

◆ 加工与分析 ◆

UPLC-MS/MS测定水和土壤中唑啉草酯及其代谢物的方法验证

杨志富^{1,2,3}, 欧晓明^{1,2,3}, 曾利红^{1,2,3}, 汤涛⁴, 梁骥^{1,2,3}, 侯根连^{1,2,3}, 欧将^{1,2,3}

(1. 湖南化工研究院有限公司 国家农药创制工程技术研究中心, 长沙 410014 2. 农用化学品湖南省重点实验室, 长沙 410014 3. 湖南化研院检测技术有限公司, 长沙 410014 4. 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 杭州 310021)

摘要: 本研究建立了在水或土壤中同时测定痕量唑啉草酯及其代谢物M2、M3超高效液相色谱-串联质谱法, 并对其方法进行方法验证。水样(土样)经盐析后(土样在酸性条件下)加乙酸乙酯-二氯甲烷(1:1, V/V)混合溶剂萃取, 浓缩后用乙腈-水(1:1, V/V)混合溶液定容, 采用UPLC-MS/MS多反应监测(MRM)正离子模式测定, 外标法定量。方法的线性范围为0.25~100 μg/L, 相关系数均大于0.990; 在自来水和红壤土中, 当添加量分别为0.1~1 000 μg/L、1.0~1 000 μg/kg时, 回收率分别为81%~105%和86%~104%, 相对标准偏差分别小于9%和7%。该方法的灵敏度、准确度和精密性、耐用性等均符合要求, 适用于唑啉草酯及其代谢物在环境试验中低浓度样品的检测。

关键词: UPLC-MS/MS; 唑啉草酯; 代谢物; 方法验证

中图分类号: S 481+.8 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2021.06.007

Method Validation of Determination of Pinoxaden and Its Metabolites in Water and Soil by UPLC-MS/MS

YANG Zhifu^{1,2,3}, OU Xiaoming^{1,2,3}, ZENG Lihong^{1,2,3}, TANG Tao⁴, LIANG Ji^{1,2,3}, HOU Genglian^{1,2,3}, OU Jiang^{1,2,3}

(1. National Engineering Research Center for Agrochemicals, Hunan Research Institute of Chemical Industry, Co., Ltd., Changsha 410014, China; 2. Hunan Province Key Laboratory for Agrochemicals, Changsha 410014, China; 3. Hunan Chemical Research Industry Testing Technology Co., Ltd., Changsha 410014, China; 4. Institute of Quality Standards for Agricultural Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: The method of UPLC-MS/MS was established and validated to determine trace pinoxaden and its metabolites of M2 and M3 in water or soil simultaneously. Pinoxaden residues in water or soil were extracted with ethyl acetate/dichloromethane (1:1, V/V) after salting out, and pinoxaden residues in soil were extracted under acidic condition. After concentration, acetonitrile and water solution (1:1, V/V) was used for volume determination, then analyzed using UPLC-MS/MS multiple reaction monitoring (MRM) mode via positive electrospray ionization. All the analytes were quantified by the external standard method. The sensitivity, accuracy, precision and durability of the method all met the requirements. The linear range of this method was 0.25-100 μg/L, and the correlation coefficient was greater than 0.990. At the spiked concentration in water or red soil ranged from 0.1-1 000 μg/L and 1.0-1 000 μg/kg, the recoveries were 81%-105%, 86%-104%, and relative standard deviations were less than 9% and 7%, respectively. The method could be used to analyze the content of pinoxaden and its metabolites in low concentration samples in environmental test.

Key words: UPLC-MS/MS; pinoxaden; metabolites; method validation

收稿日期: 2021-01-13

基金项目: 农业农村部农药登记环境试验项目(HX1812190190022)

作者简介: 杨志富(1987—), 男, 湖南常德人, 硕士, 工程师, 主要从事农药残留和环境归趋研究。E-mail: yzf19870522@yeah.net

唑啉草酯属于先正达开发的一种新苯基吡唑啉类除草剂,作用机理为通过抑制乙酰辅酶A羧化酶,造成植物脂肪酸生物合成受阻,使细胞生长分裂停止,破坏细胞膜含脂结构,导致杂草死亡。我国已于2010年登记用于防除冬小麦和春小麦以及大麦田一年生禾本科杂草^[1-3]。唑啉草酯应用于田间后,主要的代谢产物有M2和M3,母体和代谢物均可能随雨水、淋溶等进入自然水体和土壤中,影响生物生长而造成生态风险^[4-5]。建立唑啉草酯及其代谢物M2、M3在水和土壤中的分析检测方法,旨在为该药剂在环境中的研究及风险评估提供技术支持。

目前关于唑啉草酯的报道多为合成^[6-7]、应用技术^[8-10]、质量控制^[11]和在植物基质中的残留分析^[12],未见同时对其母体和代谢物在水和土壤中的检测方法。农药在环境介质中的残留量一般较低,普通的液相色谱分析方法的检出限难满足分析要求。笔者建立的超高效液相色谱-串联质谱分析方法具有更高的灵敏度,经验证可用于唑啉草酯及其代谢物M2、M3的环境归趋和环境毒理试验中农药残留分析。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

唑啉草酯标准品(纯度98.4%),国家农药质量监督检验中心(沈阳);唑啉草酯代谢物M2标准品(纯度99.8%),北京科润天朗环境技术有限公司;唑

啉草酯代谢物M3标准品(纯度99.3%),北京科润天朗环境技术有限公司。

乙腈、甲醇(色谱纯),安可化工有限公司;甲酸(色谱纯),上海安谱实验室有限公司;乙酸乙酯、氯化钠、浓盐酸(分析纯),国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器设备

Agilent 1290/G6470型三重四极杆液质联用仪、Agilent Eclipse plus C₁₈色谱柱(2.1 mm × 50 mm × 1.8 μm),美国安捷伦公司;LC-30A/LCMS-8050型超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪,日本岛津公司;SPS 402F型电子天平(0.01 g),梅特勒·托利多(常州)测量技术有限公司;AL204型电子天平(0.000 1 g),梅特勒·托利多国际贸易(上海)有限公司;Hei-vap型旋转蒸发仪,德国海道尔夫德祥科技有限公司;ACQUITY UPLCTMBEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm × 1.7 μm),美国沃特世科技有限公司。

供试水和土壤按相关要求采集、处理^[13],主要参数信息见表1。

1.3 分析检测方法

1.3.1 仪器方法

色谱条件 流动相A(0.1%甲酸水溶液),流动相B(0.1%甲酸甲醇溶液);柱温为40℃;进样体积为5 μL。梯度洗脱程序见表2^[12,14]。

表 1 供试水和土壤主要参数信息表

基质名称	pH值	电导率/(S·m ⁻¹)	硬度/(mg·L ⁻¹)	溶解性有机碳含量/(mg·L ⁻¹)	有机质含量/%	阳离子代换量/(cmol ⁺ ·kg ⁻¹)	粘粒含量/%
自来水	6.5	17.2	53.8	1.1			
红壤土	5.4				0.93	11.6	28.2

表 2 液相梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%	流速/(mL·min ⁻¹)
0	80	20	0.4
5.0	10	90	0.4
5.5	10	90	0.4
5.6	80	20	0.4
7.0	80	20	0.4

质谱条件:离子源为ESI⁺,检测方式为多反应监测;interface电压为4.0 kV;雾化器流速为3.0 L/min;干燥气流速为10.0 L/min;加热气流速为10.0 L/min;interface温度为300℃;DL温度为250℃;Heat Block温度为400℃。质谱信息见表3。

1.3.2 前处理方法

量取50 mL水样于250 mL分液漏斗中,加入10 g

氯化钠,摇匀溶解,加入80 mL乙酸乙酯-二氯甲烷(1:1,V/V,含1% 0.1 mol/L盐酸),剧烈萃取3 min,上层清液过无水硫酸钠后收集于250 mL锥形瓶中,再用80、50 mL乙酸乙酯-二氯甲烷(1:1,V/V)萃取2遍,合并上层清液并在50℃下旋蒸至近干。用5 mL乙腈-水(1:1,V/V)定容,过膜,待LC-MS/MS检测。

表 3 农药质谱检测离子对信息

名称	保留时间/min	定量离子对	碰撞电压/V	定性离子对	碰撞电压/V
M2	4.3	317.2/174.2	35	317.2/131.1	35
M3	5.0	315.2/159.2	30	315.2/101.1	25
唑啉草酯	5.6	401.3/317.2	25	401.3/289.2	40

称取5 g(精确至0.01 g)土壤样品于250 mL塑料

离心管中,加入50 mL乙酸乙酯-乙腈(1:1,V/V),再加入1 mL 0.1 mol/L盐酸,摇匀后超声5 min,离心,过无水硫酸钠后收集于250 mL圆底烧瓶中,再用50 mL乙酸乙酯-乙腈(1:1,V/V)振荡提取2遍,每次30 min,随后离心,合并上清液至圆底烧瓶中,于50℃水浴中旋转蒸发至近干,冷却后用5 mL乙腈-水(1:1,V/V)定容,过0.22 μm有机相滤膜至进样瓶中,待LC-MS/MS检测。

1.3.3 对照品溶液配制

分别配制唑啉草酯、唑啉草酯代谢物M2、唑啉草酯代谢物M3标准储备液(母液),然后配制1.0 mg/L的唑啉草酯、M2和M3的混合标准工作液(用色谱纯乙腈定容,2~8℃保存,有效期为1个月)。将该工作液用样品基质提取液逐级稀释,得到0.25、1.0、5.0、20、50、100 μg/L的基质系列标准工作液(现配现用)。

1.4 方法验证

1.4.1 仪器方法

质谱条件:AJS-ESI⁺为正离子扫描;离子喷雾电压为3.5 kV;雾化器压力为310.3 kPa;干燥气温度为5 L/min;干燥气流速5 L/min;鞘气流速为11 L/min;其他质谱条件与1.3.1中相似。

1.4.2 前处理方法

与1.3.2前处理方法相同。

1.4.3 线性与范围

将1.0 mg/L的唑啉草酯、M2和M3的混合标准工作液分别用乙腈-水(1:1,V/V)和样品基质提取液逐级稀释配制成0.25、1.0、5.0、20、50、100 μg/L质量浓度的溶剂系列标准溶液和基质系列标准溶液,制作标准曲线。

1.4.4 添加回收试验

在供试自来水和红壤土中进行加标回收试验,自来水添加浓度分别为0.1、1和1 000 μg/L,红壤土中添加浓度分别为1、10和1 000 μg/kg,每个浓度重复6次,同时设不加药的空白对照,按上述仪器条件和样品前处理方法进行分析检测。

2 结果与分析

2.1 线性试验结果和最小检出限

当基质效应小于20%,可使用溶剂标准曲线进行计算,否则需用基质标准曲线进行计算^[5]。唑啉草酯、M2、M3的基质效应在自来水中为3.17%~20.10%,红壤土中为19.8%~53.0%。验证结果存在基质效应,需选择基质标准曲线计算。取信噪比为3倍对应的待测物质量浓度作为检出限。自来水、红壤土中唑啉草酯的线性结果见表4,相关系数均大于0.990。结果表明,该方法线性关系较好、检出限低、灵敏度高。

表4 不同基质中3种分析物的线性相关性、检出限和定量限(n=6)

基质	分析物	线性方程	相关系数	检出限	定量限
自来水	唑啉草酯	$y=9\ 663.03x+104.06$	0.997 2	0.025 μg/L	0.1 μg/L
	M2	$y=3\ 022.96x+766.89$	0.998 3	0.025 μg/L	0.1 μg/L
	M3	$y=1\ 088.89x+246.81$	0.997 7	0.025 μg/L	0.1 μg/L
红壤土	唑啉草酯	$y=15\ 366.2x+2\ 326.99$	0.993 3	0.25 μg/kg	1.0 μg/kg
	M2	$y=6\ 734.8x+756.53$	0.998 5	0.25 μg/kg	1.0 μg/kg
	M3	$y=1\ 140.08x+74.7$	0.991 6	0.25 μg/kg	1.0 μg/kg

2.2 准确度、精密度试验结果

加标回收率试验结果,见表5。在自来水和红壤土中分别添加3个水平(低、中、高)3种物质的标准混合溶液,平行测定6次,以基质标为基准计算回收率。唑啉草酯、M2、M3在自来水中添加量为0.1、1.0、1 000 μg/L时,平均回收率分别为86%~98%、81%~94%、96%~105%,相对标准偏差均小于9%;在红壤土中添加量为1.0、10、1 000 μg/kg时,平均回收率分别为87%~100%、91%~104%、86%~104%,相对标准偏差在均小于7%,表明该方法回收率高,准确度高。

2.3 再现性试验结果

根据相同方法进行回收率试验,自来水和红壤土中分别做了低、中、高3档添加浓度,每个浓度6次重复。结果显示,在自来水中的唑啉草酯日内和日间精密度分别为2%~10%和7%~11%,M2的日内和日间精密度分别为2%~6%和3%~4%,M3的日内和日间精密度分别为3%~8%和6%~10%。在红壤土中唑啉草酯的日内和日间精密度分别为3%~11%和4%~6%,M2的日内和日间精密度分别为2%~8%和1%~6%;M3的日内和日间精密度分别为2%~12%和6%~9%,均小于15%,表明该方法重复性好,精密度高。

表 5 自来水和红壤土中唑啉草酯、M2、M3 的准确度和精密度结果($n=6$)

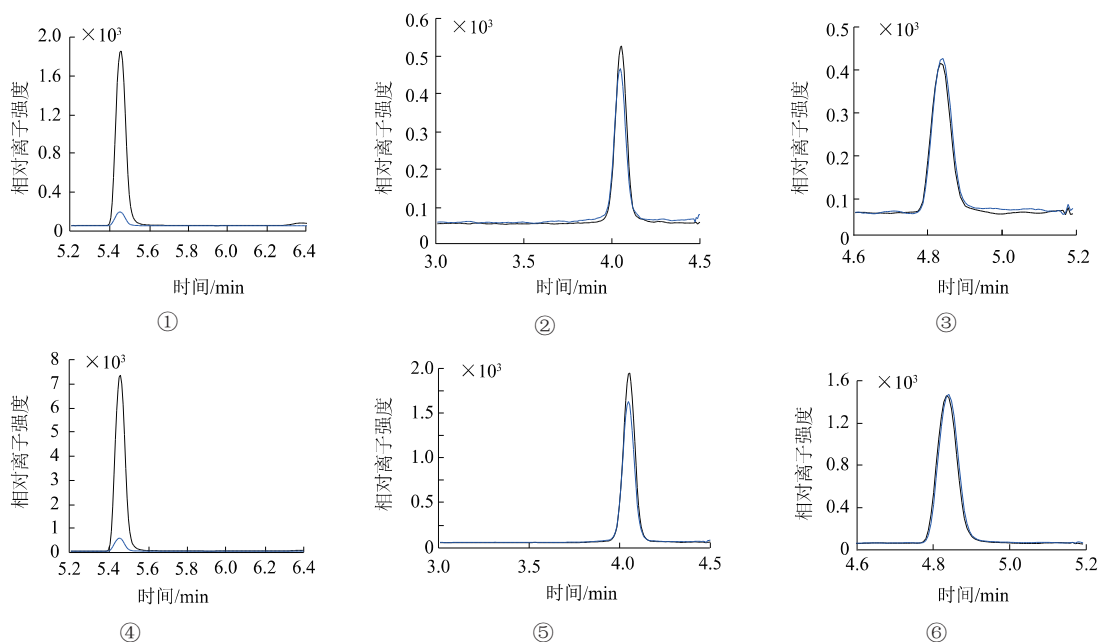
基质	分析物	添加量	平均回收率/%	相对标准偏差/%	精密度/%	
					日内	日间
自来水	唑啉草酯	0.1 $\mu\text{g/L}$	98	5	10	11
		1.0 $\mu\text{g/L}$	86	9	6	9
		1 000 $\mu\text{g/L}$	87	3	2	7
	M2	0.1 $\mu\text{g/L}$	81	3	6	4
		1.0 $\mu\text{g/L}$	94	9	4	3
		1 000 $\mu\text{g/L}$	87	2	2	3
	M3	0.1 $\mu\text{g/L}$	105	5	3	7
		1.0 $\mu\text{g/L}$	96	8	5	6
		1 000 $\mu\text{g/L}$	96	5	8	10
红壤土	唑啉草酯	1.0 $\mu\text{g/kg}$	99	7	11	6
		10 $\mu\text{g/kg}$	87	2	3	4
		1 000 $\mu\text{g/kg}$	100	3	6	5
	M2	1.0 $\mu\text{g/kg}$	91	6	8	6
		10 $\mu\text{g/kg}$	92	2	4	5
		1 000 $\mu\text{g/kg}$	104	1	2	1
	M3	1.0 $\mu\text{g/kg}$	104	5	12	9
		10 $\mu\text{g/kg}$	86	6	2	4
		1 000 $\mu\text{g/kg}$	96	1	6	6

2.4 选择和专属性试验结果

空白基质样品、最低档浓度标样、低档添加浓度质谱进样。结果表明,加标样品图谱中除3种标准物质峰外,未见其他杂峰产生有效干扰(图1、2),表明方法的选择性高、专属性好。

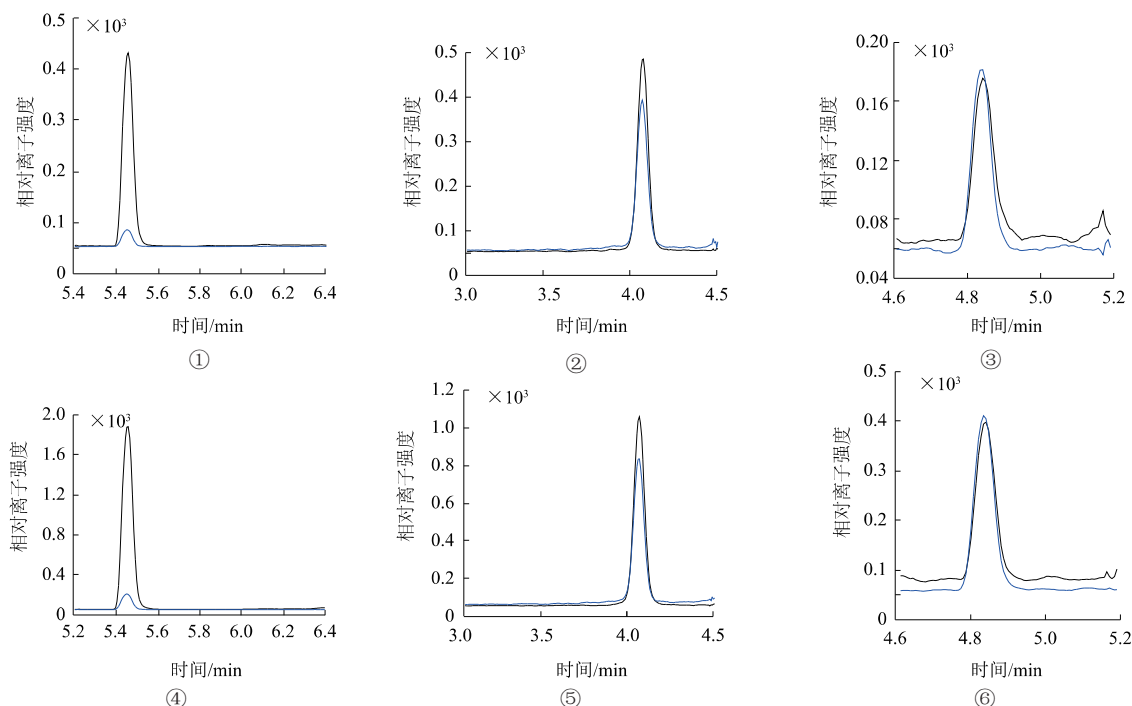
2.5 耐用性试验结果

方法验证时对比了不同的仪器品牌、色谱柱型号、柱温等条件。结果显示,唑啉草酯、M2、M3含量的相对标准偏差小于1.0%,说明该方法的耐用性较好。



注 ①~③分别为唑啉草酯、M2、M3 0.25 $\mu\text{g/L}$ 标样子离子质谱图,④~⑥分别为自来水中唑啉草酯、M2、M3添加浓度为0.1 $\mu\text{g/L}$ 样品的子离子质谱图。

图 1 自来水中唑啉草酯 M2、M3 子离子质谱图



注 ①~③分别为唑啉草酯、M2、M3 0.25 $\mu\text{g/L}$ 标样子离子质谱图,④~⑥分别为红壤土中唑啉草酯、M2、M3添加浓度为1 $\mu\text{g/L}$ 样品的子离子质谱图。

图2 红壤土中唑啉草酯 M2、M3 子离子质谱图

3 结论

参照NY/T 3151—2017《农药登记 土壤和水中化学农药分析方法建立和验证指南》^[15],笔者采用超高效液相色谱-串联质谱法建立了自来水和红壤土中唑啉草酯、M2、M3残留量的分析方法,并对其进行了验证。该方法的灵敏度、准确度和精密度、耐用性等均符合要求,方法简单、快速、准确,一次进样能检测唑啉草酯及其代谢物的残留量,满足环境试验中痕量样品低浓度的检测要求。

参考文献

- [1] 曲耀顺. 唑啉草酯具备多种性能优势,未来前景广阔值得关注开发[J]. 农药市场信息, 2019(10): 37-38.
- [2] 张一宾, 徐晓勇, 张峰. 世界农药进展(四)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2017.
- [3] MICHEL M, FREDRIK C, DEREK C, et al. Aryldiones incorporating a [1,4,5]Oxadiazepane ring. part 2: chemistry and biology of the cereal herbicide pinoxaden[J]. Pest Management Science, 2011, 67(12): 1499-1521.
- [4] Inventory of evaluations performed by the joint meeting of pesticide residues (JMPPR)[EB/OL]. [2020-12-01]. <http://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database>.
- [5] WANG H, CHENG Z W, YUAN H P, et al. Occurrence of banned and commonly used pesticide residues in concentrated leachate: implications for ecological risk assessment[J]. Science of the total environment, 2020, 710: 136287.
- [6] 王晓霞, 姬鹏燕, 魏万磊, 等. 唑啉草酯合成的研究进展[J]. 农药,

2018, 57(8): 547-550; 559.

- [7] MUEHLEBACH M, BOEGER M, CEDERBAUM F, et al. Aryldiones incorporating a [1,4,5]oxadiazepane ring. part 1: discovery of the novel cereal herbicide pinoxaden[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2009, 17(12): 4241-4256.
- [8] 蒋天梅, 赖朝晖, 孙莲. 唑啉草酯对麦田杂草的防治效果[J]. 浙江农业科学, 2014(2): 223-224.
- [9] 柏亚罗, 顾林玲. 唑啉草酯及其应用与开发进展[J]. 现代农药, 2017, 16(3): 40-44.
- [10] BARARPOUR T, KORRES N E, BURGOS N R, et al. Performance of pinaxaden on the control of diclofop-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* L ssp. *multiflorum*) in Winter Wheat[J]. Agriculture, 2018, 8(7): 114.
- [11] SIEBERRS J, BESINGER-RIEDEL A, VINKE C. Determination of active substances, co-formulants and impurities in plant protection products using high performance liquid chromatography and gas chromatography[J]. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2014, 9(2): 137-144.
- [12] 韩何丹, 余永新, 贺永娟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同步检测大麦产品中唑啉草酯、炔草酯及解毒唑的残留量[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 292-297.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局和中国国家标准化管理委员会. GB/T 31270—2014 化学农药环境安全评价试验准则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [14] 杨浪, 陈恺, 王波娜, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水中唑啉草酯和炔草酯[J]. 化学分析计量, 2020, 29(5): 15-18.
- [15] 中华人民共和国农业部. NY/T 3151—2017 农药登记 土壤和水中化学农药分析方法建立和验证指南农药[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.

(责任编辑: 徐娟)