

◆ 残留与环境 ◆

柱前衍生化气相色谱-串联质谱法检测平菇中吡虫啉的残留量

曲滢¹, 查欣欣¹, 沈鹏¹, 叶剑¹, 王洪雷^{2*}

(1. 江苏恒生检测有限公司, 南京 210046; 2. 江苏省农药研究所股份有限公司, 南京 210046)

摘要:本研究建立了一种经过衍生化处理, 测定平菇中吡虫啉及其含6-氯-吡啶基代谢物残留总量的气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)检测方法。样品中吡虫啉及其代谢物在碱性KMnO₄溶液和70℃水浴条件下氧化反应为6-氯-吡啶基的代谢物, 再加入强氧化剂进一步转化为6-氯烟酸三甲基硅酯, 采用多反应监测模式分析, 外标法定量测定衍生物。结果表明, 在0.002~0.2 mg/L范围内, 吡虫啉的衍生物6-氯烟酸三甲基硅酯的质量浓度与其峰面积呈良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.999$); 在0.02~0.5 mg/kg添加浓度范围内, 吡虫啉平均回收率为86%~95%, 相对标准偏差为1.7%~4.8%。该方法操作简单, 可满足同时测定吡虫啉及其含6-氯-吡啶基代谢物的检测需要, 为分析食品中吡虫啉残留量提供新的思路。

关键词:平菇; 吡虫啉; 含6-氯-吡啶基代谢物; 气相色谱-串联质谱法; 农药残留

中图分类号: TQ 450.7 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2022.06.008

Determination of Imidacloprid in *Pleurotus ostreatus* by Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry with Precolumn Derivatization

QU Ying¹, ZHA Xinxin¹, SHEN Peng¹, YE Jian¹, WANG Honglei^{2*}

(1. Jianshu Evertest Limited Company, Nanjing 210046, China; 2. Jiangsu Pesticide Research Institute Co., Ltd., Nanjing 210046, China)

Abstract: A gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method with precolumn derivatization was established for the determination of imidacloprid and its metabolites containing the 6-chloropyridinyl moiety residues in *Pleurotus ostreatus*. Imidacloprid and its metabolite in the sample were oxidized to 6-chloropyridinyl metabolite with alkaline KMnO₄ solution and 70℃ water bath, and converted to 6-chloronicotinic acid trimethylsilyl ester with strong oxidant. The derivative procuded was quantified by external standard method with mass detector under multireaction monitoring mode. The results showed the standard curve was well linear by the correlation coefficient in the range of 0.02-0.2 mg/L ($R^2 \geq 0.999$). Their average deviation at spiked levels of 0.02-0.5 mg/kg were 86%-95%, and the relative standard deviation of 1.7%-4.8%. The method was simple and suitable for detected imidacloprid and its 6-chloro-pyridyl metabolites, and provided a novel idea for analysing the safety problem of imidacloprid residues in food.

Key words: *Pleurotus ostreatus*; imidacloprid; containing the 6-chloropyridinyl moiety; GC-MS/MS; pesticide residues

吡虫啉(Imidacloprid), 化学名称为(E)-1-(6-氯-3-吡啶基甲基)-N-硝基亚咪唑烷-2-基胺(图1), 是

一种具有内吸性的新烟碱类杀虫剂, 为后突触烟碱乙酰胆碱受体(nAChRs)的激动剂, 作用于昆虫中枢

收稿日期: 2022-07-12

作者简介: 曲滢(1994—), 女, 河南南阳人, 本科, 初级工程师, 主要从事农药残留研究。E-mail: 1961250865@qq.com

共同第一作者简介: 查欣欣(1990—), 女, 安徽合肥人, 硕士, 工程师, 主要从事有机污染化学研究。E-mail: 752478599@qq.com

通信作者: 王洪雷(1963—), 男, 辽宁丹东人, 本科, 正高级工程师, 主要从事分析化学、制剂加工研究。E-mail: wanghonglei@lucaschem.com

神经系统,作用方式为层间传导,具有触杀和胃毒作用^[1]。吡虫啉在土壤、动物和植物中均容易发生降解代谢,土壤中最重要代谢途径为咪唑啉环羟氧化、还原或失去硝基,水解为6-氯烟酸;在植物体内主要代谢途径为吡虫啉通过失去硝基、咪唑啉环羟基化水解为6-氯烟酸(图2),主要代谢物为吡虫啉烯炔、吡虫啉脲、吡虫啉胍、5-羟基吡虫啉、6-氯烟酸,所有代谢物都含有6-氯-吡啶基部分^[2]。

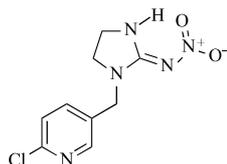


图1 吡虫啉结构式

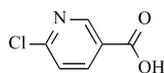


图2 6-氯烟酸结构式

目前关于吡虫啉检测方法较多,主要有液相色谱法、液相色谱串联质谱法,如采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)技术检测吡虫啉母体和苯醚甲环唑在蔬菜、秋葵等蔬菜中的残留^[3-8]。并且对吡虫啉代谢物的研究多为单独检测吡虫啉胍、吡虫啉脲、烯炔式吡虫啉、5-羟基吡虫啉、6-氯烟酸^[9-11]。而农药残留化学评估时,会同时参考GB 2763—2021^[12]和JMPR^[3]对残留的定义, JMPR对评估膳食摄入的吡虫啉残留量定义为吡虫啉及其含6-氯-吡啶基的代谢物之和。有关基于该定义研究吡虫啉的检测方法较少。因此,本研究通过柱前衍生方法,加入*N*-甲基三甲硅基三氟乙酰胺(MSTFA),将吡虫啉和代谢物转化为6-氯烟酸三甲基硅酯(图3)^[3],通过优化仪器检测和前处理反应条件等因素,同时对平菇中吡虫啉及其含6-氯-吡啶基代谢物的残留总量进行检测分析,为吡虫啉在农药残留化学评估的膳食风险摄入评估提供技术支撑。

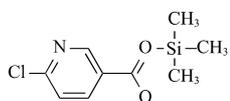


图3 6-氯烟酸三甲基硅酯结构式

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:平菇,江苏恒生检测有限公司;99.1%

吡虫啉标准品,北京勤诚亦信科技开发有限公司;99.21% 6-氯烟酸标准品,Dr·Ehrenstorfer公司。

试剂:高锰酸钾、硫酸(分析纯),南京化学试剂股份有限公司;*N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA)硅烷化试剂,美国Regis公司;甲基叔丁醚、乙腈、正己烷(色谱纯),美国天地有限公司;氯化钠、无水亚硫酸钠(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;氢氧化钠(分析纯),科密欧化学试剂有限公司;超纯水,默克化工技术有限公司。

仪器:滤膜(0.22 μm,有机系),津腾试验设备有限公司;气相色谱-串联质谱仪,美国安捷伦科技公司;AL204万分之一天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;AM600刀式研磨仪,蚂蚁源科学仪器有限公司;SSW-420-2S电热恒温水槽,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.2 仪器检测条件

色谱柱:HP-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm);色谱柱温度:100℃,保持1 min,然后以10℃/min升温至200℃,再以40℃/min升温至250℃;载气:氦气,纯度≥99.999%,流量:1.0 mL/min;进样口温度:250℃;进样量:1 μL;进样方式:不分流进样;保留时间:7.7 min左右;电离方式:EI;电子轰击源:70 eV;离子源温度:230℃;传输线温度:250℃;溶剂延迟:3 min;MRM多反应监测;质谱检测参数见表1。

表1 6-氯烟酸三甲基硅酯质谱检测参数

检测物质	前体离子(<i>m/z</i>)	产物离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV
6-氯烟酸三甲基硅酯	214	140	20
		170.1	15
		112*	35

注:*表示等量离子。

1.3 样品的提取及衍生化

准确称取2.0 g平菇样品于50 mL塑料离心管中,加入5 mL超纯水和10 mL乙腈,振荡20 min,加入5 g氯化钠,涡旋振荡1 min后以5 000 r/min离心5 min,定量吸取5 mL上清液于浓缩瓶后浓缩至近干,加入10 mL碱性KMnO₄溶液,在70℃水浴反应10 min取出冷却,温度低于15℃时,加入10%稀硫酸溶液酸化,加入1 g无水亚硫酸钠,溶液颜色由紫红色变为巧克力棕(二氧化锰)后变为无色透明,确定pH<1;用10 mL甲基叔丁醚(MTBE)液液萃取2次,取全部上清液转移至氮吹瓶吹干,2 mL正己烷复溶后,加入25 μL MSTFA,涡旋振荡30 s,反应为6-氯烟酸三甲基硅酯,过0.22 μm有机滤膜进气相色谱-串联质

谱检测。

1.4 标准储备液的配制和衍生化

准确称取0.010 2 g 6-氯烟酸标准品,用乙腈定容至10 mL,得到质量浓度为1 012 mg/L的标准储备液,用乙腈稀释为10 mg/L的标准工作溶液待衍生化;准确移取2 mL 10 mg/L标准工作溶液入氮吹瓶吹干,2 mL正己烷复溶后,加入25 μ L MSTFA进行衍生反应为6-氯烟酸三甲基硅酯,于0~4 $^{\circ}$ C保存。

称取0.010 4 g吡虫啉标准品,用乙腈定容至10 mL,得到浓度为1 031 mg/L标准储备液,用乙腈梯度稀释,配制成质量浓度分别为10和1 mg/L标准工作溶液,制备成0.02、0.05和0.5 mg/kg的添加样品,于0~4 $^{\circ}$ C保存。

1.5 标准溶液制备及标准曲线的绘制

将浓度为10 mg/L的6-氯烟酸三甲基硅酯用平菇基质空白溶液逐级稀释,配制成浓度分别为0.002、0.005、0.02、0.05、0.2 mg/L的系列标准工作溶液。在1.2所述色谱条件下进行测定,以其质量浓度和峰面积为横、纵坐标,绘制标准曲线。

1.6 计算

样品的检测对象为6-氯烟酸三甲基硅酯标准溶液浓度,因此样品中的吡虫啉残留量(吡虫啉及其含6-氯-吡啶基的代谢物之和)需用稀释因子折算^[13]。按式(1)和(2)分别计算样品检测浓度和回收率。

$$C_s = \frac{(A-b) Vn}{am} \quad (1)$$

式中: C_s 为样品中吡虫啉的检测浓度,mg/kg; m 为称样量,g; V 为定容体积,mL; n 为稀释因子; A 为样品峰面积,mAU·min; b 为标准曲线截距; a 为标准曲线斜率。

$$r/\% = \frac{C_s}{C_t} \times 100 \quad (2)$$

式中: r 为回收率; C_s 为样品的检测浓度,mg/kg; C_t 为添加浓度,mg/kg。

2 结果与分析

2.1 最终衍生物质谱结果分析

吡虫啉及其含6-氯-吡啶基的代谢物基通过加入 N -甲基- N -(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA),发生硅烷化,转化为6-氯烟酸三甲基硅酯。利用安捷伦自动优化软件Optimizer进行二级质谱分析,根据最终优化结果,离子强度最大的112为定量离子,离子强度次之的140、170.1为定性离子^[14]。在电子轰击离子源(ED)检测模式进行全扫(MS^2 Scan),选择质荷

和绝对强度较大的离子214为6-氯烟酸三甲基硅酯前体离子,6-氯烟酸三甲基硅酯质谱图见图4。

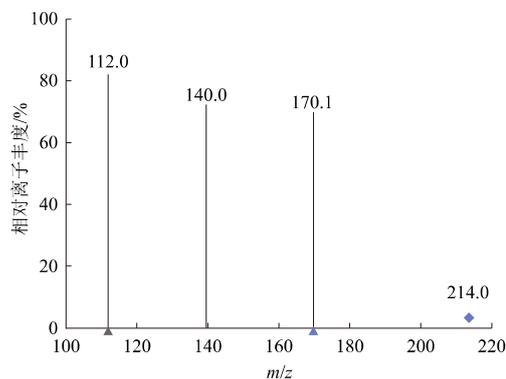


图4 定量定性离子对的质谱图

2.2 线性范围

在0.002~0.2 mg/L范围内,6-氯烟酸三甲基硅酯的线性方程为 $y=600\ 843.555\ 466x+409.212\ 699$, $R^2=0.999\ 5$, $R^2>0.999$,则工作溶液在0.002~0.2 mg/L范围内线性关系良好,符合检测要求^[15],见图5。

吡虫啉在平菇上的定量限为0.02 mg/kg,符合准则中定量限为0.01~0.05 mg/kg的要求^[16]。

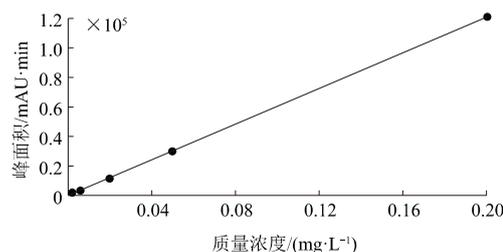


图5 6-氯烟酸三甲基硅酯的标准曲线图

2.3 准确度和精密度

目前尚未制定吡虫啉在平菇中的MRL值,因此吡虫啉在平菇基质空白样品中添加浓度设置为0.02、0.05和0.5 mg/kg,符合准则中如果尚未制定MRL值,添加水平应包括定量限和高于10倍定量限的浓度的要求^[16]。准确度以平均回收率表示,吡虫啉加标平均回收率为86%~95%;精密度以相对标准偏差表示,其相对标准偏差为1.7%~4.8%,具体结果见表2。结果表明该方法准确度和精密度良好,稳定可靠。

3 结论

本研究创新性地建立了一种柱前衍生法对平菇中吡虫啉残留物进行气相色谱-串联质谱法测定分析。平菇样品中的吡虫啉及其代谢物经乙腈提取,在碱性 $KMnO_4$ 溶液和70 $^{\circ}$ C水浴条件下氧化反应转

化为含6-氯-烟酸吡啶基的代谢物,经甲基叔丁醚萃取浓缩,正己烷复溶,*N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA)衍生为6-氯烟酸三甲基硅酯。通过最终衍生物质谱分析,并采用GC-MS/MS测定,对吡虫啉在平菇中的平均回收率为86%~95%,相对标准偏差为1.7%~4.8%。本研究结果表明,该方法操作简单方便、高效准确,适用于平菇中吡虫啉及其含6-氯-吡啶基代谢物的残留总量的检测。

表 2 吡虫啉加标平均回收率及相对标准偏差 (n=5)

添加浓度/ (mg·kg ⁻¹)	平行	测定浓度/ (mg·kg ⁻¹)	回收率/ %	平均 回收率/%	相对标准 偏差/%
0.02	1	0.017 9	90	86	4.8
	2	0.017 6	88		
	3	0.017 7	89		
	4	0.016 0	80		
	5	0.016 9	85		
0.05	1	0.044 1	88	86	3.1
	2	0.042 1	84		
	3	0.044 5	89		
	4	0.041 4	83		
	5	0.044 0	88		
0.5	1	0.482	96	95	1.7
	2	0.466	93		
	3	0.478	96		
	4	0.467	93		
	5	0.475	95		

参考文献

[1] C. 马克比恩.《农药手册》第16版[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 574-575.

[2] 张建平, 吕警. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水样中吡虫啉及其代谢物残留[J]. 农业灾害研究, 2020, 10(9):138-139; 141.

[3] JMPR. <https://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>.

(上接第 46 页)

[25] 莫秀芳, 李星翰, 王晓岚, 等. 苯醚甲环唑和啉菌酯对家蚕的生长发育毒性[J]. 农药学报, 2018, 20(6): 758-764.

[26] 沈艳, 陈亮, 孙如意, 等. 噻呋酰胺对3种水生物的急性毒性与安全性评价[J]. 农药, 2016, 55(11): 817- 820.

[27] 杨阳. 噻呋酰胺对斑马鱼的毒性及作用机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.

[28] 张国福, 李本杰, 王金花, 等. 不同剂型苯醚甲环唑和啉菌酯及其原药对斑马鱼的急性毒性评价[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(11): 2125-2130.

[29] ROUBALOVA R, PROCHAZKOVA P, DVOAK J, et al. The role of earthworm defense mechanisms in ecotoxicity studies[J]. Inverte-

[4] 卢琦, 陈子雷, 丁蕊艳, 等. 吡虫啉在大棚和露地蔬菜上的残留消解动态[J]. 农药, 2021, 60(10): 747-750.

[5] 李薇, 伍一军, 仇绍萍. 吡虫啉在萝卜及土壤中的残留动态[J]. 农药, 2006, 45(12): 840-841.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1902—2007水果蔬菜中吡虫啉、吡虫清残留量的测定高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.

[7] 苏敏, 李世雨, 李峰格, 等. 超高效液相色谱-串联质谱检测蔬菜和茶叶中吡虫啉的残留量[J]. 色谱, 2011, 29(11): 1070-1075.

[8] 杜功名, 查欣欣, 吴甜甜, 等. QuPPe-超高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄中28-表高芸苔素内酯残留量[J]. 现代农药, 2021, 20(6): 44-46.

[9] 梁秀美, 王祥云, 薛晓锋, 等. 液相色谱-串联质谱法测定蜂产品中吡虫啉及其3种代谢物 [J]. 分析化学研究报告, 2017, 45(4): 553-559.

[10] EUN K S, TAEK K K, HYE Y K, et al. Simultaneous determination of flonicamid, imidacloprid and its metabolites using QuEChERS and LC-MS/MS[J]. The Korean Journal of Pesticide Science, 2015, 58: 603-610.

[11] YANG Q H, AI X H, DONG J, et al. A QuEChERS-HPLC-MS/MS method with matrix matching calibration strategy for determination of imidacloprid and its metabolites in *Procambarus clarkii* (Crayfish) tissues[J]. Molecules, 2021, 26(2) : 274.

[12] 农业农村部, 国家市场监督管理总局, 国家卫生健康委员会. GB 2763—2021 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 2021.

[13] 张佳庆, 杨闻翰, 张丹, 等. 柱前衍生化反相高效液相色谱法测定春雷霉素[J]. 现代农药, 2022, 21(3): 41-45.

[14] 农业农村部农药管理司. 农药登记残留试验待测残留物和植物源性食品膳食风险评估残留物目录(2021版). [2021-01-05].http://www.zzys.moa.gov.cn/gzdt/202101/t20210105_6359468.htm.

[15] 白亮, 马超, 赵宜君, 等. 12%虫螨腈·多杀菌素悬浮剂液相色谱分析[J]. 现代农药, 2022, 21(3): 38-40.

[16] 农业农村部. NY/T 788—2018农作物中农药残留试验准则[S]. 北京: 中国农业出版社, 2018.

(责任编辑: 金兰)

brate Survival Journal, 2015, 12: 203-213

[30] RODRIGUEZ-CAMPOS J, DENDOOVEN L, ALVAREZ-BERNAL D, et al. Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: a review[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 79: 10-25.

[31] 李涛, 孟丹丹, 郭水良, 等. 17种常用除草剂对蚯蚓的急性毒性[J]. 生态环境学报, 2021, 30(6): 1269-1275.

[32] 施海燕, 元育杰, 束兆林, 等. 噻呋酰胺在土壤中的降解、吸附-解吸及移动特性研究[J]. 生态环境学报, 2016, 25(11): 1806-1812.

[33] 许振岚, 徐艺, 张昌朋, 等. 环酰胺菌在土壤中的吸附及降解特性[J]. 农药学报, 2020, 22(1): 188-192.

(责任编辑: 高蕾)