

花生中噻呋酰胺残留量的检测及膳食风险评估

李 辉^{1,2}, 李 娜^{1,2}, 邵 辉^{1,2}, 刘 磊^{1,2}, 宋淑荣^{1,2}, 郭永泽^{1,2}, 张玉婷^{1,2*}

(1. 天津市农业质量标准与检测技术研究所, 天津 300381;
2. 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室, 天津 300381)

摘 要: 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱联用法检测噻呋酰胺残留的分析方法, 探明噻呋酰胺在花生中的残留特性和使用安全性。**方法** 样品经乙腈提取, QuEChERS 方法净化, 在电喷雾正离子(electrospray ionization, ESI+)模式下, 用超高效液相色谱-串联质谱联用仪(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer, UPLC-MS/MS)采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式检测。**结果** 噻呋酰胺在 1~5000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好, 相关系数在 0.9998 和 1 之间。在花生壳和土壤样品中, 添加水平为 1、500、2000 $\mu\text{g/kg}$ 及在植株和花生仁样品中, 添加水平为 5、500、2000 $\mu\text{g/kg}$ 时, 加标回收率在 75.5%~107.9%之间, 相对标准偏差不大于 10%; 240 g/L 噻呋酰胺悬浮剂, 150~225g a.i/ha 用药 1 次, 采收间隔期 14、21、28 d, 噻呋酰胺在花生中的最大风险商为 0.0013。**结论** 该方法简便、快速、灵敏高, 能有效克服杂质干扰, 膳食风险结果表明, 240 g/L 噻呋酰胺悬浮剂按上述方法使用安全。

关键词: 噻呋酰胺; 花生; 残留; 超高效液相色谱-串联质谱仪; 风险评估

Determination of thifluzamide residue in peanut and dietary risk assessment

LI Hui^{1,2}, LI Na^{1,2}, SHAO Hui^{1,2}, LIU Lei^{1,2}, SONG Shu-Rong^{1,2}, GUO Yong-Ze^{1,2}, ZHANG Yu-Ting^{1,2*}

(1. Research Institution of Agricultural Quality Standards and Testing Technology in Tianjin, Tianjin 300381, China;
2. Ministry of Agriculture and Rural Affairs Lab of Agricultural Product Quality Safety Risk Assessment (Tianjin), Tianjin 300381, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of thiafuramide residue by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and investigate the residual properties and safety of thiafuramide in peanut. **Methods** The samples were extracted with acetonitril, and cleaned-up by QuEChERS. Then, the residues of thifluzamide were analyzed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UPLC/MS/MS), under electrospray positive ion using multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The thifluzamide had high correlation coefficients at the range of 1–5000 $\mu\text{g/L}$, with the correlation coefficients between 0.9998 and 1. When the spiked levels of 1, 500, 2000 $\mu\text{g/kg}$ in peanut hull and soil, and the spiked levels of 5, 500, 2000 $\mu\text{g/kg}$ in peanut plant and peanut kernel, the spiked recoveries of thifluzamide in all samples were between 75.5% and 107.9%, with the relative standard deviation (RSD) less than 10%. Spraying 1 times during growing period of peanut with 150-225 g a.i./ha of 240 g/L thifluzamide suspension concentrate, the maximum value at risk quotient of thifluzamide after the last

基金项目: 天津市农业科学院院长基金项目(16002)、天津市蔬菜产业体系创新团队项目(ITT VRS2019021)

Fund: Supported by Tianjin Academy of Agricultural Sciences President Fund Project (16002), Tianjin Vegetable Industry System Innovation Team (ITT VRS2019021)

***通讯作者:** 张玉婷, 硕士, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测。E-mail: yutingtj@163.com

***Corresponding author:** ZHANG Yu-Ting, Master, Professor, Research Institution of Agricultural Quality Standards and Testing Technology in Tianjin, Tianjin 300381, China. E-mail: yutingtj@163.com

application for 14, 21, 28 d was 0.0013. **Conclusion** This method is simple, rapid, sensitive, which can effectively overcome the interference of impurities. The dietary risk assessment results show that 240 g/L thifluzamide suspension concentrate is safety with the above application.

KEY WORDS: thifluzamide; peanut; residue; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer; risk assessment

1 引 言

噻唑酰胺又叫噻唑菌胺(thifluzamide), 属于噻唑酰胺类杀菌剂, 具有强内吸传导性和长持效性。它是含噻唑环的苯基酰胺化合物, 可防治多种作物病害, 广泛应用于水稻、麦类、花生、棉花、甜菜、咖啡、马铃薯、草坪等多种作物^[1]。目前尚不能查询到噻唑酰胺在花生作物中的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)值, 我国 GB 2763-2016 规定噻唑酰胺在稻谷中的 MRL 值为 7 mg/kg, 在糙米中的 MRL 值为 3 mg/kg, 马铃薯为 2 mg/kg^[2], 日本肯定列表规定噻唑酰胺在糙米中的 MRL 值为 1 mg/kg, 马铃薯为 0.05 mg/kg^[3]。膳食风险评估时, 花生及花生油均归类为植物油进行评估, 日膳食量按 0.0327 kg 计算^[2]。

目前国内外关于噻唑酰胺的检测方法多种多样, 使用较多的是气相色谱法^[4-6]和高效液相色谱法^[7-13], 其检测方法容易受到杂质干扰, 选择性差, 近年来, 灵敏度高、选择性强的高效液相色谱质谱联用技术被用于噻唑酰胺的残留检测, 但其检测方式多是以负离子扫描模式为主^[14-16], 在实际的农残分析时存在一定的局限性, 灵敏度通常不如正离子扫描模式高。

本研究经过对前处理过程和仪器的调节优化, 建立了在电喷雾正离子模式下, 采用超高效液相色谱-串联质谱联用仪(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer, UPLC-MS/MS)多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, 检测噻唑酰胺在花生中的残留的分析方法。样品经乙腈提取, QuEChERS 方法净化, 采用基质匹配外标法定量测定, 以期为膳食风险评估工作打下基础。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters H class 超高效液相色谱(美国 Waters 公司); UPLC/Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪(配电喷雾离子源, 美国 Waters 公司); CK2000 高通量组织研磨仪(托摩根生物科技有限公司); Laborota 4000 efficient 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); QL-901 旋涡混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

乙腈(分析纯, 天津市康科德科技有限公司); 乙腈、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 无水硫酸镁(MgSO₄, 天津市风船化学试剂科技有限公司); N-丙基乙二胺(primary

secondary amine, PSA)、石墨炭黑(graphite carbon black, GCB)(上海安谱公司)。

240 g/L 噻唑酰胺悬浮剂和噻唑酰胺农药标准品(纯度 ≥ 96.0%, 合肥星宇化学有限责任公司)。

分别称取标准品各 5.00 mg 于 50 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 配制成浓度为 100 μg/mL 的标准储备液, 于 4 °C 条件下保存。分别吸取上述标准储备液各 0.5 mL 于 50 mL 容量瓶, 用乙腈定容至刻度, 制成浓度为 1 μg/mL 的混合标准工作液。

2.2 田间设计及采样

240 g/L 噻唑酰胺悬浮剂, 设 2 个施药剂量: 低剂量为 150 g a.i./ha, 高剂量为 225 g a.i./ha。各设 1 次、2 次施药, 施药间隔期 7 d, 每处理设 3 次重复。用随机法采集距末次施药后 14、21、28 d 的花生植株、土壤、花生壳和花生仁样品。另设清水空白对照, 处理间设保护隔离带。

2.3 样品前处理方法

2.3.1 提 取

准确称取样品(土壤、植株、花生仁、花生壳)5.0 g 于 50 mL 具塞离心管中, 加入 20 mL 乙腈, 5 mL 水, 浸泡 10 min, 用组织研磨仪振荡提取 15 min 后, 向其中加入 3 g 氯化钠, 再振荡提取 15 min, 于离心机上以 4000 r/min 离心 5 min, 量取 10 mL 上清液, 浓缩至干, 用乙腈定容至 2.5 mL, 待净化。

2.3.2 净 化

将待净化液转移至 10 mL 离心管(预先加入 200 mg 无水 MgSO₄、70 mg PSA 和 15 mg GCB)中, 涡旋振荡 2 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜于 2 mL 进样小瓶, 待测。

2.4 超高效液相色谱条件

色谱柱: Acquity UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A 相: 乙腈; B 相: 0.1%甲酸水溶液, 乙腈+0.1%甲酸水(90:10, V:V); 进样量: 1 μL; 柱温: 30 °C; 流速: 0.2 mL/min; 运行时间: 3 min。

2.5 质谱条件

电离模式: 电喷雾正离子 ESI(+); 毛细管电压: 1.5 kV; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气温度: 500 °C; 脱溶剂气流量: 1000 L/h; 锥孔反吹气流量: 150 L/h; 锥孔反吹压力: 7 bar; 检测方式: 多反应监测扫描模式(multiple reaction monitoring,

MRM); 质谱采集参数见表 1。

表 1 噻呋酰胺的质谱检测条件
Table 1 Mass-spectrometric conditions for determining of thifluzamide

名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /V
噻呋酰胺	529>489	529>489	18	28
	529>509			18

2.6 膳食暴露风险评估

噻呋酰胺在花生中的膳食暴露风险评估分别由公式(1)、(2)计算得出。

国家估算每日摄入量(national estimates of daily intake, NEDI): $NEDI(mg) = \sum(STMR_i \times E_i \times P_i \times F_i)$ (1)

风险商(risk quotient, RQ): $RQ = NEDI / (ADI \times bw)$ (2)

式中: $F_i=0.0327$, 为我国一般人群对花生的日摄入量, kg; $STMR_i$ 为规范残留试验中值, mg/kg; E_i 和 P_i 分别为食品的可食部分因子和食品加工因子, 本文中不考虑区别, 均设 1; ADI 为每日允许摄入量, 引用我国国家相关标准的规定, mg/kg bw; bw 为体重, kg, 我国人均体重一般按 63 kg 计。当 $RQ > 1$ 时, 表示存在不可接受的风险, 数值越大, 风险越大; $RQ < 1$ 时, 表示风险为可接受, 数值越小, 风险越小。

3 结果与分析

3.1 仪器条件的优化

在电喷雾正离子模式下, 通过对 1 $\mu\text{g/mL}$ 的单个标准溶液做全扫描, 确定噻呋酰胺的分子离子, 并以其为母离子, 进行二级质谱扫描, 同时通过改变, 选定其响应突出且稳定的两个特征离子作为其子离子, 并再次对其特征离子的锥孔电压和碰撞能量进行优化。最终获得的质谱参数见表 1。

考虑到噻呋酰胺在乙腈溶液中有较强的溶解性和其在 pH 值为 5~9 时稳定, 试验尝试了乙腈-甲酸水溶液流动相体系的多种配比关系, 以调节目标物峰形。最终发现, 在流动相中加入少量甲酸, 甲酸的浓度以 0.1% 为宜, 且当流动相流速为 0.20 mL/min, 流动相比比为乙腈+0.1% 甲酸水(90:10, V:V)时, 目标化合物的出峰时间和峰形均能达到理想效果。

3.2 检测器的选择

试验对比了气相色谱电子捕获检测器(μ -ECD)和超高效液相色谱-串联质谱联用仪(UPLC/MS/MS)对试验样品的影响。结果发现, 检测器的选择对花生仁样品的检测效果有较大的影响。由图 1~2 可以看出, 在同一添加浓度, 同一前处理条件[气相检测时, 用正己烷+丙酮(95:5, V:V)定容]下, 用气相色谱电子捕获检测器分析, 目标物附近有很

大的杂质干扰, 即使通过冷藏分离过滤, 分析效果依然较差, 而当使用 UPLC/MS/MS, 检测器的超强选择性能直接去除基质干扰, 而且目标物峰形尖锐、对称。因而本实验选择用 UPLC/MS/MS 作为最终检测手段。

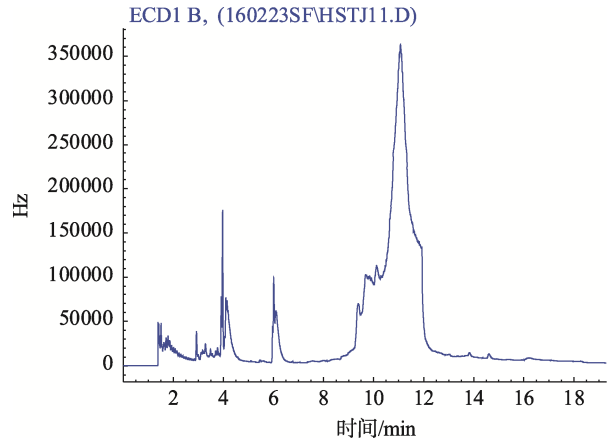


图 1 花生仁中噻呋酰胺添加(气相色谱仪)(μ -ECD)
Fig.1 Recoveries of thifluzamide in peanut kernel (GC) (μ -ECD)

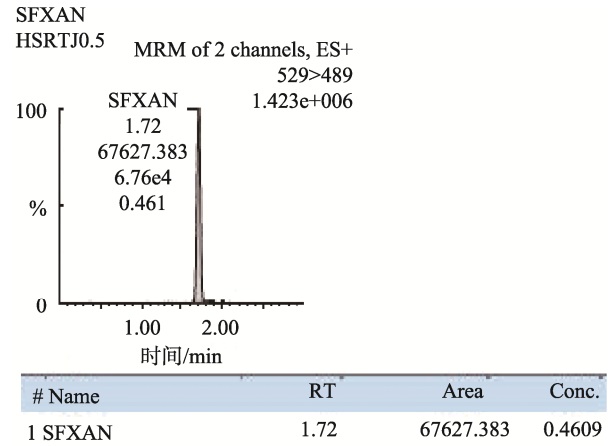


图 2 花生仁中噻呋酰胺添加(超高效液相色谱-串联质谱联用仪)
Fig.2 Recoveries of thifluzamide in peanut kernel(UPLC-MS/MS)

3.3 样品前处理条件的优化

3.3.1 提取溶剂的选择

根据研究对象样品的基质特点, 研究了乙腈、甲醇和它们与水及含酸水的提取效果, 考虑到水的介入会增加后续的处理难度, 实验重点研究了乙腈、乙腈水和甲醇的提取效果, 结果发现乙腈水的提取效果最高, 甲醇的提取率不能满足农残检测要求。故本实验最终选择乙腈水为提取溶剂。

3.3.2 净化方式的选择

实验根据文献参考和对新型固相萃取柱的开发应用, 比较了弗罗里硅土柱、ENVI-carb 柱和石墨化碳氨基柱及 QuEChERS 方法的净化效果。对于气相检测, 各净化方式均不能有效去除基质对花生仁样品检测结果的干扰,

UPLC-MS/MS 检测结果发现使用石墨化碳氨基柱和 QuEChERS 方法的净化回收率高, 且基质效应较低, 但前者使用费用和花费时间成本明显高于后者, 因而本实验最终选用 QuEChERS 方法净化。

3.4 方法的线性、灵敏度、准确度和精密度

考虑到基质效应对检测效果的影响和仪器检测的响应值范围, 本实验以噻呋酰胺的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制了基质匹配标准工作溶液的标准曲线, 线性方程和相关系数, 见表 2。结果表明, 噻呋酰胺在 1~5000 μg/L 的浓度范围内, 线性关系良好, 相关系数在 0.9998 和 1 之间。噻呋酰胺在 1(或 5)、500 和 2000 μg/kg 3 个添加浓度(花生壳和土壤样品定量限为 1 μg/kg, 植株

和花生仁样品定量限为 5 μg/kg), 按照上述提取、净化和测定方法, 做 5 个平行测定样品, 其在相应花生基质中的回收率和相对标准偏差(RSD)见表 3。噻呋酰胺在花生中的回收率在 75.5%~107.9%之间, 相对标准偏差不大于 10%。按 10 倍信噪比计算, 方法定量限可达到 1 μg/kg, 满足多残留分析的要求。

3.5 膳食风险评估

根据我国国家相关标准的规定, 噻呋酰胺人体每千克体重每日允许摄入量(ADI)为 0.014 mg, 我国人均膳食结构中花生(植物油)每日摄入量一般为 0.0327 kg。由膳食暴露风险评估公式得出, 噻呋酰胺的最大风险商为 0.0013, 如表 4, 处于极低的水平, 无明显膳食风险。

表 2 噻呋酰胺的标准曲线、相关系数
Table 2 Calibrations, correlation coefficients of thifluzamide

名称	线性范围/(μg/L)	基质	标准曲线	相关系数(r)	定量限/(μg/kg)
噻呋酰胺	1~2000	土壤	Y=2588227.0864X-15876.3282	0.9998	1
	1~4000	花生壳	Y=1181333.2051X+8542.8170	0.9998	1
	5~5000	花生植株	Y=1341944.4851X+98.4811	1	5
	5~1000	花生仁	Y=105446.2420X-291.7826	0.9999	5

表 3 噻呋酰胺的回收率及相对标准偏差
Table 3 Recoveries and the relative standard deviations of thifluzamide

名称	基质	添加浓度/(μg/kg)	回收率/%					RSD/%
噻呋酰胺	土壤	1	94.0	93.1	98.3	93.1	97.9	2.7
		500	89.4	91.0	94.8	95.5	85.4	4.5
		2000	89.2	90.0	86.4	87.1	91.8	2.5
	花生壳	1	99.9	96.9	99.0	98.8	91.0	3.7
		500	87.6	86.6	86.7	85.8	87.3	0.8
		2000	96.4	99.4	99.2	99.6	95.4	2.0
	花生植株	5	92.8	85.0	94.4	88.8	92.9	4.2
		500	95.4	89.4	91.0	92.5	91.9	2.4
		2000	80.6	77.0	75.5	77.6	78.8	2.4
	花生仁	5	92.5	90.7	85.7	85.7	85.6	3.8
		500	92.1	100.0	97.2	105.3	88.2	6.9
		2000	107.9	94.5	93.0	107.6	103.8	7.0

表 4 噻呋酰胺在花生中的膳食风险
Table 4 Dietary risk assessment of thifluzamide in peanut

施药剂量 (g a.i/ha)	施药次数	取样间隔 /d	残留中值 /(mg/kg)	风险商
150	1	14	0.023	0.0009
		21	0.034	0.0013
		28	0.021	0.0008
	2	14	0.020	0.0007
		21	0.030	0.0011
		28	0.018	0.0007

续表 4

施药剂量 (g a.i/ha)	施药次数	取样间隔 /d	残留中值 /(mg/kg)	风险商
225	1	14	0.025	0.0009
		21	0.013	0.0005
		28	0.011	0.0004
	2	14	0.030	0.0011
		21	0.014	0.0005
		28	0.025	0.0009

4 结 论

试验根据噻唑酰胺理化性质及样品基质特点,采用乙腈提取, QuEChERS 方法净化, 超高效液相色谱-串联质谱法测定, 建立了噻唑酰胺在花生样品中简便、快速、高灵敏度的电喷雾正离子检测方法。噻唑酰胺在花生中各基质样品 3 个添加浓度水平下的回收率在 75.5%和 107.9%之间, 相对标准偏差小于 10%。膳食风险评估结果表明, 240 g/L 噻唑酰胺悬浮剂, 150~225 g a.i/ha 在花生上用药 1 次, 采收间隔期 14、21、28 d, 最大风险商为 0.0013, 使用安全。该方法测定结果重现性好, 准确度、灵敏度和精密度均符合农药残留分析要求, 可用于花生各基质样品中噻唑酰胺残留量的测定, 亦可为其他样品中噻唑酰胺残留量的测定提供参考。

参考文献

- [1] 刘刚. 噻唑酰胺原药在我国的登记[J]. 农药市场信息, 2015, (22): 33.
Liu G. The registration of thifluzamide TC in China [J]. Pestic Market News, 2015, (22): 33.
- [2] GB 2763-2016 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763-2016 National food safety standard- Maximum residue limits of pesticides in food [S].
- [3] 食品中残留农业化学品肯定列表制度[Z].
Food residue agricultural chemicals in the affirmative list system [Z].
- [4] 秦旭, 孙扬, 徐应明, 等. 噻唑酰胺在马铃薯和土壤中检测方法及其残留动态研究[J]. 农业资源与环境学报, 2013, 30(6): 83-86.
Qin X, Sun Y, Xu YM, et al. Residue determination and degradation of thifluzamide in potato and soil [J]. J Agric Resour Environ, 2013, 30(6): 83-86.
- [5] 韦丽娜, 张静静, 汪芙蓉, 等. 水稻田样品中噻唑酰胺残留检测方法研究[J]. 农药学报, 2013, 15(3): 311-315.
Wei LN, Zhang JJ, Wang FR, et al. Study on determination of thifluzamide residues in rice [J]. Chin J Pestic Sci, 2013, 15(3): 311-315.
- [6] 吴厚斌, 王国联, 李国平, 等. 噻唑酰胺的气相色谱分析[J]. 农药科学与管理, 2006, (8): 1-3.
Wu HB, Wang GL, Li GP, et al. Determination of thifluzamide by GC [J]. Pestic Sci Admin, 2006, (8): 1-3.
- [7] 李金萍. 30%噻唑酰胺·咪鲜胺悬浮剂高效液相色谱分析[J]. 农药科学与管理, 2016, 37(5): 40-42.
Li JP. Determination of thifluzamide and prochloraz 30% SC by HPLC [J]. Pestic Sci Admin, 2016, 37(5): 40-42.
- [8] 陈颖, 甄子叶. 35%噻唑酰胺悬浮剂的高效液相色谱分析[J]. 现代农药, 2015, 14(4): 28-29.
Chen Y, Zhen ZY. Analysis of thifluzamide 35% SC by HPLC [J]. Mod Pest, 2015, 14(4): 28-29.
- [9] 郭利丰, 丁佩, 徐永. 噻唑酰胺原药的高效液相色谱分析[J]. 现代农药, 2014, 13(4): 28-29.
Guo LF, Ding P, Xu Y. Analysis of thifluzamide TC by HPLC [J]. Mod Pest, 2014, 13(4): 28-29.
- [10] 雷湖瑛, 屈飞艳, 石磊, 等. 噻唑酰胺·氟环唑 30%悬浮剂高效液相色谱分析[J]. 世界农药, 2015, 37(5): 40-42.
Lei SY, Qu FY, Shi L, et al. HPLC analysis research of thifluzamide·epoxiconazole 30% SC [J]. World Pest, 2015, 37(5): 40-42.
- [11] 单净宇, 孙俊, 遇璐, 等. 30%烯肟菌胺·噻唑酰胺悬浮剂高效液相色谱分析[J]. 农药, 2014, 53(5): 337-339.
Shan JY, Sun J, Yu L, et al. Analysis of fenaminstrobil-thifluzamide 30% SC by HPLC [J]. Agrochemicals, 2014, 53(5): 337-339.
- [12] 徐成辰, 唐慧敏, 杨淑娟. 噻唑·戊唑醇 300g/L 悬浮剂高效液相色谱分析[J]. 农药科学与管理, 2014, 35(3): 36-39.
Xu CC, Tang HM, Yang SX. Analytic method of thifluzamide-tebuconazole 300g/L SC by HPLC [J]. Pest Sci Admin, 2014, 35(3): 36-39.
- [13] 王珉, 朱传明. 24%噻唑酰胺悬浮剂的反相高效液相色谱测定[J]. 安徽化工, 2013, 39(6): 86-88.
Wang M, Zhu CM. Determination of 24% thifluzamide SC by RP-HPLC [J]. Anhui Chem Ind, 2013, 39(6): 86-88.
- [14] 段婷婷, 张盈, 魏进, 等. 超高效液相色谱-串联质谱快速检测精米、玉米与土豆样品中噻唑酰胺残留[J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 598-601.
Duan TT, Zhang Y, Wei J, et al. Determination of thifluzamide residues in rice, corn and potato using UPLC-MS/MS [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(5): 598-601.
- [15] 马琳, 陈建波, 赵莉, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中 6 种酰胺类农药残留量[J]. 色谱, 2015, 33(10): 1019-1025.
Ma L, Chen JB, Zhao L, et al. Determination of six amide pesticide residues in vegetables and fruits by solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2015, 33(10): 1019-1025.
- [16] Klittich CJ, Green FR, Ruiz JM, et al. Assessment of fungicide systemicity in wheat using LC-MS/MS [J]. Pest Manag Sci, 2008, 64(12): 1267-1277.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



李 辉, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农兽药残留检测及风险评估。
E-mail: lihui0092003@163.com



张玉婷, 硕士, 研究员, 主要研究农产品质量安全检测。
E-mail: yutingtj@163.com