

QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法 测定苹果中丁醚脲及其代谢物残留量

王利强*, 葛含光, 王永芳, 葛宝坤

(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: **目的** 建立基于 QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱测定苹果中的丁醚脲及其代谢物丁醚脲-脲和丁醚脲-甲酰胺残留量的方法。**方法** 样品经乙腈提取后用 PSA 作为固相分散萃取剂净化除杂, 以 0.1%甲酸乙腈溶液和 0.1%甲酸水溶液(含 10 mmol/L 甲酸铵)为流动相进行梯度洗脱, 高效液相色谱-串联质谱法正离子多反应监测模式(MRM)测定。**结果** 丁醚脲及其代谢物在 5~100 $\mu\text{g/L}$ 的范围内有良好的线性, 相关系数(R^2)>0.999。定量限 5 $\mu\text{g/kg}$ 为以空白苹果为基质, 在 5、10、50 $\mu\text{g/kg}$ 三个水平的加标回收率范围在 78.3%~103.1%之间, 精密密度在 2.1%~8.2%之间。**结论** 该方法前处理快速简单, 可用于对进出口的苹果中丁醚脲及其代谢物的检测。**关键词:** 丁醚脲及其代谢物; QuEChERS; 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of diafenthiuron and its metabolites residue in apple by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Li-Qiang*, GE Han-Guang, WANG Yong-Fang, GE Bao-Kun

(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method to detect the diafenthiuron and its metabolites residue in apple by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted with acetonitrile and cleaned up by PSA. The separation was carried out with a gradient elution using 0.1% formic acid acetonitrile solution and 0.1% formic acid solution (10 mmol/L ammonium formate) as mobile phases. The analysis of diafenthiuron and its metabolites was performed under electrospray positive ionization MRM mode. **Results** A good linearity ($R^2 > 0.999$) was achieved for the target compounds in the range of 5~100 $\mu\text{g/L}$. The limit of quantification was 5 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries at the three spiked levels (5, 10, and 20 $\mu\text{g/kg}$) in the blank matrix were ranged from 78.3% to 103.1%, with the relative standard deviations varied from 2.1% to 8.2%. **Conclusion** The method is accurate and efficient, and can be applied to the determination of diafenthiuron and its metabolites residue in apple for import and export.

KEY WORDS: diafenthiuron and its metabolites; QuEChERS; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 天津检验检疫局科技计划项目(TK078-2013)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of TJCIQ (TK078-2013)

*通讯作者: 王利强, 工程师, 主要研究方向为食品农药残留检测。E-mail: wanglq@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: WANG Li-Qiang, Engineer, Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.158, Jingmen Avenue, Free Trade Zone, Tianjin 300461, China. E-mail: wanglq@tjciq.gov.cn

1 引言

丁醚脞(diafenthion), 化学名: 1-特丁基-3-(2,6-二异丙基-4-苯氧基苯基)硫脞, 是一种新型高效的硫脞类选择性杀虫、杀螨剂, 具有触杀、胃毒、内吸和熏蒸作用, 且具有一定的杀卵效果, 广泛用于对棉花、水果、蔬菜上的蚜虫、粉虱、叶蝉、夜蛾科害虫及害螨的防治和杀灭^[1-3]。丁醚脞在见光及水环境中易分解, 也可在植物体内发生降解, 产生比原药具有更大毒性的丁醚脞-甲酰胺(diafenthion-methanimidamide)和丁醚脞-脞(diafenthion-urea)两种主要代谢产物^[4,5]。研究表明丁醚脞对蜜蜂及鱼有较大的毒性^[6,7], 因此, 欧盟于 2002 年颁布的 2076/2002 号法规规定对丁醚脞实行禁用和禁售^[8]。

目前, 日本对苹果中丁醚脞及其代谢物的最大残留限量为 0.02 mg/kg, 欧盟等规定为 0.01 mg/kg, 而我国尚未对此有明确的限量要求。目前, 有关丁醚脞及其代谢物的同时测定的方法报道较少, 仅见于茶叶、棉花等^[9-11]。因此, 有必要建立合适的分析方法对苹果中的丁醚脞及其代谢物残留量进行测定, 用于对进出口苹果中丁醚脞的残留分析和风险评估, 保障食品安全。

QuEChERS 技术是近年来国际上最新发展起来的一种用于农产品检测的快速样品前处理技术, 由美国化学家 Lehotay 和德国的 Anastassiades 教授等于 2003 年提出^[12,13]。原理是利用吸附剂填料与基质中的杂质相互作用, 吸附杂质从而达到除杂净化的目的, 具有简单、快速、方便的优点。

近年来, 由于液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术具有高灵敏度、抗基质干扰能力强、定性准确等优点, 在农药残留检测方面的应用越来越广泛^[14,15]。本文采用液相色谱串联质谱结合 QuEChERS 技术, 建立了同时测定苹果中丁醚脞及其代谢物残留量的方法, 该方法准确、快速, 可以满足残留监控和风险评估的要求。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1290 高效液相色谱仪, Agilent 6460 三重四级杆质谱(美国 Agilent 公司), 配有电喷雾离子源(Jet-ESI)、Masshunter 色谱工作站; 十万分之一电

子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ3200 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

丁醚脞、丁醚脞-甲酰胺和丁醚脞-脞标准品, 均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯(美国 Thermo Fisher 公司), QuEChERS 试剂盒(美国 Agilent 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 液质分析条件

色谱条件: Agilent Eclipse plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 柱温 35 °C; 流动相 A 为 0.1%甲酸乙腈溶液, B 为 10 mmol/L 甲酸铵, 0.1%甲酸水溶液, 梯度程序为: 0~1 min 10% A, 1~8 min 从 10% A 线性增加至 100% A, 8~9 min 100% A; 进样量 10 μL; 流速为 0.4 mL/min。

质谱条件: 电喷雾离子(Jet-ESI)源, 检测方式正离子(ESI+)多反应检测(MRM)模式, 喷雾电压 3 kV; 干燥气及雾化气均为氮气, 干燥器温度 350 °C, 干燥气流量 10 L/min; 雾化气压力 45 psi, 倍增电压 400 V。

2.2.2 标准溶液配制

精密称取丁醚脞、丁醚脞-脞、丁醚脞-甲酰胺标准品 10.0 mg, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为 100 μg/mL 的混合标准品储备溶液, 避光保存。

制备空白苹果提取液, 用此提取液将丁醚脞、丁醚脞-脞、丁醚脞-甲酰胺混合储备液稀释成 100.0、50.0、20.0、10.0、5.0 ng/mL 的基质标准溶液, 于 4 °C 保存备用。

2.2.3 样品制备

准确称取 10.0 g 苹果样品(可食部分), 加入 10 mL 乙腈, 匀质 1 min, 静置 1 h, 加入 1 g NaCl 和 MgSO₄, 涡旋振荡 1 min, 5000 r/min 离心 5 min, 吸取 1 mL 上清液, 加入装有 40 mg 乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)和 150 mg 无水硫酸镁的离心管中, 涡旋振荡 1 min, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 待 HPLC-MS/MS 测定。

3 结果与讨论

3.1 液相和质谱条件优化

从化合物结构上看, 丁醚脞及其代谢物属于弱

极性化合物,在 C_{18} 色谱柱上应具有较强保留。考虑到苹果中含有较多的有机酸类、糖类等化合物,可能会对目标化合物分析造成干扰,为使目标化合物获得较好的分离和较小的干扰,减少质谱的基质效应的影响,本方法拟选取梯度洗脱模式,使有机酸类、糖类等极性较大的杂质先被洗脱下来,目标化合物在靠后的时间洗脱下来,获得较好的分离效果,减少杂质的干扰,提高对目标化合物的检测灵敏度;通过对流动相进行考察,采用0.1%甲酸的乙腈作为有机相,含有10 mmol/L 甲酸铵的0.1%甲酸水溶液作为水相,目标化合物可以获得很好的峰形;确定为最终的液相条件。

本方法采用电喷雾离子源(ESI),丁醚脲及其代谢物含有氨基集团,在正离子模式下有更好的响应,因此采用ESI+作为电离条件;选2.5、3、3.5 kV三个条件对毛细管电压进行优化,结果显示目标化合物在3 kV条件下响应最好,确定毛细管电压为3 kV;之后分别对丁醚脲、丁醚脲-脲和丁醚脲-脲进行一级质谱分析,确定其分子离子峰 $[M+H]^+$ 作为母离子,以母离子响应为指标,分别对毛细管出口电压(fragmentor)进行优化,确定最优参数进行二级质谱分析,选取响应最强的两个子离子,分别和母离子组合确定为定量离子对和定性离子对(见图1),并进一步优化碰撞电压使各个离子对信号响应最强,确定为各自的定量参数(见表1)。

3.2 样品前处理条件优化

为建立快速、方便的样品前处理方法,本研究拟

表1 丁醚脲及其代谢物残留定量测定的质谱参数

Table 1 MS/MS parameters for residue determination of diafenthiuron and its metabolites

化合物	分子式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	出口电压 (V)	碰撞能量 (eV)
丁醚脲	$C_{23}H_{32}N_2OS$	385.1	329.0*	100	17
			278.0		33
丁醚脲-脲	$C_{23}H_{32}N_2O_2$	369.2	229.1*	150	25
			271.1		17
丁醚脲-甲酰胺	$C_{23}H_{32}N_2O$	353.3	297.3*	85	18
			280.2		25

*: 定量离子(quantitation ion)

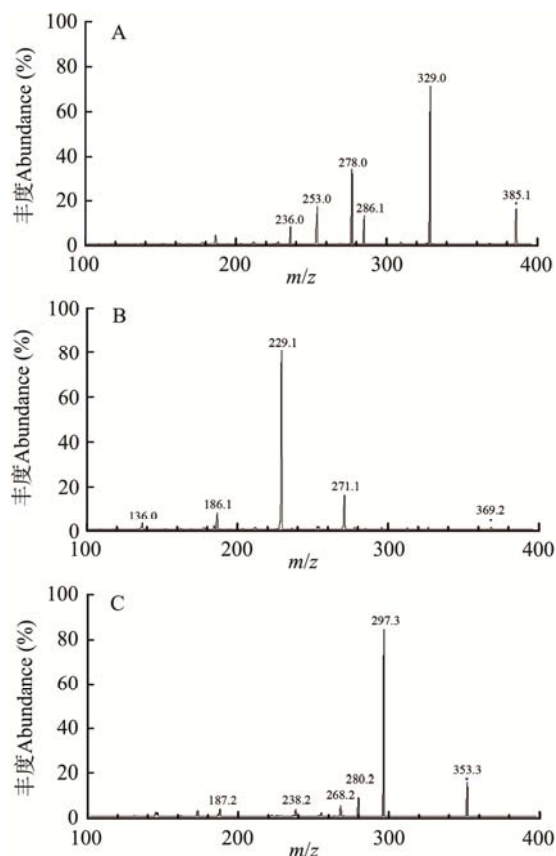


图1 丁醚脲及其代谢物二级质谱图

Fig. 1 MS/MS spectrum of diafenthiuron and its metabolites

A: 丁醚脲; B: 丁醚脲-脲; C: 丁醚脲甲酰胺
A: diafenthiuron; B: diafenthiuron-urea; C: diafenthiuron-methanimidamide

以 QuEChERS 方法为基础进行样品前处理,针对含有较多的有机酸和糖类物质的苹果样品,本研究选用 PSA 作为固相萃取吸附剂, $MgSO_4$ 去除多余的水分并提高样品分布,并对二者的使用量和比例进行考察。PSA 使用量为 40 mg, $MgSO_4$ 使用量为 150 mg 时,效果最佳,目标物和杂质能够完全分离(图 2),确定为最终的样品处理方法。

3.3 分析方法的评价

3.3.1 线性方程、相关系数、检出限和定量限

以空白苹果样品作为稀释液,加入不同浓度的丁醚脲、丁醚脲-脲、丁醚脲-甲酰胺混合储备液配制基质工作曲线,浓度分别为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL,按本文确定的条件分别测定,以待测物峰面积对质量浓度作线性回归方程。结果表明:丁醚脲、丁醚脲-脲、丁醚脲-甲酰胺三个目标化合物在 5.0~100.0 ng/mL 范围内呈现良好的线性关系,线性

方程和相关系数见表 2。根据信噪比 $S/N=3$ 计算, 本方法三个目标化合物的检出限均为 $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$; 定量限为 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.3.2 方法学考察

在空白苹果样品中添加 3 个水平(5.0、10.0 和 $50.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)的丁醚脞、丁醚脞-脞、丁醚脞-甲酰胺,

每个水平做 6 个平行样品, 按照“2.2.3”样品制备方法进行处理, 分别进行加标回收率实验和精密度实验, 结果见表 3。由表 3 可知, 3 种化合物的回收率范围为 78.3%~103.1%, 相对标准偏差为 2.1%~8.2%, 方法的准确度和精密度均达到残留分析方法的要求。

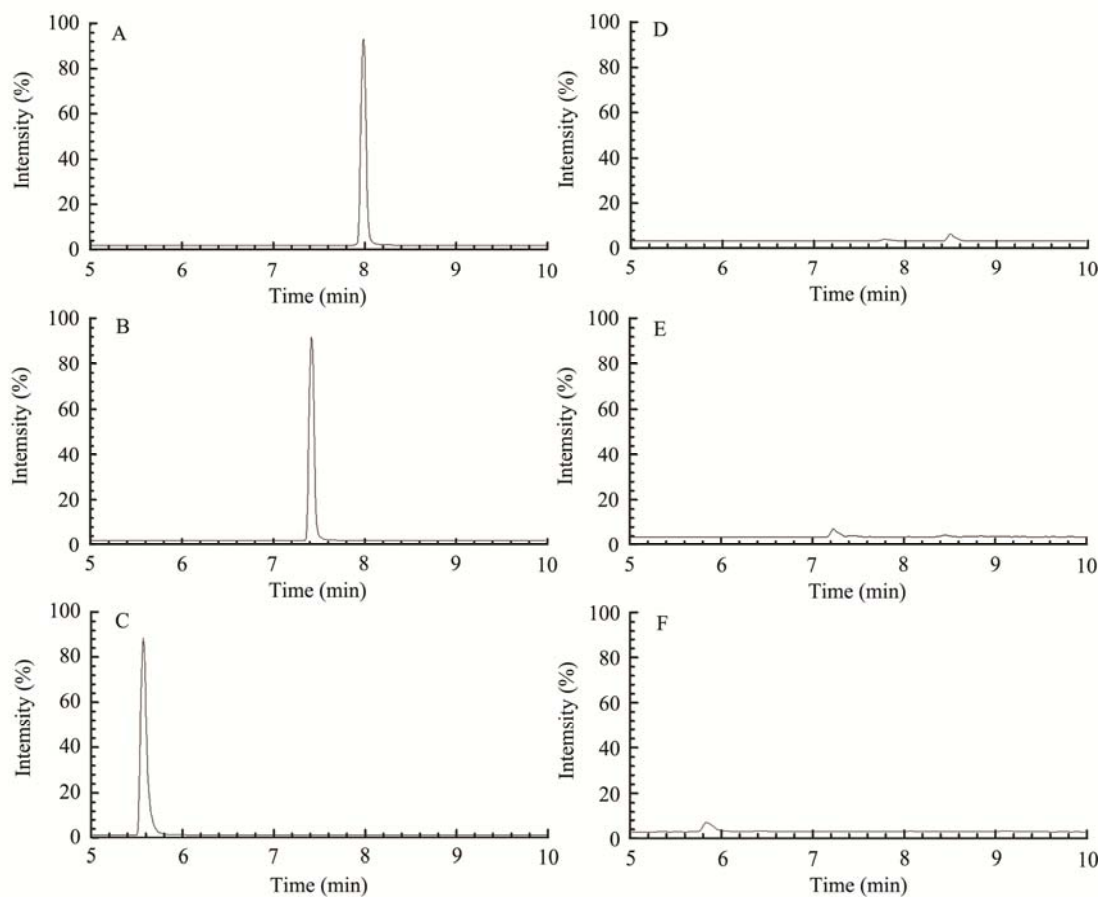


图 2 丁醚脞及其代谢物标准溶液和空白苹果基质中三种物质色谱图

Fig. 2 Chromatography of diafenthiuron and its metabolites standard solution and blank matrix solution

A: 丁醚脞; B: 丁醚脞-脞; C: 丁醚脞甲酰胺; D: 空白苹果基质中丁醚脞; E: 空白苹果基质中丁醚脞-脞;

F: 空白苹果基质中丁醚脞甲酰胺

A: diafenthiuron; B: diafenthiuron-urea; C: diafenthiuron-methanimidamide; D: diafenthiuron in blank matrix solution;

E: diafenthiuron-urea in blank matrix solution; F: diafenthiuron-methanimidamide in blank matrix solution

表 2 丁醚脞及其代谢物的线性方程、相关系数和定量限

Table 2 The linear equation, related coefficient and limit of detection of diafenthiuron and its metabolites

化合物	线性方程	相关系数 (R^2)	定量限 LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
丁醚脞	$Y=7866X+14539$	0.9996	5.0
丁醚脞-脞	$Y=5783X+21680$	0.9991	5.0
丁醚脞-甲酰胺	$Y=1696X+50595$	0.9993	5.0

表 3 丁醚脲及其代谢物在空白基质中的添加回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Average recoveries, relative standard deviation (RSD) of diafenthiuron and its metabolites ($n=6$)

化合物	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回收率 (%)	精密度 RSD (%)
丁醚脲	5	78.3	7.3
	10	83.1	5.1
	50	89.4	2.7
丁醚脲-脲	5	81.8	8.2
	10	86.9	4.8
	50	93.4	2.1
丁醚脲-甲酰胺	5	103.1	6.4
	10	88.3	4.9
	50	94.9	3.7

3.4 实际样品的测定

采用本方法对进出口的 28 个批次的苹果样品进行检测,并未检测到丁醚脲,在 1 个样品中检测到其代谢物丁醚脲-脲和丁醚脲-甲酰胺,含量分别为为 5.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 6.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

4 结 论

本文建立了基于 QuEChERS-高效液相色谱串联质谱同时测定苹果中的丁醚脲及其代谢物丁醚脲-脲和丁醚脲-甲酰胺残留量的方法。该方法前处理快速简单,回收率稳定且重现性较好,可用于对进出口的苹果中丁醚脲及其代谢物的检测,能满足残留监控和风险评估的要求。

参考文献

- [1] Wang L, Zhao P, Zhang F, *et al.* Diafenthiuron residue and decline in pakchoi and soil under field application [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012, (79): 75–9.
- [2] 刘刚. 新型果蔬杀虫杀螨剂-丁醚脲[J]. *西北园艺*, 2006, (4): 53–53.
Liu G. New fruits and vegetables pesticide-diafenthiuron [J]. *Northwest Hortic*, 2006, (4): 53–53.
- [3] Ruder F, Kayser H. The thiourea insecticide diafenthiuron inhibits mitochondrial ATPase in vitro and in vivo by its carbodiimide product [J]. *Biochem Soc Trans*, 1994, 22(1): 241–244.
- [4] Keum YS, Liu KH, Seo JS, *et al.* Dissipation of foliar residues of diafenthiuron and its metabolites [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2002, 68(6): 845–851.
- [5] Yang M, Zhang P, Hu L, *et al.* Ionic liquid-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of floating organic droplets combined with high performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1360 (19): 47–56
- [6] 高亚男, 单正军, 程燕, 等. 丁醚脲农药对 3 种水生生物的风险评价[J]. *生态与农村环境学报*, 2010, (5): 487–491.
Gao YN, Shan ZJ, Cheng Y, *et al.* Risk assessment of diafenthiuron to three species of aquatic organisms [J]. *J Ecol Rural Environ*, 2010, (5): 487–491.
- [7] Stanley J, Chandrasekaran S, Preetha G, *et al.* Toxicity of diafenthiuron to honey bees in laboratory, semi-field and field conditions [J]. *Pest Manag Sci*, 2010, 66(5): 505–510.
- [8] Commission Regulation (EC), No. 2076 /2002, 2002
- [9] 张新忠, 罗逢健, 刘光明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶和土壤中丁醚脲及其代谢物的残留[J]. *分析化学*, 2011, 39(9): 1329–1335
Zhang XZ, Luo FJ, Liu GM, *et al.* Determination of diafenthiuron and its metabolites in tea and soil by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(9): 1329–1335

- 1329–1335.
- [10] 刘艳萍, 王思威, 孙海滨, 等. 丁醚脞在柑橘及其土壤中的残留及消解动态[J]. 农药学学报, 2013, 15(6): 673–678.
Liu YP, Wang SW, Sun HB, *et al.* Residues and decline study of diafenthiuron in orange and soil [J]. Chin J Pest Sci, 2013, 15(6): 673–678.
- [11] 马婧玮, 张军锋, 李萌, 等. 丁醚脞在棉花及土壤中的残留消解动态[J]. 农药, 2014, 53(3): 200–202.
Ma JW, Zhang JF, Li M, *et al.* Residue dynamics of diafenthiuron in cotton and soil [J]. Agrochemicals, 2014, 53(3): 200–202.
- [12] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce [J]. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412–431.
- [13] Lehotay SJ. QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods [J]. Method Mol Biol, 2011, 747: 65–91.
- [14] Tadeo JL, Pérez RA, Albero B. Review of sample preparation techniques for the analysis of pesticide residues in soil [J]. J AOAC Int, 2012, 95(5): 1258–1271.
- [15] Golge O, Kabak B. Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes[J]. Food Chem, 2015, 176(1): 319–32.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王利强, 工程师, 主要研究方向为食品农药残留检测。

E-mail: wanglq@tjciq.gov.cn