

◆ 残留与环境 ◆

春雷霉素在西瓜中的残留及膳食风险评估

张文博^{1,2}, 潘兴鲁^{2*}, 董丰收², 吴小虎², 徐 军², 郑永权²

(1. 天津农学院 园艺园林学院, 天津 300384; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:本研究建立了固相萃取结合高效液相色谱-串联质谱(SPE/HPLC-MS/MS)测定西瓜中春雷霉素的痕量检测方法, 采用1%甲酸-甲醇提取西瓜样品, 用Oasis MCX固相萃取柱净化, 以ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱分离, 甲醇-0.2%甲酸水为流动相进行梯度洗脱, 多反应监测(MRM)模式检测。在0.01~1 mg/kg加标范围内, 春雷霉素的平均回收率为71.0%~79.0%, 相对标准偏差(RSD)为4.7%~4.9%, 定量限(LOQ)为0.01 mg/kg。规范田间残留试验结果表明, 在施用春雷霉素7 d后, 残留中值(STMR)不超过0.01 mg/kg, 最高残留值(HR)为0.047 mg/kg。膳食风险评估结果表明, 普通人群对春雷霉素的国家估算每日摄入量(NEDI)为0.070 3 mg, 风险商(RQ)为0.99%, 说明其对一般人群产生的膳食风险在可接受范围内。

关键词:西瓜; 春雷霉素; 农药残留; 固相萃取-高效液相色谱串联质谱; 膳食风险评估

中图分类号: TQ 450.7 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2023.01.008

Residual Levels and Dietary Assessment of Kasugamycin in Watermelon

ZHANG Wenbo^{1,2}, PAN Xinglu^{2*}, DONG Fengshou², WU Xiaohu², XU Jun², ZHENG Yongquan²

(1. College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100193, China)

Abstract: A method of solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE/HPLC-MS/MS) was developed for the trace determination of kasugamycin in watermelon. The watermelon samples were extracted with 1% formic acid-methanol, purified by Oasis MCX solid phase extraction column, then separated on a ACQUITY UPLC HSS T3 column using methanol-0.2% formic acid as mobile phase by gradient elution, and detected by HPLC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The average recoveries of kasugamycin in watermelon were in the range of 71.0%-79.0% at the spiking levels from 0.01 to 1 mg/kg with the relative standard deviations (RSD) of 4.7%-4.9% and limits of quantitation (LOQ) was 0.01 mg/kg. The results of standardized field residual trial showed that the supervised trials median residues (STMR) was less than 0.01 mg/kg, and the highest residue (HR) was 0.047 mg/kg after application of kasugamycin for 7 d. Dietary risk assessment results showed that national estimated daily intake (NEDI) of kasugamycin for the general population was 0.070 3 mg, and the risk quotient (RQ) was 0.99%, indicating that the dietary risk caused by kasugamycin was acceptable for the general population.

Key words: watermelon; kasugamycin; pesticide residue; SPE/HPLC-MS/MS; dietary risk assessment

收稿日期: 2022-08-30

基金项目: 国家自然科学基金(31901922)

作者简介: 张文博(1996—), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向为农药残留与风险评估。E-mail: zhangwenbo082@163.com

通信作者: 潘兴鲁(1990—), 男, 山东莱州人, 博士, 副研究员, 主要从事农药残留与健康风险评价研究工作。E-mail: panxinglu@caas.cn

西瓜属一年生蔓生藤本植物,果肉味甜,能降温去暑;种子含油,可作为消遣食品;果皮药用,有清热、利尿、降血压之效。中国是世界上最大的西瓜产地。西瓜作为我国重要的经济作物,各地栽培,品种甚多,以新疆、甘肃兰州、山东德州、江苏东台等地最为有名。在我国危害西瓜的主要病害有枯萎病、炭疽病、病毒病、白粉病、霜霉病等。以上病害会导致西瓜叶片脱落、幼苗枯萎,最终导致植株死亡,影响西瓜的产量和品质。春雷霉素作为一种农医两用的抗菌素,不仅能够针对西瓜主要病害起到良好的防治效果,而且对环境非靶标生物急性毒性极低。春雷霉素可通过干扰致病菌细胞内部与氨基酸代谢相关的酯酶系统,影响蛋白质的合成,从而抑制菌丝伸长和细胞颗粒化^[1-2],因此对蔬菜、瓜果和水稻等作物的多种细菌和真菌性病害具有较好的防治作用^[3]。此外,春雷霉素对人畜无毒,被农业部列为可在无公害农产品生产上使用的推荐农药^[4]。日本和欧盟规定春雷霉素在水果中的最大残留限量(MRL)均为0.2 mg/kg^[4],我国规定春雷霉素在西瓜中MRL值为0.1 mg/kg。

春雷霉素的极性大,水溶性强,无特征紫外吸收峰,在液相色谱柱上的保留时间短,不能与杂质完全分离,从而给检测带来困难。Insmmed Pharmaceuticals公司^[5]采用柱前衍生化的方法,延长了其在色谱柱上的保留时间,并具有特殊紫外吸收峰,但该方法操作复杂且衍生化过程中含有毒气体氟化氢,危害较大。牛长群等^[6]采用反相离子对高效液相色谱法和高效毛细管电泳法测定了发酵液中的春雷霉素,通过加入离子对试剂改变保留时间,避免了衍生化过程带来的麻烦,但该方法灵敏度较低,不能满足痕量分析的要求。吴国旭等^[7]在牛长群等^[6]的基础上通过改变流动相对2%春雷霉素水剂进行了检测,但该方法对试剂、酸碱度和温度有着特定的要求,且保留时间较长,不利于大量样品的快速检测。

本研究以西瓜为试验对象,采用固相萃取柱净化,超高效液相色谱串联质谱检测,旨在建立灵敏度高、净化效果好的春雷霉素在西瓜中的残留分析方法,为春雷霉素在西瓜上的正确、安全使用提供技术指导。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

供试仪器:AB Sciex QTRAP® 4500液质联用

仪、ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm),美国Waters公司;TG16-WS台式高速离心机,长沙湘仪离心机有限公司;Mili-Q超纯水仪,美国Milipore公司;XW-80A型漩涡混合器,美国Scientific industries公司;Filter Unit型有机滤膜(0.22 μm),上海普迈生物科技有限公司。

供试试剂:春雷霉素盐酸盐标准品(纯度98.8%),北京勤诚亦信科技有限公司;2%春雷霉素可湿性粉剂,江西省高安金龙生物科技有限公司;乙腈(色谱纯)、甲酸、氨水,北京北化精细化学品有限公司;甲醇(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;Oasis MCX固相萃取柱,美国Waters公司。

1.2 标准溶液配制

准确称量一定量的春雷霉素标准样品,使用超纯水配制1 000 mg/kg的储备液10 mL,然后用超纯水梯度稀释成0.01、0.05、0.1、0.5 mg/kg和1 mg/kg的系列标准溶液,备用。

1.3 田间试验

残留试验参照NY/T 788—2018《农作物中农药残留试验准则》^[8]进行设计。选取10个试验地点,分别是内蒙古、山西、宁夏、北京、山东、上海、安徽、湖南、贵州和广西。每个试验点设置1个处理小区和1个对照小区,每个小区面积为50 m²。施药剂量为30 g a.i./hm²,于西瓜收获前14 d第1次施药,于收获前7 d第2次施药,施药间隔期为7 d。施药方式为兑水喷雾,用水量为900 L/hm²。最终残留试验于最后1次施药后7、10 d采集西瓜样品。采样时,每个小区采集2份独立样品。去除果柄后用四分法取不相邻2瓣,切成小块后匀浆,将制备好的样本放入聚四氟乙烯材质容器内,贴好标签,储存于-18℃冷库。

1.4 样品前处理

准确称取5.0 g粉碎均匀的西瓜全瓜样品于50 mL的离心管中,加入10 mL 1%甲酸-甲醇,于1 400次/min振荡10 min,4 000 r/min离心5 min,转移上清液至新的离心管中,向沉淀物再次加入10 mL 1%甲酸-甲醇,重复1次以上步骤。合并2次上清液后,使用1%甲酸-甲醇定容至25 mL,涡旋2 min混合均匀,待净化。

使用5 mL甲醇和5 mL超纯水预淋洗MCX固相萃取柱,取5 mL西瓜提取液至MCX固相萃取柱中,收集流出的提取液,待提取液流尽后,重复1次上述操作,随后依次使用5 mL超纯水和5 mL甲醇淋洗MCX固相萃取柱。真空抽至近干,加入8 mL的2%氨水甲醇进行洗脱,收集洗脱液于50 mL的圆底烧瓶中,

于80 r/min, 35℃旋蒸至近干,用1 mL甲醇-水(1:1, V/V)复溶,涡旋混合均匀后过0.22 μm有机滤膜,待进样。

1.5 液相色谱与质谱条件

液相色谱条件。流动相A: 甲醇,流动相B: 0.2%甲酸水溶液;流速: 0.3 mL/min;进样体积: 3.0 μL;柱温: 35℃。采用梯度洗脱模式,具体洗脱参数见表1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	甲醇/%	0.2%甲酸水/%
0	0.30	95.0	5.0
1.00	0.30	95.0	5.0
2.20	0.30	5.0	95.0
3.40	0.30	5.0	95.0
3.50	0.30	95.0	5.0
5.00	0.30	95.0	5.0

质谱条件。多离子反应监测(MRM)模式扫描;电离源模式:电喷雾离子源;扫描模式:正离子模式;离子化电压:5 500 V;离子源温度:350℃;GS1: 50 psi;GS2: 60 psi;在多反应监测(MRM)模式下,春雷霉素的定性离子对为380.50>200.40 (*m/z*), DP电压为50.97 V, CE电压为16.29 V,定量离子对为380.50>112.40 (*m/z*),其DP电压为50.97 V, CE电压为23.94 V。

1.6 数据分析

基质效应。样品的基质效应(ME)^[9]按式(1)计算。

$$ME/\% = \frac{\text{溶剂标准曲线斜率} - \text{基质标准曲线斜率}}{\text{基质标准曲线斜率}} \times 100 \quad (1)$$

式中:基质效应结果为正数表示基质增强效应,结果为负数表示基质抑制效应;弱基质效应为 $-20\% \leq ME \leq 20\%$;中等基质效应为 $-50\% \leq ME < -20\%$ 或 $20\% < ME \leq 50\%$;强基质效应为 $ME < -50\%$ 或 $ME > 50\%$ ^[10-11]。

膳食风险评估。依据卫生部2002年发布的《中国不同人群消费膳食分组食谱》中的膳食结构数据和已制定的春雷霉素最大残留限量(MRLs),结合规范残留试验中值(STMR)或最大残留限量(MRL),可按式(2)计算农药的国家估算每日摄入量(NEDI),再依据农药的每日允许摄入量(ADI),按式(3)计算风险商(RQ)^[12-14]。

$$NEDI = \sum (STMR_i \times F_i) \quad (2)$$

$$RQ/\% = \frac{NEDI}{ADI \times bw} \times 100 \quad (3)$$

式中:STMR_i为农药在某种食品中的规范残留中值,mg/kg;F_i为一般人群对该食品的消费量,kg;bw为中国人均体重,kg(一般以63 kg计);ADI为农药的每日允许摄入量mg/(kg bw)。

当RQ≤100%时,表示其风险可以接受,RQ值越小,风险越小;当RQ>100%时,表示有不可接受的慢性风险,RQ值越大,风险越大^[15-17]。

2 结果与分析

2.1 检测条件的优化

在优化流动相条件时,分别采用乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.2%甲酸水、甲醇-0.2%甲酸水溶液作为流动相,并采用梯度洗脱法对标准溶液检测分析。结果发现,加入微量甲酸不仅有助于改善峰型,而且有助于提高待测物离子化效率,从而提高待测化合物的检测灵敏度,且甲醇相较于乙腈响应值更高且峰型较好。因此,最终选择以甲醇-0.2%甲酸水溶液作为流动相。

在优化质谱条件时,采用浓度为1 mg/kg的春雷霉素标准溶液。在正、负离子模式下分别进行全扫,发现正离子模式下响应相对较高,故选用正离子模式。进一步采用MS²扫描模式确定子离子,在MRM模式下对质谱参数进行优化,并选择信号较高的离子对作为定量离子对。在该条件下,春雷霉素标准品的保留时间为0.418 min。

2.2 SPE固相小柱的选择

QuEChERS技术目前广泛用于样品的前处理,仅需几步就可以完成对样品的提取净化,方便快捷,但其对去除干扰物质的能力较SPE柱略差。本研究首先尝试采用QuEChERS方法进行处理,在未使用净化剂时,空白基质在目标化合物出峰位置有很强的干扰,无法识别目标化合物。在使用PSA、C₁₈和GCB对样品进行净化后,结果显示,目标物与杂质仍难以实现分离(图1a)。因此,本研究考虑选用SPE柱对样品进行净化。MCX柱具有阳离子交换机理,其对碱性物质有着独特的选择性,适合碱性物质与中性和酸性物质的分离提取,对于弱碱性的春雷霉素具有很好的保留能力,可以达到良好的净化效果(图1b)。

2.3 前处理条件的优化

洗脱液在洗脱过程中,不仅可将目标物洗脱还能将杂质洗脱,因此本研究先对淋洗进行了优化。分别使用溶剂和基质液配制标准样品,比较4、6、8、10、12 mL洗脱液的洗脱效率。结果显示,洗脱液在达到8 mL后淋洗效率最高(图2a),之后略有下降并

开始趋于稳定,故选用8 mL洗脱液洗脱。使用溶剂配制的标准样品在第1次上样后的淋洗效率为95%,而使用基质液配制的标准样品在第1次上样后的淋洗效率仅为57.3%,将流出液重复上样,其淋洗效率才符合要求(图2a),故在实际样品检测中采用重复2次上样再进行淋洗和洗脱。

春雷霉素水溶性大,采用乙腈提取效果不佳,故在本研究中采用1%甲酸-甲醇作为提取液,在添加浓度为0.1 mg/kg的条件下,对比样品提取1次和提取2次的效果,结果发现,对样品提取1次时的回收率仅为45.6%,提取2次时的回收率为75.3%(图2b),因此在实际样品检测中用1%甲酸-甲醇提取2次。

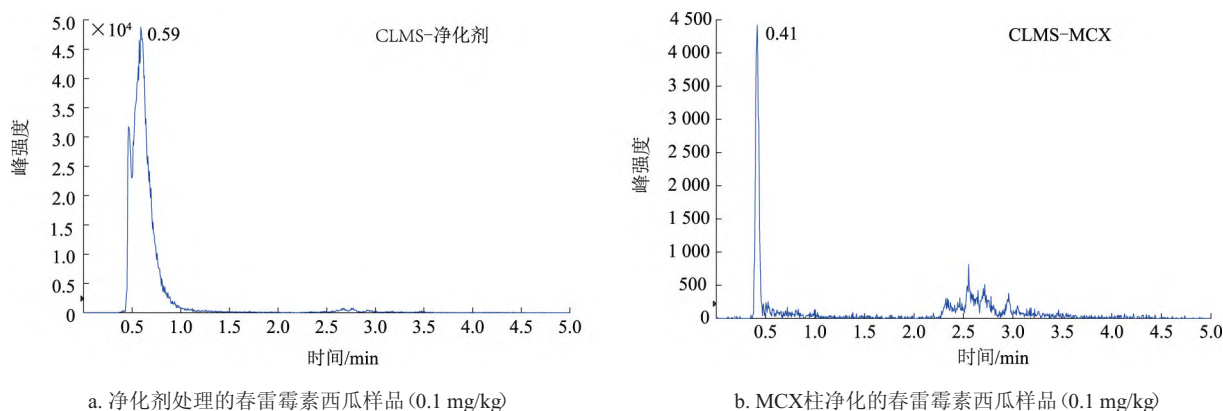


图1 不同净化方式的春雷霉素色谱图

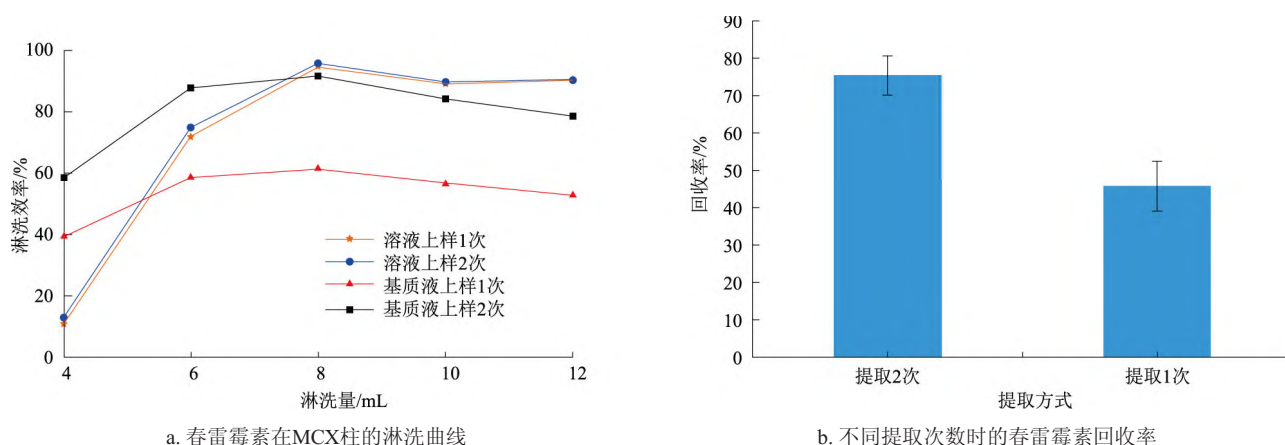


图2 淋洗曲线与不同提取方式的回收率

2.4 工作曲线、基质效应与定量限

参考春雷霉素的限量标准以及仪器的灵敏度,使用空白样品提取液和溶剂分别配制浓度范围为0.01~1 mg/kg的标准溶液,按照1.5节的仪器操作条件进行分析。春雷霉素的溶剂标准曲线和西瓜基质标准曲线的回归方程分别为 $y=502.15x-1169.1$ ($R^2=0.9998$); $y=122.16x-1885.5$ ($R^2=0.9902$)。结果表明,其在0.01~1 mg/kg范围内线性关系良好,满足分析要求。

在对样品进行提取时,一些样品中的共同提取物会对目标化合物的离子化产生影响^[18-19]。结果表明,西瓜中春雷霉素的基质效应为-75.7%,表现为较强的基质抑制效应。因此,本研究采用基质匹配

标准溶液校正法对基质效应进行了补偿,以提高定量的准确性。

2.5 准确度、精密度与定量限

称取5 g空白的西瓜全瓜样品,加入春雷霉素标准品,其加标水平分别为0.01、0.1 mg/kg和1 mg/kg。按照上述方法进行测定,每个水平平行测定5次,计算加标回收率和相对标准偏差,结果见表2。加标回收试验结果显示,在0.01~1 mg/kg加标范围内,西瓜全瓜样品中的春雷霉素平均回收率为71.0%~79.0%,相对标准偏差(RSD)为4.7%~4.9%,说明该方法具有较好的精密度及准确度,可以满足春雷霉素残留分析的要求。相关谱图见图3。本试验中以最低添加水平确定定量限(LOQ),定量限为0.01 mg/kg。

表 2 春雷霉素在西瓜中加标回收率及相对标准偏差 (n=5)

有效成分	样品	加标浓度/(mg·kg ⁻¹)	回收率/%					平均回收率/%	相对标准偏差/%
			1	2	3	4	5		
春雷霉素	西瓜	0.01	65.6	65.4	71.6	77.5	75.1	71.0	4.9
		0.1	73.2	70.6	72.2	77.0	83.7	75.3	4.7
		1	70.2	80.3	85.2	80.2	79.1	79.0	4.9

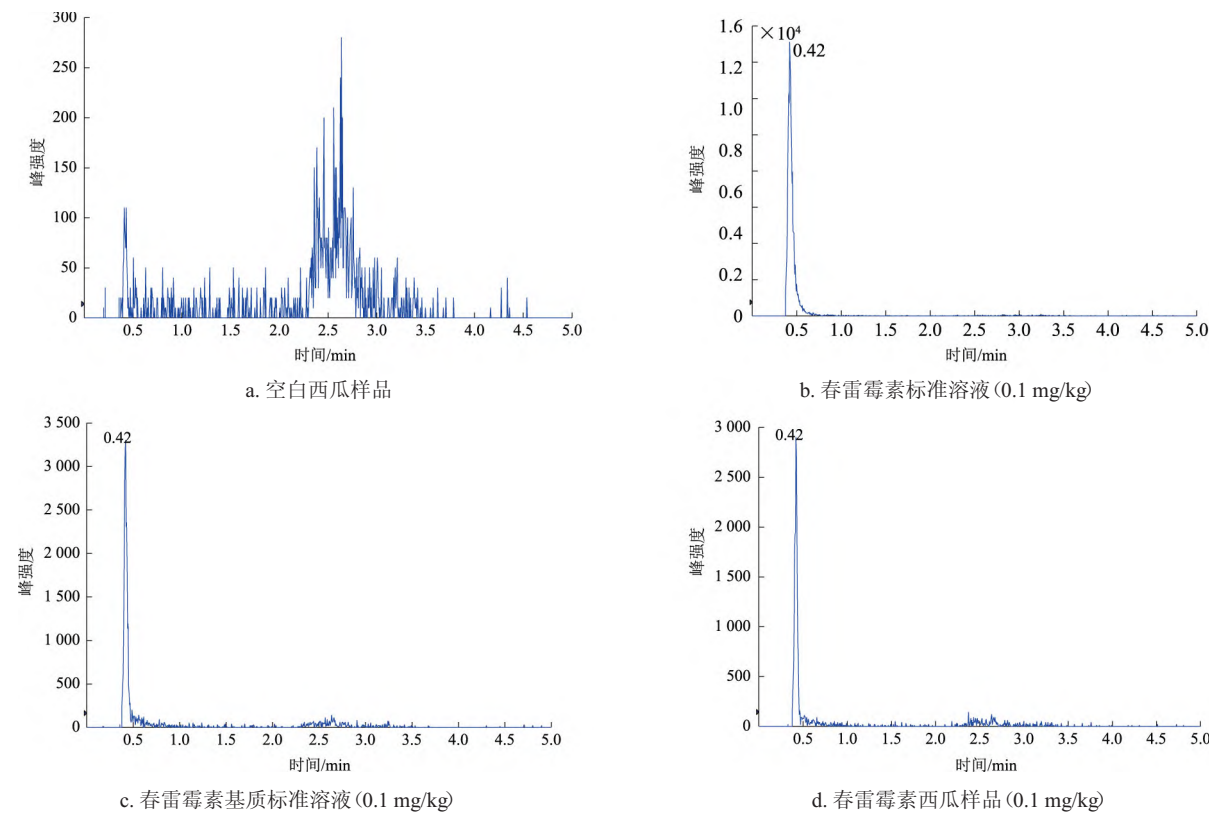


图 3 实际样品色谱图

2.6 实际样品检测与膳食风险评估

为了验证方法的可靠性和实用性,运用本方法对西瓜田间实际样品进行测定。田间试验于10个试验地点进行,距最后1次施药7 d后,春雷霉素在西瓜中的规范残留中值(STMR)不超过0.01 mg/kg,最高残留值(HR)为0.047 mg/kg。

结合我国农药登记情况和我国居民的人均膳食结构,普通人群对春雷霉素的¹国家估算每日摄入量(NEDI)为0.070 3 mg,日允许摄入量为7.119 mg,风险商(RQ)为0.99%,该研究结果说明其对一般人群健康不会产生不可接受的风险。其膳食风险评估结果见表3。

表 3 春雷霉素膳食风险评估

食物种类	F/kg	参考限量/(mg·kg ⁻¹)	限量来源	NEDI/mg	日允许摄入量/mg	RQ/%
米及其制品	0.239 9	0.1	糙米,中国	0.023 99	ADI× 63	
面及其制品	0.138 5					
其他谷类	0.023 3					
薯类	0.049 5					
干豆类及其制品	0.016	0.1	辣椒,中国	0.009 15		
深色蔬菜	0.091 5					
浅色蔬菜	0.183 7					
腌菜	0.010 3	0.2	黄瓜,中国	0.036 74		

(续表 3)

食物种类	<i>F</i> /kg	参考限量/(mg·kg ⁻¹)	限量来源	NEDI/mg	日允许摄入量/mg	RQ/%
水果	0.045 7	0.01	本试验中值	0.000 457		
坚果	0.003 9					
畜禽类	0.079 5					
奶及其制品	0.026 3					
蛋及其制品	0.023 6					
鱼虾类	0.030 1				ADI× 63	
植物油	0.032 7					
动物油	0.008 7					
糖、淀粉	0.004 4					
食盐	0.012					
酱油	0.009					
合计	1.028 6			0.070 3	7.119	0.99

3 结论

本研究建立了西瓜中春雷霉素残留分析方法。样品采用1%甲酸- 甲醇提取，Oasis MCX固相萃取柱净化，高效液相色谱- 串联质谱仪检测，有效降低了样品基质的干扰，提高了分析的灵敏度和准确度。方法定量限为0. 01 mg/kg。在0.01~1 mg/kg加标水平下，春雷霉素在西瓜中的平均回收率为71.0%~79.0%，相对标准偏差为4.7%~4.9%。该方法前处理过程简便、快速，检测结果的精密度及准确度均能达到残留分析要求。田间实际样品检测结果表明，按照推荐剂量(30 g a.i./hm²)施用春雷霉素，其在西瓜上的残留试验中值不超过0.01 mg/kg，最高残留值为0.047 mg/kg。膳食风险评估结果表明，普通人群对春雷霉素的国家估算每日摄入量为0.070 3 mg，风险商为0.99%，远小于100%，说明春雷霉素对一般人群健康不会产生不可接受的风险。

参考文献

[1] 佚名. 春雷霉素生产和应用的初步研究[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 1974(2): 40-44.

[2] 汪桂, 吴蕴, 袁子雨, 等. 春雷霉素的研究现状及展望[J]. 生物加工过程, 2016, 14(4): 70-75.

[3] 卢蕾. 超高效液相色谱串联质谱法分析辣椒中春雷霉素和多菌灵的残留动态[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.

[4] 张清鹏, 周游, 唐亮, 等. 春雷霉素在水稻田水和土壤中的残留及消解动态[J]. 农药学报, 2012, 14(5): 533-538.

[5] TAMAMURA T, SATO K. Comparative studies on *in vitro* activities of kasugamycin and clinically-used aminoglycoside antibiotics[J]. Janpanse Journal of Antibiotics, 1999, 52(1): 57-67.

[6] 牛长群, 祝仕清, 张惠敏. 反相离子对高效液相色谱法和高效毛细管电泳法测定春雷霉素[J]. 中国抗生素杂志, 2001(5): 348-350; 400.

[7] 吴国旭, 毕富春, 翟立红. 春雷霉素高效液相色谱分析方法[J]. 农

药, 2010, 49(12): 902-903.

[8] 中华人民共和国农业部. 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.

[9] HE Z, WANG L, PENG Y, et al. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography – tandem mass spectrometry-based method[J]. Food Chemistry, 2015, 169: 372-280.

[10] 姚蕴恒, 吴信子, 白龙律, 等. 固相萃取-气相色谱/质谱法测定人参种植土壤中48种农药残留[J]. 分析科学学报, 2020, 36(2): 280-286.

[11] 朱富强, 高翠, 刚强, 等. 通过式固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中18种农药残留[J]. 环境化学, 2021, 40(3): 945-948.

[12] 吕莹, 齐艳丽, 任鹏程, 等. 联苯菊酯、噻虫嗪及其代谢物噻虫胺在小麦上的残留及膳食风险评估[J]. 农药学报, 2021, 23(2): 366-372.

[13] 马琳, 朱卫芳, 占绣萍, 等. 啉霉胺在蓝莓中的残留行为及膳食风险评估[J]. 农药学报: 2022, 24(4): 884-889.

[14] GUI T, JIA G F, XU J, et al. Determination of the residue dynamics and dietary risk of thiamethoxam and its metabolite clothianidin in citrus and soil by LC-MS/MS [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2019, 54(4): 326-335.

[15] 陈小龙, 王亚, 程金金, 等. 啉虫脒在桃上的残留消解规律与膳食风险评估[J]. 农药学报, 2021, 23(3): 545-551.

[16] 李贤宾, 付岩, 王全胜, 等. 吡啉菌胺及其代谢物在柑橘中的残留行为及膳食风险评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(13): 4157-4165.

[17] 黄永凯, 董必章, 胡继业. 露地条件下高效氟氯氧菊酯和噻虫胺在甘蓝中的残留行为与膳食风险评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 404-412.

[18] 董亚蕾, 刘文婧, 曹进, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定坚果中38种农药残留[J]. 分析化学, 2017, 45(9): 1397-1404.

[19] DASENAKI M E, THOMAIDIS N S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 880: 103-121.

(责任编辑:高蕾)