

· 研究论文 ·

DOI: 10.16801/j.issn.1008-7303.2017.0085

液相色谱-串联质谱同时检测水稻样品中 乙基多杀菌素及其代谢物残留

傅 强^{*1}, 黄颖婕², 付启明¹, 梁 骥¹, 马 婧¹, 冯 雪¹, 李双双³

(1. 湖南化工研究院 国家农药创制工程技术研究中心 湖南加法检测有限公司, 长沙 410014;

2. 湖南师范大学附属中学, 长沙 410006; 3. 湖南人文科技学院, 湖南 娄底 417000)

摘 要: 采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 技术建立了同时检测水稻植株、谷壳、糙米中乙基多杀菌素及其代谢物 *N*-demethyl-175-J 和 *N*-formyl-175-J 残留的分析方法。样品采用乙腈提取, 经分散固相萃取 (PSA) 净化, LC-MS/MS 检测。结果表明: 在 0.02、0.2 和 2 mg/kg 添加水平下, 乙基多杀菌素及其代谢物的平均回收率在 73%~105% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 在 0.9%~10% 之间。乙基多杀菌素-J 和-L 的定量限 (LOQ) 分别 0.016 和 0.004 mg/kg, 代谢物的定量限 (LOQ) 为 0.02 mg/kg。该方法操作简便、稳定和快速, 可以满足水稻样品中乙基多杀菌素及其代谢物的定性定量分析要求。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 水稻; 乙基多杀菌素; 代谢物; 残留

中图分类号: S482.2; TQ450.263

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2017)05-0631-07

Simultaneous determination of spinetoram and its metabolites in rice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

FU Qiang^{*1}, HUANG Yingjie², FU Qiming¹, LIANG Ji¹, MA Jing¹,
FENG Xue¹, LI Shuangshuang³

(1. National Engineering Center for Agrochemicals, Hunan Research Institute of Chemical Industry, Hunan J&F Test Co., Ltd. Changsha 410014, Hunan Province, China; 2. The High School Attached to Hunan Normal University, Changsha 410006, Hunan Province, China;

3. Hunan University of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, Hunan Province, China)

Abstract: A method was developed for simultaneous determination of spinetoram and its metabolites residues in rice samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Samples were extracted with acetonitrile. After clean up with PSA, the analyte was analyzed using LC-MS/MS. The results showed that the average recoveries varied from 73% to 105% at spiked levels of 0.02, 0.2 and 2 mg/kg for all the analyte. The relative standard deviations (RSD) varied from 0.9% to 10%. The limits of quantification (LOQ) (based on the recovery test) of spinetoram-J and spinetoram-L were 0.016 mg/kg and 0.004 mg/kg, respectively. The LOQ of spinetoram's metabolites were 0.02 mg/kg. As the method developed in this work is convenient, rapid and reliable, it can be applied in the qualitative and quantitative analyses of residues of spinetoram and its metabolite in rice samples.

收稿日期: 2017-06-16; 录用日期: 2017-09-07.

基金项目: 农业部农药残留安全评价项目 (2014P043).

作者简介: *傅强, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事农药残留方面研究, E-mail: fuqiang0410@163.com

Keywords: liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS); rice; spinetoram; metabolite; residue

乙基多杀菌素 (spinetoram) 是由美国陶氏益农公司研发的一种新型多杀菌素^[1], 原药的有效成分为乙基多杀菌素-J (代号为 XDE-175-J) 和乙基多杀菌素-L (代号为 XDE-175-L) 的混合物 (结构式见图式 1)。乙基多杀菌素具有胃毒和触杀作用, 主要用于防治鳞翅目害虫 (小菜蛾、甜菜夜蛾) 及缨翅目害虫 (蓟马) 等, 在中国该药已在甘蓝、黄瓜、茄子、水稻、杨梅和豇豆上获准登记使用, 并已制定了稻谷、糙米、结球甘蓝、茄子、豇豆上的临时最大残留限量^[2], 其中稻谷为 0.5 mg/kg, 糙米为 0.2 mg/kg。

根据农药残留联席会议 (JMPR) 报告报道^[3], 乙基多杀菌素的膳食风险评估残留定义为乙基多杀菌素-J、乙基多杀菌素-L 及其主要代谢物 *N*-demethyl-175-J 和 *N*-formyl-175-J (代谢物折算后以乙基多杀菌素母体表示, 其结构见图式 1); 乙基多杀菌素的监测评估残留定义为乙基多杀菌素母体。

在 JMPR 报告中, 植物源样品中的乙基多杀菌素采用乙腈和水的混合溶液提取, C₁₈ 固相萃取柱净化, 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 检测, 内标法定量^[3]。目前, 关于乙基多杀菌素在环境中的残留分析方法主要有液相色谱法^[4-7]和 LC-

MS/MS 法^[8-9], 但这些分析方法均只是检测了乙基多杀菌素母体, 未见有关其代谢物的残留分析报告。鉴于此, 本研究采用 LC-MS/MS 分析方法, 同时检测水稻样品中乙基多杀菌素及其代谢物残留情况, 旨在为中国制定乙基多杀菌素在谷物类作物中的 MRL 值提供分析方法, 也为进一步探究乙基多杀菌素及其代谢物对非靶标生物的毒性效应提供参考。

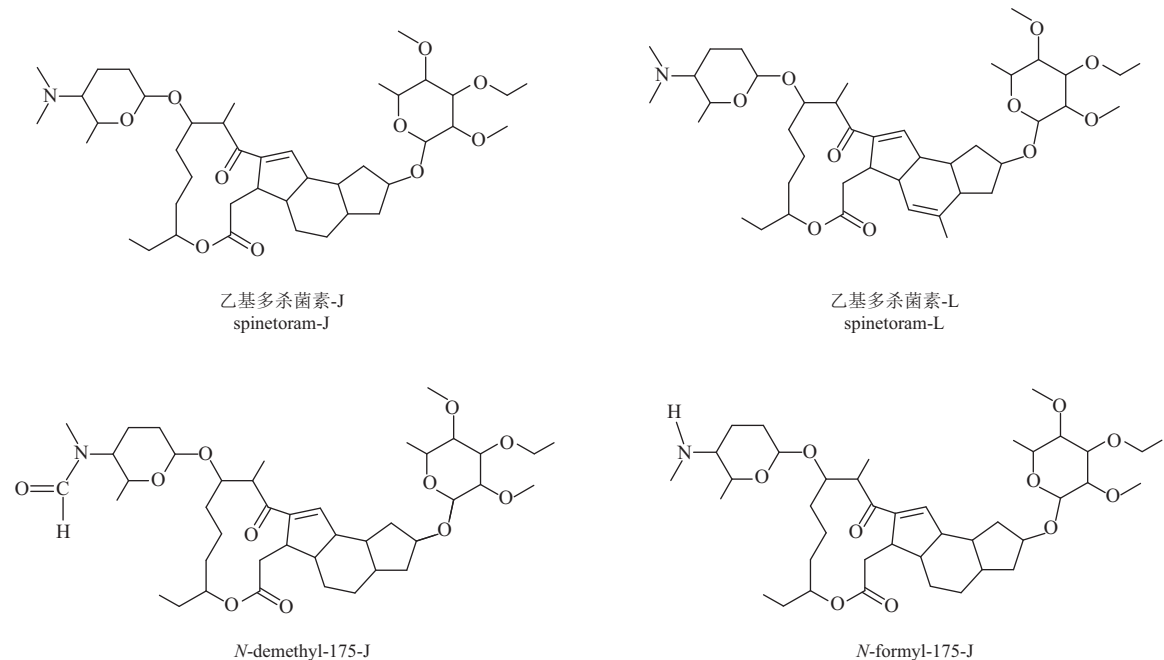
1 材料与方法

1.1 主要仪器

Agilent1290-6460 高效液相色谱-三重四极杆质谱仪 (LC-MS /MS) (美国安捷伦公司); Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm, 美国 Agilent 公司); AL204 型电子天平 (瑞士梅特勒·托利多仪器有限公司); Sartorius BL310 型电子天平 (德国赛多利斯公司); HY-B1 型回旋振荡器 (江苏省金坛市医疗仪器厂); VORTEX-5 涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); ZONKIA SC-3614 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 药剂与试剂

40% 氟啶虫胺腈·乙基多杀菌素水分散粒剂、



图式 1 乙基多杀菌素及其主要代谢物结构式

Scheme 1 Structural formula of spinetoram’s major metabolites

96.7% 的乙基多杀菌素 (spinetoram) 标准品 (其中乙基多杀菌素-J 76.7% 和乙基多杀菌素-L 20%)、98% 的 *N*-Formyl-175-J 标准品和 99% 的 *N*-Demethyl-175-J 标准品, 均由陶氏益农农业科技 (中国) 有限公司提供; 甲酸为质谱纯, 德国 CNW 公司; 甲醇和乙腈为色谱纯, 美国 Honeywell 公司; 无水硫酸镁为分析纯, 西陇化工股份有限公司; *N*-丙基乙二胺 (PSA), 美国 Welch Materials 公司。

1.3 样品提取与净化

称取适量待测样品 (糙米 5 g、谷壳 5 g、植株 5 g) 于 150 mL 具塞三角瓶中, 准确加入 40 mL 乙腈, 振荡 30 min, 静置 5 min; 取上清液 2 mL, 转入加有 0.1 g PSA 和 1.0 g 无水硫酸镁的离心管中, 涡旋 1 min, 于 4 000 r/min 下离心 5 min; 取上清液, 过 0.22 μm 有机膜, LC-MS/MS 待检测。

1.4 仪器分析条件

色谱条件: 流动相为 0.1% 甲酸乙腈溶液 (A) 和 0.1% 甲酸水溶液 (B), 流速 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 在第 4 min 时由体积分数 30% 的 A 直接增加至 90% 的 A, 保持 2 min, 在 6.01 min 时由 90% 的 A 回落至 30% 的 A, 保持 3 min。柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL 。

质谱条件: 多重反应监测 (MRM) 模式扫描, 电喷雾正离子源 (ESI⁺), 离子喷雾电压 3 500 V, 雾化气压力 103 kPa, 干燥气温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速 6 L/min。

1.5 标准溶液配制及标准工作曲线绘制

将乙基多杀菌素及其代谢物分别溶解于甲醇中, 配制成 500 mg/L 的各种母液, 再分别移取各种母液 1 mL 至 50 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配成 10 mg/L 的混合标准溶液, 然后用甲醇稀释成 1、5、10、50、100、500 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准工作溶液, 按 1.4 节的条件测定。以进样质量浓度为 x 轴、响应值为 y 轴绘制标准工作曲线, 外标法定量。

1.6 添加回收试验

向水稻植株、糙米及稻壳空白样品中分别添加 0.02、0.2 和 2.0 mg/kg 的乙基多杀菌素及其代谢物混合标准工作溶液 (其中, 乙基多杀菌素标准品中乙基多杀菌素-J 占 76.7%、乙基多杀菌素-L 占 20%, 若按照质量比 4:1 计算, 则当乙基多杀菌素添加水平为 0.02、0.2 和 2.0 mg/kg 时, 相当

于乙基多杀菌素-J 的添加水平为 0.016、0.16 和 1.6 mg/kg, 乙基多杀菌素-L 的添加水平为 0.004、0.04 和 0.4 mg/kg), 采用所建立的方法测定其添加回收率及相对标准偏差 (RSD)。每个添加水平重复 5 次, 同时设空白对照。

1.7 实际样品检测及残留量的计算

运用本研究中建立的 LC-MS/MS 分析方法, 对从大田试验中采集的水稻植株、糙米、稻壳样品中的乙基多杀菌素-J、乙基多杀菌素-L 及乙基多杀菌素代谢物的残留量进行检测。稻谷残留量数据根据糙米和谷壳质量比折算, 其中糙米以 77.6% 计算, 谷壳以 22.4% 计算, 再将两者相加即为稻谷残留量。

首先分别对代谢物 *N*-demethyl-175-J 和 *N*-formyl-175-J、母体乙基多杀菌素-J 和乙基多杀菌素-L 进行定量, 计算残留值, 然后根据代谢物 *N*-demethyl-175-J 和 *N*-formyl-175-J 与母体乙基多杀菌素-J 的相对分子质量的比 (分别为 1.019 和 0.981), 得出代谢物折算为母体的折算系数分别为 0.981 和 1.019, 最后以折算值和母体值之和表示为乙基多杀菌素残留量。

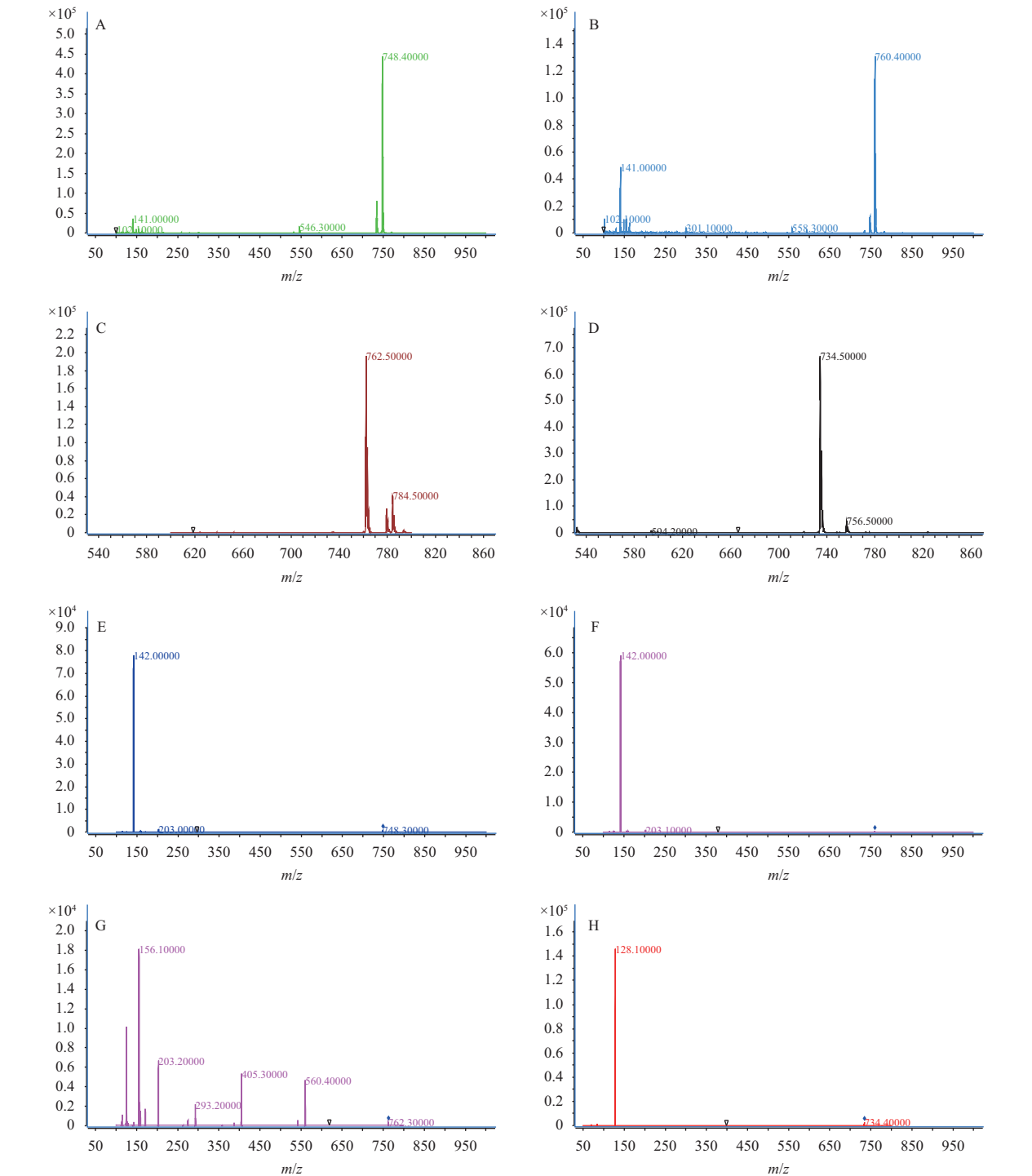
2 结果与分析

2.1 质谱条件的确定

分别取 1 mL 10 mg/L 的乙基多杀菌素、*N*-formyl-175-J 和 *N*-demethyl-175-J 标准工作液, 在正离子模式下进行母离子全扫描, 得到乙基多杀菌素-J 母离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 748.4) (图 1A) 和乙基多杀菌素-L 母离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 760.4) (图 1B), 以及 *N*-formyl-175-J 母离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 762.5) (图 1C) 和 *N*-demethyl-175-J 母离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 734.5) (图 1D)。对上述母离子施加不同的碰撞能量, 对产生的子离子进行全扫描, 得到相对丰度较高的乙基多杀菌素-J 子离子 $[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}]^+$ (m/z 142.0) 和 $[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_4]^+$ (m/z 203.0) (图 1E), 乙基多杀菌素-L 子离子 $[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}]^+$ (m/z 142.0) 和 $[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_4]^+$ (m/z 203.1) (图 1F), 以及 *N*-formyl-175-J 子离子 $[\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_2]^+$ (m/z 156.1) (图 1G) 和 *N*-demethyl-175-J 子离子 $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}]^+$ (m/z 128.1) (图 1H), 具体质谱检测参数见表 1。

2.2 吸附剂的优化

分别考察了不同质量的 PSA 对净化效果和回收率的影响。结果 (图 2) 表明: 选用 50、100 和



A. 乙基多杀菌素-J 的母离子; B. 乙基多杀菌素-L 的母离子; C. *N*-formyl-175-J 的母离子; D. *N*-demethyl-175-J 的母离子; E. 乙基多杀菌素-J 的子离子; F. 乙基多杀菌素-L 的子离子; G. *N*-formyl-175-J 的子离子; H. *N*-demethyl-175-J 的子离子

A. precursor ion of spinetoram-J; B. precursor ion of spinetoram-L; C. precursor ion of *N*-formyl-175-J; D. precursor ion of *N*-demethyl-175-J; E. product ion of spinetoram-J; F. product ion of spinetoram-L; G. product ion of *N*-formyl-175-J; H. product ion of *N*-demethyl-175-J.

图 1 乙基多杀菌素及代谢物的母离子和子离子全扫描质谱图

Fig. 1 Full scan MS spectra of precursor ions and product ions of spinetoram and its metabolites

200 mg PSA, 糙米、植株和谷壳 3 种基质中乙基多杀菌素及代谢物的回收率分别为 66%~86%、74%~100% 和 63%~80%。本研究最终选用 100 mg PSA。鉴于 3 种基质中乙基多杀菌素及代谢物均满足农药残留检测的要求^[10], 因此未进一步研究基质效应的影响。

2.2 方法的线性范围与检出限

在 1~500 μg/L 范围内, 乙基多杀菌素及其代

表 1 质谱多重反应监测参数

化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	母离子 Precursor ion, <i>m/z</i>	子离子 Product ion, <i>m/z</i>	锥孔电压 Cone voltage/V	碰撞能量 Collision energy/eV
<i>N</i> -demethyl-175-J	2.48	734.5	128.1	170	22
乙基多杀菌素-J spinetoram-J	2.54	748.4	142.0	170	32
			203.0	170	40
乙基多杀菌素-L spinetoram-L	2.71	760.4	142.0	170	34
			203.1		
<i>N</i> -formyl-175-J	4.68	762.5	156.1	130	12

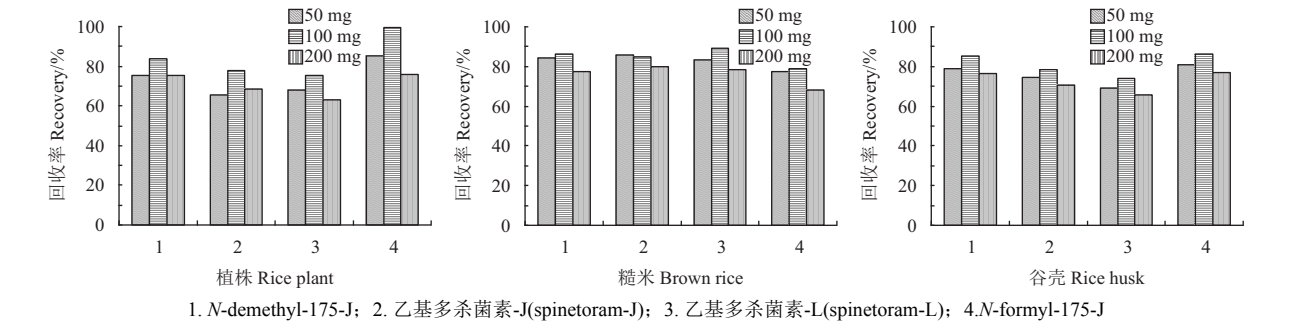


图 2 不同质量吸附剂 PSA 对净化效果的影响

Fig. 2 Influence of adsorbent in samples

谢物的进样质量浓度 (*x*) 与色谱峰面积 (*y*) 间线性关系良好, 决定系数 (*R*²) 在 0.999 1~0.999 8 之间 (表 2), 乙基多杀菌素-J 和-L 在检测样品中的 LOQ 分别 0.016 和 0.004 mg/kg, 代谢物的定量限 (LOQ) 均为 0.02 mg/kg。

2.3 添加回收试验结果

结果 (表 3) 显示: 乙基多杀菌素-J 在 0.016、0.16 和 1.6 mg/kg、乙基多杀菌素-L 在 0.004、0.04 和 0.4 mg/kg、代谢物在 0.02、0.2 和 2.0 mg/kg 添加水平下, 水稻植株、谷壳、糙米中乙基多杀菌素及代谢物的回收率在 73%~105% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 在 0.9%~10% 之间。表明方法的精密度和准确度均较好, 符合农药残留分析的要求^[12]。

表 2 乙基多杀菌素及代谢物的标准曲线方程和决定系数 (线性范围 1~500 μg/L)

Table 2 The standard curve and coefficient of determination of spinetoram and its metabolites at the concentrations ranged from 1 to 500 μg/L

化合物 Compound	标准曲线方程 Standard curve equation	决定系数, <i>R</i> ² Coefficient of determination
<i>N</i> -demethyl-175-J	<i>y</i> =611.911 <i>x</i> +412.299	0.999 8
乙基多杀菌素-J spinetoram-J	<i>y</i> =565.690 <i>x</i> +403.389	0.999 1
乙基多杀菌素-L spinetoram-L	<i>y</i> =151.900 <i>x</i> +39.373	0.999 7
<i>N</i> -formyl-175-J	<i>y</i> =49.586 <i>x</i> +31.461	0.999 5

植株添加的典型色谱图见图 3~图 5。

2.4 乙基多杀菌素及其代谢物在水稻样品中的残留量

依据 NY/T 788 《农药残留试验准则》^[10]和《农药登记残留田间试验标准操作规程》^[11], 分别以制剂量 300 g/hm² (有效成分 120 g/hm²) 和制剂量 450 g/hm² (有效成分 180 g/hm²) 各施药 1 次和 2 次, 施药间隔 7 d, 于最后一次施药后 14、21 d 采样, 测定其在水稻植株、谷壳和糙米中的最终残留量, 根据糙米和稻壳中的残留量计算稻谷中的残留量, 结果见表 4。

3 结论

运用分散固相净化-液相色谱-串联质谱技术, 建立了水稻植株、谷壳和糙米中同时检测乙基多杀菌素及其代谢物残留量的分析方法。样品用乙腈提取, 经 PSA 净化, LC-MS/MS 检测。在 0.02~2 mg/kg 添加水平下, 乙基多杀菌素及其代谢物残留量在水稻样品中的平均回收率在 73%~105% 之间, 相对标准偏差在 0.9%~10% 之间。该方法快速、简便、灵敏、高效, 可满足农药残留分析的要求, 同时实现了代谢物 *N*-demethyl-175-J 和 *N*-formyl-175-J 的定性与定量分析。

表 3 乙基多杀菌素及其代谢物在水稻样品中的添加回收率和相对标准偏差 (n = 5)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of spinetoram and its metabolites in rice samples at different spiked levels (n = 5)

化合物 Compound	添加水平 Spiked level/(mg/kg)	植株 Rice plant		谷壳 Rice husk		糙米 Brown rice	
		平均回收率 Average recovery/%	RSD/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD/%
N-demethyl-175-J	0.02	78	4.0	84	10	86	3.5
	0.2	80	1.0	86	4.2	85	8.2
	2	89	4.7	85	3.0	83	5.1
乙基多杀菌素-J spinetoram-J	0.016	73	0.9	76	4.5	86	5.6
	0.16	77	2.4	75	1.6	88	7.1
	1.6	79	3.5	78	2.1	78	3.1
乙基多杀菌素-L spinetoram-L	0.004	74	2.5	79	5.9	92	5.1
	0.04	73	2.4	74	1.4	91	6.0
	0.4	78	2.3	74	3.0	86	2.8
N-formyl-175-J	0.02	100	5.7	83	6.1	86	5.6
	0.2	105	3.8	93	3.2	82	6.7
	2	99	5.3	92	1.7	76	4.1

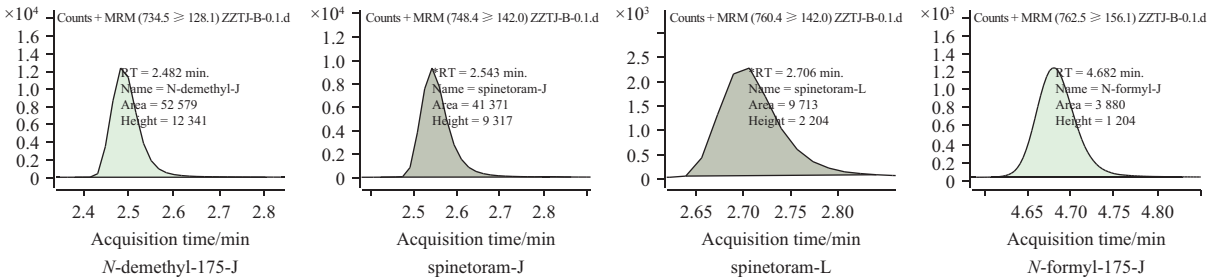


图 3 乙基多杀菌素及代谢物标准溶液 (0.1 mg/L) 的 MRM 质谱图

Fig. 3 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of standard solutions of spinetoram and its metabolites (0.1 mg/L).

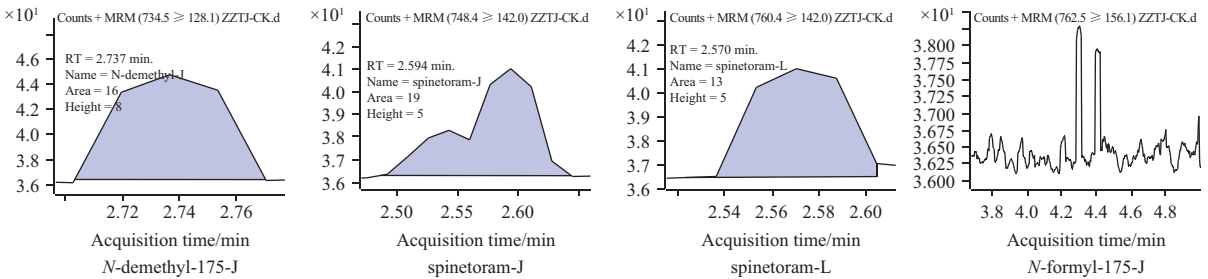


图 4 植株空白样品的 MRM 质谱图

Fig. 4 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of the blank sample of rice plant

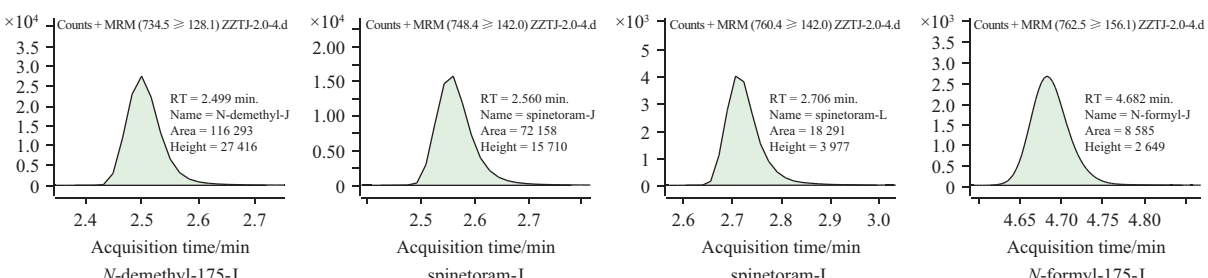


图 5 植株添加 (2 mg/kg) 样品的 MRM 质谱图

Fig. 5 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of spiked sample of rice plant(2 mg/kg)

表 4 乙基多杀菌素及其代谢物在水稻样品中的残留量

Table 4 Residues of spinetoram and its metabolites in rice samples

化合物 Compound	残留量 Residue/(mg/kg)			
	植株 Rice plant	谷壳 Rice husk	糙米 Brown rice	稻谷 Unhusked rice
<i>N</i> -demethyl-175-J	<0.02~0.152	<0.02~0.080 7	<0.02	<0.02~0.033 6
乙基多杀菌素-J spinetoram-J	<0.016~0.203	<0.016~0.134	<0.016	<0.016~0.042 4
乙基多杀菌素-L spinetoram-L	<0.004~0.019 6	<0.004~0.016 1	<0.004	<0.004~0.006 71
<i>N</i> -formyl-175-J	<0.02~0.185	<0.02~0.248	<0.02	<0.02~0.071 1
乙基多杀菌素 (合计) Sum of spinetoram	<0.06~0.556	<0.06~0.452	<0.06	<0.06~0.148

参考文献 (Reference):

[1] 武怀恒, 从胜波, 吕亮. 乙基多杀菌素对水稻蓊马的生物活性及对水稻的安全性[J]. 农药, 2016, 55(10): 767-770.
WU H H, CONG S B, LYU L. Toxicity of spinetoram against stenchaethrips biformis and its safety to rice[J]. Agrochemicals, 2016, 55(10): 767-770.

[2] 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
Maximum residue limits for pesticides in food: GB2763—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.

[3] JMPR. Spinetoram[R/OL]. (2012-09-20)[2016-02-06] http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report12/Spinetoram.pdf.

[4] 华乃震. 绿色环保生物杀虫剂多杀霉素和乙基多杀菌素的述评[J]. 农药, 2015, 54(1): 1-5.
HUA N Z. A review of green biological insecticide spinosad and spinetoram[J]. Agrochemicals, 2015, 54(1): 1-5.

[5] 陈国, 朱勇, 赵健, 等. 乙基多杀菌素在稻田水、土壤和水稻植株中的残留及消解动态[J]. 农药学报, 2014, 16(2): 153-158.
CHEN G, ZHU Y, ZHAO J, et al. Residue and decline dynamics of spinetoram in paddy water, soil and rice straw[J]. Chin J Pestic Sci, 2014, 16(2): 153-158.

[6] 吴琼, 李建国, 吕岱竹, 等. 超高效液相色谱法测定土壤中多杀菌素和乙基多杀菌素的残留[J]. 农药学报, 2015, 17(1): 111-114.
WU Q, LI J G, LV D Z, et al. Determination of spinosad and spinetoram residues in soil by ultra performance liquid chromatography (UPLC)[J]. Chin J Pestic Sci, 2015, 17(1): 111-114.

[7] 张晓燕, 邓树华, 黄卫, 等. 乙基多杀菌素的高效液相色谱测定[J]. 粮食科技与经济, 2013(1): 37-39.
ZHANG X Y, DENG S H, HUANG W, et al. Determination of Spinetoram with high-performance liquid chromatography[J]. Grain Sci Technol Econ, 2013(1): 37-39.

[8] LIU X, ABD EL-ATY A M, PARK J Y, et al. Determination of spinetoram in leafy vegetable crops using liquid chromatography and confirmation via tandem mass spectrometry[J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25(10): 1099-1106.

[9] MALHAT F M. Simultaneous determination of spinetoram residues in tomato by high performance liquid chromatography combined with QuEChERS method[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2013, 90(2): 222-226.

[10] 农药残留试验准则: NY/T 788—2004[S]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
Guideline on pesticide residue trials: NY/T 788—2004[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2004.

[11] 农业部农药检定所. 农药登记残留田间试验标准操作规程[M]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
Institute for the Control of Agrochemicals. Standard operating procedures on pesticide registration residue field trials[M]. Beijing: Standards Press of China, 2007.

[12] 朱国念. 农药残留快速检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
ZHU G N. Rapid detection of pesticide residues[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.

(责任编辑: 金淑惠)