

超高效液相色谱-串联质谱法研究 阿维菌素在苹果和土壤中的残留消解动态

李增梅^{*1} 邓立刚¹ 赵淑芳² 郭长英¹ 赵善仓¹ 毛江胜¹ 王玉涛¹

¹(农业部食品质量监督检验测试中心, 济南 250100) ²(山东省食用菌工作站, 济南 250102)

摘 要 建立了苹果和土壤中阿维菌素残留量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法,并且应用本方法研究产自泰安、西安及北京的苹果和土壤中阿维菌素的代谢规律。样品经乙腈萃取后,用饱和 NaCl 盐析分层,静置 30 min 后,旋转蒸发浓缩,氨基柱净化,应用 UPLC-MS/MS 选择多反应监测(MRM)正离子模式扫描测定。本方法最低检出浓度(LOQ)为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N=10$); 在 2.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内阿维菌素的峰强度与质量浓度的线性关系良好($r=0.9994$)。3 个添加水平(1.0, 10 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的平均回收率在 79.2% ~ 96.1%, 相对标准偏差 3.18% ~ 9.14%。田间测定试验结果表明: 阿维菌素在苹果中的原始沉积量为 11.8 ~ 18.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在土壤中的原始沉积量为 44.7 ~ 54.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 代谢速率快, 在苹果中的半衰期为 2.35 ~ 3.84 d, 在土壤中的半衰期为 4.58 ~ 6.45 d。

关键词 阿维菌素; 液相色谱-串联质谱; 苹果; 土壤; 残留; 消解

1 引 言

阿维菌素是十六元大环内酯类的抗生素类杀虫、杀螨、杀线虫剂,由阿维链霉素经液体发酵加工而成,具有高效、广谱、有效期长、不易产生抗药性等特点,已经作为高毒有机磷农药的替代品而广泛应用。但很多研究表明,阿维菌素对蜜蜂以及土壤生物(如蚯蚓)等有益生物都属高毒甚至剧毒农药^[1],对害虫天敌也具有明显的致死和亚致死效应^[2],对哺乳动物的生殖能力也存在着潜在的毒性^[3]。所以,国际上对阿维菌素的残留限量(MRL)要求很高,中国农业部规定其在柑桔、梨和黄瓜中的 MRL 为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 叶菜和豇豆中为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 欧盟规定在果蔬产品、谷物等农产品中 MRL 值为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 食品法典委员会(CAC)规定在苹果、梨、柑橘、瓜类产品中为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4]。

对于阿维菌素的残留检测方法已有许多探索与研究,但目前应用较广的是以荧光衍生化检测为基础的高效液相色谱法^[5,6]。该方法操作复杂,衍生化条件要求严格,衍生产物在光线照射条件下极不稳定,降解速率快,检测结果的准确性和重复性差。Kolar 等应用液相色谱荧光检测技术检测羊粪中阿维菌素^[7],回收率仅为 66.4% ~ 80.8%。近年来,液相色谱质谱检测阿维菌素残留有大量报道^[8~11]。液质检测方法可大大提高目标物质的灵敏度和回收率,缩短进样时间,提高检测效率。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱仪(UPLC-MS/MS),建立了阿维菌素的快速、准确检测方法,并应用本方法研究了阿维菌素在苹果和土壤中的代谢降解规律,为该药的田间施用提供指导。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ACQUITY Ultra Performance LC 超高效液相色谱, ACQUITY UPLC BEH C₈ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 固相萃取柱(Sep-Pak[®] Vac, NH₂ 柱 6 mL 500 mg Waters 公司), Micromass Quattro UltimaTM Pt 质谱仪(美国 Waters 公司); T25BS2 型高速分散匀浆机(德国 IKA 公司); 3K30 型高速离心机(美国 Sigma 公司); Laborota 4000 型旋转蒸发器(德国 Heidolph 公司); AE-240 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

2009-11-22 收稿; 2010-04-29 接受

本文是山东省科技专项(No. 2006GG1108097-34) 和山东省农科院博士基金(No. 2006YBS019) 资助项目

* E-mail: lizengmei78@163.com

0.6%阿维菌素乳油和标准品(纯度>99.0%,东莞市瑞德丰生物科技有限公司);甲醇(色谱纯,德国Merck公司);甲酸(色谱纯,美国Sigma公司);乙腈(色谱纯,天津四友公司);NaCl(分析纯)。实验用水为去离子水。

2.2 标准溶液配制

准确称取阿维菌素标准品0.0100 g(精确至0.0001 g)于100 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成100.0 mg/L储备溶液,用聚四氟乙烯(PTEE)密封带密封,-20℃避光贮存。再用甲醇逐级稀释为100, 50, 20, 10, 5和2 μg/L工作溶液,以制作标准曲线,现配现用。

2.3 苹果和土壤消解动态实验

对于苹果和土壤动态消解实验,均设置3个处理小区和对照小区,小区之间设立隔离带,苹果小区每个小区不少于2棵树,土壤每小区选取30 m²的空白地。喷雾施药一次,施药剂量均为4.5 mg/L(阿维菌素有效成分),对照区喷雾清水。施药时间是苹果果实在其成熟个体约一半大小时进行。施药后1 h及1, 3, 5, 7, 14, 21和30 d,同时采集处理样品和空白样品。苹果样品随机采集于果树的的不同部位,不少于2 kg,后用四分法将其打碎混匀,于-25℃冰箱保存待用。土壤样品是随机取5~10个点采集0~10 cm耕作层土壤1 kg以上,充分混匀后过1 mm孔径筛分样,于-25℃冰箱保存待用。

2.4 样品提取与净化

称取苹果或土壤样品20 g于200 mL广口瓶中,准确加入50 mL乙腈,苹果样品高速匀浆1 min,土壤样品超声波提取30 min,将提取液过滤至盛有5 g NaCl的具塞量筒中。剧烈振荡量筒,静置30 min,待分层,准确取上清液20 mL于圆底烧瓶中,50℃水浴旋转蒸发近干,然后加入2 mL混合洗脱液(V(二氯甲烷):V(甲醇)=95:5)溶解,待净化。

用5 mL混合洗脱液预洗氨基固相萃取柱,当溶剂液面流至吸附填料表面时,立即加入样品浓缩液,用20 mL离心管收集洗脱液,用2 mL混合洗脱液洗涤圆底烧瓶,转移至固相萃取柱,重复3次。将收集的洗脱液置氮吹仪上,氮吹蒸发近干,用甲醇定容至2 mL,0.2 μm滤膜过滤,待测。

2.5 色谱-质谱条件

流动相为0.1%甲酸(A)和甲醇(B);梯度洗脱程序:0 min, 10% B; 0~3 min, 10%~98% B; 3~5 min, 98% B; 5~5.5 min, 98%~10% B,之后进行系统平衡。流速0.3 mL/min;柱温40℃;进样量10 μL。

电喷雾(ESI)离子源,正离子检测;毛细管电压3.5 kV;锥孔电压95 V;碰撞能量47 eV;离子源温度120℃;脱溶剂温度450℃;锥孔气流量51 L/h;脱溶剂气流量460 L/h;光电倍增器电压650 V。监测模式采用多反应检测模式(MRM),定性离子对为 m/z 751.5/895.7、定量离子对为 m/z 607.5/895.7。应用Masslynx version 4.0软件进行样品分析。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理的优化

采用多残留提取方法。以乙腈为提取剂,可将目标物质、色素等有机物质提出,然后采用饱和盐进行盐析分层,盐水变为绿色或黄绿色,去掉水分便于旋转蒸发,同时也净化了样品。

用本方法测定蔬菜样品时,样品经质谱多次进样后,质谱对阿维菌素的响应信号呈逐步衰减状态,可能是样品基质中的弱碱性化合物同阿维菌素发生离子竞争抑制效应造成的。在本实验中,通过以下途径进行改善,氨基柱净化样品,可有效去除基质中的杂质;减少样品进样量(如进样量由10 μL减少至5 μL);延长平衡色谱柱时间;进样多针后可连续进标准品2~3针,从而利于质谱仪器的稳定,提高信号响应。

3.2 色谱-质谱条件的优化

3.2.1 流动相的选择 以乙腈和醋酸铵为流动相时, $[M + NH_4]^+$ 和 $[M + Na]^+$ 离子峰都很强,但是,由于醋酸铵是盐,在色谱柱冲洗不当或者长时间进样时,醋酸铵容易结晶,堵塞色谱柱。甲醇是质子性溶剂,更易离子化, $[M + Na]^+$ 峰的响应值高于乙腈流动相。所以,本实验以甲醇-水为流动相,并添加0.1%甲酸,以增强仪器的响应值和优化峰形,有效解决了拖尾现象。在优化后的液相条件下得到标准

图谱如图 1。

3.2.2 检测离子的选择 阿维菌素的分子式是 $C_{48}H_{72}O_{14}$, 相对分子量为 872.4921。分别在 ESI^+ , ESI^- 和 APCI 模式下扫描, 结果显示, ESI^+ 模式下响应值最高。这与文献 [2] 相似, ESI^+ 模式比 APCI 模式更适合阿维菌素。通过母离子扫描获得一级质谱图, 阿维菌素多以加合离子 $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$, $[M + H]^+$ 形式存在, 本实验选择离子丰度极强的 $[M + Na]^+$ (m/z 895.7) 为母离子, 优化毛细管电压等参数, 使母离子强度达到最高。

选择母离子后, 进行子离子扫描获得二级质谱图, 得到 4 组子离子碎片 m/z 752, 608, 328 和 450。理论上, $[M + 23]^+$ 母离子失去一个分子量为 144 单糖碎片变成 m/z 751.5, 再失去一个单糖碎片为 m/z 607.5。本实验选择丰度最高的 m/z 751.5 和 607.5 作为阿维菌素的特征子离子, 再对锥孔电压、碰撞能量等参数进行优化, 特征子离子的丰度达到最高时的条件为最佳。

在 MRM 多反应监测扫描过程中优化离子源温度、脱溶剂气温度等参数, 使其离子化效率达到最佳。本实验选择丰度最强、受干扰小的 m/z 895.7/751.5 作为定性离子对, m/z 895.7/607.5 为定量离子对。

3.3 方法的灵敏度、准确度和精确度

在选定的色谱和质谱条件下, 注射 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 和 100.0 $\mu g/L$ 标准系列溶液, 以进样浓度 X ($\mu g/L$) 为横坐标, 峰面积 (Y) ($\mu v \cdot s$) 为纵坐标, 求得线性方程为 $Y = 80.7621X + 490.672$, $r = 0.9994$, 具有良好的线性关系。仪器的检出限 (LOD) 为 0.001 ng ($S/N = 3$), 根据加标测定, 本方法的最小检出浓度 (LOQ) 是 1.0 $\mu g/kg$ 。

在苹果和土壤的空白样品中分别添加 3 个水平阿维菌素标准品 1.0, 10.0 和 100.0 $\mu g/kg$, 每个水平重复 5 次, 测定回收率和精密度。苹果样品的平均回收率分别为 79.2%, 88.6% 和 90.0%, 相对标准偏差分别为 9.14%, 3.38% 和 4.04%; 土壤样品的平均回收率分别为 94.8%, 95.4% 和 96.1%, 相对标准偏差分别为 3.18%, 6.60% 和 4.67%, 表明本方法具有较好的精密度, 符合痕量分析的要求, 其空白样品的添加色谱图见图 2。

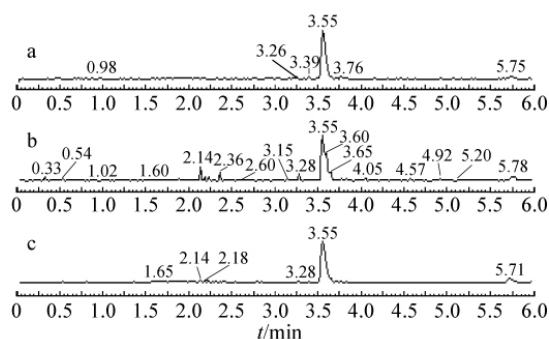


图 1 阿维菌素标准品的多反应监测 (MRM) 总离子及选择离子的离子流色谱图 (10 $\mu g/L$)

Fig.1 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of abamectin (10 $\mu g/L$)

a. 定性离子图谱 (Chromatogram of qualitative ion); b. 定量离子图谱 (Chromatogram of quantitative ion); c. 总离子图谱 (Chromatogram of total ion)。

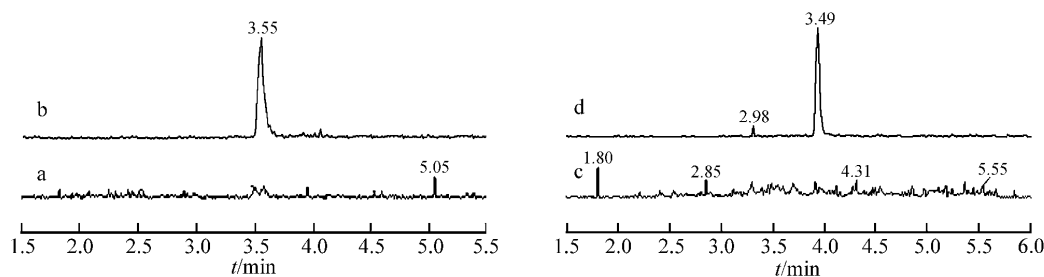


图 2 苹果和土壤样品添加后 MRM 总离子流色谱图 (10 $\mu g/kg$)

Fig.2 MRM chromatograms of apples and soil spiked with abamectin at 10 $\mu g/kg$

a. 苹果空白样品 (Blank apple); b. 苹果加标样品 (Spiked apple); c. 土壤空白样品 (Blank soil); d. 土壤加标样品 (Spiked soil)。

3.4 阿维菌素在苹果和土壤中的消解动态

应用本方法研究产自泰安、西安及北京的苹果和土壤中阿维菌素的代谢规律, 结果见表 1, 其消解规律见图 3。阿维菌素在苹果中的代谢非常快, 半衰期为 2.35 ~ 3.84 d, 施药后 1 d 采样检测, 其消解率已近 50%; 施药后 14 d 在苹果的残留量采用本方法已无法检测到。阿维菌素在土壤中代谢比苹果稍

慢,半衰期为 4.58 ~ 6.45 d。

阿维菌素是大分子的生物农药,由于化学结构的特殊性,在光照和氧气存在下容易被分解。研究报道其在枸杞果实内的半衰期为 1.34 ~ 1.50 d^[13];在露地甘蓝和西兰花中的半衰期是 1 ~ 3 d,在大棚条件下的半衰期是 5 ~ 6 d^[14,15];在梨皮中的半衰期约为 13.8 d^[16],在梨肉中的半衰期约为 1.5 d,梨皮中的含量是梨肉中的 200 倍。阿维菌素降解速率受很多因素影响,如光照强度、温度、降雨量、土壤中的微生物和酸碱度、作物本身的组成结构、生长速率与代谢机制差异等。综上所述,阿维菌素是极易降解,对作物、环境都非常安全的生物型农药。

表 1 阿维菌素在苹果和土壤中的消解规律
Table 1 Degradation dynamic of abamectin in apples and soil

样品 Samples	实验地点 Test sites	原始沉积量 Original residual ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	消解方程 Degradation equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	半衰期 Half life (d)
苹果 Apple	泰安 Tai'an	18.4	$C_t = 15.35e^{-0.2722t}$	0.9816	2.55
	西安 Xi'an	14.9	$C_t = 9.6851e^{-0.1805t}$	0.9102	3.84
	北京 Beijing	11.8	$C_t = 10.14e^{-0.2954t}$	0.9841	2.35
土壤 Soil	泰安 Tai'an	44.7	$C_t = 26.919e^{-0.1126t}$	0.9527	6.16
	西安 Xi'an	54.8	$C_t = 37.234e^{-0.1513t}$	0.9449	4.58
	北京 Beijing	48.4	$C_t = 35.351e^{-0.1075t}$	0.9691	6.45

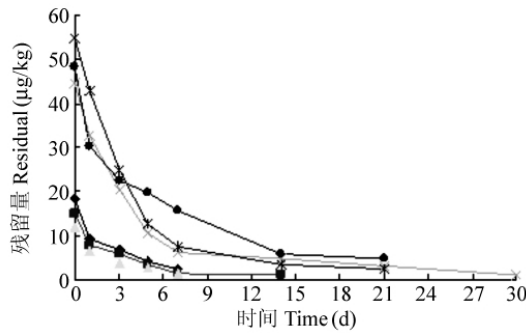


图 3 阿维菌素在苹果和土壤中的降解曲线
Fig. 3 Degradation of abamectin in apples and soil
◆ 泰安苹果(Tai'an apple); ■ 西安苹果(Xi'an apple);
▲ 北京苹果(Beijing apple); × 泰安土壤(Tai'an soil);
* 西安土壤(Xi'an soil); ● 北京土壤(Beijing soil)。

References

1 YANG Yan-Xia(杨艳霞), JIN Shao-Qiang(金绍强), LI Shao-Nan(李少男), WEI Fang-Lin(魏方林), ZHU Guo-Nian(朱国念). *Chin. J. Pesticide Sci.* (农药学报), 2008, 10(2): 226 ~ 231

2 WANG Xiao-Yi(王小艺), SHEN Zuo-Rui(沈佐锐), XU Wen-Bing(徐文兵), LU Jian(卢健). *Chin. J. Appl. Ecol.* (应用生态学报), 2003, 14(8): 1354 ~ 1358

3 Ahmed E, Shar I D. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2003, 55: 307 ~ 313

4 WTO/TBT-SPS Notification and Enquiry of China (中国 WTO/TBT-SPS 国家通报咨询网), <http://www.tbt-sps.gov.cn/jpml/Pages/default.aspx>, 2006

5 XIE Xian-Chuan(谢显传), ZHANG Shao-Hua(张少华), WANG Dong-Sheng(王冬生), HUANGPU Wei-Guo(皇甫伟国), YANG Ting(杨挺), HE Xin-Hua(何新华). *Sci. Agri. Sin.* (中国农业科学), 2005, 38(11): 2254 ~ 2260

6 Jiang H Y, Zhou D G, Li H Y, Xu F, Li C, Shen J Z, Li X W, Ding S Y. *Chromatogr.*, 2008, 68: 259 ~ 262

7 Kolar L, Kuzner J, Erzen N K. *Biomed. Chromatogr.*, 2004, 18 (2): 117 ~ 124

8 GAO Hua-Peng(高华鹏), ZHANG Jian-Ling(张健玲), LI Yong-Fu(李永夫), SHEN Wei-Jun(沈维军), WU Zhi-Yun(吴志云), RONG Wen-Qin(容文钦). *J. Chinese Mass Spectrom. Soci.* (质谱学报), 2008, 29(6): 337 ~ 342

9 YANG Fang(杨方), YANG Shou-Shen(杨守深), LIN Yong-Hui(林永辉), ZHENG Dan-Ping(郑丹萍), LU Sheng-Yu(卢声宇), HUANG Zhi-Qiang(黄志强), ZHANG Ying(张莹). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), 2009, 27(2): 153 ~ 157

10 Robert S, Lucille D. *J. AOAC Int.*, 2006, 89(4): 1088 ~ 1094

11 Kimihiko Y, Susumu I, Yasuhide T, Kiyomi A, Hideaki M, Hirohisa M. *J. Health Sci.*, 2004, 50 (1): 17 ~ 24

12 Grimalt S, Pozo O J, Marin J M, Sancho J V, Hernandez M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16 (10): 1619 ~ 1630

- 13 ZHANG Yi(张怡), ZHANG Zong-Shan(张宗山), WANG Fang(王芳), ZHANG Rong(张蓉). *Agrochemicals*(农药), 2007, 46(1): 46~47, 57
- 14 XIE Xian-Chuan(谢显传), ZHANG Shao-Hua(张少华), WANG Dong-Sheng(王冬生), HUANGFU Wei-Guo(皇甫伟国), YANG Ting(杨挺), ZHAO Jian(赵健). *Agrochemicals*(农药), 2006, 11(45): 768~770
- 15 XIE Xian-Chuan(谢显传), ZHANG Shao-Hua(张少华), WANG Dong-Sheng(王冬生), HUANGFU Wei-Guo(皇甫伟国), YANG Ting(杨挺), ZHAO Jian(赵健). *Sci. Agri. Sin.*(中国农业科学), 2008, 41(10): 3399~3404
- 16 CUI Xin-Yi(崔新仪), LIU Bo(刘波), YUAN Jia-Qi(袁家齐), LI Chong-Jiu(李重九). *Agrochemicals*(农药), 2007, 46(2): 118~120

Determination of Abamectin in Apples and Soil by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Zeng-Mei^{*1}, DENG Li-Gang¹, ZHAO Shu-Fang², GUO Chang-Ying¹,
ZHAO Shan-Cang¹, MAO Jiang-Sheng¹, WANG Yu-Tao¹

¹(Inspection Center of Food Quality (Jinan) Ministry of Agriculture, Jinan 250100)

²(Mushroom Workstation of Shandong Province, Jinan 250102)

Abstract A UPLC-MS/MS method was developed to determine and explore the degradation metabolism of abamectin residues in the apples and soils in the apples and soils in different cities including Tai'an, Xi'an and Beijing. The samples were extracted with acetonitrile, layered with saturated NaCl salt, and cleaned with NH₂-column. The detection was performed by tandem mass spectrometry with electrospray ionization in positive mode (ESI⁺). The minimum detectable concentration was 1.0 µg/kg (S/N = 10) in samples. A good linear relationship was obtained in the range of 2.0 – 100.0 µg/L with the correlation coefficient (r) over 0.99. The average recoveries were 79.2% – 96.0% spiked at 1.0, 10, 100 µg/kg. The field results indicated that the original residues of abamectin in apples and in soil were 11.8 – 18.4 µg/kg and 44.7 – 54.8 µg/kg, respectively. The half-life of abamectin in apples and in soil was 2.35 – 3.84 d and 4.58 – 6.45 d, respectively. The metabolism of abamectin in apples was faster than that in soil.

Keywords Abamectin; Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Apples; Soil; Residue; Degradation

(Received 22 November 2009; accepted 29 April 2010)

《原子发射光谱分析技术及应用》

该书以实际中广泛应用的发射光谱现代分析仪器为对象,介绍了原子发射光谱分析技术的原理和必要的基础知识,主要发射光谱仪器的分析技术及其实际应用。着重介绍火花源原子发射光谱、电感耦合等离子体发射光谱和辉光放电发射光谱的仪器结构、分析技术及其应用,并分别列举了这三种光谱分析方法在各行业中的典型分析实例,及其在国家标准及相关行业标准中的应用情况,同时简要介绍了光谱分析过程中的误差分析及测定结果不确定度的数理统计方法,为发射光谱分析数据的可比性和溯源性提供参考知识。同时,书中也介绍了原子发射光谱仪器中实用类型仪器的结构、附件及其使用要求和仪器的日常维护知识,列举了新型现代化仪器的性能、特点及其应用范围。

该书由郑国经、计子华、余兴编著,化学工业出版社于2010年1月出版,定价80.00元。