

超高效液相色谱 – 串联质谱法快速检测 洛党参中乙基多杀菌素残留

李 刚¹, 秦樊鑫¹, 张 盈², 龙家寰², 魏 进^{2*}

(1. 贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001;

2. 贵州省农业科学院 植物保护研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘 要: 建立了超高效液相色谱 – 串联质谱(UHPLC – MS/MS) 快速检测洛党参中乙基多杀菌素 – J(XDE – 175 – J) 和乙基多杀菌素 – L(XDE – 175 – L) 残留的方法。样品经乙腈提取, 乙二胺 – N-丙基硅烷和石墨化炭黑净化后, 外标法定量。结果表明, XDE – 175 – J 和 XDE – 175 – L 的峰面积与其质量浓度分别在 0.075 ~ 75 $\mu\text{g/L}$ 和 0.025 ~ 25 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 呈良好线性关系($r^2 > 0.990$); 在 0.375、3.75、75 $\mu\text{g/kg}$ 加标水平下, XDE – 175 – J 的平均回收率为 88.4%~113.5%, 相对标准偏差(RSD, $n=5$) 为 2.0%~4.2%; 在 0.125、1.25、25 $\mu\text{g/kg}$ 加标水平下, XDE – 175 – L 的平均回收率为 84.4%~99.5%, RSD($n=5$) 为 2.5%~4.9%。乙基多杀菌素的定量下限(LOQ) 为 0.375 $\mu\text{g/kg}$ (XDE – 175 – J) 和 0.125 $\mu\text{g/kg}$ (XDE – 175 – L)。该方法简便、快捷, 灵敏度高, 回收率和重复性良好, 能满足农药残留检测技术要求, 可用于大量洛党参样品中乙基多杀菌素的残留分析。

关键词: 乙基多杀菌素; 超高效液相色谱 – 串联质谱(UHPLC – MS/MS); 洛党参; 残留检测

中图分类号: O657.63; OF767.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2018)07-0834-05

Determination of Spinetoram Residues in *Radix Gotonopsis Tongshen* Otiv. Using Ultra-high Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

LI Gang¹, QIN Fan-xin¹, ZHANG Ying², LONG Jia-huan², WEI Jin^{2*}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Information Systems of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang 550006, China)

Abstract: An ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric(UHPLC – MS/MS) method was established for the determination of spinetoram residues, XDE – 175 – J and XDE – 175 – L in *Radix Gotonopsis Tongshen* Otiv. The samples were exacted with acetonitrile, and purified with primary secondary amine and graphitized carbon black. The target compounds were quantified by the external standard method. There were good linearities for the peak areas of XDE – 175 – J and XDE – 175 – L in the concentration ranges of 0.075 – 75 $\mu\text{g/L}$ and 0.025 – 25 $\mu\text{g/L}$, respectively. The average recoveries for XDE – 175 – J and XDE – 175 – L at the spiked levels of 0.375, 3.75, 75 $\mu\text{g/kg}$ and 0.125, 1.25, 25 $\mu\text{g/kg}$ were in the ranges of 88.4% – 113.5% and 84.4% – 99.5%, with relative standard deviations(RSDs) of 2.0% – 4.2% and 2.5% – 4.9%, respectively. The limits of quantitation(LOQs) for XDE – 175 – J and XDE – 175 – L were 0.375 $\mu\text{g/kg}$ and 0.125 $\mu\text{g/kg}$, respectively. With the advantages of simplicity, rapidness and convenience, the method could meet the requirements for pesticide residues analysis, and be applied in the rapid detection of spinetoram residues in *Radix Gotonopsis Tongshen* Otiv.

Key words: spinetoram; ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC – MS/MS); *Radix Gotonopsis Tongshen* Otiv.; residues determination

收稿日期: 2018-04-13; 修回日期: 2018-05-20

基金项目: 贵州五种特色果蔬病虫害绿色防控技术体系服务企业行动计划(黔科合服企 [2015] 4012 号); 洛党参重要病虫害无公害防治关键技术研究与应用示范(道科合 [2014] 07 号)

* 通讯作者: 魏 进, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 环境中农药残留及微量元素的分离分析, Tel: 0851-83806050, E-mail: wwjj0084@126.com

乙基多杀菌素(Spinetoram)原药为其有效成分乙基多杀菌素-J(XDE-175-J)和乙基多杀菌素-L(XDE-175-L)的混合物(比例3:1),可作用于昆虫神经系统,扰乱虫体对信号的传递反应,影响其正常的神经活动而致其死亡^[1]。乙基多杀菌素为我国登记的可在甘蓝、黄瓜、茄子、水稻、杨梅和豇豆上使用的农药。《食品安全国家标准-食品中农药最大残留限量》(GB 2763-2016)^[2]规定,蔬菜类豇豆、结球甘蓝和茄子中乙基多杀菌素的最大残留限量分别为0.1、0.5、0.1 mg/kg;谷物类稻谷和糙米中最大残留限量分别为0.5、0.2 mg/kg。《国际食品法典》规定番茄、甜橙和树坚果中乙基多杀菌素的最大残留限量分别为0.06、0.07、0.01 mg/kg。洛党参(*Radix Gotonopsis Tongshen Otiv.*)是贵州省地理标志保护产品,其肉质鲜嫩,具有极高的药用和经济价值,但其生长过程中易受病虫害的侵扰,影响产量和品质。乙基多杀菌素作为一种高效、低毒、易降解的新型农药^[3],可用于防治蚜虫对洛党参产生的危害,但使用不当会导致该药残留并威胁人体健康。关于乙基多杀菌素残留分析所涉及的基质包括土壤、水稻、水果等,但未见该药在洛党参中的残留分析报道和限量规定,因而建立洛党参中乙基多杀菌素残留的检测方法显得尤为重要。

目前,乙基多杀菌素残留的检测方法有液相色谱法、液相色谱-串联质谱法^[4-5]。Park等^[6]通过QuEChERS法提取,液相色谱-串联质谱法检测,研究了苋属植物和欧芹中乙基多杀菌素原药及其代谢组分的残留情况。Malhat等^[7]将QuEChERS法和高效液相色谱联用,进行了乙基多杀菌素在番茄中的残留检测研究。陈国等^[8]通过QuEChERS法提取净化,超高效液相色谱-串联质谱法检测,研究了乙基多杀菌素在稻田水、土壤及水稻植株中的残留及消解动态。刘赛等^[9]通过乙腈超声提取,0.22 μm 滤膜净化,高效液相色谱-串联质谱检测,研究了乙基多杀菌素在宁夏枸杞中的消解动态。吴琼等^[10]通过乙腈-5%氯化钠溶液-1 mol/L氢氧化钾溶液提取,固相萃取柱净化,超高效液相色谱检测,研究了土壤中乙基多杀菌素的残留,但该实验存在样品前处理复杂和乙腈用量多等问题。QuEChERS法高效、稳定、快捷,有机溶剂用量少,更适于样品农残检测的前处理;超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)具有检出限低、灵敏度高和检测耗时短等特点,被广泛用于农产品中农药残留的分析测定。为快速检测洛党参中的乙基多杀菌素残留量,本研究采用QuEChERS法进行样品前处理,超高效液相色谱-串联质谱法进行检测,建立了洛党参中乙基多杀菌素残留量的分析方法,为洛党参的质量控制和乙基多杀菌素的安全使用提供了科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UltiMate 3000/TSQ VANTAGE UHPLC-MS/MS(ThermoFisher公司);TG 16离心机(长沙迈森仪器公司);匀浆机(江苏中大仪器厂);SK-1旋涡混合器(海门市其林贝尔公司);BSA224S-CW电子天平(北京赛多利斯科学仪器公司);CK2000高通量组织研磨仪(北京托摩根生物科技有限公司)。

乙基多杀菌素标准品(纯度95%,德国Dr. Ehrenstorfer公司);无水硫酸镁、氯化钠、乙腈(分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,默克公司);甲酸(88%,ThermoFisher公司);蒸馏水(屈臣氏);Filter Unit滤膜(0.22 μm)、石墨化碳(GCB)、乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)购自Agela Technologies公司; C_{18} 、多壁碳纳米管(MWCNTs)购自北京博宇高科新材料技术有限公司。

洛党参:采自贵州省遵义市道真县洛党参种植基地。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 准确称取0.0105 g乙基多杀菌素标准品于100 mL容量瓶中,用乙腈溶解并定容,得到100 mg/L的乙基多杀菌素标准储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。准确移取适量储备液,分别用乙腈、洛党参空白稀释成含XDE-175-J质量浓度为0.075、0.375、0.75、3.75、7.5、75 $\mu\text{g/L}$ 和含XDE-175-L质量浓度为0.025、0.125、0.25、1.25、2.5、25 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准品溶液和基质匹配标准溶液。在“1.2.3”条件下进样,以峰面积(y)对乙基多杀菌素标准溶液的质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)作图,通过最小二乘法拟合得到标准曲线方程。

1.2.2 提取与净化 提取:准确称取洛党参样品10 g于50 mL离心管中,加入5 mL超纯水,待样品完全润湿后,加入10 mL乙腈,以1 000 r/min振荡提取10 min,室温下静置30 min,加入2 g氯化钠

和 3 g 无水硫酸镁, 振荡 10 min, 以 5 000 r/min 离心 5 min。

净化: 移取 1.5 mL 上清液于装有 30 mg PSA + 10 mg GCB + 150 mg 无水硫酸镁的 2 mL 离心管中, 涡旋 1 min, 以 6 000 r/min 离心 10 min, 过 0.22 μm 有机滤膜后于进样瓶中, 待测。

1.2.3 仪器条件 液相色谱条件: 色谱柱: Synchronis C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm , ThermoFisher 公司); 二元梯度洗脱分离, 流动相: 0.1% 甲酸(A) – 乙腈(B); 流速: 0.2 mL/min; 进样体积 5 μL 。梯度洗脱条件: 0 ~ 1 min, 25% A; 1 ~ 1.5 min, 25% ~ 85% A; 1.5 ~ 5 min, 85% A; 5 ~ 6 min, 85% ~ 25% A; 6 ~ 7 min, 25% A。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子电离(ESI^+); 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气、辅助气为氮气, 鞘气压力 30 Arb(2 068.5 kPa), 辅助气压力 10 Arb(689.5 kPa); 电喷雾电压: 正离子源 3 500 V; 碰撞保护气为氩气, 1.5 mTorr(2 Pa); 检测方式: 选择反应监测(SRM), 待测组分的质谱参数见表 1。

表 1 乙基多杀菌素的质谱采集参数
Table 1 Mass spectrum parameters of spinetoram

Compound	Retention time (min)	Quantitative ion pairs (m/z)	Qualitative ion pairs (m/z)	Decluster voltage (V)	Collision energy (eV)
XDE-175-J	5.44	748.7/142.2	748.7/203.1	139	28, 28
XDE-175-L	5.64	760.7/142.2	760.7/203.1	157	28, 32

2 结果与讨论

2.1 提取剂的选择

在 XDE-175-J 和 XDE-175-L 加标水平分别为 37.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的条件下, 用甲酸 – 乙腈和乙腈分别进行乙基多杀菌素的提取。发现两者均能得到良好的提取效果, 回收率分别为 110.0% ~ 115.3% 和 105.8% ~ 109.7%, 但甲酸 – 乙腈作为提取剂时, 样品的平行性较差, 相对标准偏差(RSD)相对较高(20%), 而以乙腈为提取剂时 $\text{RSD} < 3\%$ 。因此实验选择乙腈为提取剂。

2.2 净化剂的选择

在 XDE-175-J 和 XDE-175-L 加标水平分别为 3.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的条件下, 考察了不同净化剂的净化效果(表 2)。结果发现, 以 30 mg PSA + 10 mg GCB 作为净化剂组合能得到最优回收率和 RSD。这是由于 PSA 能够去除洛党参中的有机酸、脂肪酸和极性杂质^[11]; GCB 能够有效去除色素干扰^[12]。因此实验以 30 mg PSA + 10 mg GCB 为净化剂。

表 2 不同净化剂种类的影响
Table 2 Effects of different types of purifying agents

Compound	Clarificant	Average recovery(%)	RSD(%)
XDE-175-J	10 mg C_{18} + 10 mg GCB	78.5	1.8
	10 mg C_{18}	101.3	11.8
	10 mg MWCNTs	71.6	4.7
	30 mg PSA + 10 mg GCB	103.6	1.4
	30 mg PSA	67.6	1.7
XDE-175-L	10 mg C_{18} + 10 mg GCB	73.9	1.1
	10 mg C_{18}	98.0	20.3
	10 mg MWCNTs	70.4	5.1
	30 mg PSA + 10 mg GCB	94.2	2.0
	30 mg PSA	63.6	4.7

2.3 标准曲线与基质效应

按照“1.2.1”方法得到乙基多杀菌素的溶剂标准曲线方程(J 为 XDE-175-J, L 为 XDE-175-L)为: $y_J = 4.353 \times 10^6 x - 962$ ($r^2 = 0.9996$), $y_L = 1.895 \times 10^6 x + 1310$ ($r^2 = 0.9996$); 基质标准曲线方程为: $y_J = 4.516 \times 10^6 x + 4166$ ($r^2 = 0.9994$), $y_L = 1.978 \times 10^6 x + 2731$ ($r^2 = 0.9989$); 表明在系列浓度范围内, 乙基多杀菌素的峰面积与溶液浓度的线性关系良好^[13]。乙基多杀菌素标准色谱图见图 1A。

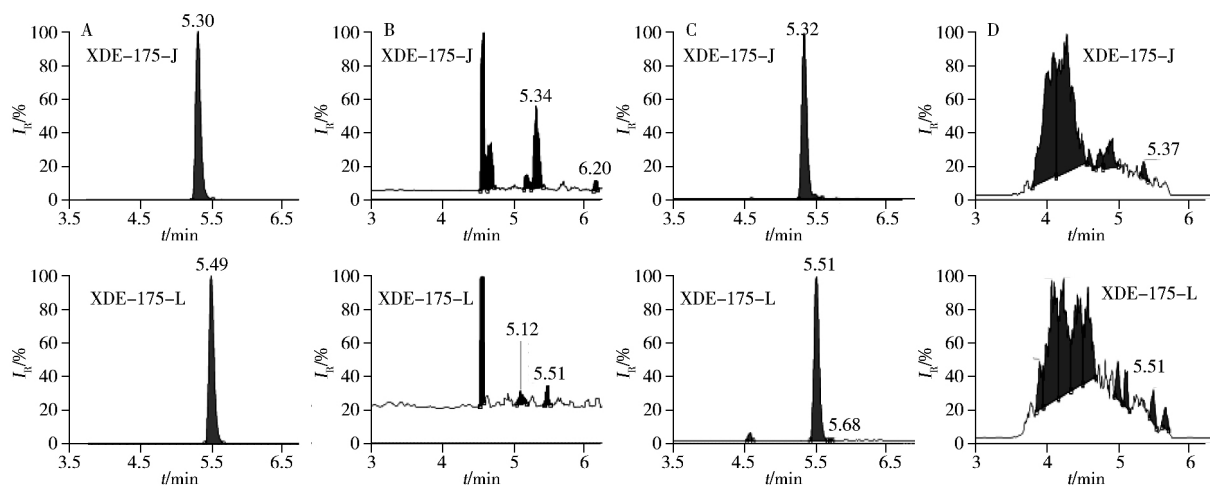


图1 乙基多杀菌素在洛党参中的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of spinetoram in *Radix Gotonopsis Tongshen Otiv*

A. spinetoram standard (1.875 $\mu\text{g/L}$ for XDE-175-J; 0.625 $\mu\text{g/L}$ for XDE-175-L); B. blank sample; C. *Radix Gotonopsis Tongshen Otiv.* spiked with 0.375 $\mu\text{g/kg}$ for XDE-175-J and 0.125 $\mu\text{g/kg}$ for XDE-175-L; D. actual *Radix Gotonopsis Tongshen Otiv.* sample

基质效应指样品中被分析物以外的共流出组分对分析物的响应值有干扰, 从而影响分析结果的准确性^[14]。可通过基质标准曲线和溶剂标准曲线斜率之比(γ %)来评价基质效应, 当 $90\% < \gamma < 110\%$ 时, 表示基质效应不显著, $\gamma > 110\%$ 时为基质增强效应, $\gamma < 90\%$ 时为基质减弱效应^[15]。本方法中 XDE-175-J 和 XDE-175-L 的 γ 分别为 103.7% 和 104.4%, 表明基质效应不显著, 可忽略不计。

2.4 方法的准确度、精密度与灵敏度

称取 10 g 空白的洛党参样品, 加入一定量乙基多杀菌素标准品, 其中 XDE-175-J 的加标水平分别为 0.375、3.75、75 $\mu\text{g/kg}$, XDE-175-L 的加标水平分别为 0.125、1.25、25 $\mu\text{g/kg}$ 。对其进行样品前处理后测定, 每个水平平行测定 5 次, 计算加标回收率和 RSD, 结果见表 3。由表 3 可知, 在加标浓度范围内, XDE-175-J 的平均回收率为 88.4%~113.5%, RSD 为 2.0%~4.2%; XDE-175-L 的平均回收率为

表3 乙基多杀菌素在洛党参中的加标回收率

Table 3 Recoveries of spinetoram in *Radix Gotonopsis Tongshen Otiv*.

Compound	Added($\mu\text{g/kg}$)	Average recovery(%)	RSD(%)
XDE-175-J	0.375	113.5	2.8
	3.75	88.4	4.2
	75	101.3	2.0
XDE-175-L	0.125	97.8	4.9
	1.25	84.4	4.5
	25	99.5	2.5

84.4%~99.5%, RSD 为 2.5%~4.9%, 方法显示了良好的准确性和精密度, 符合《农药残留试验准则》的要求^[16]。其中在对照区中采集的样品空白的色谱图见图 1B; 乙基多杀菌素加标色谱图见图 1C。

定量下限(LOQ)指用加标方法能检测出待测物在样品中的最低含量^[16]。由于乙基多杀菌素在光照下易分解, 因而对其残留进行测定时, 要求仪器具有较高的灵敏度和较低的检出限^[10]。参照文献[17], 以最小加标浓度确定乙基多杀菌素在洛党参中的定量下限(LOQ)为: 0.375 $\mu\text{g/kg}$ (XDE-175-J)和 0.125 $\mu\text{g/kg}$ (XDE-175-L), 表明方法的灵敏度良好, 可满足农药残留灵敏检测的要求。傅强等^[18]通过乙腈提取水稻植株、谷壳和糙米, 液相色谱-串联质谱检测, 得到 XDE-175-J 和 XDE-175-L 的定量下限(LOQ)分别为 0.016、0.004 mg/kg ; 陈国等^[8]通过超高效液相色谱-串联质谱法检测, 得到乙基多杀菌素在稻田水、土壤、水稻植株中的定量下限(LOQ)分别为 0.001 mg/L 、0.002 mg/kg 、0.005 mg/kg 。本方法的定量下限明显低于上述研究。

2.5 实际样品的检测

为验证方法的实用性, 对市售 12 份洛党参样品按照“1.2.2”方法进行前处理, 在“1.2.3”条件下检测, 其中 2 份洛党参样品中检出乙基多杀菌素残留, 但含量小于本方法的定量下限和该药在豇豆和茄子(0.1 mg/kg)、结球甘蓝(0.5 mg/kg)中的最大残留限量值(MRL)。实际样品色谱图见图 1D。

3 结 论

本文建立了洛党参中乙基多杀菌素残留量的超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)快速检测方法,本方法样品前处理简单、易操作,定量检测用时短,检出限和定量下限低,灵敏度高,满足农药残留分析相关要求和色谱分析的规定,可用于洛党参中乙基多杀菌素残留的快速测定。

参考文献:

- [1] Orr N, Shaffner A J, Richey K, Crouse G D. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **2009**, 95(1): 1-5.
- [2] GB 2763-2016. National Food Safety Standard - Maximum Residue Limits for Pesticide in Food. Beijing: Standards Press of China(食品安全国家标准-食品中农药最大残留限量. 北京: 中国标准出版社).
- [3] Qian C, Wu Q, Lü D Z, Li J G. *Chin. J. Pestic. Sci.* (钱程, 吴琼, 吕岱竹, 李建国. 农药学学报), **2014**, 16(5): 594-599.
- [4] Zhao L, Chen G, Zhao J, Zhang Y, Zhu Y, Yang T, Wu Y L. *Chemosphere*, **2015**, 119(119C): 1185-1191.
- [5] Xia X Y, Fu B L, Li Q, Qiu H Y, Le Y, Tang L D, Liu K. *Chin. J. Trop Crops*(夏西亚, 付步礼, 李强, 邱海燕, 乐渊, 唐良德, 刘奎. 热带作物学报), **2017**, 38(7): 1331-1336.
- [6] Park K H, Choi J H, Abd El-Aty A M, Cho J H, Park J H, Kim B M, Yang A, Na T W, Rahman M, Im G J. *Food Chem.*, **2012**, 134(4): 2552-2559.
- [7] Malhat F M. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2013**, 90(2): 222-226.
- [8] Chen G, Zhu Y, Zhao J, Yang T, Zhang Y, Wu Y L. *Chin. J. Pestic. Sci.* (陈国, 朱勇, 赵健, 杨挺, 张艳, 吴银良. 农药学学报), **2014**, 16(2): 153-158.
- [9] Liu S, Li J L, Chen J, Wei H, Qiao H L, Xu R, Guo K, Lin C, Jin H Y, Ma S C, Xu C Q. *Chin. J. Chin. Mater. Med.* (刘赛, 李建领, 陈君, 魏赫, 乔海莉, 徐荣, 郭昆, 林晨, 金红宇, 马双成, 徐常青. 中国中药杂志), **2016**, 41(10): 1815-1818.
- [10] Wu Q, Li J G, Lü D Z, Qian C, Fan Q. *Chin. J. Pestic. Sci.* (吴琼, 李建国, 吕岱竹, 钱程, 范琼. 农药学学报), **2015**, 17(1): 111-114.
- [11] Yang Y, Tian L. *J. Shangqiu Normal Univ.* (杨洋, 田黎. 商丘师范学院学报), **2015**, 31(3): 66-69.
- [12] Wang T Y, Yao Z L, Ping X L, Zhang W Q, Feng X J, Lin M. *J. Zhejiang Agric. Sci.* (王天玉, 姚周麟, 平新亮, 张伟清, 冯先橘, 林媚. 浙江农业科学), **2017**, 58(4): 583-586, 589.
- [13] He M Q, Zhang M S, Li C X, Zhao Z B. *J. Anhui Agric. Sci.* (何茂秋, 张明时, 李存雄, 赵治兵. 安徽农业科学), **2011**, 39(20): 12070-12071, 12078.
- [14] Li S J, Yu J, Gao Y S, Li X Y, Li L. *Sci. Technol. Food Ind.* (李淑娟, 于杰, 高玉生, 李晓玉, 李林. 食品工业科技), **2017**, 38(6): 49-53.
- [15] Long J H, Guo G, Zhang Y, Wei J, Liao G H, Duan T T. *Guizhou Agric. Sci.* (龙家寰, 郭刚, 张盈, 魏进, 廖国会, 段婷婷. 贵州农业科学), **2017**, 45(11): 52-54.
- [16] NY/T 788-2004. Guideline on Pesticide Residue Trials. Beijing: China Agriculture Press(农药残留试验准则. 北京: 中国农业出版社).
- [17] Xu J, Zhang Y, Dong F S, Liu X G, Guo Z L, Zheng Y Q. *Chin. J. Pestic. Sci.* (徐军, 张盈, 董丰收, 刘新刚, 郭紫兰, 郑永权. 农药学学报), **2012**, 14(6): 654-658.
- [18] Fu Q, Huang Y J, Fu Q M, Liang J, Ma J, Feng X, Li S S. *Chin. J. Pestic. Sci.* (傅强, 黄颖婕, 付启明, 梁骥, 马婧, 冯雪, 李双双. 农药学学报), **2017**, 19(5): 631-637.