DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260322002
引用格式: 喻丽, 杨开放, 李灿, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同步测定猕猴桃中氯吡脲及其代谢产物[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(17): 17–25.
Yu Li, Yang Kaifang, Li Can, et al. Simultaneous determination of forchlorfenuron and its metabolites in *Actinidia chinensis* Planch by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(17): 17–25. (in Chinese with English abstract).

QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同步测定猕猴桃中氯吡脲及其代谢产物

喻　丽[1], 杨开放[1], 李　灿[2], 向　俊[2], 邓放明[1], 林树花[3,4*], 赖灯妮[3,4*]

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙　410128; 2. 湖南省产商品质量检验研究院, 长沙　410007; 3. 岳麓山实验室, 长沙　410128; 4. 湖南省农产品加工与质量安全研究所, 长沙　410125)

摘　要: 目的　建立 QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)同步检测猕猴桃中氯吡脲及其代谢产物(2-羟基-氯吡脲、3-羟基-氯吡脲和 4-羟基-氯吡脲)的分析方法。**方法**　通过对色谱-质谱条件(流动相、锥孔电压、碰撞能量等)和样本前处理优化, 以乙腈为提取剂, 经 5 g 无水硫酸镁和 1 g 氯化钠脱水盐析, 并采用 QuEChERS 固相萃取小柱净化的前处理方案。目标物经 HPLC-MS/MS 同时进行测定, 并采用基质匹配外标法定量。**结果**　氯吡脲及 3 种代谢产物在 0~1.000 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数(r)不低于 0.995, 检出限和定量限分别为 0.0005 mg/kg 和 0.002 mg/kg, 灵敏度显著优于同类方法; 平均加标回收率为 82.1%~112.0%, 相对标准偏差为 0.4%~6.4%, 准确度与精密度良好。将该方法应用于氯吡脲处理的猕猴桃实际样本, 20 mg/L 氯吡脲处理的猕猴桃样品, 成功检出氯吡脲母体及全部 3 种羟基化代谢产物。**结论**　本研究方法具有操作简单、准确度高、快速等优势, 适用于猕猴桃中氯吡脲及其化代谢产物的同步检测与残留监控, 并为相关化合物的风险评估提供更为全面的技术依据。

关键词: 氯吡脲; 猕猴桃; 高效液相色谱-串联质谱法; 代谢产物
中图分类号: TS255.7　　**文献识别码:** A　　**文章编号:** 2095–0381(2026)17–0017–09

Simultaneous determination of forchlorfenuron and its metabolites in *Actinidia chinensis* Planch by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YU Li[1], YANG Kai-Fang[1], LI Can[2], XIANG Jun[2], DENG Fang-Ming[1], LIN Shu-Hua[3,4*], LAI Deng-Ni[3,4*]

(1. *School of Food Science and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*; 2. *Hunan Institute of Product and Commodity Quality Inspection*, *Changsha* 410007, *China*; 3. *Yuelu Mountain Laboratory*, *Changsha* 410128, *China*; 4. *Hunan Institute of Agricultural Product Processing and Quality Safety*, *Changsha* 410125, *China*)

收稿日期: 2026-03-22
基金项目: 湖南省重点研发项目(2024JK2159); 岳麓山实验室种业专项(YLS-2025-ZY02035)

第一作者: 喻丽(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: 3257783977@qq.com
***通信作者:** 林树花(1981—), 女, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农产品加工与质量安全。E-mail: 150405653@qq.com
赖灯妮(1984—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农产品营养与质量安全。E-mail: 1193908903@qq.com

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the simultaneous determination of forchlorfenuron and its metabolites, including 2-hydroxy-forchlorfenuron, 3-hydroxy-forchlorfenuron and 4-hydroxy-forchlorfenuron, in *Actinidia chinensis* Planch by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The chromatographic-mass spectrometric conditions, including mobile phase, cone voltage and collision energy, as well as sample pretreatment procedures were optimized. Acetonitrile was used as the extraction solvent, followed by dehydration and salting-out with 5 g anhydrous magnesium sulfate and 1 g sodium chloride, and purification with a QuEChERS solid-phase extraction cartridge. The target analytes were simultaneously determined by HPLC-MS/MS and quantified using the matrix-matched external standard method. **Results** Forchlorfenuron and the 3 kinds of metabolites showed good linearity in the range of 0–1.000 mg/L, with correlation coefficients (r) not lower than 0.995. The limits of detection and limits of quantitation were 0.0005 mg/kg and 0.002 mg/kg, respectively, indicating higher sensitivity than comparable methods. The average spiked recoveries ranged from 82.1% to 112.0%, with relative standard deviations of 0.4%–6.4%, demonstrating good accuracy and precision. The established method was applied to actual *Actinidia chinensis* Planch samples treated with forchlorfenuron. In *Actinidia chinensis* Planch samples treated with 20 mg/L forchlorfenuron, the parent compound and all 3 kinds of hydroxylated metabolites were successfully detected. **Conclusion** The established method is simple, rapid and accurate, and is suitable for the simultaneous determination and residue monitoring of forchlorfenuron and its hydroxylated metabolites in *Actinidia chinensis* Planch. It also provides a more comprehensive technical basis for dietary risk assessment of related compounds.

KEY WORDS: forchlorfenuron; *Actinidia chinensis* Planch; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; metabolites

0 引 言

氯吡脲是一种人工合成且具有细胞分裂素活性的植物生长调节剂[1–3]，在果蔬生产中应用广泛，可显著促进猕猴桃果实细胞分裂和膨大，提升单果重和产量[4–6]，结构式见图 1。在实际生产中，不合理地施用氯吡脲，易导致果肉松驰[7–8]、空心[9]、风味裂变[10]及耐贮性下降[11–13]等问题，严重制约猕猴桃的商品品质与食用安全。研究表明对‘贵长’猕猴桃幼果期施用 5~20 mg/L 氯吡脲，会显著降低果实硬度与可滴定酸含量，加剧贮藏期间品质劣变[14]。

氯吡脲施入植物体内发生内源代谢转化，其主要通过苯环侧发生羟基化反应，生成多种羟基化衍生物[15]。其中 4-羟基-氯吡脲已被证实有显著的细胞毒性[16]，而其余羟基化代谢产物的毒理效应、在果实中残留规律仍尚不明确。若仅针对氯吡脲母体开展残留检测，忽略羟基化代谢产物的共存残留，极易低估膳食摄入的实际健康风险，难以保障残留暴露评估的科学性与准确性。

现有研究多聚焦于氯吡脲母体的残留分析，针对其羟基化代谢产物的同步检测方法较少，已报道的少数方法存在代谢物覆盖不全、前处理对极性代谢产物兼容性差、灵敏度难以满足低残留定量需求等局限。Zhang 等[17]利用液相色谱-离子阱-飞行时间质谱(liquid chromatography-ion trap-time-of-flight mass spectrometry, LC-IT-TOF/MS)在采后猕猴桃中鉴定了氯吡脲的 17 种转化产物，包括 2-羟基-氯吡脲、3-羟基-氯吡脲、4-羟基-氯吡脲等，但仅实现了代谢产物的结构鉴定，未建立定量分析方法。Wang 等[18]首次建立了采用 QuEChERS 和高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)技术同时测定东方甜瓜中氯吡脲及其代谢产物 3-羟基-氯吡脲和 4-羟基-氯吡脲的快速灵敏方法，但局限于在甜瓜中，未进行其他果蔬中代谢物的检测。张志伟等[19]提出一种同步测定猕猴桃中氯吡脲及其代谢物的方法，但该方法对氯吡脲及其代谢物的定量限(limit of quantitation, LOQ)均超过 5 μg/kg，灵敏度不足。

目前测定氯吡脲残留主要方法分为色谱仪器分析法和免疫分析法两大类，色谱仪器分析法核心特点：高灵敏度、高特异性、可精确定量和多残留同步分析，而免疫分析法操作简便、分析速度快、适用于现场或大批量样品的快速初筛。色谱法包括高效液相色谱-二极管阵列检测器/质谱联用技术[20]、分子印迹膜固相萃取-高效液相色谱法[21]和 HPLC-MS/MS[22–23]等，免疫分析法则涵盖磁性纳米珠的免疫分析[24]、间接竞争酶联免疫吸附法[25]等，其中 HPLC-MS/MS 作为一种稳定、快速的检测方法，已用于猕猴桃、草莓和黄瓜等果蔬中氯吡脲的检测。因此，本研究以‘米良一号’猕猴桃为供试材料，系统优化标准品色谱-质谱等仪器分析条件以及提取溶剂、脱水剂用量及净化柱类型等前处理条件，建立可同步检测猕猴桃中氯吡脲及

其 3 种羟基化代谢产物(2-羟基-氯吡脲、3-羟基-氯吡脲和 4-羟基-氯吡脲)的 QuEChERS-HPLC-MS/MS, 为氯吡脲及其代谢产物在国内外相关作物中的登记及残留限量的制定提供可借鉴的依据。

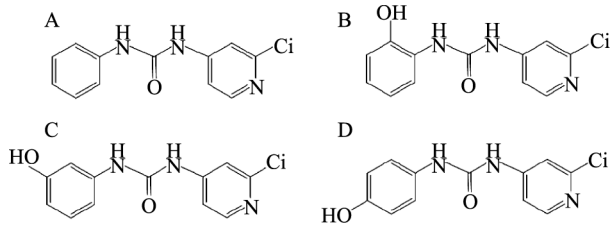


图 1　氯吡脲(A)及代谢产物 2-羟基-氯吡脲(B)、3-羟基-氯吡脲(C)、4-羟基-氯吡脲(D)结构式

Fig.1　Structural formulas of forchlorfenuron (A) and its metabolites 2-hydroxy-forchlorfenuron (B), 3-hydroxy- forchlorfenuron (C) and 4-hydroxy-forchlorfenuron (D)

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

供试猕猴桃品种为‘米良一号’, 采自湖南湘西猕猴桃健康果园。于落花后 25 d, 分别设置 0、5、10、20 mg/L 4 个质量浓度的氯吡脲溶液, 对猕猴桃对幼果进行蘸果处理, 果实成熟后统一采收。采样时各处理单株果树按东、西、南、北方位随机采摘 3~4 个果实, 混匀分装标记后当日运回实验室。样本经全果匀浆后, 于–20 ℃保存, 待测。

氯吡脲标准物质(CAS: 68157-60-8, 纯度 99.9%, 坛墨质检科技股份有限公司); 2-羟基-氯吡脲、3-羟基-氯吡脲、4-羟基-氯吡脲(纯度≥95%, 实验室化学合成); 无水硫酸镁($MgSO_4$)、氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲酸、乙酸、乙腈(色谱纯, 默克股份两合公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2　仪器与设备

AB SCIEX QTRAP 5500 高效液相四极杆串联质谱仪(美国丹纳赫集团); METTLER TOLEDO 万分之一电子天平(精度 0.1 mg, 梅特勒精密仪器上海有限公司); VORTEX-6 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); XJ-8 低速离心机(湖南迈克尔实验仪器有限公司); KQ-800DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); S-EVAP 氮吹浓缩仪(美国 Organomation 公司); WQ PIG 萃取柱(150 mg/6 mL)(武汉蔚启科技有限公司); PuriTest 色素专用柱(150 mg/6 mL)(山东美正生物科技有限公司); QuEChERS 固相萃取小柱[含 150 mg N-丙基乙二胺(primary-secondary amine, PSA), 15 mg 石墨化碳(graphitized carbon black, GCB), 885 mg $MgSO_4$][岛津(上海)实验器材有限公司]; Waters Acquity UPLC® BEH C_{18} 色谱柱(2.1mm×100 mm, 1.7 μm) (美国 Waters 公司)。

1.3　样品前处理

称取 10.0 g(精确至 0.01g)匀浆猕猴桃全果样品放入 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈, 涡旋 1 min。随后样品加入 5.0 g 无水 $MgSO_4$ 和 1.0 g 氯化钠, 摇匀 3 min, 于 4 ℃、8000 r/min 离心 5 min。移取上清液经 QuEChERS 固相萃取小柱净化, 取 5 mL 净化后上清液进行氮吹至近干, 1.0 mL 乙腈复溶, 涡旋混匀 30 s。经 0.22 μm 聚丙烯针式过滤器过滤, 所得滤液供上机检测。

1.4　标准溶液配制

分别准确称取 5.00 mg 氯吡脲标准品及 3 种羟基化代谢产物标准品, 用甲醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶, 配制成质量浓度均为 100 mg/L 的单一标准储备液, 于–18 °C 冰箱中避光保存备用。

基质匹配标准工作溶液的配制: 取经前述样品前处理得到的猕猴桃空白基质提取液, 逐级稀释上述储备液, 配制成 0、0.001、0.005、0.010、0.050、0.100、0.200、0.500、1.000 mg/L 的系列基质匹配标准工作溶液。

1.5　仪器分析条件

1.5.1　液相色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC® BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.5%甲酸水溶液(A): 乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 95% B; 1.0~5.0 min, 95%~50% B; 5.0~8.0 min, 50%~5% B; 8.0~9.5 min, 5%~95% B; 9.5~10.0 min, 95% B; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样体积: 5 μL; 运行时间: 10 min。

1.5.2　质谱条件

电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 扫描模式: 正离子; 监测模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 3.53 kV; 脱溶剂温度: 200 °C; 脱溶剂气(氮气)流量: 550 L/Hr。目标化合物的具体质谱参数见表 1。

1.6　基质效应评价

基质效应(matrix effects, ME): 样品中除目标分析物外的其他共存组分, 常在检测时对目标物的离子化过程或仪器响应信号产生干扰[26–28]。通过比较溶剂与基质配制标准曲线的斜率评价 ME, ME 计算见公式(1):

$$ME\%=\left(\frac{A}{B}-1\right)\times 100\% \quad (1)$$

式中: A 为基质标准曲线斜率; B 为溶剂标准曲线斜率。|ME|<20%为弱 ME; 在 20%≤|ME|≤50%时为中等 ME; |ME|>50%为强 ME[29–30]。

表 1 氯吡脲及其 3 种代谢产物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of forchlorfenuron and its 3 kinds of metabolites

序号	化合物	母离子(*m*/z)	子离子(*m*/z)	裂解电压/V	碰撞能量/V	保留时间/min
1	氯吡脲	248.1*	93.1*	50	17	4.52
		248.1	129.0	50	17	
2	2-羟基-氯吡脲	264.1*	129.0*	50	19	4.27
		264.1	155.0	50	14	
3	3-羟基-氯吡脲	264.1*	129.0*	50	19	3.90
		264.1	155.0	50	14	
4	4-羟基-氯吡脲	264.1*	129.0*	50	19	3.68
		264.1	155.0	50	14	

注: *为定量离子。

1.7 数据处理

采用 SPSS 22.0 软件进行数据的统计学分析, 采用 Origin 2022 软件进行绘图。定量计算采用基质匹配标准曲线外标法。在前处理条件优化实验中, 每组做 3 次平行实验; 在方法学验证实验中, 每组做 6 次平行实验。

2 结果与分析

2.1 色谱-质谱条件优化

2.1.1 质谱条件优化

分别配制质量浓度为 0.5 mg/L 的氯吡脲及其 3 种代谢产物标准溶液, 在电喷雾离子源正、负离子模式下进行母离子全扫描。结果表明, 4 种氯吡脲及其 3 种代谢产物标准品在正离子模式下均能高效结合质子且响应值最高。在此模式下, 对各标准品的子离子进行全扫描。通过仪器自动优化程序, 进一步优化锥孔电压及碰撞能等关键质谱参数, 以获得最佳的检测灵敏度。氯吡脲及其 3 种代谢产物的优化后质谱参数(包括定性/定量离子对、裂解电压和碰撞能量)见表 1。

2.1.2 色谱条件优化

在流动相筛选过程中, 重点比较了不同有机相及添加剂对分离效果的影响。甲醇和乙腈因具备良好的洗脱能力与较低的黏度, 常用作 HPLC-MS/MS 常用的流动相组成, 其中适量的添加甲酸等添加剂有助于提升木匾化合物的离子化效率及检测灵敏度。基于此, 本研究系统研究了以下 3 种流动相体系: 甲醇-0.5%甲酸水溶液、乙腈-水溶液和乙腈-0.5%甲酸水溶液。结果表明, 当采用甲醇-0.5%甲酸或乙腈-水溶液为流动相时, 氯吡脲及其 3 种代谢产物的色谱分离均不理想, 表现为峰形拖尾、分离度不足或保留时间不稳定。而使用乙腈-0.5%甲酸水溶液时, 各目标物峰形尖锐、对称性好, 且能在较短时间内实现基线分离, 表现出良好的色谱行为(图 2)。此外, 乙腈相较于甲醇具有更低的黏度和更强的洗脱能力, 有助于进一步改善分离效率、缩短分析时间并促进色谱柱快速平衡。综上, 本研究最终选用乙腈-0.5%甲酸水溶液作为优化的流动相体系。

2.2 样本前处理条件优化

2.2.1 萃取柱的选择

萃取柱的核心目的是去除干扰物(如色素、脂肪酸等), 同时保证目标物不损失[28]。本研究比较了市面上常见 4 种萃取柱对氯吡脲及其 3 种羟基化代谢产物的回收效果。结果表明(图 3), QuEChERS 固相萃取小柱的综合性能最佳: 4 种目标物的总平均回收率达 86.6%, 且回收率在 85.2%~88.4%之间。该柱对氯吡脲母体回收率 88.4%, 2-羟基-氯吡脲、3-羟基-氯吡脲及 4-羟基-氯吡脲回收率分别为

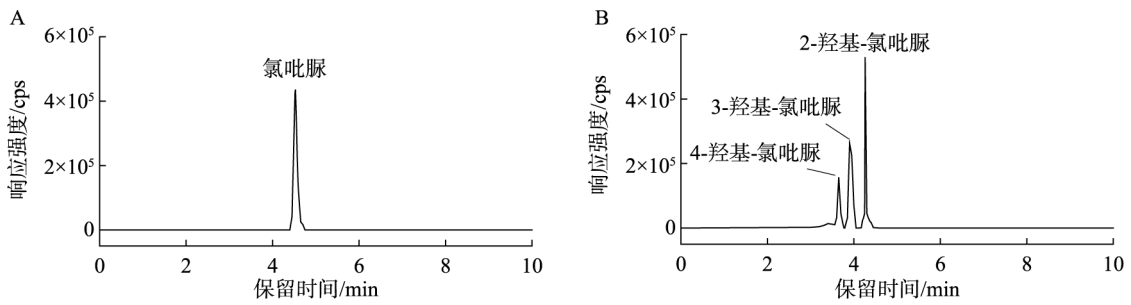


图 2 氯吡脲(A)及其代谢产物(B)的 0.5 mg/L 混合标准溶液离子流图

Fig.2 Ion chromatograms of a 0.5 mg/L mixed standard solution of forchlorfenuron (A) and its metabolites (B)

85.6%、85.2%、87.2%, 对母体及不同极性羟基代谢产物表现出均衡且稳定的回收性能。表明该柱填料(150 mg PSA、15 mg GCB、885 mg $MgSO_4$)可有效吸附猕猴桃基质中的色素、有机酸等干扰杂质, 同时对多组分目标物具有良好适配性, 满足同步检测要求。

其余几种净化方式存在明显不足: WQ PIG 固相萃取柱虽对 4-羟基-氯吡脲平均回收率较高(87.2%), 但对 2-羟基-氯吡脲回收率仅 56.4%, 组分间极差达 30.8%, 净化选择性过强, 不适合用于多目标产物同步检测; PuritTest 色素专用柱平均回收率 76.9%, 其中 3-羟基-氯吡脲回收不足仅为 69.2%, 回收效果欠佳; QUICLEAR 针式过滤器所有目标物回收率均低于 50%, 对目标产物存在严重吸附; 未经萃取的样品虽平均回收率 72.0%, 2-羟基-氯吡脲回收率仅 51.2%, 组分间回收率极差达 30%, 基质干扰明显。综合净化效果、回收稳定性及多组分适配性, 最终确定选用 QuEChERS 固相萃取小柱净化效果最优, 适用于猕猴桃中氯吡脲及其羟基化代谢产物的同步检测。

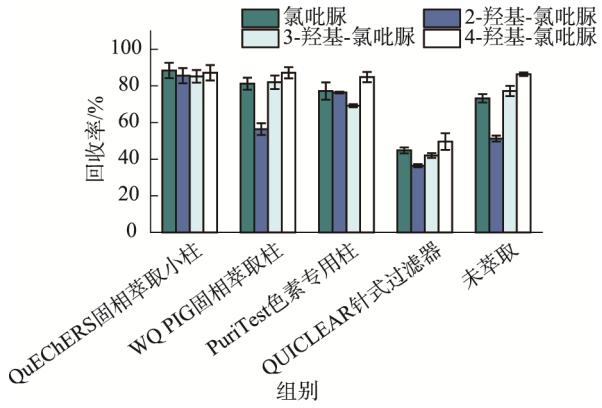


图 3　不同萃取柱对氯吡脲及 3 种代谢产物回收率的影响(n=3)
Fig.3　Effects of different extraction columns on the recovery rates of forchlorfenuron and its 3 kinds of metabolites (n=3)

2.2.2　提取溶剂类型的选择

不同提取溶剂对目标物回收率存在明显差异。2-羟基-氯吡脲、3-羟基-氯吡脲和 4-羟基-氯吡脲作为氯吡脲的羟基化代谢产物, 其理化性质与氯吡脲相似, 均需在提取过程中实现高效、同步萃取。根据 GB 23200.110—2018《食品安全国家标准　植物源性食品中氯吡脲残留量的测定　液相色谱-质谱联用法》以及相关文献研究, 本研究中选用乙腈、0.5%甲酸-乙腈[18]、1.0%乙酸-乙腈[19]作为提取剂, 考察其对猕猴桃全果中目标物回收率的影响, 结果如图 4 所示。结果表明, 不同提取溶剂对目标物回收率存在明显差异。纯乙腈提取效果最优, 4 种目标物平均回收率可达 86.9%, 回收率区间为 84.8%~88.0%, 极差仅 3.2%, 整体回收效果稳定且均衡; 0.5%甲酸-乙腈、1.0%乙酸-乙腈酸化体系平均回收率分别为 84.3%、83.8%, 均低于纯乙腈体系。分析其原因, 乙腈属于极性非质子溶剂, 极性适配性适中, 可有效渗透猕猴桃果肉组织, 对弱极性氯吡脲母体及羟基取代后极性小幅升高的代谢产物均具有良好的溶解萃取能力。同时, 乙腈可有效沉淀样品中蛋白质类杂质, 经盐析作用可实现有机相与水相的高效分层, 适配后续净化前处理流程。酸化乙腈虽可抑制样品中酸性色素等杂质共提取, 提升部分酸性农药的提取效果, 但会轻微改变羟基氯吡脲代谢物的电离平衡与溶解状态, 进而造成目标物提取回收率小幅降低。综合对比提取回收率、稳定性及操作简便性, 最终确定纯乙腈为猕猴桃全果中氯吡脲及其羟基代谢物检测的最优提取溶剂。

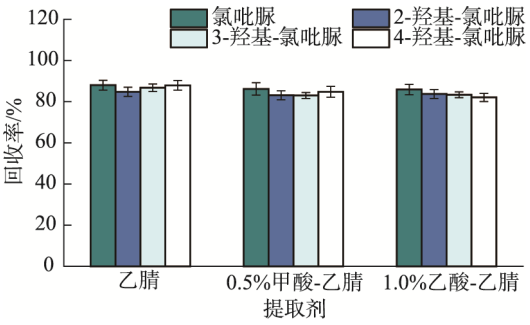


图 4　不同提取剂对氯吡脲及 3 种代谢产物回收率的影响(n=3)
Fig.4　Effects of different extractants on the recovery rates of forchlorfenuron and its 3 kinds of metabolites (n=3)

2.2.3　脱水剂用量的优化

脱水剂 $MgSO_4$ 在提取过程中主要是利用其强吸水性, 去除样品中的水分, 使乙腈等有机溶剂能与样品基质更有效地分离, 以及通过盐析效应, 促进目标分析物从水相向有机相的转移, 从而提高提取效率。基于前期筛选结果, 本研究以乙腈作为提取剂, 考察脱水剂 $MgSO_4$ 用量(0、2、4、5、6、8 g)对氯吡脲及其 3 种羟基化代谢产物回收率的影响。结果如图 5 所示, 脱水剂用量为 5 g 时提取效果最佳: 各目标物的回收率均达到最高水平, 其中氯吡脲为 90.7%、2-羟基-氯吡脲为 84.4%、3-羟基-氯吡脲为 87.2%、4-羟基-氯吡脲为 87.9%, 平均回收率 87.6%, 未添加脱水剂时, 样品水分无法有效脱除, 乙腈提取液被稀释, 目标物萃取不完全, 回收率仅为 15.2%~40.1%, 整体回收效果极差; 当脱水剂用量在 2~4 g 范围内, 回收率随用量增加呈上升趋势, 但脱水效果仍不充分, 体系中残留水分影响相分离效率; 当用量增至 6~8 g 时, 回收率呈明显下降趋势, 这可能是过量无水 $MgSO_4$ 易对目标化合物产生固相吸附作用, 且吸水后体积膨胀会阻碍提取溶剂向基质内部渗透, 进而降低萃取效率。综合回收率水平、脱水效果及基质吸附效应, 确定本研究条件下无水 $MgSO_4$ 最佳添加用量为 5 g。

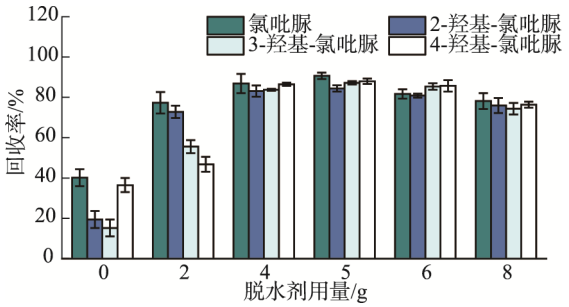


图 5 不同脱水剂用量对氯吡脲及 3 种代谢产物回收率的影响(n=3)

Fig.5 Effects of different amounts of dehydrating agents on the recovery rates of forchlorfenuron and its 3 kinds of metabolites (n=3)

2.3 方法学验证

2.3.1 相关系数、基质效应和检出限

本研究对所建立的分析方法进行了关键指标验证。在猕猴桃样品空白基质溶液中，制备了质量浓度为 0、0.001、0.005、0.010、0.050、0.100、0.200、0.500、1.000 mg/L 的氯吡脲及其 3 种代谢产物基质匹配标准工作溶液。同时用乙腈配制相同质量浓度的溶剂标准工作溶液。按照 1.5 的仪器方法，以溶液质量浓度为横坐标(X, mg/L)，峰面积为纵坐标(Y)，绘制 4 种目标分析物的基质匹配标准曲线。通过回归分析得到标准曲线方程，同时评估相关系数(r)的显著性水平。根据信噪比确定检出限(limit of detection, LOD)和 LOQ，将 $S/N \geqslant 3$ 对应的浓度值确定为 LOD，$S/N \geqslant 10$ 对应的浓度值定为 LOQ。通过比较溶剂与基质配制标准曲线的斜率评价 ME。

如表 2 所示，氯吡脲和 3 种代谢产物在 0~1.000 mg/L 范围内线性关系良好，相关系数(r)在 0.995~0.999 之间，表明该方法具备可靠的定量基础。LOD 为 0.0005 mg/kg，LOQ 为 0.002 mg/kg，说明在该浓度及以上水平进行定量时，能保证良好的精密度与准确度。与张志伟等[19]建立氯吡脲代谢产物的检测方法相比，LOQ 降低 4 倍以上。另外，氯吡脲及其 3 种代谢产物在猕猴桃全果基质中的中均表现出明显的 ME，其绝对值均超过 68%，属于强 ME 范畴。因此，本研究采用机制匹配标准曲线以校正 ME 对定量结果的影响。

2.3.2 方法准确度和精密度实验

取不含氯吡脲及 3 种代谢产物的猕猴桃全果匀浆样品作为空白基质，在 1.0×10^{-3}、5.0×10^{-3}、2.0×10^{-2} 和 5.0×10^{-2} mg/kg 的加标浓度范围内，每个加标浓度平行测定 6 次。结果如表 3 所示，4 种目标物的平均回收率介于 82.1%~112.0%，相对标准偏差为 0.4%~6.4%，该方法回收率符合 NY/T 788—2018《农作物中农药残留试验准则》中对回收率和相对标准偏差的标准，各添加水平下目标物回收率均处于 70%~120%区间，相对标准偏差均远小于 20%限定值，达到了定量检测的要求。这表明该检测方法准确度可靠、精密度良好，可满足猕猴桃基质中氯吡脲及其羟基化代谢产物残留的准确定量分析需求。

2.4 猕猴桃样品检测

采用所建方法对湘西猕猴桃基地果园样品开展实际检测实验，结果见表 4。随氯吡脲施用质量浓度从 5 mg/L 升至 20 mg/L，猕猴桃全果中氯吡脲母体残留量由 6.9×10^{-3} mg/kg 增至 4.9×10^{-2} mg/kg，残留水平呈明显上升趋势。3 种羟基化代谢产物残留量亦随施药浓度升高整体增加：4-羟基-氯吡脲在各处理均有检出，残留量依次为 6.3×10^{-4}、1.2×10^{-3}、6.5×10^{-3} mg/kg；2-羟基-氯吡脲在 5 mg/L 处理下低于 LOD，10 mg/L、20 mg/L 处理分别为 1.5×10^{-4} mg/kg、1.1×10^{-3} mg/kg；3-羟基-氯吡脲仅在 20 mg/L 处理检出，残留量 3.9×10^{-4} mg/kg。残留占比分析显示，4-羟基-氯吡脲为优势代谢产物，占母体残留比例分别为 9.13%、7.58%、13.14%；2-羟基-氯吡脲在中高浓度处理占比为 0.93%、2.25%；3-羟基-氯吡脲高浓度处理占比 0.79%。3 种代谢物总占比依次为 10.00%、8.51%、16.19%，证实氯吡脲在猕猴桃体内可发生羟基化转化，且高浓度处理更易造成代谢物累积。

已有研究证实氯吡脲在植株体内可生成羟基化代谢产物，且该类物质多富集于果皮，部分还存在潜在毒理风险[1,16]。本研究 4-羟基-氯吡脲普遍检出且占比最高，与已有文献[1]结论一致。本研究采用全果匀浆检测，为皮肉混合平均残留值，或稀释果皮实际残留浓度。综上，仅检测氯吡脲母体会低估残留暴露风险，纳入羟基化代谢物尤其是 4-羟基-氯吡脲同步检测，对完善猕猴桃氯吡脲安全评价十分必要。

表 2 氯吡脲及其代谢产物在猕猴桃基质中的相关系数、MEs、LODs 和 LOQs

Table 2 Correlation coefficients, MEs, LODs and LOQs of forchlorfenuron and its metabolites in *Actinidia chinensis* Planch matrix

名称	质量浓度范围/(mg/L)	线性方程	相关系数	MEs/%	LODs/(mg/kg)	LOQs/(mg/kg)
氯吡脲	0~1.000	Y=5.25819X	0.999	–83.9	0.0005	0.002
2-羟基-氯吡脲	0~1.000	Y=36.8808X	0.995	–68.1	0.0005	0.002
3-羟基-氯吡脲	0~1.000	Y=21.247X	0.996	–73.8	0.0005	0.002
4-羟基-氯吡脲	0~1.000	Y=21.781X	0.998	–78.2	0.0005	0.002

表 3　氯吡脲及其代谢产物在猕猴桃基质中的平均回收率及相对标准偏差(*n*=6)

Table 3　Average recovery rates and relative standard deviations of forchlorfenuron and its metabolites in *Actinidia chinensis* Planch matrix (*n*=6)

名称	添加水平/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
氯吡脲	1.0×10^{-3}	112.0	5.9
	5.0×10^{-3}	95.8	5.3
	2.0×10^{-2}	89.7	3.0
	5.0×10^{-2}	86.9	1.7
2-羟基-氯吡脲	1.0×10^{-3}	88.1	1.4
	5.0×10^{-3}	85.7	0.4
	2.0×10^{-2}	82.1	1.7
	5.0×10^{-2}	83.5	1.3
3-羟基-氯吡脲	1.0×10^{-3}	90.3	4.6
	5.0×10^{-3}	86.9	1.0
	2.0×10^{-2}	82.4	1.1
	5.0×10^{-2}	84.8	1.8
4-羟基-氯吡脲	1.0×10^{-3}	105.8	4.2
	5.0×10^{-3}	88.0	6.4
	2.0×10^{-2}	84.2	1.9
	5.0×10^{-2}	86.8	1.3

表 4　猕猴桃样品检测结果(*n*=6)

Table 4　Test results of *Actinidia chinensis* Planch samples (*n*=6)

处理质量浓度/(mg/L)	氯吡脲/(mg/kg)	2-羟基-氯吡脲/(mg/kg)	3-羟基-氯吡脲/(mg/kg)	4-羟基-氯吡脲/(mg/kg)
5	6.9×10^{-3}	6.0×10^{-5}	未检出	6.3×10^{-4}
10	1.6×10^{-2}	1.5×10^{-4}	未检出	1.2×10^{-3}
20	4.9×10^{-2}	1.1×10^{-3}	3.9×10^{-4}	6.5×10^{-3}

3　结论与讨论

本研究建立了一种基于 QuEChERS-HPLC-MS/MS 同步检测猕猴桃中氯吡脲及其代谢产物(2-羟基-氯吡脲、3-羟基-氯吡脲、4-羟基-氯吡脲)的分析方法。通过对色谱-质谱条件与样品前处理的系统优化, 确定了以乙腈为提取剂、5 g 无水 $MgSO_4$ 为脱水剂, 并经 QuEChERS 固相萃取小柱(含 150 mg PSA、15 mg GCB、885 mg $MgSO_4$)净化的前处理方案。该方法在有效去除猕猴桃基质中色素、有机酸等干扰物的同时, 实现了对氯吡脲及其不同极性代谢产物的高效提取与净化。方法学验证表明, 4 种目标化合物在 0~1.000 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数(r)均不低于 0.995; 平均加标回收率为 82.1%~112.0%, 相对标准偏差为 0.4%~6.4%, 说明方法准确、精密且重复性好。虽然目标物在猕猴桃基质中均呈现强 ME, 但通过基质匹配标准曲线定量, 有效补偿了基质干扰, 保证了结果的可靠性。

猕猴桃样品检测证实, 氯吡脲在猕猴桃中不仅以母体形式残留, 还会转化生成羟基化代谢产物。随着施药浓度(5、10、20 mg/L)增加, 母体及代谢物的残留水平总体上升。在 20 mg/L 处理组中, 3 种羟基化代谢物均被检出, 其中 4-羟基-氯吡脲残留占比最高(13.14%), 表明仅检测母体会低估实际残留风险, 尤其考虑到 4-羟基-氯吡脲已报道具有细胞毒性[16], 将其纳入同步检测对全面评估食品安全具有重要意义。

与现有方法相比, 本方法具有明显优势: 黄露等[22]及现行 GB 23200.110—2018 方法仅针对氯吡脲母体; 张志伟等[19]方法未涵盖 2-羟基-氯吡脲, 且 LOQ 较高; Shan 等[16]侧重于代谢物鉴定与毒性, 未建立系统定量方法; Wang 等[18]方法则主要适用于瓜类基质。相较之下, 本研究首次将 3 种羟基化代谢产物全部纳入同步检测体系, LOQ 低至 0.002 mg/kg, 灵敏度显著提高; 前处理经过系统优化, 对不同极性代谢物回收率稳定(82.1%~112.0%); 并通过基质匹配标准曲线有效校正了强 ME, 从而为猕猴桃中氯吡脲及其代谢产物的残留监控与风险评估提供了更全面、准确、可靠的分析手段。

综上, 本方法操作简便、灵敏度高、重复性好, 适用于猕猴桃中氯吡脲及其羟基化代谢产物的同步检测, 能够

更真实地反映其残留与转化情况，为相关残留限量标准制定和风险评估提供更完整的技术依据。后续可进一步扩大样本品种、产地与采收期，系统研究氯吡脲及其代谢物在猕猴桃中的消解动态与转化规律。

参考文献

[1] Wan Haoliang, Kong Xiabing, Liu Yihui, et al. Residue analysis and effect of preharvest forchlorfenuron (CPPU) application on quality formation of kiwifruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2023, 195: 112144.

[2] Bi Yingying, Qiao Chengkui, Han Lijun, et al. Key metabolites and mechanistic insights in forchlorfenuron controlling kiwifruit development [J]. Food Research International, 2023, 164: 112412.

[3] 谢新玥, 姚东良, 毛积鹏, 等. 氯吡脲 CPPU 处理对 6 个猕猴桃品种果实发育与品质的影响[J]. 陕西科技大学学报, 2025, 43(6): 62–68, 96.
Xie Xinyue, Yao Dongliang, Mao Jipeng, et al. Effect of forchlorfenuron (CPPU) treatment on fruit development and quality of six kiwifruit varieties [J]. Journal of Shaanxi University of Science and Technology, 2025, 43(6): 62–68, 96.

[4] Xie Xin, Rahman M M, Qiao Chengkui, et al. Effect of forchlorfenuron (CPPU) on fruits quality and residue analysis in kiwifruits [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2024, 133: 106383.

[5] 王凤怡, 吴双慧, 李曦, 等. 氯吡脲施用方式对四川猕猴桃品质的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 230–236.
Wang Fengyi, Wu Shuanghui, Li Xi, et al. Effects of application methods of forchlorfenuron on the quality of *Actinidia chinensis* in Sichuan Province [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 230–236.

[6] Huang Wenjun, Han Fei, Fu Yifan, et al. Forchlorfenuron treatment improves fruit weight and flavor quality of the red-fleshed kiwifruit ‘Donghong’ [J]. Food Quality and Safety, 2026, 10(1): 1–15.

[7] Qi Xiaofan, Qiao Chengkui, Han Lijun, et al. Comparative analysis of storage temperatures and forchlorfenuron treatment concentrations on physiological quality and primary metabolites in kiwifruit during storage [J]. Postharvest Biology and Technology, 2025, 228: 113665.

[8] 陈双双, 钟嵘, 黄春辉, 等. 不同浓度氯吡脲对‘东红’猕猴桃果实品质的影响[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(3): 549–559.
Chen Shuangshuang, Zhong Rong, Huang Chunhui, et al. Effect of different concentrations of forchlorfenuron (CPPU) on fruit quality of ‘Donghong’ kiwifruit [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(3): 549–559.

[9] 解鑫. 氯吡脲对猕猴桃果实发育期及贮藏期营养物质变化的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2023: 13.
Xie Xin. Effect of forchlorfenuron (CPPU) on nutrient changes during fruit development and storage period of kiwifruit [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023: 13.

[10] Wang Shiyu, Bi Yingying, Han Lijun, et al. Changes in functional nutrients in red-fleshed kiwifruits after forchlorfenuron application leveraging a multi-omics approach [J]. Food Chemistry, 2025, 493: 145669.

[11] Liu Zhenbin, Cheng Peiwen, Hati S, et al. Effects of forchlorfenuron treatment on the shelf-life quality of ready-to-eat kiwifruit and its mechanism [J]. Food Innovation and Advances, 2025, 4(3): 400–411.

[12] 张承, 王秋萍, 冉飞, 等. 猕猴桃适宜采摘期确定及其贮藏性能[J]. 农业工程学报, 2018, 34(17): 266–275.
Zhang Cheng, Wang Qiuping, Ran Fei, et al. Determination of appropriate harvest period and storage performance of kiwifruit [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(17): 266–275.

[13] 李圆圆, 罗安伟, 李琳, 等. 采前氯吡脲处理对‘秦美’猕猴桃贮藏期间果实硬度及细胞壁降解的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 273–278.
Li Yuanyuan, Luo Anwei, Li Lin, et al. Effect of preharvest forchlorfenuron (CPPU) treatment on fruit firmness and cell wall degradation of ‘Qinmei’ kiwifruit during storage [J]. Food Science, 2018, 39(21): 273–278.

[14] 许敏, 孔夏冰, 唐冬梅, 等. 不同浓度氯吡脲处理对猕猴桃质量安全的影响[J]. 农产品质量与安全, 2022(1): 63–67, 96.
Xu Min, Kong Xiabing, Tang Dongmei, et al. Effect of different concentrations of forchlorfenuron (CPPU) on quality and safety of kiwifruit [J]. Quality and Safety of Agro-Products, 2022(1): 63–67, 96.

[15] Moreno C M, Moreno J N, Valdez M C, et al. Fungal-mediated biotransformation of theplant growth regulator forchlorfenuron by cunninghamella elegans [J]. Metabolites, 2024, 14(2): 101.

[16] Shan Tingting, Zhang Xiao, Guo Chunfeng, et al. Identity, synthesis, and cytotoxicity of forchlorfenuron metabolites in kiwifruit [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(33): 9529–9535.

[17] Zhang Zhiwei, Guo Kangquan, Bai Yubin, 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 and Food Chemistry, 2015, 63(11): 3059–3066.

[18] Wang Qi, Su Hang, Yue Ning, et al. Dissipation and risk assessment of forchlorfenuron and its major metabolites in oriental melon under greenhouse cultivation [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 225: 112700.

[19] 张志伟, 高振红, 袁亚红, 等. QuEChERS-液相色谱串联质谱法快速检测猕猴桃中的氯吡脲及其代谢产物[J]. 现代食品科技, 2017, 33(10): 262–267.
Zhang Zhiwei, Gao Zhenhong, Yuan Yahong, et al. Rapid determination of forchlorfenuron (CPPU) and its metabolites in kiwifruit by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 262–267.

[20] Choung M G, Lee J, Lee Y D, et al. A method for determining forchlorfenuron levels in apple, mandarin, green pepper, and kimchi cabbage using HPLC-DAD/MS [J]. Horticultural Science and Technology, 2017, 35(5): 656–666.

[21] 石雨, 王建, 豆瑞, 等. 分子印迹膜-固相萃取-高效液相色谱法同时检测橙子中噻苯隆和氯吡脲[J]. 食品科学, 2025, 46(1): 176–183.

Shi Yu, Wang Jian, Dou Rui, et al. Simultaneous determination of thidiazuron and forchlorfenuron (CPPU) in oranges by molecularly imprinted membrane-solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Food Science, 2025, 46(1): 176–183.

[22] 黄露, 吴敏, 李欢, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 法测定猕猴桃中氯吡脲残留量[J]. 食品工业, 2025, 46(8): 316–320.
Huang Lu, Wu Min, Li Huan, et al. Determination of forchlorfenuron residue in kiwifruit by QuEChERS-UPLC-MS/MS method [J]. The Food Industry, 2025, 46(8): 316–320.

[23] Sharma N, Sharma S, Mandal K. Validation of simple and efficient analytical methodology for estimation of forchlorfenuron residues [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2023, 195(1): 68.

[24] Shan Yubao, He Ting, Li Ying, et al. A magnetic-bead-based immunoassay with a newly developed monoclonal antibody for rapid and highly sensitive detection of forchlorfenuron [J]. Biosensors, 2023, 13(6): 593.

[25] Liu Xinmei, Xie Bo, Cheng Yongjian, et al. A sensitive monoclonal-antibody-based ELISA for forchlorfenuron residue analysis in food samples [J]. Biosensors, 2022, 12(2): 78.

[26] 汪春明, 贾丽丽, 邵雨, 等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法同时测定粮谷中 9 种新型杀菌剂[J]. 粮食与油脂, 2026, 39(3): 155–162.
Wang Chunming, Jia Lili, Shao Yu, et al. Simultaneous determination of nine novel fungicides in cereals by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Cereals & Oils, 2026, 39(3): 155–162.

[27] Wang Qi, Li Xiaohui, Wang Hongping, et al. Spatial distribution and migration characteristic of forchlorfenuron in oriental melon fruit by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging [J]. Foods, 2023, 12(15): 2858.

[28] Kim S H, Lee Y H, Jeong M J, et al. LC-MS/MS method minimizing matrix effect for the analysis of bifenthrin and butachlor in Chinese chives and its application for residual study [J]. Foods, 2023, 12(8): 1683.

[29] 周文静, 王卢燕, 周昌瑜, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中新型甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂 Mandestrobin 和 Metyltetraprole 残留[J]. 食品科学, 2025, 46(10): 274–281.
Zhou Wenjing, Wang Luyan, Zhou Changyu, et al. Simultaneous determination of novel strobilurin fungicides mandestrobin and metyltetraprole residues in fruits and vegetables by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 2025, 46(10): 274–281.

[30] 吴绪金, 李萌, 马婧玮, 等. 5 种果蔬中嘧菌酯残留量检测及膳食摄入风险评估[J]. 农药, 2022, 61(6): 438–443.
Wu Xujin, Li Meng, Ma Jingwei, et al. Determination of azoxystrobin residue in five fruits and vegetables and dietary intake risk assessment [J]. Agrochemicals, 2022, 61(6): 438–443.

(责任编辑: 安香玉　曹岱琳)