

利用 LC-MS/MS 建立 propyrisulfuron 於糙米中殘留分析方法

許菁菁¹ 陳惠姬¹ 徐慈鴻^{1*}

摘要

許菁菁、陳惠姬、徐慈鴻。2017。利用 LC-MS/MS 建立 propyrisulfuron 於糙米中殘留分析方法。臺灣農藥科學 3: 25-37。

探討尿素系除草劑 propyrisulfuron 於糙米中殘留分析方法的建立，以含有 1% 醋酸的氘甲烷溶液作為萃取溶液，及利用液相層析串聯式質譜儀 (Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 進行測定。糙米基質添加標準品 (0.04, 0.1, 0.2 $\mu\text{g/g}$, $n = 9$) 測得平均回收率範圍介於 83.4 ~ 97.8% 之間，及相對標準偏差範圍介於 7.0 ~ 12.1% 之間。定量極限 (limit of quantification, LOQ) 為 0.01 $\mu\text{g/g}$ 。本分析方法具備靈敏度與精確度之效能，可應用於稻米中 propyrisulfuron 殘留量監測管理。

另外，探討糙米基質中 propyrisulfuron 冷凍儲存穩定試驗，於糙米基質添加標準品 (0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/g}$, $n = 3$)，儲存間期為 70 天，測得儲存回收率範圍介於 105.7 ~ 114.7% 之間，及相對標準偏差範圍介於 2.0 ~ 4.1% 之間，結果顯示糙米基質中 propyrisulfuron 殘留量在冷凍保存 70 天期間呈現穩定狀態。

關鍵詞：液相層析串聯式質譜儀、糙米、儲存穩定、propyrisulfuron

接受日期：2017 年 5 月 10 日

* 通訊作者。Email: ths@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

緒言

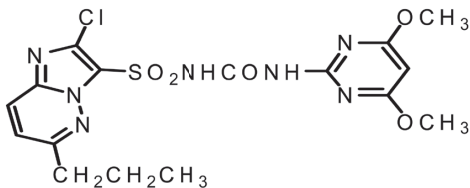
除草劑propyrisulfuron化學名稱1-(2-chloro-6-propylimidazo [1,2-b] pyridazin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl) urea (IUPAC)，係屬尿素系除草劑，其應用於農業耕地雜草之防除，日本已上市應用於水稻雜草處理⁽¹⁾。依據日本針對 propyrisulfuron 於農作物使用管制之殘留量定義 (residue definition)，以主成分 propyrisulfuron 作為容許量 (maximum residue limits, MRLs) 的評估標準。目前，國際上僅日本訂定 propyrisulfuron 在稻米上的容許量為 0.05 ppm⁽⁵⁾。propyrisulfuron 對光不穩定，酸性條件下容易降

解，pH 7 條件下其消散半衰期 (DT₅₀) 為 77 ~ 90 天，在 pH 4 條件下 DT₅₀ 為 6.3 ~ 6.8 天，鹼性條件下 (pH 7 ~ 9) 相對穩定 (表一)。因此除草劑 propyrisulfuron 申請運用於臺灣登記使用，則須針對糙米作物進行殘留消退試驗，進而建立殘留分析方法。

本研究參考 2014 年 7 月 3 日衛生署公告修正食品中殘留農藥檢驗方法——多重殘留分析方法 (五)，以 QuEChERS 方法前處理^(2,4) 萃取操作，利用 LC-MS/MS 兼具靈敏度及選擇性之優勢，建立 propyrisulfuron 於糙米中殘留分析方法，同時，探討糙米基質添加標準劑 propyrisulfuron 之冷凍儲存穩定試驗。

表一、propyrisulfuron 物理化學性質^(3,6)

Table 1. The physical and chemical properties of propyrisulfuron^(3,6)

Chemical name	1-(2-chloro-6-propylimidazo [1,2-b] pyridazin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-dimethoxy-pyrim-2-yl)urea (IUPAC)
Chemical structure	
Molecular formula	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₇ O ₅ S
Molecular weight	455.9
Melting point	193.5°C
Solubility	H ₂ O 0.98 mg/L (20°C); n-hexane < 0.01, toluene 1560, ethyl acetate 1610, acetone 7030, methanol 434 (all in mg/L, 20°C)
Stability	Propyrisulfuron showed good heat stability but poor light stability. The DT ₅₀ of propyrisulfuron in water was 77 ~ 90 days at pH 7 and 6.3 ~ 6.8 days at pH 4. Propyrisulfuron was also found to be easily degradable under acidic conditions and relatively stable under alkaline conditions (i.e. pH 7 ~ 9). Decomposition was primarily due to photolysis.

材料與方法

一、試藥

Propyrisulfuron 對照標準品，純度 100%，由臺灣住友化學股份有限公司製造及提供。相關分析試藥包括氰甲烷 (acetonitrile)、冰醋酸 (acetic acid)、甲酸 (formic acid)、甲酸銨 (ammonium formate)、無水硫酸鎂 (magnesium sulphate anhydrous)、醋酸鈉 (sodium acetate anhydrous)、PSA (primary and secondary amine)、C18 EC 等。萃取用粉劑：實驗室製備，內容物含無水硫酸鎂、醋酸鈉，並依重量比例 4:1 混合。萃取用淨化管：實驗室製備，以聚丙烯 (polypropylene, PP) 材質離心管，秤取內容物含 300 mg PSA、300 mg C18 EC 及 900 mg 無水硫酸鎂作為淨化管。

二、儀器設備

均質機 (homogenizer): KNEMATICA AG, Polytron PT 3100。高速震盪組織研磨均質機 (high-throughput plant and tissue homogenizer): SPEX SamplePrep, Geno/Grinder 2010。離心機 (centrifuge): Beckman Coulter, Allegra X-30R。吹氮濃縮機 (nitrogen blowing concentrator): Organomation Associates, Inc., N-EVAP 112。

液相層析儀 Agilent 1200 series liquid chromatography；質譜儀 Agilent 6410 triple quadrupole mass spectrometry；控制及數據分析系統 Agilent MassHunter Quantitative Analysis (Version

B.04.00)，及 Agilent Mass Hunter Workstation Acquisition (Version B.02.01)。

三、標準溶液之配製

精秤適量對照標準品，以氰甲烷溶解並定容之，製備標準儲備溶液 (standard stock solution) 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ，於 -18°C 條件下避光儲存。使用時，量取適量標準儲備溶液，以氰甲烷稀釋成 100 $\mu\text{g/mL}$ 作為分析用標準工作溶液 (standard working solution)。

四、LC 移動相之配製

移動相 A 液：0.1% 甲酸之 10 mM 甲酸銨水溶液，取甲酸 2 mL，以去離子水配製為 2,000 mL，再加入甲酸銨 1.29 g 溶解均勻。移動相 B 液：0.5% 甲酸之氰甲烷溶液，取甲酸 5 mL 與氰甲烷 995 mL 混合均勻。

五、檢液之製備

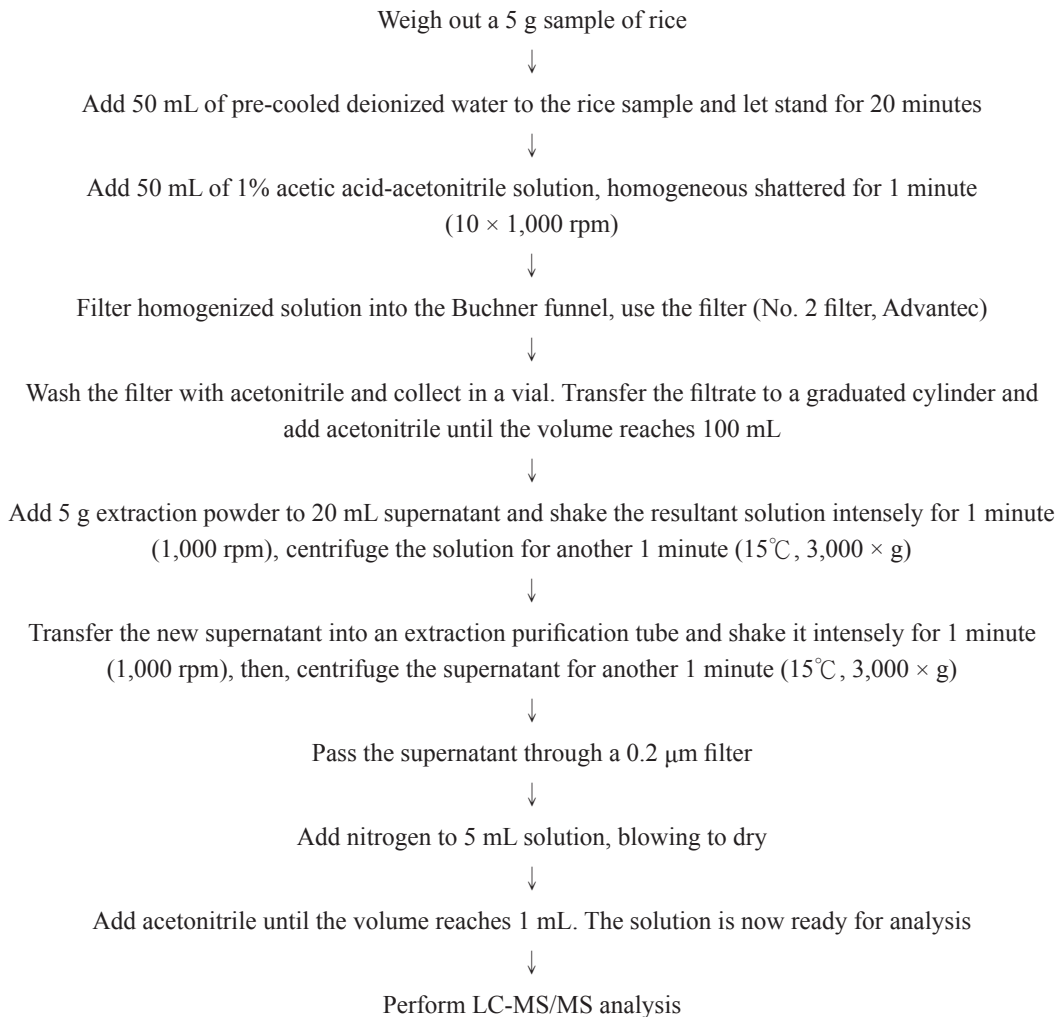
參考食品中殘留農藥檢驗方法——多重殘留分析方法 (五)，取磨粉後之糙米檢體 10 g，加入冷藏預冷之去離子水 50 mL，靜置 20 分鐘，加入含有 1% 醋酸的氰甲烷溶液 50 mL，均質打碎 1 分鐘，均質液倒入布赫納氏漏斗，上鋪濾紙 (No. 2 filter, Advantec) 抽氣過濾後，以氰甲烷洗滌濾餅，收集於抽氣瓶後，將濾液轉入量筒，並以氰甲烷定量至 100 mL，取濾液 20 mL 置於離心管中，加入萃取用粉劑 5 g，高速震盪 1 分鐘後，離心 1 分鐘，取澄清液移入萃取用淨化管，經高速震盪 1 分鐘後，再離心 2 分鐘，

取澄清液經 0.2 μm 濾膜過濾後供作檢液原液，再取檢驗原液 5 mL，以氮氣吹至微乾後，以氫甲烷定容至 1 mL，供作分析檢液。分析方法操作流程，如圖一。

六、液相層析串聯質譜分析條件

(一) 液相層析儀

層析管柱：Agilent ZORBAX SB-C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)。保護管柱：Agilent Eclipse XDB-C8 (30 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm)。



圖一、糙米中 propyrisulfuron 殘留分析流程圖。

Fig. 1. The flowchart for propyrisulfuron residue analysis in brown rice.

層析管柱溫度：50°C。流速：0.3 mL/min。注入量：5 µL。移動相 A 液：含有 0.1% 甲酸之 10 mM 甲酸銨水溶液；移動相 B 液：含有 0.5% 甲酸之氰甲烷溶液。移動相梯度分析條件，如表二。

(二) 串聯質譜儀

離子源：採用電灑離子化 (ESI+)，偵測正離子。

表二、液相層析移動相梯度條件

Table 2. The parameters of HPLC mobile phase elution

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%) ¹⁾	Mobile phase B (%) ²⁾
0.00	0.3	50	50
1.00	0.3	50	50
2.00	0.3	20	80
6.00	0.3	20	80
7.00	0.3	50	50
8.00	0.3	50	50

¹⁾ Mobile phase A solution: 0.1% formic acid in 10 mM aqueous ammonium formate solution.

²⁾ Mobile phase B solution: 0.5% formic acid in cyanomethane.

表三、propyrisulfuron 質譜儀多重反應偵測之分析參數

Table 3. The parameters of mass spectrometric multiple reaction monitoring for propyrisulfuron quantitative analysis

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Propyrisulfuron	456.1	196.1	129	29
		218.0	129	13

離子噴霧電壓 (ionspray voltage): 4,500 V。溶媒揮散溫度 (desolvation temperature): 325°C。

溶媒揮散流速 (desolvation flow): 600 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM)。

分析參數：偵測離子對、進樣錐電壓與碰撞能量，如表三。

七、標準檢量線之製作

取標準工作溶液 0.002 ~ 0.2 mg/L，進行 LC/MS/MS 分析，以波峰面積對濃度作圖，繪製成標準檢量線。

八、分析成分鑑定及含量測定

精確量取檢液及標準品溶液進行液相層析串聯質譜分析，依前述條件進行分析，測定檢液與標準品溶液所得波峰之滯留時間，及多重反應偵測相對離子強度依據歐盟規範 SANCO/12571/2013⁽⁴⁾ (表四) 鑑定，並依下列計算式求得檢體中 propyrisulfuron 濃度 (µg/g)。

檢體中 propyrisulfuron 濃度 ($\mu\text{g/g}$) = $C \times V_3 / V_2 \times V_1 / W$ 。C：由基質匹配檢量線求得之濃度 ($\mu\text{g/mL}$)；V1：氘甲烷定量之體積 (100 mL)；V2：檢液原液取用之體積 (5 mL)；V3：分析檢液定容之體積 (1 mL)；W：檢體重量 (10 g)。

九、添加回收試驗

取磨粉後之糙米 (經檢驗不含 propyrisulfuron 之糙米) 檢體 10 g，加入 propyrisulfuron 標準溶液，使其濃度為 0.04、0.1 及 0.2 $\mu\text{g/g}$ ，依分析檢液之製備操作流程，以 LC/MS/MS 進行分析，同時進行空白試驗 (blank analysis) 作為對照分析比對，以檢液所測得 propyrisulfuron 離子碎片質量波峰之滯留時間及面積，分別與標準溶液比較鑑別並定量之，求出回收率。

表四、質譜分析之相對離子強度最大可容許範圍¹⁾

Table 4. The recommended maximum tolerances for ion ratios detected using LC/MS/MS¹⁾

Relative intensity (% of base peak)	LC/MS/MS tolerance range (%)
> 50	± 30
20 ~ 50	± 30
10 ~ 20	± 30
< 10	± 30

¹⁾ Maximum acceptable tolerance ranges are in accordance with EU regulations defined in SANCO/12571/2013.

十、定量極限 (limit of quantification, LOQ) 之評估

取磨粉後之糙米檢體 10 g，加入適量 propyrisulfuron 標準品溶液，依所建立之檢驗方法步驟求得。測定離子訊號與雜訊之比值 (signal-to-noise ratio, S/N ratio) 大於 10，作為定量極限極限之測定。

十一、基質效應 (matrix effect)

基質效應之探討，分別以下列方式建立檢量線：

1. 純溶劑檢量線 (standard calibration curve, SCC)：標準品溶於氘甲烷溶劑，配製濃度為 0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。
2. 基質匹配檢量線 (matrix calibration curve, MCC)：取空白糙米最終萃取液添加標準品使其最終濃度為 0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。
3. 基質效應計算公式如下：基質效應 = (MCC 之斜率 - SCC 之斜率) / SCC 之斜率 × 100%。

十二、儲存穩定性試驗

本研究以無殘留之糙米檢體，加入 propyrisulfuron 標準品，使檢體添加濃度為 0.5、1.0、及 2.0 $\mu\text{g/g}$ ，並儲存於 -18°C 低溫條件下，儲存間期為 70 天 (2015 年 11 月 10 日至 2016 年 1 月 19 日)，目的探討殘留樣品於儲存期間 propyrisulfuron 之穩定性表現。

結果與討論

一、質譜儀之最適分析條件

利用電灑游離法作為離子源，並以 MRM 模式檢測糙米中 propyrisulfuron。溶媒揮散及進樣氣體皆為氦氣，離子噴霧電壓 (ionspray voltage) 為 4,500 V，溶媒揮散溫度 (desolvation temperature) 325 °C，溶媒揮散流速 (desolvation flow) 600 L/hr，選定之最佳進樣錐電壓 129 V，碰撞能量介於 13 ~ 29 eV。母離子於碰撞室 (collision cell) 以氦氣碰撞，誘導解離為子離子，再經由第二段質量分析器偵測合適之子離子，以獲得最大偵測感度，由母離子 A 碰撞誘導產生子離子 B，以 A > B 表示，本研究 propyrisulfuron 之母離子為 m/z 456.1，子離子選定 m/z 196.1，及 m/z 218.0，其中 m/z 196.1 離子訊號較強作為定量，因此，本研究質譜鑑定參數選擇 456.1 > 196.1 為定量離子對，及 456.1 > 218.0 為定性離子對。其相對離子強度介於 76.9 ~ 86.3% 之間。propyrisulfuron 標準品溶液之總離子層析圖及質譜圖，如圖二。

二、液相層析條件

採用層析管柱 ZORBAX SB-C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)。移動相採用二相混合梯度分析，移動相 A 液含 0.1% 甲酸之 10 mM 甲酸銨水溶液，及 B 液含 0.5% 甲酸之氰甲烷溶液，其梯度沖提條件，如表二。propyrisulfuron 批次分析滯留時窗介於 4.1 ~ 4.2 分鐘之間。

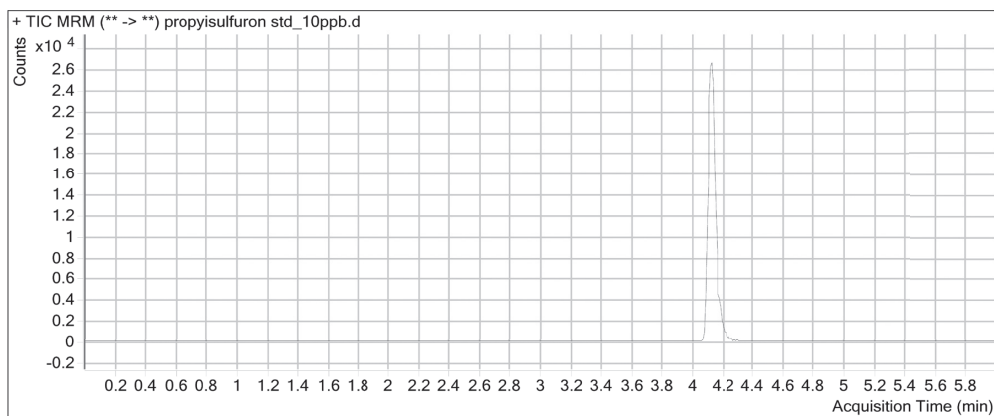
三、標準品檢量線與基質效應

標準品溶液 0.002 ~ 0.05 mg/L，製得檢量線之判定係數 (R^2) 均大於 0.995，顯示於該濃度範圍內線性關係良好。為評估基質干擾物對分析物於質譜儀離子化之影響情形，分別製備標準品檢量線 (standard calibration curve, SCC)，及基質匹配標準品檢量線 (matrix calibration curve, MCC) (圖三)，並比較其斜率。測得 SCC 檢量式為 $y = 5077.485815x + 6885.969375$ ，及 MCC 檢量式為 $y = 5156.200285x - 5741.758136$ ，利用 [基質效應 = (MCC 之斜率 - SCC 之斜率) / SCC 之斜率 × 100%] 計算公式，求得基質效應為 +1.5%，結果顯示方法之糙米萃取基質效應不明顯。考量分析結果之準確性，本研究仍採基質匹配標準劑檢量線試驗結果作定量計算。

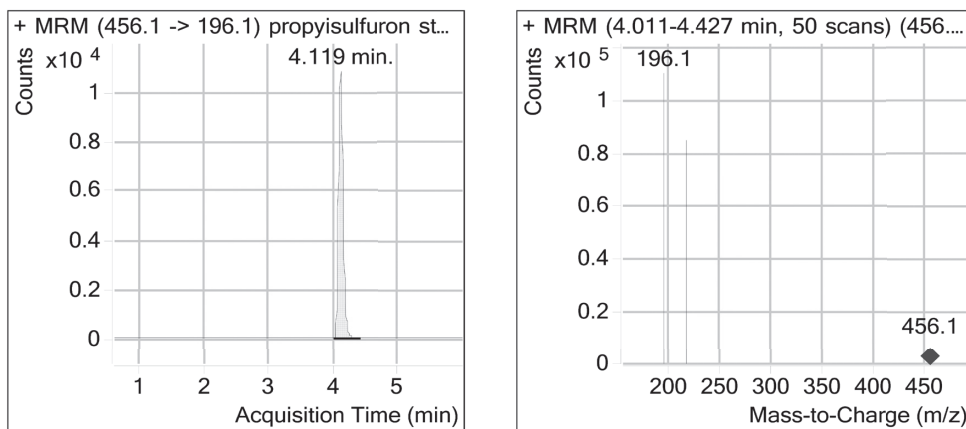
四、添加回收試驗

於糙米檢體中分別加入 propyrisulfuron 標準品溶液，使其濃度為 0.04、0.1 及 0.2 μg/g，依分析檢液之製備流程操作，添加平均回收率 (表五) 範圍介於 83.4 ~ 97.8% 之間，及相對標準偏差介於 7.0 ~ 12.1% 之間。方法之溶劑空白分析 (BK)，及基質空白分析 (CK) 於 propyrisulfuron 滯留時窗內未檢出殘留，顯示方法之共同萃取物不會干擾分析鑑別之判定，分析試驗 BK、CK 與對照標準品之 LC/MS/MS 比較圖譜，如圖四。

(A)



(B)



圖二、propyrisulfuron 標準品 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 (A) 總離子層析圖與 (B) 多重反應偵測質譜圖。

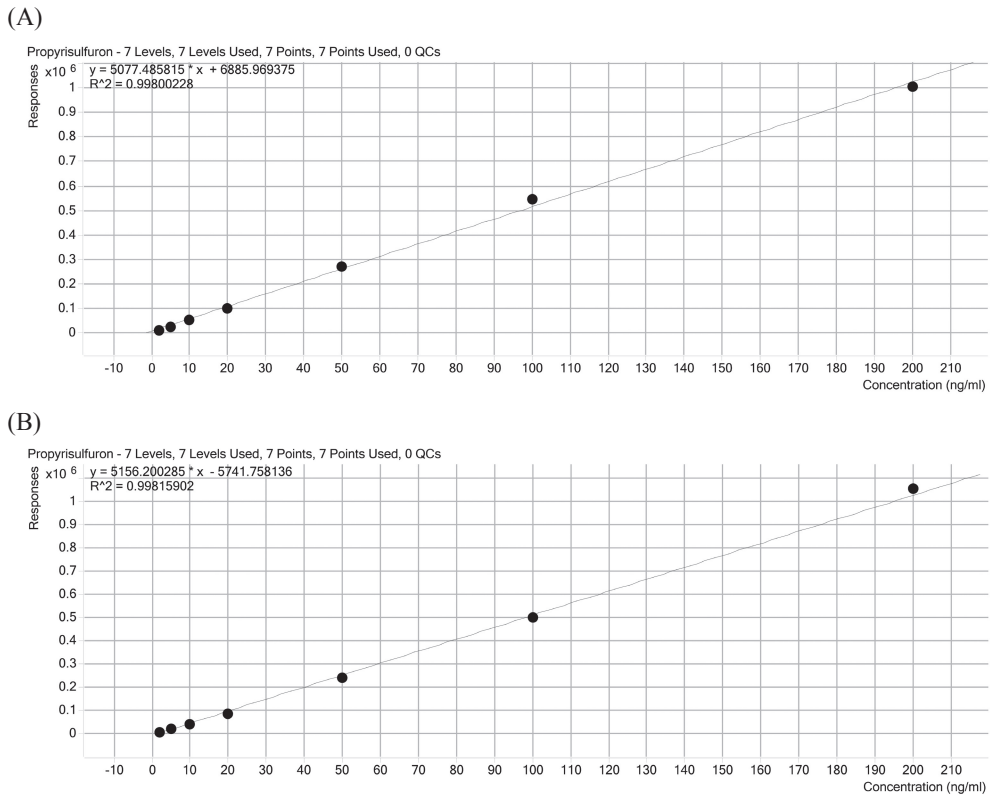
Fig. 2. (A) Representative of total ion chromatogram (TIC) of propyrisulfuron at 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (B) MRM mass chromatogram of propyrisulfuron at 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

五、定量極限

本檢驗方法 propyrisulfuron 之定量極限可至 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ (訊噪比 > 238)，係將對照樣品實際添加濃度 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ 經檢測方法步驟求得。

六、儲存穩定性試驗

基質添加 propyrisulfuron 標準品儲存試驗濃度為 0.5、1.0 及 2.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，儲存間期為 70 天，測得各種儲存濃度回收率 (及相對標準偏差，n = 3) 分別為 0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ 105.7%



圖三、propyrisulfurone 溶劑檢量線 (A) 與基質匹配檢量線 (B)。

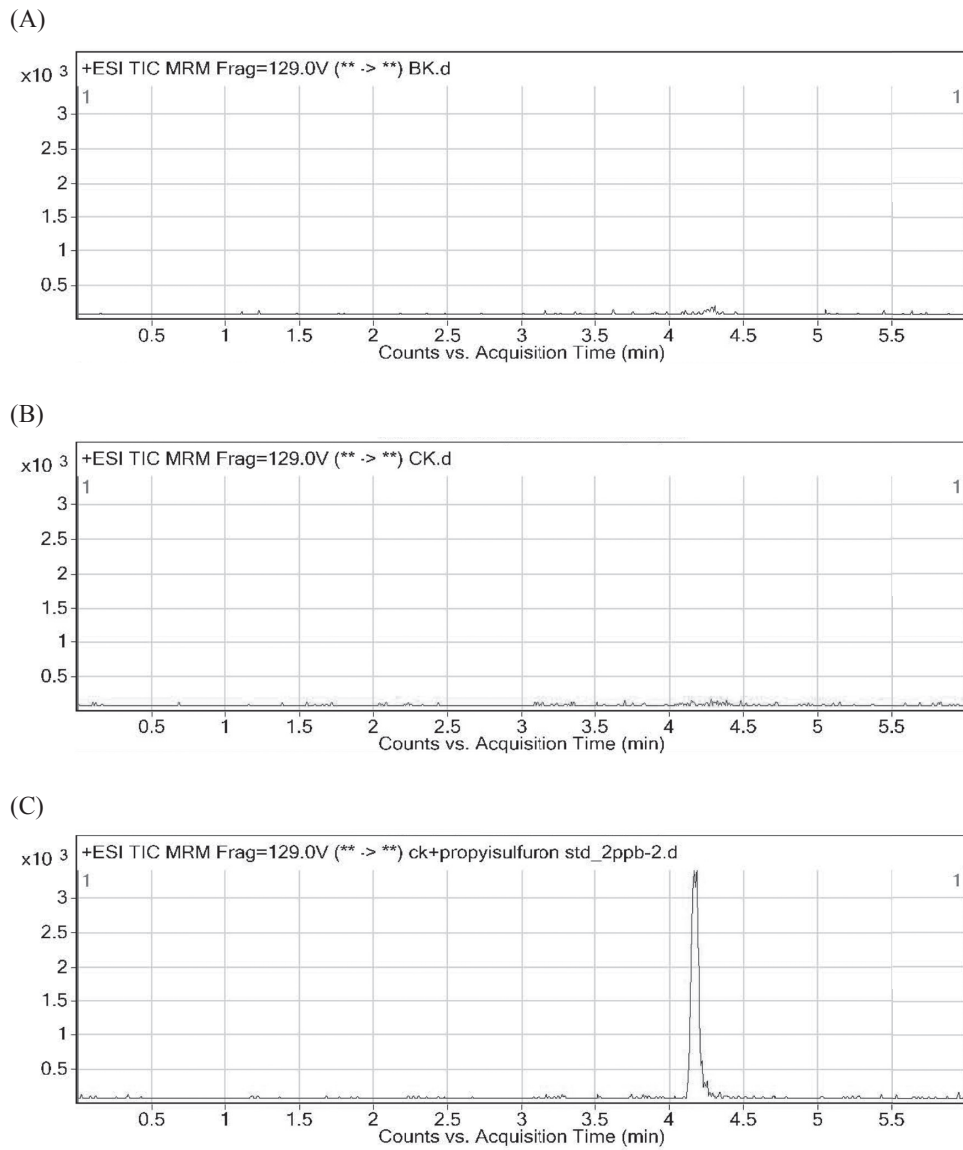
Fig. 3. Calibration curves of propyrisulfuron in solvent (A) and in matrix (B).

表五、propyrisulfuron 添加回收試驗結果

Table 5. The results of propyrisulfuron fortified recovery test

Concentration of propyrisulfuron in rice ¹⁾ (µg/g)	Recovery rate range (%)	Average recovery rate (%)	Relative standard deviation (%)	Number of repetitions
0.04	81.8 ~ 100.4	90.1	7.0	9
0.1	75.9 ~ 103.4	83.4	12.1	9
0.2	85.3 ~ 108.5	97.8	7.6	9

¹⁾ The standard addition of sample per gram.



圖四、(A) 空白試劑、(B) 空白基質、與 (C) propyrisulfuron 標準品基質匹配 (0.002 $\mu\text{g/mL}$) LC/MS/MS 分析圖譜。

Fig. 4. Representative mass chromatograms of (A) reagent blank, (B) matrix blank, and (C) brown rice matrix spiked with propyrisulfuron at 0.002 $\mu\text{g/mL}$.

表六、propyrisulfuron 添加儲存穩定試驗結果

Table 6. Results of fortified recovery test to determine the storage stability of propyrisulfuron

Storage interval (days)	Initial concentration of propyrisulfuron in rice sample ($\mu\text{g/g}$)	Average recovery rate (% , n = 3)	Relative standard deviation (% , n = 3)
70	0.5	105.7	4.1
	1.0	112.3	2.0
	2.0	114.7	2.4

(4.1%)、1.0 $\mu\text{g/g}$ 112.3% (2.0%) 及 2.0 $\mu\text{g/g}$ 114.7% (2.4%) (表六)，顯示添加樣品於低溫條件 (低於 -18°C) 儲存期間 propyrisulfuron 殘留量呈穩定現象。

結論

以 1% 醋酸之氰甲烷溶液萃取糙米中 propyrisulfuron，及利用液相層析串聯式質譜儀 (LC-MS/MS) 進行定性定量測定。Propyrisulfuron — 基質匹配之檢量線性相關係數 0.998；方法定量極限為 0.01 $\mu\text{g/g}$ ；添加平均回收率為 83.4 ~ 97.8%，及相對標準偏差 7.0 ~ 12.1%；儲存穩定性試驗結果，可提供殘留樣品至少 70 天的冷凍條件保存下，其殘留量呈現穩定無消退現象。本分析方法操作流程簡易，且無基質干擾鑑定之困擾，方法確效結果分析靈敏度及精確度均佳，可應用於稻米中 propyrisulfuron 之殘留量監測。

謝辭

本研究承蒙藥毒所殘毒管制組殘留消

退研究室王素如、林貞伶、張沛琳及賴雅莉小姐協助試驗工作，謹致謝忱。

引用文獻

1. 住友化學。2017。住友化學。取自 <http://www.sumitomo-chem.co.jp/>
2. 行政院衛生福利部。2014。食品中殘留農藥檢驗方法——多重殘留分析方法 (五)。部授食字第 1031900615 號公告修正。
3. 萬宇。2013。Propyrisulfuron 10SC 在水稻上的殘留試驗報告。田間殘留試驗研究報告。041-11H305-1315。
4. European Committee for Standardization. 2009. Foods of plant origin -- determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS method. DIN EN15662: 2009-02.
5. The Japan Food Chemical Research Foundation. Positive list system for agricultural chemical residues in foods/Maximum

- residue limits (MRLs) list of agricultural chemicals in foods. Available at <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>
6. Turner, J. A. [ed.] 2015. The pesticide manual: a world compendium, 17th ed. British Crop Protection Council, Hampshire, UK. 1357 pp.

Novel Method for the Determination of Propyrisulfuron Residues in Rice Using LC-MS/MS

Jing-Jing Syu¹, Hui-Chi Chen¹, Tsy-Horng Shyu^{1*}

Abstract

Syu, J. J., Chen, H. C., and Shyu, T. H. 2017. Novel method for the determination of propyrisulfuron residues in rice using LC-MS/MS. *Taiwan Pestic. Sci.* 3: 25-37.

An effective analytical method for the residue analysis of propyrisulfuron was studied. Propyrisulfuron is a herbicide, which belongs to the chemical class of urea compound. A liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for the determination of propyrisulfuron in rice. Residue of propyrisulfuron in rice matrices was extracted with 0.1% acetic acid in acetonitrile. Chromatographic separation was achieved on an Agilent ZORBAX SB-C18 chromatography column in gradient elution mode at 50°C. Mobile phase using 0.1% formic acid in 10 mM ammonium formate solution, and 0.5% formic acid in acetonitrile at a constant flow rate of 0.3 mL/min. The quantification is performed by reversed phase HPLC with electrospray MS/MS-detection. At fortified levels of 0.04, 0.1 and 0.2 µg/g propyrisulfuron in rice, it was shown that average recovery rate ranged from 83.4 to 97.8%, with a relative standard deviation ranged from 7.0 to 12.1%. The limit of quantification (LOQ) was found to be 0.01 µg/g. Based on the results of this study, propyrisulfuron is easy to detect with good precision and sensitivity at low levels. This analytical method will be applied for the relevant residue monitoring and regulation.

In addition, the frozen storage stability of propyrisulfuron residue in rice was studied. After fortifying rice with propyrisulfuron at concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 µg/g, the samples were placed in a temperature-monitored freezer at approximately -18°C for frozen storage. The results of the fortified recoveries ranged from 105.7 to 114.7% after 70 days storage, which indicate that residues of propyrisulfuron are stable in rice matrices for at least 70 days when stored under frozen conditions typically employed for actual residue samples.

Key words: LC-MS/MS, rice, storage stability, propyrisulfuron.

Accepted: May 10, 2017.

* Corresponding author, Email: ths@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung

