

# QuEChERS-液相色谱串联质谱法快速检测猕猴桃中的氯吡脞及其代谢产物

张志伟<sup>1,2</sup>, 高振红<sup>1,2</sup>, 袁亚红<sup>1</sup>, 王媛<sup>1</sup>, 岳田利<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

(2. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109)

**摘要:** 氯吡脞是一种猕猴桃生长过程中常用的植物生长调节剂, 主要作用是增加猕猴桃果实的尺寸和重量。本研究通过化学合成得到氯吡脞代谢产物标准品, 利用高效液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)建立了猕猴桃中氯吡脞及其4种代谢产物(4-羟基-氯吡脞、3-羟基-氯吡脞、氯吡脞-4-O- $\beta$ -D-基葡萄糖苷和氯吡脞-3-O- $\beta$ -D-基葡萄糖苷)同时检测的定性定量方法。样品前处理利用乙腈作为萃取溶剂提取氯吡脞残留, 通过PSA添加量的优化改进了QuEChERS样品前处理方法, 5种化合物在LC-MS/MS正离子多反应监测模式下进行质谱分析。结果显示: 样品前处理过程中PSA的添加量为400 mg/15 mL, 氯吡脞及其4种代谢产物在一定浓度范围内线性关系良好( $r^2 \geq 0.995$ ), 相对标准偏差(RSD)低于7.1%, 重复性好, 检出限为1~3  $\mu\text{g/L}$ , 定量限为5~10  $\mu\text{g/L}$ , 平均添加回收率87%~108%。该方法快速、准确、灵敏及稳定, 能满足果蔬中氯吡脞及其代谢产物残留的同时检测。

**关键词:** 猕猴桃; 氯吡脞; 代谢产物; 检测

文章编号: 1673-9078(2017)10-262-267

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.036

## Determination of Forchlorfenuron and Its Metabolites in Kiwifruit Using

### QuEChERS-LC-MS/MS

ZHANG Zhi-wei<sup>1,2</sup>, GAO Zhen-hong<sup>1,2</sup>, YUAN Ya-hong<sup>1</sup>, WANG Yuan<sup>1</sup>, YUE Tian-li<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, 712100, China)

(2. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, 266109, China)

**Abstract:** Forchlorfenuron (1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea) is a plant growth regulator, which mainly be used to increase the size and weight of kiwifruit. The standards of forchlorfenuron metabolites were obtained by chemosynthesis and forchlorfenuron and its metabolites (4-hydroxyphenyl- forchlorfenuron, 3-hydroxyphenyl-forchlorfenuron, forchlorfenuron-4-O- $\beta$ -D-glucoside and forchlorfenuron-3-O- $\beta$ -D-glucoside) in kiwifruit were simultaneously determined by LC-MS/MS with ESI<sup>+</sup> under the mode of multiple reaction monitoring (MRM) in this study. The pre-treatment of sample was improved by optimizing PSA addition with acetonitrile as extraction solvent for extraction of clodipourea residue. The results showed that forchlorfenuron and its metabolites had a good linear correlation within a certain concentration range, the relative standard deviations were below 7.1% with a good repeatability, the limit of detection (LOD) was 1~3  $\mu\text{g/L}$  with a limit of quantification (LOQ) of 5~10  $\mu\text{g/L}$ , and recoveris were between 87% and 108% with the PSA addition of 400 mg/15 mL. Therefore, QuEChERS-LC-MS/MS was sensitive and accurate, which could be used for simultaneous determination of forchlorfenuron and its metabolites in kiwifruit.

**Key words:** kiwifruit; forchlorfenuron; metabolites; determination; safety assessment

收稿日期: 2017-01-18

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP201701403、GJFP201700301、GJFP2016014); 陕西省科技统筹创新工程项目(2016KTCQ03-12)

作者简介: 张志伟(1979-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品与发酵工程及食品安全控制技术

通讯作者: 岳田利(1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品与发酵工程及食品安全控制技术

氯吡脞(1-(2-氯-4-吡啶)-3-苯基脞, M0)是一种人工合成的具有细胞分裂素活性的植物生长调节剂<sup>[1]</sup>, 结构见图1, 它可以促进果蔬的生长, 增加果蔬果实的尺寸和重量<sup>[2-4]</sup>, 提高种植户的经济收益。氯吡脞的不合理的施药对果蔬品质造成了不同程度的影响<sup>[5]</sup>, 20 mg/kg的氯吡脞使得猕猴桃的单果重增加, 可溶性固形物含量下降, 畸形果增加<sup>[6,7]</sup>。在猕猴桃生产过程中, 植物生长调节剂的滥用不仅影响了猕猴桃的

品质,而且还影响到了猕猴桃的质量与安全。部分植物生长调节剂施药后通过生物代谢产物消失,或者残留量很低,不能引起人们的重视。部分植物生长调节剂本身可能是低毒制剂,但是它的水解或者其他代谢产物毒性可能更强,如丁酰肼,它的代谢产物 1,1-二甲基联氨具有较高的致畸性,能产生恶性肿瘤<sup>[8]</sup>。

目前植物生长调节剂残留常见的检测方法有高效液相色谱<sup>[9]</sup>、气相色谱法<sup>[10]</sup>和高效液相色谱质谱法等,其中高效液相色谱质谱法是一种稳定快速的检测方法,已经用来检测葡萄、苹果和西红柿等果蔬中的植物生长调节剂<sup>[11-14]</sup>。QuEChERS 方法是一种快速、简单、廉价及高效安全的样品前处理方法,广泛应用于食品中农药残留的检测。本文在氯吡脞及其代谢产物结构鉴定<sup>[15]</sup>的基础上,采用 QuEChERS 样品前处理方法,利用 LC-MS/MS 建立一种氯吡脞及 4 种主要代谢产物的定性定量检测方法,该法操作简单、快速、灵敏,精密度较好,为果蔬中植物生长调节剂残留监控提供基础数据。

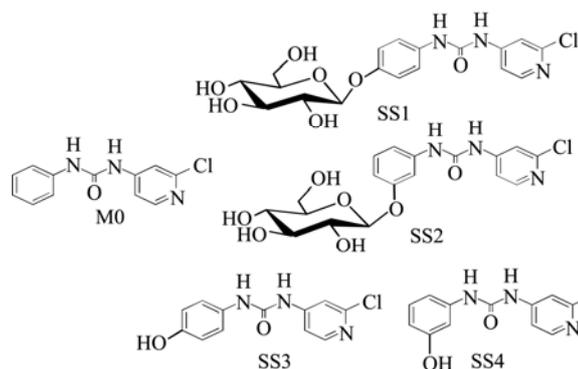


图 1 氯吡脞及其代谢产物结构式

Fig.1 The chemical structural formulas of forchlorfenuron and its metabolites

注: M0, 氯吡脞; SS1 (standard substance 1), 氯吡脞-4-葡萄糖苷; SS2, 氯吡脞-3-葡萄糖苷; SS3, 4-羟基-氯吡脞; SS4, 3-羟基-氯吡脞。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验试剂

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、醋酸(色谱纯),西格玛奥德里奇化学有限公司;石墨化碳(GCB)、N-丙基乙二胺(PSA),天津博纳艾杰尔科技有限公司;无水醋酸钠、无水硫酸镁分析纯;氯吡脞-4-O-β-D-基葡萄糖苷(SS1, ≥95%)、氯吡脞-3-O-β-D-基葡萄糖苷(SS2, ≥95%), 4-羟基-氯吡脞(SS3, ≥97%)、3-羟

基-氯吡脞(SS4, ≥97%),实验室化学合成纯化得到。

### 1.2 试验设备

串联四级杆线性离子阱多级质谱仪, 4000QTRAP, 美国 AB 公司; 高效液相色谱仪, LC-20AD, 岛津仪器有限公司; 高效液相-电喷雾-离子阱-飞行时间质谱仪(LCMS-IT-TOF), 岛津仪器有限公司; 超纯水系统, Milli-Q, 美国 Milipore 公司; 高速冷冻离心机, HC-3018R, 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品前处理

准确称取 15 g 匀浆样品, 置入 50 mL 离心管中, 加入 15 mL 1%醋酸乙腈, 涡旋 1 min; 加 6 g 无水硫酸镁, 1.5 g 无水醋酸钠, 涡旋 1 min; 3800 r/min 条件下离心 6 min; 将取上层提取液 4 mL 转入 10 mL 离心管中; 加入 50 mg PSA、50 mg GCB 和 150 mg 无水硫酸镁, 涡旋 1 min; 3800 r/min 条件下离心 6 min; 取上清液 2 mL 移入样品瓶, 用氮气吹干, 再用 1 mL 甲醇复溶; 上样分析。

#### 1.3.2 标准溶液的制备

准确称取氯吡脞标准品和 4 种代谢产物标准品各 5 mg 加入 50 mL 棕色容量瓶, 加入甲醇定容, 避光保存待用。分别用澄清的猕猴桃汁配制 1 mg/L、0.5 mg/L、0.1 mg/L、0.05 mg/L、0.01 mg/L 和 0.005 mg/L 的标准工作溶液。采用 LCMS-IT-TOF 核对氯吡脞标准品和其 4 种代谢产物标准品。采用基质配制标准品, 消除了基质对 LC-MS/MS 的影响, 使得试验数据更加准确、稳定。

#### 1.3.3 净化剂加入量的确定

按照样品前处理步骤进行样品前处理, 收集第一次离心的上清液。用上清液配制 1 mg/L 的氯吡脞和其 4 种代谢产物的标准液样品溶液。分别取 15 mL 的上清液于 50 mL 的离心管中, 加入 GCB 50 mg, 无水硫酸镁 1200 mg, PSA 的添加量设置 5 个水平分别是 250 mg、300 mg、350 mg、400 mg 和 450 mg, 后面步骤按照样品前处理步骤进行, 分别计算其回收率, 确定 PSA 最优添加量。

#### 1.3.4 液相条件

液相柱: Shim-pack XR ODS column (75 mm×3.0 mm i.d, 2.2 μm Shimadzu)。液相柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL/min 梯度条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度条件

时间	流动相 B (乙腈)
5 min	70%
10 min	100%
15 min	100%
15.1 min	5%
20 min	stop

### 1.3.5 LC-MS/MS 质谱条件

LC-MS/MS 质谱条件见表 2。

表 2 LC-MS/MS 的质谱条件

名称	参数
离子源	ESI <sup>+</sup>
离子源温度	500 °C
气帘气	30 psi
雾化气	50 psi
碰撞气	8 psi
离子喷雾电压	5500 V
扫描方式	多反应监测
CPPU 定性定量离子对	129.0/155.0
SS1 定性定量离子对	264.0/129.0
SS2 定性定量离子对	264.0/129.0
SS3 定性定量离子对	129.0/155.0
SS4 定性定量离子对 </td <td>129.0/155.0</td>	129.0/155.0

## 2 结果与分析

### 2.1 氯吡脞和四种合成标准品 TOF-MS 确认

LCMS-IT-TOF 采用 ESI 源、正离子模式、检测电压 1.6 kV、CDL 温度 200 °C、加热模块温度 200 °C、雾化气流流速 1.5 L/min、干燥气体压力 100 kPa、MS<sup>1</sup> 质谱范围  $m/z$  100~1000、MS<sup>2</sup> 质谱范围  $m/z$  100~800、MS<sup>3</sup> 质谱范围  $m/z$  100~800。

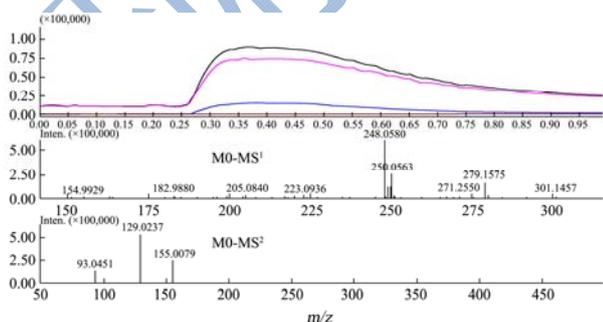


图 2 氯吡脞 (M0) 的多级质谱  
Fig.2 MS<sup>n</sup> of M0

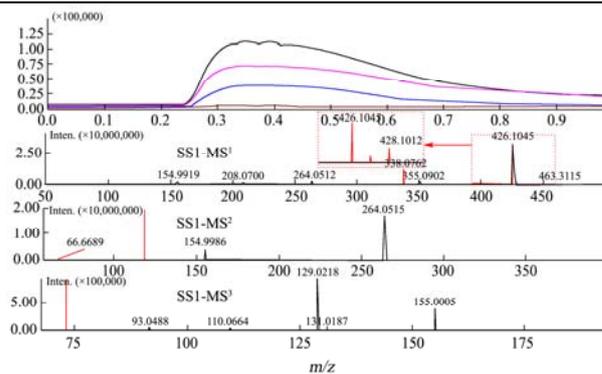


图 3 SS1 的多级质谱  
Fig.3 MS<sup>n</sup> of SS1

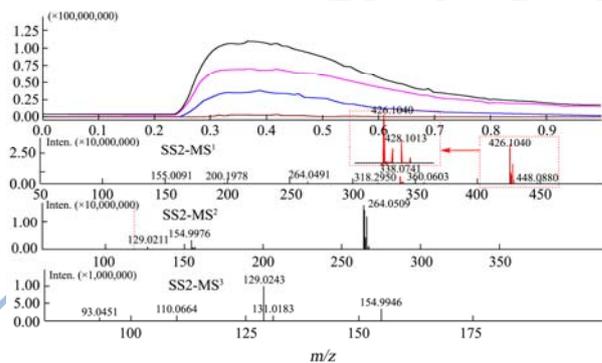


图 4 SS2 的多级质谱  
Fig.4 MS<sup>n</sup> of SS2

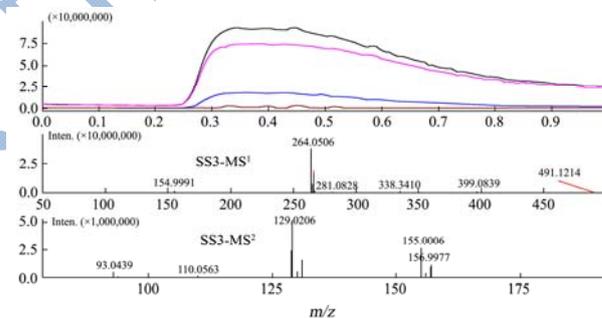


图 5 SS3 的多级质谱  
Fig.5 MS<sup>n</sup> of SS3

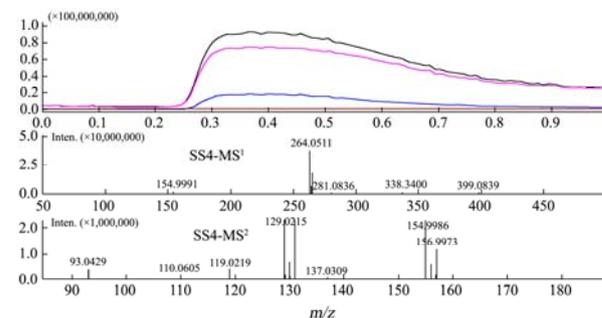


图 6 SS4 的多级质谱  
Fig.6 MS<sup>n</sup> of SS4

氯吡脞和四种合成标准品的多级质谱信息见图 2~6。M0 的 MS<sup>1</sup> 为  $m/z$  248.0580，其氯元素同位素质

谱为  $m/z$  250.0563, 两者丰度比值为 3:1,  $MS^2$  分别为  $m/z$  155.0079、 $m/z$  129.0237 和  $m/z$  93.0451; SS1 的  $MS^1$  为  $m/z$  426.1045, 其氯元素同位素质谱为  $m/z$  428.1012, 两者丰度比值为 3:1,  $MS^2$  分别为  $m/z$  264.0515 和  $m/z$  154.9986, 二级质谱  $m/z$  264.0515 裂解的  $MS^3$  分别为  $m/z$  155.0005、 $m/z$  129.0218、 $m/z$  110.0664 和  $m/z$  93.0488; SS2 的  $MS^1$  为  $m/z$  426.1040, 其氯元素同位素质谱为  $m/z$  428.1013, 两者丰度比值为 3:1,  $MS^2$  分别为  $m/z$  264.0509、 $m/z$  154.9976 和  $m/z$  129.0211, 二级质谱  $m/z$  264.0509 裂解的  $MS^3$  分别为  $m/z$  154.9946、 $m/z$  129.0243、 $m/z$  110.0664 和  $m/z$  93.0451; SS3 的  $MS^1$  为  $m/z$  264.0506,  $MS^2$  分别为  $m/z$  155.0006、 $m/z$  129.0206、 $m/z$  110.0563 和  $m/z$  93.0439; SS4 的  $MS^1$  为  $m/z$  264.0511,  $MS^2$  分别为  $m/z$  154.9986、 $m/z$  129.0215、 $m/z$  110.0605 和  $m/z$  93.0429。经过 TOF-MS 核实, 4 种代谢产物标准品正确无误。

## 2.2 样品提取和净化条件的选择

根据 AOAC2007.01 样品中 QuEChERS 提取方法, 结合目标化合物的性质, 本文考察了 1%醋酸-甲醇、1%醋酸-乙腈两种提取溶剂的效果。1%醋酸-甲醇作为提取溶剂, 萃取液颜色较重, 所含有机酸、糖类杂质较多; 1%醋酸-乙腈作为提取溶剂, 萃取液颜色清澈, 基质干扰较小, 因此选择 1%醋酸-乙腈作为提取剂。

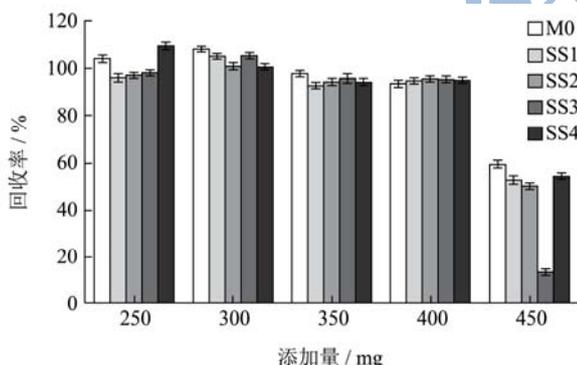


图 7 PSA 添加量单因素试验

Fig.7 Effect of PSA on the recovery rate

QuEChERS 方法中常用的净化剂 GCB 和 PSA。GCB 的主要作用是去除样品基质中叶绿素、类胡萝卜

素等色素以及固醇类杂质; PSA 主要有效去除样品基质中的有机酸、糖类杂质。根据 AOAC2007.01, 猕猴桃果汁中 GCB 的添加量为 50 mg/15 mL, 结合前期的试验结果, GCB 添加量为 50 mg/15 mL 时能较好地去除猕猴桃果汁中的干扰物质, 因此 GCB 添加量确定为 50 mg/15 mL。本研究主要优化了净化剂 PSA 的添加量, 由图 7 可以看出, 15 mL 猕猴桃果汁中 PSA 的添加量为 250 mg、300 mg、350 mg、400 mg 和 450 mg, 5 种标准品的添加回收率均在 90%以上, 当 PSA 添加量为 450 mg 时, 5 种标准品的回收率均迅速减小, SS3 回收率仅为 13%左右, 通过对比分析, PSA 的添加水平选择 400 mg/15 mL。

## 2.3 5 种标准品 LC-MS/MS 分离条件的确定

试验考察了甲醇-水溶液、乙腈-水溶液两种流动相, 以甲醇-水溶液为流动相时, 5 种目标分析物不易分离, 以乙腈-水溶液为流动相时, 5 种目标分析物分离效果较好, 因此选用乙腈-水溶液为流动相。5 种标准品的总离子流图见图 8。

试验采用 ESI<sup>+</sup>和 ESI<sup>-</sup>对 5 种标准溶液进行母离子扫描。结果表明 5 种标准溶液在正离子扫描模式下响应较好, 5 种标准溶液 LC-MS/MS 质谱条件见表 2。

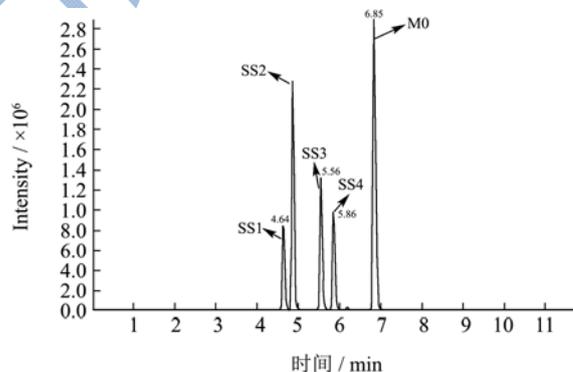


图 8 5 种标准品的总离子流图

Fig.8 Total Ion Chromatography of forchlorfenuron and 4 metabolites

## 2.4 线性关系与检出限、定量限

表 3 氯吡脞和 4 种代谢产物的标准曲线、检出限及定量限

Table 3 Standard curves, LOD and LOQ of forchlorfenuron and four kinds of metabolites

名称	浓度范围/( $\mu\text{g/L}$ )	线性方程	相关系数	检出限/( $\mu\text{g/L}$ )	定量限/( $\mu\text{g/L}$ )
M0	0~1000	$y=2169x+23876$	0.999	2	7
SS1	0~1000	$y=4312x+27370$	0.998	1	5
SS2	0~1000	$y=705.5x+8441$	0.996	2	7.5
SS3	0~1000	$y=2936x+47328$	0.997	2	6
SS4	0~1000	$y=1364x+19237$	0.995	3	10

氯吡脞和4种生物化学代谢产物的标准品的总离子流从图8可看出,分离效果比较好。5种标准品以3倍信噪比(S/N)所对应的标准品浓度为检出限,其值1~3 μg/L,以10倍信噪比(S/N)所对应的标准品浓度为定量限,其值为5~10 μg/L。其详细结果见表3。

## 2.5 回收率和精密度

表4 氯吡脞和4种代谢产物的添加回收率

Table 4 Recovery rate of forchlorfenuron and four kinds of metabolites

名称	添加水平/(μg/L)	平均回收率/%	RSD/%
M0	100	95	3.1
	50	95	5.3
	10	101	6.7
SS1	100	87	4.6
	50	108	7.1
	10	90	3.6
SS2	100	88	6.3
	50	108	5.2
	10	98	4.5
SS3	100	93	5.2
	50	89	6.3
	10	102	3.7
SS4	100	93	5.6
	50	101	3.8
	10	95	4.9

氯吡脞和4种代谢产物的添加回收率设置了三个水平(每个水平重复三次取其平均值),分别是100 μg/L、50 μg/L和10 μg/L,由表4可以看出,5种标准品的平均添加回收率在87%~108%,相对标准偏差RSD在3.1%~7.1%,达到了定量检测的要求。

## 2.6 重复性试验

试验过程按照1.3的步骤进行,5种标准品的添加水平均为100 μg/L,平行6次试验,5种标准品(M0/SS1/SS2/SS3/SS4)的RSD分别为2.5%、1.6%、1.8%、2.3%、1.0%和1.6%,具有较好的重复性。

## 2.7 未知样品测定

按照得到的样品前处理方法及设备仪器参数进行未知样品的测试。测试2个样本,两个样本中氯吡脞及其4种生物化学代谢产物的含量结果见表5。由表5可以看出两个样品中5种化合物全部检出。

表5 LC-MS/MS 检测结果

Table 5 The detection results of LC-MS/MS

样品号	M0 /(μg/kg)	SS1 /(μg/kg)	SS2 /(μg/kg)	SS3 /(μg/kg)	SS4 /(μg/kg)
1	58.73	8.11	19.95	0.34	58.73
2	121.05	11.36	28.04	0.42	1.22

## 3 结论

建立了氯吡脞及4种代谢产物的LC-MS/MS的检测方法,改进了猕猴桃样品前处理的QuEChERS法,通过PSA的单因素试验优化了其添加量,PSA的添加量为400 mg/15 mL, GCB添加量为50 mg/15 mL;流动相为乙腈-水,梯度洗脱;氯吡脞及4种代谢产物标准品在0~1000 μg/L范围内线性关系良好;5种标准品的平均添加回收率在87%~108%;相对标准偏差RSD在3.1%~7.1%;氯吡脞、4-羟基-氯吡脞、3-羟基-氯吡脞、氯吡脞-4-O-β-D-基葡萄糖苷、氯吡脞-3-O-β-D-基葡萄糖苷定量限为5~10 μg/L;检出限为1~3 μg/L,重复性良好,精确性良好,同时利用此方法对两个未知样品中进行了定性定量分析,两个样品均检测到了氯吡脞及其4种代谢产物。本方法简单、快速、灵敏度高、稳定性好,可以作为果蔬中氯吡脞及其4种代谢产物LC-MS-MS同时检测的方法。

## 参考文献

- [1] Valverde A, Piedra L, Aguilera A, et al. Analysis and residue levels of forchlorfenuron (CPPU) in watermelons [J]. Journal of Environmental Science & Health. partb. Pesticides Food Contaminants & Agricultural Wastes, 2007, 42(7): 801-807
- [2] Patterson K J, Mason K A, Gould K S. Effects of CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) on fruit growth, maturity, and storage quality of kiwifruit [J]. New Zealand Journal of Crop & Horticultural Science, 1993, 21(3): 253-261
- [3] Lewis D H, Burge G K, Hopping M E, et al. Cytokinins and fruit development in the kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) .II. effects of reduced pollination and CPPU application [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 98(1): 187-195
- [4] Moriyama M M, Dokoozlian N K, Ebisuda N C. Forchlorfenthuron (CPPU) increases the berry size and delays the maturity of thompson seedless table grapes [J]. American Society for Enology and Viticulture, ASEV, 1994, 6(28): 63-68

- [5] Ezzahouani A. Effects of forchlorfenuron (CPPU) and girdling on table grape cultivars 'Perlette' and 'Italia' [J]. Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin, 2000: 57-60
- [6] 杨清平. CPPU 对美味猕猴桃果实重量、可溶性固形物及糖酸含量的影响[J]. 亚热带植物科学, 2004, 30(1): 20-21  
YANG Qing-ping. Influence of CPPU on weight, contents of TSS and acid in *Actinidia deliciosa* fruits [J]. Subtropical Plant Science, 2004, 30(1): 20-21
- [7] 尹翠波, 周庆阳. GA<sub>3</sub> 和 CPPU 对猕猴桃果实发育及品质的影响[J]. 东南园艺, 2007, 4(4): 5-9  
YIN Cui-bo, ZHOU Qing-yang. Effect of GA<sub>3</sub> and CPPU on fruit development and quality of kiwifruit [J]. Southeast Horticulture, 2007, 4(4): 5-9
- [8] Choudhary G, Hansen H. Human health perspective of environmental exposure to hydrazines: a review [J]. Chemosphere, 1998, 37(5): 801-843
- [9] Sharma D, Awasthi M D. Behaviour of forchlorfenuron residues in grape, soil and water [J]. Chemosphere, 2003, 50(5): 589-594
- [10] Zhao L, Qing M A, Lin M A. Determination of forchlorfenuron residue in vegetables and fruits [J]. Journal of Analytical Science, 2013, 29(4): 583-586
- [11] Campillo N, Viñas P, Férrez-Melgarejo G. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of three cytokinin compounds in fruits and vegetables by liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry [J]. Talanta, 2013, 116(22): 376-381
- [12] Oulkar D P, Banerjee K, Ghaste M S, et al. Multiresidue analysis of multiclass plant growth regulators in grapes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Journal of Aoac International, 2011, 94(3): 968-977
- [13] Xiaomei S, Fen J, Yuting H, et al. Simultaneous determination of five plant growth regulators in fruits by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2012, 60(1): 60-65
- [14] Xue J, Wang S, You X, et al. Multi-residue determination of plant growth regulators in apples and tomatoes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011, 25(21): 3289-3297
- [15] Zhiwei Z, Kangquan G, Yubin B, et al. Identification, Synthesis, and safety assessment of forchlorfenuron (1-(2-Chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea) and its metabolites in kiwifruits [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(11): 3059-3066