

液相色谱-串联质谱法测定大米中异噁唑草酮及代谢物残留量

罗佳¹, 沈睿至², 杨长志^{2*}

(1. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 2. 黑龙江出入境检验检疫局, 哈尔滨 150001)

摘要: **目的** 建立大米中异噁唑草酮及代谢物残留量的液相色谱-串联质谱法测定方法。**方法** 试样中残留的异噁唑草酮除草剂及代谢物用乙酸乙腈溶液(1:99, V:V)高速匀浆提取, 提取液经 N-丙基乙二胺(PSA)、十八烷基硅烷(ODS)净化, 经色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH Phenyl 分离和流动相为 1.5% 乙酸的乙酸铵(1 mmol/L)-乙腈进行梯度洗脱, 用配有大气压化学电离源(APCI)的液相色谱-串联质谱仪检测和确证。**结果** 异噁唑草酮及代谢物在 0.0025~1.000 µg/mL 浓度范围内呈现良好线性关系($r=0.9998\sim0.9999$)。当样品加标浓度在 5~200 µg/kg 范围内时, 其样品加标平均回收率为 70.2%~110.6%, 相对标准偏差为 7.38%~12.84%。异噁唑草酮及代谢物的最低检出限分别为 10 µg/kg、5 µg/kg。**结论** 本方法适用于大米中异噁唑草酮及代谢物残留的同时测定。

关键词: 异噁唑草酮及代谢物; 液相色谱-串联质谱法; 大米

Determination of isoxaflutole and its metabolites residues in rice by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry

LUO Jia¹, SHEN Rui-Zhi², YANG Chang-Zhi²

(1. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China;
2. Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a novel method for determination of isoxaflutole and its metabolites residues in rice by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** With acetic acid acetonitrile solution(1:9,V:V) as the extraction, the test sample were extracted by means of high speed homogenization, cleaned up by primary secondary amine (PSA) and octadecylsilane (ODS). The residues in the extracts were separated on a reversed-phase liquid chromatography with ACQUITY UPLC BEH Phenyl column using a gradient elution program of 1.5% acetic acid (1 mmol/L) ammonium acetate solution and acetonitrile. The residues were determined and confirmed by LC-MS/MS equipped with atmosphere pressure chemical ionization source. **Results** The calibration curve of isoxaflutole and its metabolites showed a good linearity in the range of 0.0025~1.000 µg/mL with the correlation coefficient of 0.9998~0.9999. The average recoveries of isoxaflutole and its metabolites in spiked samples were in the range of 70.2%~110.6%, and the relative standard deviations (RSD) were between 7.38%~12.84% at spiked levels of 5~200 µg/kg. The limit of detection was 10 µg/kg and 5 µg/kg for the isoxaflutole and its metabolites,

*通讯作者: 杨长志, 研究员, 主要研究方向为食品安全与检测技术。E-mail: yangcz621126@163.com

*Corresponding author: YANG Chang-Zhi, Researcher, Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China. E-mail: yangcz621126@163.com

respectively. **Conclusion** This method can be used for the simultaneous determination of isoxaflutole and its metabolites residues in rice.

KEY WORDS: isoxaflutole and its metabolites; liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS); rice

1 引言

异噁唑草酮(别名为 IXF 或 Balance)被称为新异噁唑类除草剂家族的一员,是一种苗前除草剂^[1]。这种新型除草剂新型由是罗纳-普朗克公司(现为拜耳公司)于 2001 年首先开发主要用于玉米生产的农药。异噁唑草酮不仅用量低(约 11-64 g/公顷),而且有效除草时期长,用于防除抗三嗪类除草剂的杂草^[2,3]。1998 年首次获美国环保局(EPA)注册,1999 年应用于其 16 个州玉米田的除草。异噁唑草酮除草剂对羟基苯基丙酮酸酯双氧化酶抑制剂(HPPD)具有抑制作用,从而阻断类胡萝卜素生物合成^[1,4],进而导致杂草出现白化后死亡。由于异噁唑草酮除草剂杀草谱广,有效除草时期长(可达 6 周),其广泛应用可能对人类造成潜在的健康威胁和生态环境污染。

为保护人类健康,各国政府对食品中异噁唑草酮残留量的检测都很重视,均制定了严格的限量要求^[5]。尤其日本政府于 2006 年 5 月 29 日实施了“肯定列表制度”,所要求的农、兽残限量更为严格,对我国出口食品将产生极大影响。异噁唑草酮是日本、美国、韩国、澳大利亚、加拿大、意大利、以色列和食品法典委员会等国有限量要求的检测项目,其在各类食品中最高残留限量在 0.01~10 mg/kg 之间,与此同时,欧盟还规定了此种农药的方法的测定低限为 0.05 mg/kg。

目前,国内有关食品中异噁唑草酮及代谢物残留量测定方法鲜有文献报导^[6],国外文献的报道也不多, Lin 等采用 LC 或 LC-MS 测定水中异噁唑草酮及代谢物残留量^[7], LC-UV 的检测低限 150 ng/L (IXF)、100 ng/L 异噁唑草酮代谢物 I (diketonitrile, DKN)、250 ng/L 异噁唑草酮代谢物 II (benzoic acid metabolite, BA); LC-MS 测定低限 50 ng/L。Lin 等采用 LC-MS/MS 法检测土壤和饲料作物中异噁唑草酮及代谢物残留量^[8], 饲料作物中异噁唑草酮及代谢物的测定低限分别为 0.05 μg/kg (IXF)、0.01 μg/kg (DKN)、0.05 μg/kg (BA)。Michael T. Meyer 等采

用 LC-MS/MS 法检测水中异噁唑草酮及代谢物残留量^[9], 样品经 SPE 柱净化后,其测定低限分别为 0.003 μg/L (IXF、DKN)、0.004 μg/L (BA)。鉴于此,本文研究了大米中异噁唑草酮及代谢物残留量检测的样品前处理方法、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测方法。该方法既简便、省时又能得到很好的定性、定量结果,完全能满足大米中异噁唑草酮及代谢物残留量检测的需要。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

2.1.1 试剂

甲酸、乙酸铵均为分析纯,均购于北京百灵威科技有限公司;冰乙酸、氯化钠均为分析纯,均购于天津市凯通化学试剂有限公司;乙酸钠(分析纯),购于天津市瑞金特化学品有限公司;乙腈(色谱纯),购于 Dikma Technologies INC.;无水硫酸镁(分析纯),购于 Acros Organics 公司;经 650 °C 灼烧 4 h,置于干燥器内备用;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)均购于天津博纳艾杰尔科技有限公司;异噁唑草酮(isoxaflutole, IXF)、异噁唑草酮代谢物 I (diketonitrile, DKN)、异噁唑草酮代谢物 II (benzoic acid metabolite, BA)均购于德国 Sigma-Aldrich 公司。

2.1.2 仪器

Waters Xevo TQ MS 液相色谱-质谱/质谱联用仪(配有大气压化学电离源(APCI),美国 Waters 公司);离心机(TDZ5-WS):湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司;氮吹仪(N-EVAP):美国 Organomation 公司;均质器(IKA T25):德国 IKA 公司。

2.2 仪器条件

2.2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH Phenyl(50 mm×2.1 mm (i.d.), 1.7 μm);流动相:梯度洗脱程序见表 1;流速: 0.30 mL/min;柱温: 30 °C;进样量: 5 μL。

表 1 梯度洗脱程序表
Table 1 The gradient program of mobile phase

保留时间(min)	1.5%乙酸乙酸钠(1 mmol/L), %	乙腈, %
0.00	80	20
2.20	80	20
3.00	60	40
4.00	60	40
4.20	30	70
5.50	30	70
5.60	80	20

2.2.2 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 ℃; 去溶剂气流量: 750 L /hr, 氮气; 探头温度: 550 ℃; 锥孔气流量 50 L /hr, 氮气; 碰撞气流量: 0.24 mL/min, 氙气, 纯度≥99.999%; 电晕针电压: 3.0 kV; 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞气能量见表 2。

2.3 样品前处理

称取试样 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 螺旋盖聚丙烯离心管中, 加入 10 mL 2%乙酸水溶液, 于旋涡混合器上混合 30 s, 放置 15 min。加入 3 g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 乙酸钠和 15 mL 1%乙酸乙腈溶液, 用均质器以 10000 r/min 均质 2 min, 4000 r/min 离心 5 min。将上清液转移至 25 mL 容量瓶中。再用 10 mL 1%乙酸乙腈溶液重复提取一次, 合并提取液于同一 25 mL 容量瓶中, 并用乙腈定容至刻度, 待净化。

移取 8 mL 上述提取液于 15 mL 螺旋盖聚丙烯离心管中, 加入 300 mg 无水硫酸镁、250 mg PSA、500 mg ODS, 在旋涡混合器上混合 2 min, 4000 r/min 离心 5 min。准确移取 5 mL 净化液于 15 mL 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 1.0 mL, 过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

2.4 方法的线性实验

准确称取适量异噁唑草酮及代谢物标准品, 用乙腈溶解并定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 得浓度为 100 μg/mL 的标准储备溶液。分别准确吸取异噁唑草酮标准储备溶液 10 mL、异噁唑草酮代谢物 I 标准储备溶液 5 mL 和异噁唑草酮代谢物 II 标准储备溶液 5 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈稀释成浓度分别为 20.0 μg/mL(IXF)、10.0 μg/mL(DKN)、10.0 μg/mL(BA)的标准中间溶液。根据需要使用前用空白样品基质配制浓度在 0.0025~1.000 μg/mL 范围混合标准工作溶液。

3 结果与讨论

3.1 测定方法的选择

从其化学结构式和文献报道得知, 异噁唑草酮没有极性, 但极其不稳定, 遇水很容易转化为异噁唑草酮代谢物(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^[11], 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^[12], 利用 GC 方法也只能检测其总的异噁唑草酮残留量, 不能区分代谢物的残留量^[13,14], 所以这种方法不能满足测定异噁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 测定异噁唑草酮及代谢物残留量^[7,9]。所以本标准最后选用 LC-MS/MS 进行研究, 经实验本方法的测定低限为 0.01 mg/kg (IXF)、0.005 mg/kg (DKN、BA), 完全能满足日本肯定列表“一律标准 0.01 mg/kg 要求。

表 2 异噁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 transitions of precursor/product ion for qualitative and quantitative analysis, cone voltage, and collision energy 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)
异噁唑草酮	357.9/78.9, 357.9/278.9	357.9/278.9	32, 32	16, 32
异噁唑草酮代谢物 I	357.9/78.9, 357.9/277.9	357.9/277.9	26, 26	14, 16
异噁唑草酮代谢物 II	266.9/159.1, 266.9/222.7	266.9/222.7	16, 16	19, 10

3.2 提取剂的选择

异噁唑草酮微溶正己烷, 较微溶于水, 易溶于乙腈、丙酮等有机溶剂, 但在水(pH=7)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, 但极性较强、挥发性低、热不稳定性, 其 pKa 分别为 DKN: 1.1、BA: 2.1, 显比较强的酸性^[8]; 同时又根据 Anastassiades 和 Lehotay 等研究建立的 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe)的方法^[15,16], 即先用 2%乙酸水溶液浸润样品, 然后用含 1%醋酸的乙腈对样品进行提取, 所以本方法选用酸性乙腈作为提取剂。主要考虑到乙腈一方面能沉淀蛋白质而脂肪提出又很少, 又有利于后续的盐析和净化。

3.3 净化方法的选择和优化

PSA (primary secondary amine, 伯仲胺)吸附剂能有效去除样本中的脂肪酸、极性色素、糖类物质等极性基质杂质, C₁₈ 吸附剂能去部分脂肪和脂溶性杂质。试验对添加 PSA 和 C₁₈ 的量进行了优化, 结果发现, PSA 添加 250 mg, C₁₈ 添加 500 mg 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 250 mg 和 C₁₈ 500 mg。

3.4 色谱柱和流动相的选择

据文献报道^[7,8,10], 分析异噁唑草酮及代谢物残留量常用的色谱柱为 C₁₈、C₈ 液相色谱柱。本试验选择了 ACQUITY UPLC BEHC₁₈ 液相色谱柱 (50 mm×2.1 mm(i.d), 1.7 μm)、ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 mm×2.1 mm(i.d), 1.7 μm)液相色谱柱和 ACQUITY UPLC HSST3 液相色谱柱 (50 mm×2.1 mm(i.d), 1.7 μm), 同时我们选择了 5 种不同溶剂配比: 水-乙腈、乙酸铵水溶液-乙腈、甲酸铵水溶液 (pH=3.0)-乙腈、1.5%乙酸乙酸钠水溶液-乙腈、0.2%甲酸-乙腈进行了流动相实验。结果表明: 异噁唑草

酮及代谢物在 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 液相色谱柱能进行有效分离, 但异噁唑草酮代谢物 II 色谱峰太宽且峰形不对称、不平滑; 而在 ACQUITY UPLC HSST3、ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 mm×2.1 mm(i.d), 1.7 μm)液相色谱柱上, 异噁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, 主要考虑异噁唑草酮化合物本身在水(pH=7)中不稳定极易降解性^[15], 以及代谢物 pKa 值(DKN: 1.1, BA: 2.1), 所以本实验的流动相选择了 1.5%乙酸乙酸钠水溶液-乙腈在 ACQUITY UPLC HSST3、ACQUITY UPLC BEH Phenyl 进行实验, 结果表明: 这 2 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、1.5%乙酸乙酸钠水溶液-乙腈分别作为本标准方法的色谱柱和流动相。

3.5 标准曲线和最低检出限

将质量浓度在 0.0025~1.000 μg/mL 范围内的一系列不同浓度的异噁唑草酮及代谢物混合标准工作溶液, 在选定的色谱条件和质谱条件下进行分析, 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、线性相关系数和最低检出限见表 3。

3.6 方法的回收率、精密度

称取 5 g (精确到 0.01 g)样品, 添加不同浓度的标准溶液, 按照 2.3 节方法对样品进行前处理, 在 2.2 节中色谱条件下, 对异噁唑草酮及代谢物回收率、精密度等指标进行考察。其回收率、精密度的结果见表 4。由表 4 可以看出, 异噁唑草酮及代谢物在 5~200 μg/kg 浓度范围之间, 方法的回收率在 70.2%~110.6% 之间, 精密度在 7.38%~12.84% 之间。大米空白样品和添加浓度为 5~10 μg/kg 样品色谱图见图 1~3。

表 3 异噁唑草酮及代谢物的色谱保留时间、线性相关系数及检出限
Table 3 Retention time, linear relationships, detection limits of isoxaflutole and its metabolites

化合物	保留时间(min)	线性范围((μg/mL)	线性方程	相关系数(r)	检出限(μg/kg)
异噁唑草酮	4.91	0.0025~1.0000	Y= 206.01X+631.1	0.9999	10
异噁唑草酮代谢物 I	3.53	0.0025~1.0000	Y= 680.8X+2534.5	0.9998	5
异噁唑草酮代谢物 II	1.79	0.0025~1.0000	Y= 1192.8X-952.8	0.9999	5

表 4 大米中异噁唑草酮及代谢物的回收率、精密度($n=10$)
Table 4 Recoveries and relative standard deviations of isoxaflutole and its metabolites in rice ($n=10$)

化合物	添加浓度($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
异噁唑草酮	10	77.2~110.6	10.31
	50	80.0~101.2	8.68
	200	75.1~102.7	10.88
异噁唑草酮代谢物 I	5	81.6~108.2	9.44
	25	78.2~103.2	9.92
	200	78.8~106.1	8.27
异噁唑草酮代谢物 II	5	81.2~108.4	9.48
	25	79.4~101.1	7.38
	200	70.2~104.8	12.84

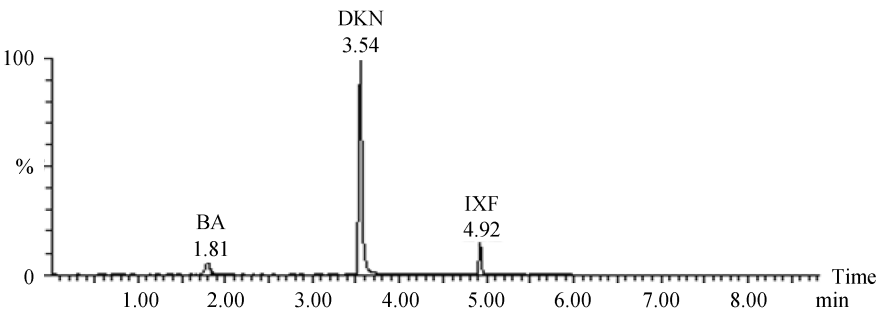


图 1 异噁唑草酮及代谢物标准品多反应监测色谱图
Fig. 1 MRM chromatogram of the isoxaflutole and its metabolites standard

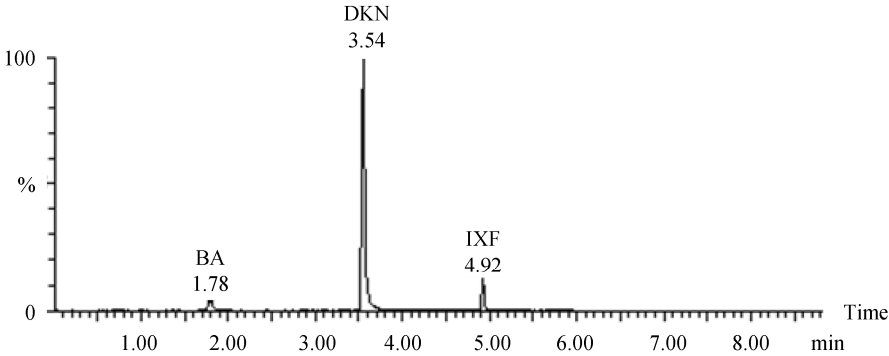


图 2 大米样品添加($5\ \mu\text{g/kg}$ 、 $10\ \mu\text{g/kg}$)色谱图
Fig. 2 Chromatogram of spiked ($5\ \mu\text{g/kg}$, $10\ \mu\text{g/kg}$) in rice

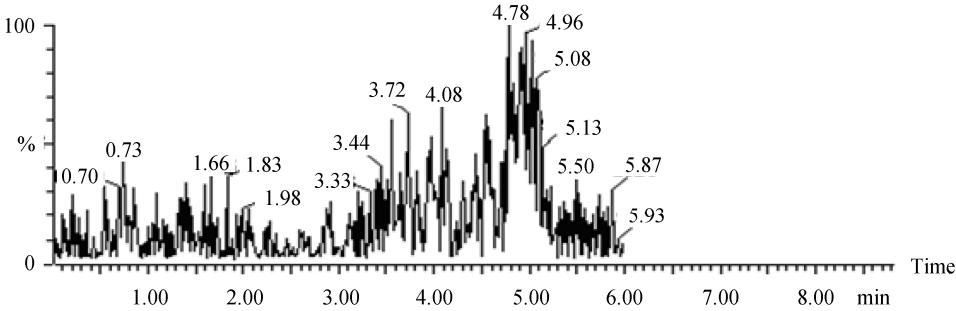


图 3 大米样品空白色谱图
Fig. 3 Chromatogram of blank in rice

4 结 论

本文建立了大米中异噁唑草酮及代谢物残留量的液相色谱-串联质谱分析方法,系统研究了样品前处理过程,并对色谱条件进行优化,解决了大米中异噁唑草酮及代谢物残留量检测的分析难题。异噁唑草酮及代谢物的线性关系良好($r=0.9998\sim0.9999$),样品加标平均回收率为70.2%~110.6%,相对标准偏差为7.38%~12.84%,最低检出限分别为0.01 mg/kg、0.005 mg/kg。实验表明本方法具有选择性好、准确度、分析速度快、操作简便、重复性好,能满足检测工作的实际要求。

参考文献

- [1] Pallett KE, Cramp SM, Little JP, *et al.* Isoxaflutole: the background to its discovery and the basis of its herbicidal properties [J]. *Pest Manage Sci*, 2001, 57: 133–142.
- [2] Lazo M, Lopez de Medina F, Sardina JL, *et al.* *Actas-Congr., Soc. Esp. Malherbol, Lleida, Spain*; Sociedad Espanola de Maherbologia: Lleida, Spain, 1997: 383–387.
- [3] Menendez J, De Prado A, Gomez-Arnau J. *Actas-Congr., Soc. Esp. Malherbol, Lleida, Spain*; Sociedad Espanola de Maherbologia: Lleida, Spain, 1997: 89–92.
- [4] Pallett KE, Little JP, Sheekey MV, *et al.* The mode of action of isoxaflutole I. Physiological effects, metabolism, and selectivity [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1998, 62: 113–124.
- [5] 王霓霓, 宿忠民, 向金秀, 等. 主要贸易国家和地区食品中农药残留限量标准[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
Wang NN, Su ZM, Xang JX, *et al.* The compilation of residue limits standards for pesticides and veterinary drugs in foodstuffs in major trading countries and regions [M]. Beijing: China Standards Press, 2010.
- [6] 杨长志, 王传松, 程阳, 等. HPLC-MS-MS 测定玉米中异噁唑草酮及代谢物残留量[J]. *食品科学*, 2011, 32(22): 280–284.
Yang CZ, Wang CS, Cheng Y, *et al.* Determination of isoxaflutole and its metabolites residues in rice by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2011, 32(22): 280–284.
- [7] Lin CH, Robert N, Lerch E, *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]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50, 5816–5824.
- [8] Lin CH, Robert N, Lerch, *et al.* Improved HPLC-MS/MS method for determination of isoxaflutole (Balance) and its metabolites in soils and forage plants [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 3805–3815.
- [9] Meyer MT, Lee EA, Scribner EA. Method of analysis by the U.S. geological survey organic geochemistry research Group-determination of dissolved isoxaflutole and its sequential degradation products, diketonitrile and benzoic acid, in water using solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *US Geolog Survey Tech Method*, 2007, 5(9): 13.
- [10] Rho'ne-Poulenc Agro. Method of analysis for the determination of isoxaflutole (RPA 201772) and its metabolites (RPA 202248 and 03328) in raw agricultural [J]. *Commodities Process Food*, 1998: 30.
- [11] Beltran E, Fenet H, Cooper JF, *et al.* Kinetics of abiotic hydrolysis of isoxaflutole: influence of pH and temperature in aqueous mineral buffered solutions [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 4399–4403.
- [12] Office of Pesticide Programs. Pesticide fact sheet: isoxaflutole [M]. Washington, DC: Environ Protect Agency, 1998.
- [13] Office of Pesticide Programs. Pesticide fact sheet: isoxaflutole; pesticide tolerance [M]. *Fed Reg*, 1998.
- [14] 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: 577–584.
- [15] Anastassiades MSJ, Lehotay D, Stajnbaher. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues [C]. In "18th Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium Proceedings", 2002: 231–241.
- [16] Lehotay SJ (2006). Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach for determining pesticide residues methods in Biotechnology [M]. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2006.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



罗 佳, 本科, 主要研究方向为食品中农药、兽药残留检测。
E-mail: luozhei@163.com



杨长志, 硕士研究生, 研究员, 硕士生导师, 主要研究方向食品安全与检测技术。
E-mail: yangcz621126@163.com