

Kaedah pengesanan residu azoxystrobin, isopyrazam dan metabolit SYN545364 pada tanaman padi menggunakan Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra-Spektrometri Jisim Tandem (UPLC-MS/MS)

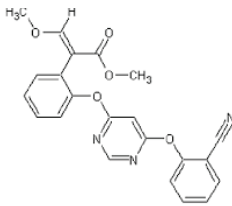
[Detection method of azoxystrobin, isopyrazam and metabolite SYN545364 residues in paddy crops using Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS)]

Jamaliah Jaafar

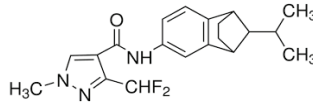
Pengenalan

Ancaman fungi pada tumbuhan boleh menyebabkan pelbagai jenis penyakit dan secara tidak langsung akan mendatangkan kesan dalam pertanian. Kerosakan serius daripada serangan tersebut boleh menjejaskan kualiti tanaman, seterusnya mengakibatkan kerugian hasil dan keuntungan. Salah satu kaedah pengurusan ancaman fungi adalah melalui aplikasi racun perosak khusus, iaitu fungisida yang boleh mengawal, menghalang atau membunuh patogen penyebab penyakit. Walau bagaimanapun, aplikasi racun yang tidak mematuhi pengesyoran berisiko menyebabkan ketoksikan kepada manusia dan alam sekitar. Kajian residu memberi gambaran tahap kandungan bahan aktif dalam sesuatu komoditi. Pemantauan tahap residu racun memerlukan kaedah ujian makmal yang efisien dan sensitif bagi memastikan nilai dikesan berada dalam julat yang terkawal. Dalam kajian ini, tiga bahan aktif dalam kumpulan fungisida telah dipilih sebagai bahan kajian iaitu azoxystrobin, isopyrazam dan metabolit SYN545364. Struktur molekul dan formula molekul fungisid tersebut ditunjukkan seperti dalam *Rajah 1* Azoxystrobin ialah fungisida spektrum luas yang mempunyai struktur cincin pirimidin. Kajian ketoksikan mendapati azoxystrobin adalah kurang toksik kepada manusia, mamalia lain, burung, serangga dan cacing tanah, namun ia mempunyai keupayaan untuk menembusi tanah dan mengawal pertumbuhan fungi dengan sangat berkesan. Isopyrazam pula adalah bahan aktif yang baru diperkenalkan oleh Syngenta pada tahun 2011. Di Malaysia, formulasi racun yang mengandungi isopyrazam masih belum digunakan secara meluas. Berdasarkan carian dalam Sistem Maklumat Racun Perosak (SISMARP), tiada maklumat penggunaan racun ini ke atas tanaman padi.

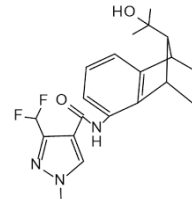
Isopyrazam merupakan bahan aktif berspektrum luas yang tergolong dalam kelas kimia fenil amida tersubstitusi orto. Ia mengawal pelbagai jenis patogen dengan bertindak sebagai perencat dehidrogenase suksinat (SDHI) yang berfungsi menyerang sistem pernafasan mitokondria, mengganggu aliran elektron seterusnya mengubah suai respirasi selular.



a) Azoxystrobin ($C_{22}H_{17}N_3O_5$).



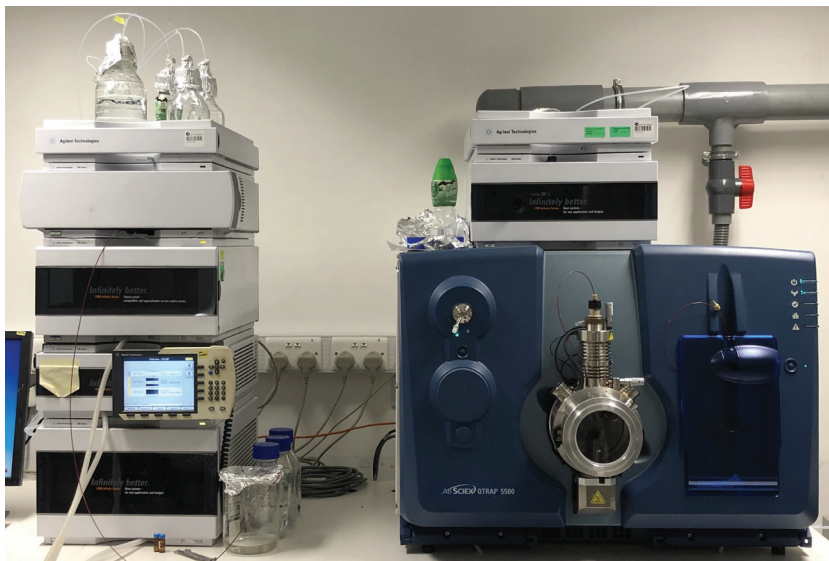
b) Isopyrazam ($C_{20}H_{23}F_2N_3O$)



c) SYN545364 ($C_{20}H_{23}F_2N_3O_2$)

Rajah 1. Struktur dan formula molekul fungisid azoxystrobin, isopyrazam dan SYN545364

Isopyrazam ialah sebatian kiral yang boleh mengandungi campuran dua, atau lebih pasangan enantiomer syn- dan anti-isomer. Selain daripada sebatian utama isopyrazam, proses degradasinya menghasilkan metabolit SYN545364 yang juga berpotensi menimbulkan risiko kepada manusia dan alam sekitar. Kajian melaporkan bahawa terdapat produk metabolit isopyrazam berupaya menghasilkan kesan ketoksikan yang lebih tinggi berbanding dengan sebatian induknya. Dalam kajian ini, penentuan serentak residu azoxystrobin, isopyrazam dan produk degradasinya (SYN545364) telah dijalankan melalui kaedah instrumen iaitu menggunakan Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra-Spektrometri Jisim Tandem (UPLC-MS/MS) (Gambar 1) dalam matriks padi dan beras. Pemilihan matrik ini adalah berdasarkan potensi penggunaan bahan aktif tersebut dalam formulasi fungisid pada tanaman padi.



Gambar 1. Peralatan sistem Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra (UPLC) Agilent 1200 digandingkan dengan spektrometer jisim API 5500 QTrap (ABI-SCIEX)

Kaedah pengesanan

Langkah 1: Penyediaan matriks kajian

Matrik kawalan daripada pokok padi dalam bentuk bijirin padi dan jerami telah diperolehi dari plot penyelidikan MARDI di MARDI Parit, Perak. Sampel tersebut telah dipastikan tidak tercemar atau dirawat dengan formulasi mengandungi fungisid kajian. Bijirin padi yang diperolehi akan diproses di makmal menggunakan peralatan yang sesuai untuk menghasilkan beras perang dan beras putih yang kemudiannya dikisar hingga menjadi serbuk halus menggunakan mesin pemproses makanan. Jerami padi juga akan dihancurkan dan dikisar menjadi serbuk halus.

Langkah 2: Kaedah pengekstrakan sampel

Sampel beras putih, beras perang (10 g) dan jerami padi (20 g) ditimbang di dalam botol Schott Duran berkapasiti 250 mL. Pelarut organik asetonitril 40 mL (beras putih dan beras perang) dan 80 mL (jerami padi) ditambahkan dan disonikasi selama 30 minit. Kemudian sampel diempar pada kelajuan 4,000 rpm selama 5 minit. Sebanyak 5 mL diambil daripada bahan ekstrak dan disaring menggunakan penyaring nilon bersaiz 0.22 μm . Bahan ekstrak akhir ini dipindahkan ke dalam vial bagi penentuan analit menggunakan peralatan UPLC-MS/MS (GRM006.01B, 2006).

Langkah 3: Penyediaan larutan piawai

Piawai bahan aktif atau analit azoxystrobin (peratus ketulenan 99.8% w/w), isopyrazam (peratus ketulenan 97.2% w/w ketulenan) dan SYN545364 diperolehi daripada Sygenta Crop Protection. Larutan piawai utama disediakan secara berasingan dalam pelarut asetonitril pada kepekatan 1,000 mg/L setiap satu. Bagi penentuan kuantitatif secara serentak, larutan kalibrasi disediakan melalui pencampuran ketiga-tiga jenis bahan aktif dan pencairan berasingan menggunakan larutan ekstrak kawalan daripada matriks beras putih, beras perang dan jerami, pada kepekatan 1, 2, 5, 10, 20, 50 dan 100 ng/mL.

Langkah 4: Kaedah pengesanan bahan aktif racun

Peralatan sistem Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra (UPLC) Agilent 1200 digandingkan dengan spektrometer jisim API 5500 QTrap (ABI-SCIEX) dan dikawal oleh perisian Analyst diguna sebagai alat bagi menentukan analit kajian. Pengasingan sebatian dilakukan menggunakan turus Synergy Fusion-RP bersaiz partikel 100 angstrom (Å) dan berdiameter 2.5 μm dengan dimensi 50 mm \times 2 mm i.d (Phenomenax). Aliran fasa cecair ditetapkan secara gradien dengan kadar alir 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Eluen yang berfungsi sebagai fasa gerak akan membawa bahan aktif melalui turus kromatografi yang mengandungi lapisan kimia partikal fasa pegun, di mana pemisahan berdasarkan interaksi relatif bahan aktif berlaku. Eluen A terdiri daripada 0.01% asid formik dalam air, manakala eluen B ialah 0.01% asid formik dalam asetonitril.

Nisbah gradien eluen A dan B ditentukan pada kadar aliran yang optimum seperti dalam *Jadual 1*.

Langkah 5: Validasi kaedah analisis

Validasi kaedah analisis ditentukan dengan menilai parameter tertentu bagi membuktikan parameter tersebut memenuhi prasyarat yang ditetapkan dalam dokumen *EC Guidance Document SANTE/11813/2017*. Pengesahan kaedah analisis ditentukan dengan menerbitkan data validasi daripada penentuan peratus perolehan semula analit pada kadar fortifikasi setiap analit 0.01 $\mu\text{g/g}$ dan 0.10 $\mu\text{g/g}$ dengan minimum lima replikasi setiap satunya. Parameter analitik yang dipertimbangkan adalah ketepatan (*accuracy*), kejituan (*precised*), perolehan semula dan had kuantifikasi kaedah (LOQ).

Jadual 1. Kadar aliran dan tetapan gradien eluen pada kromatografi cecair

Masa (min)	Eluen A (%)	Eluen B (%)	Kadar (mL/min)
0.0	90	10	400
3.0	20	80	400
5.0	20	80	400
6.0	90	10	400

Keputusan dan perbincangan

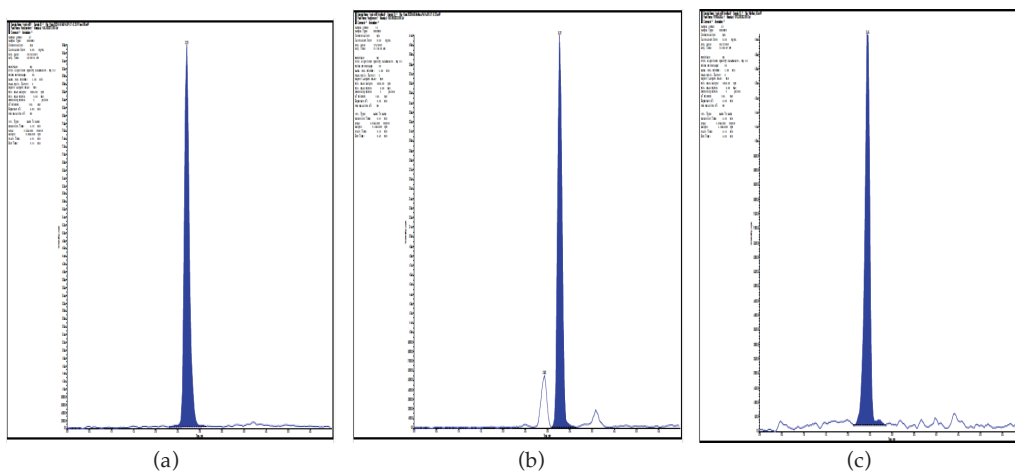
Penentuan kandungan analit-kajian - Pengoptimuman peralatan kromatografi cecair bertekanan tinggi (UPLC) dan pengesanan spektrometer jisim tandem (MS/MS)

Dalam kajian ini, pengesanan analit dijalankan melalui mod pemantauan tindak balas berbilang (MRM). Parameter spektrometer jisim tandem (MS/MS) dengan tetapan yang spesifik ditentukan dengan mengenal pasti pasangan ion peralihan yang terdiri daripada ion prekursor dan ion produk bagi setiap analit. Nilai tenaga perlanggaran (CE, DP dan CXP) yang menghasilkan respons dikenal pasti dengan menyuntik larutan piawai terus ke dalam sistem MS/MS. Bagi setiap analit, pasangan ion prekursor-ion produk dengan respons kelimpahan relatif tertinggi digunakan untuk tujuan kuantitatif, manakala pasangan berikutnya yang mempunyai keamatan kedua tertinggi dipilih bagi tujuan pengesanan. Dalam kajian ini, parameter MS/MS khusus bagi setiap analit didapati daripada pengionan positif iaitu dalam transisi molekul $[M + H]^+$. Tetapan nilai ion prekursor, ion produk dan terbitan nilai tenaga perlanggaran (CE, DP dan CXP) yang telah dioptimumkan ditunjukkan seperti dalam *Jadual 2*.

Selain tetapan pada pengesanan MS/MS, tetapan pada alat kromatografi cecair bertekanan tinggi (UHPLC) juga dioptimumkan bagi memastikan pemisahan analit dalam turus berlaku. Melalui parameter UHPLC dan MS/MS yang telah dioptimumkan, penentuan serentak azoxystrobin dikesan pada minit 2.70, isopyrazam pada minit 3.22 dan SYN545364 pada minit 2.44. Jumlah masa keseluruhan untuk kaedah penentuan ini ialah 6 minit. Isyarat pengesanan UPLC-MSMS bagi setiap analit ditunjukkan seperti dalam *Rajah 2(a), (b) dan (c)*.

Jadual 2. Penetapan ion peralihan MS/MS

Analit	Peralihan 1 (Kuantifikasi)					Peralihan 2 (Pengesahan)				
	Prekursor (m/z)	Produk (m/z)	DP	CE	CXP	Prekursor (m/z)	Produk (m/z)	DP	CE	CXP
Azoxystrobin	404.1	371.1	60.0	19.0	22.0	404.1	344.1	60.0	33.0	22.0
Isopyrazam	360.0	320.0	62.0	26.7	22.0	360.0	244.0	52.0	28.2	22.0
Metabolite (SYN545364)	376.2	262.0	40.0	40.0	20.0	376.2	282.0	88.0	25.0	22.0



(a) Isyarat spektrometer jisim bagi azoxystrobin (masa penahanan 2.70 min; peralihan ion 404.1 → 371.1)

(b) Isyarat spektrometer jisim bagi isopyrazam (masa penahanan 3.22 min; peralihan ion 360 → 320.0)

(c) Isyarat spektrometer jisim bagi SYN545364 (masa penahanan 2.44 min; peralihan ion 376 → 262.0)

Rajah 2. Penentuan serentak azoxystrobin, isopyrazam dan SYN545364 pada kepekatan 1 ng/mL di dalam matrik beras perang

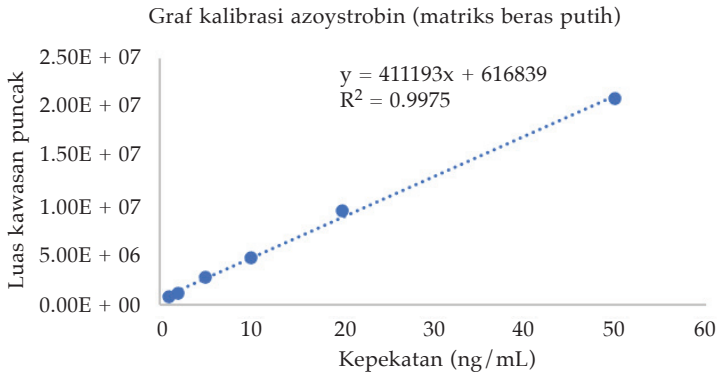
Penentusahan kaedah analisis

Penumpuan pengesanan ditentukan dengan melihat respons relatif antara ion peralihan 1 dengan ion peralihan 2. Penentusahan kehadiran analit dinilai melalui nisbah kelimpahan relatif ion kuantifikasi berbanding dengan ion pengesanan, mesti berada bawah nilai 30%. Kelinearan dinilai dalam kedua-dua larutan piawai yang disediakan dalam asetonitril dan juga dalam larutan matriks. Bagi setiap analit, graf kalibrasi kepekatan analit melawan luas kawasan puncak dalam pelarut dan matriks diplotkan.

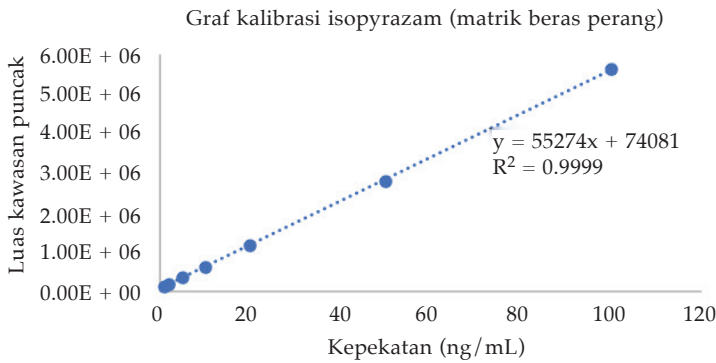
Dua replikasi bagi setiap penentuan titik kalibrasi dilakukan. Sampel kawalan daripada setiap matriks juga disediakan. Kelinearan didapati terbaik dengan pekali korelasi (R^2) melebihi 0.996 dengan sisihan ralat relatif untuk setiap titik penentuan ialah $<10\%$ *relative standard deviation* (RSD). Graf kalibrasi bagi azoystrobin, isopyrazam dan SYN54364 dalam matriks beras putih ditunjukkan seperti dalam *Rajah 3(a), (b) dan (c)*.

Sampel yang mengandungi pelbagai sebatian semula jadi cenderung untuk memberi kesan ke atas pengionan semburan elektron [*electrospray ionisation* (ESI)]. Pengaruh matriks ini ditentukan dengan membandingkan nisbah cerun lengkung yang terhasil dari graf kalibrasi matriks dengan pelarut asetonitril. Keputusan positif dan negatif masing-masing menunjukkan peningkatan dan penindasan isyarat ion. Di dalam kajian ini, penentuan residu dibuat dengan mengambil kira kesan matriks beras putih, beras perang dan jerami bagi setiap satu bahan aktif. *Jadual 3* menunjukkan had kuantifikasi [*limit of quantification* (LOQ)] kaedah, iaitu tahap kepekatan analit terendah yang boleh dikesan secara kuantitatif di dalam keadaan ujian bagi kaedah analisis yang digunakan.

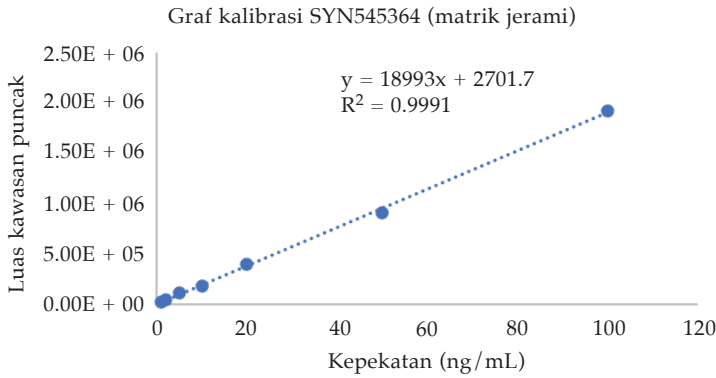
Perolehan semula proses validasi memberi maklumat tentang ketepatan kaedah analisis dan juga kecekapan pengekstrakan analit daripada sampel di dalam matriks. Ujian perolehan semula dalam kajian ini dibuat pada dua tahap fortifikasi iaitu 10 dan 200 ng/g dengan mengambil kira replikasi analisis pada hari yang berbeza (*intra-day*) dan hari yang sama (*inter-day*). Purata peratus perolehan semula bagi semua ujian berada dalam julat 70 – 120% iaitu nilai yang dibenarkan dalam garis panduan SANTE/11813/2017. Nilai sisihan piawai [*standard deviation* (SD)] dan relatif sisihan piawai (RSD) bagi ujian juga memberikan nilai yang memuaskan iaitu kurang daripada 20%. Melalui ujian penentuan had pengesanan, had kuantifikasi kaedah dikira dan ditetapkan pada nilai 0.01 $\mu\text{g/g}$ untuk semua fungisid. Data pengesanan untuk racun perosak berbilang kelas dalam tiga matriks diringkaskan seperti dalam *Jadual 3*. Kesemua parameter kajian untuk penentuan kaedah analisis menunjukkan keputusan yang memuaskan bagi peringkat fortifikasi rendah (0.01 $\mu\text{g/g}$) dan juga fortifikasi tinggi (0.2 $\mu\text{g/g}$) untuk semua matriks iaitu beras perang, beras putih dan jerami padi. Rumusan daripada keputusan ini menunjukkan kaedah ini sesuai untuk digunakan di dalam makmal secara rutin.



(a) Kalibrasi garis linear azoystrobin pada julat kepekatan 1 – 50 ng/mL



(b) Kalibrasi garis linear isopyrazam pada julat kepekatan 1 – 100 ng/mL



(c) Kalibrasi garis linear isopyrazam pada julat kepekatan 1 – 100 ng/mL

Rajah 3. Julat kelinearan kalibrasi analit dalam matriks beras putih

Jadual 3. Parameter penentusahan kaedah analisis penentuan serentak azoxystrobin, isopyrazam dan metabolit (SYN545364) dalam matriks beras putih, beras perang dan jerami

Matriks	Analit	Kadar fortifikasi ($\mu\text{g/g}$)	Perolehan semula (n = 5)			LOQ ($\mu\text{g/g}$)
			Purata (%)	sd	RSD	
Beras perang	Azoxystrobin	0.01	92.38	1.32	1.43	0.01
		0.20	79.40	2.11	2.65	0.01
	Isopyrazam	0.01	78.46	3.42	4.36	0.01
		0.20	104.62	3.22	3.08	0.01
	SYN545364	0.01	74.81	10.27	13.73	0.01
		0.20	94.97	9.20	9.69	0.01
Beras putih	Azoxystrobin	0.01	92.33	1.87	2.03	0.01
		0.20	79.23	2.06	2.59	0.01
	Isopyrazam	0.01	74.80	5.51	7.37	0.01
		0.20	103.88	2.68	2.58	0.01
	SYN545364	0.01	76.96	13.30	19.86	0.01
		0.20	112.54	7.27	6.46	0.01
Jerami	Azoxystrobin	0.01	83.66	15.00	15.88	0.01
		0.20	107.00	13.20	12.35	0.01
	Isopyrazam	0.01	86.21	17.10	19.84	0.01
		0.20	106.99	19.13	17.88	0.01
	SYN545364	0.01	93.13	15.64	16.79	0.01
		0.20	93.40	6.73	7.21	0.01

Kesimpulan

Penentuan serentak bahan aktif fungisid iaitu azoystrobin, isopyrazam dan metabolit terbitannya (SYN545364) melalui pengekstrakan dan pengesanan menggunakan peralatan UPLC-MS/MS telah dibangunkan dan ditentusahkan pada matriks, beras putih, beras perang dan jerami. Melalui prosedur penentusahan kaedah analisis, kajian membuktikan kaedah yang dibangunkan ini berjaya dan berupaya untuk mengesan residu bahan aktif dalam matriks kajian. Walau bagaimanapun, bagi sebatian kiral isopyrazam, kaedah analisis tersebut tidak enantioselektif, menyebabkan penentuan analit tidak dapat membezakan syn-isomer daripada anti-isomer. Kajian lanjut bagi menentukan isomer yang reaktif berfungsi sebagai fungisid adalah penting bagi mengurangkan pembebasan bahan tidak reaktif ke persekitaran.

Bibliografi

- ESFA (European Food Safety Authority), (2021b). Member States consultation report on the review of the existing MRLs for isopyrazam according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. Diperoleh dari www.efsa.europa.eu.
- Fang, K., Liu, Y., Zhang, X. L., Fang, J. W., Chen, D., Liu, T., & Wang, X. G. (2021). Simultaneous determination of the residue of isopyrazam isomers and their metabolites in soil and tomatoes by Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 69, 756–766.
- SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedure for pesticide residues and analysis in food and feed. (2017). European Commission.
- Sistem Maklumat Racun Perosak (SISMARP), Department of Agriculture. Diperoleh dari <http://www.portal.doa.gov.my/sismarp/>.
- SYN520453-Analytical method for the determination of residues of SYN53498 and SYN534969 in crops. Final determination by LCMS/MS. GRM006.01B Sygenta Ltd. (2006).

Ringkasan

Kaedah penentuan serentak residu fungisida daripada bahan aktif azoxystrobin, isopyrazam dan metabolit terbitannya (SYN545364) pada tanaman padi telah dibangunkan. Pengesanan analit dilakukan menggunakan Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra - Spektrometri Jisim Tandem (UPLC-MS/MS). Proses validasi bertujuan untuk membuktikan kaedah analisis yang dibangunkan ini boleh diterima untuk bahan aktif kajian dengan padanan matriks beras putih, beras perang dan jerami padi, berdasarkan piawaian *EC Guidance Document SANTE/11813/2017*. Graf kalibrasi pada julat kepekatan 1 – 100 ng/g menghasilkan garis linear dengan $R^2 \geq 0.996$. Nilai had pengesanan racun diperolehi ialah 1 ng/g, manakala nilai had kuantifikasi ialah 10 ng/g. Peratus perolehan semula bagi semua matriks adalah dalam julat dibenarkan iaitu 74 – 112%. Cerapan data residu yang diukur untuk *intra-day* dan *inter-day* menunjukkan ketepatan relatif sisihan piawai untuk semua sebatian sasaran berada bawah aras 20%. Kaedah ini telah ditentusahkan dan boleh digunakan untuk mengesan azoxystrobin, isopyrazam dan SYN54534 dalam produk padi.

Summary

Simultaneous determination of isopyrazam residues and its degradation products (SYN545364) using Ultra-performance Liquid Chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was established for paddy crops. The simple, sensitive, and efficient analytical method was developed and validated to assess the residue occurrences of the studied fungicides in paddy plants, and processed rice commodities. Method validation displayed acceptable linearities for all pesticides ($R^2 \geq 0.99$). The calculated detection limits (LOD) and quantification (LOQ) were 1 ng/g and 10 ng/g in each representative matrix. It was necessary to employ matrix-matched standards to correctly quantify these fungicides in all matrices. Acceptable recoveries (74 – 112%) were obtained for all the target compounds with good intra-day and inter-day precisions ($RSD \leq 20\%$). The results indicated that the method is dependable for detecting these fungicides in polished rice, brown rice and paddy fodder.

Pengarang

ChM Jamaliah Jaafar

Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,

43400 Serdang, Selangor

E-mel: jmai@mardi.gov.my