

## 大米及玉米中 6 种环己烯酮类除草剂的 液相色谱-串联质谱测定

沈金灿, 叶卫翔, 谢丽琪, 赵琼辉, 肖来龙

(深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 广州 深圳 518067)

**摘要:**建立了大米和玉米中 6 种环己烯酮类除草剂吡喃草酮, 禾草灭, 噻草酮, 苯草酮, 稀禾定和烯草酮的高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定方法。样品制备后,采用乙腈进行提取,经 C<sub>18</sub>和 Envi-Carb 固相萃取柱净化处理后,采用 LC-MS/MS 电喷雾电离(ESI),多反应监测(MRM)正离子模式检测,外标法定量。在 1~100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,6 种环己烯酮类除草剂的线性相关系数均大于 0.999。在添加浓度 5~20  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$  范围内,6 种环己烯酮类除草剂的回收率在 70.0%~97.9%,相对标准偏差(RSD)均在 10%以内。

**关键词:**环己烯酮;除草剂;液相色谱-串联质谱

中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2009)04-0201-07

## Analysis of Cyclohexanedione Herbicides in Rice and Corn by LC-MS/MS

SHEN Jin-can, YE Wei-xiang, XIE Li-qi, ZHAO Qiong-hui, XIAO Lai-long

(*Inspection Center of Import and Export Food, Shenzhen Entry-Exit Inspection  
and Quarantine Bureau, Shenzhen 518067, China*)

**Abstract:** A method for determination of 6 cyclohexanedione herbicides, tepraloxymid, alloxymid, cycloxydim, tralkoxydim, sethoxydim and clethodim in rice and corn was developed. After homogenization, sample was extracted with acetonitrile. The extracts were cleaned by C<sub>18</sub> and Envi-Carb solid phase extraction (SPE) cartridge. Identification and detection were achieved by electrospray ionization (ESI) in positive mode using multiple reaction monitoring of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. The linearity of all the 6 cyclohexanedione herbicides in the range from 1 to 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  is correlation coefficient greater than 0.999. Cyclohexanedione herbicides are quantified by external standard method. Recoveries of 6 cyclohexanedione herbicides are within 70.0%~97.9% at the spiked levels of 5-20  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ . The relative standard deviations (RSDs) for the 6 herbicides are less than 10%.

**Key words:** cyclohexanedione; herbicide; LC-MS/MS

环己烯酮类 (3-hydroxycyclohex-2-enones) 或环己二酮类 (cyclohexanediones) 除草剂最早由日本曹达公司于 20 世纪 60 年代初研发得到, 它属于脞类除草剂, 是细胞有丝分裂抑制剂。到目前为止, 发现的该类除草剂有: 禾草灭 (aloxymidim)、稀禾定 (sethoxydim)、烯草酮 (clethodim)、苯草酮 (tralkoxydim)、噻草酮 (cycloxydim) 和吡喃草酮 (tepraloxymidim) 等, 它们在化学结构上均保持相同的母体骨架结构, 示于图 1。6 种主要环己烯酮类除草剂的结构列于表 1。

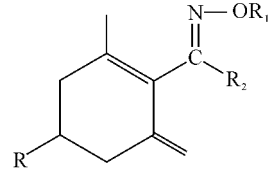


图 1 环己烯酮类除草剂的母体骨架结构  
Fig. 1 Framework structure of cyclohexanedione herbicides

表 1 6 种环己烯酮类除草剂的化学结构

Table 1 Chemical structure of 6 cyclohexanedione herbicides

除草剂	结构	除草剂	结构
吡喃草酮 Tepraloxymidim		稀禾定 Sethoxydim	
烯草酮 Clethodim		苯草酮 Tralkoxydim	
禾草灭 Aloxydim		噻草酮 Cycloxydim	

美国、日本、加拿大等西方发达国家出于维护本国经济利益和保护人们健康的需要, 相继对进口食品中环己烯酮类农药残留量等卫生指标提出了越来越严格的要求。如日本规定大米和玉米中吡喃草酮的限量为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 美国和加拿大规定玉米中稀禾定的限量为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 美国规定玉米中烯草酮的限量为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 日本规定大米和玉米中苯草酮的限量为  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。目前, 国内外对环己烯酮类除草剂残留分析的报道较少, 已有的研究报道主要使用了液相色谱和液相色谱-质谱测定方

法, 研究对象有烯禾定、烯草酮、禾草灭等单种或多种环己烯酮类除草剂, 研究基质包括标准物质、水样、油菜籽等样品<sup>[2-5]</sup>。采用高效液相色谱法测定的方法分辨率和灵敏度低, 无法对农产品复杂基质中痕量的残留化合物进行分析, 并且该检测方法无法提供结构方面的信息, 从而无法对目标化合物进行确证, 因而在残留分析应用中受到很大的限制。Marek 等<sup>[5]</sup>采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法研究了水样中多种环己烯酮化合物, 结果表明, 采用液相色谱-串联质谱技术进行环己烯酮化合物测定具有灵敏度高、选择

性强等优点。将 LC-MS/MS 用于环己烯酮类农药分析,不仅可以实现对多种残留化合物的确证分析,还可以使复杂基质中痕量的残留化合物得以检出,从而满足各国对于该类化合物残留的分析要求。对植物源性食品中多种环己烯酮类除草剂的 LC-MS/MS 分析国内外未见文献报道。

本研究采用高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法同时测定大米及玉米中 6 种环己烯酮类除草剂,吡喃草酮、禾草灭、噻草酮、苯草酮、稀禾定和烯草酮。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与条件

Premier XE 液相色谱-串联质谱仪;美国 Waters 公司产品;BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×50 mm×1.7 μm);美国 Waters 公司产品;LC C<sub>18</sub> 固相萃取柱(3 mL,200 mg);Supelco 公司产品;Envi-Carb 固相萃取柱(3 mL,200 mg);Supelco 公司产品;Turbo Vap LV 型吹氮浓缩仪;Zymark 公司产品;PT 3000 型均质器;Polytron 公司产品。

禾草灭、稀禾定、烯草酮、苯草酮、噻草酮和吡喃草酮标准均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;所用甲醇、乙腈、正己烷和丙酮为色谱纯,Merck 公司产品;甲酸和乙酸为优级纯试剂,Sigma 公司产品;氯化钠为分析纯,广州试剂有限公司产品;实验用水为 Milli-Q 高纯水。

试样制备:取代表性样品约 500 g,用粉碎机充分粉碎,混匀,装入洁净容器,置于 4 ℃ 冷藏保存。

标准工作溶液的配制:准确称取 10.0 mg 各种环己烯酮标准物质,用乙腈定容至 100 mL,配制成浓度为  $1.00 \times 10^2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准储备溶液,-18 ℃ 避光保存。取每种标准储备溶液 1.00 mL,用乙腈定容至 100 mL,稀释成  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合标准工作溶液,-18 ℃ 避光保存。

空白样品提取液的制备:称取 6 个阴性样品,每个样品为 5.00 g(精确到 0.01 g),然后按样品前处理步骤进行处理。

基质混合标准工作溶液:取适量的混合标准储备溶液,用空白样品提取液配制成浓度为 1.0、5.0、10.0、20.0、40.0、100 μg·L<sup>-1</sup> 的基质

混合标准工作溶液。

### 1.2 LC-MS/MS 分析条件

BEH C<sub>18</sub> 色谱柱,采用梯度洗脱,梯度洗脱条件列于表 2,洗脱液流速  $0.30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温 40 ℃,进样量为 10 μL。

表 2 环己烯酮类除草剂测定的梯度洗脱条件  
Table 2 Elution condition for the determination of cyclohexanedione herbicides

时间/min	φ0.1%的醋酸溶液/%	φ乙腈/%
0	50	50
5	10	90
6	10	90
7.5	50	50

MS/MS 条件:电喷雾离子化源,检测方式为多反应监测(multi-reaction monitoring mode,MRM)离子模式,正离子检测;毛细管电压 3.0 kV;去溶剂气和锥孔反吹气流速分别为  $700 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$  和  $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ;碰撞气为氩气,流速  $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;离子源温度 105 ℃;去溶剂辅助加热温度 350 ℃;锥孔电压、碰撞能量及其他相关质谱条件列于表 3。

### 1.3 样品前处理

1.3.1 提取 称取 5.00 g 样品于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 水,漩涡混匀后放置 1 h。然后加入过量氯化钠,使水溶液达到饱和,再加入 15 mL 乙腈高速均质提取 3 min,振荡提取 15 min,于  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,将乙腈层转移至 25 mL 容量瓶中。残渣再用 10 mL 乙腈重复提取一次,合并提取液,并用乙腈定容至 25 mL。

1.3.2 净化 (a)大米:取 5.0 mL 提取液于 15 mL 离心管中,40 ℃ 下用氮气吹至近干。残渣用 2.0 mL V(正己烷):V(丙酮)=2:1 的混合溶液溶解,将溶解液加入 5.0 mL 正己烷-丙酮处理过的 Envi-Carb 固相萃取柱中,以约 1 滴每秒的流速使样液全部通过固相萃取柱,再用 5 mL 正己烷-丙酮润洗样品管,并将润洗液一并加入 Envi-Carb 固相萃取柱,收集全部流出液于 15 mL 离心管中,于 40 ℃ 水浴中氮气吹至近干,残余物用 1.0 mL V(乙腈):V(水)=1:1 的混合溶液溶解,漩涡混匀后,供液相色谱-串联质谱仪测定。

表 3 环己烯酮类除草剂测定的质谱参数

Table 3 Mass spectrometric parameters for the determination of cyclohexanedione herbicides

化合物	定性离子对 ( $m/z$ )	定量离子对 ( $m/z$ )	采集时间/s	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
禾草灭	324/178		0.05	30	30
Alloxydim	324/234	324/178	0.05	21	30
噻草酮	326/180		0.05	29	30
Cycloxydim	326/280	326/280	0.05	18	30
稀禾定	328/178		0.05	29	30
Sethoxydim	328/220	328/178	0.05	22	30
苯草酮	330/138		0.05	28	30
Tralkoxydim	330/284	330/138	0.05	18	30
吡喃草酮	342/166		0.05	30	32
Tepraloxym	342/250	342/250	0.05	19	32
烯草酮	360/164		0.05	29	32
Clethodim	360/268	360/164	0.05	18	32

(b)玉米:取 5.0 mL 提取液于 15 mL 离心管中,40 °C 下用氮气吹至 2.0 mL 左右。将提取液转入 5 mL 乙腈处理过的 C<sub>18</sub> 固相萃取柱中,以约 1 滴每秒的流速使样液全部通过固相萃取柱,再用 3 mL 乙腈淋洗并抽干固相萃取柱,收集全部流出液于 15 mL 离心管中,40 °C 下用氮气吹至近干。残渣用 2.0 mL 正己烷-丙酮溶液溶解,将溶解液加入 5.0 mL 正己烷-丙酮处理过的 Envi-Carb 固相萃取柱中,以约 1 滴每秒的流速使样液全部通过固相萃取柱,再用 5 mL 正己烷-丙酮润洗样品管,并将润洗液一并加入 Envi-Carb 固相萃取柱,收集全部流出液于 15 mL 离心管中,在 40 °C 水浴中氮吹至近干,残余物用 1.0 mL 乙腈-水溶解,旋涡混匀后,供液相色谱串联质谱仪测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 提取溶剂的选择

由于环己烯酮类除草剂极性较弱,根据相似相溶原理,实验选取弱极性的溶剂作为提取溶剂。考察了二氯甲烷、乙腈、酸性乙腈、正己烷、乙酸乙酯、酸性乙酸乙酯及丙酮作为提取溶剂的提取效率。结果表明,采用二氯甲烷或乙腈,6 种环己烯酮类除草剂均可以得到较高的提取效

率。由于粮谷类产品在农药测定前通常需加一定量的水进行浸泡,为了使提取试剂与之充分互溶而进行有效提取,故首先选择乙腈作为提取溶剂。

### 2.2 净化条件的选择

采用固相萃取净化技术对样品提取液进行净化。由于乙腈的极性中等,能够将样品中的油脂化合物同时提取出来,采用乙腈提取也容易将一些较强极性的有机化合物,如极性色素同时提取出来,因此在测定前需对提取液进行除油和脱色净化。为了避免这些共萃物的测定干扰,实验选用 C<sub>18</sub> 和 Envi-Carb 两种不同的固相萃取柱进行净化。

为了将弱极性、强保留的脂类及色素共萃物保留在柱上,实验选择反相固相萃取柱进行净化。通过将乙腈提取液直接上柱,再用 3 mL 乙腈淋洗,目标化合物则直接被洗脱,而弱极性、强保留的物质则保留在柱子上。反相柱选择中,通过比较 HLB、Waters C<sub>18</sub>、Varian C<sub>18</sub>、LC-C<sub>18</sub> 柱的净化效果,发现采用 4 种不同牌子的色谱柱其回收率并没有大的差别。在所选用的固相萃取柱中,采用 LC-C<sub>18</sub> 柱进行净化能得到最好的回收率,故实验选择 LC-C<sub>18</sub> 柱作为净化柱。

通过反相柱净化后的提取液,样品依然含有

较多色素(表现为颜色较深)。近年来, Envi-Carb 萃取柱由于具有很强的净化能力而在样品前处理中得到广泛应用, 它特别适用于分离/去除普遍存在于粮谷、蔬菜和其他天然产物中的色素(如叶绿素和类胡萝卜素)及固醇类化合物。实验选择 Envi-Carb 萃取柱对提取液进行脱色净化。通过试验不同比例正己烷-丙酮溶剂的洗脱效果, 结果表明, 采用 5 mL  $V(\text{正己烷}) : V(\text{丙酮}) = 2 : 1$  的混合溶液进行直接洗脱, 各种除草剂具有较高的回收率。

### 2.3 HPLC-MS/MS 条件优化

液相分离时优化了流动相, 以 0.1% 乙酸水溶液作为水相流动相, 乙腈作为有机相, 采用梯度洗脱, 6 种环己烯酮类除草剂得到良好的分离, 且灵敏度较高。流动相洗脱条件列于表 2。

质谱条件优化时, 分别取 6 种  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  环己烯酮类除草剂标准溶液, 以  $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  流速分别将 6 种化合物标准溶液注入离子源。在正离子检测方式下分别对其进行一级质谱分析(Q1 扫描), 得到分子离子峰  $[M+H]^+$ 。再对分子离子进行二级质谱分析(子离子扫描), 得到碎片的离子信息。在选定的质谱条件下, 吡喃草酮

主要产生  $m/z$  166、250、222 和 314 等子离子; 禾草灭主要产生  $m/z$  234、178、206 和 266 等子离子; 噻草酮主要产生  $m/z$  280、180 和 252 等子离子; 苯草酮主要产生  $m/z$  284、138 和 122 等子离子; 稀禾定主要产生  $m/z$  178、220、150 和 161 等子离子; 烯草酮主要产生  $m/z$  164、268、206 和 240 等子离子。选取丰度最强的离子作为各组分的监测离子, 然后再对锥孔电压及碰撞气能量等参数进行优化, 使分子离子与特征碎片离子强度达到最大。将质谱仪与液相色谱联机, 优化去溶剂气、锥孔反吹气、去溶剂辅助加热温度、毛细管电压等参数, 使每种环己烯酮类除草剂离子化效率达到最佳。

### 2.4 线性范围、检出限和测定下限

以样品定容液配置得到 6 种环己烯酮类除草剂的浓度分别为 1.0、5.0、10.0、20.0、40.0、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合标准溶液, 在选定的条件下进行测定, 进样量为  $10 \mu\text{L}$ , 用峰面积对标准溶液中各被测组分的浓度作图, 6 种环己烯酮类除草剂在绝对量为  $1.0 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内呈良好的线性关系, 检出限均小于  $0.50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其线性方程和校正因子列于表 4。

表 4 6 种环己烯酮类化合物线性关系和检出限

Table 4 Regression equations, correlation coefficients and detection limits of 6 cyclohexanedione herbicides

化合物	浓度范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	线性方程	相关系数/ $r$	检出限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
吡喃草酮 Teparloxydim	1.0~100	$y=326.01x-98.24$	0.999 2	0.294
禾草灭 Alloxydim	1.0~100	$y=803.45x-390.89$	0.999 4	0.190
噻草酮 Cycloxydim	1.0~100	$y=1\,324.31x-411.37$	0.999 3	0.156
苯草酮 Tralkoxydim	1.0~100	$y=1\,588.82x-780.46$	0.999 8	0.152
稀禾定 Sethoxydim	1.0~100	$y=234.12x-938.79$	0.999 1	0.302
烯草酮 Clethodim	1.0~100	$y=579.82x-316.47$	0.999 2	0.264

### 2.5 方法的回收率和精密度

称取 30 份玉米或大米样品(每份  $5.00 \text{ g}$ ), 分为 3 组(每组 10 个平行样), 分别添加 0.5、0.10 和  $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 6 种环己烯酮类化合物的混合标准溶液, 按上述方法进行处理和测定。玉米空白样品添加  $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的环己烯酮除草

剂的多反应监测图示于图 2。玉米和玉米中 6 种环己烯酮除草剂添加回收率列于表 5。在添加浓度  $5 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  范围内, 6 种环己烯酮的回收率为  $70.0\% \sim 97.9\%$ , 相对标准偏差(RSD)均在  $10\%$  以内。该方法的准确度与精密度完全可以满足国内外相关法规的要求。

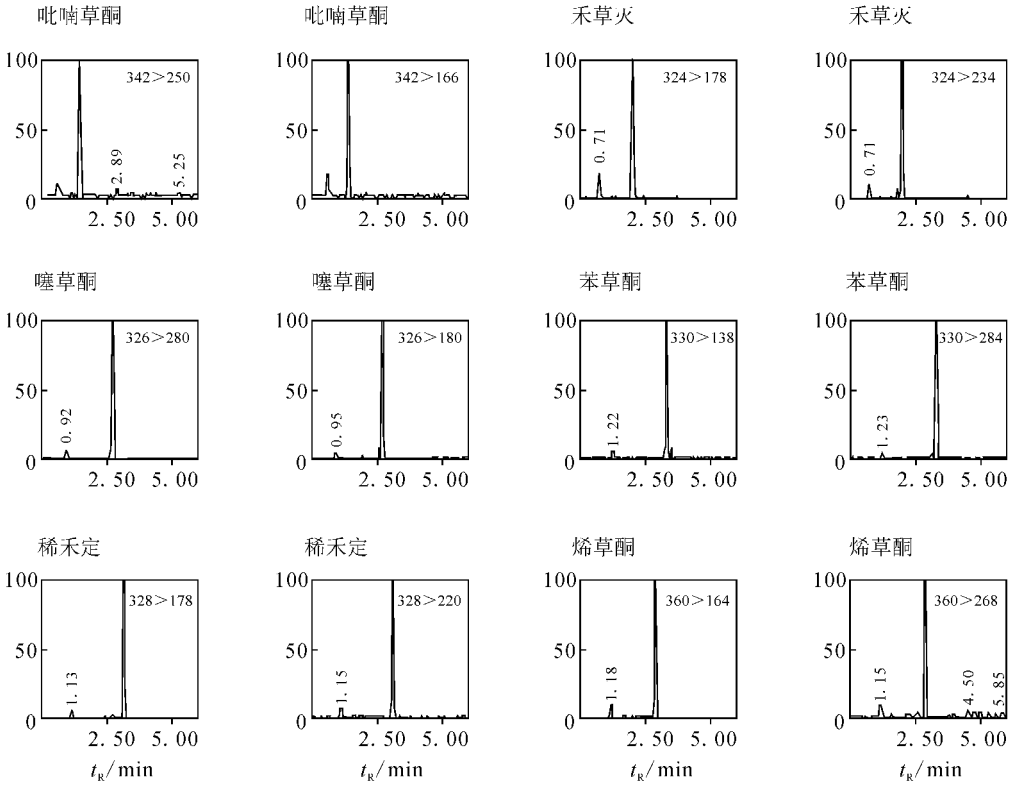


图 2 玉米中添加  $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  环己烯酮类除草剂标准的多反应监测(MRM)色谱图

Fig. 2 MRM chromatography of corn sample added with  $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  cyclohexanedione herbicide standards

表 5 玉米和大米中吡喃草酮、禾草灭、噻草酮、苯草酮、稀禾定和烯草酮的添加回收率和相对标准偏差( $n=10$ )  
Table 5 Recoveries and relative standard deviations of tepraloxymid, alloxymid, cycloxydim, tralkoxydim, sethoxydim and clethodim ( $n=10$ )

基质	化合物	背景值	加入量	测得量	回收率/%	相对标准偏差/%
		$/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	$/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	$/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$		
玉米	吡喃草酮 Tepraloxymid	0	5	4.51	90.3	5.20
		0	10	9.04	90.4	5.18
		0	20	16.4	82.0	4.15
	禾草灭 Alloxymid	0	5	4.74	94.7	4.59
		0	10	8.81	88.1	3.75
		0	20	16.0	80.0	3.88
玉米	噻草酮 Cycloxydim	0	5	3.68	73.6	5.93
		0	10	7.14	71.4	6.19
		0	20	14.4	72.0	3.95
	苯草酮 Tralkoxydim	0	5	4.52	90.5	4.18
		0	10	7.73	77.3	2.55
		0	20	16.6	83.0	4.64

续表

基质	化合物	背景值	加入量	测得量	回收率/%	相对标准 偏差/%
		$/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	$/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	$/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$		
大米	稀禾定 Sethoxydim	0	5	3.56	71.2	5.49
			10	7.16	71.6	5.20
			20	14.6	73.0	4.86
	烯草酮 Clethodim	0	5	3.80	75.9	4.57
			10	7.15	71.5	5.13
			20	14.0	70.0	6.05
	吡喃草酮 Tepraloxydim	0	5	3.92	78.3	7.71
			10	8.19	81.9	5.15
			20	18.5	92.4	4.50
	禾草灭 Alloxydim	0	5	4.40	87.9	6.40
			10	9.33	93.3	4.19
			20	18.5	92.7	5.89
	噻草酮 Cycloxydim	0	5	4.11	82.2	5.06
			10	8.33	83.3	5.97
			20	19.6	97.9	5.76
	苯草酮 Tralkoxydim	0	5	4.01	80.2	7.76
			10	8.64	86.4	7.92
			20	19.2	96.1	6.91
稀禾定 Sethoxydim	0	5	3.97	79.4	7.32	
		10	8.58	85.8	7.18	
		20	18.1	90.3	4.94	
烯草酮 Clethodim	0	5	4.18	83.5	8.73	
		10	8.23	82.3	6.63	
		20	17.4	87.1	5.88	

## 参考文献:

- [1] 刘长令. 环己烯酮的创制经纬[J]. 农药, 2002, 41(6): 46.
- [2] 陈玮瑄, 姜云腾. 新除草剂烯草酮的反相高效液相色谱分析[J]. 农药, 1990, 29(2): 24-25.
- [3] 王 嫻, 龚党生, 侯青青. 稀禾定原药的高效液相色谱分析[J]. 农药, 2001, 40(10): 15-16.
- [4] 陈玮瑄, 逮忠斌, 刘伊玲. 油菜籽中稀禾定及其主要活性代谢产物的残留分析[J]. 色谱, 1992, 10(6): 371-372.
- [5] LEETTA J. MAREK, WILLAM C, et al. LC/MS Analysis of cyclohexanedione oxime herbicides in water[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 2 797-2 801.