



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104374857 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 201410612518.0

(22) 申请日 2014.11.05

(73) 专利权人 中国烟草总公司四川省公司
地址 611130 四川省成都市槐树街1号娇子大厦

(72) 发明人 熊巍 陶晓秋 韶济民 庞凤黄玫

(74) 专利代理机构 四川君士达律师事务所
51216
代理人 杨宣付 苟忠义

(51) Int. Cl.

G01N 30/88(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

(56) 对比文件

US 5981800 A, 1999.11.09,

CN 101393183 A, 2009.03.25,

US 5922913 A, 1999.07.13,

王建忠等. 改进的 QuEChERS 方法结合

UPLC-MS/MS 同时快速检测 8 种蔬菜中 77 种农药

残留.《江苏农业科学》.2014,第42卷(第4期),
廖雅桦等.凝胶渗透色谱-高效液相色谱-串联质谱法同时测定烟草中3种抑芽剂残留.《分析试验室》.2010,第29卷(第1期),第72~75页.

孙福生等.基质固相分散-反相液相色谱法测定蔬菜中二甲戊乐灵农药残留.《分析试验室》.2010,第29卷(第2期),第69~72页.

审查员 王方

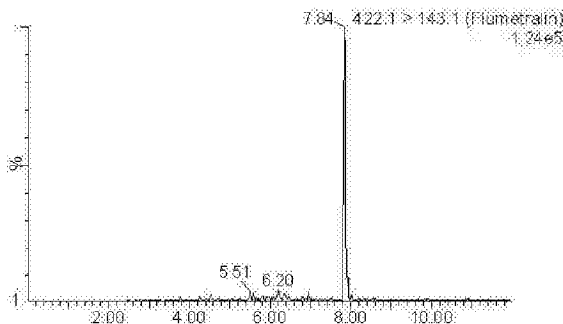
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法

(57) 摘要

本发明公开一种烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,包括以下步骤:提取烟草中的目标物、N-丙基乙二胺纯化、标准储备液和标准工作液的配制、液相色谱-串联质谱测定。本发明使用的超高效色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)在农残检测的灵敏度以及选择性方面都明显优于传统方法,在分析速度方面优于GC和普通LC-MS/MS法;与传统的气相色谱-电子捕获检测器法比较,采用基质分散固相萃取法来检测氟节胺、仲丁灵和除芽通,无需浓缩与过固相萃取小柱,简化了前处理过程,提高了分析灵敏度。



1. 一种烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)提取烟草中的目标物:

称取烘干磨好的烟叶样品,加入超纯水浸润,依次加入内标和乙腈,第一次涡漩混合振荡;放入冰箱冷冻后取出,依次加入无水硫酸镁、氯化钠、柠檬酸钠和柠檬酸二氢钠,第二次涡漩振荡后离心;

2)N-丙基乙二胺纯化:

移取上清液于新的离心管中,加入无水硫酸镁及PSA吸附剂,第三次漩涡振荡混合,然后高速离心;吸取上清液经有机相滤膜过滤,移取滤液,并用乙腈和超纯水稀释后待测;

3)标准储备液和标准工作液的配制:

用乙腈配制氟节胺、仲丁灵和除芽通标准储备液,储存于棕色玻璃瓶中,-20℃保存;取一定量的各化合物储备液进行混合,用乙腈稀释定容,制得混合标准储备液;

用乙腈准确配制二甲戊灵-d₅内标储备液,用内标储备液配制内标工作液,储存于棕色玻璃瓶中;所有的储备液于-20℃保存,使用前将其恢复到室温;

用空白烟叶的萃取基质配制不同浓度的氟节胺,仲丁灵和除芽通标准工作溶液;

4)液相色谱-串联质谱测定:

吸取空白烟叶溶液和配制好的不同浓度的氟节胺、仲丁灵和除芽通标准工作溶液,注入液相色谱-串联质谱,按内标法以峰面积计算出样品待测液中氟节胺、仲丁灵和除芽通含量;

前述液相色谱-串联质谱为UPLC-MS/MS系统,选取的色谱柱为UPLC色谱柱:UPLC HSS T3,规格为100mm×2.1mm,1.8μm,柱温35℃;串联质谱检测的条件为:电喷雾离子源,喷雾电压:2.6kV;离子化温度350℃;雾化气流量:1000L/Hr;锥孔气流量50L/Hr;碰撞气流量为0.15ml/min;碰撞气为氩气,其余气体为氮气;驻留时间为30msec,正离子MRM模式采集;洗脱条件为梯度洗脱,选取流动相A:甲酸水,流动相B:甲酸甲醇溶液,进样量为5μL;所述甲酸水中甲酸体积分数为0.1%,所述甲酸甲醇溶液中甲酸体积分数为0.1%;

梯度洗脱条件为:0~2min,90%A~50%A;2~2.4min,50%A~30%A;2.4~4.0min,30%A~20%A;4.0~6.0min,20%A~5%A,6.0~9.8min,5%A~5%A;9.8~10.0min,5%A~90%A,10.0~12.0min,90%A~90%A;流动相流速为0.3mL/min。

2. 根据权利要求1所述的烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,所述步骤1)中提取过程依次加入的超纯水,内标,乙腈的体积分别为10mL、200μL和10mL,所述内标的浓度为10μg/mL。

3. 根据权利要求2所述的烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,所述步骤1)中第一次涡漩振荡速率为2000rpm,震荡时间1min,离心管在-10℃条件下保持10min。

4. 根据权利要求3所述的烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,所述步骤1)中无水硫酸镁、氯化钠、柠檬酸钠和柠檬酸二氢钠的质量分别为4g、1g、1g和0.5g。

5. 根据权利要求4所述的烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,所述步骤1)中第二次漩涡混合振荡的速率为2000rpm,振荡时间为2min,以4000rpm的速

率离心10min。

6. 根据权利要求1所述的烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,步骤2)中,加入无水硫酸镁及PSA吸附剂的质量分别为150mg和25mg。

7. 根据权利要求1所述的烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,所述步骤2)中第三次漩涡振荡混合的速率为2000rpm,振荡2min,以6000rpm速率离心2min。

8. 根据权利要求1所述的烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,所述步骤2)中移取滤液体积为200 μ L,加入乙腈和超纯水的体积分别为100 μ L和700 μ L。

9. 根据权利要求1所述的烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,其特征在于,步骤4)中测定烟草中氟节胺,仲丁灵和除芽通含量的具体操作为:吸取标准空白烟草和配制好的不同浓度的氟节胺,仲丁灵和除芽通标准工作溶液,注入UPLC-MS/MS系统,绘制氟节胺,仲丁灵和除芽通的线性回归方程,对纯化稀释后的样品待测液进行测定,测得分析物与内标峰面积的比值,代入一元线性回归方程,求得样品待测液中分析物的含量。

一种烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于农药残留检测领域,涉及烟草中农药残留量检测技术,特别涉及烟草中常用植物生长调节剂残留量的测定方法,具体是检测烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通的残留量。

背景技术

[0002] 生长调节剂在现代农业、果蔬及烟叶生产中应用十分广泛,给人们的生产生活带来了巨大的利益。随着人们环保意识的增加,人们不仅注重作物的产量和营养,更加关注对环境的影响以及食品安全问题。国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)的农用化学品咨询委员会(ACAC)在2008年制定的118种农用化学品指导性残留限量表中将氟节胺、仲丁灵和除芽通的限量定为5mg/kg。

[0003] 烟草常施用的植物生长调节剂有可能会超出指导限量,因此监测烟草常施用农药的残留量尤为重要。烟叶植物生长调节剂的分析方法主要有气相色谱法(GC)、气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)和高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。廖雅桦等利用凝胶渗透色谱处理烟叶样品,高效液相色谱-串联质谱法测定了烟草中二甲戊灵、仲丁灵和马来酰肼等抑芽剂残留。陈晓水等利用GC-MS/MS同时测定了烟草中的氟节胺等132种农药残留,此方法适合于有机磷、有机氯和菊酯类农药的检测。2011年,烟草行业制定一系列多农残检测标准,而这3种常用农药分列于两个检测标准,其中GC-ECD法测定氟节胺和除芽通需要通过基质分散提取,单独的固相萃取和旋转蒸发浓缩,使得前处理过程较为复杂,繁琐,并且标准方法虽然为多农残检测方法,但检测时间较长,不利于单独筛查植物生长调节剂的残留量。

发明内容

[0004] 鉴于此,本发明目的在于提供一种简便、快捷的氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的检测方法。

[0005] 为解决以上技术问题,本发明提供的技术方案是,提供一种烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量的测定方法,包括以下步骤:

[0006] 1)提取烟草中的目标物:

[0007] 称取烘干磨好的烟叶样品,加入超纯水浸润,依次加入内标和乙腈,第一次涡漩混合振荡;放入冰箱冷冻后取出,依次加入无水硫酸镁、氯化钠、柠檬酸钠和柠檬酸二氢钠,第二次涡漩振荡后离心;

[0008] 2)N-丙基乙二胺纯化:

[0009] 移取上清液于新的离心管中,加入无水硫酸镁及PSA吸附剂,第三次漩涡振荡混合,然后高速离心;吸取上清液经有机相滤膜过滤,移取滤液,并用乙腈和超纯水稀释后待测;

[0010] 3)标准储备液和标准工作液的配制:

[0011] 用乙腈配制氟节胺、仲丁灵和除芽通标准储备液,储存于棕色玻璃瓶中,-20℃保

存;取一定量的各化合物储备液进行混合,用乙腈稀释定容,制得混合标准储备液;

[0012] 用乙腈准确配制二甲戊灵-d5内标储备液,用内标储备液配制内标工作液,储存于棕色玻璃瓶中;所有的储备液于-20℃保存,使用前将其恢复到室温;

[0013] 用空白烟叶的萃取基质配制不同浓度的氟节胺,仲丁灵和除芽通标准工作溶液;

[0014] 4)液相色谱-串联质谱测定:

[0015] 吸取空白烟叶溶液和配制好的不同浓度的氟节胺、仲丁灵和除芽通标准工作溶液,注入液相色谱-串联质谱,按内标法以峰面积计算出样品待测液中氟节胺、仲丁灵和除芽通含量;

[0016] 前述液相色谱-串联质谱为UPLC-MS/MS系统,选取的色谱柱为UPLC色谱柱:UPLCHSST3,规格为100mm×2.1mm、1.8μm,柱温35℃;串联质谱检测的条件为:电喷雾离子源,喷雾电压:2.6kV;离子化温度350℃;雾化气流量:1000L/Hr;锥孔气流量50L/Hr;碰撞气流量为0.15ml/min;碰撞气为氩气,其余气体为氮气;驻留时间为30msec,正离子MRM模式采集;洗脱条件为梯度洗脱,选取流动相A:甲酸水,流动相B:乙腈,进样量为5μL;所述甲酸水中甲酸体积分数为0.1%,所述甲酸甲醇溶液中甲酸体积分数为0.1%。

[0017] 优选地,所述步骤1)中提取过程依次加入的超纯水,内标,乙腈的体积分别为10mL、200μL和10mL,所述内标浓度为10μg/mL。

[0018] 优选地,所述步骤1)中第一次涡漩振荡速率为2000rpm,震荡时间1min,离心管在-10℃条件下保持10min。

[0019] 优选地,所述步骤1)中无水硫酸镁、氯化钠、柠檬酸钠和柠檬酸二氢钠的质量分别为4g、1g、1g和0.5g。

[0020] 优选地,所述步骤1)中第二次漩涡混合振荡的速率为2000rpm,振荡时间为2min,以4000rpm的速率离心10min。

[0021] 优选地,步骤2)中,加入无水硫酸镁及PSA吸附剂的质量分别为150mg和25mg。

[0022] 优选地,所述步骤2)中第三次漩涡振荡混合的速率为2000rpm,振荡2min,以6000rpm速率离心2min。

[0023] 优选地,所述步骤2)中移取滤液体积为200μL,加入乙腈和超纯水的体积为100μL和700μL。

[0024] 优选地,步骤4)中,梯度洗脱条件为:0~2min,90%A~50%A;2~2.4min,50%A~30%A;2.4~4.0min,30%A~20%A;4.0~6.0min,20%A~5%A,6.0~9.8min,5%A~5%A;9.8~10.0min,5%A~90%A,10.0~12.0min,90%A~90%A;流动相流速为0.3mL/min。

[0025] 优选地,步骤4)中测定烟草中氟节胺,仲丁灵和除芽通含量的具体操作为:吸取标准空白烟草和配制好的不同浓度的氟节胺,仲丁灵和除芽通标准工作溶液,注入UPLC-MS/MS系统,绘制氟节胺,仲丁灵和除芽通的线性回归方程,对纯化稀释后的样品待测液进行测定,测得分析物与内标峰面积的比值,代入一元线性回归方程,求得样品待测液中分析物的含量。

[0026] 本发明的方法克服了现有技术样品处理方法的不足,针对烟草样本优化了酶解条件、固相萃取条件,并对LC-MS/MS的相关检测条件进行了优化,主要优化了离子源条件,色谱柱以及流动相体系。与现有技术相比,上述技术方案中的一个技术方案具有如下优点:

[0027] 1、本发明使用的超高效色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)在农残检测的灵敏度以及选

择性方面都明显优于传统方法,在分析速度方面优于GC和普通LC-MS/MS法,而目前未见该检测方法应用同时检测烟草中的氟节胺、仲丁灵和除芽通残留量。

[0028] 2、与传统的气相色谱-电子捕获检测器法比较,采用基质分散固相萃取法来检测氟节胺、仲丁灵和除芽通。无需浓缩与过固相萃取小柱,简化了前处理过程,提高了分析灵敏度。

[0029] 3、由于选取了超高效液相色谱柱,使得柱子的分离度明显提高,分析时间显著缩短,提高检测通量。串联质谱的使用使得方法的选择性和灵敏度提高,更有利于低含量的植物生长调节剂残留的测定。

[0030] 4、选取了空白基质配制标准曲线的方法,使得方法的准确性更高,有效消除基质干扰和前处理过程中引起的误差。

[0031] 5、本方法具有操作简便、快速、准确、灵敏度及重复性好的优点。

附图说明

[0032] 图1为氟节胺的选择离子流色谱图。

[0033] 图2为仲丁灵的选择离子流色谱图。

[0034] 图3为二甲戊灵的选择离子流色谱图。

具体实施方式

[0035] 下面结合一个具体实施例进行说明。

[0036] 本实施例依次采用超纯水浸润样品,乙腈萃取分析物,N-丙基乙二胺(PSA)净化样品,超高效液相色谱-串联质谱仪等步骤进行测定,可快速、准确、同时检测出烟草中氟节胺、仲丁灵和除芽通的残留含量。

[0037] 1.仪器与试剂:Waters Xevo TQ超高效液相色谱-串联质谱仪(美国Waters公司),配备电喷雾电离源(ESI);VtexMixer 230VeU振荡器(美国Labnet公司);Sigma 3K15离心机(德国Sigma公司)。

[0038] 甲酸为HPLC级(浓度为49-51%,德国Sigma公司);乙腈、甲醇均为色谱纯(美国Thermo-Fisher公司);氟节胺、仲丁灵和除芽通标准品来自于Labor Dr.Ehrenstorfer-Schafers(化学纯度:98.5%,Augsburg,德国),二甲戊灵-d₅来自于Labor Dr.Ehrenstorfer-Schafers(纯度:98.5%,Augsburg,德国)。N-丙基乙二胺(PSA)吸附剂,水为超纯水。

[0039] 2.提取烟草中的分析物

[0040] 准确称取2.00g样品于50mL具盖离心管中,加入10mL水,振荡直至样品被水充分浸润。冷冻10min后移取200 μ L内标和10mL乙腈至离心管中,然后将离心管置于涡漩混合振荡仪上,以2000rpm速率振荡1min。将离心管置于-10 $^{\circ}$ C条件下保持10min,然后向离心管中加入4g无水硫酸镁和1g氯化钠,1g柠檬酸钠和0.5g柠檬酸二氢钠,立即于漩涡混合振荡仪上,以2000rpm速率振荡2min,然后以4000rpm速率离心10min。

[0041] 3.PSA纯化

[0042] 移取上清液1.0mL于1.5mL离心管中,加入150mg无水硫酸镁及25mgPSA吸附剂,于漩涡混合振荡仪上以2000rpm速率振荡2min,以6000rpm速率离心2min。吸取上清液经0.22 μ

m有机相滤膜过滤,移取200 μ L,加入100 μ L乙腈,用超纯水稀释至1.0mL,待测。

[0043] 4.液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定

[0044] (1)LC-MS/MS条件:

[0045] 色谱条件:Atiantis UPLC HSS T3(100mm \times 2.1mm,1.8 μ m,美国Waters公司);流动相A:0.1%甲酸水溶液(体积分数),流动相B:0.1%甲酸甲醇溶液(体积分数);流速0.3mL/min;柱温35 $^{\circ}$ C;进样量5 μ L。梯度洗脱条件:0~2min,90%A~50%A;2~2.4min,50%A~30%A;2.4~4.0min,30%A~20%A;4.0~6.0min,20%A~5%A,6.0~9.8min,5%A~5%A;9.8~10.0min,5%A~90%A,10.0~12.0min,90%A~90%A。

[0046] 质谱条件:电喷雾离子源,喷雾电压(IS):2.6kV;离子化温度350 $^{\circ}$ C;雾化气流量:1000L/Hr;锥孔气(cone)流量50L/Hr;碰撞气流量为0.15ml/min;碰撞气为氩气,其余气体为氮气;驻留时间为30msec,正离子MRM模式采集,监测离子对及其相应的碰撞能量(CE)见表1。

[0047] 表1多反应监测模式下三种植物生长调节剂及其内标的部分质谱参数

	化合物	离子对(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)
[0048]	氟节胺	422.1/143.1*	19	32
		422.1/213.0	19	28
	仲丁灵	296.2/132.1*	20	32
		296.2/240.1	20	15
[0049]	二甲戊灵	282.2/194.1*	18	20
		282.2/212.1	18	12
	二甲戊灵-d ₅	287.5/213.3	16	10

[0050] *定量离子对。

[0051] (2)标准储备液的配制:

[0052] 用乙腈配制氟节胺、仲丁灵和除芽通标准储备液,储存于棕色玻璃瓶中,-20 $^{\circ}$ C保存。取一定量的各化合物储备液进行混合,用乙腈稀释定容,制得混合标准储备液(仲丁灵和除芽通5 μ g/mL,氟节胺20 μ g/mL)。

[0053] 用乙腈准确配制二甲戊灵-d₅内标储备液(0.190mg/mL),用标准储备液配制内标工作液(10 μ g/mL),储存于棕色玻璃瓶中。所有的储备液于-20 $^{\circ}$ C保存,使用前将其恢复到室温。

[0054] (3)氟节胺、仲丁灵和除芽通含量的测定:

[0055] 吸取配制好的不同浓度的氟节胺、仲丁灵和除芽通的混合标准工作溶液各5 μ L,注入LC-MS/MS;氟节胺、仲丁灵和除芽通的线性回归方程分别为 $y=5.42e^{-5}x-0.0008$, $y=0.0017x-0.0009$ 和 $y=1621x-1.7432$,其中y代表分析物与内标峰面积的比值,x表示烟草中目标分析物的浓度。同样的方法检测实际样本,求得实际样本中氟节胺、仲丁灵和除芽通的含量。

[0056] (4)该方法的线性范围和检出限:

[0057] 本实验空白烤烟基质配制标准曲线,分别移取混合标准储备液(5 μ g/mL,氟节胺20 μ g/mL)0 μ L,20 μ L,50 μ L,100 μ L,200 μ L,500 μ L于6个1.8mL旋盖色谱瓶中,每个色谱瓶移入20 μ L混合氘代内标工作液(10 μ g/mL),加入200 μ L空白烟叶样品萃取液,用乙腈定容至1mL。各标

准工作溶液的浓度分别为0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对各标样峰面积与内标的峰面积的比值(y)和其浓度(x)进行线性回归分析, 得到标准曲线, 结果见表2。各种化合物线性关系良好(除甲基硫菌灵外, 其它化合物的相关系数 $r^2 \geq 0.99$), 可以满足定量分析的需要。以3倍信噪比确定方法的检出限, 详见表2。图1至图3为各植物生长调节剂离子流色谱图。

[0058] 表2三种植物生长调节剂的线性范围、相关系数、检测限及保留时间

	化合物	定量内标	回归曲线	相关系数 (r^2)	检出限 (ngg^{-1})
[0059]	氟节胺		$y=5.42e-5x-0.0008$	0.9957	3.365
	仲丁灵	二甲戊灵- d_5	$y=0.0017x-0.0009$	0.9969	1.945
	二甲戊灵		$y=1621x-1.7432$	0.9956	8.560

[0060] (5)本发明方法的重复性和加标回收率:

[0061] 在空白的烤烟样品中添加一定量的氟节胺、仲丁灵和除芽通标准溶液, 然后提取、测定, 计算回收率。本实验选用高、中、低3种不同浓度的加标回收实验来考察方法的准确度, 计算5次结果的平均值为62.1%~129.7%。方法的精密度以回收率的相对标准偏差(RSD)来评价, 对同一样品平行测定5次, 3种化合物回收率的RSD范围为3.8%~17.8%, 结果见表3。

[0062] 表3烟草中三种除草剂的回收率和精密度($n=5$)

	化合物	加标浓度 ng	计算浓度 ng	回收率 N=5, (%)	RSD N=6 (%)
[0063]	氟节胺	100	129.71	129.7	17.8
		1000	922.58	115.3	6.4
		2000	2360.98	111.6	10.9
	仲丁灵	20	25.67	99.8	10.6
		200	210.61	104.9	10.9
		500	516.14	103.1	3.8
	二甲戊灵	20	18.73	74.9	6.4
		200	124.19	62.1	6.1
		500	348.07	69.6	12.2

[0064] 以上仅是本发明的优选实施方式, 应当指出的是, 上述优选实施方式不应视为对本发明的限制, 本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明的精神和范围内, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

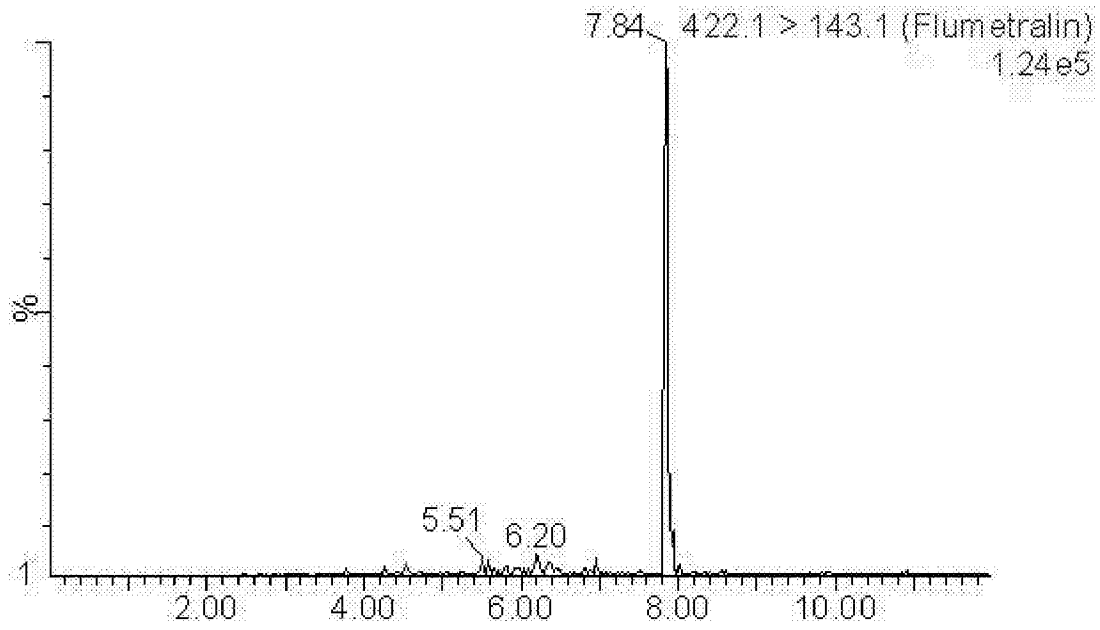


图1

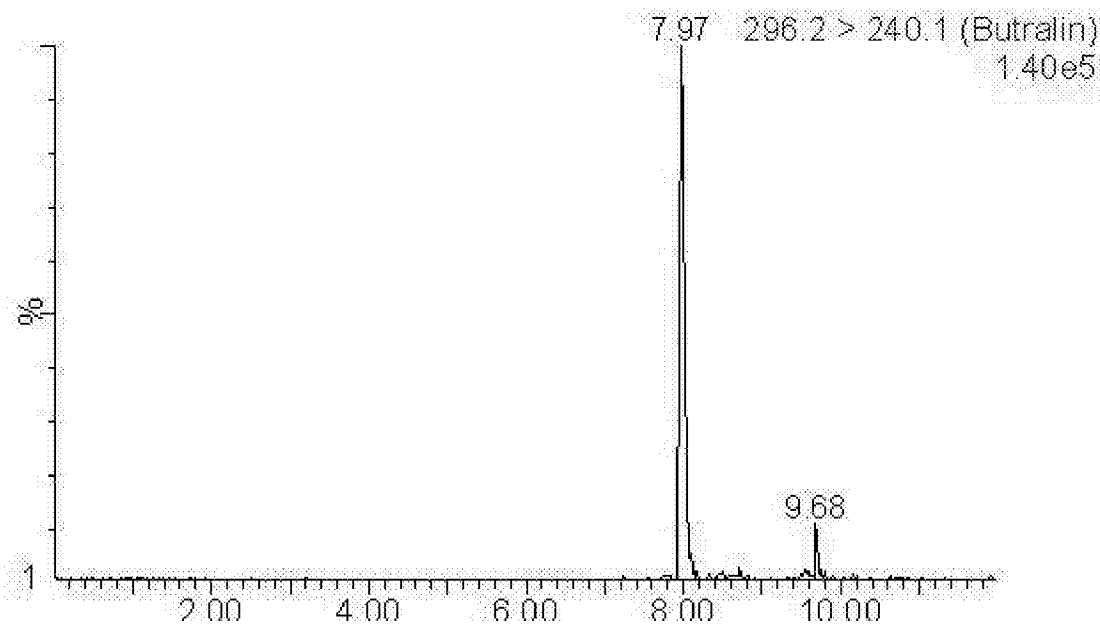


图2

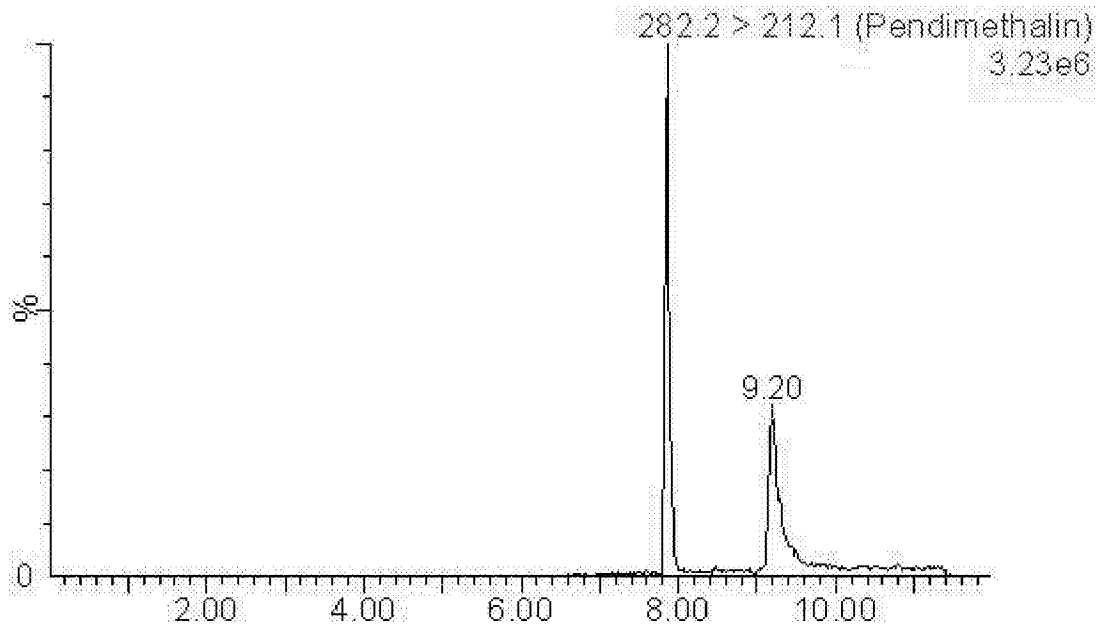


图3