

高效液相色谱-串联质谱法测定玉米中虫酰肼残留量

吕鹏^{1*}, 田丰¹, 宋文成¹, 杨长志², 刘巍³

(1. 黑河出入境检验检疫局, 黑河 164300; 2. 黑龙江出入境检验检疫局, 哈尔滨 150001;
3. 同江出入境检验检疫局, 佳木斯 156499)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法检测玉米中虫酰肼的残留量。**方法** 样品经含 1% 乙酸的乙腈溶液提取, 再经 N-丙基乙二胺(PSA)、石墨化炭黑和十八烷基硅烷(octadecylsilane, ODS)净化, 用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)柱分离, 以 0.1% 乙酸水溶液和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 然后经质谱法检测, 以外标法定量。**结果** 虫酰肼在 4~100 ng/mL 浓度范围内时, 线性关系良好, 相关系数为 0.9933。在 0.001、0.05 和 25.0 mg/kg 3 个水平加标的平均加标回收率为 85.5%~105.0%之间, 相对标准偏差均小于 10.1%, 检出限为 0.001 mg/kg。**结论** 本方法灵敏准确、操作简便, 可适用于玉米中虫酰肼残留量的测定。**关键词:** 虫酰肼; 玉米; 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of tebufenozide residue in corn by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LV Peng^{1*}, TIAN Feng¹, SONG Wen-Cheng¹, YANG Chang-Zhi², LIU Wei³

(1. Heihe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Heihe 164300, China; 2. Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China; 3. Tongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Jiamusi 156499, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for detection of worm tebufenozide residue in corn by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Tebufenozide residue in the sample was extracted with acetonitrile containing 1% acetic acid, cleaned up with N-propyl ethylenediamine (PSA), graphitized carbon black and octadecylsilane (ODS), separated by an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) using 0.1% acetic acid water solution-acetonitrile as mobile phase for gradient elution, and then detected by tandem mass spectrometry with external standard method for quantification. **Results** Tebufenozide had a good linearity in the range of 4~100 ng/mL, with a correlation coefficient of 0.9933. The average recoveries of tebufenozide spiked in 3 levels of 0.001, 0.05 and 25.0 mg/kg were ranged from 85.5% to 105.0%, with the relative standard deviations below 10.1%. The limit of detection was 0.001 mg/kg. **Conclusion** This method is sensitive, accurate and simple, which is suitable for the detection of tebufenozide residue in corn.

KEY WORDS: tebufenozide; corn; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*通讯作者: 吕鹏, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全, E-mail: 164352847@qq.com

*Corresponding author: LV Peng, Engineer, Heihe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Heihe 164300, China. E-mail: 164352847@qq.com

1 引 言

虫酰肼(tebufenozide), 中文别名为米螨、抑虫肼、特虫肼, 化学名 N-叔丁基-N'-(4-乙基苯甲酰基)-3-5-二甲基苯酰肼, 是非甾族新型昆虫激素类杀虫剂, 主要用于防治蔬菜(甘蓝类、瓜类、茄果类等)、玉米、高粱、水稻、大豆、棉花、葡萄、猕猴桃、苹果、核桃、甜菜、茶叶、花卉等作物上的缨翅目、鳞翅目、蚜科、叶蝉科、叶螨科、斑潜蝇属、根疣线虫属、鳞翅目幼虫如梨小食心虫、甜菜夜蛾、葡萄小卷蛾等害虫。目前, 此类农药在玉米、大豆、蔬菜以及林木病虫害防治方面得到了推广, 但存在一定的危害。

为确保食品安全, 世界各国政府对食品中虫酰肼的残留限量都做出了明确规定。例如, 欧盟规定玉米中虫酰肼的残留限量为 0.05 mg/kg^[1]。为符合我国进出口贸易商品检验把关的需要, 研究和建立快速准确的玉米中虫酰肼残留检测方法就显得极为紧迫和必要。目前, 国内有 SN/T 1770-2006《进出口食品中抑虫肼残留量测定方法-液相色谱法》^[1], 基质为大米, 其方法检出限为 0.025 mg/kg; SN/T 1738-2006《进出口粮谷和油籽中虫酰肼残留量的检验方法 气相色谱串联质谱法》^[2], 基质为糙米、玉米、大豆和花生仁, 其方法要检出限为 0.1 mg/kg, 部分不能满足国外检验限量(玉米、大豆: 0.05 mg/kg)要求; GB/T 20769-2006《水果和蔬菜中 405 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[3]中包含有虫酰肼的测定, 其检测限分别为 0.01 mg/kg; GB/T 20770-2006《粮谷中 372 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[4]中包含有虫酰肼的测定, 其检测限为 0.004 mg/kg; GB/T 20771-2006《蜂蜜、果汁和果酒中 420 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[5]中包含有虫酰肼的测定, 其检测限为 0.00267 mg/kg; GB/T 20772-2006《动物肌肉中 380 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[6]中包含有虫酰肼的测定, 其检测限为 0.004 mg/kg; JAP-055 日本有氟定脲、除虫脲、虫酰肼、氟苯脲、氟虫脲、氟铃脲和氟丙氧脲检测方法^[7], 采用丙酮提取, 经液液分配转移至正己烷和乙腈中, 然后用硅胶或胺基柱净化, 利用液相色谱和液相色谱-质谱进行谷类、豆类、种子类、水果、蔬菜和茶中这几种农药残留量的测定, 虫酰肼检测限为 0.05 mg/kg(茶: 0.1 mg/kg)。

戴琳等^[8]采用高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定蔬菜中虫酰肼和甲氧虫酰肼残留, 样品经碱性乙腈提取固相萃取净化, 反相高效液相色谱柱分离后进行质谱分析, 虫酰肼定量限为 4 μg/kg; 杨长志等^[9]采用高效液相色谱法测定大米中抑虫肼的残留量, 样品采用丙酮-水提取、二氯甲烷萃取、硅胶和中性氧化铝柱净化, 反相高效液相色谱柱分离后进行分析, 虫酰肼的定量限为 0.025 mg/kg; 石春红等^[10]采用高效液相色谱法检测茎椰菜中虫酰肼残留量,

样品经丙酮提取、正己烷反相萃取, 硅胶柱、胺基柱净化, 利用液相色谱进行分析测定, 样品中虫酰肼的最低检出限为 0.01 mg/kg; 章虎等^[11]采用高效液相色谱法测定甘蓝、青菜和番茄中虫酰肼、甲氧虫酰肼和咪喃虫酰肼残留, 样品以酸化甲醇高速匀浆提取, 正己烷去除脂类杂质, 二氯甲烷反萃取去除亲水性杂质, 再经氟罗里硅土柱层析净化, 利用液相色谱进行分析测定, 样品中虫酰肼的检出限为 0.05 mg/kg; 沈菁等^[12]采用液相色谱-质谱法测定土壤和甘蓝中的虫酰肼残留, 应用分散固相萃取方法进行前处理, 即以 N-丙基乙二胺(N-(n-propyl)ethylenediamine, PSA)为吸附剂, 乙腈为萃取溶剂, 实现样品快速制备, 最低检测浓度为 0.02 mg/kg; 董静等^[13]采用 QuEChERS-高效液相色谱法检测蔬菜中的吡虫啉、虫酰肼、阿维菌素和噻螨酮, 将 QuEChERS 样品处理方法进行了提取及净化的改进, 虫酰肼检出限分别为 0.02 mg/kg; Masahiro 等^[14]采用液相色谱-质谱法测定农产品中 17 种农药残留, 样品经乙腈提取, 用 PSA 柱净化, 利用液相色谱-大气压化学源-串联质谱法(liquid chromatography-atmospheric pressure chemical source - tandem mass spectrometry, LC-APCI-MS)测定大米、柑桔和土豆中 17 种农药残留, 虫酰肼的检出限为 0.02 mg/L; Satoshi 等^[15]采用气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)或液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)对食品中多种农药进行残留分析, 先用水浸润, 然后用乙腈进行提取, 经 C₁₈、GCB/PSA 柱净化后进行 99 种农药测定, 虫酰肼检出限为 0.01 mg/kg; Arrebola 等^[16]采用 GC-MS 测定新鲜食品中 81 种农药残留量, 其中虫酰肼检出限为 0.00326 mg/kg; Marina 等^[17]采用基质分散技术和 LC-MS 方法测定鲜果汁中多种农药残留, 其中虫酰肼检测限为 0.42~1.59 μg/L。本研究采用高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定玉米中虫酰肼的残留量, 以期对相关研究提供参考。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

乙酸(优级纯, 天津市丰越化学品有限公司); 乙酸钠(优级纯, 天津市光复精细化工研究所); 氯化钠(优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 乙腈(色谱纯, 赛默飞世尔科技公司); 无水硫酸镁(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司, 无水硫酸镁经 650 °C 灼烧 4 h, 置于干燥器内备用); PSA 吸附剂(40~100 μm)。石墨化炭黑吸附剂(120~400 μm); 十八烷基硅烷(octadecylsilane, ODS)键合相(40~100 μm); 实验用水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

虫酰肼标准物质: 虫酰肼(tebufenozide), CAS: 112410-23-8, 纯度 99%, 德国 Sigma Aldrich 公司。

Waters Quattro Premier 液相色谱-质谱/质谱联用仪(美国 Waters 公司); 湘仪 L550 离心机(湖南湘仪公司); CPA324S 电子天平(德国赛多利斯公司); MS3 旋涡混合器、IKA T25 均质器(德国 IKA 公司); N-EVAP112 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

100 µg/mL 标准储备溶液: 准确称取一定量的虫酰肼标准物质, 用乙腈溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 此溶液转移至标液储存瓶中, 在 -18 °C 避光条件下可储存 6 个月。

20 µg/mL 标准中间溶液: 准确吸取上述标准储备溶液 10 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释定容, 此溶液转移至标液储存瓶中, 在 -18 °C 避光条件下可储存 6 个月。

混合标准工作溶液: 使用前根据检测需要, 用空白样品基质配制标准工作溶液。

2.2.2 仪器条件

(1) 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.1 µm); 流动相: 0.1%的乙酸水溶液和乙腈, 梯度洗脱程序见表 1。流速: 0.3 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 µL。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

保留时间(min)	0.1%乙酸水溶液(%)	乙腈(%)
0.00	30	70
2.00	30	70
4.00	0	100
4.50	30	70
5.00	30	70

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI+); 检测方式: 多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM); 离子源温度: 150 °C; 去溶剂气流量: 氮气 550 L/hr; 去溶剂温度: 350 °C; 锥孔气流量 50 L/hr, 氮气; 3.40×10⁻⁴ kPa, 氩气, 纯度≥99.999%; 毛细管电压: 3.0 kV; 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞气能量等见表 2。

表 2 虫酰肼的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞气能量

Table 2 Qualitative ion pair, quantitative ion pair, taper hole voltage and collision energy of tebufenozide

化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞气能量 (eV)
虫酰肼	353.1/133.1 353.1/297.1	353.1/297.1	12, 12	16, 8

2.2.3 样品前处理

称取玉米试样 5 g(精确到 0.01 g), 置于 50 mL 的具塞离心管中, 加入 10 mL 水, 旋涡混匀 30 s, 静置 10 min。加入 1 g 氯化钠、1 g 乙酸钠、3 g 无水硫酸镁和 15 mL 含 1% 乙酸的乙腈溶液, 以 10000 r/min 均质 2 min, 再以 4000 r/min 离心 5 min。将上清液转移至 25 mL 容量瓶中。再用 10 mL 含 1%乙酸的乙腈溶液重复提取一次, 合并上清液于上述 25 mL 容量瓶中, 然后用乙腈定容至刻度, 待净化。

从上述 25 mL 容量瓶中移取 10 mL 提取液置于 15 mL 具塞离心管中, 加入 250 mg PSA、500 mg ODS、300 mg 无水硫酸镁和 70 mg 石墨化炭黑, 旋涡混合 2 min, 4000 r/min 离心 5 min。然后准确移取 5 mL 净化液于 15 mL 玻璃具塞离心管中, 氮吹仪 60 °C 下吹干后, 用含 0.1%乙酸的乙腈溶液溶解并定容至 1.0 mL, 过 0.22 µm 有机系滤膜后装入进样瓶中, 供 HPLC-MS/MS 测定。

3 结果与分析

3.1 净化方法的选择和优化

本方法采用了多残留快速检测前处理技术-QuEChERS。其中 PSA 吸附剂能够有效去除样本中的极性色素、脂肪酸、糖类物质等极性基质干扰, C₁₈ 吸附剂能除去部分脂肪和脂溶性杂质。本试验中 C₁₈ 添加 500 mg、PSA 添加 250 mg 可达到满意的净化效果。本实验还加入一定量石墨化炭黑, 除去玉米样品净化液中部分杂质, 实验效果良好。分别试验加入石墨化炭黑量为 30、40、50、60、70 和 80 mg。结果表明, 当加入量≥60 mg 时, 基质效应明显减少, 虫酰肼的回收率大于 85%, 所以本实验最终的优化条件为 PSA 250 mg、C₁₈ 500 mg 和石墨化炭黑 60 mg。

3.2 色谱柱和流动相的选择

本试验选择了 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 液相色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.1 µm)。结果表明, ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 液相色谱柱在分离度和灵敏度上完全满足检测下限要求。本实验流动相初选了水-乙腈、乙酸铵水溶液(pH 3.0)-乙腈和 0.1%乙酸-乙腈 3 种不同溶剂配比。试验结果表明, 选择前两种流动相配比, 虫酰肼的色谱峰形不好; 当采用 0.1%乙酸-乙腈流动相, 虫酰肼的出峰时间和峰形比较理想, 所以选择流动相为 0.1%乙酸-乙腈。

3.3 线性范围的确定

在确定上述实验条件后, 用虫酰肼系列标准溶液, 以色谱响应峰面积对虫酰肼的浓度做线性回归方程, 当虫酰肼标准溶液的浓度在 4~100 ng/mL 范围内时, 线性系数良好, 其相关系数和回归方程分别见图 1。

3.4 检出限

本研究的检出限采用添加回收率实验确定。当添加到

最低含量小于 0.001 mg/kg 时, 回收率无法满足要求。最终确定虫酰肼的检出限为 0.001 mg/kg, 含玉米基质的标准溶液色谱图、检出限的色谱图和玉米基质的空白色谱图, 见图 2~图 4。

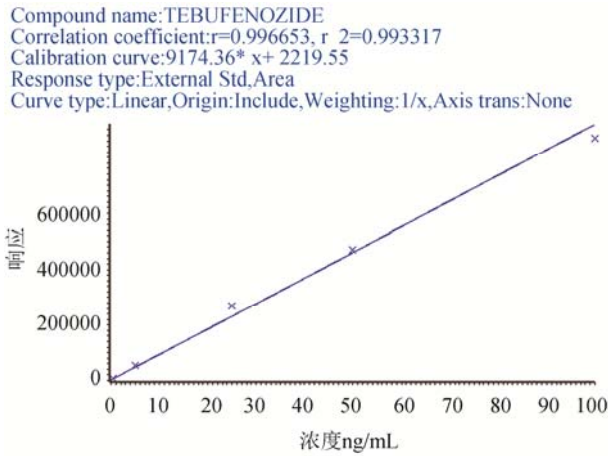


图 1 虫酰肼的线性关系
Fig. 1 Linear relationship of tebufenozide

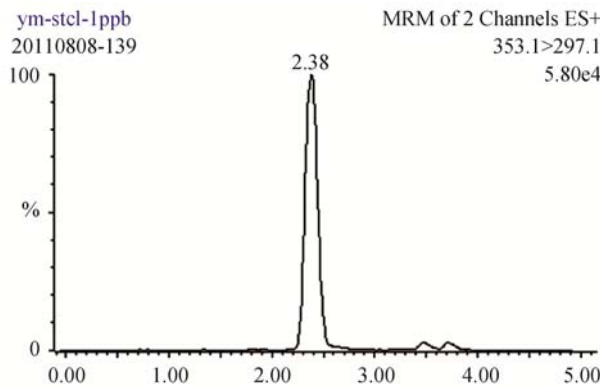


图 2 虫酰肼标准品的多反应监测色谱图
Fig. 2 MRM chromatogram of tebufenozide standard

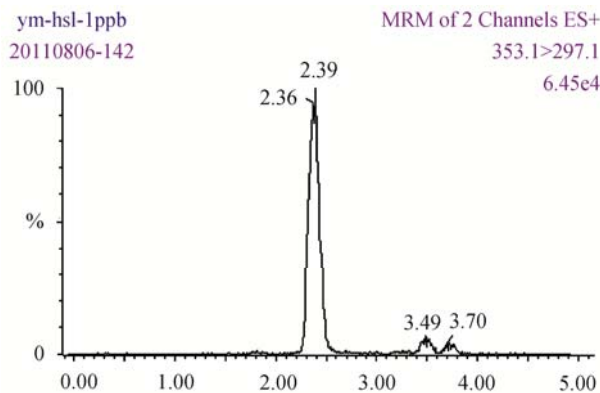


图 3 玉米样品添加 0.001 mg/kg 虫酰肼的色谱图
Fig. 3 Chromatogram of corn samples added 0.001 mg/kg tebufenozide

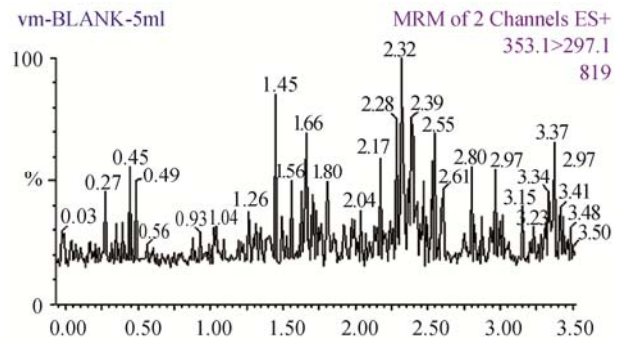


图 4 玉米空白样品色谱图
Fig.4 Chromatogram of corn blank sample

3.5 回收率和精密度实验

分别向空白玉米样品中添加浓度为 0.001、0.05 和 25 mg/kg 的虫酰肼标准溶液, 每个浓度水平平行测定 6 次, 分别计算回收率和精密度, 其平均回收率和相对标准偏差分别见表 3。由表 3 可知, 本方法的回收率及精密度均符合要求。

表 3 虫酰肼的回收率、精密度(n=6)
Table 3 Recoveries and RSDs of tebufenozide (n=6)

添加浓度(mg/kg)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
0.001	105.0	10.1
0.050	92.4	8.83
25.00	85.5	7.92

4 结 论

目前虫酰肼的相关检测方法以 HPLC 和 HPLC-MS/MS 为主, 样品主要为水果、蔬菜和土壤等, 而专门针对玉米中虫酰肼残留量测定的 HPLC-MS/MS 尚未见报道。因此, 本研究采 QuEChERS-HPLC-MS/MS 研究了玉米中虫酰肼残留量的测定, 方法准确、简便、快捷。该方法的回收率在 85.5%~105.0%之间, 检出限为 0.001 mg/kg, 相对标准偏差均小于 10.1%, 能够满足欧盟等国家和地区对玉米中虫酰肼限量的要求。

参考文献

- [1] SN/T 1770-2006 进出口食品中抑虫酰肼残留量测定方法-液相色谱法 [S].
SN/T 1770-2006 Determination of antimicrobial hydrazone residues in the import and export food-liquid chromatography (HPLC) [S].
- [2] SN/T 1738-2006 进出口粮谷和油籽中虫酰肼残留量的检验方法 气相色谱串联质谱法[S].
SN/T 1738-2006 Testing method of worm hydrazone residues in the import and export of grain and oilseed-gas chromatography-tandem mass

- spectrometry [S].
- [3] GB/T120769-2006 水果和蔬菜中 405 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T120769-2006 Determination of 405 kinds of pesticides in fruits and vegetables and related chemical residues-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [4] GB/T20770-2006 粮谷中 372 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 20770-2006 Determination of 372 kinds of pesticides in grain and related chemicals residue-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [5] GB/T20771-2006 蜂蜜、果汁和果酒中 420 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/honey T20771-2006 Determination of 420 kinds of pesticides and related chemicals residues in the fruit juice and wine-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [6] GB/T20772-2006 动物肌肉中 380 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T20772-2006 Determination of 380 kinds of pesticides and related chemicals residues in animal muscles-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [7] JAP-055 氟定脲、除虫脲、虫酰肼、氟苯脲、氟虫脲、氟铃脲和氟丙氧脲检测方法[S].
JAP-055 Detection method of fluorine urea, deinsectization urea, insect hydrazide, fluorine benzene urea, urea worm fluoride, fluoride bell urea and oxygen fluorine urea [S].
- [8] 戴琳, 徐锦忠, 丁涛. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定蔬菜中虫酰肼和甲氧虫酰肼残留[J]. 分析化学, 2008, 36(1): 87-90.
Dai L, Xu JZ, Ding T. Determination of insect hydrazide and methoxyl hydrazide residues in vegetables by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Anal Chem, 2008, 4(1): 87-90.
- [9] 杨长志, 康庆贺. 高效液相色谱法测定大米中抑虫脲的残留量[J]. 化学工程师, 2006, 134(11): 27-29.
Yang CZ, Kang QH. Determination of the suppression pest hydrazine residues in rice by high performance liquid chromatography (HPLC) method [J]. Chem Eng, 2006, 134(11): 27-29.
- [10] 石春红, 施燕萍, 许庆炎. 高效液相色谱法检测茎椰菜中虫酰肼残留量[J]. 食品科技, 2010, 35(6): 301-303.
Shi CH, Shi YP, Xu QY. Detection of worm hydrazide residues in stem cabbage by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. J Food Sci Technol, 2010, 35(6): 301-303.
- [11] 章虎, 吴俐勤, 谢磊. 高效液相色谱法测定甘蓝、青菜和番茄中虫酰肼、甲氧虫酰肼和咪唑虫酰肼残留[J]. 现代科学仪器, 2006, 3: 55-58.
Zhang H, Wu LQ, Xie L. Determination of insect hydrazide, methoxyl bug hydrazide and furan hydrazide residues in cabbage, green vegetables and tomatoes by high performance liquid chromatography [J]. Mod Sci Instrum, 2006, 3: 55-58.
- [12] 沈菁, 刘军, 陈平. 液相色谱-质谱法测定土壤和甘蓝中的虫酰肼残留[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(2): 442-444.
Shen J, Liu J, Chen P. Determination of worm hydrazide residues in soil and cabbage by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Hubei Agric Sci, 2009, 48(2): 442-444.
- [13] 董静, 宫小明, 张立. QuEChERS 高效液相色谱法检测蔬菜中的吡虫啉、虫酰肼、阿维菌素和噻螨酮[J]. 分析实验室, 2008, 27(3): 91-94.
Dong J, Gong XM, Zhang L. Detection of imidacloprid, insect hydrazide, abamectin and thiamethoxam mite ketone in vegetables by QuEChERS-HPLC [J]. J Anal Lab, 2008, 27(3): 91-94.
- [14] Masahiro O. Determination of seventeen pesticide residues in agricultural products by LC-MS [J]. J Food Hyg Soc Japan, 2002, 43(6): 389-393.
- [15] Satoshi T, Okihashi M, Kitagawa Y. Rapid and easy multiresidue method for determination of pesticide residues in foods using gas or liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Pest-Strat Pest Anal, 2011, 1: 197-214.
- [16] Arrebola FJ. Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography-chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2003, 484: 167-180.
- [17] Marina R. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2009, 113: 712-719.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



吕 鹏, 研究生, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 164352847@qq.com