

《烟草及烟草制品 抑芽丹农药残留量的测定液相色谱串联质谱法》

技术报告

《烟草及烟草制品 抑芽丹农药残留量的测定 液相色谱串联质谱法》

技术报告

1.引言

1.1 项目的提出

抑芽丹，也叫马来酰肼或青鲜素，化学名称为 1,2-二氢-3,6-吡嗪二酮，英文名称 maleic hydrazide，《GB 4839-2009 农药中文通用名称》中规定其中文通用名称为抑芽丹^[1]，其结构式如图 1 所示。抑芽丹纯品为白色结晶，熔点 296~298℃，在水中的溶解度为 0.2%（25℃），可溶于二甲基甲酰胺，微溶于乙醇。其钠、钾、铵盐及有机碱盐类易溶于水。性质稳定，对酸，碱性水溶液稳定。

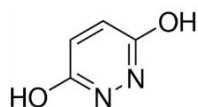


图 1-1 抑芽丹结构式

抑芽丹是一种植物生长调节剂和选择性除草剂，是内吸性药剂，可通过叶面角质层进入植株，降低光合作用、渗透压和蒸发作用，能强烈的抑制芽的生长。用于防止马铃薯块茎、洋葱、大蒜、萝卜等贮藏期间的抽芽，并有抑制作物生长延长开花的作用。

在烟草生产中，抑芽丹一般用于烟草的化学摘心，抑制腋芽生长，在国内外应用比较广泛。在 20 世纪 50 年代时，抑芽丹即在烟草中广泛施用，登记允许使用抑芽丹的国家包括美国、阿根廷、巴西、中国、多米尼加共和国、欧洲、马来西亚和南非^[2]。其中，在美国的使用最为普遍，据美国环保署（US EPA）的统计，美国每年使用的抑芽丹有约 88% 使用于烟草生产中。US EPA 将抑芽丹归为人类非致癌性物质（Group E），国际癌症研究机构（IARC）将其归为 Group 3 类致癌物，即其对人类的致癌性尚未得到官方证实^[3]。在国际烟草科学研究合作中心（CORESTA）制定的指导性残留限量（GRLs）和中国烟草总公司企业标准《YQ 50—2014 烟叶农药最大残留限量》中，对抑芽丹在烟草中的最大残留限量均定为 80 mg/kg。

一般农药在作物上，常以游离态存在，以有机溶剂即可实现有效萃取，而抑

芽丹被喷施于作物后，其中一部分与作物体内的单糖结合生成 β -D-葡萄糖苷，另一部分仍然呈游离态，所以，抑芽丹不能与其他农药同时检测，必须以单独方法进行检测。

烟草中抑芽丹检测的国际方法为 ISO 4876-1980 《Tobacco and tobacco products-Determination of Maleic Hydrazide Residues》^[4]，被转化为我国的国标方法 GB/T 19611-2004^[5]。30 多年来，该方法一直被国内外相关检测机构所使用，但是该方法操作繁琐、涉及的试剂种类繁多、消耗量大，且浓碱、高温提取的前处理条件对玻璃仪器的腐蚀性大。我国烟草行业现行的检测标准方法为《YC/T 405.5-2011 烟草及烟草制品 多种农药残留量的测定 第 5 部分：马来酰肼残留量的测定 高效液相色谱法》^[6]，与 ISO 方法相比，该方法简化了样品前处理，但以高效液相色谱法（配紫外检测器）检测时可能会存在干扰，影响抑芽丹目标物的准确性及定量。

基于以上背景，本项目组提出了以灵敏度更高和抗干扰能力更好的液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）代替液相色谱法（HPLC），对原 YC/T 405.5-2011 方法进行修订，以提高检测结果的可靠性，实现对烟草中抑芽丹残留量的准确性和定量检测。

1.2 国内外研究现状及发展趋势

目前国内外抑芽丹的检测方法主要包括液相色谱法^[7-11]、电化学法^[12,13]、毛细管电泳法^[14]、紫外分光光度法^[15]、免疫分析法^[16]等，样品基质类型主要涉及土豆、洋葱、大蒜及食品等。由于样品基质类型不同，由基质带来的干扰情况也会有很大的不同。

根据烟草及烟草制品的特点，对于烟草中抑芽丹残留量的针对性检测方法主要包括蒸馏-分光光度法^[4,5]、气相色谱法^[17-19]、高效液相色谱法^[20]、液相色谱串联质谱法^[21,22]等。

GB/T 19611-2004 采用的是蒸馏-分光光度法，此方法由 ISO 4876:1980 方法转化而来，其原理是将样品在 50%的氢氧化钠溶液中煮沸除去挥发性碱性化合物，加入锌粒，由新生态氢将抑芽丹还原成丁二酸酞肼，并随后水解，蒸馏释放出联氨，分光光度法测定其与 4-二甲基氨基苯甲醛形成的黄色化合物。几十年来，该方法一直在使用，但操作繁琐，涉及的试剂种类繁多、消耗量大，且浓碱、高

温提取的前处理条件对玻璃仪器的腐蚀性大，对操作人员的要求也较高。

关于烟草中抑芽丹的气相色谱检测法的报道均采用衍生化法，通过抑芽丹与 4-氯氯苄^[17]、N,O-双(三甲基硅基)乙酰胺^[18]、硫酸二甲酯^[19]等衍生化试剂反应，最终以配备电子捕获检测器 (ECD)、氢火焰离子检测器 (FID)、或氮磷检测器 (NPD) 的气相色谱仪进行定性定量分析检测。在这些方法中，衍生化效率是影响测定准确性和稳定性的主要因素，因此对操作条件要求较为严格。

YC/T 405.5-2011 是以盐酸为提取液，加热回流萃取烟叶中的抑芽丹，经 C₁₈ 固相萃取小柱净化后以液相色谱进行分析，以 UV 检测器进行检测。该方法对抑芽丹的提取效率高，但因烟草基质较为复杂，HPLC 的抗干扰能力较差，故方法的检测限较高，对低含量样品有时存在定性定量不够准确的情况。

随着检测仪器的发展，串联质谱 (MS/MS) 技术的应用愈发广泛，在提高检测灵敏度、选择性，以及简化样品前处理方面有着重要优势，其优势有：
1. MS/MS 综合使用了保留时间、母离子、子离子和实验参数的条件，为目标物的鉴定提供了高水平的选择性；2. MS/MS 在对离子检测前就排除了样品基质中的干扰组分，因而即使对基体复杂的样品也可以达到较高的灵敏度。LC-MS/MS 具有比 HPLC 更高的灵敏度和选择性，对于复杂烟草基质的抗干扰能力大大提高，可增强检测结果的可靠性，也可使样品前处理过程简化，实现对烟草抑芽丹残留量的定性和定量准确检测。

内标法是色谱分析中一种比较准确的定量方法，在样品处理前期加入内标可有效地校正样品萃取过程以及在质谱离子源中离子化等过程中目标物的损失。同位素内标与目标化合物性质相近，因此能很好地反应样品前处理以及检测中目标物的损失，故同位素内标也是内标法中最常使用的内标。其中，因其易得、成本低的优势，氘代同位素内标是使用最为广泛的同位素内标。

廖雅桦^[21]等人用乙酸乙酯和环己烷的混合溶剂超声提取烟草中的包括抑芽丹在内的 3 种抑芽剂残留，以氘代氧乐果为内标，通过凝胶渗透色谱净化，以 LC-MS/MS 检测。Wang L.J.^[22]和陈晓水^[23]等人以盐酸溶液提取烟草样品，以氘代-抑芽丹为内标，以 LC-MS/MS 检测。前者采用微波辅助萃取，后者采用加热回流提取，但都未进一步净化提取液，造成上机溶液较脏，从而使 LC-MS/MS 仪器的维护频率增加。

本项目拟研究建立和完善 LC-MS/MS 检测烟草中抑芽丹农药残留量的方法，简化样品前处理过程，改善以 HPLC 检测时定性定量不够准确的问题。基于以上背景，提出以灵敏度更高和抗干扰能力更好的 LC-MS/MS 法代替 HPLC 法，对原 YC/T 405.5-2011 方法进行修订，以提高检测结果的可靠性。

2.项目主要研究内容和技术路线

2.1 项目主要研究内容

1. 国内外相关资料的搜集、整理。
2. 根据烟草及烟草制品的特点，研究开发《烟草及烟草制品 抑芽丹农药残留量的测定 液相色谱串联质谱法》检测方法。主要是考察以液相色谱-串联质谱联用仪（LC-MS/MS）作为检测仪器的各种检测参数，提高方法的定性能力和检测灵敏度，以氘代抑芽丹为内标进行内标法定量，降低检测干扰，提高检测数据的重复性；同时，对样品前处理过程进行考察，在保证目标物提取效率的同时，简化操作，提高批量处理样品的能力。
3. 完成技术报告。

2.2 项目技术路线

在前期研究工作的基础上，确立的项目技术路线如图 2-1 所示：

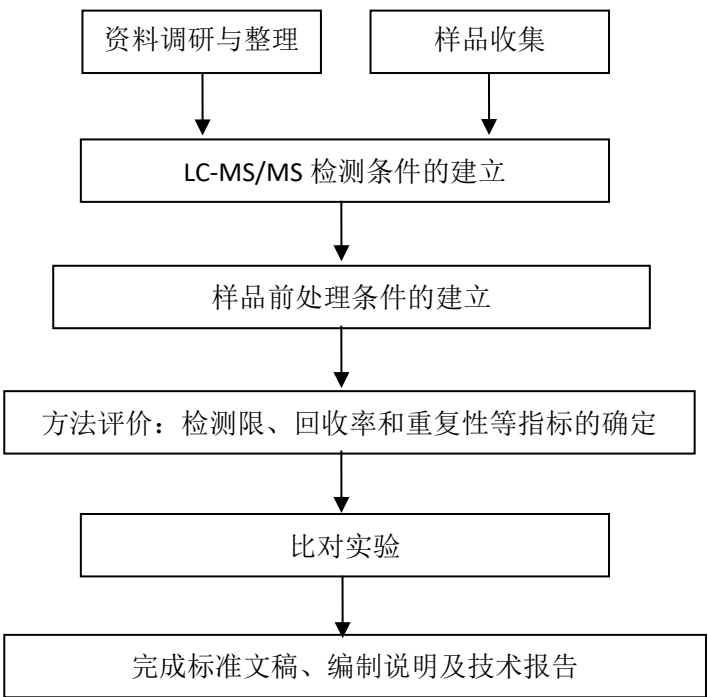


图 2-1 项目的技术路线图

3.实验部分

YC/T 405.5-2011 对抑芽丹的检测基于 HPLC 方法，以外标法定量。此次修订以 LC-MS/MS 方法替代原 HPCL 方法，有效地提高检测的灵敏度以及抗干扰能力，并在样品前处理开始时加入氘代抑芽丹的稳定同位素内标，以内标法定量，提高定量的准确性，并在一定程度上简化了样品前处理操作步骤。

3.1 方法原理

将烟末样品使用盐酸水溶液加热回流提取抑芽丹农药残留，冷却后的提取液经过滤或离心后，以固相萃取小柱净化，用液相色谱串联质谱仪进行检测，内标法定量。

3.2 试剂与材料

所有试剂应适用于农药残留量分析。水应为蒸馏水或同等纯度的水，至少应达到 GB/T 6682 三级水的水平。所有溶剂应依照与样品测定（萃取和液相色谱串联质谱测定）相同的程序做空白实验以检查其纯度，溶剂色谱图的基线上应没有明显会影响抑芽丹测定的峰出现。

抑芽丹（纯度≥99%，德国 Dr. Ehrenstorfer 公司），氘代抑芽丹（纯度≥97%，德国 Dr. Ehrenstorfer 公司），乙腈、甲醇（色谱纯，美国 J.T.Baker 公司），冰醋酸（纯度≥99%，美国 Fisher Chemical 公司），发烟盐酸（质量百分比 37%，韩国 Duksan Pure Chemicals 公司）

盐酸提取液：将发烟盐酸（37%，质量百分比）与蒸馏水按 1:2（体积比）比例稀释，即得约 4 mol/L 的盐酸提取液。

固相萃取小柱为 Supelclean™ LC-18 SPE 净化柱（500 mg, 3 mL）。

抑芽丹标准储备液：准确称取 0.01 g（精确至 0.1 mg）抑芽丹标准品至 100 mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释定容，配制成浓度为 100 µg/mL 的抑芽丹标准储备液。

氘代抑芽丹内标储备液：准确称取 0.01 g（精确至 0.1 mg）氘代抑芽丹标准品至 50 mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释定容，配制成浓度为 200 µg/mL 的氘代抑芽丹内标储备液。

标准工作溶液：分别移取 50 µL、125 µL、250 µL、500 µL、1.25 mL、2.5 mL、

5 mL 100 µg/mL 的抑芽丹标准储备液于 100 mL 容量瓶中，各加入 250 µL 200 µg/mL 抑芽丹氘代内标储备液，用蒸馏水稀释定容，配制成浓度为 0.05 µg/mL、0.125 µg/mL、0.25 µg/mL、0.5 µg/mL、1.25 µg/mL、2.5 µg/mL、5 µg/mL 的系列标准工作溶液，氘代抑芽丹内标的浓度为 0.5 µg/mL。相应的系列标准工作溶液中抑芽丹含量为 5 µg、12.5 µg、25 µg、50 µg、125 µg、250 µg、500 µg，氘代抑芽丹含量为 50 µg。

3.3 仪器设备

分析天平，感量 0.1 mg;

容量瓶（50 mL、100 mL）、量筒、球形冷凝管、磨口圆底/平底烧瓶（250 mL）玻璃仪器；

恒温电加热套（功率 230 W，河南豫华仪器有限公司）或恒温油浴锅（JY-6A，金坛市天竟实验仪器厂）；

Sigma 3-30K 高速离心机（德国 Sigma Laborzentrifugen 公司），配备适用于 50 mL 离心管的离心机转子；

固相萃取装置；

AB SCIEX TRIPLE QUAD™ 5500 液相色谱-串联质谱仪（美国 AB SCIEX 公司），配备电喷雾离子源（ESI）

3.4 试样制备

按 YC/T 31 制备样品，测定样品水分含量。

3.5 操作步骤

称取 5 g 试样，精确至 0.01g，于圆底烧瓶中。加入 50 mL 4 mol/L 的盐酸提取液，加入 250 µL 200 µg/mL 氘代抑芽丹内标溶液，适当振摇或超声，使烟末分散与盐酸溶液混合均匀。将烧瓶放置于加热套或者油浴锅中，装上球形冷凝管，加热回流。控制回流速度，使蒸汽升至球形冷凝管第二球处，回流稳定后开始计时，回流 1 小时。回流结束后，关闭加热套或油浴锅电源，冷却至室温后，将提取液摇匀后倒入 50 mL 离心管中，10000 rpm 离心 10 min。

分别以 2 mL 甲醇和 2 mL 超纯水活化 Supelclean™ LC-18 SPE 净化小柱，取 2 mL 上述离心所得的提取液，加到固相萃取小柱中，即刻开始收集流出液，并用 2 mL 蒸馏水洗脱，合并流出液及洗脱液，用 0.45 µm 水相滤膜过滤，待

LC-MSMS 分析。

样品前处理过程的示意图如图 3-1 所示：



图 3-1. 样品前处理过程示意图

3.6 测定

3.6.1 液相色谱条件

色谱柱：Hypercarb Porous Graphitic Carbon 液相色谱柱，柱长 100 mm，内径 4.6 mm，粒径 5.0 μm ；柱温 30℃；进样量 10 μL 。流动相及流速参见表 3-1。

表 3-1. 流动相梯度

时间 (min)	流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	1% HAc 水 (%)	1% HAc 乙腈 (%)
0	300	100	0
8	300	85	15
15	300	85	15
16	300	10	90
20	300	10	90
21	300	100	0
36	300	100	0

3.6.2 质谱条件

扫描方式：正离子扫描；检测方式：多反应监测模式 (MRM)；电喷雾电压：5500 V；气帘气压力：30 psi；辅助加热气压力：60 psi；碰撞气压力：6 psi；离子化温度：500℃；抑芽丹及氘代抑芽丹的定量离子对、定性离子对、去簇电压及碰撞能量如表 3-2 所示：

表 3-2. 化合物质谱参数

化合物名称	离子对	去簇电压(V)	碰撞能量(V)	驻留时间(ms)
抑芽丹	113/85(定量)	110	27	50
	113/67(定性)	110	24	50
氘代抑芽丹	115/87(定量)	110	27	50
	115/69(定性)	110	24	50

4. 结果与讨论

4.1 样品前处理条件的优化

YC/T 405.5-2011 中样品的提取是将 5 g 试样置于 250 mL 烧瓶中,加入 50 mL 的 4 mol/L 的盐酸提取液,于加热套中加热回流 1 h,回流完毕放至室温后用定性滤纸过滤试样,将滤液收集到 100 mL 容量瓶中,用适量 4 mol/L 的盐酸提取液淋洗冷凝管和萃取过的试样,洗液均经过滤合并至容量瓶中,以盐酸提取液定容至刻度。分别以 2 mL 甲醇和 2 mL 的 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液依次淋洗 C₁₈ 固相萃取小柱,从 100 mL 容量瓶中准确移取 2 mL 上述提取液加到预处理过的 C₁₈ 固相萃取小柱上,即刻开始收集流出组分到 5 mL 容量瓶中,用 2 mL 的 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液洗脱,合并洗脱液至该 5 mL 容量瓶中,并用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液定容至刻度,经 0.45 μ m 水相滤膜过滤后得待测试样萃取液,待高效液相色谱分析。

该前处理采用盐酸溶液加热回流提取,是经以往研究验证过的较为有效的提取方式^[19,21-22],能够有效地提取烟草中游离态和结合态的抑芽丹残留。故此,本项目延续使用了 YC/T 405.5-2011 中以 4 mol/L 的盐酸加热回流提取的前处理方法。

但由于 YC/T 405.5-2011 需使用 HPLC 进行分离检测,外标法定量,故前处理中有较多的定容步骤,而本项目以氘代抑芽丹作内标,采用 LC-MS/MS 进行分离检测,内标法定量,可省去原 YC/T 405.5-2011 方法前处理中的定容步骤。此外,原 YC/T 405.5-2011 的净化步骤中,以 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液洗脱,因提取液为 4 mol/L 的盐酸溶液,0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液仅能中和极其少量的盐酸,以 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液洗脱的必要性不大。若以更大浓度的故本项目中氢氧化钠溶液中和提取液中的盐酸,则会产生高浓度的 NaCl,对 LC-MS/MS

检测是不利的。故最终本项目直接采用蒸馏水作洗脱液。

本项目最终确立的前处理过程如下：

称取 5 g 试样，精确至 0.01g，于圆底烧瓶中。加入 50 mL 4 mol/L 的盐酸提取液，加入 250 μ L 200 μ g/mL 氘代抑芽丹内标溶液，适当振摇或超声，使烟末分散与盐酸溶液混合均匀。将烧瓶放置于加热套或者油浴锅中，装上球形冷凝管，加热回流。控制回流速度，使蒸汽升至球形冷凝管第二球处，回流稳定后开始计时，回流 1 小时。回流结束后，关闭加热套或油浴锅电源，冷却至室温后，将提取液摇匀后倒入 50 mL 离心管中，10000 rpm 离心 10 min。分别以 2 mL 甲醇和 2 mL 蒸馏水活化 Supelclean™ LC-18 SPE 净化小柱，取 2 mL 上述离心所得的提取液，加到固相萃取小柱中，即刻开始收集流出液，并用 2 mL 蒸馏水洗脱，合并流出液及洗脱液，用 0.45 μ m 水相滤膜过滤，待 LC-MSMS 分析。

4.2 检测条件的优化

4.2.1 质谱条件的优化

在 LC-MS/MS 分析中，对每一种目标物需要优化的质谱参数主要有母离子、子离子和碰撞能量。

首先，以适宜的质量浓度（5-10 μ g/mL）在 m/z 30-600 之间进行全扫描分析（Full Scan），确定目标物的保留时间和一级质谱图。并从一级质谱图中选择适当的离子作为母离子，母离子的选择主要考虑两方面因素：高选择性和高灵敏度，高选择性即尽量选择质荷比较大的离子；高灵敏度即尽量选择丰度较大的离子。综合考虑，选择适宜的离子初步定为母离子。

其次，对选定的母离子用子离子扫描的方式，确定二级质谱图，从中选择适宜的离子作为子离子，基本原则同母离子。

对每一组母离子/子离子，分别选择碰撞能量为 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 eV 进行扫描优化，以响应信号大小为选择依据；再在此优化的碰撞能量附近进行微调，做二次优化，得到最优的碰撞能量。

经优化得到的抑芽丹及氘代抑芽丹的质谱检测参数如表 3-2 所示。

在最优的分离检测条件下，得到的标准工作溶液的提取离子色谱图如图 4-1 所示：

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/885004330343011233>