

doi:10.3969/j.issn.1002-2090.2018.01.008

UHPLC-MS/MS 法测定大米中丁草胺和吡虫啉残留

高玉玲^{1,2}, 刘少彬¹, 孙鹏¹

(1.黑龙江八一农垦大学, 大庆 163319; 2.黑龙江八一农垦大学牡丹江食品与生物技术创新研究院)

摘要:为建立大米中丁草胺和吡虫啉残留农药残留的检测方法,采用超高效液相色谱-串联质谱的方法,样品经乙腈提取,弗罗里硅土固相萃取柱净化,采用多反应监测模式(MRM),对流动相比例、柱温、流速、碎裂电压、碰撞能等条件进行了优化。结果表明:丁草胺和吡虫啉在 1~250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围内保持良好线性关系且($r>0.9995$)回收率在 88.7%~105.4%,检出限分别为 0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 0.43 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,定量限为 0.89 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 1.42 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,RSD 小于 3.9%。该方法稳定、可靠,可满足大米中丁草胺和吡虫啉农药残留检测的需要。

关键词:超高效液相色谱串联质谱法;丁草胺;吡虫啉;大米

中图分类号:Q89

文献标识码:A

文章编号:1002-2090(2018)01-0033-05

Determination of Butachlor and Imidacloprid Residue in Rice by UHPLC-MS/MS

Gao Yuling^{1,2}, Liu Shaobin¹, Sun Peng¹

(1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319;

2. Institute of Mudanjiang Food and Bio-technology Innovation, Heilongjiang Bayi Agricultural University)

Abstract: UHPLC-MS/MS method was developed for determination of butachlor and imidacloprid residues in rice. After extracted with acetonitrile, rice samples were cleaned up by florisil solid-phase extraction column purification. The mass spectrometer was operated in the positive mode using MRM. Influences of mobile phases, column temperature, flow velocity, fragmentor, collision energy were investigated. The method maintained good linear range ($r>0.9995$) with recovery 88.7%~105.4%, and the limits of detection were 0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 0.43 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, the limits of quantification were 0.89 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 1.42 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, when the concentration of Butachlor and imidacloprid was 1~250 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The method was efficient, reliable and could meet the requirements for the determination of butachlor and imidacloprid residue.

Key words: UHPLC-MS/MS; butachlor; imidacloprid; rice

大米是我国主要的粮食作物,据现代营养学分析,大米含有蛋白质、脂肪、维生素 B1、A、E 及多种矿物质,具有较高的营养价值。但水稻种植的特殊性,需要使用的农药品种和数量较多,由此带来了稻谷中农药超标现象。丁草胺(butachlor)为酰胺类选择性内吸传导除草剂。适用于水稻、玉米、小麦、大麦等粮食作物除草。在土壤中该除草剂能被微生物分解,在强酸条件下会加速其分解,但在常温中性、弱碱性条件下化学性质稳定,因此丁草胺具有一定残留毒性,使用不当,会对人畜造成一定危害^[1]。吡虫啉是烟碱类

超高效杀虫剂,具有广谱、高效、低毒、低残留,害虫不易产生抗性,对人、畜、植物和天敌安全等特点,并有触杀、胃毒和内吸等多重作用^[2-3]。欧盟禁用农药清单中有丁草胺,但是没有最低限量;日本肯定列表对丁草胺最低限量为 0.1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、吡虫啉最低限量为 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;我国 NY/T 419-2014(绿色食品稻米)规定大米中丁草胺最大残留限量为 0.01 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,吡虫啉最大残留限量为 0.05 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。东北主食以大米为主,丁草胺和吡虫啉是北方水稻种植常选用的农药,如使用不当会使丁草胺和吡虫啉残留在大米中,甚

收稿日期:2017-04-19

基金项目:牡丹江市科学技术计划项目(Z2016n0017);黑龙江八一农垦大学“校内培育课题资助计划”(XZR2014-17)。

作者简介:高玉玲(1983-),女,助理研究员,齐齐哈尔大学毕业,现主要从事农产品农药残留、兽药残留检测技术方面的研究。

至导致超标,对身体健康造成影响,因此建立简便、可靠的方法测定大米中丁草胺和吡虫啉非常必要,对北方饮食安全有着重要意义。

目前检测农药常用的主要方法有高效液相色谱法(HPLC)^[4]、气相色谱法(GC)^[5]、高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[6-8]、气相色谱串联质谱法(GC-MS)^[9]等。农药分析样品前处理主要是去除共提取基质干扰物对定量准确度、灵敏度及仪器污染的影响。标准方法及已报道文献中样品净化多采用凝胶净

化系统,净化分析时间长等问题限制其发展。固相萃取技术具有吸附容量大、净化效果好、易与检测仪器联用等优点,已广泛应用于中食品^[10-11]、环境^[12-14]等分析中,对固相萃取前处理方法,结合灵敏度高、抗干扰能力强的超高效液相色谱串联三重四级杆质谱(UH-PLC-MS/MS)技术,以大米基质配置校准曲线,外标法定量,并应用于实际样品中丁草胺和吡虫啉(图1)的分析检测。该方法具有操作简单、灵敏度高、应用广的特点,对大米中农药安全分析有重要的意义。

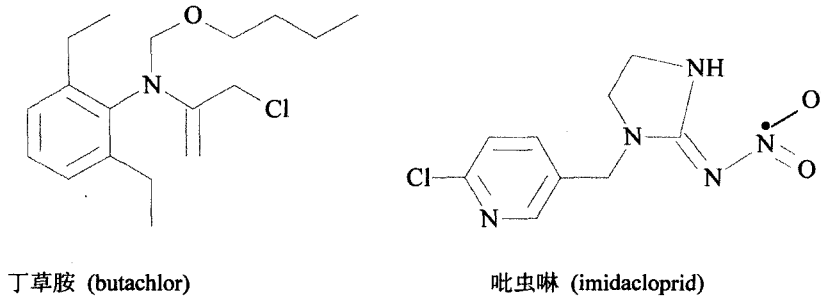


图1 丁草胺和吡虫啉农药结构式

Fig. 1 Structural formula of butachlor and imidacloprid

1 试剂、仪器和方法

1.1 仪器与试剂

1290-6460 型超高效液相色谱串联三重四级杆质谱仪(配有 ESI 离子源及 MassHunter 6.0 数据处理系统)美国安捷伦科技公司, IKA T25 型高速组织匀浆机(德国艾卡仪器设备有限公司), Z36HK 型高速冷冻离心机(德国 HERMIE 公司), Extrapid 固相萃取仪(北京莱伯泰科仪器有限公司), MTN-2800D 型水浴氮吹仪(天津奥特赛思仪器有限公司), VORTEX-2 型涡旋仪(美国 SI DIGITAL), SK8200H 型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司)。

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(迪马科技有限公司), 丁草胺、吡虫啉标准品(纯度大于 99.0%, 农业部环境保护科研监测所), 乙腈、甲醇、乙醇为 Fisher Scientific 试剂公司, 无水硫酸钠(优级纯)、氯化钠(优级纯)400 °C 灼烧 2 h, 贮藏于干燥器中备用, 弗罗里硅土固相萃取柱 500 mg, 3 mL(天津博纳艾杰尔科技有限公司), 0.22 μm 微孔滤膜(天津博纳艾杰尔科技有限公司), 实验所用水为娃哈哈纯净水, 实验所用的大米购于大庆市东安市场。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(50 mm×2.1 mm×1.8 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 甲酸水溶液(体积比 80:20)等度洗脱; 柱温: 24 °C; 流速: 0.25 mL·min⁻¹; 进样量: 5 μL。

1.2.2 质谱条件

电喷雾电离源(ESI), 正离子模式, 多反应监测(MRM), 干燥气、雾化气、鞘气为普氮, 碰撞气为高纯氮, 干燥气温度(Gas Temp): 300 °C, 干燥气流速: 5.1 L·min⁻¹, 鞘气流速(Sheath Gas Flow): 11.0 L·min⁻¹, 鞘气温度(Sheath Gas Temp): 250 °C, 喷嘴电压(Nozzle Voltage): 500 v, 毛细管电压(Capillary): 3 500 V。

1.3 样品处理

采用四分法制备大米样品, 将大米样品置于组织捣碎机中, 制成大米粉, 准确称取 5 g(±0.05 g) 放入盛有 10 g 无水硫酸钠的 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 20 mL 乙腈, 均质提取 1 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 上清液移入 50 mL 比色管, 重复提取, 合并上清液, 浓缩至 5 mL 备用。

先用丙酮+正己烷(10+90)活化, 然后以后 1 mL·min⁻¹ 的速率上样, 再用正己烷淋洗, 收集洗脱液, 40 °C 下氮气吹干, 残渣用 2 mL 流动相溶解、涡旋混匀, 过 0.22 μm 针头滤膜。

2 结果与讨论

2.1 质谱分析条件

吡虫啉、丁草胺结合氢离子形成正离子模式,得到[M+H]⁺准分子离子峰。配置 10 μg·L⁻¹ 吡虫啉、丁草胺标准溶液,先选择 MS2 scan 确定吡虫啉、丁草胺母

离子。再选择 MS2 SIM 模式优化质谱的 Fragmentor 碎裂电压,选择 product ion 模式优化离子碰撞能,以进行二级质谱扫描,选取二级质谱中没有干扰,信号相对强的 2 个特征碎片离子,与其母离子组成两对离子对,对吡虫啉、丁草胺进行定性和定量分析,见表 1。

表 1 2 种农药的 MS/MS 质谱采集参数
Table 1 MS/MS parameters of two pesticides

农药名称	保留时间/min	母离子/m·z ⁻¹	子离子/m·z ⁻¹	传输电压/V	碰撞能/V
吡虫啉	0.319	256.0	256.0>209.0*	85	15
			256.0>175.0		20
丁草胺	0.598	312.2	312.2>238.0*	95	20
			312.2>162.1		25

* 定量离子

2.2 液相色谱分析条件

2.2.1 流速和柱温的选择

该方法采用 ESI⁺模式检测吡虫啉、丁草胺,此模式下易采用低流速,故试验比较了 0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mL·min⁻¹ 流速下吡虫啉、丁草胺峰形及响应强度等指标,最终确定最佳流速为 0.25 mL·min⁻¹。试验比较了 22、24、26、28、30 °C 下待测物的峰形及响应强度的影响,结果表明随着温度的升高保留时间有所下降,但对峰形及响应强度影响并不大(见图 2),故实验选择 24 °C。

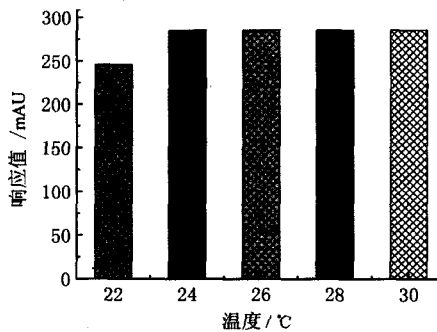


图 2 柱温对响应值的影响

Fig.2 Effect of column temperature on response

2.2.2 流动相的选择

试验选择 ESI 正离子模式,分别选择了甲醇、乙

腈为有机相考察对检测结果的影响,在相同条件下,在甲醇作为流动相的体系中,吡虫啉、丁草胺能够获得更大的响应值,故试验选择甲醇:水为流动相,同时优化了流动相比对检测结果的影响,最佳比例为甲醇:水=80:20(见图 3)。

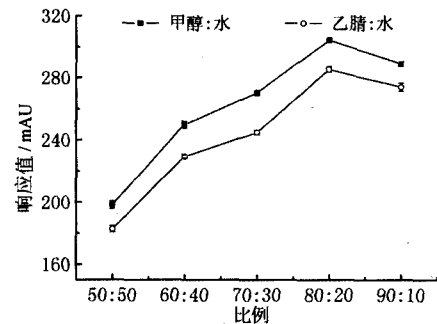


图 3 流动相比对响应值的影响

Fig.3 Effect of mobile phase ratio on response

2.3 方法线性范围、检出限、信噪比

在最佳的试验条件下,向阴性大米样品中添加含量为 1、5、20、50、100、250、500 μg·kg⁻¹ 标准储备液,加标大米样品进行 SPE-UHPLC-MS/MS 测定,通过峰面积(A)与加标样品中吡虫啉、丁草胺的含量量(C, μg·kg⁻¹)制作工作曲线,分别以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算检出限和定量下限,结果见表 2。

表 2 2 种农药的相关系数、线性范围、检出限、定量限
Table 2 Correlation coefficient, linear range, LOQ, LDQ of two pesticides

农药名称	线性方程	线性范围/ μg·kg ⁻¹	相关系数/ r	检出限/ μg·kg ⁻¹	定量限/ μg·kg ⁻¹
吡虫啉	Y=166.804 6X+22 565.318 3	1~250	0.999 8	0.43	1.42
丁草胺	Y=10.054 9X+157.249 3	1~250	0.999 5	0.27	0.89

2.4 方法回收率和精密度

在阴性大米样品中添加吡虫啉和丁草胺浓度为5、20、50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。方法回收率及精密度见表3。由表

3可知方法回收率在88.7%~105.4%，相对标准偏差均低于3.9%(n=6)。

表3 丁草胺和吡虫啉测定的精密度和回收率(n=6)

Table 3 The accuracy and recovery of butachlor and imidacloprid(n=6)

农药名称	加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率/%	相对标准偏差/%
吡虫啉	5	88.7	2.8
	20	102.8	1.4
	50	98.8	1.9
丁草胺	5	96.5	3.9
	20	105.4	2.6
	50	98.0	2.1

2.5 大米样品分析

在最佳条件下对市售大米样品及阴性大米加标

样品进行UHPLC-MS/MS分析,样品未检出吡虫啉、丁草胺农药,分析结果见图4、图5。

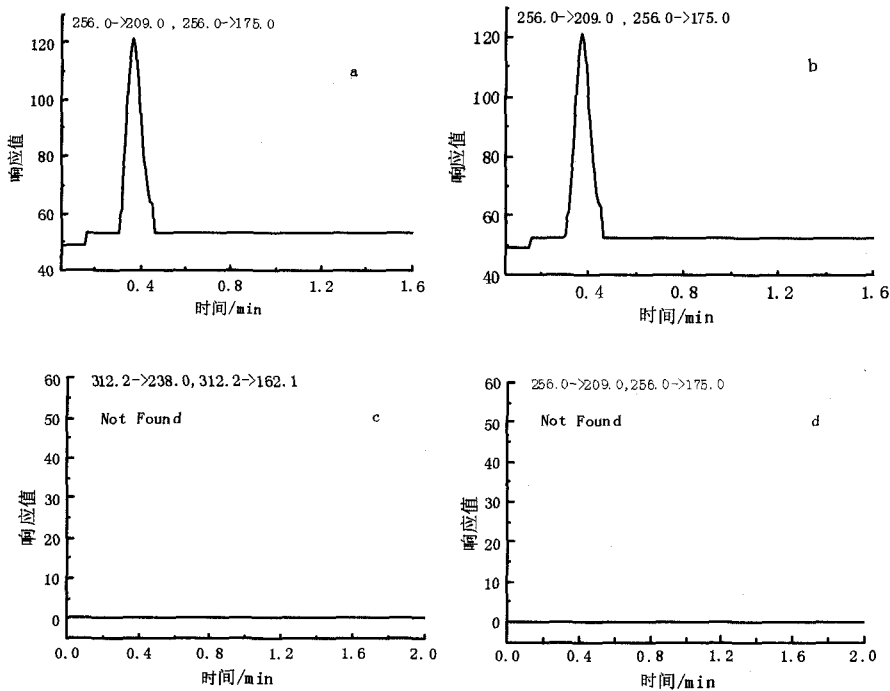


图4 (a)吡虫啉二级质谱图、(b)丁草胺二级质谱图、(c)(d)大米样品的二级质谱图

Fig. 4 Tandem mass spectra(a)butachlor,(b)imidacloprid,(c)(d)rice samples

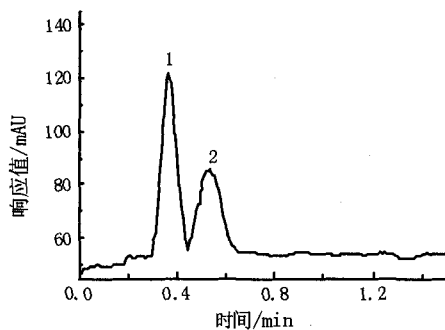


图5 混合标准溶液($0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的色谱图

Fig. 5 Chromatogram of mixed standard solution

3 结论

建立了固相萃取超高效液相色谱-串联质谱测定大米中丁草胺和吡虫啉农药残留的方法,弗罗里硅土固相萃取柱净化大米提取液,丁草胺和吡虫啉回收率高,优异的样品净化能力可大大提高测试的灵敏度和选择性,大大提高了检测效率,UHPLC-MS/MS灵敏度高、准确度、回收率、精密度均能满足大米中农药检测要求,为应用于农药多残留检测提供参考。

参考文献:

- [1] 姚斌,徐建民,张超兰.除草剂丁草胺的环境行为综述[J].生态环境,2003,12(1):66-70.
- [2] 李义强,闫晓阳.不同剂型吡虫啉在烟叶和土壤中的残留及消解动态[J].农药学报,2013,15(6):679-685.
- [3] 赵颖,沈坚,秦丽,等.吡虫啉和百菌清在设施内外葫芦和黄瓜中的残留特性比较[J].农药学报,2012,14(6):647-653.
- [4] 李朝静,李培培,陈敏,等.高校液相色谱-荧光法同时检测葡萄汁中3中苯并咪唑类农药[J].食品科学,2016,37(12):192-196.
- [5] 孙鹏,高玉玲,王金梅,等.漂浮固化分散液-液微萃取-气相色谱法测定液态奶中5种拟除虫菊酯类农药残留[J].农药学报,2016,18(4):497-502.
- [6] Pang N N, Wang T L, Hu J Y. Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 793-800.
- [7] Li W W, Marsha M K, Graham S E, et al. Measurement of pyrethroids and their environmental degradation products in fresh fruits and vegetables using a modification of the quick easy cheap effective rugged safe (QuEChERS) method[J]. Talanta, 2016, 151:42-50.
- [8] Gao J, Wang J, Zuo M, et al. A highly sensitive method for simultaneous determination of the quaternary ammonium pesticides chlormequat and mepiquat in pears and potatoes by modified QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. RSC Adv., 2015(8):5895-5903.
- [9] 甘静妮,程雪梅,莫晓君,等.分散固相萃取/气相色谱-三重四极杆串联质谱测定蔬菜和水果中67中农药残留[J].分析测试学报,2016,35(12):1528-1534.
- [10] 杨梅.固相萃取-气质联用测定茶叶中的26种农药残留[J].农药科学与管理,2015,36(1):26-30.
- [11] 孙晓杰,郭萌萌,王苏玥,等.分散固相萃取-在线凝胶色谱-气相色谱-质谱联用快速检测紫菜中的农药多残留[J].色谱,2014,32(10):1124-1130.
- [12] 王红斌,赵田甜,李桂镇,等.多壁碳纳米管固相萃取-高效液相色谱法测定水中7中三唑类农药残留[J].环境污染与防治,2015,37(4):42-52.
- [13] Zolfaghar A, Alireza F, Mohammad B. Efficient sample preparation method based on solvent-assisted dispersive solid-phase extraction for the trace detection of butachlor in urine and waste water samples [J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(19):3798-3805.
- [14] 陶芊.固相微萃取与低热容气相色谱质谱联用快速分析水中有机磷农药残留量[J].分析仪器,2015(1):18-23.

(上接第23页)

参考文献:

- [1] DIEBOLD I, PETRY A, DJORDJEVIC T, et al. Reciprocal regulation of Rac1 and PAK-1 by HIF-1 alpha: a positive feedback loop promoting pulmonary vascular remodeling [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 13(4):399-412.
- [2] Tudor RM, Staehel E, Robinson J, et al. Pathology of pulmonary hypertension [J]. Clin Chest Med., 2013, 34(4):639-650.
- [3] 王亚运,张琪.虎杖苷的药理作用研究进展[J].中医中药,2017,23(5):989-996.
- [4] 尹雯,朱丹.虎杖的呼吸系统药理作用及分子机制[J].中国药物评价,2013,30(2):82-85.
- [5] Zhang LP, Ma HJ, Bu HM, et al. polydatin attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis in myocardium of the rat[J]. Sheng Li Xue Bao, 2009, 61(4):367-372.
- [6] Zhang Yu Song, Zhuang Zhi Xiang, Meng Qing Hui, et al. polydatin inhibits growth of lung cancer by inducing apoptosis and causing cell cycle arrest [J]. ONCOLOGY LETTERS, 2014(1):295-301.
- [7] 李艳云,史秋梅,王晓珊,等.紫锥菊多糖对内毒素血症小鼠炎症的保护作用[J].河北科技师范学院学报,2015,29(3):8-11.
- [8] 苗青,王四旺,王剑波,等.虎杖苷对大鼠低血压低氧性肺动脉高压的预防作用及初步机制探讨[J].中国新药杂志,2009(19):1872-1876.
- [9] 杨晓晖,黄鹏,罗金文.三七总皂苷对肺动脉高压大鼠病理的影响[J].中国医师杂志,2015,17(10):1532-1535.
- [10] Tudor R M, Cool C D, Yeager M, et al. The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium [J]. Clin Chest Med., 2001, 22:405-418.