

超高效液相色谱-串联质谱法同时检测柑橘样品中 氟吡呋喃酮及其代谢物残留

李双双¹, 欧晓明^{1,2,3*}, 金晨钟^{1*}, 晏姣¹, 张贵群^{2,3}, 梁骥^{2,3}, 梁贵平^{2,3}

- (1. 湖南人文科技学院 农药无害化应用重点实验室/湖南省农田杂草防控技术与应用协同创新中心, 湖南 娄底 417000; 2. 湖南化工研究院 国家农药创制工程技术研究中心, 湖南 长沙 410014;
3. 湖南加法检测有限公司, 湖南 长沙 410014)

摘要: 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术建立了同时检测柑橘全果、橘肉及橘皮中氟吡呋喃酮及其代谢物二氟乙酸(DFA)、6-氯烟酸(6-CNA)和二氟乙氨基呋喃酮(DFEAF)残留的分析方法。样品经乙腈提取,分散固相萃取(PSA)净化,采用电喷雾电离(ESI^+/ESI^-)快速正负切换模式,多反应监测模式(MRM)扫描,外标法定量。结果表明,氟吡呋喃酮及其代谢物在1~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数为0.9979~0.9996,检出限为0.001 mg/L;在0.05、0.3、2 mg/kg加标水平下,柑橘全果、果肉中氟吡呋喃酮及其代谢物的回收率为71.9%~106%,相对标准偏差(RSD)为0.8%~9.1%;在0.1、0.3、3 mg/kg加标水平下,柑橘果皮的回收率为77.9%~100%,RSD为1.2%~6.5%。氟吡呋喃酮及其代谢物在柑橘全果、橘肉和橘皮中的定量下限(LOQ)分别为0.05、0.05、0.1 mg/kg。该方法操作简便、快速准确,适于柑橘基质中氟吡呋喃酮及其代谢物残留量的快速检测。

关键词: 农药残留; 氟吡呋喃酮; 代谢产物; 柑橘; 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)

中图分类号: O657.7; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2018)11-1354-05

Simultaneous Determination of Flupyradifurone and Its Metabolites in Citrus Samples Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Shuang-shuang¹, OU Xiao-ming^{1,2,3*}, JIN Chen-zhong^{1*}, YAN Jiao¹,
ZHANG Gui-qun^{2,3}, LIANG Ji^{2,3}, LIANG Gui-ping^{2,3}

- (1. Key Laboratory of Pesticide Harmless Application/Hunan Provincial Collaborative Innovation Center for Field Weeds Control, Hunan University of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, China; 2. National Engineering Center for Agrochemicals, Hunan Research Institute of Chemical Industry, Changsha 410014, China;
3. Hunan J&F Test Co. Ltd., Changsha 410014, China)

Abstract: An analytical method was developed for the simultaneous detection of flupyradifurone and its three metabolites i. e. difluoroacetic acid (DFA), 6-chloronicotinic acid (6-CNA) and difluoroethylaminofuranone (DFEA) in citrus by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Citrus samples were extracted with acetonitrile, and cleaned up by dispersive solid-phase extraction (PSA). The analytes were detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode under alternate positive/negative electrospray ionization (ESI^+/ESI^-) mode, and quantified by the external standard method. The results showed that there were good linearities for flupyradifurone and its metabolites in their respective concentration ranges with correlation coefficients of 0.9979-0.9996. The limits of detection were 0.001 mg/L. The average recoveries for the analytes in the whole citrus fruit and fruit pulp at spiked levels of 0.05, 0.3 and 2 mg/kg ranged from 71.9% to 106% with relative standard deviations (RSDs) of 0.8% - 9.1%. The average recoveries of the analytes in citrus fruit peel at spiked levels of 0.1, 0.3 and 3 mg/kg ranged from 77.9% to

收稿日期: 2018-04-03; 修回日期: 2018-05-17

基金项目: 湖南省高校产业化培育项目(13CY030); 湖南省高校创新平台开放基金项目(15K066); 湖南人文科技学院产学研合作引导项目(2013CXY04); 湖南省2017年研究生创新科研项目(CX2017B779)

* 通讯作者: 欧晓明, 博士, 研究员, 研究方向: 农药残留化学, E-mail: xmouhn@163.com
金晨钟, 教授, 研究方向: 植物保护, E-mail: hnljcz@sina.com

100% with relative standard deviations (RSDs) of 1.2% – 6.5%. The limits of quantitation (LOQs) for flupyradifurone and its metabolites in the whole citrus fruit, fruit pulp and peel were 0.05, 0.05 and 0.1 mg/kg, respectively. The method is simple, stable, rapid and sensitive, and is suitable for the determination of flupyradifurone and its metabolites in citrus samples.

Key words: pesticide residue; flupyradifurone; metabolites; citrus; ultrahigh performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS)

氟吡呋喃酮 (Flupyradifurone), 商品名为 Sivanto 或 Sivanto Prime, 化学名为 4-[(6-氯-3-吡啶基甲基)(2, 2-二氟乙基)氨基]呋喃-2(5H)-酮, 是德国拜耳公司开发的一种新型丁烯酸内酯类杀虫剂, 可作用于靶标害虫的中枢神经系统, 为昆虫烟碱乙酰胆碱受体激动剂, 主要登记用于防治蔬菜、果树、棉花、大豆等作物的蚜虫、粉虱、木虱、叶蝉等害虫, 表现出明显的内吸、触杀、胃毒、渗透和选择作用, 且对蜜蜂安全^[1-2], 其代谢物为二氟乙酸 (DFA)、二氟乙氨基呋喃酮 (DFEAF) 和 6-氯烟酸 (6-CNA)。目前针对氟吡呋喃酮的研究主要集中于合成和应用方面, 如杨吉春^[3]、曹庆亮^[4]、赵国建^[5]等研究了氟吡呋喃酮的合成, 陈敏^[6]、胡菡青^[7]等进行了氟吡呋喃酮对番茄烟粉虱和柑橘木虱的田间药效试验, 武鹏等^[8]报道了氟吡呋喃酮的原药分析方法, 而有关氟吡呋喃酮及其代谢物在柑橘上的残留分析方法及其在环境中的归趋研究尚未见报道^[9-12]。基于此, 本文采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱技术 (UPLC – MS/MS) 建立了同时检测柑橘样品中氟吡呋喃酮及其代谢物残留的方法, 以期为该药剂在柑橘生态系统中的合理安全用药及其环境安全评价提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1290 – 646 型超高效液相色谱 – 三重四极杆质谱仪 (美国安捷伦公司), AL204 型电子天平 (瑞士梅特勒·托利多仪器有限公司), Scout SE 型百分之一电子天平 (奥豪斯公司), HY – B1 型回旋振荡器 (金坛市医疗仪器厂), Vortex – 5 型涡旋混合仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), Zonkia SC – 3614 型低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

乙腈 (质谱纯, Honeywell 公司), 甲酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 氯化钠 (分析纯, 西陇化工公司), PSA 填料 (北京安捷飞科技有限公司); 标准品: 氟吡呋喃酮 (纯度 99.4%)、二氟乙酸 (DFA, 纯度 95.5%)、二氟乙氨基呋喃酮 (DFEAF, 纯度 99.3%)、6-氯烟酸 (6-CNA, 纯度 98.9%) 均由湖南化工研究院国家农药创制工程技术研究中心提供。实验用水为超纯水 (自制)。

1.2 样品分析方法

1.2.1 提取与净化 准确称取适量柑橘样品 (柑橘皮 10 g、柑橘全果 20 g) 于 150 mL 具塞锥形瓶中, 加入 40 mL 乙腈, 回旋振荡 1 h, 静置取上清液 2 mL, 加 200 mg PSA, 涡旋 20 s, 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 有机相滤膜至进样瓶中, 待测。

称取柑橘橘肉 20 g 于 150 mL 具塞锥形瓶中, 加入 40 mL 乙腈, 回旋振荡 1 h, 提取液转移至 100 mL 具塞量筒中, 加入 5 g NaCl, 剧烈摇动, 静置 10 min, 上清液过 0.22 μm 有机相滤膜至进样瓶中, 待测。

1.2.2 分析条件 色谱条件: Thermo Hypercarb 色谱柱 (100 mm × 3 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 – 0.1% 甲酸溶液 (70 : 30, 体积比), 等度洗脱, 流速 0.4 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。

质谱条件: 多反应监测模式 (MRM), 正负离子扫描 (ESI), 离子喷雾电压 3 500 V, 雾化气压力 103.4 kPa, 干燥气温度 350 °C, 干燥气流速 7 L/min。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的确定

取 1 mg/L 的氟吡呋喃酮及代谢物混合标准溶液, 用针泵进样的方式, 首先进行全扫描 (Q1scan), 确定各成分的母离子, 其次通过 MS² SIM 确定锥孔电压 (DP), 再用 Product Ion 功能找出子离子并确定碰撞能量 (CE), 最后用 MRM 扫描的方式优化各质谱参数。

氟吡呋喃酮及其 3 个代谢产物均含氨基或羰基, 易形成稳定的 $[M + H]^+$ 的准分子离子, 配制 1 mg/L 的标准溶液, 使用两通连接液相色谱与质谱, 在正离子模式下全扫描得到氟吡呋喃酮母离子(m/z 288.8)和 DFEAF 母离子(m/z 164.0); 在负离子模式下全扫描得到 6-CNA 母离子(m/z 156.0)和 DFA 母离子(m/z 95.1)。将分子离子作为母离子, 给予一定的碰撞能量和碰撞气体, 全扫描二级离子, 选取丰度较强、干扰较小的 2 个子离子分别作为定性及定量离子(见表 1)。

2.2 碎裂电压与碰撞能量的优化

以氟吡呋喃酮为例对碎裂电压进行优化。将氟吡呋喃酮配成 1 mg/L 的标准溶液, 以 10 μ L 进样。初步考察了碎裂电压为 200、150、100、50、20 V 时的响应值, 结果显示 150~200 V 之间的响应值较高; 再考察了碎裂电压为 200、180、160、140、120 V 时的响应值, 结果显示 160 V 出现最大响应值; 最后将电压设定为 175、170、165、160、155、150 V, 结果显示电压为 165 V 时响应值最大。实验选择氟吡呋喃酮、DFEAF、6-CNA、DFA 的最优碎裂电压分别为 165、100、50、35 V。

在最优电压条件下, 以氟吡呋喃酮为例对碰撞能量进行优化。将氟吡呋喃酮配成 1 mg/L 的标准溶液, 进样 10 μ L。先将碰撞能量设置为 50、40、30、20、10、5 V, 结果显示子离子 m/z 288.8/125.8 在 20 V 时出现最大响应值, m/z 288.8/89.9 在 30 V 时出现最大响应值; 再细分各子离子的碰撞能量, 发现子离子 m/z 288.8/125.8 在 22 V 时出现最大响应值, m/z 288.8/89.9 在 34 V 时出现最大响应值。氟吡呋喃酮及其代谢物优化后的碎裂电压和碰撞能量等质谱参数见表 1。

表 1 氟吡呋喃酮及其代谢物的质谱检测参数
Table 1 MS/MS conditions of flupyradifurone and its metabolites

Compound	Retention time (min)	Quantitative ions (m/z)	Qualitative ions (m/z)	DP (V)	CE (V)	Scanning method
Flupyradifurone	3.725	288.8/125.8	288.8/125.8, 288.8/89.9	165	22, 34	Kation
DFEAF	1.697	164.0/55.1	164.0/55.1, 164.0/65.1	100	26	Kation
6-CNA	5.504	156.0/112.1	156.0/112.1, 156.0/35.2	50	10	Anion
DFA	2.743	95.1/51.2	95.1/51.2	35	16	Anion

2.3 流动相的优化

实验对比了甲醇-水和乙腈-水作为流动相时的质谱响应, 发现乙腈-水为流动相时氟吡呋喃酮及其 3 个代谢产物的质谱响应更好, 因此采用乙腈作为流动相中的有机相。另外, 考察了在水相中分别添加 0.1% 甲酸、1.0 mol/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸-1.0 mol/L 乙酸铵对色谱分离及灵敏度的影响, 结果显示 3 种添加剂对目标分析物的色谱峰形及分离的影响差别不大, 但添加少量甲酸后, 各化合物的离子化效率更高, 灵敏度更好, 且添加甲酸的效果好于添加乙酸铵。基于此, 本实验最终采用乙腈-0.1% 甲酸溶液作为流动相。

2.4 吸附剂的优化

分别考察了不同质量的 PSA 对净化效果和回收率的影响, 结果发现 PSA 用量为 50、100、200、400 mg 时, 氟吡呋喃酮及其代谢物的回收率分别为 52%~69%、67%~86%、89%~100%、70%~84%。本实验最终选用 200 mg PSA 作为吸附剂。

2.5 基质效应的考察

基质效应(Matrix effects, ME)是指基质中的共提取干扰物质影响目标化合物的离子化, 从而使目标化合物在仪器上的响应发生增强或抑制的现象^[13]。因此在进行农残测定时, 对目标化合物在不同基质中的基质效应进行评价尤为重要。本文采用较为常用的相对响应值法评价基质效应: $ME = (B/A - 1) \times 100\%$, 其中 A 为纯溶剂中化合物的响应值, B 为柑橘基质中添加相同浓度农药的响应值^[14]。实验考察了 0.05、0.1、0.5 mg/L 3 个加标水平下 4 种化合物在全果、果肉、果皮 3 种柑橘基质中的基质效应。结果表明, 在上述 3 个水平下的基质效应分别为 -16.65%~9.68%、18.76%~8.29% 和 -15.91%~10.59%, 基质效应均小于 20%, 属于弱基效应, 对结果影响较小。

2.6 线性关系与定量下限

将 500 mg/L 的氟吡呋喃酮及其代谢物混合标准溶液用乙腈稀释配成 1、5、10、50、100、500 μ g/L

的系列混合标准工作溶液,按“1.2.2”的色谱条件进行测定。以监测离子峰面积(y)对相应质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)作标准曲线,得到氟吡呋喃酮及其代谢物的线性方程。结果表明,在1~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内,氟吡呋喃酮及其代谢物的峰面积与质量浓度呈良好的线性关系,相关系数(r^2)为0.997 9~0.999 6。

定量下限(LOQ)采用加标回收率进行验证,以符合一定的准确度和精密度要求的最低加标浓度确定为定量下限。经验证,该方法的检出限(LOD, $S/N=3$)为0.001 mg/L,氟吡呋喃酮及其代谢物在柑橘全果、橘肉中的LOQ为0.05 mg/kg,橘皮中的LOQ为0.1 mg/kg。与其他方法^[9-11]相比,本方法的分析时间更短,检出限低于或接近已有方法,灵敏度较高。

2.7 加标回收率与相对标准偏差

采用基质匹配标准溶液外标法定量,在空白柑橘基质中对氟吡呋喃酮及其代谢物进行3个浓度水平的加标回收实验,每个水平处理5个重复,按“1.2.2”的方法进行测定,计算回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表2。由表2可见,氟吡呋喃酮及其代谢物在柑橘全果、果肉中的回收率为71.9%~106%,RSD为0.8%~9.1%;柑橘果皮中的回收率为77.9%~100%,RSD为1.2%~6.5%,说明该方法的精密度和准确度均符合农药残留分析的基本要求^[15]。

表2 氟吡呋喃酮及其代谢物在柑橘样品中添加回收率
Table 2 The recovery of flupyradifurone and its metabolites in citrus samples

Matrix	Compound	Added (mg/kg)	Average recovery (%)	RSD (%)
Citrus fruit	Flupyradifurone	0.05, 0.3, 2	85.8, 81.7, 106	3.2, 1.0, 0.8
	DFEAF	0.05, 0.3, 2	89.3, 77.4, 104	5.3, 3.4, 1.4
	6-CNA	0.05, 0.3, 2	86.1, 76.8, 97.2	4.4, 1.4, 5.5
	DFA	0.05, 0.3, 2	89.3, 74.3, 91.0	3.3, 2.2, 4.0
Citrus pulp	Flupyradifurone	0.05, 0.3, 2	98.3, 94.6, 82.2	8.8, 1.6, 3.3
	DFEAF	0.05, 0.3, 2	81.7, 71.9, 72.4	9.1, 1.6, 1.6
	6-CNA	0.05, 0.3, 2	99.6, 104, 87.9	5.3, 1.7, 6.3
	DFA	0.05, 0.3, 2	95.4, 86.9, 86.6	5.6, 2.2, 1.7
Citrus peel	Flupyradifurone	0.1, 0.3, 3	97.5, 88.9, 100	1.2, 1.4, 3.5
	DFEAF	0.1, 0.3, 3	100, 94.7, 87.0	3.7, 1.9, 4.3
	6-CNA	0.1, 0.3, 3	82.2, 77.9, 85.2	6.5, 2.9, 3.4
	DFA	0.1, 0.3, 3	86.2, 81.7, 87.9	3.4, 3.3, 3.2

2.8 实际样品的分析

根据《农药残留试验准则》^[15]和《农药登记残留田间试验标准操作规程》^[16]进行了17%氟吡呋喃酮溶液在柑橘作物上的最终残留田间试验,有效成分用量分别为低剂量制剂2 000倍液(有效成分100 mg/kg)和高剂量制剂1 333倍液(有效成分150 mg/kg),各设3次施药和4次施药两个处理,另设清水空白对照,处理间设保护带,施药间隔期为10 d,每个处理重复3次,末次施药后间隔14、21、28 d采集柑橘样品,按照“1.2.2”方法测定氟吡呋喃酮及其代谢物在柑橘中的最终残留量,结果见表3。由表3可见,氟吡呋喃酮相较于其代谢产物的检出率更高,且在柑橘果皮中的检出浓度较高。

表3 氟吡呋喃酮及其代谢物在实际柑橘样品中的残留量
Table 3 Detection data of flupyradifurone and its metabolites in citrus field samples

Compound	Effective dose (mg/kg)	Times of application	Residual quantity (mg/kg)		
			Citrus fruit	Citrus pulp	Citrus peel
Flupyradifurone	100	3	0.053 6~0.326	<0.05~0.077 4	0.171~0.954
		4	0.053 2~0.297	<0.05~0.125	0.171~0.894
	150	3	0.088 5~0.370	<0.05~0.176	0.330~1.79
		4	0.063 1~0.585	<0.05~0.131	0.423~1.90
DFDAF	100	3	<0.05	<0.05	<0.1
		4	<0.05	<0.05	<0.1
	150	3	<0.05	<0.05	<0.1
		4	<0.05	<0.05	<0.1
6-CNA	100	3	<0.05	<0.05	<0.1

(续表 3)

Compound	Effective dose (mg/kg)	Times of application	Residual quantity (mg/kg)			
			Citrus fruit	Citrus pulp	Citrus peel	
DFA	150	4	<0.05	<0.05	<0.1	
		3	<0.05	<0.05	<0.1	
		4	<0.05	<0.05	<0.1	
	100	3	<0.05	<0.05	<0.1	
		4	<0.05	<0.05	<0.1	
		150	3	<0.05 ~ 0.051 8	<0.05	<0.1 ~ 0.122
			4	<0.05	<0.05	<0.1 ~ 0.116

3 结 论

本文采用 UPLC-MS/MS 技术建立了同时检测柑橘全果、果肉、果皮中氟吡呋喃酮及其代谢物残留量的定性定量分析方法。样品以乙腈提取,经分散固相萃取净化,直接上机分析,较常用的液相色谱法缩短了样品前处理的时间。该方法选择性强、重现性好、灵敏度高,且前处理简单,溶剂用量少,适用于柑橘样品中氟吡呋喃酮及其代谢物的快速检测,并成功应用于实际样品的测定。

参考文献:

- [1] Zhang Y F. *World Pestic.* (张翼翹. 世界农药), **2015**, 37(6): 62-63.
- [2] Xiao H. *World Pestic.* (筱禾. 世界农药), **2014**, 36(3): 59.
- [3] Yang J C, Wu Q, Song Y Q, Yang F, Liu C L. *Agrochemicals*(杨吉春, 吴峤, 宋玉泉, 杨帆, 刘长令. 农药), **2013**, 52(8): 561-562.
- [4] Cao Q L, Zhao X S, Xie X. *Mod. Agrochem.* (曹庆亮, 赵雪松, 谢欣. 现代农药), **2013**, (1): 26-27.
- [5] Zhao G J. *Zhejiang Chem. Ind.* (赵国建. 浙江化工), **2014**, (6): 9-12.
- [6] Chen M, Luan B H, Yi X J, Shi J, Wang P S. *Agrochemicals*(陈敏, 栾炳辉, 衣先家, 石洁, 王培松. 农药), **2017**, 56(5): 380-383.
- [7] Hu H Q, Wang X D, Lin X J, Yang C Y, Chen J, Fan G C. *Agrochemicals*(胡菡青, 王贤达, 林雄杰, 杨川毓, 陈瑾, 范国成. 农药), **2017**, 56(4): 297-299.
- [8] Wu P, Huang W, Wu J L. *Pestic. Sci. Admin.* (武鹏, 黄伟, 吴进龙. 农药科学与管理), **2016**, (7): 38-40.
- [9] Campbell J W, Cabrera A R, Stanley-Stahr C, Ellis J D. *J. Econom. Entomol.*, **2016**, 109(5): 186.
- [10] Xue D C, Meeja Seo, Lukasz L, Stelinski L L. *Crop Protect.*, **2017**, 98: 102-107.
- [11] Berset J D, Mermer S, Robel A E, Walton V M, Chien M L, Field J A. *J. Chromatogr. A*, **2017**, 1506: 45-54.
- [12] Li Y, Liu X J, Wu X H, Dong F S, Xu J, Zheng Y Q. *J. Sep. Sci.*, **2016**, 39(6): 1090-1098.
- [13] Xiang P, Shen M, Zhuo X Y. *J. Instrum. Anal.* (向平, 沈敏, 卓先义. 分析测试学报), **2009**, 28(6): 753-756.
- [14] Li L Y, Xu X M, Lin H, Qian H, Huang X D, Liu G Y, Zheng S N, Xu D H, Pei Z G. *J. Instrum. Anal.* (李凌云, 许晓敏, 林桓, 钱洪, 黄晓冬, 刘广洋, 郑姝宁, 徐东辉, 裴志国. 分析测试学报), **2018**, 37(1): 98-102.
- [15] NY/T788-2004. Institute for the Control of Agrochemicals. Pesticide Residue Test Guidelines(农业部农药检定所. 农药残留试验准则), **2004**.
- [16] Institute for the Control of Agrochemicals. Standard Operating Procedures on Pesticide Registration Residue Field Trials. Beijing: Standards Press of China(农业部农药检定所. 农药登记残留田间试验标准操作规程. 北京: 中国标准出版社), **2007**.