

超高效液相色谱串联质谱法测定上海青基质中吡虫啉和啉霉胺残留

覃国新, 劳水兵, 莫仁甫, 闫飞燕, 莫磊兴, 何洁, 周其峰, 杨玉霞, 罗丽红

(广西壮族自治区农业科学院农产品质量安全与检测技术研究所, 农业部甘蔗品质监督检验测试中心(南宁), 广西南宁 530007)

摘要: 本文研究建立了超高效液相色谱-四级杆串联质谱(UPLC-MS/MS)同时检测上海青基质中吡虫啉和啉霉胺残留量的方法。上海青样品经乙腈提取, SPE氨基固相萃取柱净化(乙腈+甲苯(3+1)洗脱)后, 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相进行超高效液相色谱梯度洗脱分离, 质谱多反应监测模式检测, 以保留时间和子离子比定性, 外标法定量。结果表明, 吡虫啉和啉霉胺的方法定量限(LOQ)分别为 3.1×10^{-6} mg/kg和 3.6×10^{-7} mg/kg, 在0.0005~0.5 mg/L线性范围内, 两种农药的相关系数为0.9995以上。添加水平在0.02~0.2 mg/kg范围内, 吡虫啉和啉霉胺平均回收率分别为99.1%~105.8%和99.1%~110.0%之间, 相对标准偏差(RSD)分别小于1.23%和1.64%。该方法操作简单、线性范围宽、灵敏度高、稳定可靠, 可满足当前国内外蔬菜中此类药物残留量的检测要求。

关键词: 上海青; 吡虫啉; 啉霉胺; 超高效液相色谱-串联质谱

文章编号: 1673-9078(2017)12-262-266

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.12.039

Determination of Imidacloprid Residues and Pyrimethanil Residues in Green Vegetable (*Brassica rapa* var. *chinensis*) by Ultra Performance

QIN Guo-xin, LAO Shui-bing, MO Ren-fu, YAN Fei-yan, MO Lei-xing, HE Jie, ZHOU Qi-feng, YANG Yu-xia, LUO Li-hong

(Institute for Agricultural Product Quality Safety and Testing Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Quality Inspection and Test Center for Sugarcane and Its Product, China Ministry of Agriculture (Nanning), Nanning 530007, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of imidacloprid residues and pyrimethanil residues in green vegetable (*Brassica rapa* var. *chinensis*) by using Ultra performance liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC/MS/MS) was established in this paper. The green vegetable (*Brassica rapa* var. *chinensis*) samples were extracted by acetonitrile and purified by an amino solid phase extraction (SPE) column (eluted by acetonitrile + toluene (3+1)), and then the gradient elution was applied in ultra performance liquid chromatography separation by using the acetonitrile -0.1% formic acid solution as mobile phase. Samples were detected by mass spectrometry multi reaction monitoring model, using retention time and sub-ion ratio as qualitative analysis and the external standard method as quantitative analysis. Tandem mass spectrometry with electrospray ionization and multiple reaction monitoring interface in an external standard manner. The results showed that the limits of quantitation (LOQ) of imidacloprid and pyrimethanil were 3.1×10^{-6} mg/kg and 3.6×10^{-7} mg/kg respectively, and the correlation coefficients of two pesticides were more than 0.9995 in the linear range of 0.0005~0.5 mg/L. In addition, the average recoveries were 99.1%~105.8% for imidacloprid and 99.1%~110.0% for pyrimethanil in the range of 0.02-0.2 mg/kg, and the relative standard deviations (RSD) were less than 1.23% and 1.64%, respectively. The proposed method had the advantages of simple operation, wide linear range, high sensitivity and reliability, which met the requirements for the detection of such drug residues in vegetables at home and abroad.

Key words: green vegetable (*Brassica rapa* var. *chinensis*); imidacloprid; pyrimethanil; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS)

收稿日期: 2017-07-10

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(21567007); 农业部农产品质量安全监管专项(风险评估)(181721301092362201); 农业部农产品质量安全监管专项(风险评估)(181721301092362926); 广西农科院科技发展基金项目(2015YT93); 广西农科院科技发展基金项目(桂农科2017JM60)

作者简介: 覃国新(1982-), 男, 工程师, 研究方向: 分析化学

通讯作者: 何洁(1984-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品科学

吡虫啉 (Imidacloprid) 和啉霉胺 (Pyrimethanil) 是蔬菜种植生产过程中广泛使用的两种农药, 它们具有低毒、高效和广谱等特点, 吡虫啉主要用于防治叶蝉、蚜虫等刺吸式口器害虫, 啉霉胺主要用于灰霉病菌的防治。近年来, 吡虫啉和啉霉胺在蔬菜生产中用量不断增加, 由于其直接喷洒在蔬菜上, 通过食用进入人体, 其残留量过大不可避免的对人体健康造成危害, 美国、日本和欧盟等已相继对蔬菜中吡虫啉和啉霉胺的最高残留量做了限量规定^[1]。我国国家标准 GB 2763-2016 食品安全国家标准-食品中农药最大残留量也对两者做了限量标准: 吡虫啉在大白菜、黄瓜和芹菜等蔬菜中的最大残留量为 0.5~5 mg/kg; 啉霉胺在马铃薯、黄瓜、番茄和菜豆等蔬菜中的最大残留量为 0.05~3 mg/kg。因此, 研究快速、灵敏、准确、可靠的方法同时检测蔬菜中吡虫啉和啉霉胺具有重要意义。

据文献报道, 吡虫啉的检测方法主要有气相色谱法^[2]、液相色谱法^[3-5]、液相色谱串联质谱法^[6-8]和胶体金免疫层析法^[9,10]等。啉霉胺的检测方法主要有气相色谱法^[11,12]、气相色谱串联质谱法^[13-15]和液相色谱法^[16-18]等, 其中, 吡虫啉残留量的检测以液相色谱方法为主, 啉霉胺以气相色谱方法为主。以超高效液相色谱-串联质谱方法同时检测这两种药物的文献未见有报道。本文在前人研究的基础上, 建立了超高效液相色谱-电喷雾四级杆串联质谱法同时测定上海青中的吡虫啉和啉霉胺 2 种药物残留, 方法操作简便, 灵敏度高、定量限低、准确可靠, 能满足农药残留检测的要求, 以期对蔬菜中吡虫啉和啉霉胺 2 种药物残留的检测研究提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜上海青, 搅碎混匀后于 -18 °C 冰箱保存备用。标准品吡虫啉 (纯度 ≥ 96%)、啉霉胺 (纯度 ≥ 98%) 上海市农药研究所有限公司; 乙腈、乙酸、正己烷、甲苯 (均为色谱纯) 赛默飞世科技有限公司; 氯化钠

(分析纯, 400 °C 灼烧 2 h, 贮藏于干燥器中备用)。

1.2 仪器与设备

Xevo TQ-S 型超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪 (UPLC-MS/MS) (配有电喷雾离子源), 美国 Waters 公司; DS-1 型高速组织捣碎机, 上海标模仪器厂; 高速分散均质机, 上海标本模型厂; LD5-2A 型低速离心机, 北京京立离心机有限公司; CNWBOND NH₂ 氨基 SPE 小柱 (1 g, 6 mL, 使用前用 5 mL 乙腈 + 甲苯 (3+1) 活化), 上海安谱实验科技股份有限公司; RE5-2A 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SE812J 数控氮吹仪, 北京科伟永兴仪器有限公司。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱, ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1×100 mm, 1.7 μm); 柱温 35 °C; 进样量 1.0 μL; 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸溶液。梯度洗脱: 0~0.8 min, 10%~40% A; 0.8~2.8 min, 40%~60% A; 2.8~3.8 min, 60%~80% A; 3.8~4.7 min, 80%~90% A; 4.7~5.7 min, 90% A; 5.7~6.0 min, 90%~10% A; 6.0~7.0 min, 10% A。流速为 0.3 mL/min。

1.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 ESI (+), 扫描模式: 多反应监测 MRM, 离子源温度 150 °C, 脱溶剂气温度 400 °C, 电喷雾电压 3.0 kV, 脱溶剂气体流速 800 L/hr。在分析过程中, 以离子对 (母离子和两个子离子) 信息比较进行定性分析; 以母离子和响应值最高的子离子进行定量分析。吡虫啉和啉霉胺在多反应监测模式下的质谱参数见表 1。

1.4 溶液的配制

吡虫啉和啉霉胺标准储备溶液的配制: 准确称取适量标准品 (精确至 0.1 mg), 用乙腈配制成浓度为 1000.0 mg/L 的标准储备液, 置于 -18 °C 冰箱中避光保存。

表 1 吡虫啉、啉霉胺的质谱参数

Table 1 MS/MS parameters of imidacloprid and pyrimethanil

Compound	Precursor ion(<i>m/z</i>)	Product ion(<i>m/z</i>)	Declustering potential/V	Collision energy/V
Imidacloprid	256.10	209.10*	30.00	16.00
	256.10	175.10	30.00	19.00
Pyrimethanil	200.00	107.00*	42.00	24.00
	200.00	82.00	42.00	24.00

注: *为定量离子。

空白样品提取液: 称取 20.00 g 空白上海青试样(精确至 0.01 g)于 100 mL 离心管中, 加入 40.0 mL 乙腈, 用高速匀浆机于 12000 r/min 匀浆提取 1 min 后, 加入 6 g 氯化钠, 继续匀浆提取 1 min, 4000 r/min 离心 5 min, 合并上清提取液, 备用(按 1.5 净化)。

1.5 样品的前处理

提取: 称取 20.00 g 试样(精确至 0.01 g)于 100 mL 离心管中, 加入 40.0 mL 乙腈, 用高速匀浆机于 12000 r/min 匀浆提取 1 min 后, 加入 6 g 氯化钠, 继续匀浆提取 1 min, 4000 r/min 离心 5 min。分取上清液 10.0 mL 待净化。

净化: 将 10.0 mL 提取液于 50 °C 水浴真空旋转蒸发近干, 2 mL 乙腈溶剂残渣, 过氨基固相萃取小柱(已活化), 之后用 5×5 mL 乙腈+甲苯(3+1)淋洗, 收集全部流出液, 控制流出液速度低于 1.0 mL/min。将收集液在 50 °C 水浴真空旋转蒸发近干后, 用氮气吹干, 最后用 2.0 mL 乙腈溶解残渣, 过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 供 UPLC-MS/MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

甲醇、乙腈和乙酸乙酯等溶剂对吡虫啉和啉霉胺都有一定的提取效率。实验发现, 乙腈的提取效率比乙酸乙酯的高, 这是由于乙腈与水有很好的互溶性, 能从水分含量较高的蔬菜样品中充分提取出农药, 因此, 本实验选用乙腈作为提取溶剂。

2.2 净化方法的选择

本实验参考标准 GB 20769-2008, 采用 SPE 氨基固相萃取柱为净化小柱, 实验考察了乙腈、乙腈: 甲苯体积比(1:1、2:1、3:1)不同加入量对洗脱效果的影响, 含有甲苯的洗脱体系比纯乙腈洗脱效果好, 考虑到甲苯的加入量对浓缩效率的影响, 本实验采用乙腈: 甲苯(体积比 3:1), 25 mL 洗脱率能达到 90%以上。

2.3 色谱条件的选择

不同流动相对吡虫啉和啉霉胺两种药物离子化效率都有不同程度的影响。实验通过比较水-乙腈、0.1% 甲酸溶液-乙腈两种不同流动相条件下目标物的离子化效率。结果表明, 水-乙腈(体积比: 10:90)作为

流动相对苯醚甲环唑的离子化效率明显不佳, 用 0.1% 甲酸溶液-乙腈(体积比: 10:90)作为流动相时, 两种药物的目标物离子化效率均较高。用 Optimizer 优化软件对两种药物的质谱参数进行优化, 所得结果见表 1。

2.4 方法线性方程和检测限

实验比较乙腈和空白样品提取液作为标准稀释液制备标准系列, 发现上海青样品中存在基质干扰效应, 使得吡虫啉和啉霉胺的仪器响应受到干扰, 回收率偏低; 因此, 本实验用空白上海青样品提取净化液配制标准系列, 稀释成 0.0005、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/L 混合标准系列溶液, 按 1.3 的仪器条件进行测定。基质标(浓度为 0.05 mg/L)(图 1a)及添加水平为 0.02 mg/kg(图 1b)的总离子流图如图 1 所示, 在 $t=1.95$ min 为吡虫啉峰, $t=3.03$ min 为啉霉胺峰。用选定的定量离子峰面积(Y)对质量浓度(X)绘制标准曲线, 所得基质标准曲线线性方程及相关系数见表 2。

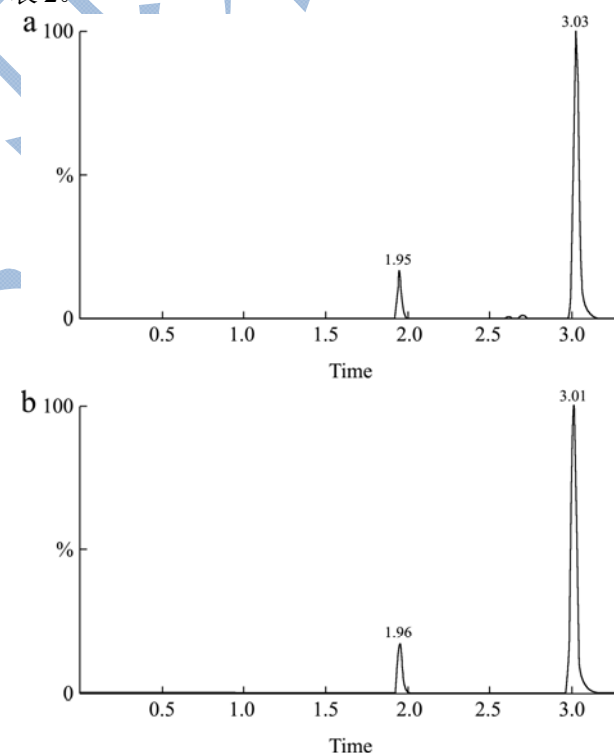


图 1 基质标(0.05 mg/L)(a)及加标样上海青样(添加水平 0.02 mg/kg)(b)的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatography of matrix (50 μg/L) (a) and green vegetable (*Brassica rapa* var. *chinensis*) with imidacloprid and pyrimethanil standards (add a level of 0.02 mg/kg) (b)

表 2 吡虫啉和啉霉胺的基质线性方程、相关系数

Table 2 Matrix linear equations and correlation coefficients of imidacloprid and pyrimethanil

Compound	Linear range/(mg/L)	Regression equation	r
Imidacloprid	0.0005~0.5	Y=1042.55X+793.67	0.9999
Pyrimethanil	0.0005~0.5	Y=9982.68X+4633.16	0.9995

以 10 倍信噪比所对应的待测物质浓度为最低定量限质量浓度, 根据样品稀释倍数, 确定本方法吡虫啉和啉霉胺两种农药的样品定量限分别为 3.1×10^{-6} mg/kg 和 3.6×10^{-7} mg/kg, 比国家标准 GB 2763-2016 所规定的最低农药残留限量值低 100 个数量级以上, 满足国家标准的相关要求。线性范围均为 0.0005~0.500 mg/L, 在线性范围以外, 可以适当增大样品最终定容体积或减少样品净化体积。

2.5 方法回收率和精密度

选取不含吡虫啉和啉霉胺基质的上海青样品, 进行不同添加水平的吡虫啉和啉霉胺加标回收实验, 添加水平分别为 0.02、0.05、0.2 mg/kg 三个, 每个质量浓度做 6 个平行样, 吡虫啉和啉霉胺两种农药的基质标准溶液(10 μ g/L)及添加水平为 0.02 mg/kg 的 MRM 色谱图如图 2 所示, 图 a 和 b 分别为啉霉胺的定量和定性离子色谱图, c 和 d 分别为吡虫啉的定量和定性离子色谱图, 以及相对应的 0.02 mg/kg 添加水平的 MRM 色谱图如图中 e、f 和 g、h。吡虫啉和啉霉胺平均回收率分别为 99.1%~105.8%和 99.1%~110.0%之间, 相对标准偏差(RSD)分别小于 1.23%和 1.64%。结果见表 3。上述结果表明, 本实验建立的方法得到的数据准确可靠。

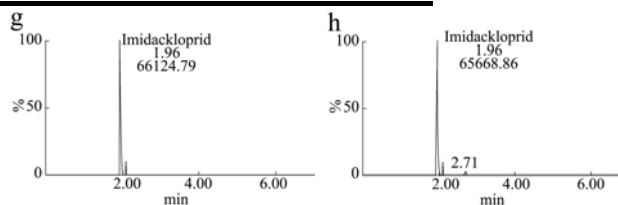
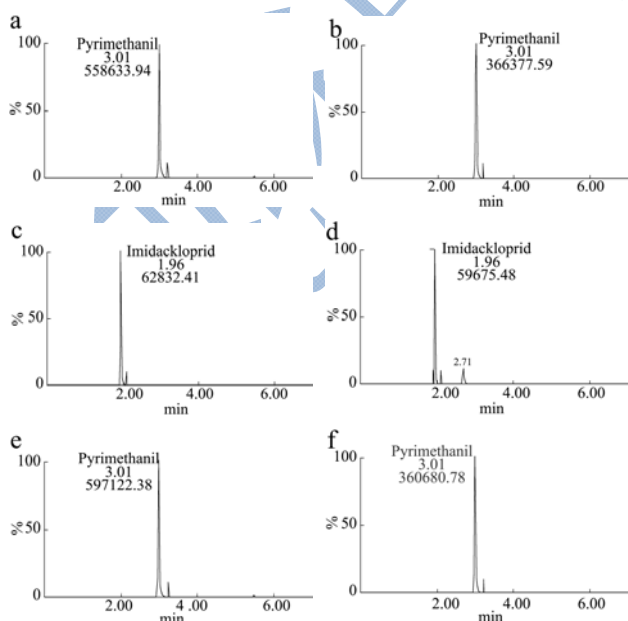


图 2 基质标 (0.01 mg/L) (吡虫啉: c、d; 啉霉胺: a、b) 及加标样上海青样 (添加水平 0.02 mg/kg) (吡虫啉: g、h; 啉霉胺: e、f) 的 MRM 色谱图

Fig.2 MRM chromatograms of matrix standard solution (0.01 mg/L) (imidacloprid: c, d; pyrimethanil: a, b) and green vegetable (*Brassica rapa* var. *chinensis*) with standard (imidacloprid: g, h; pyrimethanil: e, f) (add a level of 0.02 mg/kg)

表 3 吡虫啉和啉霉胺的加标回收试验 (n=6)

Table 3 Spike recoveries of imidacloprid and pyrimethanil (n=6)

Compound	Spiked / (mg/kg)	Average recovery / %	RSD / %
Imidacloprid	0.02	108.50	0.81
	0.05	103.50	1.23
	0.20	99.10	1.06
Pyrimethanil	0.02	110.00	0.44
	0.05	104.50	1.64
	0.20	99.10	0.13

3 结论

本实验建立了同时测定上海青基质中吡虫啉和啉霉胺 2 种药物残留的超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法, 样品前处理操作简便, 应用超高效液相色谱-串联质谱法检测, 灵敏度高、重现性好, 准确度可靠, 定量限低, 线性范围宽, 满足国内外对农药残留分析的相关要求, 适用于上海青基质中吡虫啉和啉霉胺 2 类药物残留的同时快速检测。

参考文献

[1] 高蓉,赵人铮,肖杭.高效液相色谱法测定黄瓜中吡虫啉和啉霉胺残留量[J].现代农药,2004,3(6):21-23
GAO Rong, ZHAO Ren-zheng, XIAO Hang. Determination

- of pyrimethanil and imidacloprid residue in cucumber by HPLC [J]. *Modern Agrochemicals*, 2004, 3(6): 21-23
- [2] 李广颖,姜金庆,王自良,等.气相色谱法检测卷心菜中啶虫脒和吡虫啉残留[J].*西北农业学报*,2010,19(9):71-74
LI Guang-ling, JIANG Jin-qing, WANG Zi-liang, et al. Determination of Acetamiprid and Imidacloprid Residue in Cabbage by Gas Chromatography [J]. *Acta Agricuturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2010, 19(9): 71-74
- [3] 张雪辉,杜雨倩,徐芳,等.高效液相色谱法检测蔬菜中的吡虫啉残留[J].*现代食品科技*,2012,28(4):466-482
ZHANG Xue-hui, DU Yu-qian, XU Fang, et al. Determination of imidacloprid pesticide residue in fresh vegetables by HPLC [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(4): 466-482
- [4] 侯如燕,蔡荟梅,张正竹,等.水果蔬菜中吡虫啉农药残留的液相色谱检测方法[J].*食品与发酵工业*,2009,35(10): 128-131
HOU Ru-yan, CAI Hui-mei, ZHANG Zheng-zhu, et al. A method for determination of imidacloprid residue in fruit and vegetables with HPLC [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 40(9): 295-297
- [5] 陈黎,王金芳,杜鹏,等.韭菜中吡虫啉和啶虫脒残留的微波处理-逆向相分散法净化及液相色谱检测[J].*分析化学*, 2008,10(36):1364-1368
CHEN-Li, WANG Jin-fang, DU Peng, et al. Determination of imidacloprid and acetamiprid in leek by reversed phase high performance liquid chromatography with microwave treatment and convenient reverse solid phase dispersion clean-up [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 10(36): 1364-1368
- [6] 苏敏,李世雨,李锋格,等.超高效液相色谱-串联质谱法快速检测番茄酱中吡虫啉等 6 种农药残留[J].*色谱*,2011, 29(11):1070-1075
SU Min, LI Shi-yu, LI Feng-ge, et al. Rapid determination of 6 pesticide residues in tomato paste by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2011, 29(11): 1070-1075
- [7] 诸力,王晨,陈红平,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定茶叶中 11 植物生长调节剂及吡虫啉、啶虫脒的残留[J].*分析化学(FENXI HUAXUE)研究报告*,2017,45(4):529-436
ZHU Li, WANG Chen, CHEN Hong-ping, et al. Simultaneous determination of plant growth regulators and imidacloprid, acetamiprid in tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(4): 529-436
- [8] 成婧,王美玲,朱绍华,等.固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定茶中啶虫脒、吡虫啉和氟虫脒残留量[J].*食品安全质量检测学报*,2016,7(1):131-137
CHENG Jing, WANG Mei-ling, ZHU Shao-hua, et al. Determination of imidacloprid, acetamiprid and fipronil residues in tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase extraction [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2016, 7(1): 131-137
- [9] Wang R M, Wang Z H, Yang H, et al. Highly sensitive and specific detection of neonicotinoid insecticide imidacloprid in environmental and food sample by a polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92: 1253-1260
- [10] 楼小华,高川川,朱文静,等.胶体金免疫层析法快速检测烟草中吡虫啉残留[J].*食品安全质量检测学报*,2017,8(5): 1739-1774
LOU Xiao-hua, GAO Chuan-chuan, ZHU Wen-jing, et al. Rapid detection of imidacloprid residues in tobacco leaf by colloidal gold immunochromatographic assay [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(5): 1739-1774
- [11] 潘守奇,孙军,董静,等.气相色谱法测定水果和蔬菜中异丙威、啶霉胺、抑霉唑残留量[J].*食品科学*,2008,29(12):516-518
PAN Shou-qi, SUN Jun, DONG Jing, et al. Simultaneous determination of pyrimethanil, isoprocarb and imazalil multiresidues in fruits and vegetables with gas chromatography [J]. *Food Science*, 2008, 29(12): 516-518
- [12] 张心明,余向阳,洪晓月,等.固相萃取-气相色谱法测定农产品中啶霉胺的残留量[J].*食品科学*,2007,28(11):424-427.
ZHANG Xin-ming, YU Xiang-yang, HONG Xiao-yue, et al. Determination of pyrimethanil residue in agro-products by SPE-GC [J]. *Food Science*, 2007, 28(11): 424-427
- [13] 朱涛,周宏琛,闫秋成,等.气相色谱-质谱联用法测定大蒜中的啶霉胺、噻嗪酮残留量[J].*分析实验室*,2007,26(10):72-75
ZHU Tao, ZHOU Hong-chen, YAN Qiu-cheng, et al. Determination of pyrimethanil and hexythiazox in garlic by gas chromatography mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2007, 26(10): 72-75
- [14] Navalón A, Prieto A, Araujo L, et al. Determination of pyrimethanil and kresoxim-methyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 975(2): 355-360

- [15] Charlton A J A, Ainsley J. Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1141(1): 117-122
- [16] 程文杰,苏效华,桑绍纯.高效液相色谱法测定黄瓜中嘧霉胺和烯酰吗啉农药残留[J].*环境与职业医学*,2010,27(8): 512-514
CHENG Wen-jie, SU Xiao-hua, SANG Shao-chun. Determination of residues of pesticides pyrimethanil and dimethomorph in cucumber by highperformance liquid chromatography [J]. *J Environ. Occup. Med.*, 2010, 27(8): 512-514
- [17] 王玉健,黄惠玲,梁振纲,等.QuEChERS/液相色谱-串联质谱法测定热带水果中抑霉唑和嘧霉胺的残留量[J].*食品工业*,2014,35(6):262-265
WANG Yu-jian, HUANG Hui-ling, LIANG Zhen-gang, et al. Determination of imazalil and pyrimethanil in tropical fruits with liquid chromatography tandem mass spectrometry using QuEChERS [J]. *The Food Industry*, 2014, 35(6): 262-265

现代食品科技