



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108562673 A

(43)申请公布日 2018.09.21

(21)申请号 201810785746.6

(22)申请日 2018.07.17

(71)申请人 中国热带农业科学院农产品加工研究所

地址 524000 广东省湛江市霞山区人民大道南48号

(72)发明人 查玉兵 杨春亮 叶剑芝 林玲

(74)专利代理机构 广州市南锋专利事务所有限公司 44228

代理人 李慧

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种测定番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,属于农药残留检测技术领域;本发明将样品经乙腈涡旋震荡提取后,用PSA、C18、GCB、无水硫酸镁等净化,净化液过滤膜后经超高效液相色谱分离,串联质谱进行检测,外标法定量;本方法采用的试剂较少,节约成本;样品前处理方法简单,净化效果好,解决了基质干扰较严重的技术问题;采用液相串联质谱检测,具有检测灵敏度高、准确度高、重复性好,检测的特异性高等优点,为蔬菜、水果中宁南霉素含量的检测提供了参考。

1. 一种番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 准备标准工作溶液:称取0.005~0.02g宁南霉素标准品于100mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,然后用甲醇稀释并最终配制5个具有浓度梯度的标准工作溶液;

(2) 提取样品:称取2.00~5.00g番茄样品加入50mL具塞离心管中,加入4~7g NaCl, 20~25mL 0.1% 乙酸乙腈涡旋震荡提取2~3min后,于高速离心机中以5000~7000 r/min的速度离心8~10min;

(3) 净化样品:在50mL离心管中分别加入100~400mg PSA, 100~300mg C18, 50~100mg GCB, 30~70mg无水硫酸镁,取出上10 mL清液到该离心管中,振荡涡旋2~5min, 5000~8000 r/min的速度离心3~5 min,取出2~4mL上清液于30~50℃下氮气吹干,加2~4mL初始流动相定容,通过0.2μm滤膜过滤,得到待检测宁南霉素含量的样品溶液;

(4) 基质标准工作溶液:对空白番茄样品按上述步骤(2)和步骤(3)的前处理方式提取和净化后,于氮气吹干后的待净化液中加入2mL步骤(1)制备的梯度浓度的宁南霉素标准工作溶液定容,得到系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液;

(5) 将步骤(4)制备的系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液和步骤(3)制备的待检测宁南霉素含量的样品溶液注入液相色谱仪,经串联质谱仪检测后得到番茄样品中宁南霉素的含量。

2. 如权利要求1所述的一种番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,其特征在于,采用的超高效液相色谱仪器参数条件为:

色谱柱:UPLC ACQUITY BEH, 50×2.1 mm, 1.7 μm;流动相:乙腈/ 0.1甲酸水溶液;梯度洗脱程序为:0~1min, 90%A; 1~2.2 min, 90%乙腈-50%乙腈; 2.2~3min, 50%-90%乙腈; 3~4min, 90%乙腈保持1min, 流速:0.3 mL/min;柱温:40 ℃;进样量:10μL。

3. 如权利要求1所述的一种番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,其特征在于,采用的质谱参数条件为:

离子源:ESI, 正离子模式;毛细管电压:4.0 kv ;离子源温度:110 ℃;脱溶剂气温度350 ℃;脱溶剂气流量:800 L/ hr;锥孔反吹气流量50 L/ hr;锥孔电压:30 v;扫描方式:多反应监测MRM, 离子对:441.3/164.9, 441.3/227。

一种测定番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种宁南霉素含量的检测方法,具体涉及一种测定番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,属于农药残留检测技术领域。

背景技术

[0002] 宁南霉素为胞嘧啶核苷肽型抗菌素,是由诺尔斯链霉菌西昌变种发酵产生的一种抗生素农药,商品名为菌克毒克,其分子量为444[质谱法],分子式为C₁₆H₂₅N₇O₈。宁南霉素属低毒抗菌素类杀菌剂,对大、小鼠急性经口LD₅₀为5492~6845毫克/千克,小鼠急性经皮LD₅₀>1000毫克/千克,无致癌、致畸、致突变作用,无蓄积作用。该抗生素是一种低毒、低残留、无“三致”和蓄积问题,不污染环境等特点而广泛使用,有一定的防病和增产效果,是一种蔬菜常用杀菌剂。

[0003] 宁南霉素对防治番茄苗期茎基腐病、番茄枯萎病、病毒病效果好,有良好的防治效果。所以在番茄的种植过程中,经常会喷涂该农药。随着人们生活水平和食品安全意识的不断提高,对农药残留的检测也越来越重视。

[0004] 王芳等公开了用液相色谱测定宁南霉素含量的检测方法和条件。但是液相色谱测定存在干扰多,灵敏度不够高等缺陷。

测定番茄中的宁南霉素,首先要考虑的是怎么从番茄中提取宁南霉素,提取既要考虑选择性,又要考虑灵敏性。近来,QuEChERS(快速,简易,净化,高效,安全)前处理方法在2003年已经被广泛应用到农药残留分析方法中,特别是蔬菜,水果、牛奶和水等的复杂基质中。QuEChERS方法用乙腈提取,用固相分散剂净化(乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)是常用的固相分散剂),主要用来除去极性有机酸、极性颜料、糖类和脂肪酸;然后才是宁南霉素检测方法和条件的选择。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术中的不足,本发明提供一种测定番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,采用的试剂较少,节约成本;样品前处理方法简单,净化效果好,解决了基质干扰较严重的技术问题;采用串联质谱检测,大大提高检测方法的灵敏度。

[0006] 为实现上述发明的目的,本发明采取的技术方案如下:

一种番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,包括以下步骤:

(1) 准备标准工作溶液:称取0.005~0.02g宁南霉素标准品于100mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,然后用甲醇稀释并最终配制5个具有浓度梯度的标准工作溶液;

(2) 提取样品:称取2.00~5.00g番茄样品加入50mL具塞离心管中,加入4-7g NaCl,20~25mL 0.1% 乙酸乙腈涡旋震荡提取2~3min后,于高速离心机中以5000~7000 r/min的速度离心8~10min;

(3) 净化样品:在50mL离心管中分别加入100-400mg PSA, 100-300mg C18, 50-100mg

GCB, 30-70mg无水硫酸镁, 取出上10 mL清液到该离心管中, 振荡涡旋2~5min, 5000~8000 r/min的速度离心3~5 min, 取出2~4mL上清液于30-50℃下氮气吹干, 加2-4mL初始流动相定容, 通过0.2 μ m滤膜过滤, 得到待检测宁南霉素含量的样品溶液;

(4) 基质标准工作溶液: 对空白番茄样品按上述步骤(2)和步骤(3)的前处理方式提取和净化后, 于氮气吹干后的待净化液中加入2mL步骤(1)制备的梯度浓度的宁南霉素标准工作溶液定容, 得到系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液;

(5) 将步骤(4)制备的系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液和步骤(3)制备的待检测宁南霉素含量的样品溶液注入液相色谱仪, 经串联质谱仪检测后得到番茄样品中宁南霉素的含量。

[0007] 所述的超高效液相色谱仪器参数条件为:

色谱柱: UPLC ACQUITY BEH, 50 \times 2.1 mm, 1.7 μ m; 流动相: 乙腈(A)/0.1甲酸水溶液(V:V); 梯度洗脱程序为: 0~1min, 90%A; 1~2.2 min, 90%A-50%A; 2.2~3min, 50%-90%A; 3~4min, 90%A保持1min, 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L;

所述的质谱参数条件为:

离子源: ESI, 正离子模式; 毛细管电压: 4.0 kv; 离子源温度: 110 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度 350 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气流量: 800 L/hr; 锥孔反吹气流量 50 L/hr; 锥孔电压: 30 v; 扫描方式: 多反应监测(MRM); 离子对: 441.3/164.9, 441.3/227。

[0008] 本发明的有益效果是:

本发明采用的试剂较少, 节约成本; 样品前处理方法简单, 净化效果好, 解决了基质干扰较严重的技术问题; 采用串联质谱检测, 大大提高了检测方法的灵敏度, 同时本方法具有准确度高、重复性好, 检测的特异性高等优点, 为蔬菜、水果中宁南霉素含量的检测提供了参考。

具体实施方式

[0009] 下面通过实例对本发明做进一步详细说明, 这些实例仅用来说明本发明, 并不限制本发明的范围。

[0010] 实施例1

一种番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法, 包括以下步骤:

(1) 准备标准工作溶液: 称取0.005g宁南霉素标准品于100mL容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 然后用甲醇稀释并最终配制5个具有浓度梯度的标准工作溶液;

(2) 提取样品: 称取2.00g番茄样品加入50mL具塞离心管中, 加入4g NaCl, 20mL 0.1%乙酸乙腈涡旋震荡提取2min后, 于高速离心机中以5000 r/min的速度离心8min;

(3) 净化样品: 在50mL离心管中分别加入100-400mg PSA, 100-300mg C18, 50-100mg GCB, 30-70mg无水硫酸镁, 取出上10 mL清液到该离心管中, 振荡涡旋2min, 5000r/min的速度离心3min, 取出2mL上清液于30 $^{\circ}$ C下氮气吹干, 加2mL初始流动相定容, 通过0.2 μ m滤膜过滤, 得到待检测宁南霉素含量的样品溶液;

(4) 基质标准工作溶液: 对空白番茄样品按上述步骤(2)和步骤(3)的前处理方式提取和净化后, 于氮气吹干后的待净化液中加入2mL步骤(1)制备的梯度浓度的宁南霉素标准工作溶液定容, 得到系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液;

(5) 将步骤(4)制备的系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液和步骤(3)制备的待检测宁南霉素含量的样品溶液注入液相色谱仪,经串联质谱仪检测后得到番茄样品中宁南霉素的含量。

[0011] 所述的超高效液相色谱仪器参数条件为:

色谱柱:UPLC ACQUITY BEH,50×2.1 mm,1.7 μm;流动相:乙腈(A)/0.1甲酸水溶液(V:V);梯度洗脱程序为:0~1min,90%A;1~2.2 min,90%A-50%A;2.2~3min,50%-90%A;3~4min,90%A保持1min。流速:0.3 mL/min;柱温:40 °C;进样量:10μL;

所述的质谱参数条件为:

离子源:ESI,正离子模式;毛细管电压:4.0 kv;离子源温度:110 °C;脱溶剂气温度350 °C;脱溶剂气流量:800 L/hr;锥孔反吹气流量50 L/hr;锥孔电压:30 v;扫描方式:多反应监测(MRM);离子对:441.3/164.9,441.3/227。

[0012] 实施例2

一种番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,包括以下步骤:

(1) 准备标准工作溶液:称取0.0125g宁南霉素标准品于100mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,然后用甲醇稀释并最终配制5个具有浓度梯度的标准工作溶液;

(2) 提取样品:称取3.5番茄样品加入50mL具塞离心管中,加入5.5g NaCl,22.5mL 0.1%乙酸乙腈涡旋震荡提2.5min后,于高速离心机中以6000 r/min的速度离心9min;

(3) 净化样品:在50mL离心管中分别加入100-400mg PSA, 100-300mg C18, 50-100mg GCB,30-70mg无水硫酸镁,取出上10 mL清液到该离心管中,振荡涡旋3.5min,6500r/min的速度离心4 min,取出3mL上清液于40 °C下氮气吹干,加3mL初始流动相定容,通过0.2μm滤膜过滤,得到待检测宁南霉素含量的样品溶液;

(4) 基质标准工作溶液:对空白番茄样品按上述步骤(2)和步骤(3)的前处理方式提取和净化后,于氮气吹干后的待净化液中加入2mL步骤(1)制备的梯度浓度的宁南霉素标准工作溶液定容,得到系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液;

(5) 将步骤(4)制备的系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液和步骤(3)制备的待检测宁南霉素含量的样品溶液注入液相色谱仪,经串联质谱仪检测后得到番茄样品中宁南霉素的含量。

[0013] 所述的超高效液相色谱仪器参数条件为:

色谱柱:UPLC ACQUITY BEH,50×2.1 mm,1.7 μm;流动相:乙腈(A)/0.1甲酸水溶液(V:V);梯度洗脱程序为:0~1min,90%A;1~2.2 min,90%A-50%A;2.2~3min,50%-90%A;3~4min,90%A保持1min。流速:0.3 mL/min;柱温:40 °C;进样量:10μL;

所述的质谱参数条件为:

离子源:ESI,正离子模式;毛细管电压:4.0 kv;离子源温度:110 °C;脱溶剂气温度350 °C;脱溶剂气流量:800 L/hr;锥孔反吹气流量50 L/hr;锥孔电压:30 v;扫描方式:多反应监测(MRM);离子对:441.3/164.9,441.3/227。

[0014] 实施例3

一种番茄中宁南霉素含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法,包括以下步骤:

(1) 准备标准工作溶液:称取0.02g宁南霉素标准品于100mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,然后用甲醇稀释并最终配制5个具有浓度梯度的标准工作溶液;

(2) 提取样品:称取5.00g番茄样品加入50mL具塞离心管中,加入4-7g NaCl, 25mL 0.1% 乙酸乙腈涡旋震荡提取3min后,于高速离心机中以7000 r/min的速度离心8~10min;

(3) 净化样品:在50mL离心管中分别加入100-400mg PSA, 100-300mg C18, 50-100mg GCB, 30-70mg无水硫酸镁,取出上10 mL清液到该离心管中,振荡涡旋5min, 8000 r/min的速度离心5 min,取出4mL上清液于50℃下氮气吹干,加4mL初始流动相定容,通过0.2μm滤膜过滤,得到待检测宁南霉素含量的样品溶液;

(4) 基质标准工作溶液:对空白番茄样品按上述步骤(2)和步骤(3)的前处理方式提取和净化后,于氮气吹干后的待净化液中加入2mL步骤(1)制备的梯度浓度的宁南霉素标准工作溶液定容,得到系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液;

(5) 将步骤(4)制备的系列浓度的宁南霉素的基质标准工作溶液和步骤(3)制备的待检测宁南霉素含量的样品溶液注入液相色谱仪,经串联质谱仪检测后得到番茄样品中宁南霉素的含量。

[0015] 所述的超高效液相色谱仪器参数条件为:

色谱柱:UPLC ACQUITY BEH, 50×2.1 mm, 1.7 μm;流动相:乙腈(A)/ 0.1甲酸水溶液(V:V);梯度洗脱程序为:0~1min, 90%A; 1~2.2 min, 90%A-50%A; 2.2~3min, 50%-90%A; 3~4min, 90%A保持1min。流速:0.3 mL/min;柱温:40℃;进样量:10μL;

所述的质谱参数条件为:

离子源:ESI, 正离子模式;毛细管电压:4.0 kv;离子源温度:110℃;脱溶剂气温度350℃;脱溶剂气流量:800 L/hr;锥孔反吹气流量50 L/hr;锥孔电压:30 v;扫描方式:多反应监测(MRM);离子对:441.3/164.9, 441.3/227。

[0016] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围,其均应涵盖在本发明的权利要求和说明书的范围当中。