

基于 QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS 法同时测定知母中 58 种农药残留

谭 鹏¹, 张海珠², 许 莉¹, 赵小勤¹, 包晓明³, 黄春燕¹, 文永盛^{1*}

1. 成都市食品药品检验研究院, 四川 成都 610045

2. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000

3. 岛津企业管理(中国)有限公司, 四川 成都 610023

摘要: 目的 建立基于 QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS 的知母中 58 种农药残留同时定量分析方法。方法 采用岛津 TQ8050 三重四级杆气质联用仪, Shimadzu SH-Rxi-5Sil MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)为色谱柱;进样口温度为 250 °C, 进样量为 1.0 μL, 不分流进样, 高压进样压力为 250 kPa;载气为高纯氦气, 载气控制方式为恒线速度模式;色谱柱体积流量为 1.69 mL/min, 线速度为 47.2 cm/s, 吹扫流量为 5 mL/min;程序升温:初始温度为 50 °C, 保持 1 min, 先以 25 °C/min 升温至 125 °C, 再以 10 °C/min 升温至 300 °C, 保持 15 min;柱平衡时间为 0.5 min。采用 QuEChERS 法提取、净化供试品溶液;配制基质匹配标准曲线;使用稳定的同位素内标进行校正等 3 个措施共同消除基质效应。结果 成功建立并验证了一种基于 QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS 的知母中 58 种农药残留同时定量分析方法。通过对不同产地、野生与栽培品种、不同规格的知母药材进行 58 种农药残留量的定量测定, 结果显示 30 个批次内共有 6 个批次知母药材检测到了微量的 p,p'-滴滴伊(p,p'-DDE), 3 个批次检测到了氟乐灵, 2 个批次检测到了毒死蜱, 1 个批次检测到了微量的仲丁灵。结论 建立的基于 QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS 的知母中 58 种农药残留同时定量分析方法具有较好的适用性, 对其他中药材农药多残留检测方法的建立具有参考价值。

关键词: QuEChERS; 三重四级杆气相-质谱联用法; 农药残留; 提取; 净化; 定量分析; 知母

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)14-3397-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.028

Development and application of a simultaneous quantitative analysis method of 58 pesticide residues in *Anemarrhena asphodeloides* based on QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS

TAN Peng¹, ZHANG Hai-zhu², XU Li¹, ZHAO Xiao-qin¹, BAO Xiao-ming³, HUANG Chun-yan¹, WEN Yong-sheng¹

1. Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China

2. Department of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

3. Shimadzu Enterprise Management (China) Co., Ltd., Chengdu 61023, China

Abstract: Objective To establish a simultaneous quantitative analysis method of 58 pesticide residues in *Anemarrhena asphodeloides* based on QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS technique. **Methods** This study was performed on a Shimadzu GC-QQQ-MS/MS spectrometer, equipped with a SHIMADZU SH-Rxi-5Sil MS column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm). The temperature of injection port was 250 °C, the injection volume was 1.0 μL, the injection mode was splitless, the injection pressure was 250 kPa; The carrier gas was high purity helium and the carrier gas control mode was constant linear velocity mode; The column flow rate was 1.69 mL/min, the line speed was 47.2 cm/s, the purge flow rate was 5 mL/min. The temperature rise method was the gradient program: The initial temperature was 50 °C, hold the state for 1 min, first raise the temperature to 125 °C with 25 °C/min, then raise the temperature to 300 °C with 10 °C/min, keep the state for 15 min; The balance time was 0.5 min. The QuEChERS method was used to purify the test sample solutions, and the calibration was carried out using the standard curve of blank matrix matching, using a stable isotope internal

收稿日期: 2018-01-23

基金项目: 成都市食品药品监督管理局风险监测项目; 成都市科技局科技惠民项目(2016-HM01-00312-SF)

作者简介: 谭 鹏(1987—), 男, 中药学博士, 主要从事中药材质量标准研究。Tel: (028)85362592 E-mail: 2013tanpeng@sina.com

*通信作者 文永盛, 副主任中药师。Tel: (028)85362592 E-mail: 1245551207@qq.com

standard for quantitative. **Results** Quantitative determination of 58 pesticide residues in 30 batches of *A. asphodeloides* samples was carried out. The results showed that there were five batches of samples detecting a small amount of p,p'-DDE, three batches of samples were detected trifluralin, two batches of samples were detected chlorpyrifos, and one batch of samples were detected butralin. **Conclusion** The development and validation quantitative analysis method of 58 pesticide residues based on QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS has good applicability, which is of reference value for the establishment of other pesticide residues in herbs.

Key words: QuEChERS; GC-QQQ-MS/MS; pesticide residues; extraction; purification; quantitative analysis; *Anemarrhena asphodeloides* Bge.

近年来,中药材中农药残留量超标事件时有发生,公众的关注力越来越强。农药残留量超标不但影响中药材的品质,影响临床使用安全,而且还严重影响中药的国际形象,已成为制约中药走出国门的“绿色壁垒”^[1-2]。导致中药材农药残留的原因主要有两个方面^[3-4]:一是在中药材种植过程中,为了预防病虫害、提高产量,施用农药成为生产者采取的必要措施,但部分生产者滥用或误用农药、可挥发农药未过降解期就进行采收等不当生产行为不可避免地造成了中药材的农药残留。二是诸如六六六、滴滴涕等有机氯类农药降解期较长,长期在土壤中残留,药材种植过程中容易转移到药材里面。随着人们对高品质绿色中药材的需求越来越多,加大对中药材外源性有害物质(农残、重金属等)的监测显得尤为紧迫,因此建立快速、灵敏度高、高通量的中药材中农药残留检测方法已成为评控中药材中农药残留量亟须解决的问题。

中药材中农残定量分析存在 2 个技术难点^[5-6]:一是样品的前处理繁琐,目标农残提取困难;二是由于不同的中药材供试品溶液的基质差异大,例如含挥发油类、皂苷类、色素类等,对色谱响应都会造成一定的增强或者减弱影响,即产生基质效应^[7-9]。因此需要对含不同基质的供试品溶液进行提取、净化和浓缩。目前文献报道的样品前处理技术诸如磺化法、固相萃取小柱法、凝胶色谱柱法等存在前处理繁琐、周期长和回收率较低等缺陷,因此目前被《中国药典》2015 年版正式收录的需要测定农药残留的中药材仅有 4 个^[10],显然这远远不能满足目前呼吁提振中药品质的要求。QuEChERS 方法是近年来国际上最新发展起来的一种用于农产品农残检测的快速样品前处理技术,由美国农业部 Anastassiades M. 教授等开发,因其具有快速(quick)、简单(easy)、廉价(cheap)、有效(effective)、可靠(rugged)、安全(safe)的特点而得名 QuEChERS^[11]。与固相萃取小柱(SPE)相比较,其是利用分

散的吸附剂填料吸附杂质从而达到除杂净化的目的,可称为分散固相萃取法^[12-13]。QuEChERS 方法有以下优势^[11,14]:(1)回收率高,对极性、非极性种类的农药均能获得较好的回收率;(2)精确度和准确度高,可用内标法进行校正;(3)前处理时间短,操作简便;(4)有机溶剂使用量少,对环境污染小,价格低廉。

本实验尝试以知母为模式药,建立一种基于 QuEChERS(净化)-GC-QQQ-MS/MS(定性、定量)的 58 种农药快速分析方法,探讨 QuEChERS 方法应用于中药材样品前处理过程的可行性,以期中药材多组分农残检测提供一个参考示例。

1 仪器与试剂

GCMS-TQ8050 三重四极杆气质联用仪,日本岛津公司,配备 AOC-20i 自动进样器;TGL-16 冷冻高速离心机,四川蜀科公司;XS-205 电子天平、AL-204 电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;移液枪 1.0~10 μ L、10~100 μ L,德国 Eppendorf 公司;超声仪(40 kHz),南京新辰生物科技有限公司;Milli-Q 超纯水制备系统,美国 Millipore 公司。

QuEChERS Extract tubes(批号 6358621-01, AOAC Method),配备盐包 1[含无水硫酸镁 6.0 g 与无水乙酸钠 1.5 g 的混合粉末];Dispersive15mL Universal kit(批号 0006357558),配备盐包 2[含无水硫酸镁 1 199.8 mg, N-丙基乙二胺(PSA) 400.1 mg,十八烷基硅烷键合硅胶 400.1 mg,石墨化炭黑 45.0 mg],均购买于安捷伦科技有限公司。31 种有机磷类农药标准品混合储备液(100 μ g/mL,批号 06031627,包括敌敌畏、二苯胺、杀虫脒、氟乐灵、氯硝胺、特丁硫磷、百菌清、毒死蜱、甲基毒死蜱、乙烯菌核利、甲基对硫磷、皮蝇磷、八氯二丙醚、苯氟磺胺、氯酞酸二甲酯、对硫磷、三唑酮、三氯杀螨醇、仲丁灵、溴硫磷、二甲戊乐灵、氟虫腈、腐霉利、三唑醇、嘧草丹、乙基溴硫磷、氟节胺、溴虫腈、除草醚、溴磷酯、喹禾灵),27 种有机氯类农药标准品混合储备液

(100 μg/mL, 批号 06031628, 包括 α-硫丹、β-硫丹、硫丹硫酸盐、o,p'-滴滴伊、o,p'-滴滴滴、p,p'-滴滴伊 (p,p'-DDE)、p,p'-滴滴滴、o,p'-滴滴涕、p,p'-滴滴涕、四氯硝基苯、α-六六六、六氯苯、β-六六六、γ-六六六、δ-六六六、五氯硝基苯、甲氧滴滴涕、灭蚁灵、七氯、艾氏剂、狄试剂、异狄试剂、顺式环氧七氯、氧化氯丹、反式环氧七氯、反式氯丹、顺式氯丹),

购买于德国 Neochema GmbH 公司; 氘代倍硫磷内标储备液 (Fenthion D6, 100 μg/mL, 批号 96566AC) 购买于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。乙腈为色谱纯, 美国 Fisher 公司; 其余试剂为分析纯。30 批次药材 (YP01~YP30) 采集自河北、山西等省, 见表 1。经笔者鉴定为知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge.。药材粉碎成细粉 (过 3 号筛) 备用。

表 1 30 批次样品采集信息

Table 1 Detailed information of 30 batches of samples

编号	野生/栽培	规格	产地	编号	野生/栽培	规格	产地
YP01	栽培	知母药材	安徽十九里镇周庄	YP16	栽培	知母药材	河北西陵镇太平峪村
YP02	栽培	知母药材	安徽十九里镇李门楼村	YP17	栽培	知母药材	河北西陵镇小胡家沟
YP03	栽培	知母药材	河北博野县南杨村	YP18	栽培	知母药材	河北易县山区
YP04	栽培	知母药材	河北安国西寇村	YP19	栽培	知母药材	河北西陵镇太和保村
YP05	栽培	知母药材	河北安国西寇村	YP20	栽培	知母肉	河北西陵镇太平峪村
YP06	野生	知母药材	河北安国西寇村	YP21	栽培	知母药材	河北西陵镇丁家沟
YP07	栽培	知母药材	河北安国南娄村	YP22	野生	知母药材	内蒙古巴林左右旗
YP08	栽培	知母药材	河北安国米庄村	YP23	野生	知母药材	内蒙古赤峰一带
YP09	栽培	知母药材	河北安国石佛镇	YP24	野生	知母药材	山西省万荣县东杜村
YP10	栽培	知母药材	河北安国杜各庄村	YP25	野生	知母药材	山西省寿阳县司家沟村
YP11	野生	知母药材	河北涞源县团圆村	YP26	栽培	知母药材	山西省榆社县李峪村
YP12	栽培	知母药材	河北安国北堡村	YP27	栽培	知母药材	陕西榆林七里庙村
YP13	野生	知母药材	河北赤城县龙文乡	YP28	野生	知母药材	陕西榆林高庙山村
YP14	栽培	知母肉	河北西陵镇丁家沟	YP29	野生	知母药材	陕西榆林高渠乡
YP15	栽培	知母药材	河北西陵镇太和保村	YP30	野生	知母药材	张家口市赤城县龙文乡

2 方法

2.1 色谱条件

以 Shimadzu SH-Rxi-5Sil MS 毛细管柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) 为色谱柱; 进样口温度为 250 °C, 进样量为 1.0 μL, 不分流进样, 高压进样压力为 250 kPa; 载气为高纯氦气, 载气控制方式为恒线速度模式; 色谱柱流量为 1.69 mL/min, 线速度为 47.2 cm/s, 吹扫流量为 5 mL/min; 程序升温: 初始温度为 50 °C, 保持 1 min, 先以 25 °C/min 升温至 125 °C, 再以 10 °C/min 升温至 300 °C, 保持 15 min; 柱平衡时间为 3.0 min。

2.2 质谱条件

离子源为电子轰击源 (EI), 离子化能量 70 eV, 离子源温度为 230 °C, 质谱传输接口温度为 250 °C, 碰撞气为氩气; 质谱监测模式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 溶剂延迟时间为 6 min。为提高检测灵敏度, 本实验采用时间分段、MRM 同步监测各农药。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密量取上述各对照品贮备液、内标贮备溶液适量, 用含 0.05% 醋酸的乙腈分别制成含 100 μg/L 和 1 000 μg/L 的 2 种溶液, 即得。

2.4 供试品溶液的制备

知母药材粉碎成粉末 (过 3 号筛), 取约 3 g, 精密称定, 置 50 mL QuEChERS Extract tubes 中, 加入 1% 冰醋酸溶液 15 mL, 涡旋使药粉充分浸润, 放置 50 min, 精密加入乙腈 15 mL 与内标溶液 100 μL 涡旋使混匀, 置振荡器上剧烈振荡 (800 次/min) 5 min, 置于冰浴中冷却 30 min, 加入盐包 1 [含无水硫酸镁 6.0 g 与无水乙酸钠 1.5 g 的混合粉末], 立即摇散, 再置振荡器上剧烈振荡 (800 次/min) 5 min, 离心 (8 500 转/min) 5 min, 取上清液 9 mL, 置 SPE PSA Packing 净化管, 加入盐包 2 [含无水硫酸镁 1 199.8 mg, N-丙基乙二胺 (PSA) 400.1 mg, 十八烷基硅烷键合硅胶 400.1 mg, 石墨化炭黑 45.0 mg] 中, 涡旋使充分混匀,

再置振荡器上剧烈振荡 (800 次/min) 5 min 使净化完全, 离心 (8 500 r/min) 5 min, 精密吸取上清液 5 mL, 置氮吹仪上于 30 ℃ 水浴浓缩至约 0.2 mL, 加乙腈定容至 1 mL, 涡旋混匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 内标溶液的制备

精密量取内标贮备溶液适量, 加乙腈制成含 8 μg/mL 的溶液, 即得。

2.6 阴性供试品溶液的制备

按照“2.4”项下方法制备缺少知母药材的阴性供试品溶液, 备用。

2.7 空白供试品溶液的筛选

取编号为 YP01~YP30 的知母样品, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样分析。采用岛津公司“农残保留指数数据库”对 58 种目标农药进行初筛分析, 找出空白基质样品 (即 58 种目标农药在供试品溶液中不得检出), 最终确认 YP01 样品作为空白样品。

2.8 基质混合对照品溶液的制备

取空白样品 3 g, 一式 6 份, 同供试品溶液的制备方法处理至“置氮吹仪上于 30 ℃ 水浴浓缩至约 0.2 mL”, 分别加入混合对照品溶液 (100 μg/L) 50、100 μL, 混合对照品溶液 (1 000 μg/L) 50、100、200、400 μL, 内标溶液 100 μL, 加乙腈定容至 1 mL, 涡旋混匀, 用微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过, 取续滤液, 即得系列基质混合对照品溶液。

2.9 方法学考察

2.9.1 专属性考察 (取样空白试验) 为考察提取溶剂和提取材料对供试品是否存在干扰, 按照上述供试品溶液的制备方法, 制备缺少知母药材的阴性供试品溶液, 注入气质仪测定。结果显示 58 种目标农药在阴性供试品溶液中均未检测出, 表明提取溶剂和提取材料对实验结果无干扰。

2.9.2 线性关系考察 精密吸取“2.3”项混合对照品溶液 1.0 μL, 注入气质色谱仪, 得各目标农药相应的定量、定性离子对峰面积, 以各个农药的质量浓度与内标物质的质量浓度的比值为横坐标 (X), 以各个农药的定量离子对峰面积与内标物质的定量离子对峰面积的比值为纵坐标 (Y), 经线性回归, 得到各个目标农药的回归方程和线性相关系数 (r)。结果显示所测定的 58 种农药 r 均大于 0.995, 表明在各目标农药中进样量为 0.005~0.400 ng 内呈良好的线性关系。见表 2。

表 2 4 种被检测出农药的线性关系考察结果

Table 2 Linearity of four pesticide residues

农药名称	线性方程式	r
氟乐灵	$Y=0.020\ 06\ X+5.883\times 10^{-4}$	0.999 8
毒死蜱	$Y=0.040\ 16\ X+3.559\times 10^{-3}$	0.999 1
仲丁灵	$Y=0.012\ 58\ X-1.112\times 10^{-3}$	0.999 3
p,p'-DDE	$Y=0.148\ X+0.010\ 57$	0.999 7

2.9.3 方法的检出限及定量限 根据《中国药典》2015 年版四部药品质量标准分析方法验证指导原则中信噪比法来计算检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 采用上述线性关系考察中质量浓度为 5 ng/mL 的采集数据来确定, 计算方式为峰对峰。以 3 倍信噪比 ($S/N=3$) 对应的目标物浓度作为检出限, 以 10 倍信噪比 ($S/N=10$) 对应的目标物质量浓度作为定量限, 结果见表 3。

2.9.4 精密度考察 精密吸取同一吸取基质混合对照品溶液 (5 ng/mL), 按上述测定方法, 连续进样 6 次, 按照内标法计算各个目标农药的含量, 计算 RSD 值。结果显示各个目标农药含量的 RSD 值均小于 1.82%, 表明仪器的精密度良好。

2.9.5 重复性考察 取同一批次知母药材粉末, 共 6 份, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 按照内标法计算各个目标农药的含量, 计算 RSD 值。结果显示各目标农药的含量 RSD 值为 2.97%~4.88%, 表明该方法的重复性良好。

2.9.6 稳定性考察 取同一份知母药材粉末, 按照上述“2.4”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、16、48 h 进行测定, 按照内标法计算各个目标农药的质量分数, 计算 RSD 值。测定结果显示各个目标农药含量的 RSD 值在 1.37%~4.85%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.9.7 加样回收率试验 取空白样品 (YP01) 粉末 6 份, 精密称定, 再精密加入基质混合对照品溶液 5 mL (各农药质量浓度为 10 ng/mL), 按照上述“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样测定并计算回收率。结果显示, 各个目标农药的加样回收率为 70.52%~126.77%, RSD 值为 3.78%~5.02%, 结果表明各个目标农药 (百菌清除外) 的加样回收率符合要求。

2.10 样品测定

精密吸取供试品溶液和基质混合对照品溶液各 1.0 μL, 注入气相色谱-串联质谱仪, 按内标标准曲线法计算供试品中 58 种农药残留量。

表 3 58 种农药检测参数优化结果

Table 3 GC-MS/MS detection parameters of 58 pesticides

编号	农药	保留时间/min	母离子	子离子	碰撞能量/V	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	敌敌畏	6.018	109.00	79.00	8.00	0.143 1	0.477 0
			185.00	93.00	14.00		
2	四氯硝基苯	9.671	260.90	202.90	14.00	0.023 2	0.077 4
			202.90	142.90	22.00		
3	二苯胺	10.037	169.10	66.00	24.00	0.009 6	0.032 1
			167.10	139.10	28.00		
4	杀虫脒	10.407	196.00	181.00	10.00	0.534 0	1.780 0
			181.00	140.00	15.00		
5	氟乐灵	10.409	306.10	264.10	8.00	0.006 2	0.020 6
			264.10	160.10	18.00		
6	α -六六六	10.848	180.90	144.90	16.00	0.006 7	0.022 4
			218.90	182.90	8.00		
7	六氯苯	10.938	283.80	248.80	24.00	0.005 3	0.017 6
			283.80	213.80	28.00		
8	氯硝胺	11.093	206.00	176.00	10.00	0.018 2	0.060 8
			176.00	148.00	12.00		
9	β -六六六	11.328	180.90	144.90	16.00	0.006 8	0.022 8
			218.90	182.90	8.00		
10	五氯硝基苯	11.437	264.80	236.80	10.00	0.036 6	0.122 0
			294.80	236.80	15.00		
11	γ -六六六	11.527	180.90	144.90	16.00	0.007 9	0.026 3
			218.90	182.90	8.00		
12	特丁硫磷	11.606	231.00	128.90	26.00	0.010 0	0.033 2
			231.00	174.90	14.00		
13	百菌清	11.839	263.90	168.00	24.00	0.014 5	0.048 4
			263.90	228.80	18.00		
14	δ -六六六	12.060	180.90	144.90	16.00	0.007 0	0.023 4
			218.90	182.90	8.00		
15	甲基毒死蜱	12.683	285.90	93.00	22.00	0.011 3	0.037 6
			287.90	93.00	22.00		
16	乙烯菌核利	12.755	212.00	172.00	16.00	0.017 5	0.058 4
			285.00	212.00	12.00		
17	甲基对硫磷	12.794	263.00	109.00	14.00	0.059 7	0.199 0
			125.00	47.00	12.00		
18	七氯	13.002	271.80	236.90	20.00	0.055 1	0.183 6
			273.80	238.90	16.00		
19	皮蝇磷	13.027	284.90	269.90	16.00	0.173 5	0.578 2
			286.90	271.90	18.00		
20	八氯二丙醚	13.172	130.00	95.00	20.00	0.038 5	0.128 3
			181.00	85.00	10.00		
21	苯氟磺胺	13.440	223.90	123.10	8.00	0.017 2	0.057 2
			167.10	124.10	10.00		
22	毒死蜱	13.615	196.90	168.90	14.00	0.022 9	0.076 5
			313.90	257.90	14.00		
23	艾氏剂	13.712	262.90	191.00	34.00	0.033 3	0.110 8
			262.90	193.00	28.00		
24	氯酞酸二甲酯	13.717	298.90	220.90	24.00	0.004 1	0.013 8
			300.90	222.90	26.00		
25	对硫磷	13.757	139.00	109.00	8.00	0.028 0	0.093 2
			291.10	109.00	14.00		
26	三唑酮	13.822	208.10	181.00	10.00	0.014 3	0.047 7
			208.10	111.00	22.00		
27	三氯杀螨醇	13.912	139.00	111.00	16.00	0.005 2	0.017 5
			139.00	75.00	28.00		
28	仲丁灵	13.971	266.10	190.10	12.00	0.041 4	0.138 1
			266.10	236.10	8.00		
29	溴硫磷	14.048	330.90	315.90	14.00	0.009 4	0.031 3
			328.90	313.90	18.00		
30	二甲戊乐灵	14.262	252.10	162.10	10.00	0.029 1	0.097 1
			252.10	191.10	8.00		
31	氟虫腈	14.325	366.90	212.90	30.00	0.013 2	0.044 2
			368.90	214.90	30.00		
32	顺式环氧七氯	14.462	352.80	262.90	14.00	0.022 0	0.073 5
			354.80	264.90	20.00		

续表 3

编号	农药	保留时间/min	母离子	子离子	碰撞能量/V	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
33	反式环氧七氯	14.463	352.80	253.00	26.00	0.045 0	0.150 0
			354.80	253.00	18.00		
34	氧化氯丹	14.464	185.00	149.00	6.00	0.019 1	0.063 8
			185.00	121.00	12.00		
35	腐霉利	14.643	283.00	96.00	10.00	0.006 4	0.021 3
			285.00	96.00	10.00		
36	三唑醇-1	14.640	168.10	70.00	10.00	0.152 4	0.508 1
			128.10	65.00	22.00		
36	三唑醇-2	14.787	168.10	70.00	10.00	0.670 2	2.234 1
			128.10	65.00	22.00		
37	啶草丹	14.653	119.10	91.10	10.00	0.304 9	1.016 3
			145.10	112.10	8.00		
38	乙基溴硫磷	14.852	358.90	302.90	16.00	0.004 9	0.016 5
			302.90	284.90	18.00		
39	反式氯丹	14.917	374.80	265.90	26.00	0.020 1	0.067 0
			372.80	263.90	28.00		
40	o,p'-滴滴伊	14.956	246.00	176.00	30.00	0.021 5	0.071 6
			248.00	176.00	28.00		
41	氟节胺	15.025	143.00	107.00	21.00	0.012 9	0.043 0
			143.00	83.00	18.00		
42	顺式氯丹	15.172	374.80	265.90	26.00	0.015 1	0.050 3
			372.80	263.90	28.00		
43	α -硫丹	15.176	194.90	160.00	8.00	0.017 4	0.058 1
			194.90	125.00	24.00		
44	p,p'-DDE	15.572	246.00	176.00	30.00	0.003 6	0.012 1
			317.90	248.00	24.00		
45	狄氏剂	15.695	276.90	241.00	8.00	0.037 2	0.124 1
			262.90	193.00	34.00		
46	o,p'-滴滴涕	15.699	235.00	165.00	24.00	0.042 3	0.141 1
			237.00	165.00	28.00		
47	溴虫腈	15.861	247.10	227.00	16.00	0.027 1	0.090 3
			139.00	102.00	12.00		
48	除草醚	16.021	202.00	139.00	24.00	0.015 0	0.049 9
			282.90	253.00	12.00		
49	异狄氏剂	16.091	262.90	191.00	30.00	0.057 1	0.190 2
			262.90	193.00	28.00		
50	β -硫丹	16.282	194.90	160.00	8.00	0.019 9	0.066 4
			194.90	125.00	24.00		
51	p,p'-滴滴涕	16.361	235.00	165.00	24.00	0.042 8	0.142 6
			237.00	165.00	28.00		
52	o,p'-滴滴涕	16.419	235.00	165.00	24.00	0.063 9	0.213 1
			237.00	165.00	28.00		
53	硫丹硫酸盐	17.000	271.80	236.90	18.00	0.004 9	0.016 5
			386.80	252.90	16.00		
54	p,p'-滴滴涕	17.074	235.00	165.00	24.00	0.070 7	0.235 6
			237.00	165.00	28.00		
55	溴螨酯	18.004	340.90	182.90	18.00	0.002 8	0.009 4
			340.90	184.90	20.00		
56	甲氧滴滴涕	18.089	227.10	169.10	24.00	0.003 0	0.010 1
			227.10	212.10	14.00		
57	灭蚁灵	19.072	271.80	236.80	18.00	0.001 6	0.005 5
			273.80	238.80	18.00		
58	喹禾灵	20.767	372.10	299.10	14.00	0.007 7	0.025 5
			299.10	255.10	18.00		

三唑醇存在异构体, 存在 2 个异构体峰的保留时间

Because triadimenol has two isomers, there are two retention times

3 结果与分析

精密吸取供试品溶液和基质混合对照品溶液各 1.0 μL , 注入气相色谱-串联质谱仪, 典型质谱图见图 1, 典型色谱图见图 2。按内标标准曲线法计算供试品中 58 种农药残留量, 结果见表 4。通过对不同产地、野生与栽培品种、不同规格的知母药材进行 58 种农药残留量的定量测定, 结果显示 30 个批次内共有 6 个批次知母药材检测到了微量的 p,p' -DDE, 3 个批次检测到了氟乐灵, 2 个批次检测到了毒死蜱, 1 个批次检测到了微量的仲丁灵。但是考虑到 p,p' -DDE 此类农药国家早已经禁止使用, 推测主要来自于土壤中的残留。测定结果显示知母药材中农药残留种类较少, 且农药残留量较小, 结合知母的日常用量 (6~12 g)^[6]、服药频次等因素,

综合而言, 知母药材中农药残留处于一个比较安全的范围内。

4 讨论

由于同时检测的农药种类较多, 不同农药之间的极性差异较大, 而且知母药材中大量的皂苷类物质会影响部分农药提取, 提取溶剂需充分渗入药材组织内部才能得到良好的提取效果, 因而对知母药材的前处理要求较高。知母药材粉末提取前需加入 1% 冰醋酸水溶液使其充分浸润, 以使提取试剂与供试品粉末充分接触, 同时 1% 冰醋酸水溶液与盐包 1 中的醋酸钠形成缓冲体系, 有利于保持一些结构不稳定的农药保持稳定性。乙腈对于知母供试品粉末中的色素、脂质等非极性成分的溶解能力较小, 而且更容易通过盐析作用除去样品中的水分, 故本方

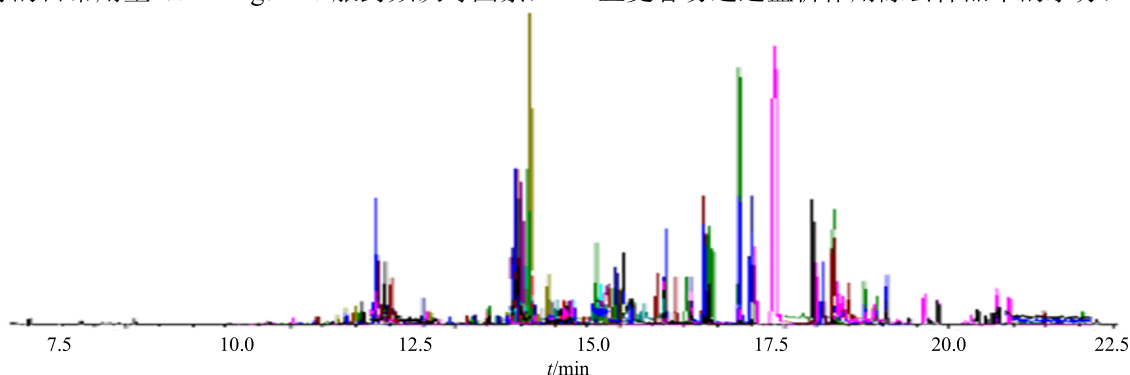
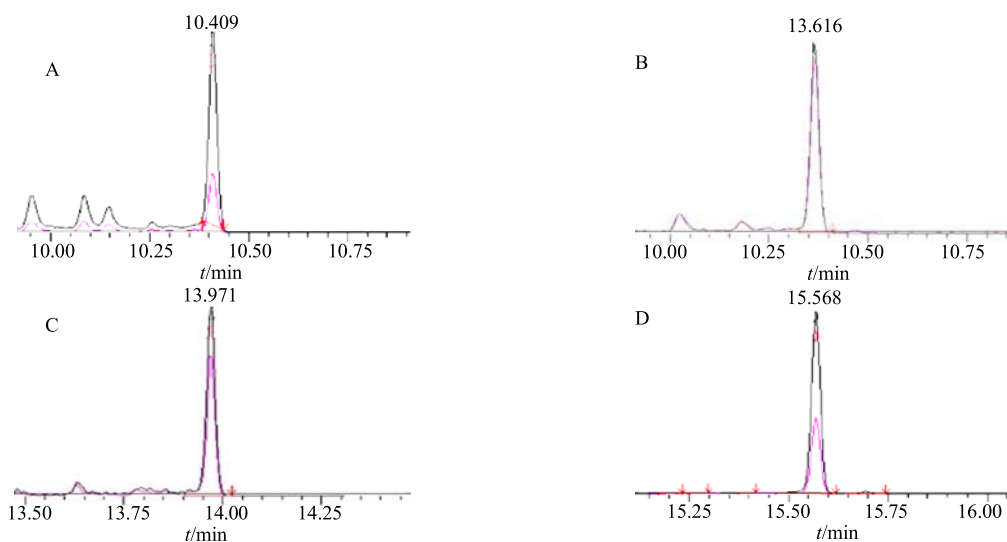


图 1 典型的知母基质混合对照品加入 58 种农药对照品溶液 MRM 监测结果 TIC

Fig. 1 TIC of MRM monitoring result of sample and standard substance mixed solution



A、B、C、D-氟乐灵、毒死蜱、仲丁灵、 p,p' -DDE 的质谱图

A, B, C, D-mass chromatograms of trifluralin, chlorpyrifos, butralin, p,p' -DDE

图 2 4 种检出农药供试品的 MRM 监测结果质谱图

Fig. 2 Typical mass chromatograms of MRM monitoring results of four pesticides

表 4 30 批次知母药材 4 种检出农药残留量测定结果

Table 4 Determination results of 4 pesticides in 30 batches of samples

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)				编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)			
	p,p'-DDE	氟乐灵	毒死蜱	仲丁灵		p,p'-DDE	氟乐灵	毒死蜱	仲丁灵
YP01	ND	ND	ND	ND	YP16	ND	ND	ND	ND
YP02	ND	ND	ND	ND	YP17	ND	ND	ND	ND
YP03	ND	ND	ND	ND	YP18	ND	ND	ND	ND
YP04	ND	ND	ND	ND	YP19	ND	18.11	ND	ND
YP05	ND	ND	ND	ND	YP20	ND	ND	11.14	ND
YP06	ND	ND	ND	ND	YP21	6.75	ND	ND	ND
YP07	ND	ND	ND	ND	YP22	ND	ND	ND	ND
YP08	2.68	14.88	ND	ND	YP23	ND	ND	ND	64.87
YP09	2.47	ND	6.05	ND	YP24	3.42	28.6	ND	ND
YP10	ND	ND	ND	ND	YP25	ND	ND	ND	ND
YP11	ND	ND	ND	ND	YP26	2.01	ND	ND	ND
YP12	5.24	ND	ND	ND	YP27	ND	ND	ND	ND
YP13	ND	ND	ND	ND	YP28	ND	ND	ND	ND
YP14	ND	ND	ND	ND	YP29	ND	ND	ND	ND
YP15	ND	ND	ND	ND	YP30	ND	ND	ND	ND

ND-代表未检出, 其余 54 种农药质谱确认未检出, 未在表中列出

ND-represent not detected, and the other 54 pesticides were not detected and confirmed by mass spectrometry, so they are not listed in table

法采用乙腈作为提取溶剂。供试品提取时加入的盐包 1 中无水乙酸钠有利于提取体系中水与乙腈的分配平衡; 无水硫酸镁可进一步除水。供试品净化时加入的盐包 2 中 PSA 能够吸附供试品中许多极性基质成分, 如亲脂性色素、糖类等, 而对农药残留物无吸附作用; 十八烷基硅烷键合硅胶对非极性物质有较高的容量, 可吸附油脂和其他一些非极性的杂质, 但对各种农药化合物几乎没有吸附; 实际上供试品净化时加入的盐包 2 起到分散固相萃取作用 (dispersive-SPE) [12], 即使用盐和多孔吸附填料组合对提取后的供试品溶液进一步除去干扰物, 净化基质。

在进行中药材农药残留定量分析时, 基质效应对农药残留的准确度和定量具有较大影响^[15-16], 因而逐渐受到药学研究者的重视。在 GC/MS 分析中较常出现基质增强效应, 本实验采用 QuEChERS 法更好地净化供试品溶液 (减少与目标分析物同时到达离子源的基质的数量)、使用基质匹配标准曲线进行校正、使用稳定的同位素内标进行校正等 3 个措施共同消除基质效应, 保证分析结果的准确性。

农药残留量是中药材品质评价的重要指标, 目前我国有关中药材中农药残留的分析技术和质量标准相对落后的主要原因在于分析方法的缺乏。简单、快速、高通量的前处理技术和高灵敏度的检测技术是农药多残留检测的发展趋势^[17]。GC-MS/MS、

LC-MS/MS 联用技术特别适用于供试品溶液基质干扰严重、定性困难、供试品中目标组分含量低的情况, 将成为中药材中农药多残留检测技术发展的必然趋势。本实验以知母为模式药, 建立了基于 QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS 的 58 种农药残留量同时测定方法, 对其他中药材农药多残留检测方法的建立具有参考价值。

参考文献

- [1] 钱韵旭. 国外新农残标准对中药出口的影响及对策研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2014.
- [2] 霍卫, 姜丽. 2013 年中药材和中药饮片出口分析 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(3): 241-243.
- [3] 傅巧真, 林慧彬, 林建强, 等. 中药材农药残留原因及防治措施的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 925-927.
- [4] 王丽丽, 夏会龙. 我国中草药中农药残留的特点 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 471-474.
- [5] 孔令军, 张娅婷, 庞会利, 等. 中药材农药残留的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 231-234.
- [6] 李淑芬, 全灿, 王幼君, 等. 中药材中农药残留的脱除与检测研究 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 232-234.
- [7] Li Y, Pang G F, Fan C L, et al. Hierarchical cluster analysis of matrix effects on 110 pesticide residues in 28 tea matrixes [J]. JAOAC Int, 2013, 96(6): 1453-1465.
- [8] Tsuchiyama T, Katsuhara M, Nakajima M, et al. Compensation of matrix effects in gas

- chromatography-mass spectrometry analysis of pesticides using a combination of matrix matching and multiple isotopically labeled internal standards [J]. *J Chromatogr A*, 2017, doi:10.1016/j.chroma.2017.09.072.
- [9] 黄宝勇. 果蔬中农药多残留的气相色谱-质谱方法与基质效应的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] Anastassiades M, Lehotay S J, Schenck F J, *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce [J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(2): 412-431.
- [12] Martins M L, Kemmerich M, Prestes O D, *et al.* Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.080.
- [13] Qin Y, Zhang J, Li Y, *et al.* Automated multi-filtration cleanup with nitrogen-enriched activated carbon material as pesticide multi-residue analysis method in representative crop commodities [J]. *J Chromatogr A*, 2017, doi:10.1016/j.chroma.2017.08.009.
- [14] Trevisan M T, Owen R W, Calatayud-Vernich P, *et al.* Pesticide analysis in coffee leaves using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and liquid chromatography tandem mass spectrometry: Optimization of the clean-up step [J]. *J Chromatogr A*, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.033.
- [15] Moreno-González D, Alcántara-Durán J, Gilbert-López B, *et al.* Matrix-effect free quantitative liquid chromatography mass spectrometry analysis in complex matrices using nanoflow LC with integrated emitter tip and high dilution factors [J]. *J Chromatogr A*, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.09.006.
- [16] 贺利民, 刘祥国, 曾振灵. 气相色谱分析农药残留的基质效应及其解决方法 [J]. 色谱, 2008, 26(1): 98-104.
- [17] 盛 静, 管 健, 吴永江, 等. 气相色谱-质谱联用法测定杭白菊中 32 种残留农药 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1568-1572.