

# 谷物中 15 种除草剂多残留检测方法的建立及应用

田宏哲, 周艳明, 刘朋宇, 陈 柏  
(沈阳农业大学分析测试中心, 辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:** 采用高效液相色谱-离子阱质谱建立同时测定谷物中 15 种除草剂残留量的方法。样品经乙腈提取, 氟罗里硅土固相萃取柱净化, 然后采用 HPLC-ESI-MS/MS 进行测定。15 种除草剂在 0.01~10mg/kg 范围内呈良好线性, 相关系数为 0.9834~0.9997。15 种除草剂的定量限为 0.002~0.07mg/kg, 平均加标回收率为 74.44%~115.56%, 相对标准偏差为 0.37%~13.79%。采用本实验所建立的方法对市售谷物样品进行测定, 确定了其中所存在的除草剂残留量。

**关键词:** 除草剂; 多残留分析; 谷物

## Development and Application of Multi-residue Analysis of 15 Herbicides in Grains

TIAN Hong-zhe, ZHOU Yan-ming, LIU Peng-yu, CHEN Bai  
(Analysis and Testing Center, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** This study developed a specific high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometric (HPLC-ESI-MS/MS) method that allowed simultaneous determination of 15 herbicide multi-residues in grain samples. Residues of the herbicides were extracted from grains with acetonitrile, cleaned up using florisil-SPE, and then determined by HPLC-ESI-MS/MS. The method showed high degree of linearity (the correlation coefficients were 0.9834—0.9997) over the range of 0.01—10 mg/kg for the analytes. The limit of quantifications ranged from 0.002 to 0.07 mg/kg. The average recoveries for the herbicides in spiked samples were between 74.44% and 115.56% with a relative standard deviations from 0.37% to 13.79%. The method developed was applied to detect the targets in real samples, and several herbicide residues were identified.

**Key words:** herbicide; multi-residue analysis; grain

中图分类号: O654.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0215-04

国内外农产品中农药残留检测技术近几年发展较快、方法较多, 如气相色谱法<sup>[1]</sup>、液相色谱法<sup>[2]</sup>、气相色谱-质谱联用法<sup>[3-4]</sup>、液相色谱-质谱联用法<sup>[5-7]</sup>、胆碱酯酶抑制法等<sup>[8]</sup>。传统的气相色谱法和液相色谱法同时检测的农药数量少, 样品前处理繁琐、时间长; 胆碱酯酶抑制法虽然方法简单、速度快, 但方法灵敏度低、不能定量, 只能给出半定性结果, 还存在一定的假阳性和假阴性现象; 气相色谱-质谱联用法和液相色谱-质谱联用法可进行多类农药残留的测定, 同时还能给出确证信息。

农药在农产品中残留的种类、数量具有很大的不确定性和不可预测性, 鉴于 GC-MS 只能对挥发性组分实现直接分析等局限性, 不能应用于强极性、难挥发、

热不稳定化合物及生物农药等多种结构类型的农药多残留的筛选测定, HPLC-MS/MS 技术正被广泛地应用于农药多残留检测技术的研究中<sup>[9-12]</sup>。采用 HPLC 作为主要的分离手段, 与二极管阵列检测器(DAD)和 MS 联用可以同时得到农药组分的光谱信息和分子量等结构信息, 该技术有效解决了传统液相检测器灵敏度和选择性不够的缺点, 可以提供准确的相对分子质量及结构信息, 简化操作步骤, 节省样品处理时间和分析时间。与其他检测分析手段相比, 在农产品质量监控领域具有很大应用前景, 可以为不同类型农产品的农药多残留检测提供准确的定性以及定量信息。

本实验采用高效液相色谱-离子阱质谱建立谷物中 15 种除草剂的多残留测定方法, 通过多反应监测模式

收稿日期: 2008-11-26

作者简介: 田宏哲(1972—), 女, 讲师, 博士, 主要从事液相色谱-质谱联用方法应用以及农药残留分析研究。

E-mail: tthz2@yahoo.com.cn

(MRM)排除样品基质和杂质成分的干扰,对目标组分进行准确的定性及定量,并通过对实际样品中除草剂残留量的测定,对该方法进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

“娃哈哈”纯净水 杭州娃哈哈集团;大麦、燕麦、大米、江米 市售。

甲草胺、乙草胺、吡氟草胺、吡啶草胺、双苯酰草胺、苯噻草胺、丙草胺、丁草胺、戊炔草胺、异丙甲草胺、西玛津、莠去津、敌草隆、敌稗等除草剂标准品(纯度>99.0%) Sigma-Aldrich 公司;扑草净(纯度 97.0%) 沈阳化工研究院;乙腈、正己烷(色谱纯) Fluka 公司;佛罗里硅土固相萃取柱(1000mg, 6ml) Dikma 公司;SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(150mm × 2.1mm) Agilent 公司;其他试剂均为分析纯。

配制的流动相均经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤。标准样品用色谱纯溶剂配成 1000mg/L 的储备液,然后稀释到 1.0mg/L 进行流动注射进样,分别获取标准样品的一级和二级质谱图,得到准分子离子峰和碎片离子峰的信息。

Agilent 1100 LC-Trap SL 液相色谱-质谱仪[配有四元梯度泵、自动进样器、二极管阵列检测器(DAD)等] Agilent 公司;质谱直接进样注射泵 美国 KD Scientific 公司;KQ-300DE 型医用数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;TDL-40B 离心机 上海安亭科学仪器厂;RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

### 1.2 样品制备

称取 2g 谷类样品,用 20ml 乙腈超声提取 10min 后,3500r/min 离心 5min,然后将提取液转移到鸡心瓶中进行旋转蒸发,浓缩近干。加入 2ml 正己烷重新溶解,待净化。

佛罗里硅土固相萃取柱(1000mg, 6ml)净化:用 1ml 丙酮、3ml 正己烷预淋洗。加入试样提取液,用 15ml 正己烷-丙酮混合溶剂(88:12, V/V)洗脱,收集洗脱液,45℃水浴浓缩近干,然后用 0.5ml 流动相溶解,过 0.45 μm 滤膜,待进样分析。

### 1.3 液相色谱条件

SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(150mm × 2.1mm),流动相为乙腈(乙腈溶液中含 0.1% 甲酸, V/V)和 0.1% 甲酸水溶液;梯度洗脱,0~15min 乙腈溶液由 35% 到 60%,15~22min 乙腈溶液由 60% 到 90%,保持 3min,然后回到初始流动相组成,平衡 10min,流速 0.2ml/min,柱温 25℃,进样量 10 μl,检测波长 220nm。

### 1.4 质谱条件

ESI 电离源,正离子化模式;干燥气:9L/min;干燥温度:325℃;喷雾压力:30psi;毛细管电压:

4500V;毛细管出口电压:90V;带电荷离子数目控制(ion charged control, ICC):30000 个;累积时间:200ms。扫描范围:  $m/z$  50~800。多反应模式监测(MRM)。液相色谱-质谱联用优化参数见表 1。

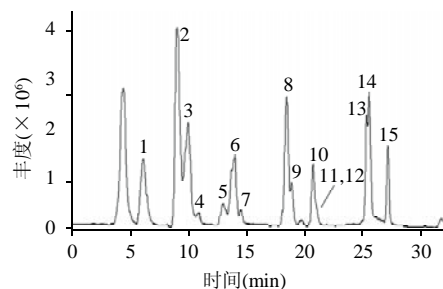
表 1 采用液质联用方法分析目标除草剂的优化参数

Table 1 Optimized parameters for multi-residue analysis of 15 herbicides with HPLC-ESI-MS/MS

除草剂	保留时间 (min)	分子量	离子化模式	监测离子对 ( $m/z$ )	其他离子( $m/z$ )
西玛津	6.2	201.66	ESI <sup>+</sup>	202.1>132.0	173.9; 123.9; 103.9; 96
莠去津	10.0	215.68	ESI <sup>+</sup>	216.1>174.2	145.9; 131.9; 103.9; 95.9
扑草净	9.1	241.35	ESI <sup>+</sup>	242.2>200.1	158.0; 116.1
敌草隆	10.8	233.09	ESI <sup>+</sup>	233.1>72.0	110.8; 187.8
异丙甲草胺	20.7	283.79	ESI <sup>+</sup>	284.3>252.0	138.1; 176
乙草胺	21.3	269.77	ESI <sup>+</sup>	270.2>224.0	148.0; 194.0; 250.7
吡氟草胺	25.3	394.29	ESI <sup>+</sup>	395.1>265.8	245.9; 232.9
甲草胺	21.0	269.77	ESI <sup>+</sup>	270.2>238.0	135.1; 163.3
丙草胺	25.5	311.85	ESI <sup>+</sup>	312>252.2	
丁草胺	27.1	311.86	ESI <sup>+</sup>	312>238.1	224.1; 252.2
戊炔草胺	18.9	256.13	ESI <sup>+</sup>	257>190	172.9; 240.3
吡啶草胺	13.0	277.75	ESI <sup>+</sup>	278.7>210	134.1
双苯酰草胺	13.8	239.31	ESI <sup>+</sup>	240>134.1	118.1; 167.1
敌稗	14.5	218.08	ESI <sup>+</sup>	219>162	
苯噻草胺	18.4	298.36	ESI <sup>+</sup>	299>192	120.1; 148.1; 177

## 2 结果与分析

### 2.1 除草剂的液相色谱-质谱多残留方法建立



1. 西玛津; 2. 扑草净; 3. 莠去津; 4. 敌草隆; 5. 吡啶草胺; 6. 双苯酰草胺; 7. 敌稗; 8. 苯噻草胺; 9. 戊炔草胺; 10. 异丙甲草胺; 11. 甲草胺; 12. 乙草胺; 13. 吡氟草胺; 14. 丙草胺; 15. 丁草胺。

图 1 采用 MRM 模式分析 15 种除草剂标样(1.0 mg/kg)的总离子流图  
Fig.1 Total ion chromatogram of mixed 15 herbicide standards (1.0 mg/kg) monitored in MRM mode

酰胺类、三嗪类和脲类除草剂的理化性质差别较大,为了确保提取回收率,实验中尝试采用丙酮和乙腈两种覆盖面宽的溶剂进行多残留提取,两种提取溶剂的提取效率接近并较高,但丙酮提取液的油脂、色素等杂质较多,给后续的净化步骤带来困难,因此确定乙腈为最佳提取溶剂。根据不同类型农产品的基质成分不同,如谷物中含有油脂和色素成分会干扰除草剂的分离和检测,实验中确定佛罗里硅土固相萃取柱进行样品

净化, 尽量排除基质成分和杂质的干扰筛选出目标化合物, 确保对不同除草剂进行准确的定性以及定量分析。

采用本实验建立的 HPLC-ESI-MS/MS 方法(见 1.3 节和 1.4 节)分析除草剂组分, 以 MRM 模式提供的目标农药的母离子与子离子组成的离子对进行定性和定量分析(表 1), 划分了 12 个时间段, 每个时间段只监测 1~3 个目标组分, 从而排除杂质峰和基质成分的干扰。在本实验所建立的色谱条件下, 大部分目标农药有很好的分离度, 仅有甲草胺、异丙甲草胺和乙草胺及吡氟草胺和丙草胺, 这两组除草剂虽然在全扫描条件下没有完全分离(图 1), 但二级质谱以 MRM 模式监测目标组分, 可以通过分别抽提每个除草剂的二级质谱的萃取离子流图(EIC), 从而排除未完全分离的化合物彼此间在定性及定量上的干扰。

## 2.2 HPLC-ESI-MS/MS 分析除草剂的方法评价

表 2 LC-ESI-MS/MS 联用方法分析 15 种除草剂的定量限、线性相关系数及最大残留限量

Table 2 Limits of quantification (LOQs), maximum residue limits (MRLs) and linear equations as well as correlation coefficients (at the concentration levels ranging from 0.01 to 10 mg/kg) of 15 herbicides analyzed by this method

除草剂	定量限 (mg/kg)	最大残留限量 (mg/kg)	线性方程	相关系数(r)
西玛津	0.025	0.25	$y=4.37 \times 10^5+2.31 \times 10^7x$	0.9995
莠去津	0.02	0.1	$y=6.72 \times 10^6+1.43 \times 10^8x$	0.9973
扑草净	0.01	0.25	$y=8.09 \times 10^6+1.84 \times 10^8x$	0.9983
敌草隆	0.01	1	$y=725.3+1.64 \times 10^4x$	0.9980
异丙甲草胺	$2.5 \times 10^{-3}$	0.1	$y=2.33 \times 10^6+6.83 \times 10^7x$	0.9986
乙草胺	0.015	0.02	$y=2.36 \times 10^5+5.92 \times 10^6x$	0.9984
吡氟草胺	$2.5 \times 10^{-3}$	0.002	$y=4.86 \times 10^5+2.74 \times 10^7x$	0.9997
甲草胺	0.015	0.2	$y=5.68 \times 10^5+4.06 \times 10^6x$	0.9834
丙草胺	$2.0 \times 10^{-3}$	0.1	$y=2.80 \times 10^6+7.67 \times 10^7x$	0.9983
丁草胺	$5.0 \times 10^{-3}$	0.1	$y=3.71 \times 10^5+1.88 \times 10^7x$	0.9995
戊炔草胺	0.01	0.02	$y=2.39 \times 10^5+1.46 \times 10^7x$	0.9997
吡啶草胺	0.05	0.1	$y=-2.00 \times 10^4+2.45 \times 10^7x$	0.9947
双苯酰草胺	0.01	0.1	$y=-3.07 \times 10^6+1.00 \times 10^8x$	0.9972
敌稗	0.07	0.2	$y=4.55 \times 10^6+1.43 \times 10^8x$	0.9885
苯噻酰草胺	0.025	0.1	$y=3.49 \times 10^5+5.73 \times 10^6x$	0.9989

注: 最大残留限量取目前国际上谷物中目标除草剂的最大残留限量的最低值。

采用大米为基质进行方法验证, 确定了 15 种除草剂的定量限(S/N=10)、线性方程(表 2)以及加标回收率和重现性(表 3)。在 0.01~10mg/kg 范围内, 15 种除草剂中的 13 种农药线性方程的相关系数大于 0.994、2 种大于 0.983, 均呈良好的线性关系。定量限在 0.002~0.07mg/kg 之间, 与目前欧盟、美国及日本等国对谷物中除草剂最大残留限量要求相比, 除了吡氟草胺定量限略高于目前国际上在大米中的最大残留限量要求(其他谷物中吡氟草胺的最大残留限量均大于 0.002mg/kg), 本实验所建立的除草剂测定方法完全可以满足有关标准对这

15 种除草剂的检测要求。目标除草剂的添加浓度分别为 0.05、0.1 和 2.0  $\mu\text{g/g}$ , 每个添加浓度进行三次平行实验, 15 种除草剂的平均添加回收率均大于 74.44%, 相对标准偏差为 0.37%~13.79%, 本方法的准确度和精密性均符合农药残留分析的要求。

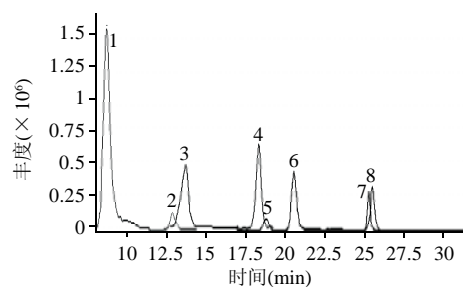
表 3 15 种除草剂的平均加标回收率(大米)

Table 3 Recoveries for 15 herbicides in rice spiked at three levels

除草剂	添加浓度					
	0.05 $\mu\text{g/g}$		0.1 $\mu\text{g/g}$		2 $\mu\text{g/g}$	
	回收率(%)	RSD (%)	回收率(%)	RSD (%)	回收率(%)	RSD (%)
西玛津	77.29	8.0	114.69	3.06	76.42	2.55
莠去津	80.36	11.21	106.42	7.20	114.92	5.24
扑草净	106.73	8.81	88.07	6.89	103.00	8.86
敌草隆	99.96	8.94	100.96	0.37	96.09	4.33
异丙甲草胺	74.44	9.02	81.73	5.80	96.72	2.66
乙草胺	93.58	6.55	85.96	6.71	105.59	6.28
吡氟草胺	88.48	1.48	88.40	4.03	112.22	3.28
甲草胺	91.80	5.74	87.94	5.12	84.36	5.58
丙草胺	87.29	5.37	87.33	2.82	95.48	9.85
丁草胺	79.93	13.79	102.08	10.86	90.78	2.40
戊炔草胺	86.23	8.37	113.07	1.21	104.99	2.02
吡啶草胺	81.42	6.06	104.35	4.10	102.90	6.91
双苯酰草胺	102.91	9.77	101.89	7.76	101.57	3.59
敌稗	93.44	13.39	107.09	9.78	76.19	7.74
苯噻酰草胺	82.10	10.70	115.56	9.41	84.84	8.74

注: 本底值未检出。

## 2.3 实际样品测定



1. 扑草净; 2. 吡啶草胺; 3. 双苯酰草胺; 4. 苯噻酰草胺;  
5. 戊炔草胺; 6. 异丙甲草胺; 7. 吡氟草胺; 8. 丙草胺。

图 2 采用 MRM 模式分析实际样品(大米)中除草剂的萃取离子流图  
Fig.2 Total ion chromatogram of 8 herbicides in common rice monitored in MRM mode

为了考察本实验所建立的方法在实际样品测定中的可行性, 将本实验建立的多残留检测方法应用于四种市售谷物样品的分析, 测定结果见表 4, 采用 MRM 模式分析大米样品的萃取离子流图见图 2。在大米样品中测定出 8 种除草剂残留, 其中双苯酰草胺残留量最大, 达到 0.203mg/kg; 而燕麦样品中除草剂残留种类最少, 残留量最小。以上数据证实该方法可以用于实际样品中除草剂残留量的测定, 并且获得了较为满意的结果。

表4 本方法在实际样品中的应用实验结果  
Table 4 Residue levels of 15 herbicides in barley, common rice, oat and glutinous rice analyzed by this method

除草剂	检测浓度(mg/kg)			
	大麦	燕麦	大米	江米
西玛津	—	—	—	—
莠去津	—	—	—	—
扑草净	0.018	0.010	0.195	0.013
敌草隆	—	—	—	—
异丙甲草胺	0.005	—	0.107	—
乙草胺	—	—	—	0.035
吡氟草胺	0.042	—	0.106	—
甲草胺	—	—	—	—
丙草胺	0.004	—	0.040	0.002
丁草胺	—	—	—	—
戊炔草胺	—	—	0.120	—
吡啶草胺	—	—	0.102	—
双苯酰草胺	0.016	—	0.203	0.052
敌稗	—	—	—	—
苯噻酰草胺	0.060	0.025	0.117	0.030

注：—，未检出。

### 3 讨论与结论

本实验从实用角度出发，建立了谷物中15种除草剂的HPLC-ESI-MS/MS多残留分析方法，既考虑了国内常用除草剂的类型，也使该方法具有很大的适用范围，可以满足当前国际上对谷物中目标除草剂最大残留限量的要求。将该方法应用于市售农产品中除草剂残留量的测定，确定了实际样品中残留的几种除草剂。该方法快速、准确、操作简单，不仅为农产品质量控制提供参考，同时可以满足当前对农产品以及食品等领域的农药多残留检测需求。

### 参考文献：

[1] CCORREIA M, DELERUE-MATOS C, ALVES A. Multi-residue methodology for pesticide screening in wines[J]. J Chromatogr A, 2000, 889 (1/2): 59-67.

[2] LOURENCETTI C, MARCHI M R R, RIBEIRO M L. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV[J]. Talanta, 2008, 77(2): 701-709.

[3] WALORCZYK S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2007, 1165 (1/2): 200-212.

[4] 高文惠, 王凤池, 郭春海. 气相色谱-质谱法同时测定草莓中7种除草剂农药残留[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 359-361.

[5] BANERJEE K, OULKAR D P, DASGUPTA S, et al. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2007, 1173(1/2): 98-109.

[6] VENKATESWARLU P, MOHAN K R, KUMAR C R, et al. Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1760-1766.

[7] PIZZUTTI I R, KOK A, ZANELLA R, et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization[J]. J Chromatogr A, 2007, 1142(2): 123-136.

[8] JENSEN A F, PETERSEN A, GRANBY K. Cumulative risk assessment of the intake of organophosphorus and carbamate pesticides in the Danish diet[J]. Food Additives and Contaminants, 2003, 20(8): 776-785.

[9] HIEMSTRA M, KOK A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2007, 1154 (1/2): 3-25.

[10] ZHANG F, BARTELS M J, BRODEUR J C, et al. Quantitation of 17  $\alpha$ -ethinylestradiol in aquatic samples using liquid-liquid phase extraction, dansyl derivatization, and liquid chromatography/positive electrospray tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(22): 2739-2742.

[11] BLASCO C, FONT G, MAÑES J, et al. Solid-phase microextraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry to determine postharvest fungicides in fruits[J]. Anal Chem, 2003, 75(14): 3606-3615.

[12] PANG G F, LIU Y M, FAN C L, et al. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(6): 1366-1408.