

柱后衍生法分析 8 种氨基甲酸酯农药

潘媛媛 刘晓达 金燕
赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

柱后衍生；荧光检测器；邻苯二甲醛；双三元液相色谱

目标

基于氨基甲酸酯农药分析需要两级衍生，本文欲通过双三元液相色谱左泵分析，右泵和 AXP 泵分别辅助衍生化，建立氨基甲酸酯柱后衍生后检测的方法。

引言

氨基甲酸酯类农药的结构特性是分子中含有一个 N-甲基基团，是一类以甲酸酯为前体化合物发展而来的农药，具有分解快、残留低、低毒、高效、选择性强等特点，代表品种有甲萘威（西维因）、涕灭威、呋喃丹（克百威）等。20 世纪 70 年代以来，由于有机氯农药品种相继被不同国家禁用或者限制使用，以及抗有机磷农药的昆虫品种的日益增多，氨基甲酸酯类农药的使用量逐年增加。

大多数氨基甲酸酯类农药的半衰期较短，在碱性和高温条件下容易分解，施用后短时间内就会被降解为相应的代谢产物。其代谢产物通常具有与母体氨基甲酸酯类农药相同或更强的生物活性，例如涕灭威亚砷（涕灭威的代谢产物）与涕灭威相比，具有更强的抗胆碱酯酶的作用。因此，在测定氨基甲酸酯类农药残留时，必须考虑如何有效地对代谢产物进行测定。

分光光度法是比较早用于氨基甲酸酯类农药残留测定的方法之一，由于操作繁琐，易受其他物质干扰，现已很少使用。从 1977 年 Moye 等第一次采用 HPLC 柱后衍生测定氨基甲酸酯类农药残留以来，采用 HPLC 柱后水解或柱后衍生方法对复杂介质中氨基甲酸酯类农药的残留量进行检测越来越普遍^[1,2]。农业标准 NY/T 761-2008 第三部分蔬菜和水果中氨基甲酸酯类农药多残留的测定中^[3]，规定了该类化合物采用液相色谱法分离，柱后在线水解生成甲胺进行荧光衍生后检测的方法。检测原理如下：氨基



甲酸酯类化合物经反相柱分离后，首先在 100°C 强碱性条件 (NaOH) 下水解生成甲胺；第二个柱后反应中甲胺与荧光衍生试剂邻苯二甲醛 (OPA) 和 2-巯基乙醇反应，生成有强荧光吸收的 1-甲基-2-咪唑类化合物，进行较高灵敏度的荧光检测。

本方法参考 NY/T 761-2008 方法，建立了采用双三元液相色谱配合 AXP 泵辅助柱后衍生，实现了 8 种氨基甲酸酯农药的检测，最低检测限可达 0.008-0.015mg/L，满足 NY/T 761-2008 的要求。

仪器

Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000RS 色谱系统，包括：

- DGP-3600RS 色谱泵
- WPS-3000TRS 自动进样器（配置 100μL 定量环）
- TCC-3000RS 柱温箱
- TCC-3000SD 柱温箱
- FLD-3400RS 二极管阵列检测器

AXP 泵 (P/N V10PFT03DX)

Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ 色谱工作站

耗材

Thermo Scientific™ Target2™ Nylon Syringe Filters (0.45 μm, 30mm, P/N F2500-1)

一次性使用无菌注射器, 1mL (上海治宇医疗器械有限公司)

柱后衍生反应管 750μL (P/N 042631)

柱后衍生反应管 375μL (P/N 043700)

试剂与标准品

去离子水 (18.2 MΩ-cm, Thermo Scientific™ genPure Pro™ UV-TOC, P/N 50131948)

甲萘威、克百威、涕灭威、3-羟基咪喃丹、灭多威、杀线威、涕灭威砒、涕灭威亚砒混合标准溶液, 0.1mg/mL 溶解在乙腈中 (AccuStandard®, Inc.)

邻苯二甲醛 (98%, Alfa Aesar)

硼酸、巯基乙醇、氢氧化钠 (国药集团化学试剂有限公司)

衍生溶液的制备

衍生试剂 1:

50mM 氢氧化钠, 称取 2g 氢氧化钠, 用水 (预先用氮气吹扫 3min) 溶解并定容至 1000mL 量瓶中, 摇匀备用。

衍生试剂 2:

0.4M 硼酸缓冲液 (pH=10.0): 称取 24.8g 硼酸, 14.1g 氢氧化钠, 用水稀释并定容至 1000mL 容量瓶中, 摇匀备用。

邻苯二甲醛溶液: 称取 200mg 邻苯二甲醛, 用甲醇溶解并定容至 100mL 容量瓶中, 摇匀备用。

邻苯二甲醛-巯基乙醇衍生试液: 取 100mL 邻苯二甲醛溶液转移至棕色容器中, 加入巯基乙醇 (200μL), 摇匀, 氮气吹扫 3 分钟, 避光密封备用。

设置硼酸缓冲液与衍生试液的混合比例为 4:1, 并调节混合后的溶液流速为 0.3mL/min。

色谱条件

分析柱:	Thermo Scientific Acclaim 120 C18, 5μm 4.6 × 250 mm (P/N 059149)		
淋洗液:	A: 水 B: 甲醇		
	时间 min	A%	B%
	0	85	15
	2	75	25
	8	75	25
	9	60	40
	10	55	45
	19	20	80
	25	20	80
	25.1	85	15
	30	85	15
流速:	0.8 mL/min		
进样体积:	10 μL		
柱温:	42°C		
检测器:	Ex: 330 nm; Em: 465 nm		
运行时间:	30 min		
柱后衍生:	一级衍生: 衍生试剂 1, 柱后衍生反应管 750μL (P/N: 042631), 0.3mL/min, 温度: 100°C。AXP 泵做一级衍生泵。 二级衍生: 衍生试剂 2, 柱后衍生反应管 375μL (P/N: 043700), 0.3mL/min, 室温。双三元右泵做衍生泵。		

结果

本方法中色谱分离条件采用农业部标准 NY/T 761-2008 中的液相条件，双三元液相色谱其中一个泵（左泵）作分析泵，色谱柱采用 Acclaim 120 C18, 5 μ m 4.6 \times 250 mm，在 30min 内可实现 8 种氨基甲酸酯农药的分离。8 种氨基甲酸酯在色谱柱分离后，进入一级衍生，AXP 泵做衍生泵，衍生温度为 100 $^{\circ}$ C，衍生温度由 TCC-3000RS 柱温箱提供；二级衍生为 OPA 衍生，双三元另一个泵（右泵）做衍生泵，衍生温度为室温。衍生后进入荧光检测器分析，结果如色谱图 1 所示。

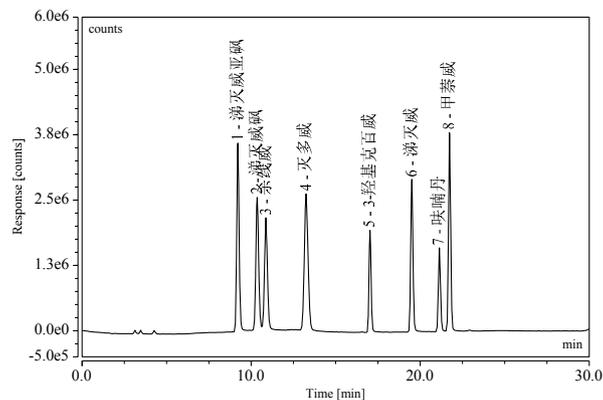


图 1. 氨基甲酸酯混合标准溶液 (2mg/L) 谱图

线性范围考察

将不同浓度的标准工作曲线溶液依次测定，取其峰面积值，以峰面积为纵坐标，标准溶液质量浓度为横坐标建

立标准工作曲线，得到各化合物的线性回归方程和相关系数，如表 1 所示。以信噪比 S/N=3 计算方法的检出限，结果见表 1。

表 1. 氨基甲酸酯线性数据、线性范围和检出限

名称	线性类型	线性回归方程	线性范围 (mg/L)	线性相关系数 R ²	检出限 LOD (mg/L)(S/N=3)
涕灭威亚砷	Loff	A=274399C+1854.4	0.05-1	0.9993	0.009
涕灭威砷	Loff	A=219774C+758.84	0.05-1	0.9999	0.013
杀线威	Loff	A=188554C+4538.2	0.05-1	0.9967	0.015
灭多威	Loff	A=311651C+2036.7	0.05-1	0.9984	0.013
3-羟基克百威	Loff	A=125081C-1263.7	0.05-1	0.9957	0.015
涕灭威	Loff	A=212249C+1666.7	0.05-1	0.9983	0.011
克百威	Loff	A=111557C+530.35	0.05-1	0.9997	0.015
甲萘威	Loff	A=250271C+3847.5	0.05-1	0.9975	0.008

注：A- 峰面积 counts \times min；C- 进样浓度 mg/L；Loff：标准曲线不强制通过原点

与 NY/T 761-2008 方法的检出限比较，该方法灵敏度符合或优于农业部标准，如表 2 所示。

表 2. 方法检出限与 NY/T 761-2008 对比

Name	本方法检出限 LOD (mg/L)(S/N=3)	NY/T 761-2008 检出限 (mg/L)(S/N=3)
涕灭威亚砷	0.009	0.04
涕灭威砷	0.013	0.04
杀线威	0.015	--
灭多威	0.013	0.02
3-羟基克百威	0.015	0.02
涕灭威	0.011	0.018
克百威	0.015	0.02
甲萘威	0.008	0.016

重复性试验

去对照品溶液，连续进样 5 针，见图 2。

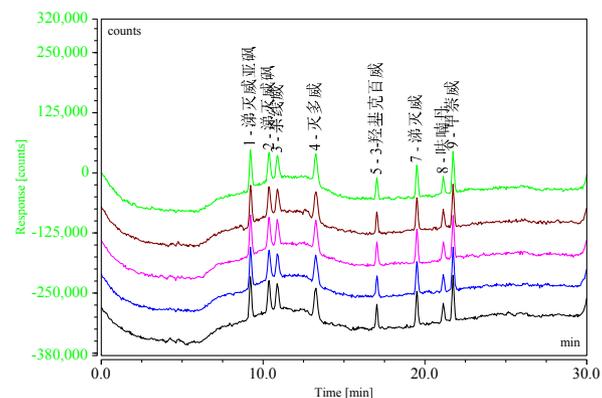


图 2. 氨基甲酸酯混合标准连续进样重复性谱图 (0.05mg/L)

测试结果表明，连续进样 5 针，保留时间和峰面积重复性均符合要求，结果见表 3，表明该方法重复性良好。

表 3. 氨基甲酸酯重复性数据 (0.05 mg/L, n=5)

Name	保留时间 min	峰面积 counts × min
涕灭威亚砷	0.05%	1.7%
涕灭威砷	0.07%	1.7%
杀线威	0.13%	2.0%
灭多威	0.04%	1.5%
3- 羟基克百威	0.03%	1.6%
涕灭威	0.02%	0.91%
克百威	0.03%	1.5%
甲萘威	0.02%	1.7%

讨论

本文探索了利用双三元液相色谱结合 AXP 辅助泵, 实现氨基甲酸酯柱后两级衍生并荧光检测的可行性。结果表明, 该方法完全可以满足 NY/T 761-2008 方法的灵敏度要求。本方法所分析的化合物中, 杀线威并未包含在 NY/T 761-2008 方法中, 但在色谱图中, 杀线威和涕灭威砷出峰时间相近, 如果二者在色谱柱上分离度差, 势必会对实际样品检测有影响, 因此对于色谱柱的选择非常重要; 本方法中, 杀线威和涕灭威砷的分离度为 1.62, 可达到完全基线分离, 因此该条件下 Acclaim C18, 5 μ m 4.6 × 250 mm 色谱柱完全可以用于氨基甲酸酯的分析, 此外选用 Acclaim PAII, 5 μ m 4.6 × 250 mm 色谱柱, 同样可以达到很好的分析效果。

该柱后衍生系统为实验室自己搭建, 在双三元的基础上, 只需额外配置一台 AXP 泵和常规柱温箱即可实现氨基甲酸酯的检测, 与 Pickering 等柱后衍生仪相比, 成本大大降低, 且完全满足 NY/T 761-2008 的灵敏度要求。如果用户需要更高灵敏度的分析, 如环境方向, 建议配置 Pickering 等柱后衍生仪。

参考文献:

- [1] Yang S S, Smetena. Determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in tobacco using high performance liquid chromatography with post column reaction and fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 1994, 664: 289 ~ 294.
- [2] Murugaver IB, Kent J, DeLuca VSJ. Utilization of abenchtop mass spectrometer with capillary supercritical fluid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1993, 633: 195 ~ 205.

[3] NY/T 761-2008 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定 (第 3 部分)

附注 1:

双三元流路连接图



附注 2:

在实验过程中, 有几个方面需要注意:

- 1) 为保证 AXP 泵和双三元衍生泵稳定的性能, 需要在衍生管前连接反压管;
- 2) 衍生液和色谱柱流出液进入三通时, 建议两者以 90 度方向接入, 混合后流入衍生反应管;
- 3) 衍生管后的管路需用灰色或绿色 PEEK 管, 或其他内径相当管路, 避免反压过高, 造成衍生管接头漏液, 如下图所示:



- 4) 第二步 OPA 衍生温度为室温, 但环境温度变化会影响基线噪音, 建议可将第二路衍生管浸入烧杯中室温水浴, 可以避免温度的剧烈变化;
- 5) 实验开始时, 需按照流路从前往后的顺序, 依次开启双三元分析泵、AXP 泵、双三元衍生泵; 实验结束后, 需要按照流路从后往前的顺序, 关闭双三元衍生泵、AXP 泵、双三元分析泵。这样可以避免衍生流路中强碱回流进入色谱柱, 造成色谱柱损伤; 编辑方法关机程序时, 也按照该停泵顺序进行编辑。
- 6) 实验结束后, 需要用水彻底冲洗衍生管, 避免长时间放置造成堵塞。

赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司

免费服务热线: 800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC