

苹果中杀铃脲残留量的快速测定方法研究

刘春华^{1,2*}, 张 群^{1,2}, 黎舒怀^{1,2}, 吴小芳^{1,2}

(1. 中国热带农业科学院分析测试中心, 海口 571101; 2. 海南省热带果蔬产品质量安全重点实验室, 海口 571101)

摘 要: **目的** 建立苹果中杀铃脲的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)快速测定方法。**方法** 苹果样品通过乙腈匀浆提取, 用固相萃取小柱净化, 甲醇-二氯甲烷(1:19, v:v)淋洗、洗脱后, 选用 C₁₈(100 mm×2.1 mm i.d., 1.7 μm)作为分析柱, 甲醇/1 mmol/L 乙酸铵梯度洗脱, 经高效液相色谱分离, 在多反应监测模式(MRM)及电喷雾电离方式(ESI⁺)下串联质谱法进行测定, 基质配标准曲线定量。**结果** 分析物在 0.01~0.50 mg/L 范围内有良好的线性关系, 相关系数 $r > 0.99$, 空白样品中分析物在添加水平为 0.01、0.02、0.05 mg/kg 时, 平均回收率在 80.0%~84.8%之间, 相对标准偏差为 4.9%~8.8%, 定量限为 0.005 mg/kg。**结论** 本方法简单快速、灵敏度高、准确度高, 能满足定量分析的要求。

关键词: 苹果; 杀铃脲; 超高效液相色谱-串联质谱

Methodology for rapid determination of triflumuron residue in apple

LIU Chun-Hua^{1,2*}, ZHANG Qun^{1,2}, LI Shu-Huai^{1,2}, WU Xiao-Fang^{1,2}

(1. Analysis and Testing Center, CATAS, Haikou 571101, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Quality and Safety for Tropical Fruits and Vegetables, Haikou 571101, China)

ABSTRACT: Objective An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis (UPLC-MS/MS) was established for the determination of the residues of triflumuron pesticide in apple. **Methods** The samples were extracted by ultrasonic extraction with acetonitrile and cleaned with solid-phase extraction. The separation was performed on a C₁₈ column(100 mm×2.1 mm i.d., 1.7 μm), the gradient mobile phase consisting of 1 mmol /L ammonium acetate and methanol. The separation was achieved by UPLC, and then the identification and quantification were performed using MS/MS with multiple-reaction monitoring (MRM) and positive electrospray ionization (ESI⁺) mode. The matrix-matched external standard calibration curves were used for the quantitative analysis. **Results** Under the optimum conditions, the method showed a good linearity in the range of 0.005~0.50 mg/L with correlation coefficient over 0.99. The limits of quantitation (LOQ) for the pesticide residue were 0.005 mg/kg. The average recoveries of pesticides residues were 80.0%~84.8% at the spiked levels of 0.01, 0.02 mg/kg and 0.05 mg/kg with relative standard deviations (RSDs) of 4.9%~8.8%. **Conclusion** The method is sensitive and accuracy and it is suitable for quantitative determination of triflumuron pesticides in apple.

KEY WORDS: apple; triflumuron; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis

*通讯作者: 刘春华, 助理研究员, 主要研究方向为农产品质量安全与检测。E-mail: chunhualiu111@126.com

*Corresponding author: LIU Chun-Hua, Research Associate, Analysis and Testing Center, CATAS & Hainan Provincial Key Laboratory of Quality and Safety for Tropical Fruits and Vegetables, No.4, Xueyuan Road, Haikou 571101, China. E-mail: chunhualiu111@126.com

1 引言

杀铃脲^[1-3]属于苯甲酰胺类的昆虫生长调节剂。它能抑制昆虫几丁质合成酶的活性,阻碍新表皮的形成,使昆虫的蜕皮化蛹受阻,活动减缓,取食减少,甚至死亡。具有杀虫谱广、药效高、持效期长、选择性强的特点,对靶标昆虫具有触杀和胃毒作用,成为当前调节剂类农药的主要品种,特别是对于防治危害苹果树的金纹细蛾有特效作用。苹果是我国主要果树和主要出口水果之一,近年来,农产品质量安全,特别是农药最大残留日益成为消费者关注的焦点,许多国家的农药最大残留限量标准不断增加,指标日趋严格。是否满足出口国农药最大残留限量标准已成为农产品能否顺利出口的关键因素。我国的农业行业标准 NY 1500.26.1-2007^[4]中规定了苹果中杀铃脲的最大残留限量为 0.1 mg/kg。目前,关于杀铃脲的检测方法主要有液相色谱法^[5-10]和液相色谱-串联质谱法^[11-14]。液相色谱法快速、准确、重复性好,使用一直比较广泛。但是有些样品的成分比较复杂,如果在前处理中不能较好的净化,用液相色谱进行定量和定性分析就会存在一定问题。相对于传统的液相色谱法,超高效液相色谱具有分析速度快和灵敏度高等优点,将超高效液相色谱与质谱,尤其是串联质谱结合,更能显现色谱与质谱的优势。刘锦霞等^[11]采用高效液相色谱-串联质谱法测定了猪肉中杀铃脲的残留量;柳茵等^[12]采用高效液相色谱-串联质谱法测定大豆与玉米中的杀铃脲的残留量;韩笑等^[13]采用基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法检测蔬菜中杀铃脲的残留量;丁慧瑛等^[14]采用液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中杀铃脲的残留量。目前针对于苹果中杀铃脲的高效液相色谱-串联质谱的检测方法未见报导。由于猪肉和粮食基质与苹果基质存在很大差异,所以刘锦霞等研究的猪肉中杀铃脲残留量和柳茵等研究的粮食中杀铃脲残留量的前处理方法不适合于苹果中杀铃脲的提取。在韩笑报导的蔬菜中杀铃脲的检测方法中采用中性氧化铝和石墨化炭黑研磨方法净化;而丁慧瑛报导的蔬菜中杀铃脲的检测方法中采用 *N*-丙基乙二胺(PSA)和 C_{18} 填料分散固相萃取净化,两种净化方法不仅操作繁杂,而且不利于苹果中果糖和有机酸的去除,因此本研究采用氨基固相萃取净化小柱,专门针对去除苹果中的果糖和有机酸,操作简单,使净化效果和回收率得到

一定提高,并在质谱进样时采用正源进样方式,提高杀铃脲的信号响应值,提高了灵敏度。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters UPLC/Quattro Premier 超高效液相色谱-串联质谱仪(UPLC-MS/MS)(美国 Waters 公司);高速匀浆机(T25 basic, 广州仪科实验技术有限公司);旋转蒸发仪(RE52CS-1, 上海亚荣生化仪器厂);电子顶载天平(EB-280-12, 日本岛津公司);旋涡混合器(QL-901, 江苏海门其林医用仪器厂);Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

乙腈、甲醇(HPLC 级, 美国 Fisher); C_{18} 色谱柱(美国 Waters 公司);乙酸铵、氯化钠(分析纯, 广州试剂公司);实验室用水均为超纯水。标准物质杀铃脲纯度 $\geq 99\%$ (天津农业部环境质量监督检验测试中心);0.22 μm 有机系滤膜(天津美瑞泰克公司);氨基固相萃取小柱(CNWBOND 500 mg, 6 mL, 上海安普科学仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 超高效液相色谱条件

Waters ACQUITY_UPLC™ BEH C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm *i.d.*, 1.7 μm), 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 5 μL ;流动相及流速见表 1。

表 1 UPLC 流动相梯度洗脱
Table 1 UPLC gradient elution condition

时间(min)	流速(mL/min)	A(甲醇):B(1.0 mmol 乙酸铵溶液)
0.00	0.25	10:90
1.00	0.25	70:30
4.50	0.25	70:30
5.00	0.25	90:10
6.50	0.25	90:10
7.50	0.25	10:90
8.50	0.25	10:90

2.2.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI⁺);毛细管电压:3.0 kV;离子源温度:110 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气温度:350 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气流量:900 L/h;锥孔气流量:50 L/h;碰撞气流量:0.21 mL/min;杀铃脲农药的质谱采集参数见表 2。

表 2 质谱参数
Table 2 Parameters of mass spectrometry analysis

农药名称	电离方式	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量(V)
杀铃脲	ESI ⁺	7.23	359	24	359>156.1 [*] , 359>139	25, 40

注: “*” 为定量离子。

2.2.3 样品处理

称取样品 25.00 g(精确至 0.01 g)于 150 mL 烧杯中, 加入 50.0 mL 乙腈, 在匀浆机中高速匀浆 2 min 后用滤纸过滤, 滤液收集到装有 7 g NaCl 的 100 mL 具塞量筒中, 收集全部滤液, 盖上塞子, 剧烈震荡 2 min, 静置 30 min, 使乙腈相和水相分层。从 100 mL 具塞量筒中准确吸取 10.00 mL 乙腈溶液于 50 mL 圆底烧瓶中, 35 ℃ 水浴真空旋转蒸发近干, 加入 5.0 mL 甲醇-二氯甲烷(1:19, v:v)溶解残渣, 待净化。

将氨基柱用 5.0 mL 甲醇-二氯甲烷(1:19, v:v)预淋洗, 当溶剂液面接近柱吸附层表面时, 立即加入上述待净化溶液, 用 50 mL 圆底烧瓶收集洗脱液, 再用 5.0 mL 甲醇-二氯甲烷(1:19, v:v)洗圆底烧瓶后过柱, 重复两次。35 ℃ 水浴真空旋转蒸发近干, 用甲醇定容至 5.00 mL, 过 0.22 μm 滤膜, 上机。

2.2.4 标准溶液配制与标准曲线

准确吸取适量标准物质(精确至 0.01 mL), 用甲醇配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备液, -18 ℃ 冷冻避光保存。准确移取适量的标准物质, 将其分别配制成 10.00、1.00、0.10 mg/L 混合标准中间溶液, 待用, -18 ℃ 冷冻避光保存。

用处理好的空白样品基质, 配制成最终定容浓度为 0.005、0.01、0.02、0.05、0.10、0.50 mg/L 的混合标准基质上机液, 得到基质标准曲线和线性相关系数及仪器检出限。

2.2.5 添加回收率与精密度测定

称取经测定不含杀铃脲农药残留的 3 组空白苹果样品, 在 3 组 5 个空白样品中分别加入混合标准溶液, 添加至 0.01、0.02、0.05 mg/kg, 按照上述提取和色谱操作条件进行分析, 计算添加回收率和相对标准偏差。

3 结果与分析

3.1 液相色谱条件优化

因为液相质谱-串联质谱测定方法受基质的影响

很大。由于苹果的基质中含有果糖和有机酸等物质, 经过氨基小柱净化提取, 虽然去除了大部分的果糖和有机酸, 但是还会有一些基质的残留。如果是简单的等度洗脱, 这些基质会和目标分析物一起进入质谱, 势必造成一定的干扰, 降低目标物的响应者。因此, 采用梯度洗脱的方式, 将基质的干扰降到最低。

通过比较甲醇-超纯水、乙腈-超纯水、甲醇-1 mmol/L 乙酸铵和乙腈-1 mmol/L 乙酸铵等不同的流动相, 发现以甲醇-1 mmol/L 乙酸铵为流动相进行梯度洗脱时, 响应最高, 因此选用甲醇-1 mmol/L 乙酸铵作为流动相, 详见表 1。

3.2 质谱条件优化

在 ESI⁺模式电离下, 对杀铃脲农药的质谱条件进行了优化, 分别采用全扫描和子离子扫描方式优化, 得到了母离子、子离子及各自锥孔电压和碰撞能量, 选择分子离子峰[M+H]⁺作为母离子进行二级质谱分析, 以响应值最大的碎片离子(子离子)为定量离子, 次级响应离子为定性离子, 从而得到最优的质谱条件(表 2)。图 1 为 MRM 模式下杀铃脲农药的定量离子对的单通道扫描质谱图, 从图 1 可以看到, 杀铃脲的峰形尖锐、灵敏度高, 准确性强。运行过程中采用柱后阀切换模式进样进行质谱分析, 有助于降低对离子源的污染。

3.3 样品处理净化条件优化

3.3.1 提取剂优化

选择甲醇和乙腈两种溶液作为提取剂, 在添加水平为 0.01 mg/kg 时的结果表明: 甲醇的提取范围比较广, 很多杂质都会被甲醇提取出来, 对目标物分析会造成一定干扰, 回收率为 70.2%; 而采用乙腈提取, 回收率为 85.0%, 提取率很高(见图 2), 完全满足实验要求, 因此本方法选择乙腈作为提取剂。

3.3.2 固相萃取小柱优化

苹果样品中含有较多的糖分和有机酸, 会对目标物的检测产生干扰, 因此需要采用固相萃取柱净

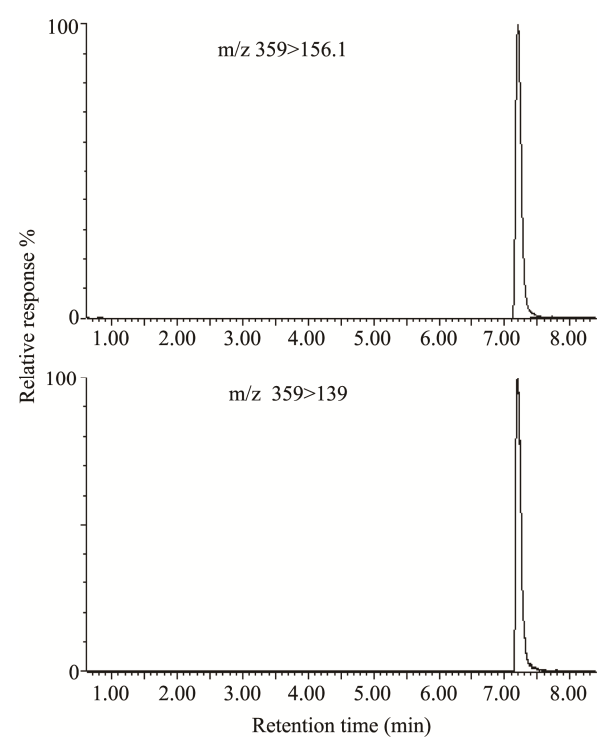


图 1 杀铃脲农药标准的提取离子色谱图
Fig. 1 Ion chromatographs of triflurumuron

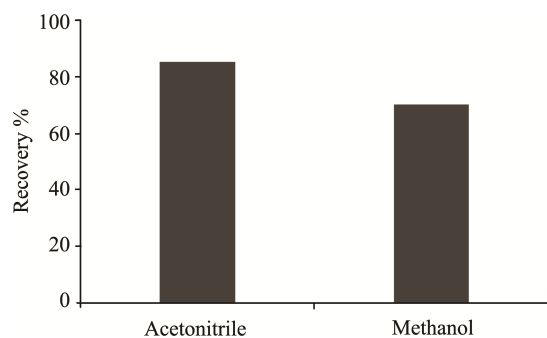


图 2 不同提取剂对杀铃脲农药在苹果样品中添加回收率的影响(添加水平为 0.1 mg/kg)
Fig. 2 Effect of different extraction solutions on recovery of triflurumuron in apple at level of 0.1 mg/kg

化。由于韩笑^[13]报导的蔬菜中杀铃脲的检测方法中采用中性氧化铝和石墨化炭黑研磨方法净化;而丁慧瑛^[14]报导的蔬菜中杀铃脲的检测方法中采用 *N*-丙基乙二胺(PSA)和 C_{18} 填料分散固相萃取净化,两种净化方法不仅操作繁杂,而且不利于苹果中果糖和有机酸的去除,氨基固相萃取净化小柱,可以有效去除苹果样品中的果糖和有机酸,且操作简单。通过研究表明,添加水平为 0.01 mg/kg 时的结果表明: C_{18} 回收率为 70.6%; 中性氧化铝回收率为 75.3%; 氨基固相

萃取小柱回收率为 80.0%。通过比较 C_{18} 、中性氧化铝和氨基固相萃取小柱发现,氨基固相萃取小柱的净化效果和回收率更好一些,因此我们选择氨基固相萃取小柱作为净化小柱。

3.4 线性方程、定量限、回收率和精密度

3.4.1 线性方程

以目标组分的峰面积 *Y* 对相应的质量浓度 *X*(mg/L)绘制标准曲线,对测定结果进行线性相关分析。结果表明,在 0.005~0.50 mg/L 范围内线性关系良好(表 3)。

表 3 杀铃脲农药的线性方程及线性相关系数
Table 3 Linear equation and correction coefficient of triflurumuron

农药	线性范围 (mg/L)	线性方程	线性系数 <i>r</i>
杀铃脲	0.005~0.50	$Y=1.57838\times10^6X+3141.93$	0.9970

3.4.2 定量限

定量限($S/N=10$)是指可以进行准确性和定量测定的最低水平,在该水平下得到的准确度^[15]。根据 10 倍信噪比确定的定量限(LOQ)为 0.0006 mg/kg,为配合实际样品和定量准确,本实验从 0.001 mg/kg 开始添加,通过添加回收率试验和准确定量的要求,发现添加浓度为 0.005 mg/kg,回收率和准确度符合定量限的要求,因此,苹果中杀铃脲农药的定量限通过实际添加回收率试验最终确定为 0.005 mg/kg,详见表 4。

表 4 杀铃脲农药的定量限测定结果($n=5$)
Table 4 LOQ of triflurumuron in apple ($n=5$)

农药名称	添加浓度 /mg/kg	回收率(%)	RSD(%)	定量限 (mg/kg)
杀铃脲	0.005	70.8(满足 60~120)	9.2(≤ 20)	0.005(满足)

3.4.3 回收率和精密度

方法的准确度是指所得结果与真实值的符合程度,农药残留检测方法的准确度一般用回收率进行评价。重复性一般做三个水平的实验,每个水平重复次数不少于 5 次。因此,在 3 组 5 个空白样品中分别添加水平至 0.01、0.02、0.05 mg/kg 的混合标准溶液,按照上述提取、色谱操作条件进行分析测定,计算回收率和精密度。结果表明,杀铃脲农药残留的平均回收率范围为 80.0%~84.8%; 5 次平行测定的相对标准

偏差范围为 4.9%~8.8%, 均满足定量分析要求, 结果见表 5。

表 5 杀铃脲农药的回收率及精密度测定结果($n=5$)
Table 5 Recoveries and precision of triflumuron in apple ($n=5$)

农药名称	定量限 (mg/kg)	添加水平 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD(%)
杀铃脲	0.005	0.01	80.0	8.8
		0.02	83.0	5.4
		0.05	84.8	4.9

3.4.4 实际样品检测

应用本方法对 10 份采集于超市中的苹果样品进行测定, 均未检出杀铃脲农药残留, 详细检测情况见图 3。下一步将扩大样品范围, 摸清我国目前苹果中杀铃脲农药的使用情况。

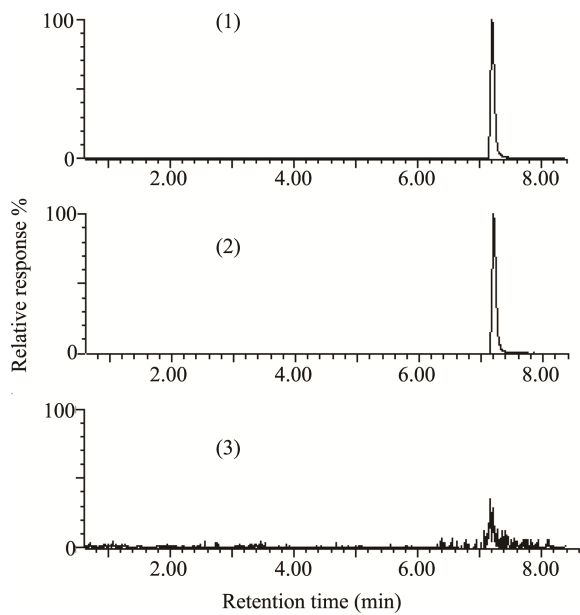


图 3 杀铃脲农药标准(上)、加标样品(中)、空白样品(下)的总离子流谱图

Fig. 3 Total ion chromatograms of standard (1); spiked sample(2);blank sample(3)

4 结 论

本实验建立了苹果中杀铃脲农药残留量的 UPLC-MS/MS 分析检测方法。本研究采用乙腈提取, 氨基固相萃取小柱净化后, 用 UPLC-MS/MS 进行分析, 在 8.5 min 内即可完成苹果中杀铃脲农药残留的

定性与定量检测, 杀铃脲的定量限为 0.005 mg/kg。该方法简单、快捷、灵敏度高、准确性强, 是苹果中杀铃脲农药残留检测比较理想的方法。

参考文献

[1] 刘衍忠, 高曙光, 刘东霞. 杀铃脲原药对大鼠的肝脏毒性[J]. 中国工业医学杂志, 2008, 20(3): 186–187.
Liu YZ, Gao SG, Liu DX. Hepatic toxicity of triflumuron pesticide in rats[J]. Chin J Ind Med, 2008, 20(3): 186–187.

[2] 宋长友, 徐秀军. 杀铃脲的合成[J]. 化学工程师, 2005, 19(4): 55–56, 72.
Song CY, Xu XJ. Synthesis of triflumuron [J]. Chem Eng, 2005, 19(4): 55–56, 72.

[3] Bicchi C, Balbo C, Amato AD, *et al.* SFC-UV Determination of Diflubenzuron Residues, Teflubenzuron and Triflumuron in Apple and Pear Pulpes for Baby Food [J]. Chromatographia, 2005, 43(7): 439–443.

[4] NY 1500.26.1-2007 农产品中农药最大残留限量 [S].
NY 1500.26.1-2007 Maximum Residue Limits for Pesticide Residue Trials [S].

[5] NY/T 1720-2009 水果、蔬菜中杀铃脲等其中苯甲酰脲类农药残留量的测定 高效液相色谱法 [S].
NY/T 1720-2009 Determination of Seven Benzoylurea Pesticides in Fruits and Vegetables by HPLC [S].

[6] 王恒, 赵洁, 陈志伟, 等. 高效液相色谱法同时测定含脂羊毛中残留的除虫脲和杀铃脲[J]. 色谱, 2008, 26(6): 740–743.
Wang H, Zhao J, Chen ZW, *et al.* Simultaneous determination of diflubenzuron and triflumuron residues in greasy wool using high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2008, 26(6): 740–743.

[7] 周建科, 杨冬霞, 徐鹏, 等. 微萃取/反相液相色谱法测定水中苯甲酰脲类农药[J]. 中国给水排水, 2011, 27(8): 96–98.
Zhou JK, Yang DX, Xu P. Determination of Benzoylurea Insecticides in Water by Microextraction Flask/Reversed-phase Liquid Chromatography[J]. China Water & Wastewater, 2011, 27(8): 96–98.

[8] 刘世勤, 李方实. 高效液相色谱法测定水体中的苯甲酰脲类杀虫剂残留量[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2010, 32(1): 1671–1672.
Liu SQ, Li FS. Determination of Benzoylurea Pesticide Residues in Water by High Performance Liquid Chromatography [J]. J Nanjing Univ Technol (Natural Science Edition), 2010, 32(1): 1671–1672.

[9] 黄永春, 王继军, 傅学起, 等. SPE-HPLC 测定黄瓜中除虫脲灭幼脲和杀铃脲的残留检测方法[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 615–618.

- Huang YC, Wang JJ, Fu XQ. Residual Quantity Determination of Diflubenzuron Miesouniao and Triflumuron in Cucumber Using SPE-HPLC [J]. J Agro-Environ Sci, 2004, 23(3): 615-618.
- [10] 樊苑牧, 黄绍棠, 俞雪钧, 等. 快速溶剂萃取-高效液相色谱法测定含脂羊毛中残留的除虫脲和杀铃脲[J]. 色谱, 2009, 27(4): 463-466.
- Fan YM, Huang ST, Yu XJ, *et al.* Determination of Diflubenzuron and Triflumuron Residues in Greasy Wool by Accelerated Solvent Extraction Technique and High Performance Liquid Chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2009, 27(4): 463-466.
- [11] 刘锦霞, 王美玲, 黄志强, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 10 种苯甲酰脲类杀虫剂[J]. 分析试验室, 2010, 29(9): 39-43.
- Liu JX, Wang ML, Huang ZQ, *et al.* Determination of 10 Benzoylureas Pesticides Residues in Pork Using High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2010, 29(9): 39-43.
- [12] 柳菡, 沈崇钰, 赵增运, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定大豆与玉米中的苯甲酰脲类农药残留[J]. 分析测试学报, 2010, 29(11): 1180-1184.
- Liu D, Shen CY, Zhen ZY, *et al.* Determination of Benzoylurea Insecticides Residues in Soya Beans and Corns by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2010, 29(11): 1180-1184.
- [13] 韩笑, 娄喜山, 张莉, 等. 基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法检测蔬菜中残留的苯甲酰脲类和双酰肼类杀虫剂[J]. 色谱, 2010, 28(4): 341-347.
- Han X, Lou XS, Zhang L, *et al.* Determination of Benzoylurea and Bishydrazide Pesticide Residues in Vegetables by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry With Matrix Solid Phase Dispersion [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(4): 341-347.
- [14] 丁慧瑛, 谢文, 周召千, 等. 蔬菜中 11 种苯甲酰脲类农药残留的液相色谱-串联质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(8): 970-974.
- Ding HY, Xie W, Zhou ZQ. Determination of 11 Benzoylurea Insecticides Residues in Vegetable by LC-MS/MS [J]. J Instrum Anal, 2009, 28(8): 970-974.
- [15] NY/T 788-2004 农药残留试验准则 [S].
- NY/T 788-2004 Guideline on Pesticide Residue Trials [S].
- (责任编辑: 赵静)

作者简介



刘春华, 助理研究员, 主要研究方向为农产品质量安全与检测。
E-mail: chunhualiu111@126.com