

QuEChERS-液相色谱-串联质谱法检测 糙米中氟唑环菌胺的残留

姜桦韬, 尤祥伟, 张广雨, 隋程程, 王秀国, 李义强*

(中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266101)

摘要: 采用 QuEChERS 前处理与液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 技术, 建立了糙米中氟唑环菌胺残留的分析方法。样品采用 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=80:20$ 混合溶液涡旋提取, 经 PSA 分散固相萃取净化, LC-MS/MS 测定, 外标法定量。结果表明: 在 0.001~0.1 mg/L 范围内, 氟唑环菌胺的质量浓度与对应的峰面积间线性关系良好, $R^2 > 0.996$ 。在 0.004、0.01 和 0.1 mg/kg 添加水平下, 氟唑环菌胺在糙米中的回收率为 83%~95%, 相对标准偏差 (RSD) 为 3.9%~12%。以最小添加浓度确定氟唑环菌胺在糙米中的定量限 (LOQ) 为 0.004 mg/kg, 远低于国际食品法典委员会规定的最大残留限量 (MRL) 0.01 mg/kg。所建方法操作简单、准确度和灵敏度高, 可用于糙米中氟唑环菌胺残留的检测。对中国 6 个省 (市) 40 个糙米样品进行检测, 氟唑环菌胺的残留量均低于 LOQ 0.004 mg/kg。膳食风险评估结果表明, 氟唑环菌胺目前在中国水稻上使用对一般人群的健康风险很低。

关键词: QuEChERS; 液相色谱-串联质谱; 糙米; 氟唑环菌胺; 残留

中图分类号: S482.2; O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2018)01-0124-05

Determination of sedaxane in brown rice by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

JIANG Huatao, YOU Xiangwei, ZHANG Guangyu, SUI Chengcheng,
WANG Xiuguo, LI Yiqiang*

(Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong Province, China)

Abstract: An analytical method for the determination of sedaxane residues in brown rice was established by QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were extracted with a mixture of acetonitrile and water (80/20, V/V), purified by dispersion solid phase extraction with PSA as sorbent, and quantified using LC-MS/MS by external standard method. The results showed that good linearity was obtained in the range from 0.001 to 0.1 mg/L, with $R^2 > 0.996$. At the fortified levels of 0.004, 0.01 and 0.1 mg/kg, the recoveries of sedaxane in brown rice samples were 83%-95% with the relative standard deviations (RSD) of 3.9%-12%. The limit of quantitation (LOQ) was 0.004 mg/kg in brown rice samples, which was significantly lower than the

收稿日期: 2017-09-22; 录用日期: 2017-12-26.

基金项目: 国家重点研发计划“化学肥料和农药减施增效综合技术研发”重点专项 (2016YFD0200200-5).

作者简介: 姜桦韬, 女, 在读研究生, 主要从事农药残留研究, E-mail: mavis-jiang@hotmail.com; *李义强, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 研究员, 主要从事农药残留和农产品质量安全研究, E-mail: liyiqiang1008@163.com

maximum residue limit (MRL) of 0.01 mg/kg set by the Codex Alimentarius Commission. The proposed method is simple, accurate and sensitive. Hence, it could be used for the detection of sedaxane residues in brown rice. A market survey of 40 brown rice samples from 6 provinces was carried out, and the residual amount of sedaxane was less than 0.004 mg/kg in all samples. The dietary risk assessment showed that the use of sedaxane in rice was currently at a low risk in China.

Keywords: QuEChERS; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); brown rice; sedaxane; residue

氟唑环菌胺是先正达公司开发的新型吡唑酰胺类杀菌剂,其作用机理是通过作用于病原菌线粒体呼吸链电子传递链上的琥珀酸脱氢酶影响病原菌线粒体电子传递系统,阻碍其能量的代谢,抑制病原菌的生长,最终导致其死亡^[1]。氟唑环菌胺已在中国水稻上登记,用于防治水稻恶苗病、烂秧病和立枯病等多种病害,还可促进作物根系的生长^[2]。国际食品法典委员会(CAC)规定氟唑环菌胺在糙米上的最大残留限量(MRL)为0.01 mg/kg,中国目前尚未制定氟唑环菌胺在水稻产品上的MRL值,因此有必要针对较严格的限量,建立灵敏、准确、可靠的残留分析方法用于市场样品监测,保证农产品质量和消费者健康。

QuEChERS前处理与液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测技术联用,被广泛运用于水果、蔬菜等基质中农药残留的检测分析^[3]。但目前仅有杨欢等采用改良的QuEChERS方法检测蔬果中氟唑环菌胺残留的报道^[4],尚缺乏糙米中氟唑环菌胺残留分析方法的报道。为此,本研究利用QuEChERS前处理与LC-MS/MS检测相结合,建立了糙米中氟唑环菌胺的快速分析方法,并利用所建方法对中国市场上糙米中氟唑环菌胺残留量进行了监测。根据监测结果,结合氟唑环菌胺毒理学数据、膳食结构和糙米摄入量,对氟唑环菌胺的摄入风险进行评估^[5],以期对氟唑环菌胺MRL标准的制定及对一般人群健康的风险评估提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

Accela高效液相色谱仪和TSQ QUANTUM ULTRA三重四极杆质谱仪(美国Thermo公司);BSA323S型千分之一电子天平和BSA323型万分之一电子天平(瑞士Sartorius公司);T-25 basic ULTRA-TURRAX高速植物组织捣碎机(德国IKA公司);HYQ-3110涡旋混合振荡器(美国

Crystal公司);3K15高速离心机(美国Sigma公司);系列体积移液器(德国Eppendorf公司)。

氟唑环菌胺(sedaxane)标准品(99.4%)购自德国Dr.E公司;N-丙基乙二胺(PSA)(Agela Technologies公司);无水硫酸镁、氯化钠(上海国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯);乙腈为色谱纯,其余试剂及有机溶剂均为分析纯;所有用水均为蒸馏水。

1.2 QuEChERS样品前处理方法

将糙米粉碎过筛(孔径0.25 mm)后准确称取8 g于50 mL离心管中,加入20 mL V(乙腈):V(水)=80:20混合溶液,振荡提取1 min;加入4 g无水硫酸镁和1 g氯化钠后迅速摇匀,涡旋1 min,于4 000 r/min下离心5 min;移取1 mL上清液,转移至盛有20 mg PSA的1.5 mL离心管中,涡旋2 min,在10 000 r/min下离心3 min;取上清液过0.22 μm微孔滤膜,待LC-MS/MS检测。

1.3 液相色谱-串联质谱检测条件

色谱条件:Thermo Hypersil GOLD C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3.0 μm);以乙腈和含0.1%甲酸的水溶液为流动相进行线性梯度洗脱。洗脱程序:乙腈相体积比10%,保持0.5 min,0.5 min内调整为90%,恒定6 min,2 min内调整为10%,保持2 min。流速0.25 mL/min;柱温35 °C ± 5 °C;进样量10 μL;

质谱条件:电喷雾正离子(ESI⁺)模式;毛细管电压3 200 V;离子源温度200 °C;脱溶剂温度350 °C;鞘气压力115.2 kPa;辅助气压力46.2 kPa;多重反应监测模式(MRM)。其他质谱条件见表1。

1.4 标准溶液配制及标准曲线的绘制

准确称取0.01 g氟唑环菌胺标准品,用乙腈溶解并定容至100 mL,配制成100 mg/L的氟唑环菌胺母液,再用糙米空白提取液逐级稀释成质量浓度分别为0.001、0.002、0.005、0.05和0.1 mg/L的氟唑环菌胺基质匹配系列标准工作溶

表 1 氟唑环菌胺 LC-MS/MS 检测条件

Table 1 LC-MS/MS detection conditions of sedaxane

保留时间 Retention time/min	定量离子对 Quantitative ions, m/z	定性离子对 Qualitative ions, m/z	锥孔电压 Cone voltage/V	碰撞能量 Collision energy/V
		332.0/158.8		19
3.6	332.0/158.8	332.0/291.8	72	13
		332.0/311.8		10

液,按 1.3 节条件进行检测,重复 3 次。以进样质量浓度为横坐标,所对应的色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.5 添加回收试验

在糙米空白样品中分别添加一定量的氟唑环菌胺标准溶液,添加水平分别为 0.004、0.01 和 0.1 mg/kg,按 1.2 和 1.3 节条件进行样品前处理和测定,每个水平重复 5 次,进行添加回收率检测验证。

1.6 实际样品的检测

为验证方法的可行性并对氟唑环菌胺在中国市场上糙米的残留情况进行摸底,采集了天津、黑龙江、吉林、浙江、山东、上海 6 个省(市)的 40 份糙米样品,按 1.2 和 1.3 节的方法和条件进行样品前处理及测定。

2 结果与分析

2.1 检测条件的优化

配制 1.0 mg/L 的氟唑环菌胺单一标准溶液,分别采用电喷雾正离子 (ESI⁺) 模式和负离子 (ESI⁻) 模式对两者进行母离子扫描。结果表明:当使用 ESI⁺ 模式扫描时,氟唑环菌胺的分子离子峰 [M+H]⁺ 响应值较高,故采用 ESI⁺ 模式,得到氟唑环菌胺的分子离子为 m/z 332.0。

进一步对子离子、碎裂电压、碰撞能量等参数进行优化,综合方法的灵敏度和选择性,各选择出响应值最高的 3 组离子对,并获得各离子对的最优锥孔电压和碰撞能量,将响应值最大的一组离子对设为定量离子对,响应强度相对较弱的 2 组离子对设为定性离子对,确定最终的质谱条件见表 1。

采用乙腈-水作为流动相对目标物进行梯度洗脱,氟唑环菌胺在 LC-MS/MS 上的保留时间为 3.6 min。有研究表明,在水相中添加适量的甲酸,不仅可以改善色谱峰形,还可以提高农药的离子化效率,从而提高检测的灵敏度^[6]。经验证,在水

相中加入 0.1% 的甲酸,目标农药出峰效果最好。

2.2 方法的性能指标

2.2.1 线性范围及检出限 在 0.001~0.1 mg/L 范围内,氟唑环菌胺在糙米中的质量浓度与对应的色谱峰面积间呈良好线性关系,线性方程为 $y = 8.4 \times 10^8 x + 8.5 \times 10^5$, 决定系数 (R^2) 大于 0.996。以 3 倍信噪比 ($S/N = 3$) 计算方法的检出限 (LOD) 为 0.01 ng。

2.2.2 方法的回收率及定量限 添加回收试验结果表明:在 0.004、0.01 和 0.1 mg/kg 添加水平下,氟唑环菌胺在糙米中的回收率为 83%~95%,RSD 为 3.9%~12%。满足农药残留分析的要求^[7],以最小添加浓度确定方法的定量限 (LOQ),通过添加回收试验确认,氟唑环菌胺在糙米中的 LOQ 为 0.004 mg/kg。典型色谱图见图 1,可见,在氟唑环菌胺出峰时间无明显杂质干扰。

2.3 市场样品监测及风险评价

结果表明,40 个糙米样品中均未检出氟唑环菌胺,即残留量均低于 0.004 mg/kg,也低于国际食品法典委员会 (CAC) 规定的 MRL 值 0.01 mg/kg。

CAC 规定氟唑环菌胺在小麦、玉米、马铃薯和糙米上的 MRL 值分别为 0.01、0.01、0.02 和 0.01 mg/kg^[8]。中国已经制定了氟唑环菌胺在大麦、燕麦、黑麦、小黑麦、油菜籽和大豆上的 MRL 值均为 0.01 mg/kg^[9],但未制定其在登记作物小麦、玉米、马铃薯和水稻上的 MRL 值。

根据 2002 年中国居民营养与健康现状调查结果中中国居民对每类食物的每日摄入量,计算得到氟唑环菌胺膳食摄入的理论最大量 (TMDI) 为 7.331×10^{-3} mg;根据氟唑环菌胺的日允许摄入量 (ADI) 0.11 mg/kg bw 及中国人平均体重 63 kg^[10],计算得到中国成人的日允许摄入量为 6.3 mg,氟唑环菌胺在 CAC 和中国已经制定限量的 7 类作物中,理论最大量占日允许摄入量的风险比例为 0.12%(表 2),风险概率极低,表明氟唑环菌胺目前在中国水稻上的使用不会对一般人群健康产生不可接受的风险^[11-12]。

3 结论

本研究采用 QuEChERS 样品前处理方法,结合液相色谱-串联质谱技术,建立了糙米中氟唑环菌胺残留的测定方法。样品采用 V (乙腈): V (水)=80:20 混合溶液涡旋提取,PSA 分散固相萃

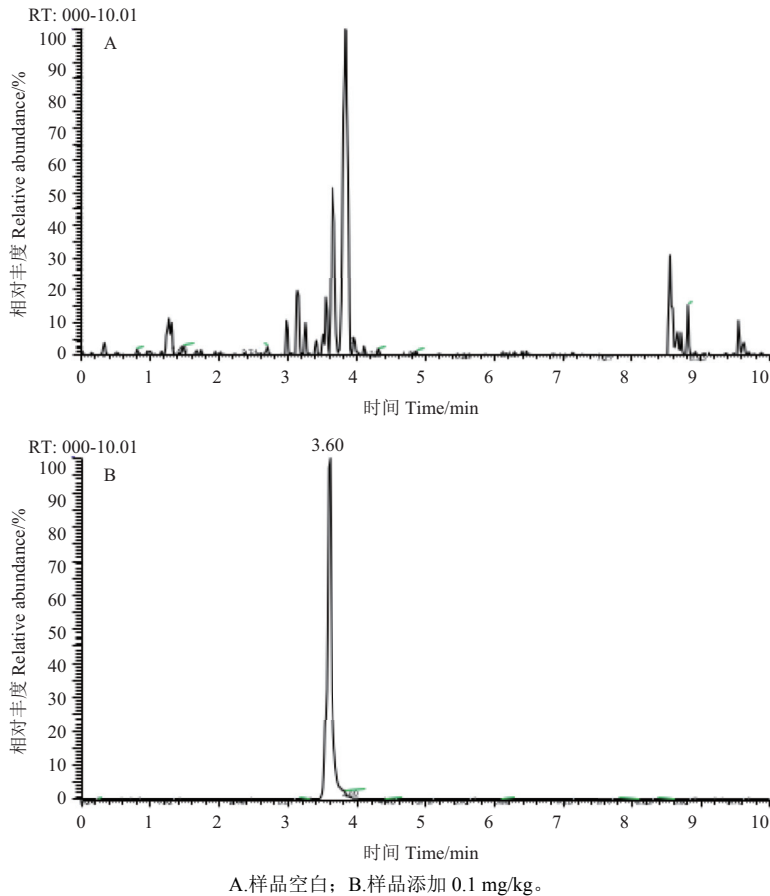


图 1 糙米中氟唑环菌胺典型 LC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 The typical LC-MS/MS chromatogram of sedaxene in brown rice sample

表 2 氟唑环菌胺膳食风险评估计算表

Table 2 Dietary risk assessment of sedaxene in food

食物分类 Food type	膳食量 Dietary intake/kg	参考限量 Reference maximum limit/(mg/kg)	限量来源 ⁽⁸⁻⁹⁾ Limit source	理论最大日 摄入量 TMDI/mg	日允许摄入量 Acceptable daily intake/mg	风险概率 Risk probability/%
米及其制品 Rice and its products	0.239 9	0.01	稻谷, CAC Paddy, CAC	0.002 399	ADI × 63	
面及其制品 Flour and its products	0.138 5	0.01	小麦, CAC Wheat, CAC	0.001 385		
其他谷类 Other cereals	0.023 3	0.01	玉米, 中国 Corn, China	0.000 233		
薯类 Tubers	0.049 5	0.02	马铃薯, CAC Potato, CAC	0.000 99		
豆及制品 Dried beans and their products	0.016 0	0.01	大豆, 中国 Soybean, China	0.000 16		
浅色蔬菜 Light vegetables	0.183 7	0.01	玉米笋, CAC Baby corn, CAC	0.001 837		
植物油 Vegetable oil	0.032 7	0.01	油菜籽, 中国 Rapeseed, China	0.000 327		
合计 Sum	1.028 6			0.007 331	6.3	0.12

取净化, LC-MS/MS 测定, 外标法定量。方法线性良好, $R^2 > 0.996$, 添加回收率为 83%~95%, RSD 为 3.9%~12%, LOQ 为 0.004 mg/kg。所建方法重现性好、快速、灵敏, 适用糙米中氟唑环菌胺残留的检测。为中国检测糙米中氟唑环菌胺的

残留量提供了可参考的方法。利用该方法对采自中国 6 个省(市)的 40 份糙米样品开展了检测, 其中氟唑环菌胺的残留量均低于定量限 0.004 mg/kg。表明目前氟唑环菌胺在中国水稻上不会对一般人群健康产生不可接受的风险。

参考文献 (Reference):

- [1] 《中国农药》编辑部. 氟唑环菌胺[J]. 中国农药, 2005, 11(1): 60.
Journal of Chinese Pesticide. Sedaxane[J]. China Pestic, 2005, 11(1): 60.
- [2] 农业部农药检定所. 氟唑环菌胺. 中国农药信息网[DB/OL]. [2018-01-01]. <http://www.chinapesticide.gov.cn/yxcftozw.jhtml>.
Institute for the Control of Agrochemicals. Sedaxane. China pesticide information network[DB/OL]. [2018-01-01]. <http://www.chinapesticide.gov.cn/yxcftozw.jhtml>.
- [3] YANG F, BIAN Z, CHEN X, et al. Analysis of 118 pesticides in tobacco after extraction with the modified QuEChERS method by LC-MS-MS[J]. J Chromatogr Sci, 2014, 52(8): 788-792.
- [4] 杨欢, 孙伟华, 曹赵云, 等. 改良QuEChERS方法快速测定果蔬中8种新型琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂[J]. 色谱, 2016, 34(11): 1070-1076.
YANG H, SUN W H, CAO Z Y, et al. Determination of eight novel succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in vegetables and fruits by modified QuEChERS[J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(11): 1070-1076.
- [5] YOU X W, LI Y Q, WANG X G, et al. Residue analysis and risk assessment of tebuconazole in jujube (*Ziziphus jujuba Mill*)[J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(7): e3917.
- [6] 李娜, 张玉婷, 李辉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定6种中药材中110种农药残留[J]. 农药学报, 2012, 14(6): 619-628.
LI N, ZHANG Y T, LI H, et al. Determination of 110 pesticide residues in six Chinese herbal medicines by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin J Pestic Sci, 2012, 14(6): 619-628.
- [7] European Commission Directorate General Health and Consumer Protection. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed[R]. SANCO/12571/2013, 2013.
- [8] Codex Alimentarius Commission (CAC). Pesticide residues in food and feed. Rome, Italy: CAC, 2016. [DB/OL]. [2018-01-01] <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/home/en/>.
- [9] 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National food safety standard-maximum residue limits for pesticides in food: GB 2763—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [10] 中华人民共和国卫生部, 中华人民共和国科学技术部, 中华人民共和国国家统计局. 中国居民营养与健康状况2002[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
Ministry of Health of the People's Republic of China, The People's Republic of China Ministry of Science and Technology, National Bureau of Statistics of the People's Republic of China. Nutrition and health status of Chinese residents 2002[M]. Beijing: People's Medical Press, 2005.
- [11] 袁玉伟, 王强, 朱加虹, 等. 食品中农药残留的风险评估研究进展[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(2): 394-399.
YUAN Y W, WANG Q, ZHU J H, et al. Review on the risk assessment for pesticide residue in foods[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2011, 23(2): 394-399.
- [12] JMPR. Sedaxane[EB/OL]. [2018-01-01]. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report12/Sedaxane.pdf.

(责任编辑: 曲来娥)