

HPLC-MS/MS 测定玉米中异恶唑草酮及代谢物残留量

杨长志, 王传松, 程阳, 刘永, 吴岩, 魏冬旭
(黑龙江出入境检验检疫局, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 建立玉米中异恶唑草酮及代谢物残留量同时测定的高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, HPLC-MS/MS)分析法。试样用乙酸-乙腈(1:99, V/V)高速匀浆提取、醋酸钠和无水硫酸镁盐析后, 提取液经 *N*-丙基乙二胺(PSA)、十八烷基硅烷(ODS)和石墨化炭黑(GCB)净化, 除去样品中脂肪和色素等大多数的干扰基质, 用高效液相色谱-串联质谱仪检测, 外标法定量。异恶唑草酮及代谢物的添加量在0.005~0.100mg/kg 范围内, 样品平均加标回收率在74.8%~107.2%之间, 相对标准偏差为6.45%~11.15%; 方法的检测限异恶唑草酮为0.01mg/kg、异恶唑草酮代谢物0.005mg/kg。本方法灵敏、准确、省时和操作简便, 适用于玉米中异恶唑草酮及代谢物残留量同时检测和确证。

关键词: 异恶唑草酮及代谢物; 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS); 玉米

Determination of Isoxaflutole and Its Metabolite Residues in Maize by HPLC-MS/MS

YANG Chang-zhi, WANG Chuan-song, CHENG Yang, LIU Yong, WU Yan, WEI Dong-xu
(Heilongjiang Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China)

Abstract: An HPLC-MS/MS (high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry) method has been developed for the determination of isoxaflutole and its two metabolite residues in maize. The isoxaflutole and its metabolite residues in samples were extracted into acetic acid-cetonitrile (1:99, V/V) by means of high-speed homogenization, subjected to liquid-liquid partition in the presence of added anhydrous magnesium sulfate and sodium acetate, cleaned up with primary secondary amine (PSA), octadecylsilane (ODS) and graphitized carbon black for purpose of eliminating such most matrix interferences as lipids, pigments, etc before HPLC-MS/MS analysis and subsequent quantification by an external standard method. The average recovery rates of isoxaflutole and its metabolites from spiked samples ranged between 74.8% and 107.2% with a relative standard deviation of 6.45% - 11.15% across the spike levels of 0.010, 0.050 mg/kg and 0.100 mg/kg. The detection limit was 0.01 mg/kg and 0.005 mg/kg for isoxaflutole and its metabolites, respectively. This method was sensitive, accurate, time-saving, simple, and suitable for the detection of isoxaflutole and its metabolite residues in maize.

Key words: isoxaflutole and its metabolites; high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); maize

中图分类号: TS207.3; O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0280-05

异恶唑草酮除草剂是由罗纳-普朗克(Rhone-Poulenc)公司开发的一种选择性内吸型苗前除草剂^[1], 主要用于玉米、甘蔗等旱作物田防除苘麻、藜等多种一年生阔叶杂草和稗草、大狗尾草等一些一年生禾本科杂草的防除。异恶唑草酮化合物本身并无除草活性, 只有喷到土壤中异恶唑草酮将迅速水解为水溶性和稳定性强的二酮腈类代谢物(diketetonitrile), 才具有除草活性^[2]。

它通过抑制对羟基苯基丙酮酸酯双氧化酶的合成, 导致酪氨酸的积累, 使质体醌和生育酚的生物合成受阻, 进而影响到类胡萝卜素的生物合成, 进而导致杂草出现白化后死亡^[3]。异恶唑草酮除草剂自从1992年问世以来, 先后在美国和欧洲等国家得到了广泛应用, 1998年经美国EPA注册用于其16个州玉米田的除草^[4]。目前国际社会对各类农药残留检测的要求越来越严格, 检测项目日

收稿日期: 2011-02-23

基金项目: 国家认证认可管理委员会检验检疫行业标准制订项目(2009B412)

作者简介: 杨长志(1962—), 男, 研究员, 硕士, 主要从事食品安全与检测研究。E-mail: yangcz621126@163.com

益增多,尤其是日本开始实施的“肯定列表制度”,对食品中农药的限量进行了严格规定并重点监控;2008年4月21日美国拟修订除草剂异恶唑草酮及其代谢物的残留限量,玉米谷粒为0.02mg/kg。为使我国食品顺利出口,研究和探讨玉米中异恶唑草酮及其代谢物残留快速准确的分析方法显得极为迫切。而国内尚未见报道,国外对异恶唑草酮及其代谢物残留检测方法报道^[5-7]也不多,主要测定水、土壤、植物草料中异恶唑草酮及其代谢物残留,采用的方法为液相色谱法、液相色谱-串联质谱法。本研究结合 QuEChERS 净化技术^[8-11],即提取液直接加入 PSA 吸附剂粉末、ODSC18 或石墨炭黑粉进行净化,经离心后上清液上机检测。本实验拟建立玉米中异恶唑草酮及代谢物残留量同时测定的高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, HPLC-MS/MS)分析法为各检测实验室实用的农残快速检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

玉米(四单 19) 哈尔滨市购。

乙酸、甲酸、乙酸钠、乙酸铵、氯化钠均为分析纯;乙腈(色谱纯);无水硫酸镁(分析纯):经 650 灼烧 4h,置于干燥器内备用;石墨化炭黑吸附剂(120~400 μm);*N*-丙基乙二胺(PSA)吸附剂(40~100 μm);十八烷基硅烷(ODS)键合相(40~100 μm);异恶唑草酮(isoxaflutole, IXF)(CAS:141112-29-0,纯度 99%);异恶唑草酮代谢物(diketonitrile, DKN)(CAS:143701-75-1,纯度 99%);异恶唑草酮代谢物(benzoic acid metabolite, BA)(CAS:142994-06-7,纯度 99%) 德国 Sigma-Aldrich 公司。

异恶唑草酮及代谢物标准储备溶液:准确称取适量异恶唑草酮及代谢物标准品,用乙腈溶解并定容至 100mL 棕色容量瓶中,得质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备溶液,此溶液避光-18 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

混合标准中间溶液:分别准确吸取异恶唑草酮标准储备溶液 10mL、异恶唑草酮代谢物 标准储备溶液 5mL 和异恶唑草酮代谢物 标准储备溶液 5mL 于 50mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释成质量浓度分别为 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(IXF)、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DKN)、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BA)的标准中间溶液,此溶液转移至储液瓶中避光-18 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

混合标准工作溶液:根据需要使用前用空白样品基质配制适当混合标准工作溶液。

1.2 仪器与设备

Waters Xevo TQ MS 液相色谱-串联质谱联用仪[配有大气压化学电离源(APCI)] 美国 Waters 公司;XP 205 电子天平(感量 0.01mg)、PL3002 电子天平(0.01g) 瑞士梅特勒-托利多公司;TDZ5-WS 离心机 湘仪离心机仪器有限公司;Vortex.Genie2 旋涡混合器 美国 Scientific Industries 公司;N-EVAP 111 氮吹仪 美国 Organomation Associates 公司;T25 Basic 均质器 德国 IKA 公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH Phenyl(50mm \times 2.1mm, 1.7 μm);流动相:梯度洗脱程序见表 1;流速:0.30mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:5 μL 。

表 1 梯度洗脱程序表

保留时间/min	0.00	2.20	3.00	4.00	4.20	5.50	5.60
乙酸-1mmol/L	80	80	60	60	30	30	80
乙腈/(1.5:98.5, V/V)	20	20	40	40	70	70	20

1.3.2 质谱条件

离子源:大气压化学电离源;扫描方式:负离子扫描;检测方式:多反应监测;离子源温度:150 $^{\circ}\text{C}$;去溶剂气流量:750L/h,氮气;探头温度:550 $^{\circ}\text{C}$;锥孔气流量 50L/h,氮气;碰撞气流量:0.24mL/min,氩气,纯度 99.999%;电晕针电压:3.0kV;定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞气能量见表 2。

1.3.3 样品前处理

称取试样 5g(精确到 0.01g)于 50mL 螺旋盖聚丙烯离心管中,加入 10mL 2% 乙酸溶液,于旋涡混合器上混合 30s,放置 15min。加入 3g 无水硫酸镁、1g 氯化钠、

表 2 异恶唑草酮及代谢物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞气能量

Table 2 MRM precursor/product ion transitions, cone voltage, collision energy for qualitative and quantitative analysis of isoxaflutole and its metabolites

化合物	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞气能量/eV
异恶唑草酮	357.9/78.9、357.9/278.9	357.9/278.9	32、32	16、32
异恶唑草酮代谢物	357.9/78.9、357.9/277.9	357.9/277.9	26、26	14、16
异恶唑草酮代谢物	266.9/159.1、266.9/222.7	266.9/222.7	16、16	19、10

1g 乙酸钠和 15mL 乙酸-乙腈(1:99, *V/V*)溶液,用均质器以 10000r/min 均质 2min, 4000r/min 离心 5min。将上清液转移至 25mL 容量瓶中。再用 10mL 乙酸-乙腈(1:99, *V/V*)溶液重复提取一次,合并提取液于同一 25mL 容量瓶中,并用乙腈定容至刻度,待净化。

移取 8mL 上述提取液于 15mL 螺旋盖聚丙烯离心管中,加入 300mg 无水硫酸镁、250mg PSA、500mg ODS 和 80mg 石墨化炭黑,在旋涡混合器上混合 2min, 4000 r/min 离心 5min。准确移取 5mL 净化液于 15mL 玻璃具塞离心管中,经 40 氮吹仪吹干后,用 1.3% 甲酸-乙腈溶液(80:20, *V/V*)溶液溶解并定容 1.0mL,过 0.45 μm 聚四氟乙烯滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

2 结果与分析

2.1 测定方法的选择

从其化学结构式和文献报道得知,异恶唑草酮没有极性,但极其不稳定,遇水很容易转化为异恶唑草酮代谢物(DKN、BA),同时 DKN 和 BA 挥发性低、热不稳定性,其中代谢物 BA 是一种苯甲酸类化合物^[12],只有将其酯化方能采用气相色谱法-检测器(ECD)测定其残留量,利用 GC 方法也只能检测其总的异恶唑草酮残留量,不能区分代谢物的残留量^[13],所以这种方法不能满足测定异恶唑草酮及代谢物残留量的需要。国外文献大多采用 LC 或 LC-MS/MS 测定异恶唑草酮及代谢物残留量^[6-7],所以本标准最后选用 HPLC-MS/MS 进行研究。

2.2 提取剂的选择

异恶唑草酮微溶于正己烷,较微溶于水,易溶于乙腈、丙酮等有机溶剂,但在水(pH7)中不稳定极易降解;其代谢物易溶于水、乙腈、丙酮等有机溶剂,但极性强、挥发性低、热不稳定性,其 pK_a 分别为 DKN:1.1、BA:2.1,显比较强的酸性^[6];同时又根据 Anastassiades 和 Lehotay 等研究建立的 QuEChERS 的方法^[8-9],即先用 2% 乙酸溶液浸润样品,然后用含乙酸-乙腈(1:99, *V/V*)对样品进行提取,所以本方法选用酸性乙腈作为提取剂。

2.3 提取和净化方法的选择和优化

原 QuEChERS 方法是将样品用单一溶剂乙腈振荡,加入 MgSO_4 等盐除水;然后直接从提取液中取 2mL 用乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)等吸附剂进行净化,上清液进行 GC-MS、LC-MS 检测。本方法是在原有的基础上进行了改进,将原来的一次提取改为两次,最后定容提取液为 25mL,这样有效地提高了药物的提取效率;在净化方法上也有改进,从 25mL 提取液中准确吸取 8mL,采用 PSA、ODSC₁₈ 和石墨炭黑粉进行净化,一方面 PSA 去除脂肪酸、极性色素、糖类物质等极性基

质杂质效果较好,另一方面 ODSC₁₈ 和石墨炭黑除去部分脂肪、脂溶性和色素等杂质的能力较强。所以,在净化的过程中除了考虑原方法中的 PSA 粉外,同时还要考虑 ODSC₁₈ 粉和石墨炭黑粉,且各种吸附剂粉末的用量不为定数,而是针对不同的目标化合物和样品基质进行调整。对添加 PSA 和 C₁₈ 的量进行优化,结果发现,PSA 添加 250mg, C₁₈ 添加 500mg 即可达到净化效果,继续添加,样液无明显改善,不过对回收率影响也不大。故本方法中添加 PSA 250mg 和 C₁₈ 500mg。对于玉米样品的净化,有些杂质干扰除了加入 PSA、C₁₈ 之外仍然无法去除。在这种情况下加入一定量石墨化炭黑,实验效果良好,但石墨化炭黑加入的量需要严格控制,如果加入石墨化炭黑量的大于 80mg 时,异恶唑草酮及代谢物的回收率有些下降,其回收率小于 60%,所以本实验石墨化炭黑用量为 80mg。

2.4 色谱柱和流动相的选择

据文献[5-7]报道,分析异恶唑草酮及代谢物残留量常用的色谱柱为 C₁₈、C₈ 液相色谱柱。本实验选择 ACQUITY UPLC BEHC₁₈ 液相色谱柱(50mm \times 2.1mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC BEH Phenyl(50mm \times 2.1mm, 1.7 μm)液相色谱柱和 ACQUITY UPLC HSST3 液相色谱柱(50mm \times 2.1mm, 1.7 μm),同时选择 5 种不同溶剂配比:水-乙腈、乙酸铵溶液-乙腈、甲酸铵溶液(pH3.0)-乙腈、乙酸-1mmol/L 乙酸铵(1.5:98.5, *V/V*)-乙腈、0.2% 甲酸-乙腈进行流动相实验。结果表明:异恶唑草酮及代谢物在 ACQUITY UPLC BEHC₁₈ 液相色谱柱能进行有效分离,但异恶唑草酮代谢物 色谱峰太宽且峰形不对称、不平滑;而在 ACQUITY UPLC HSST3、ACQUITY UPLC BEH Phenyl(50mm \times 2.1mm, 1.7 μm)液相色谱柱上,异恶唑草酮及代谢物无论在分离上还是在灵敏度上都优于 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 液相色谱柱,且色谱峰尖锐,对称,平滑。对于流动相的选择,主要考虑异恶唑草酮化合物本身在水(pH7)中不稳定极易降解性,以及代谢物 pK_a 值(DKN:1.1、BA:2.1),所以本实验的流动相乙酸-1mmol/L 乙酸铵(1.5:98.5, *V/V*)-乙腈在 ACQUITY UPLC HSST3、ACQUITY UPLC BEH Phenyl 进行了实验,结果表明:这两种色谱柱无论在分离上还是在灵敏度上都能满足实验要求,最终选择 ACQUITY UPLC BEH Phenyl 色谱柱、乙酸-1mmol/L 乙酸铵(1.5:98.5, *V/V*)-乙腈分别作为本标准方法的色谱柱和流动相。

2.5 定容溶液的选择

本实验选择乙腈、0.2% 乙酸-乙腈、1.3% 甲酸-乙腈进行实验,结果表明:乙腈定容进样,异恶唑草酮两种代谢物的峰形不好且出峰太早;0.2% 乙酸-乙腈

定容进样, 异恶唑草酮及两种代谢物有降解现象; 1.3% 甲酸-乙腈不同比例定容进样, 以 1.3% 甲酸-乙腈(8:2, V/V)效果最好, 所以样品的定容溶液选择为 1.3% 甲酸-乙腈(8:2, V/V)。

2.6 滤膜的选择

本实验选择混合纤维素酯滤膜(0.22 μm (水相)、尼龙滤膜(0.22 μm)、聚四氟乙烯滤膜(0.45 μm)进行实验, 结果表明混合纤维素酯滤膜 0.22 μm (水相)、尼龙滤膜 0.22 μm 对异恶唑草酮代谢物有吸附作用, 而聚四氟乙烯滤膜没有吸附现象, 所以本实验选择了聚四氟乙烯滤膜(0.45 μm)。

2.7 标准曲线和方法检测限

移取一定量混合标准溶液, 用 1.3% 甲酸-乙腈溶液(80:20, V/V)溶液配制一系列不同浓度的异恶唑草酮及代谢物的标准工作溶液, 在选定的色谱条件和质谱条件下进行测定, 用峰面积对标准工作溶液中被测组分的浓度作图, 其线性范围、线性方程、线性相关系数和方法检测线见表 3。

2.8 方法的回收率、精密度

本方法选用玉米样品, 采用添加法分别对空白玉米进行 3 个不同水平的加标实验, 每个水平平行测定 10 次, 计算回收率和相对标准偏差, 其回收率、精密度的结果见表 4。由表 4 可以看出, 添加异恶唑草酮及代谢物在 0.005 ~ 0.100mg/kg 范围之内, 方法的回收率在 70% ~ 120% 之间, 精密度均小于 15%, 符合残留分析的要求。玉米空白样品和添加量为 0.005 ~ 0.010mg/kg 的玉米样品色谱图见图 1 ~ 3。

表 4 玉米中异恶唑草酮及代谢物的回收率、精密度($n=10$)

Table 4 Recovery rates and relative standard deviations of isoxaflutole and its metabolites in maize ($n=10$)

化合物	添加量/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
异恶唑草酮	0.010	83.2 ~ 104.6	6.87
	0.050	79.2 ~ 102.6	7.72
	0.100	80.0 ~ 98.6	7.61
异恶唑草酮代谢物	0.005	83.2 ~ 104.2	9.22
	0.025	79.8 ~ 98.3	6.69
	0.050	80.4 ~ 106.1	8.18
异恶唑草酮代谢物	0.005	74.8 ~ 107.2	8.09
	0.025	81.3 ~ 101.8	6.45
	0.050	80.2 ~ 98.4	11.15

表 3 异恶唑草酮及代谢物的色谱保留时间、回归方程、线性关系及检出限

Table 3 Retention times, linear equations and detection limits of isoxaflutole and its metabolites

化合物	保留时间/min	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	线性方程	相关系数(r)	方法检测限/(mg/kg)
异恶唑草酮	4.91	0.0025 ~ 1.0000	$A=206.01C + 631.1$	0.9999	0.01
异恶唑草酮代谢物	3.53	0.0025 ~ 1.0000	$A=680.8C + 2534.5$	0.9998	0.005
异恶唑草酮代谢物	1.79	0.0025 ~ 1.0000	$A=1192.8C - 952.8$	0.9999	0.005

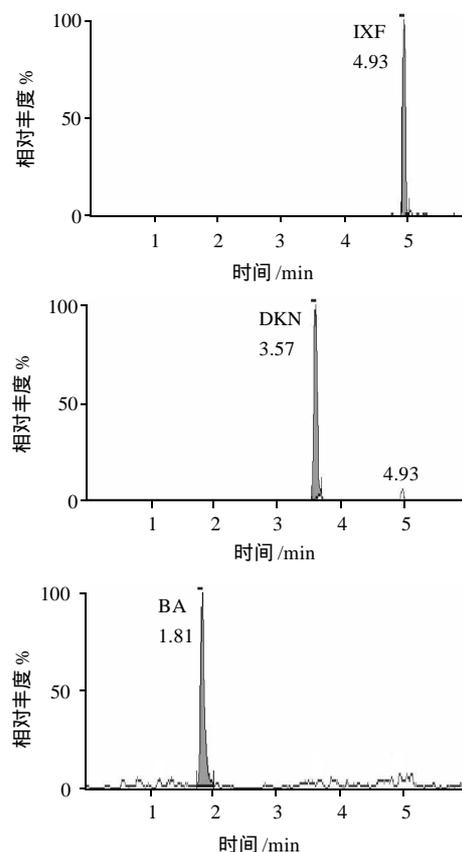
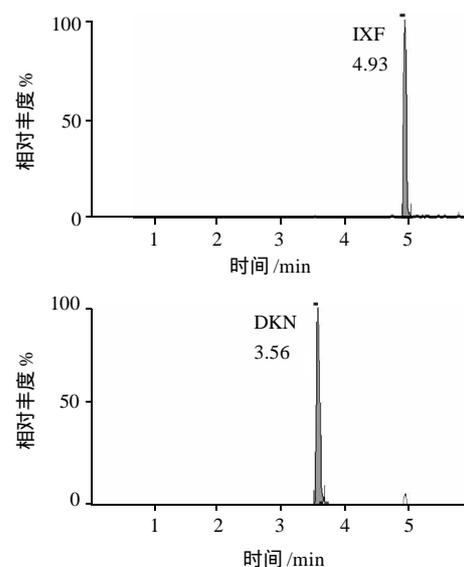


图 1 异恶唑草酮及代谢物标准品多反应监测色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of the standards of isoxaflutole and its metabolites



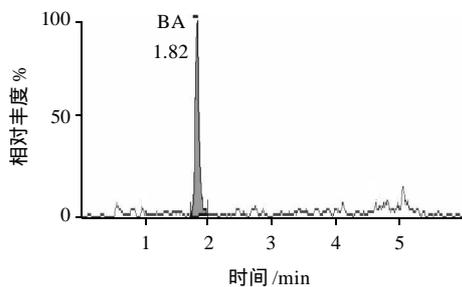


图2 玉米样品添加(5 μg/kg)色谱图

Fig.2 Chromatogram of spiked maize sample (at 5 μg/kg)

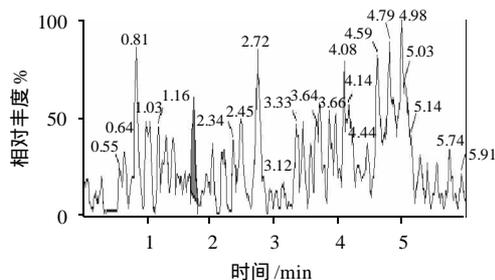
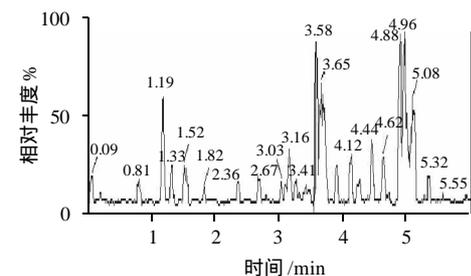
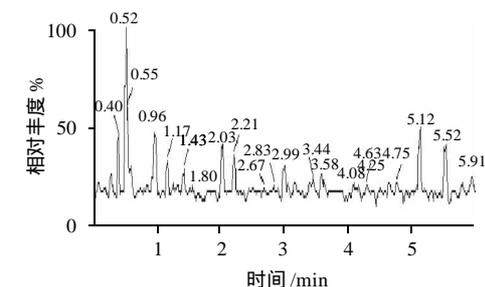


图3 玉米样品空白色谱图

Fig.3 Chromatogram of blank maize sample

3 结论

本实验采用改良的 QuEChERS 净化法。试样用乙酸-乙腈(1:99, V/V)高速匀浆提取两次,经氯化钠、醋酸钠和无水硫酸镁盐析后定容,提取液经 *N*-丙基乙二胺(PSA)、十八烷基硅烷(ODS)和石墨化炭黑(GCB)净化,解决了样品中脂肪和色素等大多数干扰基质的问题。该

QuEChERS 净化法与现代的固相萃取(SPE)净化技术相比,具有溶剂使用量少,污染小,价格低廉,分析速度快,农药范围广,操作简便,装置简单,回收率高等优势。实验证明,QuEChERS 方法作为一种快速高效的样品前处理技术,完全可以应用到食品中多农药残留检测的领域。

参考文献:

- [1] 刘长令. 玉米新型除草剂-isoxaflutole[J]. 农药译丛, 1997, 19(6): 61-63.
- [2] 苏少泉. 异恶唑草酮的开发、使用与除草剂新品种筛选的思考[J]. 农药研究与应用, 2008, 12(1): 1-6.
- [3] PALLETT K E, LITTLE J P, SHEEKEY M, et al. The mode of action of isoxaflutole I. Physiological effects, metabolism, and selectivity[J]. Pestic Biochem Physiol, 1998, 62(2): 113-124.
- [4] PALLETT K E. The mode of action of isoxaflutole: a case study of an emerging target site[M]//COBB A H, KIRKWOOD R C. Herbicides and their mechanisms of action. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press, 2000: 215-238.
- [5] LIN C H, LERCH R N, THURMAN E M, et al. Determination of isoxaflutole (balance) and its metabolites in water using solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet or mass spectrometry[J]. Agric Food Chem, 2002, 50(2): 5816-5824.
- [6] LIN C H, LERCH R N, THURMAN E M, et al. Improved HPLC-MS/MS method for determination of isoxaflutole (balance) and its metabolites in soils and forage plants[J]. Agric Food Chem, 2007, 55(10): 3805-3815.
- [7] ROUCHAUD J, NEUS O, EELEN H, et al. Soil metabolism of isoxaflutole in corn[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2002, 42(3): 280-285.
- [8] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER D. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues[C]//America Chemical Society. Arlington Washington, D C: 18th Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium Proceedings, August 11 - 15, 2002, 2002: 231-241.
- [9] LEHOTAY S J. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe approach for determining pesticide residues[M]// Pesticide Protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2005: 239-261.
- [10] OKIHASHI M, KITAGAWA Y, AKUTSU K, et al. Rapid method for the determination of 180 pesticide residues in foods by gas chromatography/Mass spectrometry and flame photometric detection[J]. Pestic Sci, 2005, 30(4): 368-377.
- [11] 胡西洲, 程运斌, 胡定金. 农药多残留分析中 QuEChERS 方法介绍[J]. 现代农药, 2006, 5(4): 24-29.
- [12] BELTRAN E, FENET H, COOPER J F, et al. Kinetics of abiotic hydrolysis of isoxaflutole: influence of pH and temperature in aqueous mineral buffered solutions[J]. Agric Food Chem, 2000, 48(9): 4399-4403.
- [13] ROUCHAUD J, NEUS O, CALLENS D, et al. Isoxaflutole herbicide persistence and mobility in summer corn and winter wheat crops[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1998, 60(4): 577-584.