

◆ 环境与残留 ◆

超高效液相色谱-质谱串联法测定双孢菇中噻虫嗪及其代谢物噻虫胺残留量

朱卫芳¹, 马琳², 陈建波², 赵莉^{2*}, 占绣萍²

(1. 上海市青浦区食用农产品检测中心, 上海 201799 2. 上海市农业技术推广服务中心, 上海 201103)

摘要: 建立改进的QuEChERS提取净化方法和超高效液相色谱-串联质谱法测定双孢菇中噻虫嗪及其代谢物噻虫胺残留。样品经乙腈提取后, 采用MgSO₄、PSA和C₁₈吸附净化, UPLC-MS/MS检测。研究表明, 噻虫嗪和噻虫胺质量浓度为0.005~0.5 mg/L, 方法呈良好的线性关系, 相关系数大于0.995。方法的检出限为0.1 ng, 定量限为0.005 mg/kg。在添加质量分数为0.005、0.01、0.5 mg/kg时, 方法的平均回收率为85%~112%, 相对标准偏差为0.5%~7.1%。该方法准确可靠, 灵敏度和准确度均达到了农药残留检测的要求。

关键词: 噻虫嗪; 噻虫胺; 残留; QuEChERS法; 超高效液相色谱-串联质谱法; 测定

中图分类号: TQ 450.2+63 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2019.02.011

Determination of Thiamethoxam and Its Metabolite Clothianidin Residues in *Agaricus bisporus* by UPLC-MS/MS

Zhu Wei-fang¹, Ma Lin², Chen Jian-bo², Zhao Li^{2*}, Zhan Xiu-ping²

(1. Qingpu Edible Agricultural Products Testing Center, Shanghai 201799, China; 2. Shanghai Agriculture Technology Extension & Service Centre, Shanghai 201103, China)

Abstract: A sensitive LC-MS/MS method for determining of thiamethoxam and its metabolite clothianidin residues in *Agaricus bisporus* was established by improved QuEChERS. The thiamethoxam and clothianidin residues in *Agaricus bisporus* were extracted by acetonitrile, purified by the mixture of MgSO₄, PSA, C₁₈, then determined by UPLC-MS/MS. The results showed that the good linearities of thiamethoxam and clothianidin were obtained at the concentration of 0.005-0.5 mg/L, with the correlative coefficient more than 0.995. The detection limits of thiamethoxam and clothianidin in *Agaricus bisporus* were 0.1 ng, the quantification limits were 0.005 mg/kg. When the spiked concentration of 0.005-0.5 mg/L, the average recoveries of thiamethoxam and clothianidin were 85%-112%, and the variation coefficients were 0.5%-7.1%. The UPLC-MS/MS method was simple, the sensitivity and accuracy met the requirements of residue analysis.

Key words: thiamethoxam; clothianidin; residue; QuEChERS; UPLC-MS/MS; determination

双孢菇外表白嫩圆润, 味道鲜美, 受到广大消费者喜爱, 是我国乃至全球食用菌生产中最大的菇种之一。近年来, 双孢菇市场行情看好, 各地栽培面积不断扩大, 但线虫等地下害虫造成的危害也在逐年加重。线虫主要生活在覆土层, 以刺吸菌丝体造成菌丝衰败, 幼菇受线虫侵害后, 菌丝体变得稀疏,

培养料下沉、变黑, 发黏发臭, 菌丝消失而不出菇, 最终萎缩死亡。实地调查发现, 不少种植户使用噻虫嗪、吡虫啉等新烟碱类杀虫剂防治土壤害虫, 但截至目前, 尚未批准噻虫嗪在土壤方面的登记使用。种植户的超范围使用对双孢菇的质量安全造成潜在的安全风险。

收稿日期: 2018-08-27

基金项目: 双孢蘑菇生产中农药污染潜在风险评估和预警技术研究[沪农科攻字(2016)第5-2号]

作者简介: 朱卫芳, 高级农艺师, 本科, 从事农产品质量安全监督监测工作。E-mail: shqpnj@163.com

通讯作者: 赵莉, 推广研究员, 硕士, 从事农药残留及相关工作。E-mail: zhaoli5741@aliyun.com

研究表明,噻虫嗪(thiamethoxam)在植物体内可转化为噻虫胺(clothianidin),因此JMPR评估报告中噻虫嗪的膳食评估残留物包括噻虫嗪和噻虫胺^[1]。噻虫嗪和噻虫胺结构式见图1。噻虫嗪及其代谢物噻虫胺的残留测定方法主要有HPLC法^[2]和LC-MS/MS法^[3-5]。前处理方法大多采用固相萃取法(SPE)或QuEChERS方法。目前尚未见同时检测双孢菇中噻虫嗪、噻虫胺的方法报道。因此,研究建立高效准确,同时测定噻虫嗪及其代谢物噻虫胺的农残检测方法,对于保障食品安全,进行农药安全评价具有重要意义。

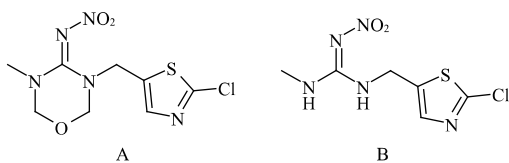


图1 噻虫嗪(A)及噻虫胺(B)的结构式

本研究采用改进的QuEChERS法,通过对样品量和净化条件等进行优化,并结合UPLC-MS/MS技术,建立双孢菇中噻虫嗪和噻虫胺残留的快速测定方法。本方法操作简单,能够满足双孢菇中噻虫嗪和噻虫胺残留的快速检测要求。

1 材料与方 法

1.1 仪器等实验材料

1290超高效液相色谱、G6460三重四极杆质谱仪,美国Agilent公司;Milli-Q超纯水仪,美国Millipore公司;水浴恒温振荡器SHA-C,常州国华电器有限公司。

噻虫嗪(99.0%)、噻虫胺(99.0%)标准品,均购于德国Dr. Ehrenstorfer公司;乙腈、甲醇(色谱纯),德国Merck公司;PSA、C₁₈,美国Agilent公司;氯化钠、无水硫酸镁(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;甲酸(分析纯),重庆川东化工有限公司。

双孢菇、香菇样品购于当地超市。

1.2 实验方法

1.2.1 仪器条件

色谱条件:色谱柱为Agilent Proshell 120 EC-C₁₈柱(100 mm×3.0 mm 2.7 μm),流动相为乙腈+0.1%甲酸水溶液(体积比95:5),流速为0.4 mL/min;柱温为40℃,进样量为2 μL。外标法(峰面积)定量。

质谱条件:ESI源正离子模式电离,多反应监测(MRM),气体温度 300℃;气体流量:7 L/min;雾化器压力:275.8 kPa;鞘气温度 350℃;鞘气流量:

11 L/min。

1.2.2 样品前处理

准确称取5.0 g(精确至0.1 g)样品至50 mL离心管中,加入5 mL乙腈,冰浴超声提取20 min,再加入2.0 g NaCl,涡旋1 min,并以3 000 r/min离心5 min。取2 mL上清液转入至装有0.3 g无水硫酸镁、50 mg PSA和40 mg C₁₈的15 mL离心管中,涡旋1 min,并以3 000 r/min离心5 min。取上清液过0.22 μm滤膜,制成待测液。

2 结果与讨论

2.1 仪器条件的优化

配制2种农药标样溶液(0.1 mg/L),并移取2 μL,以乙腈+水(体积比50:50)为流动相,采用电喷雾正负离子模式,对各农药进行一级质谱扫描,确定农药的母离子。对各个农药的母离子进行二级质谱扫描,确定各农药的子离子。最后结合基质空白和基质标样溶液的离子扫描图,进一步优化参数,确定2种农药在多反应监测(MRM)模式下的质谱采集参数及质谱条件,结果见表1。图2为0.1 mg/L双孢菇基质标样溶液的MRM离子色谱图。

表1 2种农药的LC-MS/MS检测条件参数

农药	保留时间/ min	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	碰撞能量/ eV
噻虫嗪	3.56	292.0>211.0	292.0>211.0	10
		292.0>181.0		20
噻虫胺	4.14	250.0>169.2	250.0>169.2	5
		250.0>132.0		15

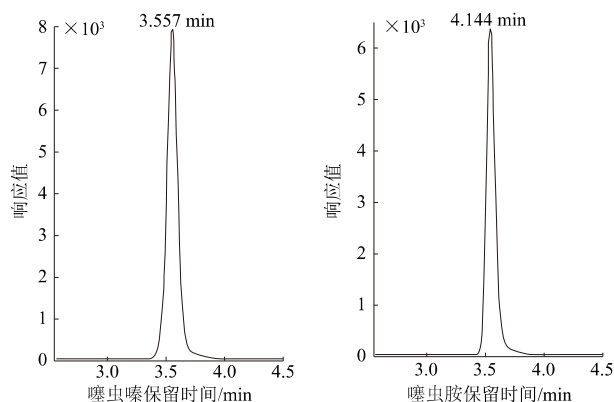


图2 2种农药的UPLC-MS/MS色谱图

2.2 前处理条件的优化

2.2.1 称样量

QuEChERS方法中的称样量一般为10.0 g^[6]。本实验考察不同称样量(3.0、5.0、10.0 g)对2种农药回收率的影响,实验结果见表2。结果表明,样品称样

量过少或过多均会影响回收率。当称样量为5.0 g时,2种农药的回收率均最佳。且随着称样量的增加,溶剂等消耗增加,成本也会上升,因此,本实验选取的最佳称样量为5.0 g。

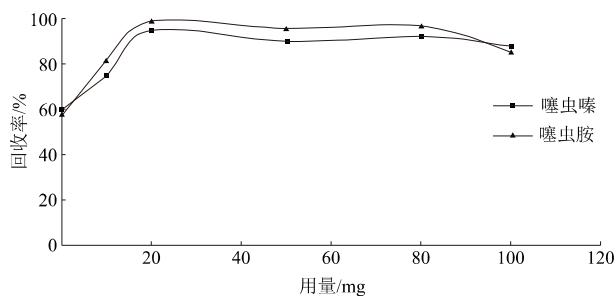
表2 C₁₈用量对回收率的影响

C ₁₈ 用量/mg	回收率/%	
	噻虫嗪	噻虫胺
0	60	58
10	75	82
20	95	99
50	90	96
80	92	97
100	88	86

2.2.2 吸附剂选择

PSA是QuEChERS法理想的净化吸附剂。25 mg PSA可以完全吸附1 g含水量较高的水果、蔬菜提取液中的有机酸、糖类、极性色素等干扰物质,且对目标农药的回收率影响可以忽略不计^[7]。参考AOAC 2007.01方法,本研究中每mL提取液用25 mg PSA进行净化吸附。

在净化方法研究中,为了更好地去除样品中的蜡质、甾醇、维生素等杂质,在添加25 mg PSA的同时添加不同用量C₁₈(0、10、20、50、80和100 mg),研究结果见图3。C₁₈的加入能够明显降低蜡质、甾醇、维生素等杂质的干扰。当C₁₈用量为20 mg时,2种农药的回收率均较高,且用量继续增加,2种农药的回收率变化不明显。因此,本实验确定每mL提取液加入25 mg PSA和20 mg C₁₈净化剂。

图3 不同C₁₈用量对双孢菇中2种农药回收率的影响

2.3 基质效应

基质效应是由共洗脱基质组分引起的分析信号抑制或增强现象,已被广泛研究并被认为是食品样品LC-MS/MS定量分析中的误差源^[8-9]。本研究使用基质匹配的校准标准物来补偿基质溶液中目标农药的基质效应(Mi)。

Mi为正值,基质效应增强,反之减弱。当基质效

应增强或抑制超过20%,则认为基质效应对定量检测具有显著影响,不可忽略^[9]。双孢菇中噻虫嗪和噻虫胺的基质效应分别为-25%和-31%,减弱效应比较明显,均超过20%。为确保结果的准确性,本研究采用基质标准工作液为基准进行校正。

2.4 方法评价

2.4.1 线性关系与检出限

在最优实验条件下,对2种目标农药的混合标样溶液进行UPLC-MS/MS测定。以各农药的质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,并计算得到线性方程和相关系数,结果见表3。噻虫嗪、噻虫胺质量浓度为0.005~0.5 mg/L时,方法线性关系良好,相关系数分别为0.998 3、0.996 1。当实际样品中2种农药残留量超过此线性范围时,应对样品溶液适当稀释后再进行定量测定。在信噪比(S/N)为3时,2种农药的检出限(LOD)均为0.1 ng。

表3 方法的线性范围及线性方程

农药	线性范围/(mg·L ⁻¹)	线性方程	相关系数	LOD/ng
噻虫嗪	0.005~0.5	y=29 580 x-2 363.8	0.998 3	0.1
噻虫胺	0.005~0.5	y=306 129 x+2 247.0	0.996 1	0.1

2.4.2 回收率与精密度

分别在空白双孢菇样品中添加质量分数为0.005、0.01、0.5 mg/kg的混标溶液,每个添加质量分数平行测定5次,进行加标回收率实验,结果见表4。2种农药的平均回收率为85%~112%,相对标准偏差(RSD)为0.5%~7.1%。以最低加标浓度可知,2种农药的定量限(LOQ)为0.005 mg/kg。结果表明,本方法具有较高的回收率和精密度,满足农药多残留检测要求。

表4 2种农药的平均加标回收率和相对标准偏差(n=5)

农药	0.005 mg/kg		0.01 mg/kg		0.5 mg/kg	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
噻虫嗪	85	5.6	100	7.1	104	1.4
噻虫胺	104	4.5	96	6.8	112	0.5

2.4.3 方法应用

采用本文建立方法,对50份市售双孢菇和香菇进行测定。结果显示,1份双孢菇中检出噻虫嗪,4份双孢菇中检出噻虫胺,3份香菇中检出噻虫胺,质量分数为0.01~0.025 mg/kg,超过欧盟在栽培食用菌上的MRL值(0.01 mg/kg)。因此,食用菌中噻虫嗪及其代谢物噻虫胺残留污染问题须引起监管部门的

(下转第49页)

参考文献

- [1] Yamamoto K, Horikoshi R, Oyama K, et al. Quinoline Derivative and Insecticide Containing Same as Active Constituent: WO, 2006013896A1 [P]. 2006-02-09.
- [2] Tanigakiuchi K, Sekiguchi M, Hotta H, et al. Stabilized Crystal of 2-Ethyl-3,7-dimethyl-6-(4-(trifluoromethoxy)phenoxy)quinoline-4-yl Methyl Carbonate, Process for Producing the Crystal, and Agricultural Chemical Composition Comprising the Crystal: US, 20130045989A1 [P]. 2013-02-21.
- [3] 厚生労働省. フロメトキン農薬抄録 [EB/OL]. (2017-06-22) [2018-11-14]. http://101.96.10.64/www.acis.famic.go.jp/syouroku/flometoquin/flometoquin_01.pdf.
- [4] Nobuto M, Tomoya M, Kiyoshi S, et al. 4-Acyloxyquinoline Derivative and Insecticide and Acaricide Containing the Same Derivative as Active Ingredient: JP, 03-128355A [P]. 1991-05-31.
- [5] Yamamoto K, Teraoka T, Iwata M, et al. 4-Quinolol Derivatives and Agrohorticultural Bactericides Containing the Same as Active Ingredient: WO, 98055460A1 [P]. 1998-12-10.
- [6] 農林水産省消費・安全局農産安全管理課, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター. 審査報告書 フロメトキン [EB/OL]. [2018-11-14]. http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_sinsa/attach/pdf/index-28.pdf.
- [7] 厚生労働省. フロメトキン(案) [EB/OL]. [2018-11-14]. <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000170883.pdf>.
- [8] フロメトキン(ファインセーブ) [EB/OL]. [2018-11-14]. <https://wiki.tenteki.org/index.php?%A5%D5%A5%ED%A5%E1%A5%C8%A5%AD%A5%F3>.
- [9] 三宅孝明, 武内晴香. 新規殺虫剤ファインセーブ™フロアブルの特長 [J]. 植物防疫, 2018, 72 (8): 547-549.
- [10] Insecticide Resistance Action Committee. Mode of Action Classification [EB/OL]. (2016-04) [2018-09-30]. <http://www.irac-online.org/documents/moa-structures-poster-english/?ext=pdf>.
- [11] 李青, 焦爽, 柴宝山, 等. 新型杀虫剂flometoquin的合成与生物活性研究 [J]. 农药, 2014 (1):15-16.
- [12] 李微, 柳爱平, 刘兴平, 等. 杀虫剂flometoquin的合成与生物活性研究 [J]. 精细化工中间体, 2016, 46 (1): 27-29.
- [13] El-moneim M A A. Efficacy of Certain Insecticides and Beauveria Bassiana Against Whitefly and Aphids with Determination of Thiamethoxam and Dinotefuran Residues In Pepper [D]. Cairo, Egypt: Cairo University, 2018.
- [14] Yamamoto K, Horikoshi R, Oyama K, et al. Quinoline Derivatives and Insecticide Comprising Thereof as Active Ingredient: US, 20070203181A1 [P]. 2007-08-30.
- [15] Kato Y, Shimano S, Morikawa A, et al. Process for Producing 6-Aryloxyquinoline Derivative and Intermediate Therefor: US, 20110118468A1 [P]. 2011-05-19.
- [16] 于保青, 黄成田, 张立, 等. Flometoquin原药的反相高效液相色谱分析 [J]. 农药, 2017, 56 (2):114-115. (责任编辑:陈晨)

(上接第 32 页)

高度注意,防止发生因农药残留污染引起食品安全和环境污染问题。

3 小结

本研究采用优化的QuEChERS方法结合UPLC-MS/MS技术,建立了双孢菇中噻虫嗪及其代谢物噻虫胺残留的快速测定方法。方法操作简单,其灵敏度、准确度、精密度均符合残留测定要求,并能很好地消除干扰。此外,样品的前处理简便易行,极大地缩短了检测时间,减少了有机溶剂使用量,便于实际操作。

参考文献

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Thiamethoxam and Clothianidin [DB/OL]. (2016-05-01). [2018-08-13]. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report12/Thiamethoxam_Clothianidin.pdf.
- [2] 李一帆, 董兆克, 相玉苗, 等. 吡虫啉和噻虫嗪防治瓜蚜的最终残留及膳食风险评估 [J]. 农药, 2015, 54 (9): 667-670.
- [3] 冯义志, 潘金菊, 齐晓雪, 等. 噻虫嗪及其代谢物噻虫胺在韭菜和土壤中的残留消解动态及残留量 [J]. 现代农药, 2016, 15 (5): 45-48.
- [4] 刘炎, 欧阳迪庆, 叶玉凤, 等. QuEChERS结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定番茄中噻虫嗪、噻虫胺、螺虫乙酯及其代谢物残留 [J]. 分析测试学报, 2017, 36 (12): 1431-1438.
- [5] 刘艳萍, 王思威, 孙海滨, 等. 噻虫嗪及其代谢物噻虫胺在节瓜中的消解动态及初步膳食风险评估 [J]. 农药学报, 2018, 20 (2): 211-216.
- [6] Anastassiades M, Lehotay S J, Tajnbaher D, et al. Fast and Easy Multi-Residue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce [J]. J AOAC Int, 2003, 86 (2): 412-431.
- [7] Lehotay S J, Kok A D, Hiemstra M, et al. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection [J]. J AOAC Int, 2005, 88 (2): 595-614.
- [8] Niessen W M A, Manini P, Andreoli R. Matrix Effects in Quantitative Pesticide Analysis Using Liquid [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2006, 25 (6): 881-899.
- [9] 马琳, 陈建波, 赵莉, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中6种酰胺类农药残留量 [J]. 色谱, 2015, 33 (10): 1019-1025. (责任编辑:石凌波)