



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103149313 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 03

(21) 申请号 201310046867. 6

(22) 申请日 2013. 02. 06

(73) 专利权人 中国烟草总公司四川省公司

地址 610031 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 杨雪

庞夙 张海燕 黄玫

(74) 专利代理机构 成都信博专利代理有限责任

公司 51200

代理人 舒启龙 卓仲阳

(51) Int. Cl.

G01N 30/88 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2011/0207604 A1, 2011. 08. 25, 全文.

CN 102854271 A, 2013. 01. 02, 权利要求 2.

美国环境保护署. Solvent Extractable

Nonvolatile Compounds by High Performance

Liquid Chromatography / Thermospray / Mass Spectrometry (HPLC/TS/MS) or Ultraviolet (UV) Detection. 《EPA 8321A 标准》. 1996, 1-49.

Urairat Koesukwivat 等. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry. 《analytica chimica acta》. 2008, (第 626 期), 10-20.

审查员 吕静

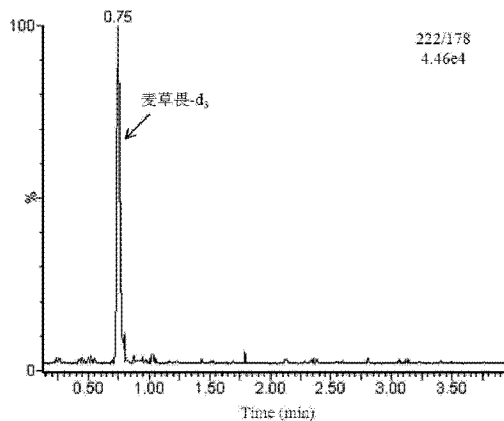
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种烟草中麦草畏残留量的测定方法

(57) 摘要

本发明公开一种测定烟草中麦草畏残留量的方法,该方法包括以下步骤: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和液相色谱-串联质谱测定。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前处理条件,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。与传统的气相色谱比较,采用基质分散固相萃取法来检测麦草畏。简化了前处理过程,提高了分析灵敏度。与 HPLC 方法相比,由于选取了超高效液相色谱柱 RP18,使得柱子的分离度明显提高,分析时间显著缩短。串联质谱的使用使得方法的选择性和灵敏度提高,更有利于低含量的除草剂残留的测定。



1. 一种测定烟草中麦草畏含量的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 提取烟草中的目标物

称取烘干磨好的烟叶样品,加入纯水浸润,依次加入氘代内标,乙腈和甲酸,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,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,于漩涡振荡混合,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

用乙腈配置麦草畏标准储备液,储存于棕色玻璃瓶中,-20℃保存;取一定量的储备液进行混合,用乙腈稀释定容,制得混合标准储备液;

用乙腈准确配置麦草畏-d₃ 氘带内标标准储备液,储存于棕色玻璃瓶中,-20℃保存;取一定量的内标储备液进行混合,用乙腈稀释定容,制得混合内标标准储备液;所有的储备液于冰箱-20℃,使用前将其恢复到室温;

用国际烟草科学研究合作中心空白烟叶的萃取基质配制不同浓度的麦草畏标准工作溶液;

4) 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定:吸取空白烟叶溶液和配制好的不同浓度的麦草畏标准工作溶液,注入 LC-MS/MS 系统,按内标法以峰面积计算出样品待测液中麦草畏含量;选取 70%流动相 A 和 30%流动相 B 作为初始流动相体系,分析时间为 4min,进样量为 10 μL,所述流动相 A 为体积分数 0.05%的甲酸水,所述流动相 B 为乙腈;梯度洗脱条件为:0~2min,70% A~10% A;2~3.5min,10% A~10% A;3.5~3.51min,10% A~70% A;3.51~4.00min,70% A~70% A;流动相流速为 0.7mL/min。

2. 根据权利要求 1 所述的测定烟草中麦草畏含量的方法,其特征在于,所述烟叶的重量为 2g。

3. 根据权利要求 2 所述的测定烟草中麦草畏含量的方法,其特征在于,步骤 1) 中所述冷冻时间为 10min,冷冻温度为 -18 至 -15℃。

4. 根据权利要求 3 所述的测定烟草中麦草畏含量的方法,其特征在于,步骤 1) 中提取过程依次加入的超纯水,氘代内标,乙腈和甲酸的体积分别为 10mL,20 μL,10mL 和 200 μL;涡漩振荡 1min;离心管在 -10℃ 条件下保持 10min;依次加入的无水硫酸镁,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;然后漩涡混合振荡的速率为 2000rpm,振荡时间为 2min,离心时间为 10min。

5. 根据权利要求 3 所述的测定烟草中麦草畏含量的方法,其特征在于,步骤 2) 中,加入无水硫酸镁及 PSA 吸附剂的质量为 150mg 和 25mg。

6. 根据权利要求 1 所述的测定烟草中麦草畏含量的方法,其特征在于,步骤 2) 中移取滤液体积为 200 μL,加入乙腈和超纯水的体积为 100 μL 和 700 μL。

7. 根据权利要求 1 所述的测定烟草中麦草畏含量的方法,其特征在于,步骤 4) 串联质谱检测器的条件:ESI-,喷雾电压:2.6kV,雾化气流量:800L/Hr;锥孔气(cone)流量 50L/Hr,离子化温度 350℃;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,负离子 MRM 模式采集。

一种烟草中麦草畏残留量的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及属于农药残留检验技术领域,具体涉及烟草中麦草畏残留量的测定方法。

背景技术

[0002] 麦草畏是第一类投入商业生产的选择性除草剂,广泛施用于禾谷类作物田、针叶树林和牧草场等。麦草畏都为低毒除草剂,通过植物叶面、茎秆和根系吸收传导,阻碍植物激素的正常传导,从而使其死亡。但在使用过程中,结果表明此类物质可以引起人类软组织恶性肿瘤,对动物体表现出胎盘毒性。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麦草畏的限量定为 0.20mg/kg。

[0003] 对于水、土壤、蔬果以及纺织品中麦草畏残留的检测已有相关报道,而对于烟草中麦草畏残留的检测报道较少。Häkkinen, V. 等利用在线的液相色谱-气相色谱联用法测定了烟草中的麦草畏,酯化后的烟草样品进入液相色谱分离,选取合适的保留时间段切入气相色谱再次分离,然后通过电子捕获检测器检测。刘惠民等研究开发了非水相毛细管电泳法测定烟草中的麦草畏,2,4-D 和 2,4,5-T 残留,其中麦草畏的检出限为 0.5 μ g/mL,烟草样品经乙酸乙酯超声萃取,凝胶渗透色谱净化后,进入毛细管电泳仪检测分析。宋娟梅等改进报道的毛细管电泳法,采用正交法设计实验,优化毛细管电泳法,并将优化好的方法应用于烟草中 2,4-D、2,4,5-T、麦草畏的测定。烟草行业也于 2004 年制定了相应的行业标准,其中麦草畏、2,4-D、2,4,5-T 选取盐酸水溶液萃取,旋转蒸发浓缩,三甲基氢氧化铯衍生化,GC-MS 分析,其前处理复杂费时,检测时间较长,不利于高通量样品的快速准确检测。非水毛细管电泳法的检出限较高,且分离度效果不如色谱方法。

[0004] 超高效液相色谱-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普通的 HPLC 方法,而目前未见该检测方法应用检测烟草中的麦草畏残留量。

发明内容

[0005] 鉴于此,本发明目的在于提供一种前处理简单、检测时间短,利于高通量样品的快速准确的麦草畏残留量的测定方法。

[0006] 为解决以上技术问题,本发明提供的技术方案是,提供一种测定烟草中麦草畏残留量的方法,该方法包括以下步骤:

[0007] 1) 提取烟草中的目标物

[0008] 称取烘干磨好的烟叶样品,加入纯水浸润,依次加入氘代内标,乙腈和甲酸,涡流混合振荡。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,涡旋振荡后离心。

[0009] 2) N-丙基乙二胺 (PSA) 纯化

[0010] 移取上清液于新的离心管中,加入无水硫酸镁及 PSA 吸附剂,于漩涡振荡混合,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。

[0011] 3) 标准储备液和标准工作液的配制

[0012] 用乙腈配置麦草畏标准储备液,储存于棕色玻璃瓶中, -20°C 保存。取一定量的储备液进行混合,用乙腈稀释定容,制得混合标准储备液 (10g/mL)。

[0013] 用乙腈准确配置麦草畏 $-d_3$ 氘带内标标准储备液,储存于棕色玻璃瓶中, -20°C 保存。取一定量的内标储备液进行混合,用乙腈稀释定容,制得混合内标标准储备液 (10g/mL)。所有的储备液于冰箱 -20°C ,使用前将其恢复到室温。

[0014] 用国际烟草科学研究合作中心 (CORESTA) 空白烟叶的萃取基质配制不同浓度的麦草畏标准工作溶液;

[0015] 4) 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 测定:吸取空白烟叶溶液和配制好的不同浓度的麦草畏标准工作溶液,注入 LC-MS/MS 系统,按内标法以峰面积计算出样品待测液中麦草畏含量。

[0016] 优选地,所述烟叶的重量为 2g。

[0017] 优选地,步骤 1) 中所述冷冻时间为 10min,冷冻温度为 -18 至 -15°C 。

[0018] 优选地,步骤 1) 中提取过程依次加入的超纯水,氘代内标 (10g/mL),乙腈和甲酸 (49-51%) 的体积分别为 10mL, $20\ \mu\text{L}$, 10mL 和 $200\ \mu\text{L}$ 。涡旋振荡 (2000rpm) 1min。离心管在 -10°C 条件下保持 10min。依次加入的无水硫酸镁,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。然后漩涡混合振荡的速率为 2000rpm,振荡时间为 2min,离心 (4000rpm) 时间为 10min。

[0019] 优选地,步骤 2) 中,加入无水硫酸镁及 PSA 吸附剂的质量为 150mg 和 25mg。

[0020] 优选地,所述步骤 (2) 中移取滤液体积为 $200\ \mu\text{L}$,加入乙腈和超纯水的体积为 $100\ \mu\text{L}$ 和 $700\ \mu\text{L}$ 。

[0021] 优选地,步骤 4) 中选取 70% 甲酸水 (体积分数 0.05%) 和 30% 乙腈初始流动相体系,分析时间为 4min,进样量为 $10\ \mu\text{L}$ 。

[0022] 优选地,步骤 4) 中梯度洗脱条件为梯度洗脱条件: $0\sim 2\text{min}, 70\% \text{A}\sim 10\% \text{A}$; $2\sim 3.5\text{min}, 10\% \text{A}\sim 10\% \text{A}$; $3.5\sim 3.51\text{min}, 10\% \text{A}\sim 70\% \text{A}$; $3.51\sim 4.00\text{min}, 70\% \text{A}\sim 70\% \text{A}$; 流动相流速为 $0.7\text{mL}/\text{min}$ 。

[0023] 优选地,步骤 4) 串联质谱检测器的条件:ESI-,喷雾电压 (IS): 2.6kV ,雾化气流量: $800\text{L}/\text{Hr}$;锥孔气 (cone) 流量 $50\text{L}/\text{Hr}$,离子化温度 350°C ;碰撞气流量为 $0.15\text{ml}/\text{min}$;碰撞气为氩气,其余气体为氮气;驻留时间为 30msec,负离子 MRM 模式采集。

[0024] 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前处理条件,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。与现有技术相比本发明方法具有如下优良效果:

[0025] 选取了基质分散固相萃取方式来处理样品,简化了前处理过程。

[0026] 在乙腈萃取过程中加入乙酸,有助于提高麦草畏这类苯氧羧酸类化合物的萃取效率。

[0027] 在加入硫酸镁和氯化钠之前,放入冰箱冷冻一段时间,可以防止其加入后过热结块。

[0028] 与传统的气相色谱比较,采用基质分散固相萃取法来检测麦草畏。简化了前处理

过程,提高了分析灵敏度。

[0029] 与 HPLC 方法相比,由于选取了超高效液相色谱柱 RP18 (50mm×2.1mm, 1.7μm),使得柱子的分离度明显提高,分析时间显著缩短。串联质谱的使用使得方法的选择性和灵敏度提高,更有利于低含量的除草剂残留的测定。

[0030] 选取了氘代麦草畏对麦草畏进行定量,有效消除基质干扰和前处理过程中引起的误差,使得方法的准确性更高。

[0031] 选取了两个离子对,定量离子对定量,定性离子对确认,可以提高方法的准确度。

[0032] 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

[0033] 图 1 是麦草畏的子离子质谱图。

[0034] 图 2 是麦草畏 -d₃ 的子离子质谱图。

[0035] 图 3 是加标样品的选择离子流色谱图 (50ng/mL, 定量离子对)。

[0036] 图 4 是加标样品的选择离子流色谱图 (50ng/mL, 定性离子对)。

[0037] 图 5 是麦草畏 -d₃ 的选择离子流色谱图 (IS20ng/mL)。

具体实施方式

[0038] 下面结合附图与具体实施例进行说明。参见图 1 至图 5。

[0039] 1. 仪器与试剂

[0040] 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);VtexMixer230VeU 振荡器(美国 Labnet 公司);Sigma3K15 离心机(德国 Sigma 公司)。

[0041] 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);麦草畏标准品来自于 Labor Dr. Ehrenstorfer-Schafers(化学纯度:98.5%,Augsburg,德国),内标麦草畏 -d₃ 来自于 Labor Dr. Ehrenstorfer-Schafers(化学纯度:99%,同位素纯度:98.5%,Augsburg,德国)。N-丙基乙二胺 (PSA) 吸附剂、末尾封端碳 18 (C18E) 吸附剂,水为超纯水。

[0042] 2. 提取烟草中的分析物

[0043] 准确称取 2g 样品(精确至 0.01g)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 10mL 乙腈至离心管中,加入 200 μL 甲酸,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 0℃ 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,立即于涡漩混合振荡仪上,以 2000rpm 速率振荡 2min,然后以 4000rpm 速率离心 10min。

[0044] 3. PSA 纯化

[0045] 移取上清液 1.0mL 于 1.5mL 离心管中,加入 150mg 无水硫酸镁及 25mg PSA 吸附剂,于涡漩混合振荡仪上以 2000rpm 速率振荡 2min,以 6000rpm 速率离心 2min。吸取上清液经 0.22m 有机相滤膜过滤,移取 200 μL,用超纯水稀释至 1.0mL,待测。

[0046] 4 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 测定

[0047] (1)LC-MS/MS 条件:

[0048] 色谱条件:Atiantis UPLC BEH Shield RP18(50mm×2.1mm,1.7um,美国 Waters 公司);流动相 A:0.05%甲酸水溶液(体积分数),流动相 B:乙腈;流速 0.7mL/min;柱温 45℃;进样量 10 μL。梯度洗脱条件:0~2min,70% A~10% A;2~3.5min,10% A~10% A;3.5~3.51min,10% A~70% A;3.51~4.00min,70% A~70% A。

[0049] 质谱条件:电喷雾离子源,喷雾电压(IS):2.6kV,雾化气流量:800L/Hr;锥孔气(cone)流量 50L/Hr,离子化温度 350℃;碰撞气流量为 0.15ml/min;碰撞气为氦气,其余气体为氮气;驻留时间为 30msec,负离子 MRM 模式采集,监测离子对及其相应的碰撞能量(CE)见表 1。

[0050] 表 1 多反应监测模式下麦草畏及其氘代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)
[0051]	麦草畏	219.0/174.9*	-22	-14
		221.0/176.9	-19	-7
	麦草畏-d ₃	222.1/178.0	-21	-7

[0052] *quantification ion pairs.

[0053] (2) 标准储备液的配制

[0054] 储备液及工作液的配制:用乙腈准确配置麦草畏(1.00mg/mL)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,制得标准储备液(10g/mL)。

[0055] 用乙腈准确配置麦草畏-d₃(0.67mg/mL)氘带内标标准储备液,储存于棕色玻璃瓶中,-20℃保存。取一定量的各内标储备液进行混合,用乙腈稀释定容,制得混合内标标准储备液(10g/mL)。所有的储备液于冰箱-20℃,使用前将其恢复到室温。

[0056] (3) 麦草畏含量的测定

[0057] 吸取配制好的不同浓度的麦草畏的混合标准工作溶液各 10 μL,注入 LC-MS/MS;麦草畏的线性回归方程分别为 $y = 0.00798x + 0.248518$,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,求得实际样本中麦草畏的含量。

[0058] (4) 该方法的线性范围和检出限

[0059] 分别移取混合标准储备液 0 μL,10 μL,20 μL,50 μL,100 μL 1g/mL 混合标液和 20 μL,50 μL 及 100 μL 10g/mL 混合标液到 8 个 10mL 容量瓶中,每个容量瓶移入 20μL 混合氘代内标工作液(1g/mL),加入 200 μL 空白烟叶样品萃取液,用纯水定容至 1mL。各标准工作溶液的浓度分别为 0ng/mL,1ng/mL,2ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,50ng/mL,100ng/mL。分别对这些标准溶液进行 LC-MS/MS 分析,并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 5。结果表明,麦草畏线性关系良好(相关系数 $r > 0.998$),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。混合标准品及加标样品的总离子流色谱图见图 4。

[0060] 表 2 麦草畏的线性范围、相关系数、检测限及保留时间

[0061]

化合物	定量内标	线性范围 (ng · g ⁻¹)	回归曲线	相关系 (r ²)	检出限 (ng · g ⁻¹)	定量限 (ng · g ⁻¹)
麦草畏	麦草畏-d ₃	5-500	y=0.00798x +0.248518	0.9991	0.117	0.390

[0062] (5) 本发明方法的重复性和加标回收率：

[0063] 在空白的烤烟样品中添加一定量的麦草畏标准溶液，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 93.1%~100.6%。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，麦草畏回收率的 RSD 范围为 4.6%~10.3%，结果见表 3。

[0064] 表 3 烟草中麦草畏的回收率和精密度 (n = 5)

[0065]	化合物	加标浓度	计算浓度	回收率	RSD
		ng	ng	N=5	N=6
				(%)	(%)
[0066]	麦草畏	20	18.62	93.1	10.3
		100	94.9	94.9	8.3
		400	402.34	100.6	4.6

[0067] 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。

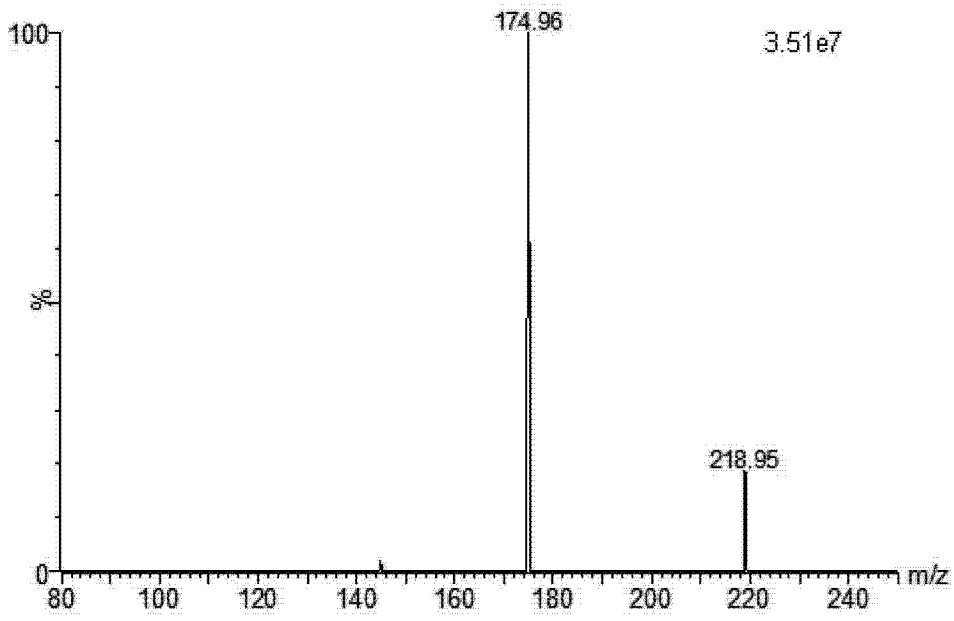


图 1

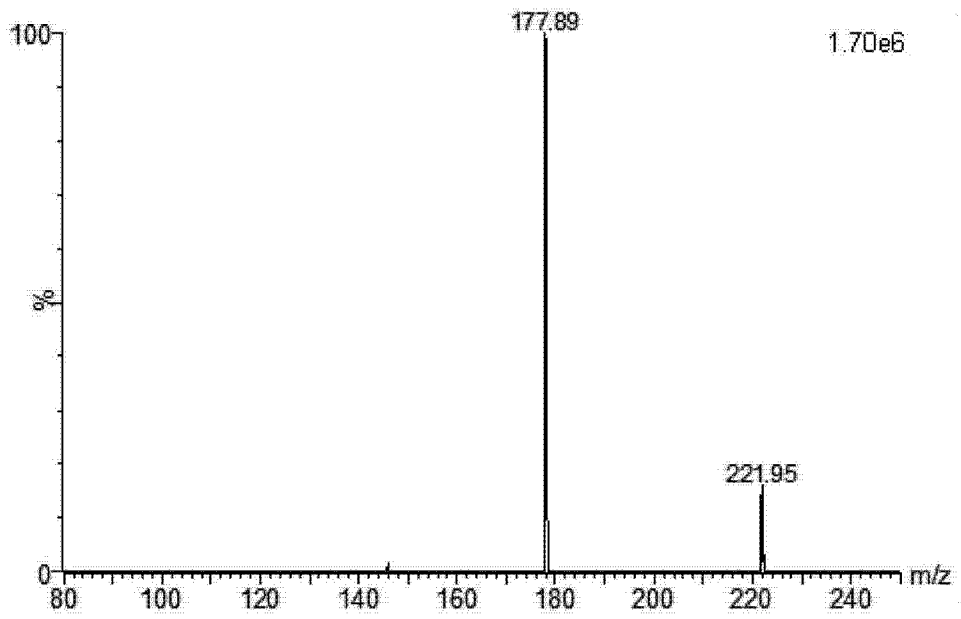


图 2

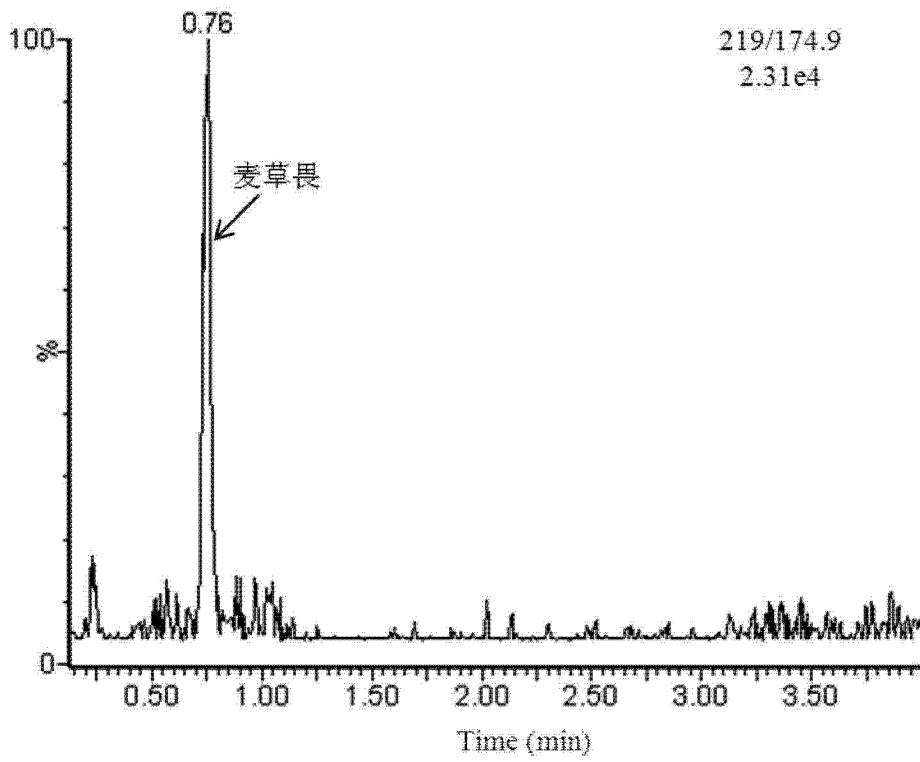


图 3

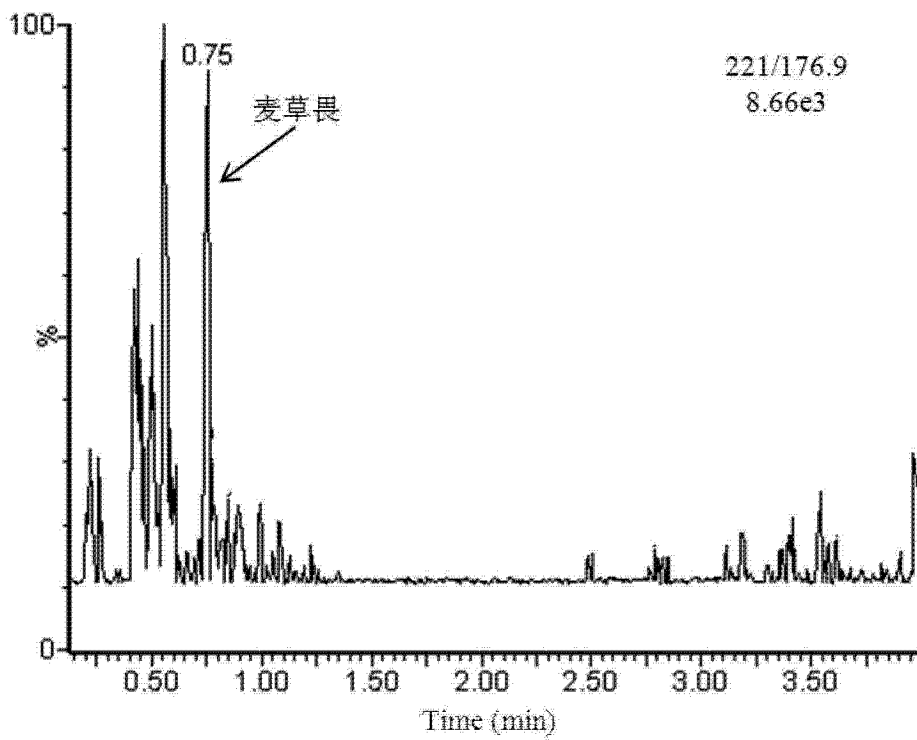


图 4

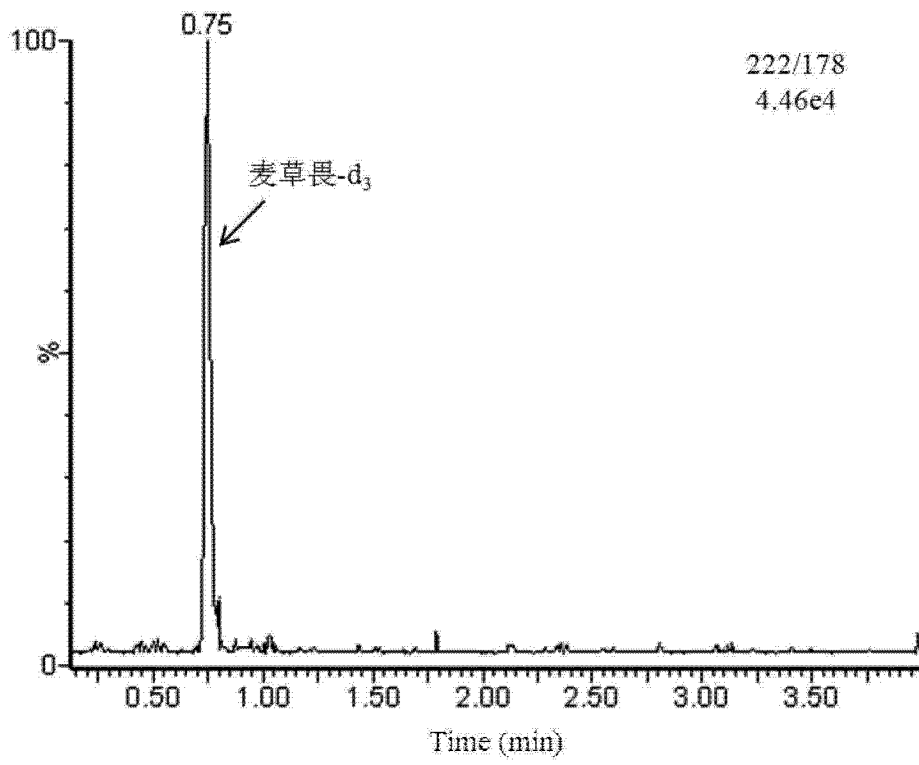


图 5