (二氯甲

烷):  $V(\text{甲醇}) = 95:5$  的混合溶剂预淋洗, 加入样品提取浓缩液, 再用 3 mL 上述混合溶剂洗涤样品瓶 3 次, 一并转移至萃取小柱中, 收集全部淋出液, 在 40 °C 水浴中旋转浓缩至干, 残留物用色谱级甲醇溶解并定容至 2.5 mL 待 UPLC 检测。

### 1.3 UPLC 测定条件

ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm 1.7 μm); 柱温 40 °C; 流动相:  $V(\text{乙腈}): V(\text{质量分数为 2% 的乙酸铵缓冲液}): V(\text{甲醇}) = 50:20:30$ ; 流速 0.3 mL/min; 紫外检测器波长 250 nm; 进样体积为 4 μL。

### 1.4 标准曲线的绘制

采用外标法定量。以甲醇为溶剂, 先分别配制 1 000 μg/mL 的多杀菌素和乙基多杀菌素标准品母液, 再逐级稀释成质量浓度分别为 4.0、2.0、1.0、0.50 和 0.10 μg/mL, 采用 1.3 节的条件进样分析, 以药剂质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

### 1.5 方法的准确度和精密度测定

在未检出多杀菌素和乙基多杀菌素的空白土壤

样品中分别添加不同含量的多杀菌素和乙基多杀菌素标准溶液, 使添加水平分别为 0.1、1、2 mg/kg 和 0.05、0.1、0.5 mg/kg。按照所建立的前处理和检测方法进行添加回收试验, 重复 5 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线

在 0.10 ~ 4.0 μg/mL 范围内, 多杀菌素和乙基多杀菌素的峰面积响应值 ( $y$ ) 和药剂质量浓度 ( $x$ ) 均具有良好的线性关系。多回归方程分别为  $y = 5490x - 67.2$ ,  $R^2 = 0.9999$  和  $y = 12200x + 1.73$ ,  $R^2 = 0.9997$ 。

### 2.2 方法的准确度和精密度

添加回收试验结果 (表 1) 表明: 在添加水平为 0.1 ~ 2 mg/kg 范围内, 多杀菌素在土壤中的平均回收率在 89% ~ 96% 之间, 相对标准偏差 ( $RSD$ ) 在 2.1% ~ 4.9% 之间; 在添加水平为 0.05 ~ 0.5 mg/kg 范围内, 乙基多杀菌素在土壤中的平均回收率在 86% ~ 93% 之间,  $RSD$  在 1.2% ~ 8.1% 之间。均符合农药残留试验的要求<sup>[13]</sup>。相关色谱图见图 1。

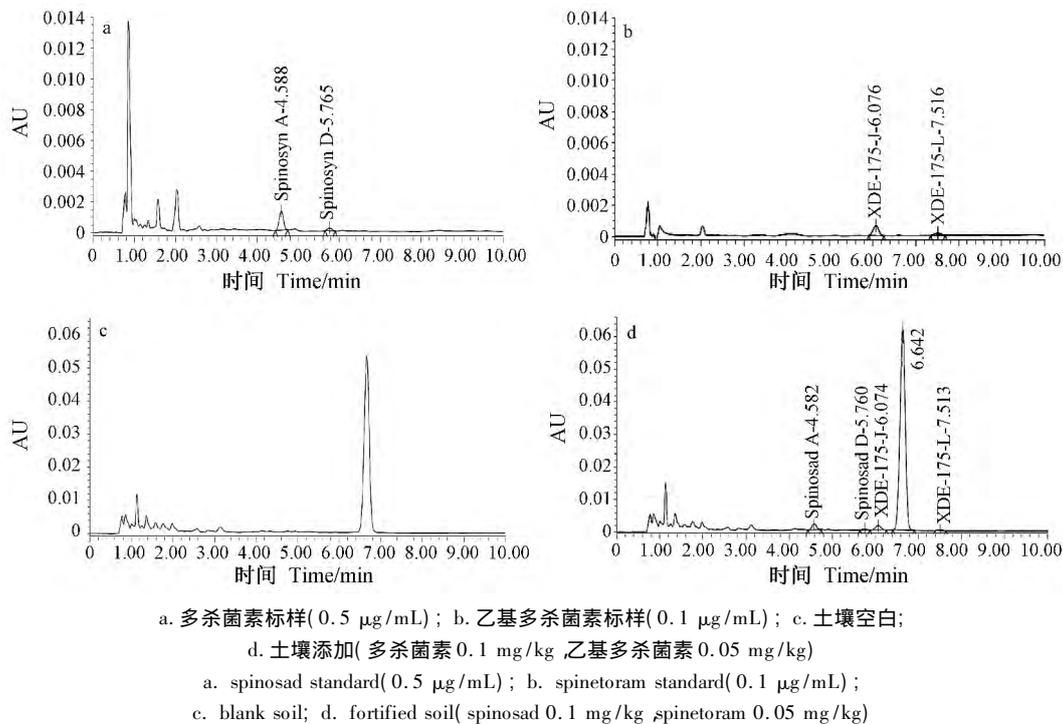


图 1 多杀菌素和乙基多杀菌素超高效液相色谱图

Fig. 1 UPLC chromatogram of Spinosyn A, Spinosyn D, SDE-175-J and SDE-175-L

### 2.3 方法的灵敏度

多杀菌素和乙基多杀菌素具有易光解特性, 分解快、残留低, 因此要求检测仪器具有较低的检测限。在所选定的检测条件下, 仪器对多杀菌素和乙

基多杀菌素的最小检出量分别为  $8.0 \times 10^{-7}$  和  $2.8 \times 10^{-7}$  g; 土壤中多杀菌素和乙基多杀菌素的定量限 (LOQ) 分别为 0.1 和 0.05 mg/kg。

表 1 多杀菌素和乙基多杀菌素在土壤中的添加回收率

Table1 Recoveries of spinosad and spinetoram in soil(  $n = 5$  )

农药 Pesticide	添加水平 Fortified level/ ( mg/kg)	平均回收率 Average recovery /%	相对标准偏差 RSD /%
多杀菌素 spinosad	0.1	96	2.1
	1	89	4.9
	2	95	3.5
乙基多杀菌素 spinetoram	0.05	93	1.2
	0.1	90	8.1
	0.5	86	6.6

### 3 小结与讨论

由于多杀菌素和乙基多杀菌素在酸性条件下易溶于水相而不溶于有机相,而在碱性环境中易溶于有机相而不溶于水相,所以提取时先在碱性条件下用乙腈提取后,通过改变提取液 pH 值的方法,将干扰物质与待测物分离,使提取液得到初步的净化;然后再将提取物用  $\text{NH}_2$  柱进一步净化,可使待测物与杂质得到有效分离。因此本研究采用  $V(\text{乙腈}) : V(5\% \text{氯化钠}) : V(1 \text{ mol/L 氢氧化钾}) = 40 : 8 : 2.5$  的混合溶剂提取,通过改变提取液的 pH 值使样品得到初步的净化后再经 SPE 柱进行净化。多杀菌素和乙基多杀菌素的添加回收率均在 70% ~ 110% 范围内,5 次重复测定样品峰面积的平均相对标准偏差均小于 10%,重现性良好。采用超高效液相色谱仪耗时短,前处理操作简单,方法的灵敏度、精确度和检测限均满足农药残留分析的要求,可用于同时测定多杀菌素和乙基多杀菌素在土壤中的残留。

### 参考文献( Reference ) :

- [1] Blanc M P, Panighini C, Gadani F, et al. Activity of spinosad on stored-tobacco insects and persistence on cured tobacco strios [J]. *Pest Manag Sci*, 2004, 60( 11): 1091 - 1098.
- [2] Diao J, Xu S C. Spinosad, a successful example of researching and developmting from natural products [J]. *Agrochemicals*, 2008, 47( 8): 558 - 560.
- [3] 朱秦. 陶氏益农公司获得杀虫剂 spinetoram 的第一个全球登记[J]. 农药市场信息, 2007, 21: 25.  
Zhu Qin. Dow Agrosiences receives first global registration for spinetoram insecticide [J]. *Pesticide Market News*, 2007, 21: 25. ( in Chinese)
- [4] 陈国, 朱勇, 赵健, 等. 乙基多杀菌素在稻田水、土壤和水稻植株中的残留及消解动态 [J]. 农药学学报, 2014, 16( 2): 153 - 158.  
Chen Guo, Zhu Yong, Zhao Jian, et al. Residue and decline dynamics of spinetoram in paddy water, soil and rice straw [J].

- Chin J Pestic Sci*, 2014, 16( 2): 153 - 158. ( in Chinese)
- [5] 孙敏, 曹赵云, 刘慧, 等. PSA 分散固相萃取和高效液相色谱-质谱法测定蔬菜中多杀菌素的残留量 [J]. 分析试验室, 2010, 29( 8): 70 - 74.  
Sun Min, Cao Zhaoyun, Liu Hui, et al. Determination of spinosad in vegetables by PSA dispersive solid phase extraction and high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese J Anal Lab*, 2010, 29( 8): 70 - 74. ( in Chinese)
- [6] 张缙, 杨黎忠, 林立毅, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中多杀菌素 A 和 D 的残留量 [J]. 色谱, 2011, 29( 7): 637 - 642.  
Zhang Jin, Yang Lizhong, Lin Liyi, et al. Determination of spinosyns A and D residues in food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29( 7): 637 - 642. ( in Chinese)
- [7] 李文明, 乔成奎, 陈晓旭, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水稻中多杀霉素的残留及消解动态 [J]. 农药学学报, 2012, 14( 3): 298 - 304.  
Li Wenming, Qiao Chengkui, Chen Xiaoxu, et al. Study on decline and residue of spinosad in paddy using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2012, 14( 3): 298 - 304. ( in Chinese)
- [8] 吴春先, 聂果, 王广成, 等. 高效液相色谱法测定水中多杀菌素的残留量 [J]. 农药, 2006, 45( 3): 191 - 193.  
Wu Chunxian, Nie Guo, Wang Guangcheng, et al. Determination of spinosad residues in water by HPLC [J]. *Agrochemicals*, 2006, 45( 3): 191 - 193. ( in Chinese)
- [9] 熊健, 李能威, 叶君, 等. 多杀菌素的高效液相色谱测定 [J]. 现代食品科技, 2009, 25( 6): 704 - 706.  
Xiong Jian, Li Nengwei, Ye Jun, et al. Determination of spinosad with high-performance liquid chromatography [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2009, 25( 6): 704 - 706. ( in Chinese)
- [10] 李增梅, 王文丽, 吴慧明, 等. 高效液相色谱法检测菜蛾幼虫体内多杀菌素残留 [J]. 昆虫学报, 2006, 49( 1): 137 - 141.  
Li Zengmei, Wang Wenli, Wu Huiming, et al. Detection and analysis of spinosad residue in the body fluid of *Cotesia plutellae* larvae with HPLC [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2006, 49( 1): 137 - 141. ( in Chinese)
- [11] 张晓燕, 邓树华, 黄卫, 等. 乙基多杀菌素的高效液相色谱测定 [J]. 粮食科技与经济, 2013, 38( 1): 37 - 39.  
Zhang Xiaoyan, Deng Shuhua, Huang Wei, et al. Determination of spinetoram with high-performance liquid chromatography [J]. *Grain Sci Technol Econ*, 2013, 38( 1): 37 - 39. ( in Chinese)
- [12] 秦为辉, 李丽, 张晓琳, 等. 响应曲面分析方法优化发酵液中多杀菌素的提取工艺 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23( 2): 314 - 319.  
Qin Weihui, Li Li, Zhang Xiaoli, et al. Process optimization for extracting spinosad from fermentation broth by response surface methodology [J]. *Nat Prod Res Develop*, 2011, 23( 2): 314 - 319. ( in Chinese)
- [13] NY/T 788—2004, 农药残留试验准则 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2004.  
NY/T 788—2004, Guideline on pesticide residue trials [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2004. ( in Chinese)

( 责任编辑: 金淑惠)