



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108398506 B

(45)授权公告日 2020.02.04

(21)申请号 201810319188.4

G01N 30/06(2006.01)

(22)申请日 2018.04.11

审查员 陈群霞

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108398506 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(73)专利权人 国家烟草质量监督检验中心

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

(72)发明人 杨飞 唐纲岭 邓惠敏 边照阳

李中皓 范子彦 王颖 刘珊珊

(74)专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司

41110

代理人 姜振东

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

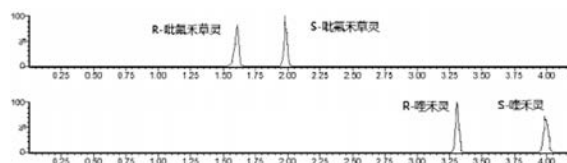
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种超高效合相色谱-串联质谱技术拆分、测定手性农药啶嗪禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法

(57)摘要

本发明属于分析化学领域和农药残留检测技术领域,具体是一种超高效合相色谱-串联质谱技术拆分、测定手性农药啶嗪禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法,涉及手性农药的对映体的拆分及定量方法。该方法采用QuEChERS方法提取烟草及干果中的啶嗪禾灵和吡氟禾草灵,用合相色谱手性固定相结合三重四极杆串联质谱同步检测了啶嗪禾灵和吡氟禾草灵2种手性农药的对映体,方法检出限分别为0.0018和0.0016 mg/kg。本发明首次采用合相色谱快速的对啶嗪禾灵和吡氟禾草灵进行手性分离,以超临界CO<sub>2</sub>为流动相,节省了大量有机溶剂的使用,绿色环保。本发明方法使用合相色谱分析速度快,耗时仅仅5分钟,灵敏度高,手性异构体之间分离度好。



1. 一种超高效合相色谱-串联质谱技术拆分、测定手性农药噻禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 样品前处理;

(2) 检测条件:将待测样品进行合相色谱-串联质谱检测,根据洗脱峰保留时间、目标化合物定量离子对和定性离子对确认各个洗脱峰,即得到各个手性农药对映体,

合相色谱检测条件如下:色谱柱:规格150 mm×3.0 mm,2.5 $\mu$ m的 ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil CEL2柱;流动相:超临界CO<sub>2</sub>/乙醇,流速:2mL/min;梯度洗脱;柱温:40 °C;背压:1600 psi;进样量:2 $\mu$ L;

梯度洗脱方式如下:初始至第2分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比由99%:1%变成92%:8%;第2分钟到第3.5分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从92%:8%变成88%:12%;第3.5分钟到第4分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从88%:12%变成70%:30%;第4分钟到第4.1分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从70%:30%变成99%:1%;第4.1分钟到第5分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比为99%:1%;

根据洗脱峰保留时间、目标化合物定量离子对和定性离子对确认各个洗脱峰的方法如下:

保留时间为1.68分钟、定量离子对为384.1/282.1、定性离子对为384.1/328.1的洗脱峰即为R-吡氟禾草灵;

保留时间为1.95分钟、定量离子对为384.1/282.1、定性离子对为384.1/328.1的洗脱峰即为S-吡氟禾草灵;

保留时间为3.30分钟、定量离子对为373.1/271.1、定性离子对为373.1/299.2的洗脱峰即为R-噻禾灵;

保留时间为3.98分钟、定量离子对为373.1/271.1、定性离子对为373.1/299.2的洗脱峰即为S-噻禾灵;

(3) 检测方法:配制R-噻禾灵和R-吡氟禾草灵的基质混合标准工作溶液,按照步骤(2)提供的色谱条件进行分离,并记录每种对映体对应的峰面积,以每种对映体的浓度值为自变量,以其对应的峰面积为因变量,得到R-噻禾灵和R-吡氟禾草灵的一元线性回归方程;

将待测样品按照前述方法进行分离,并记录每种对映体对应的峰面积;将每种对映体对应的峰面积代入上述一元线性回归方程,即得到待测样品中各对映体的浓度。

2. 根据权利要求1所述的拆分、测定手性农药噻禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法,其特征在于,步骤(1)中的样品前处理过程具体如下:准确称取2 g研磨后的粉末样品于50 mL具盖离心管中,加入10mL水,泡发后加入10 mL乙腈,然后将离心管置于涡漩混合振荡仪上,以2000 rpm 速率振荡5 min;然后向离心管中加入5g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠和0.5 g柠檬酸氢二钠至离心管中,立即于漩涡混合振荡仪上,以2000 rpm速率振荡5 min,然后以6000 rpm速率离心3 min;移取上清液1.0 mL于1.5 mL离心管中,并加入50 mg C18和50 mg中性氧化铝,于漩涡混合振荡仪上以2000 rpm速率振荡2 min,以6000 rpm 速率离心3 min;吸取上清液经0.45  $\mu$ m有机相滤膜过滤,用乙腈稀释2倍。

3. 根据权利要求1所述的拆分、测定手性农药噻禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法,其特征在于,步骤(2)中的质谱条件中,离子源为电喷雾离子源(ESI);扫描方式为正离子扫描;毛细管电压为2.6KV;离子源温度150°C;脱溶剂气温度350°C;脱溶剂气体流速800 L/h;锥孔气体流速50 L/h;补偿溶剂0.1%甲酸甲醇溶液,流速为0.2 mL/min;

每种对映体的去簇电压和碰撞能量如下：

吡氟禾草灵定量离子对和定性离子对的去簇电压均为38V，碰撞能量分别为22V和16V；  
噻禾灵定量离子对和定性离子对的去簇电压均为28V，碰撞能量分别为17V和18V。

4. 根据权利要求1所述的拆分、测定手性农药噻禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法，其特征在于，步骤(3)中的两种农药的一元线性回归方程如下：

R-吡氟禾草灵： $y=323X+5767$ ，线性范围为25ng/mL-500ng/mL，线性相关系数0.9992；

R-噻禾灵： $y=579X+1590$ ，线性范围为25ng/mL-500ng/mL，线性相关系数0.9995。

5. 根据权利要求1所述的拆分、测定手性农药噻禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法，其特征在于，步骤(3)中的基质混合标准工作溶液的具体方法如下：分别称取10 mg的R-吡氟禾草灵和R-噻禾灵标准品于10 mL容量瓶中，用乙腈溶解并定容至刻度，配制成每种农药的单一标准储备液；移取一定量各农药的单一标准储备液于100 mL容量瓶中，用乙腈定容至刻度配得混合标准储备液；分别移取混合标准储备液25 $\mu$ L，50 $\mu$ L，100 $\mu$ L，250 $\mu$ L，500 $\mu$ L及1000 $\mu$ L到6个10 mL容量瓶中，用乙腈定容，制得标准工作溶液；然后分别移取上述标准工作溶液500  $\mu$ L与500 $\mu$ L的空白样品基质溶液混合，配制成基质混合标准工作溶液。

6. 根据权利要求5所述的拆分、测定手性农药噻禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法，其特征在于，所述空白样品基质溶液的制备方法如下：准确称取2 g研磨后的空白样品于50 mL具盖离心管中，加入10mL水，泡发后加入10 mL乙腈，然后将离心管置于涡漩混合振荡仪上，以2000 rpm 速率振荡5 min；然后向离心管中加入5g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠和0.5 g柠檬酸氢二钠至离心管中，立即于涡漩混合振荡仪上，以2000 rpm速率振荡5 min，然后以6000 rpm速率离心3 min；移取上清液1.0 mL于1.5 mL离心管中，并加入50 mg C18和50 mg中性氧化铝，于涡漩混合振荡仪上以2000 rpm速率振荡2 min，以6000 rpm 速率离心3 min；吸取上清液经0.45  $\mu$ m有机相滤膜过滤，滤液备用。

7. 根据权利要求1所述的拆分、测定手性农药噻禾灵和吡氟禾草灵对映体的方法，其特征在于，所述样品为烟草、谷物或干果。

## 一种超高效合相色谱-串联质谱技术拆分、测定手性农药啶氟禾草灵和啶氟禾草灵对映体的方法

### 技术领域

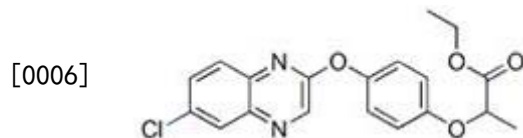
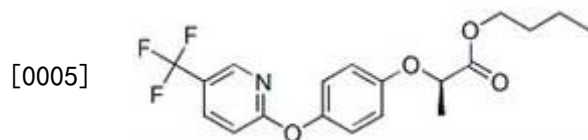
[0001] 本发明属于分析化学领域和农药残留检测技术领域,具体是一种超高效合相色谱-串联质谱技术拆分、测定手性农药啶氟禾草灵和啶氟禾草灵对映体的方法,涉及多种手性农药的对映体的拆分及定量方法。

### 背景技术

[0002] 目前使用的农药中有25%是手性的,手性农药的生物活性存在对映体差异性,其活性往往只存在于一个或少数几个对映体中,而手性农药的对映体在环境中的消解和归趋往往也有明显的不同。即手性农药对映体在自然环境和生物体中的活性、毒性以及吸收、代谢、降解等诸多方面可能存在巨大大差异。

[0003] 啶氟禾草灵和啶氟禾草灵属于芳氧羧酸类农药,是除稻田、大豆田及烟田中禾本科杂草的优良除草剂。这类除草剂通常都含有一个手性中心,生物活性主要体现在R-异构体,S-异构体则无活性或活性比较低。市售品均为其R、S的外消旋体。

[0004] 啶氟禾草灵和啶氟禾草灵的结构式分别如下所示



[0007] 药理研究表明,啶氟禾草灵和啶氟禾草灵的主要药效来自于R体【现代农药,2006,5(4),32-33;农药,2010,49(6),421-423】。马斌斌等【农药,2012,51(3),193-196】采用超临界流体色谱分离了这两类农药,但是分析时间长达50分钟,且啶氟禾草灵分离度欠佳。因而建立啶氟禾草灵和啶氟禾草灵对映体纯度的测定方法对于开发生产R体啶氟禾草灵和啶氟禾草灵单一产品和生产厂家进行产品质量控制,以及减少农药投放量、节约原料、保护环境具有重要意义。

[0008] 发明内容:

[0009] 本发明的目的是提供一种采用合相色谱-串联质谱技术分离外消旋的啶氟禾草灵和啶氟禾草灵的方法,该方法能快速、准确的将外消旋的啶氟禾草灵和啶氟禾草灵的一组对映体进行分离,并且可以准确定量,基质干扰少,环境友好。

[0010] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0011] 一种超高效合相色谱-串联质谱技术拆分、测定手性农药啶氟禾草灵和啶氟禾草灵对映体的方法,包括以下步骤:

[0012] (1) 样品前处理,样品可为烟草、谷物或干果。

[0013] (2) 检测条件:将待测样品进行合相色谱-串联质谱检测,根据洗脱峰保留时间、

目标化合物定量离子对和定性离子对分离各个洗脱峰,即得到各个手性农药对映体,

[0014] a、合相色谱检测条件如下:色谱柱:规格150 mm×3.0 mm,2.5 $\mu$ m的 ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil CEL2柱;流动相:超临界CO<sub>2</sub>/乙醇,流速:2mL/min;梯度洗脱;柱温:40℃;背压:1600 psi;进样量:2 $\mu$ L;

[0015] b、梯度洗脱方式如下:初始至第2分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比由99%:1%变成92%:8%;第2分钟到第3.5分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从92%:8%变成88%:12%;第3.5分钟到第4分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从88%:12%变成70%:30%;第4分钟到第4.1分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从77%:30%变成99%:1%;第4.1分钟到第5分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比为99%:1%;

[0016] c、根据洗脱峰保留时间和母离子/子离子的质荷比特征分离各个洗脱峰的方法如下:

[0017] 保留时间为1.68分钟、定量离子对为384.1/282.1、定性离子对为384.1/328.1的洗脱峰即为R-吡氟禾草灵;

[0018] 保留时间为1.95分钟、定量离子对为384.1/282.1、定性离子对为384.1/328.1的洗脱峰即为S-吡氟禾草灵;

[0019] 保留时间为3.30分钟、定量离子对为373.1/271.1、定性离子对为373.1/299.2的洗脱峰即为R-喹禾灵;

[0020] 保留时间为3.98分钟、定量离子对为373.1/271.1、定性离子对为373.1/299.2的洗脱峰即为S-喹禾灵;

[0021] (3) 检测方法:配制R-喹禾灵和R-吡氟禾草灵的基质混合标准工作溶液,按照步骤(2)提供的色谱和质谱方法进行分离,并记录每种对映体对应的峰面积,以每种对映体的浓度值为自变量,以其对应的峰面积为因变量,得到R-喹禾灵和R-吡氟禾草灵的一元线性回归方程;

[0022] 将待测样品按照前述方法进行分离,并记录每种对映体对应的峰面积;将每种对映体对应的峰面积代入上述一元线性回归方程,即得到待测样品中各对映体的浓度。

[0023] 在本发明中,步骤(1)中的样品前处理过程具体如下:准确称取2 g研磨后的粉末样品于50 mL具盖离心管中,加入10mL水,泡发后加入10 mL乙腈,然后将离心管置于涡漩混合振荡仪上,以2000 rpm 速率振荡5 min。然后向离心管中加入5g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠和0.5 g 柠檬酸氢二钠至离心管中,立即于漩涡混合振荡仪上,以2000 rpm速率振荡5 min,然后以6000 rpm速率离心3 min;移取上清液1.0 mL于1.5 mL离心管中,并加入50 mg C18和50 mg中性氧化铝,于漩涡混合振荡仪上以2000 rpm速率振荡2 min,以6000 rpm 速率离心3 min。吸取上清液经0.45  $\mu$ m有机相滤膜过滤,用乙腈稀释2倍。

[0024] 步骤(2)中的质谱条件中,离子源为电喷雾离子源(ESI);扫描方式为正离子扫描;毛细管电压为2.6KV;离子源温度150℃;脱溶剂气温度350℃;脱溶剂气体流速800 L/h;锥孔气体流速50 L/h;补偿溶剂0.1%甲酸甲醇溶液,流速为0.2 mL/min;

[0025] 每种对映体的去簇电压和碰撞能量如下:

[0026] 吡氟禾草灵定量离子对和定性离子对的去簇电压均为38V,碰撞能量分别为22V和16V;

[0027] 喹禾灵定量离子对和定性离子对的去簇电压均为28V,碰撞能量分别为17V和18V。

[0028] 步骤(3)中的各种农药的一元线性回归方程如下:

[0029] R-吡氟禾草灵:  $y=323X+5767$ , 线性范围为25ng/mL-500ng/mL, 线性相关系数0.9992;

[0030] R-噻禾灵:  $y=579X+1590$ , 线性范围为25ng/mL-500ng/mL, 线性相关系数0.9995。

[0031] 步骤(3)中, 配制基质混合标准工作溶液的具体方法如下: 分别称取10 mg的R-吡氟禾草灵和R-噻禾灵标准品于10 mL容量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 配制成每种农药的单一标准储备液; 移取一定量各农药的单一标准储备液于100 mL容量瓶中, 用乙腈定容至刻度配得混合标准储备液; 分别移取混合标准储备液25 $\mu$ L, 50 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 250 $\mu$ L, 500 $\mu$ L及1000 $\mu$ L到6个10 mL容量瓶中, 用乙腈定容, 制得标准工作溶液; 然后分别移取上述标准工作溶液500 $\mu$ L与500 $\mu$ L的空白样品基质溶液混合, 配制成基质混合标准工作溶液。

[0032] 所述空白样品基质溶液的制备方法如下: 准确称取2 g研磨后的空白样品于50 mL具盖离心管中, 加入10mL水, 泡发后加入10 mL乙腈, 然后将离心管置于涡漩混合振荡仪上, 以2000 rpm速率振荡5 min。然后向离心管中加入5g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠和0.5 g柠檬酸氢二钠至离心管中, 立即于漩涡混合振荡仪上, 以2000 rpm速率振荡5 min, 然后以6000 rpm速率离心3 min; 移取上清液1.0 mL于1.5 mL离心管中, 并加入50 mg C18和50 mg中性氧化铝, 于漩涡混合振荡仪上以2000 rpm速率振荡2 min, 以6000 rpm速率离心3 min; 吸取上清液经0.45  $\mu$ m有机相滤膜过滤, 滤液备用。

[0033] 本发明首次采用合相色谱结合串联质谱实现了噻禾灵和吡氟禾草灵手性农药的分离分析。该方法采用多糖型手性固定相的色谱柱, 在合相色谱系统上拆分了上述手性农药对映体, 考察了不同的流动相组成、系统背压等对拆分的影响, 优化了分离条件。再对每个农药的质谱参数进行了优化, 建立了同步分离噻禾灵和吡氟禾草灵手性农药对映体的分析方法。最后用上述对映体拆分方法, 样品以乙腈为萃取溶剂提取后, 提取液经净化后进UPC<sup>2</sup>-MS/MS分析, 噻禾灵和吡氟禾草灵对映体获得了良好的分离及测定。该方法中噻禾灵和吡氟禾草灵的最低检测限分别为0.0018和0.0016 mg/kg。本发明采用超临界CO<sub>2</sub>为流动相, 节省了大量有机溶剂的使用, 绿色环保。本发明方法使用合相色谱分析速度快, 耗时仅仅5分钟, 灵敏度高, 手性异构体之间分离度好。

## 附图说明

[0034] 图1: 噻禾灵和吡氟禾草灵标准溶液的UPC<sup>2</sup>-MS/MS选择离子色谱图(该图作为摘要附图)。

## 具体实施方式

[0035] 本发明以下结合实例做进一步描述, 但并不是限制本发明。

[0036] 实例1:

[0037] 1. 仪器与试剂:

[0038] 乙腈、乙醇、甲醇均为色谱级试剂, 柠檬酸钠、氯化钠均为分析纯试剂; 蒸馏水, 符合GB/T 6682中一级水的要求。

[0039] Waters TQD四极杆串联质谱仪; 水浴恒温振荡器; 瑞士Mettler AE 163电子天平(感量:0.0001g)。

[0040] 2. 样品处理:

[0041] 准确称取2 g研磨后的烟草粉末样品于50 mL具盖离心管中,加入10mL水,泡发后加入10 mL乙腈,然后将离心管置于涡漩混合振荡仪上,以2000 rpm 速率振荡5 min。然后向离心管中加入5g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠和0.5 g柠檬酸氢二钠至离心管中,立即于漩涡混合振荡仪上,以2000 rpm速率振荡5 min,然后以6000 rpm速率离心3 min;移取上清液1.0 mL于1.5 mL离心管中,并加入50 mg C18和50 mg中性氧化铝,于漩涡混合振荡仪上以2000 rpm速率振荡2 min,以6000 rpm 速率离心3 min。吸取上清液经0.45 μm有机相滤膜过滤,用乙腈稀释2倍。进超高效合相色谱串联质谱(UPC<sup>2</sup>-MS/MS)检测;

[0042] 3.检测条件:合相色谱检测条件:色谱柱:规格150 mm×3.0 mm,2.5μm的 ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil CEL2柱 ;流动相:超临界CO<sub>2</sub>/乙醇,流速:2mL/min;梯度洗脱;柱温:40 °C;背压:1800 psi;进样量:2μL;

[0043] 梯度洗脱方式如下:初始至第2分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比由99%:1%变成92%:8%;第2分钟到第3.5分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从92%:8%变成88%:12%;第3.5分钟到第4分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从88%:12%变成70%:30%;第4分钟到第4.1分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比从77%:30%变成99%:1%;第4.1分钟到第5分钟CO<sub>2</sub>和乙醇的体积比为99%:1%;

[0044] 质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI);扫描方式为正离子扫描;毛细管电压为2.6KV;离子源温度150°C;脱溶剂气温度350°C;脱溶剂气体流速800 L/h;锥孔气体流速50 L/h;补偿溶剂0.1%甲酸甲醇溶液,流速为0.2 mL/min;吡氟禾草灵的定量离子对为384.1/282.1、定性离子对为384.1/328.1;啶禾灵的定量离子对为373.1/271.2、定性离子对为373.1/299.2;

[0045] 吡氟禾草灵定量离子对和定性离子对的去簇电压均为38V,碰撞能量分别为22V和16V;啶禾灵定量离子对和定性离子对的去簇电压均为28V,碰撞能量分别为17V和18V;

[0046] 4.测定方法:将已知浓度的R-啶禾灵和R-吡氟禾草灵手性农药对映体标准溶液混合,并用空白样品基质稀释2倍,按照前述提供的色谱和质谱方法进行分离,并记录每种对映体对应的峰面积,以每种对映体的浓度值为自变量,以其对应的峰面积为因变量,得到一元线性回归方程。

[0047] 将待测样品按照前述提供的方法进行分离,并记录每种对映体对应的峰面积;将每种对映体对应的峰面积代入一元线性回归方程,得到所述待测样品中R-吡氟禾草灵和S-吡氟禾草灵的含量分别为1.22 mg/kg 和0.34mg/kg。

[0048] 为判断方法的准确性,在此样品中加入1.0 μg的R-吡氟禾草灵标准溶液,进行同上的样品前处理,以UPC<sup>2</sup>-MS/MS测得分析物的选择离子峰面积,代入标准曲线,求得此时样品中的R-吡氟禾草灵含量为2.16 mg/kg,即目标物的加标回收率为97.3%,说明此方法是准确的。

[0049] 实例2:

[0050] 如实施例1所述,选择谷物样品,在样品中未检出吡氟禾草灵和啶禾灵。

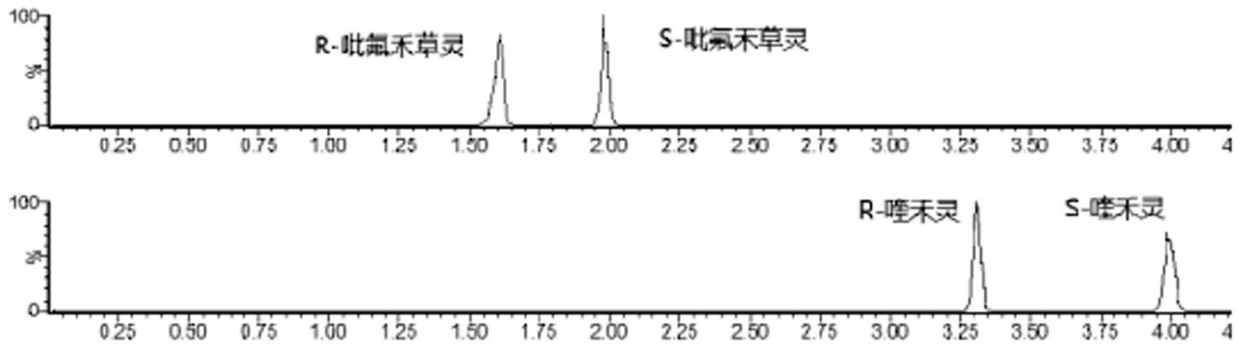


图1