



## 超高效液相色谱-串联质谱法测定 玉米中硝磺草酮及其代谢物残留量

邓立刚<sup>1,2,3</sup> 李增梅<sup>2,3</sup> 赵善仓<sup>2,3</sup> 陈业兵<sup>2,3</sup> 郭长英<sup>2,3</sup> 路福绥<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>( 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018)

<sup>2</sup>( 山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 济南 250100)

<sup>3</sup>( 山东省食品质量与安全检测技术重点实验室, 济南 250100)

**摘 要** 建立了超高效液相色谱-串联质谱法测定玉米中硝磺草酮及其代谢物(MNBA)的残留分析方法。样品用乙腈-水溶液提取,取适量提取液用甲酸酸化至 pH 2,过 HLB 固相萃取柱进行净化,用甲醇-乙醚(70:30, V/V)洗脱,洗脱液用氮气吹至近干,用 1 mmol/L 醋酸铵-乙腈(25:75, V/V)定容后进行质谱分析,利用基质校正曲线对其准确定量。硝磺草酮和 MNBA 在 1~200  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内呈线性关系,相关系数均大于 0.99,在添加浓度 5~50  $\mu\text{g/kg}$  范围内,硝磺草酮及其代谢物 MNBA 的平均回收率为 83.8%~101.1%,相对标准偏差在 5.3%~12.8% 之间,硝磺草酮和代谢物 MNBA 定量限分别为 1.0 和 2.0  $\mu\text{g/kg}$ 。

**关键词** 硝磺草酮;液相色谱-串联质谱;玉米;代谢物

### 1 引 言

硝磺草酮(Mesotrione)是由瑞士先正达公司(Syngenta)开发的新型三酮类除草剂,通过抑制对羟苯基丙酮酸双加氧酶(HPPD)的活性而最终降低类胡萝卜素的合成,使植物“白化”而死亡,主要用来防治玉米田阔叶杂草和部分禾本科杂草<sup>[1-3]</sup>。2012年8月,硝磺草酮在我国的行政保护期到期,它将在我国大规模生产和推广应用,同时,也会对农产品安全、后茬作物及其它非靶标生物带来潜在的危害<sup>[4-6]</sup>。我国规定硝磺草酮在玉米中的最大允许限量(MRL)值为 0.01 mg/kg<sup>[7]</sup>,欧盟规定硝磺草酮及其代谢物(4-Methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid, MNBA)在玉米中 MRL 值为 0.05 mg/kg<sup>[8]</sup>。

硝磺草酮为难挥发性化合物,对热不稳定,无法进行气相色谱分析。目前,检测硝磺草酮的主要方法是高效液相色谱法<sup>[9,10]</sup>和液相色谱-质谱联用法。2002年,Alfemes等<sup>[11]</sup>报道了硝磺草酮及其2个代谢物(MNBA和AMBA(2-amino-4-methylsulfonyl-benzoic acid))在玉米、土壤和水中的高效液相色谱-荧光分析方法,样品需通过液相色谱馏分收集器净化,收集的净化液再经衍生生成AMBA,再通过荧光检测器测定,该方法前处理繁琐,衍生不稳定,耗时长,不利于大批量样品的测试工作。尽管文献[12,13]采用液相色谱-质谱联用法测定了食品中硝磺草酮的残留量,但均未涉及到硝磺草酮代谢物MNBA检测方法。本研究采用HLB固相萃取柱实现了两种化合物的同时净化,并优化了色谱-质谱条件和定容液比例,建立了能够同时测定玉米中硝磺草酮及其代谢物MNBA的超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)的分析方法。本方法对硝磺草酮和MNBA定量限分别为1.0和2.0  $\mu\text{g/kg}$ ,能够满足国际残留限量测定的需要。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

ACQUITY Ultra Performance LC 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);Micromass Quattro Ultima PT

2012-12-25 收稿;2013-04-01 接受

本文系山东省科技专项(No. 2009GG20001021)资助

\* E-mail: lfs@sdau.edu.cn

三重四级杆串联质谱仪 配带电喷雾离子源(ESI)及 Masslynx 工作站 Version 4.0; T25 Basic 高速分散匀浆机(德国 IKA 公司); Laborata 4000 型旋转蒸发器(德国 Heidolph 公司); JNC N-EVAPTM112 型氮吹仪(美国 Organomation 公司); Oasis HLB Cartridge 固相萃取小柱(SPE 150 mg/6 mL 美国 Waters 公司)。

硝磺草酮及代谢物 MNBA 标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); NaCl、乙醚、氨水(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲酸(色谱纯, 阿沙埃莎(天津)化学有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国飞世尔科技公司)。

## 2.2 色谱质谱条件

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm×1.7 μm); 柱温 40 °C; 样品室温度 10 °C; 进样体积 5.0 μL; 流动相 A 为 0.1% 氨水-乙腈, 流动相 B 为 1 mmol/L 醋酸铵(含 0.1% 氨水); 流速 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 100% A; 1.0~2.5 min, 100%~60% A; 2.5~4.0 min, 60%~100% A。

质谱条件: ESI 源, 负离子模式; 多反应监测扫描(MRM); 毛细管电压 3.5 kV; 锥孔电压 35 V; 离子源温度 100 °C; 脱溶剂气温度 300 °C; 锥孔反吹氮气流量 50 L/h; 脱溶剂气流量 600 L/h; 光电倍增器电压 650 V; 碰撞室真空度 0.076 Pa。其它条件参数见表 1。

表 1 硝磺草酮及其代谢物的 ESI<sup>-</sup>-MS/MS 条件参数

Table 1 ESI<sup>-</sup>-MS/MS conditions for the determination of mesotrione and its metabolite

化合物 Compound	分子式 Molecular formula	保留时间 Retention time (min)	母离子 Parent ion ( <i>m/z</i> )	子离子 Daughter ions ( <i>m/z</i> )	停顿时间 Dwell time (s)	锥孔电压 Cone voltage (V)	碰撞能量 Collision energy (eV)
硝磺草酮 Mesotrione	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>7</sub> S	3.1	337.94	290.86*	0.1	35	10
				211.88		35	27
4-甲磺基-2-硝基苯甲酸 MNBA	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>6</sub> S	3.1	243.72	169.89*	0.1	35	15
				141.89		35	18

\* : 定量离子(Quantitative daughter ion); MNBA: 4-Methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid.

## 2.3 样品处理

**2.3.1 样品提取** 称取 10.0 g 试样于广口瓶中, 先加入 1 g NaCl, 再加入 70 mL 乙腈-水(50:50, V/V), 以 10000 r/min 高速均质 1 min 后, 过滤至 100 mL 容量瓶中, 向残渣再加入 30 mL 乙腈-水(50:50, V/V), 再提取 1 次, 合并两次滤液, 用提取液定容至 100 mL, 取 25 mL 提取液样品于圆底烧瓶中, 于 40 °C 水浴旋转蒸发, 除去乙腈后收集残留水溶液约 8~12 mL, 用去离子水定容至 25 mL, 用甲酸调至 pH 2, 待净化。

**2.3.2 净化** 依次用 3 mL 乙醚、2 mL 甲醇、3 mL 水预洗 Oasis HLB 固相萃取柱, 当溶剂液面流至吸附填料表面时, 立即加入 2.3.1 节酸化后的样品提取溶液, 然后用 3 mL 甲酸-水溶液(1:99, V/V) 淋洗固相萃取柱, 弃去淋洗液, 最后用 6 mL 甲醇-乙醚(70:30, V/V) 洗脱, 收集洗脱液, 40 °C 水浴下氮气吹至近干, 用 1 mmol/L 醋酸铵-乙腈(25:75, V/V) 定容至 2 mL, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 待测。

## 2.4 标准溶液配制与标准曲线

分别称取 0.0100 g 硝磺草酮和代谢物 MNBA 标准品, 用乙腈溶解并定至 100 mL, 配制成 100 mg/L 标准储备液, -20 °C 避光保存。标准储备液用 1 mmol/L 醋酸铵-乙腈(25:75, V/V) 依次稀释成 1, 5, 10, 50, 100 和 200 μg/L, 作为标准工作液; 同时, 采用玉米空白基质配制成相应浓度的基质标准溶液。UPLC-MS/MS 进样 5 μL 测定, 获得两种化合物溶剂和基质标准曲线及线性相关系数。

# 3 结果与讨论

## 3.1 质谱条件的优化

尽管硝磺草酮是三酮类化合物, 不含酸性基团, 但其在水溶液中发生电离而表现出弱酸性<sup>[14]</sup>, 其代谢物 MNBA 含有羧基, 易电离生成负离子化合物, 因此这两种化合物均可采用 ESI<sup>-</sup> 模式扫描测定。通过母离子扫描(MS Scan), 可获得一级质谱图, 两种化合物的软电离均是以准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>形式

存在,硝磺草酮和代谢物 MNBA 的母离子分别是  $m/z$  337.94 和 243.72。

在 MS Scan 条件优化过程中,发现脱溶剂气温度对 MNBA 丰度影响较大,当温度高于 350 °C 时,在 MS SCAN 质谱图中,未发现 MNBA 的  $[M-H]^-$  峰,可能是温度过高导致其完全裂解;当温度低于 350 °C 时, $[M-H]^-$  离子丰度逐渐增强;当脱溶剂气温度为 300 °C, MNBA 的  $[M-H]^-$  离子丰度达到最大。因此,选定 300 °C 作为最佳脱溶剂温度,保证其高灵敏度。

在选定母离子后,进行子离子扫描(Daughter scan),可获得二级质谱图(图 1),硝磺草酮主要的特征碎片离子为  $m/z$  290.86 和 211.88,推测是丢失杂原子(N,S)基团而产生的,它们分别代表着  $[M-H-HNO_2]^-$ ,  $[M-H-HNO_2-CH_3SO_2]^-$  峰;代谢物 MNBA 主要的特征碎片离子为  $m/z$  199.87, 169.89 和 141.89,主要是丢失  $CO_2$ , NO 和 CO 中性碎片而产生的,分别代表着  $[M-H-CO_2]^-$ ,  $[M-H-CO_2-NO]^-$  和  $[M-H-CO_2-NO-CO]^-$  峰;对锥孔电压和碰撞能量等质谱各条件参数进行优化,获得对硝磺草酮及 MNBA 最高灵敏度的最佳仪器参数和特征碎片离子,见表 1。

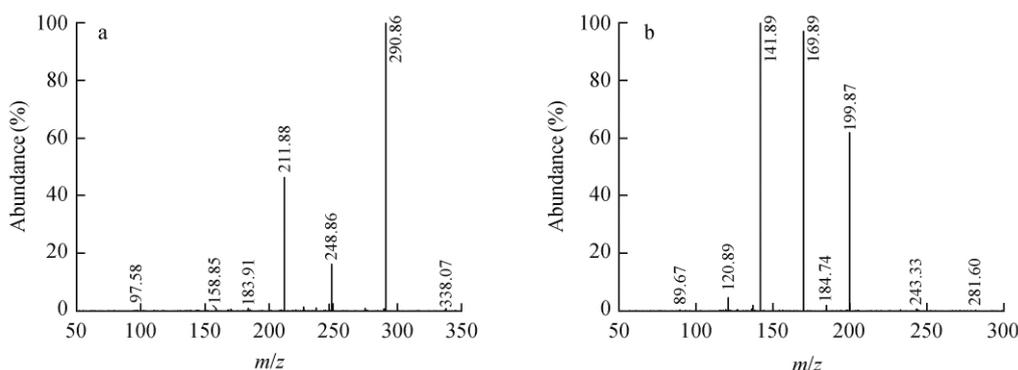


图 1 硝磺草酮(a)和 MNBA(b)的二级质谱图

Fig.1 Mass spectra of misotrione (a) and MNBA (b) by daughter scan

### 3.2 液相色谱条件的优化

本实验首先选用了 BEH  $C_{18}$  色谱柱,采用不同比例的乙腈-水作为流动相,对硝磺草酮及其 MNBA 标样进行分离,发现两种化合物在该柱几乎没保留,这主要是因为两种化合物极性较强所致。在流动相中加入 0.1% 甲酸,尽管目标化合物在色谱柱上有所保留,但又影响其离子化效率,造成质谱灵敏度严重下降。因此,本实验又采用了对极性化合物保留较强的 Amide 色谱柱。在流动相中分别加入了 0.1% 氨水、1 mmol/L 醋酸铵、1 mmol/L 醋酸铵(含 0.1% 氨水)及水,质谱灵敏度依次为 1 mmol/L 醋酸铵(含 0.1% 氨水) > 0.1% 氨水 > 1 mmol/L 醋酸铵 > 水,流动相 pH 值升高,能够促进化合物离子化,而醋酸铵又能改善峰形。因此,本实验选择 0.1% 氨水-乙腈和 1 mmol/L 醋酸铵(含 0.1% 氨水)作为流动相,获得了最佳质谱灵敏度。

### 3.3 样品前处理条件优化

硝磺草酮在水、乙腈、甲醇、二氯甲烷中均有良好的溶解度,本实验采用了乙腈-水作为提取剂,既可提出待测化合物,又能沉淀蛋白,减少对杂质的提取率,便于后续净化。比较了  $C_{18}$  和 Oasis HLB 固相萃取柱, $C_{18}$  固相萃取柱回收率仅 10% ~ 20%,而 HLB 固相萃取柱回收率均在 80% 以上,这是因为 HLB 柱键合了亲水亲脂基团。在 HLB 萃取条件优化过程发现,提取液的酸化对回收率影响较大,固相萃取柱上样前,应调节样品溶液至 pH 2。

### 3.4 样品定溶液的选择

样品定容液选用了乙腈、乙腈-水、乙腈-1 mmol/L 醋酸铵溶液、乙腈-0.1% 氨水溶液,发现乙腈配制的标准品没有质谱信号响应;其它 3 种定容液均出现同一个化合物分离出两个色谱峰现象(图 2a),这是因为化合物在分离微环境下发生了部分解离,出现了分子和离子两种状态,改变了化合物与色谱柱键合相作用,去质子化的化合物先出峰,分子化合物后出峰,不同比例的乙腈-水、乙腈-0.1% 氨水溶液无法彻底改善两个峰同时存在的状态,而通过调节具有缓冲作用的乙腈-1 mmol/L 醋酸铵溶液比例,可以

有效改善这一现象;当乙腈-1 mmol/L 醋酸铵溶液体积比为 75:25 时,每个化合物只出现单个色谱峰(图 2b),便于样品定性和定量分析。流动相和定容液的选择优化是本研究的关键,对于其它类似化合物的检测方法开发具有较高的参考价值。

### 3.5 线性方程及基质效应

按 2.4 节配制的 1~200  $\mu\text{g/L}$  系列标准工作液,以进样浓度( $\mu\text{g/L}$ )为横坐标,定量离子对的色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,求得硝磺草酮纯溶剂标准曲线方程为  $Y=340.412x+24.819$  ( $r=0.9996$ ),基质加标准曲线方程为  $Y=162.143x+122.052$  ( $r=0.9989$ );代谢物 MNBA 纯溶剂标准曲线方程为  $Y=128.801x+427.996$  ( $r=0.9997$ ),基质加标准曲线方程为  $Y=53.903x+345.363$  ( $r=0.9968$ )。基质与溶剂标准曲线方程的斜率之比可以反映基质效应的强弱,硝磺草酮与代谢物 MNBA 基质标样与溶剂标样的斜率之比分别为 0.47 和 0.42,说明这两种化合物基质抑制效应的程度均较大,使用溶剂配制的标准曲线测定的结果比实际结果低。因此,在实际样品检测过程中,应采用基质加标方法进行定量分析。

### 3.6 方法的灵敏度、准确度和精密度

对空白玉米样品在 5, 10 和 50  $\mu\text{g/kg}$  浓度水平进行添加,每个水平平行 5 次,按照 2.3 节方法进行提取净化,采用基质配制的标准校正曲线进行定量分析。添加量、平均回收率和精密度见表 2。结果表明,在 5~50  $\mu\text{g/kg}$  添加范围内,在玉米中平均回收率为 83.8%~101.1%,相对标准偏差 RSD 为 5.3%~12.8%,对硝磺草酮和 MNBA 的定量限分别为 1.0 和 2.0  $\mu\text{g/kg}$  ( $S/N=10$ )。

### 3.7 实际样品的分析

采用本方法对实际样品进行分析,24 份样品来自《农药登记残留田间试验标准操作规程》<sup>[15]</sup> 指导下的田间试验样本,样本中均未检出硝磺草酮及其代谢物 MNBA 残留,这说明按照硝磺草酮的农药登记剂量科学施药,收获的玉米可以满足国内外 MRL 值要求。

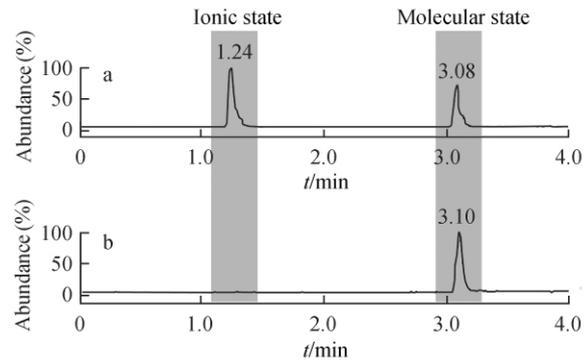


图 2 硝磺草酮和 MNBA 总离子色谱图,定容液乙腈-1 mmol/L 醋酸铵体积比: a. 60:40, b. 75:25

Fig. 2 Total ion chromatogram (TIC) of mesotrione and MNBA, prepared by acetonitrile-1 mmol/L ammonium acetate, volume ratio: a. 60:40, b. 75:25

表 2 硝磺草酮及其代谢物 MNBA 在玉米中的回收率、标准偏差和定量限

Table 2 Average recoveries and relative standard deviations of mesotrione and its metabolite from maize

化合物 Compound	添加量 Added ( $\mu\text{g/kg}$ )	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (% $n=5$ )	定量限 LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ )
硝磺草酮 Mesotrione	5	101.1	6.2	
	10	89.5	5.3	1.0
	50	100.6	10.0	
MNBA	5	99.4	9.8	
	10	86.1	12.8	2.0
	50	83.8	8.9	

## References

- Sutton P, Richards C, Buren L, Glasgow L. *Pest Manag. Sci.*, **2002**, 58(9): 981-984
- Mitchell G, Bartlett D W, Fraser T E M, Hawkes T R, Holt D C, Townson J K, Wichert R A. *Pest Manag. Sci.*, **2001**, 57(2): 120-128
- Wilson J S, Foy C L. *Weed Technol.*, **1990**, 4(4): 731-738
- Abit M J M, AL-Khatib K, Regehr D L, Tuinstra M R, Claassen M M, Geier P W, Stahlman P W, Gordon B W, Currie R S. *Weed Technol.*, **2009**, 23(1): 28-33
- Moro C V, Bricheux G, Portelli C, Bohatier J. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2012**, 31(4): 778-786
- Stephenson IV D O, Bond J A, Walker E R, Bararpour M T, Oliver L R. *Weed Technol.*, **2004**, 18(4): 1111-1116
- GB 2763-2012, *National Food Safety Standard Maximum Residue Limits for Pesticides in Food*. National Standards of the People's Republic of China  
食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准. GB 2763-2012

- 8 Directive E. C. *COMMISSION REGULATION (EC) No 149/2008. Amending Regulation (EC) No 396. 2008*
- 9 Barchanska H, Rusek M, Szatkowska A. *Environ. Monit. Assess.*, **2012**, 184(1): 321-334
- 10 PANG Min-Hao, LIU Shun, ZHANG Li-Hui, KANG Zhan-Hai, TAO Bu, WU Li-Qiang, LIU Ying-Chao. *Journal of Agricultural University of Hebei*, **2007**, 30(5): 75-78  
庞民好, 刘顺, 张利辉, 康占海, 陶晔, 吴立强, 刘颖超. 河北农业大学学报, **2007**, 30(5): 75-78
- 11 Alferness P, Wiebe L. *J. Agr. Food Chem.*, **2002**, 50(14): 3926-3934
- 12 ZHANG Dai-Hui, TENG Guo-Sheng, LI Zheng-Qiang, LI Ai-Jun, KANG Ming-Qin, MOU Jun. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(5): 811-812  
张代辉, 滕国生, 李正强, 李爱军, 康明芹, 牟峻. 分析化学, **2012**, 40(5): 811-812
- 13 Chen X X, Li W M, Wu Q, Chen W T, Han L J. *Bull. Environ. Contam. Tox.*, **2012**, 88(5): 772-775
- 14 Dyson J S, Beulke S, Brown C D, Lane M C G. *J. Environ. Qual.*, **2002**, 31(2): 613-618
- 15 Institute for the Control of Agrochemicals, MOA. *Standard Operating Procedures on Pesticide Registration Residue Field Trials*. Beijing: Standards Press of China. **2007**  
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**

## Determination of Mesotrione and Its Metabolite Residues in Maize by Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

DENG Li-Gang<sup>1,2,3</sup>, LI Zeng-Mei<sup>2,3</sup>, ZHAO Shan-Cang<sup>2,3</sup>, CHEN Ye-Bing<sup>2,3</sup>, GUO Chang-Ying<sup>2,3</sup>, LU Fu-Sui<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

<sup>2</sup>(Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology Research, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

<sup>3</sup>(Key Laboratory of Test Technology on Food Quality and Safety of Shandong Province, Jinan 250100, China)

**Abstract** A novel method was developed for the simultaneous determination of mesotrione and its metabolite (4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid, MNBA) in maize by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The samples were extracted with acetonitrile-water (50:50, V/V) solutions and an aliquot of the extract was acidified to pH 2 with formic acid and then cleaned-up by Oasis HLB cartridge. The residues were eluted from cartridge with methanol-diethyl ether (70:30, V/V). The elutions were evaporated to appropriately dry under a stream of nitrogen, dissolved in 2 mL acetonitrile-1 mmol/L ammonium acetate (75:25, V/V). The residues were analyzed by mass spectrometry with negative ion mode using multiple-reaction monitoring (MRM) and quantification was achieved by matrix calibration. The method had a good linear correlation (correlation coefficient was above 0.99) in the range of 1-200  $\mu\text{g/L}$ . The average recoveries of mesotrione and MNBA were 83.8% - 101.1% at spiked level between 5  $\mu\text{g/kg}$  and 50  $\mu\text{g/kg}$  with the relative standard deviation (RSD) between 5.3% and 12.8%. The limits of quantification for mesotrione and MNBA were 1.0 and 2.0  $\mu\text{g/kg}$ , respectively.

**Keywords** Mesotrione; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Maize; Metabolite

(Received 25 December 2012; accepted 1 April 2013)