

高效液相-质谱联用法测定浙贝母中 12 种农药残留成分

马临科, 李文庭, 赵维良*

浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310004

摘要: **目的** 建立 *N*-丙基乙二胺 (PSA)-高效液相-三重四极杆串联质谱 (HPLC-QQQ-MS/MS) 法测定浙贝母中有机磷等 12 种农药残留的方法, 并收集主产地浙江等地 20 批浙贝母样品进行农药残留测定。**方法** 浙贝母样品加乙腈提取, 过 PSA 柱净化, 采用 LC-QQQ-MS/MS 方法在多反应监测 (MRM) 模式下测定, 内标法定量。**结果** 12 种农药成分在相应的测定范围内线性关系良好, 相关系数在 0.998 6~0.999 8, 12 种农药在 90、300、900 ng/mL 3 个添加水平下, 加样回收率范围为 68.1%~108.0%, RSD 为 1.1%~6.1%, 各农药的检出限在 0.08~1.0 µg/kg。**结论** 该方法可应用于浙贝母药材中 12 种农药残留成分的同时检测。浙贝母药材农药残留量甚微, 符合安全性要求。

关键词: 浙贝母; 农药残留; *N*-丙基乙二胺; HPLC-QQQ-MS/MS; 多反应监测

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0849-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.021

Determination of 12 kinds of pesticide residues in *Fritillariae Thunbergii Bulbus* by HPLC-MS

MA Lin-ke, LI Wen-ting, ZHAO Wei-liang

Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China

Abstract: Objective To develop an analysis method based on *N*-propylethylenediamine (PSA)-HPLC-QQQ-MS/MS for the determination of 12 kinds pesticide residues in *Fritillariae Thunbergii Bulbus* and to quantify them in 20 batches of *Fritillariae Thunbergii Bulbus* produced in various places in Zhejiang province. **Methods** *Fritillariae Thunbergii Bulbus* samples were extracted with acetonitrile and purified by the small column of PSA. The prepared samples were analyzed by HPLC-QQQ-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode, and the pesticides were qualified by the internal standard method. **Results** All the 12 pesticides showed good linearities in their reasonable range ($r = 0.998\ 6 - 0.999\ 8$), and the average recoveries of all the pesticides were in the range of 68.1%—108.0% at three spiked levels of 90, 300, and 900 ng/mL. The RSD values were in the range of 1.1%—6.1%, and the LODs of each pesticide were all in the range of 0.08—1.0 µg/kg. **Conclusion** The method is suitable for the multiresidues analysis of pesticides in *Fritillariae Thunbergii Bulbus* simultaneously and the quality of *Fritillariae Thunbergii Bulbus* is basically good for the safety although it contains a trace of several pesticide residues.

Key words: *Fritillariae Thunbergii Bulbus*; pesticide residues; *N*-propyl ethylenediamine; HPLC-QQQ-MS/MS; multiple reaction monitoring

浙贝母 *Fritillariae Thunbergii Bulbus* 为常用药材, 收载于历版《中国药典》一部^[1]中, 功能清热化痰止咳、解毒散结消痈; 为著名的“浙八味”之一, 分大贝和珠贝 2 种规格, 主产浙江。因浙贝母在生长过程中常有灰霉病、黑斑病、干腐病、软腐病、葱螨、蛴螬和沟金针虫等病虫害。据笔者了解, 浙贝母种植过程中需使用毒死蜱、辛硫磷、多菌灵、

甲霜灵、三唑酮、辛硫磷、敌敌畏、敌百虫、甲胺磷、甲拌磷、二嗪磷、啉霉胺、乙烯菌核利、甲基托布津等多种农药, 并可能产生一定的残留。曾见有对浙贝母药材的农药残留进行检测的研究报道^[2], 其检测对象为有机氯和拟除虫菊酯类, 但结果均未检出。

本课题组根据调查结果, 以上述报道以外的有机磷类、多菌灵、三唑酮等 12 种农药作为实验对

收稿日期: 2013-11-19

基金项目: 国家药典委员会研究基金 (1677)

作者简介: 马临科 (1978—), 男, 副主任中药师, 研究方向为中药成分及质量分析。

*通信作者 赵维良 Tel: (0571)86452373 E-mail: zwl@zjyj.org.cn

象,进行方法学研究和样品测定,这些农药或毒性较大或半衰期较长,并且目前在浙贝母的栽培中使用较为广泛或曾经较为广泛使用。目前,对于多组分农残的检测,在用有机溶剂提取后,净化的方法有过固相萃取柱^[3-5]、直接加入固相吸附剂^[6]、凝胶渗透化^[7]、磺化法^[1]等。多组分有机磷等多种类农残测定方法有 HPLC-MS、GC、GC-MS^[2,8-10]等。考虑到浙贝母含有较多的生物碱等小分子成分,对多组分农残的测定干扰较大,为增加方法的专属性,本实验拟以 *N*-丙基乙二胺 (PSA) 固相萃取小柱净化,采用 LC-MS/MS 法进行方法研究和测定。

1 仪器与材料

高效液相色谱-串联质谱仪:美国 Agilent 公司 1200 液相色谱-6430 三重四极杆串联质谱仪,配有电喷雾离子源 (ESI); SUPELCO 固相萃取仪;氮气吹干仪 (N-EVAPTM III 型,美国 Organomation Associates, Inc 公司); 旋转蒸发仪 (R215 型,瑞士 Büchi 公司); 分析天平 (AG285 型电子天平,德国 Sartorius 公司)。

乙腈、甲醇均为色谱纯 (Merck 公司); PSA 柱, 500 mg/6 mL (DIKMA 公司); 无水硫酸钠,分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。

甲胺磷、辛硫磷、三唑酮、敌百虫、毒死蜱、二嗪磷、敌敌畏、甲霜灵、甲拌磷、多菌灵、吡虫啉、氟啶脲均来源于 Dr. Ehrensterfer 公司; 磷酸三苯酯 (triphenylphosphate, 内标), 来源于 Sigma 公司。

共收集浙贝母样品 20 批,其中浙江磐安各种植点 6 批 (编号 1~6)、浙江磐安药材市场 5 批 (编号 7~11)、浙江宁波鄞州各种植点 4 批 (编号 12~15)、浙江宁波市场 1 批 (编号 16)、浙江省中医院 1 批 (编号 17)、安徽亳州药材市场 1 批 (编号 18)、安徽亳州永刚饮片厂 2 批 (编号 19~20)。样品经本院郭增喜主任中药师鉴定均为浙贝母 *Fritillaria Thunbergii Bulbus*。收集的样品代表性强,基本囊括了浙贝母的主要产地及种植、加工、销售和使用点。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

取药材样品,粉碎,过 3 号筛,准确称取 5.0 g,精密加入乙腈 50 mL,放置 30 min,于冰浴中超声提取 30 min,离心,取上清液,置锥形瓶中,加无水硫酸钠 5 g,放置 30 min,精密量取 10 mL 置圆底烧瓶中,40 °C 减压浓缩至约 1 mL,置 PSA 小柱

(加样前柱上加约 1 cm 高无水硫酸钠,用乙腈 10 mL 预淋洗) 上,锥形瓶用乙腈洗涤 3 次,每次 1 mL,洗液置同一小柱上,用乙腈 25 mL 洗脱,收集洗脱液,40 °C 减压浓缩至约 1 mL,置氮吹仪上吹至近干,加入内标溶液 100 μ L,加入 60% 甲醇 900 μ L,超声使溶解,混匀,离心,即得。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 对照品和内标储备溶液的制备 精密称取各农药对照品和磷酸三苯酯适量,用甲醇分别制成约 1 mg/mL 储备液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密吸取各农药对照品储备溶液适量,用甲醇-水 (3:2) 制成分别为 12、18、36、60、120、180、300 ng/mL 混合对照品工作溶液,并分别加入内标储备液适量,使磷酸三苯酯质量浓度为 24 ng/mL。

2.2.3 内标溶液的制备 精密吸取内标储备溶液适量,用甲醇-水 (3:2) 制成质量浓度 0.24 μ g/mL 溶液,作为内标工作液。

2.2.4 基质混合对照品溶液的制备 取不含农药的空白样品基质,按照“2.1”项下方法处理至氮吹仪上吹至近干,加入上述对照品溶液各 1 mL,摇匀,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温 40 °C,进样量 5 μ L,流动相为含 0.1% 甲酸的水溶液 (A)-乙腈 (B),梯度洗脱,0~0.3 min, 90% A; 0.3~4.0 min, 90%~60% A; 4.0~13.0 min, 60%~40% A; 13.0~15.0 min, 40%~5% A; 15.0~20.0 min, 5% A; 体积流量为 0.4 mL/min。

2.4 质谱条件

电离源模式:电喷雾离子化; 电离源极性:正模式; 雾化气:氮气; 雾化气压力:344.75 kPa; 扫描方式:正离子扫描; 检测方式:多反应监测 (MRM); 电喷雾电压:4 000 V; 离子源温度:350 °C; 干燥气温度:350 °C; 干燥气体积流量 12 L/min。

2.5 质谱方法的建立

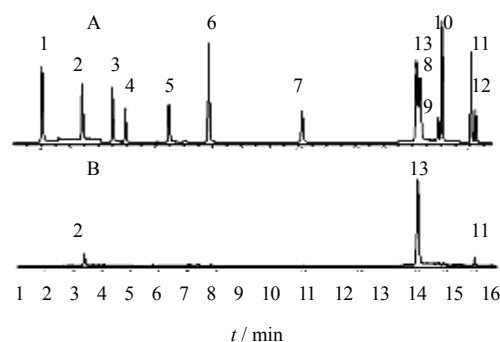
在不连接色谱柱条件下将农药对照品溶液分别注入离子源中,在正离子检测方式下对每种农药进行一级质谱分析,得到每种农药的分子离子峰,对每种农药的分子离子峰进行子离子扫描,得到碎片离子信息,然后优化每种农药的源内碎裂电压 (Fragmentor)、碰撞气能量 (CE) 等参数,使每种

农药的分子离子与特征碎片离子产生的离子对强度达到最大,得到每种农药的二级质谱图。按照二级质谱图提供的碎片离子信息,选择每种农药的定性和定量离子对,得到 MRM 模式总离子流色谱图见图 1,各参数信息见表 1。

2.6 方法学考察

2.6.1 标准曲线和检出限 精密吸取 7 个不同质量浓度的基质混合对照品溶液各 5 μL ,进样,记录各待测组分与内标 MRM 色谱峰面积,以各成分的质量浓度与内标质量浓度比为横坐标 (X),各成分的峰面积与内标峰面积比为纵坐标 (Y),进行回归分析,得标准曲线;另将低质量浓度加样样品进样分析,测定信噪比,取信噪比约为 3 的溶液浓度作为定性检测限,数据见表 2。

2.6.2 精密度试验 取基质混合对照品溶液 (60 ng/mL) 连续进样 6 次,记录峰面积,计算待测物



1-甲胺磷 2-多菌灵 3-敌百虫 4-吡虫啉 5-敌敌畏 6-甲霜灵
7-三唑酮 8-二嗪磷 9-甲拌磷 10-辛硫磷 11-毒死蜱 12-氟啶脲
13-磷酸三苯酯 (内标)
1-methamidophos 2-carbendazim 3-trichlorfon 4-imidacloprid
5-dichlorvos 6-metaxyl 7-triadimefon 8-diazinon 9-phorate
10-phoxim 11-chlorpyrifos 12-chlorfluazuron 13-triphenylphosphate

图 1 混合对照品 (A) 和浙贝母 (B) 的总离子流图
Fig. 1 TIC of mixed reference substance (A) and sample (B)

表 1 对照品及检测参数

Table 1 Reference substances and detection parameters of pesticides

对照品	t/min	母离子	定量离子峰(m/z)	定性离子峰(m/z)	源内碎裂电压/V	碰撞气能量/V	
						定量	定性
甲胺磷	0.93	142.0	94.1	125.0	92	10	10
多菌灵	2.24	192.1	160.1	132.1	88	14	34
敌百虫	3.32	256.9	109.1	221.0	86	14	6
吡虫啉	3.73	256.1	209.1	175.1	100	10	14
敌敌畏	5.26	221.0	108.9	145.0	120	15	15
甲霜灵	6.63	280.2	220.1	192.1	86	10	14
三唑酮	9.74	294.1	197.1	225.1	98	10	6
二嗪磷	13.81	305.1	169.1	153.1	118	18	18
甲拌磷	14.53	261.0	74.9	199.0	64	1	4
辛硫磷	14.75	299.1	129.1	77.1	76	2	30
毒死蜱	15.87	349.9	97.0	198.0	100	34	10
氟啶脲	16.06	540.0	382.9	158.0	124	16	20
磷酸三苯酯 (内标)	13.62	327.1	214.7	77.0	70	5	17

表 2 12 种农药对照品线性考察结果及检出限

Table 2 Linear test results and LOD of 12 pesticide reference substances

对照品	线性范围 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	线性方程	r	LOD / ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
多菌灵	1.173~29.32	$Y=0.261\ 2\ X+0.058\ 2$	0.999 4	0.23
氟啶脲	16.79~419.7	$Y=0.109\ 9\ X+0.000\ 1$	0.999 3	0.90
毒死蜱	25.15~628.8	$Y=0.228\ 9\ X+0.006\ 8$	0.998 6	0.84
二嗪磷	2.365~59.12	$Y=0.342\ 4\ X+0.000\ 3$	0.998 9	0.17
敌敌畏	11.97~299.2	$Y=0.219\ 2\ X+0.001\ 0$	0.998 9	0.94
吡虫啉	11.34~283.5	$Y=0.112\ 0\ X+0.000\ 6$	0.998 8	0.45
甲霜灵	2.466~61.66	$Y=0.396\ 3\ X+0.002\ 2$	0.999 3	0.08
甲胺磷	7.508~187.7	$Y=0.392\ 1\ X+0.000\ 1$	0.999 8	0.14
甲拌磷	25.87~646.7	$Y=0.163\ 3\ X+0.000\ 1$	0.999 5	0.97
辛硫磷	5.524~138.1	$Y=0.360\ 8\ X+0.001\ 7$	0.999 2	0.21
三唑酮	12.02~300.4	$Y=0.185\ 2\ X+0.000\ 3$	0.999 2	0.45
敌百虫	21.76~544.1	$Y=0.363\ 1\ X+0.000\ 4$	0.999 1	1.00

峰面积与内标峰面积的比值及相应的 RSD 值,考察仪器精密度,数据见表 3,结果满意。

2.6.3 重复性试验 采用考察加样回收率的方法来考察方法的重现性。取样品,粉碎,过 3 号筛,称取 5.0 g,一式 6 份,置锥形瓶中,分别精密加入 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液(不含内标)各 0.5 mL,精密加入乙腈 50 mL,同供试品溶液制备方法制得重复性试验供试品溶液,计算回收率及相应 RSD 值,考察方法重复性。结果见表 3。上述测定农药各成分测得回收率 RSD 均小于 5.2%。

2.6.4 回收率试验 取样品,粉碎,过 3 号筛,称取 5.0 g,一式 12 份,高(900 ng/mL)、中(300 ng/mL)、低(90 ng/mL)质量浓度分别为 3、6、3 份,分别精

密加入 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液(不含内标)各 0.15、0.5、1.5 mL,精密加入乙腈 50 mL,按照“2.1”项制得加样试验供试品溶液。计算回收率及相应 RSD 值,考察方法回收率,结果详见表 3。12 种农药的加样回收率基本上分布在 68.1%~108.0%,认为可满足农药残留测定的要求。

2.7 样品测定

取浙贝母样品,按供试品溶液制备法制备供试品溶液,精密吸取 5 μL 注入液相色谱-串联质谱仪,按内标-校正曲线法计算供试品中农药残留量。结果甲胺磷、甲拌磷、敌百虫、二嗪磷、辛硫磷、吡虫啉、甲拌磷、氟啶脲均未检出,其余农药均有检出。数据见表 4。

表 3 12 种农药对照品的精密度、重复性、回收率

Table 3 Precision, repeatability, and recovery rates of 12 pesticide reference substances

对照品	精密度 RSD / %	重复性 RSD / %	低浓度 (90 ng·mL ⁻¹)		中浓度 (300 ng·mL ⁻¹)		高浓度 (900 ng·mL ⁻¹)	
			回收率 / %	RSD / %	回收率 / %	RSD / %	回收率 / %	RSD / %
多菌灵	1.8	5.1	88.8	1.7	99.3	5.1	96.1	1.4
氟啶脲	4.7	5.2	74.1	2.9	82.6	5.2	83.5	4.0
毒死蜱	2.4	4.2	85.2	3.6	88.6	4.2	90.1	2.3
二嗪磷	0.8	2.3	85.4	4.1	91.0	2.3	95.1	1.2
敌敌畏	1.9	3.9	108.0	5.9	96.6	3.9	104.2	3.9
吡虫啉	1.3	3.6	84.9	4.5	88.1	3.6	94.2	1.5
甲霜灵	0.7	2.4	88.6	5.5	93.4	2.4	96.7	2.0
甲胺磷	2.7	3.4	91.4	5.5	94.8	3.4	97.4	1.2
甲拌磷	2.5	2.3	85.7	5.5	90.2	2.3	91.2	1.1
辛硫磷	1.8	3.0	90.2	4.8	95.0	3.0	95.0	3.3
三唑酮	1.0	2.9	89.7	5.3	93.8	2.9	96.3	1.8
敌百虫	2.2	4.0	68.1	6.1	70.2	4.0	78.8	5.2

表 4 浙贝母样品中农药残留量测定结果 (n = 3)

Table 4 Determination of pesticide residues in *Fritillariae Thunbergii Bulbus* (n = 3)

样品 编号	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)				样品 编号	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)			
	多菌灵	甲霜灵	三唑酮	毒死蜱		多菌灵	甲霜灵	三唑酮	毒死蜱
1	0.9	—	—	—	11	1.1	—	—	13.2
2	134.7	—	—	—	12	—	—	—	—
3	107.0	—	—	—	13	2.8	—	—	—
4	90.0	—	—	—	14	0.9	—	—	—
5	68.9	—	12.3	16.9	15	7.9	—	—	—
6	437.5	—	9.5	14.4	16	6.5	—	—	—
7	12.7	—	—	—	17	111.0	—	—	—
8	0.6	—	—	—	18	2.4	—	—	7.4
9	374.4	—	4.6	8.6	19	9.6	0.9	—	—
10	1.4	—	—	6.9	20	14.2	0.9	—	—

“—” 未检出

“—” undected

3 讨论

农药残留常用的提取溶剂有醋酸乙酯、丙酮、甲醇、乙腈和二氯甲烷等,或者它们的混合溶剂。通过对比试验,发现用丙酮和甲醇提取很充分,但提取的杂质多,净化难度大。采用醋酸乙酯或二氯甲烷提取,因对组织渗透性不够而不能使中药材的植物纤维完全润湿展开,提取效率较低。采用乙腈提取,极性大小较合适,样品中大部分的亲脂性物质不被萃取,弱极性色素和其他杂质提取亦较少。故采用乙腈作为提取溶剂。

对弗罗里硅土柱、石墨化碳氨基串联柱、PSA柱、TPH柱等不同固相萃取柱进行比较考察,结果除在弗罗里硅土柱上有近半数的农药未被洗脱外,12种农药在石墨化碳氨基串联柱、PSA柱上的回收率未见显著差别,但采用后者回收率较集中,且净化效果较好,故选择PSA柱进行净化。另对洗脱溶剂和洗脱体积进行了优化比较,分别考察了乙腈、丙酮-醋酸乙酯(1:1)、3%甲醇的丙酮等不同洗脱溶剂,和20、25、30 mL不同洗脱体积,结果采用25 mL乙腈已基本洗脱完全,并能达到良好净化效果。

对于极性相差较大的农药多残留分析检测,液相色谱分离常用的液相色谱柱有C₁₈柱,色谱柱规格主要有150 mm×2.1 mm, 100 mm×2.1 mm, 150 mm×3.0 mm, 100 mm×4.6 mm等,内径越小,流动相流速降低,灵敏度可显著提高,故选用100 mm×2.1 mm色谱柱,采用粒径为1.8 μm,分离度明显提高,故选用色谱柱为Zorbax Eclipse plus C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);采用梯度洗脱的方式,在将各色谱峰基本分开,且保证各离子峰的响应灵敏度较好的前提下,尽量节省分析时间;流动相采用偏酸的缓冲盐体系能更好地保证各农药成分在色谱系统中的稳定性和质谱的离子化效果。经过反复实验摸索,确立了上述流动相条件。

从20批样品测定结果分析,12种农药中检出率最高的为多菌灵和毒死蜱,三唑酮和甲霜灵有少量检出,其余8种农药均未检出;多菌灵为低毒农药,检出量亦不高,根据国内外的限度规定,如加拿大对苹果等的限度为10 mg/kg,我国

对大米、玉米、花生等食品的限度为2~0.1 mg/kg,且浙贝母的用量较小为5~10 g/d,而毒死蜱,三唑酮和甲霜灵检出量更低,故认为浙贝母的农药残留风险较低。

本研究建立了提取、PSA柱净化、LC-QQQ-MS/MS同时测定浙贝母药材中有机磷等12种农药残留的方法,此方法操作方便,有机溶媒的使用量少,采用了HPLC-MS/MS的MRM模式进行定性和定量检测,基质效应能通过空白基质校准消除,灵敏度、准确性符合农残检测要求,适用于浙贝母药材农残的检测。并对浙江主产地的20批样品进行了测定,结果表明浙贝母药材农药残留量很低,使用是安全的。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 李健鑫,方翠芬,马临科,等.气相色谱-质谱连用法测定浙贝母中20种农药残留[J].药物分析杂志,2012,32(3):419-423.
- [3] 万益群,李艳霞.气相色谱-质谱法同时测定中药中有机磷和有机氮农药残留量[J].分析测试学报,2005,24(3):90-94.
- [4] 汤富彬,楼正云,陈宗懋,等.固相萃取-高效液相色谱法测定茶叶中有机氮农药残留量[J].理化检验-化学分册,2008,44(10):947-949.
- [5] 李佩,李银峰,王杰晶,等.固相萃取技术在药物分析中的应用[J].现代药物与临床,2013,28(2):261-264.
- [6] 李缓,肖丽和,殷果,等.分散固相萃取-气相色谱-三重四极杆串联质谱法测定莪蒿中17种农药残留[J].药物分析杂志,2013,33(4):661-668.
- [7] 高梦南,王燕萍,唐红卫.凝胶渗透色谱净化在土样有机氮测定中的应用[J].环境科学与技术,2006,29(3):38-40.
- [8] 戴博,金红宇,田金改.中药中外源性有害残留物检测方法研究进展[J].药物分析杂志,2008,28(6):1014-1019.
- [9] 刘知远.石英毛细管气相色谱法测定柘荣太子参中联苯菊酯、毒死蜱的农药残留量[J].药物分析杂志,2013,33(2):271-273.
- [10] 王进,岳永德,汤锋,等.竹笋中40种农药残留的固相萃取/气相色谱-质谱法同时测定[J].分析测试学报,2011,30(2):161-166.