

## 液相色谱-串联质谱法测定黄瓜和苹果中 氟啶虫酰胺及其代谢产物残留量

陈 国, 孙亚米, 杨 挺, 吴银良\*

(宁波市农业科学研究院, 浙江 宁波 315040)

**摘要:** 建立了黄瓜和苹果中氟啶虫酰胺及其3种代谢产物 [*N*-(4-三氟甲基烟酰基)甘氨酸(TFNG)、4-三氟甲基烟酸(TFNA)和4-三氟甲基烟酰胺(TFNA-AM)]同时测定的液相色谱-串联质谱分析方法。样品用磷酸盐缓冲液提取两次,调节pH值至1.5~2.0后,再用乙酸乙酯提取,液相色谱-串联质谱分析。采用Acquity BEH C<sub>18</sub>色谱柱分离,0.1%甲酸水-甲醇作为流动相进行梯度洗脱,电喷雾正离子(ESI+)模式电离,多反应监测(MRM)模式检测,外标法定量。氟啶虫酰胺、TFNG、TFNA和TFNA-AM的检出限分别为0.17、0.20、0.35和0.60 μg/kg。在黄瓜和苹果样品中添加5.0~2000 μg/kg水平的氟啶虫酰胺、TFNG、TFNA和TFNA-AM,其平均添加回收率在82.9%~104.1%范围内,批内分析相对标准偏差(RSD)在3.6%~6.9%之间。4种物质的峰面积与其浓度在0.50~200 μg/L范围内均呈良好的线性关系,线性回归系数均大于0.998。前处理步骤仅用有机溶剂6 mL。整个方法具有高灵敏度、准确、稳定的特点。

**关键词:** 液相色谱-串联质谱; 氟啶虫酰胺; 代谢产物; 残留分析; 黄瓜; 苹果

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)06-0555-05

## Simultaneous determination of flonicamid and its metabolites in cucumbers and apples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Guo, SUN Yami, YANG Ting, WU Yinliang\*

(Ningbo Academy of Agricultural Science, Ningbo 315040, China)

**Abstract:** A method was developed for the simultaneous determination of flonicamid and its metabolite [*N*-(4-trifluoromethylnicotinoyl) glycine (TFNG), 4-trifluoromethylnicotinic acid (TFNA) and 4-trifluoromethylnicotinamide (TFNA-AM)] in cucumbers and apples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with liquid-liquid extraction. The sample was extracted twice with phosphate buffer solution (pH 7.0), and the extract was adjusted to pH 1.5-2.0, then an aliquot of the extract (3 mL) was extracted with ethyl acetate. The final extract was dried under nitrogen and the residue was dissolved in 0.1% formic acid in water/methanol (80/20, v/v). The sample was analyzed by LC-MS/MS and quantified with the external standard calibration curve method. The detection limits of flonicamid, TFNG, TFNA and TFNA-AM were 0.17, 0.20, 0.35 and 0.60 μg/kg, respectively. The average recoveries of flonicamid and its metabolites in cucumbers and apples were 82.9% - 104.1%. In the intra-assay, the relative standard deviations were 3.6% - 6.9% at the spiked levels of 5.0 - 2000 μg/kg. There were good linear correlations (the calibration coefficients were above 0.998) between the peak areas and the concentrations of flonicamid and its metabolites in the range of 0.5 - 200 μg/L. The volume of organic solvent used in the whole pretreatment procedure was only 6 mL. The method is accurate, highly sensitive and stable for the determination of flonicamid and its metabolites.

\* 通讯联系人: 吴银良, 博士, 高级工程师, 研究方向为农兽药残留分析。Tel: (0574) 87928060, E-mail: wupaddyfield@tom.com.  
基金项目: 宁波市自然科学基金项目(No. 2009A610183)和宁波市农业攻关项目(No. 2010C10029和2010C10026)。  
收稿日期: 2012-01-20

**Key words:** liquid chromatography-tandem mass spectrometry ( LC-MS/MS ); flonicamid; metabolite; residue analysis; cucumbers; apples

氟啶虫酰胺( flonicamid) 是由日本石原产业株式会社研制的一种新型杀虫剂,主要用于棉花、葫芦、水果、蔬菜、马铃薯、梨果和核果的种植上,低剂量即能有效控制蚜虫、粉虱、牧草虫和臭虫,其作用机理独特,对蚜虫等吮吸害虫有很好的神经作用和快速拒食活性,目前为止还未发现与其他活性组分相抵抗<sup>[1-2]</sup>。该药已于 2007 年在中国获得临时登记,批准用于马铃薯、黄瓜和苹果中防治蚜虫。为了保护公众健康,欧盟已制定了食品中氟啶虫酰胺最高残留量( MRL) 为 0.02 ~ 2.0 mg/kg,以亲体、N-(4-三氟甲氧基吡啶基)甘氨酸( TFNG) 和 4-三氟甲氧基吡啶基烟酸( TFNA) 的总和计算<sup>[3]</sup>。但已建立的有关氟啶虫酰胺残留量的分析方法中,涉及亲体和代谢产物同时分析的较少,因此有必要开展氟啶虫酰胺及其代谢产物同时测定的分析方法研究。

目前对于蔬菜和水果中氟啶虫酰胺及其代谢物残留的分析方法较少,所用方法仅有气相色谱法<sup>[4]</sup>、液相色谱法<sup>[5]</sup>和液相色谱-串联质谱法( LC-MS/MS) <sup>[6-8]</sup>。其中 Hengel 等<sup>[6]</sup>建立的固相萃取和液-液萃取相结合的前处理净化方法,整个过程非常复杂,并且分析时必须采用亲水相互作用色谱柱; Xu 等<sup>[8]</sup>建立的 QuEChERS 净化方法简单快速,提取时采用乙腈提取。目前国内还暂未见有关氟啶虫酰胺和代谢产物同时分析的报道。考虑到目前农药残留越来越多采用 LC-MS/MS 分析<sup>[9-14]</sup>结合氟啶虫酰胺和 3 种代谢产物的化学性质,为了减少有机溶剂的用量,本文建立了缓冲溶液提取/液-液萃取净化相结合的前处理方法和 LC-MS/MS 分析方法,前处理步骤仅用有机溶剂 6 mL。整个方法具有高灵敏度、准确、稳定的特点。

表 1 氟啶虫酰胺及其代谢产物的分子式、定性和定量离子对、锥孔电压及碰撞能量

Table 1 Formulas, qualitative and quantitative ion pairs, cone voltages and collision energies of flonicamid and its metabolites

Pesticide	Formula	Qualitative and quantitative ion pairs ( <i>m/z</i> )	Cone voltage/V	Collision energy/eV
Flonicamid	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	229.98/202.87 <sup>*</sup> , 229.98/147.80	26, 16	30
TFNG	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	249.00/202.91 <sup>*</sup> , 249.00/147.86	29, 18	32
TFNA	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	191.88/78.79, 191.88/97.86 <sup>*</sup>	30, 26	40
TFNA-AM	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	190.94/78.85, 190.94/97.87 <sup>*</sup>	30, 26	34

\* Quantitative ion pair.

### 1.3 样品处理

称取 5 g 试样于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 磷酸盐缓冲液,以 10 000 r/min 速率匀质 1 min,布氏漏斗抽滤,用 5 mL 磷酸盐缓冲液洗涤残渣,收集

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters UPLC Xevo™ TQ MS 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司),配置电喷雾离子(ESI)源; Ultra-Tyrax T25 型匀质器(德国 IKA 公司)。

氟啶虫酰胺标准品(纯度为 98.0%, Dr. Ehrenstorfer 公司); TFNA、TFNG 和 4-三氟甲氧基吡啶基烟酰胺( TFNA-AM) 标准品(纯度分别为 94.9%、99.4% 和 97.9%, Hayashi Pure Chemical Ind. Ltd.)。甲醇( Merck 公司)和甲酸( Tedia 公司)均为色谱纯;乙酸乙酯、二水合磷酸二氢钠和氢氧化钠均为分析纯(上海化学试剂公司)。

0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液( pH 7.0) 的配制:称取 15.6 g 磷酸二氢钠于 1 000 mL 容量瓶中,加水溶解并定容至刻度(用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0)。

### 1.2 色谱-质谱条件

色谱柱: Acquity BEH C<sub>18</sub> 柱( 100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)。流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为甲醇。梯度洗脱条件: B 相在 0.5 min 内保持 15%; 然后在 2.0 min 内线性增加到 60%, 保持 2.0 min; 在 0.1 min 内降至 20%, 保持 1.4 min。流速 0.2 mL/min。进样量: 10 μL。

ESI 源正离子模式电离; 多反应监测( MRM) 模式扫描; 毛细管电压: 2.2 kV; 萃取锥孔电压: 20 V; 射频( RF) 透镜电压: 0.5 V; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气温度: 500 °C; 锥孔气流速: 50 L/h; 脱溶剂气流速: 1 000 L/h; 倍增器电压: 650 V; 二级碰撞气: 氩气; 其他条件详见表 1。

提取液,用甲酸调节 pH 至 1.5 ~ 2.0,再用纯水定容至 30 mL。取提取液 3 mL 置于 10 mL 离心管中,用 6 mL 乙酸乙酯分两次萃取,每次 3 mL。合并萃取液,在 40 °C 水浴中氮吹至近干,加入 0.5 mL

0.1% 甲酸水溶液-甲醇(80:20, v/v), 混匀后过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜供 LC-MS/MS 分析。

#### 1.4 标准曲线的绘制

准确称取氟啶虫酰胺和 3 种代谢产物标准品各 10.0 mg 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 得到均为 100 mg/L 的单标准储备液。准确吸取各标准储备液 10 mL 于同一 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容得 10 mg/L 混合标准中间工作液。用 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(80:20, v/v) 稀释上述混合标准中间工作液, 配制 0.5、2.5、10、50、100 和 200  $\mu\text{g/L}$  系列混合标准工作液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反相液相色谱条件的选择

氟啶虫酰胺和 3 种代谢产物均含有氨基或羧基基团(见图 1), 在 ESI 正离子模式条件下易质子化, 于是采用“T”三通方式, 利用 IntelliStart 软件获得 4 种化合物的定性和定量离子对以及锥孔电压等质谱分析参数, 详见表 1。

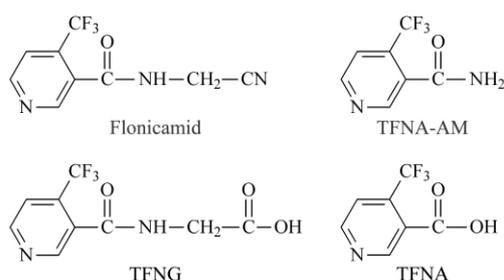


图 1 氟啶虫酰胺及其代谢产物的化学结构式

Fig. 1 Molecular structures of flonicamid and its metabolites

采用反相液相色谱-串联质谱分析氟啶虫酰胺亲体残留量, 无论有机相是甲醇还是乙腈, 对分析结果影响差异较小; 但同时测定氟啶虫酰胺和 3 种代谢产物时, Hengel 等<sup>[6]</sup>发现当以乙腈作为有机相, 4 种化合物无法在同一色谱条件下获得满意的结果, 于是改用亲水相互作用色谱柱进行分析。为了能在反相液相色谱条件下 4 种化合物均能获得满意的分析结果, 我们分别利用乙腈和甲醇作为有机相对标准溶液进行了分析, 发现以乙腈作为有机相时, 氟啶虫酰胺和 TFNG 的灵敏度和重复性相对较好, 但 TFNA 和 TFNA-AM 的灵敏度和重复性非常差; 而以甲醇作为有机相时, 4 种化合物的灵敏度和重复性均较好。在 1.2 节条件下, 获得的标准溶液、空白样品和添加样品的图谱见图 2。从图 2 可知 4 种化合物峰形较好, 出峰处均无明显的杂质干扰。

### 2.2 提取和净化条件的选择

乙腈和乙腈-水(50:50, v/v) 等曾被用于对氟啶虫酰胺及其代谢产物的提取<sup>[6,8]</sup>。为了减少溶剂的使用量, 考虑到氟啶虫酰胺及其代谢产物的极性较强, 本实验尝试用磷酸盐缓冲液进行提取。通过添加回收率试验(1.0 mg/kg) 比较了磷酸盐缓冲液浓度和 pH 值对 4 种化合物在黄瓜样品中的提取效果, 结果见图 3。从图 3 可知, 磷酸盐缓冲液浓度在 0.025~0.15 mol/L 范围内对 4 种化合物的回收率影响较小; pH 值对 4 种化合物的提取效果影响较大, 当 pH 值为 7 和 8 时各化合物的回收率较好。故实验选择在 pH 7 的 0.10 mol/L 磷酸盐缓冲液下进行。

由于氟啶虫酰胺及其代谢产物的极性较强, 提取后的溶液直接过 HLB 小柱时, 除亲体外, 代谢产物的回收率均小于 40%。因 4 种化合物的酸碱性差异较大, 无法采用离子交换固相萃取净化获得满意的回收率。Hengel 等<sup>[6]</sup>曾利用乙酸乙酯萃取乙腈-水(20:80, v/v) 混合溶液中的氟啶虫酰胺和代谢产物, 但处理一个样品的乙酸乙酯用量达到了 80 mL。为了减少有机溶剂用量, 在黄瓜空白样品提取液中添加适量的标准溶液(使其质量浓度为 100  $\mu\text{g/L}$ ) 后调 pH 值, 然后采用 6 mL 乙酸乙酯对 3 mL 该提取液进行两次提取, 考察提取液的 pH 值对回收率的影响, 结果见图 4。从图 4 中可知, pH 值对氟啶虫酰胺和 TFNA-AM 的回收率影响不大, TFNG 和 TFNA 的回收率随 pH 值的升高呈下降趋势。因此本实验将提取后溶液的 pH 值调节至 1.5~2 进行。

在上述优化后的实验条件下, 比较了 2.5 和 10  $\mu\text{g/L}$  标准溶液和两种基质(黄瓜和苹果) 校准溶液的定量离子对峰面积, 未发现明显的基质效应。

### 2.3 线性关系

分别对 0.5、2.5、10、50、100 和 200  $\mu\text{g/L}$  氟啶虫酰胺及其代谢产物的混合标准工作液进行 LC-MS/MS 测定, 每个浓度水平样品测定 3 次, 以标准溶液的质量浓度  $x$  ( $\mu\text{g/L}$ ) 为横坐标, 定量离子对峰面积  $y$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到的标准曲线方程分别为  $y = 4875.2x + 387$  (氟啶虫酰胺),  $y = 4623.7x + 477$  (TFNG),  $y = 4417.8x + 812$  (TFNA) 和  $y = 3574.1x + 527$  (TFNA-AM), 相关系数 ( $r$ ) 均高于 0.998, 说明本方法适用于氟啶虫酰胺和代谢产物的定量分析。

### 2.4 方法的检出限、回收率和精密度

欧盟规定黄瓜和苹果中氟啶虫酰胺残留限量分别为 50 和 200  $\mu\text{g/kg}$ , 因此确定进行 5.0、50 和 500

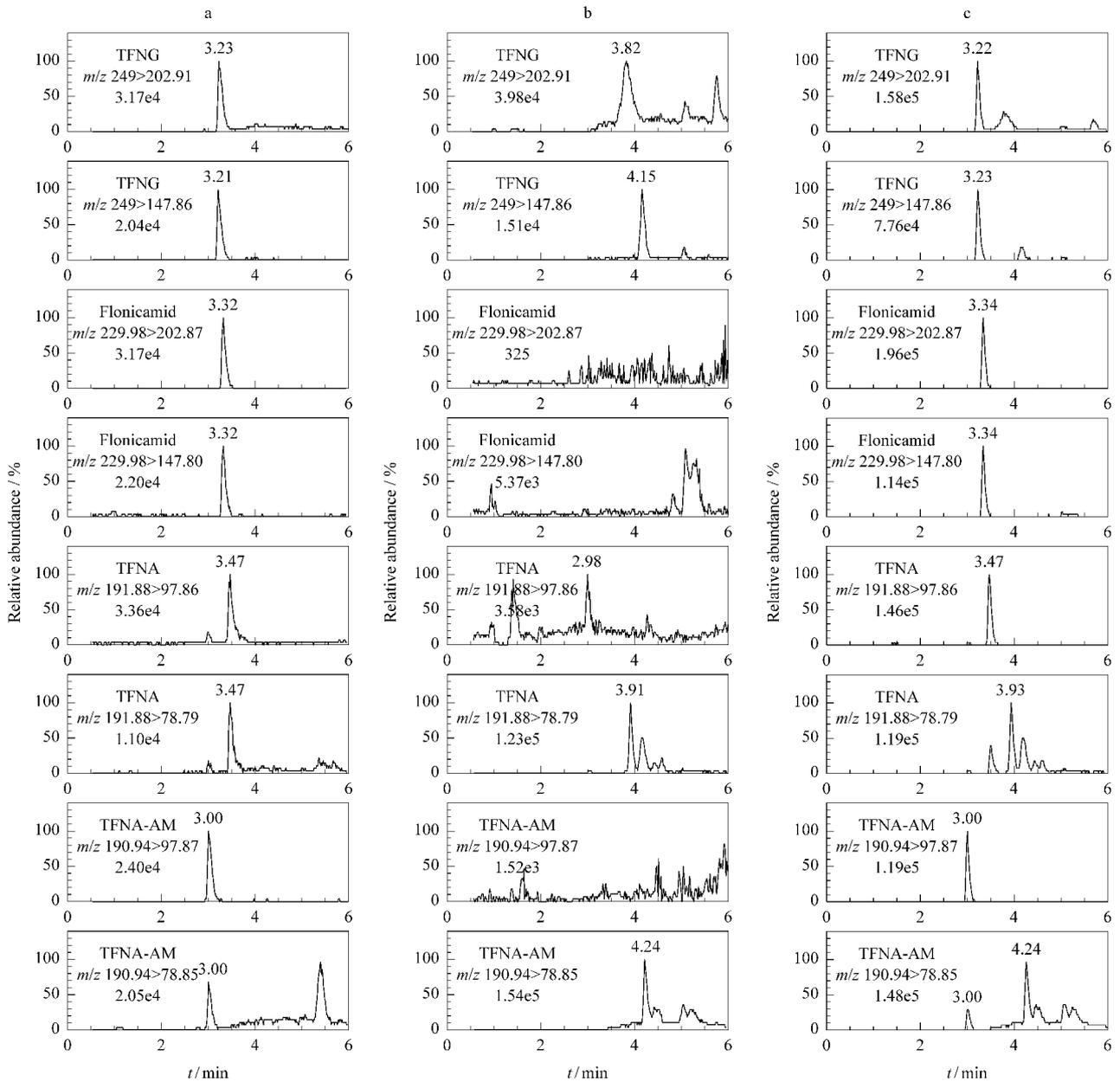


图 2 (a) 氟啶虫酰胺及其代谢产物标准溶液 (0.50  $\mu\text{g/L}$ )、(b) 黄瓜空白样品、(c) 黄瓜加标样品 (5.0  $\mu\text{g/kg}$ ) 的色谱图  
 Fig. 2 Chromatograms of (a) flonicamid and its metabolite standard solution (0.50  $\mu\text{g/L}$ ), (b) a blank cucumber sample, and (c) a cucumber sample spiked with standards (5.0  $\mu\text{g/kg}$ )

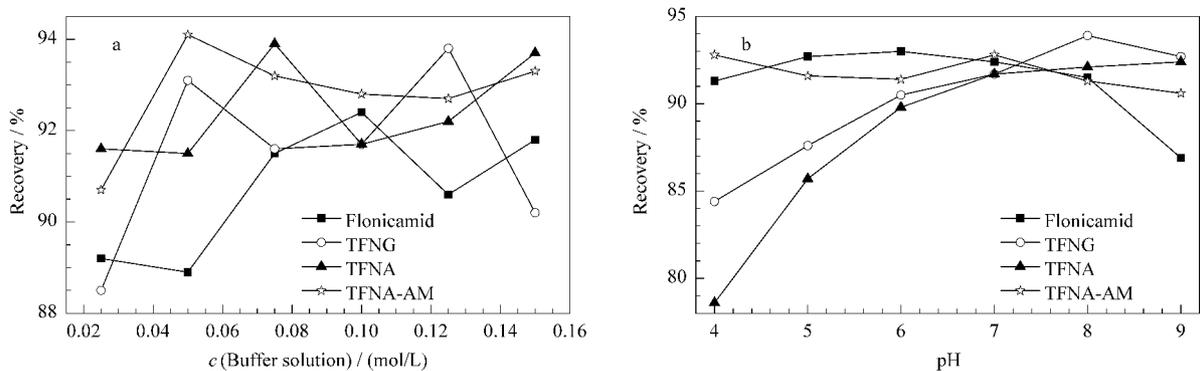


图 3 (a) 磷酸盐缓冲溶液浓度和 (b) pH 值对黄瓜样品中氟啶虫酰胺及其代谢物提取效果的影响 (添加水平为 1.0  $\text{mg/kg}$ )  
 Fig. 3 Effects of (a) concentration and (b) pH of phosphate buffer on extraction recoveries of flonicamid and its metabolites at a fortified level of 1.0  $\text{mg/kg}$  in a cucumber sample

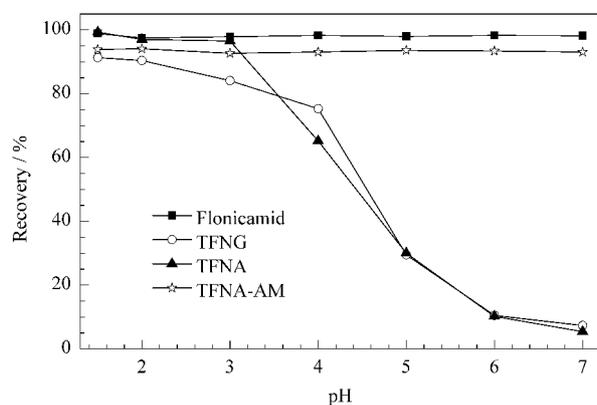


图4 黄瓜样品提取液的pH值对氟啶虫酰胺及其代谢产物回收率的影响(添加水平均为100 μg/L)

Fig. 4 Effects of pH value of cucumber sample extract on recoveries of flonicamid and its metabolites at a spiked level of 100 μg/L

表2 黄瓜和苹果中氟啶虫酰胺和代谢产物的加标回收率( $n=6$ )

Table 2 Recoveries (mean ± SD) of flonicamid and its metabolites spiked in cucumber and apple samples ( $n=6$ )

Sample	Spiked/(μg/kg)	Recovery / %			
		Flonicamid	TFNA	TFNG	TFNA-AM
Cucumber	5.0	87.2 ± 4.1	93.1 ± 3.7	86.6 ± 4.6	84.1 ± 4.8
	50	92.7 ± 3.3	90.8 ± 4.0	88.5 ± 3.8	82.9 ± 5.7
	500	92.4 ± 5.2	89.3 ± 3.9	91.4 ± 4.6	86.0 ± 4.3
Apple	5.0	96.3 ± 6.2	90.8 ± 4.4	102.5 ± 5.7	89.1 ± 4.2
	20	93.3 ± 4.7	95.8 ± 5.3	98.1 ± 5.0	87.3 ± 3.7
	200	88.1 ± 3.9	92.7 ± 4.2	104.1 ± 5.6	84.9 ± 4.6
	2000	94.5 ± 4.8	91.6 ± 5.0	93.7 ± 4.5	88.5 ± 5.2

## 2.5 方法应用

利用该方法测定了购于超市的27个样品(15个黄瓜和12个苹果)均未检出氟啶虫酰胺和代谢产物残留。

## 3 结论

本文采用液相色谱-串联质谱技术建立了黄瓜和苹果中氟啶虫酰胺及其代谢产物的分析方法。该方法前处理具有相对快速、简单和有机溶剂用量少的特点。同时整个方法具有选择性好、灵敏度高的特点。方法检出限在0.17~0.60 μg/kg之间,能够满足蔬菜和水果中氟啶虫酰胺及其代谢物残留量的测定要求。

## 参考文献:

- [1] Zhang Y B. World Pesticide (张亦冰. 世界农药), 2010, 32(1): 54
- [2] Morita M, Ueda T, Yoneda T, et al. Pest Manag Sci, 2007, 63: 969
- [3] European Union. Commission Regulation (EU) No. 893/2010
- [4] Xie J J, Chen J, Wang L, et al. Journal of Northwest A & F

University: Natural Science Edition (谢建军, 陈捷, 王岚, 等. 西北农林科技大学学报: 自然科学版), 2011, 39(3): 82

μg/kg(黄瓜)和5.0、20、200和2000 μg/kg(苹果)的添加回收率试验,每个添加水平重复测定6次;含量超过线性范围的样品用0.1%甲酸水溶液-甲醇(80:20, v/v)稀释后进行分析。从表2可见2种样品中各添加水平的氟啶虫酰胺和代谢产物的平均添加回收率均在82.9%~104.1%之间。批内测定回收率的相对标准偏差(RSD,  $n=6$ )均在3.6%~6.9%之间。可见该方法具有较好的准确性和稳定性。最低添加水平5.0 μg/kg的信噪比( $S/N$ )均高于10,且均能满足欧盟2002/657/EC规定的确证要求<sup>[15]</sup>,因此将最低添加水平确定为定量限;同时采用逐级稀释标准溶液的方法进行试验,并根据 $S/N=3$ 确定氟啶虫酰胺、TFNA-AM、TFNA和TFNG的检出限分别为0.17、0.60、0.35和0.20 μg/kg。

- [5] Hou R Y, Bian H Z, Zhao X X, et al. Journal of Instrumental Analysis (侯如燕, 卞红正, 赵秀霞, 等. 分析测试学报), 2011, 30(1): 58
- [6] Hengel M J, Miller M. J Agric Food Chem, 2007, 55: 8033
- [7] Zywitz D, Anastassiades M, Scherbaum E. Dtsch Lebensmittel-Rundschau, 2003, 99(5): 188
- [8] Xu Y, Shou L F, Wu Y L. J Chromatogr A, 2011, 1218: 6663
- [9] Shi J W, Li J G, Wang Y F, et al. Chinese Journal of Chromatography (施家威, 李继革, 王玉飞, 等. 色谱), 2010, 28(12): 1137
- [10] Ye R H, Su J F. Chinese Journal of Chromatography (叶瑞洪, 苏建峰. 色谱), 2011, 29(7): 618
- [11] Dong F, Liu X, Cheng L, et al. J Sep Sci, 2009, 32: 3892
- [12] Li C, Zhao L, Yang T, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李存, 赵莉, 杨挺, 等. 分析化学), 2011, 39(2): 239
- [13] Li Y, Zheng F, Wang M L, et al. Chinese Journal of Chromatography (李岩, 郑锋, 王明林, 等. 色谱), 2009, 27(2): 127
- [14] Zheng J H, Pang G F, Fan C L, et al. Chinese Journal of Chromatography (郑军红, 庞国芳, 范春林, 等. 色谱), 2009, 27(3): 254
- [15] European Union. Off J Eur Comm, 2002, L221: 8