

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.21.008

百合中乐果等3种农药残留的气相色谱-串联质谱法一测多评研究

陈波¹, 高羽¹, 余敏灵², 朱敏凤²

(1. 四川省成都市妇女儿童中心医院, 四川 成都 610000; 2. 四川省乐山市食品药品检验检测中心, 四川 乐山 614000)

摘要:目的 建立气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)测定百合中乐果等3种农药残留的一测多评方法。方法 样品经乙腈提取、Cleanert TPH柱净化、GC-MS/MS测定,根据色谱峰相对保留时间和质荷比信息进行定性分析,以乐果二级离子扫描峰(125/79)面积为参照,计算其与敌敌畏二级离子扫描峰(185/93)面积和毒死蜱二级离子扫描峰(313.9/257.9)面积之间的相对校正因子,建立以乐果为对照品,测定百合中乐果等3种农药残留量的GC-MS/MS法。结果 敌敌畏、乐果、毒死蜱进样量均在0.1~1.0 ng范围内与其色谱峰面积均有较好的线性关系,检出限(以进样量计)敌敌畏为 1.84×10^{-4} ng,乐果为 2.87×10^{-2} ng,毒死蜱为 1.75×10^{-4} ng;平均回收率敌敌畏为95.46%,乐果为96.21%,毒死蜱为96.01%,RSD分别为0.99%,0.92%,0.74%(n=9)。结论 该一测多评方法定量准确、简单、快速,适用于百合中敌敌畏、乐果、毒死蜱农药残留的定量分析。

关键词:气相色谱-串联质谱;含量测定;百合;敌敌畏;乐果;毒死蜱;一测多评;农药残留

中图分类号:R932;R284.1;S481.8

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)21-0027-04

Study on QAMS of Three Pesticide Residues Such as Dimethoate in *Lilii Bulbus* by GC-MS/MS

Chen Bo¹, Gao Yu¹, Yu Minling², Zhu Minfeng²

(1. Chengdu Women's and Children's Center Hospital, Chengdu, Sichuan, China 610000; 2. Leshan Food and Drug Control, Leshan, Sichuan, China 614000)

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS) method for the simultaneous determination of three pesticide residues such as dimethoate in *Lilii Bulbus* by GC-MS/MS. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile, purified by Cleanert TPH column and determined by GC-MS/MS. Information on relative retention time and mass charge ratio was used for qualitative analysis, the peak area obtained by secondary ion MS of dimethoate(125/79) was taken as the reference peak to calculate the relative correction factors for the peak area of dichlorvos(185/93) and chlorpyrifos(313.9/257.9), to establish a GC-MS/MS method for determination of three pesticide residues such as dimethoate in *Lilii Bulbus* with dimethoate as the reference substance. **Results** There was a good linear correlation in the range of 0.1~1.0 ng for dichlorvos, dimethoate and chlorpyrifos. Limit of quantification(calculated in sample size) of dichlorvos, dimethoate and chlorpyrifos were 1.84×10^{-4} ng, 2.87×10^{-2} ng, 1.75×10^{-4} ng, respectively. The average recovery rates of dichlorvos, dimethoate and chlorpyrifos were 95.46%, 96.21% and 96.01%, respectively, and RSDs were 0.99%, 0.92% and 0.74% (n=9). **Conclusion** The QAMS method is accurate, simple and rapid, which is suitable for the quantitative analysis of residual quantity of dichlorvos, dimethoate and chlorpyrifos residues in *Lilii Bulbus*.

Key words: GC-MS/MS; content determination; *Lilii Bulbus*; dichlorvos; dimethoate; chlorpyrifos; quantitative analysis of multi-components by single marker; pesticide residues

中药材种植及中药饮片加工储存过程中农药的不当使用,均会影响中药饮片质量,危害人体健康^[1]。2015年版《中国药典(四部)》收载了多种有机磷农药残留的气相色谱检查方法^[2]。近年来,农药残留研究多以气相色谱、液相色谱或与其与质谱的联用为主^[3-5]。本研究中根据色谱保留时间和质荷比信息对样品进行定性分析,以乐果二级离子扫描色谱峰(125/79)面积为参照,计算其与敌敌畏二级离子扫描色谱峰(185/93)面积和毒死蜱二级离子扫描色谱峰(313.9/257.9)面积的校正因子,建立定量准确测定百合^[6]中乐果等3种农药残留的一测多评方法,以期测定农药残留量提供一测多评^[7-11]研究思路。现报道如下。

1 材料与仪器

1.1 材料

敌敌畏、乐果、毒死蜱标准品溶液(批号分别为GSB05-2298-2016, GSB05-2286-2016, GSB05-1849-2016),均为农业部环境监测保护研究所提供,规格均为100 μg/mL;乙腈、丙酮(北京百灵威科技有限公司)均为色谱纯;氯化钠、无水硫酸钠(成都市科龙化工试剂厂)均为优级纯;百合样品(四川龙马药业有限公司,批号分别为20160516, 20160721, 20170815),由乐山市食品药品检验检测中心朱敏凤主管中药师鉴定为 *Brown var. viridulum* Bak 的干燥肉质鳞叶(百合 *Lilium brownii* F. E.),符合2015年版《中国药典(一部)》规定。

1.2 仪器

GCMS-TQ8030 气质联用仪(岛津中国科技有限公司);GC-MS/MS 7008 气质联用仪(美国 Agilent 公司);TSQ 8000 气质联用仪(美国赛默飞世尔科技公司)。色谱柱 1:Rxi-5SilMS, 30 m×0.25 mm, 0.25 μm 毛细管柱(岛津中国科技有限公司);色谱柱 2:Rxi-5SilMS, 30 m×0.25 mm, 0.25 μm 毛细管柱(美国 Agilent 公司);色谱柱 3:Rxi-5SilMS, 30 m×0.25 mm, 0.25 μm 毛细管柱(美国 Restek 公司)。电子天平(德国 Satorius 公司);Cleanert TPH 净化柱(天津博纳艾杰尔公司)。

2 方法与结果

2.1 测定原理

利用样品色谱图中被测物质色谱峰相对保留时间进行定位^[2]和图谱中二级离子碎片峰[乐果为 47, 62, 79 碎片离子峰(丰度比为 155:13:100, 以 79 为参比)、敌敌畏为 63, 93, 109(丰度比为 24:100:25, 以 93 为参比)、毒死蜱为 194, 258, 286(丰度比为 24:100:49, 以 258 为参比)]对乐果、敌敌畏、毒死蜱色谱峰进行定性分析。精密量取乐果、敌敌畏、毒死蜱标准品溶液各适量,配制成不同质量浓度的混合溶液,按设定条件进样,记录色谱图,绘制乐果、敌敌畏、毒死蜱进样量对其峰面积的回归曲线,以乐果回归曲线斜率与敌敌畏、毒死蜱回归曲线斜率的比计算校正因子($f_{sk} = K_s / K_k$),通过乐果回归曲线计算乐果含量,通过校正因子及乐果回归曲线计算敌敌畏、毒死蜱含量^[2]进行定量分析。

2.2 溶液制备

取各标准品溶液,用丙酮稀配置成每 1 mL 含乐果、敌敌畏、毒死蜱各 10 μg 的溶液,作为标准品对照贮备液。取百合(批号为 20160516)约 50 g,粉碎过三号筛,称取 1.7324 g,精密称定,置 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈,匀浆(15 000 r/min)提取 1 min,加入 2.5 g 氯化钠,匀浆提取 1 min,离心(4 200 r/min)5 min,上清液置 150 mL 鸡心瓶中,离心管中加入 15 mL 乙腈,按上述方法匀浆提取 1 次,合并提取液,40℃水浴旋转蒸发至约 1 mL。加入约 2 cm 高无水硫酸钠于 Cleanert TPH 固相萃取柱上,用正己烷-丙酮(6:4)预洗 10 mL,将浓缩液移入柱中,用正己烷-丙酮(6:4)25 mL 洗脱,洗脱液于 40℃水浴旋转浓缩至近干,用丙酮稀释至 1 mL,用 0.2 μm 滤膜过滤,即得供试品溶液;除称取样品外,按上述方法制备空白溶液。取供试品溶液制备项下百合粉末 1.0213 g,精密称定,同法从“置 50 mL 离心管中起到收集洗脱液于 40℃水浴旋转浓缩至近干”转移至 1 mL 容量瓶中,加 5 μL 标准贮备溶液,用丙酮稀释至刻度,摇匀,用 0.2 μm 滤膜过滤,即得样品加标溶液。

2.3 测定条件

2.3.1 气相色谱条件

色谱柱:Rxi-5SilMS 毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);线速度:47.2 cm/s;进样口温度:250℃;程序升温:50℃保持 1 min,以 25℃/min 速率升至 125℃,再以 10℃/min 速率升至 300℃,保持 15 min;进样体积:1 μL;载气:氦气(纯度大于 99.999%)。

2.3.2 质谱条件

接口温度:250℃;离子源温度:200℃;溶剂延迟时间:5 min;碰撞气:氦气(纯度大于 99.999%)。碰撞电压设置和检测离子选择:敌敌畏母离子为 185.0(碰撞电压 70 eV),子离子分别为 93.0(碰撞电压 14 eV)、109.0(碰撞电压 14 eV)、63.0(碰撞电压 22 eV);乐果母离子为 125.0(碰撞电压 70 eV),子离子分别为 79.0(碰撞电压 8 eV)、47.0(碰撞电压 14 eV)、62.0(碰撞电压 10 eV);毒死蜱母离子为 313.9(碰撞电压 70 eV),子离子分别为 257.9(碰撞电压 14 eV)、285.9(碰撞电压 8 eV)、193.9(碰撞电压 28 eV)。

2.4 图谱解析

精密量取标准品贮备溶液 50 μL,置 1 mL 容量瓶中,加丙酮定容,作为对照品溶液。按 2.3.1 项下色谱条件,取对照品溶液、供试品溶液、样品加标溶液、空白溶液分别进样,记录色谱图。结果在对照品溶液二级离子扫描色谱图中,有敌敌畏二级离子扫描峰(185/93)、乐果二级离子扫描峰(125/79)和毒死蜱二级离子扫描峰(313.9/257.9),保留时间分别为 5.690, 10.663, 13.191 min,在空白溶液色谱和供试品溶液色谱中无上述色谱峰,在样品加标溶液色谱中有和对照品溶液色谱保留时间一致的敌敌畏、乐果和毒死蜱二级离子扫描色谱峰,详见图 1。对照品溶液和样品加标溶液的二级离子碎片图谱中敌敌畏在 63, 93, 109 处(丰度比为 24:100:25),乐果在 47, 62, 79 处(丰度比为 155:13:100),毒死蜱在 194, 258, 286 处(丰度比为 24:100:49),有二级离子碎片峰,详见图 2。

2.5 方法学考察

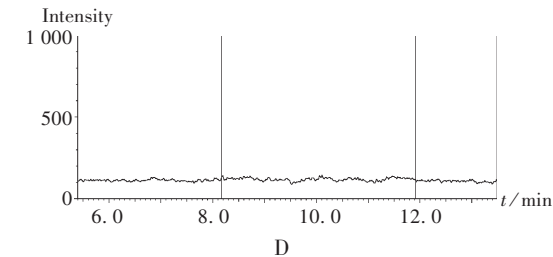
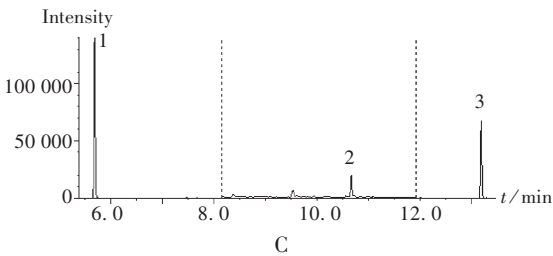
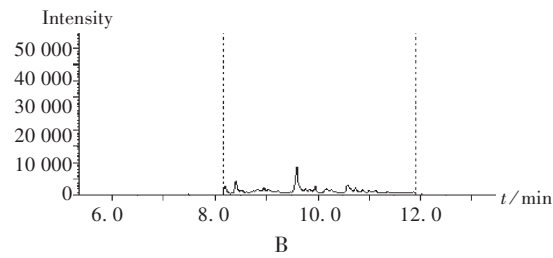
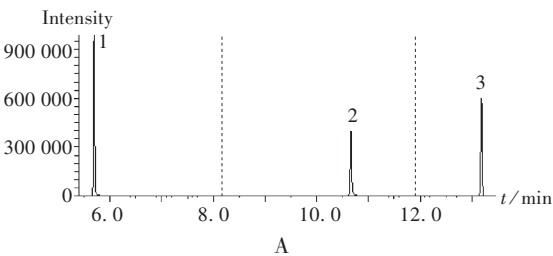
线性关系考察:精密量取标准品贮备溶液 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100 μL,分别置 7 个 1 mL 容量瓶中,加丙酮稀释至刻度,摇匀,按 2.3.1 项下色谱条件测定。以各组二级离子扫描峰面积(A)与进样量(m, ng)进行线性回归,得回归方程。结果见表 1。

f 值和 t 值测定与耐受性考察:校正因子 $f_{敌/乐} = 2016535/615311 = 3.2773$, $f_{毒/乐} = 1278304/615311 = 2.0775$;相对保留时间 $t_{敌/乐} = 5.690/10.663 = 0.5336$, $t_{毒/乐} = 13.191/10.663 = 1.2371$ 。实际应用中,色谱仪、色谱柱、色谱条件的变化可能引起 f 值变化,因此对不同仪器、不同色谱柱、线速度、进样体积可能影响 f 值

表1 线性关系考察、精密度、重复性、稳定性试验及检出限确定结果

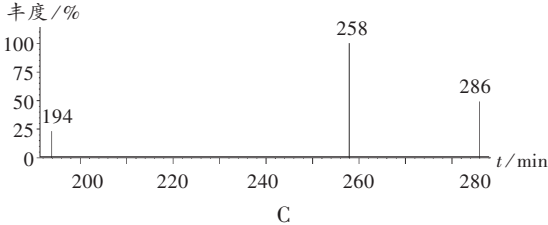
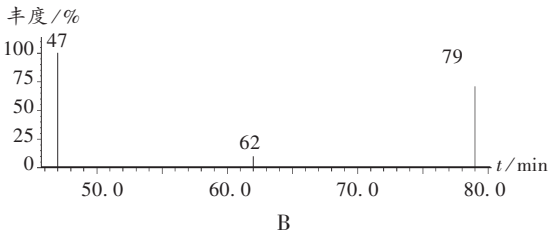
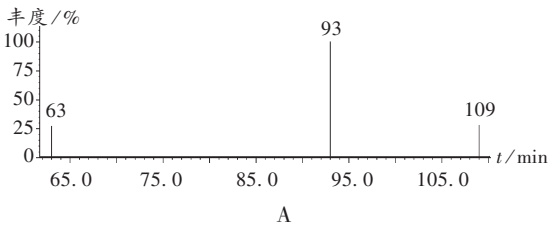
组分	二级离子 扫描峰	线性关系		精密度 ($n=6$)		重复性 ($n=6$)		稳定性试验 $RSD(\%)$	检出限		
		回归方程	$r(n=7)$ 线性范围(ng)	峰面积	$RSD(\%)$	峰面积	$RSD(\%)$		S/N	检出限(ng)	定量限(ng)
A	185/93	$A=2016.535m-203$	0.999 7 0.1~1.0	806 838	0.55	806 512	0.76	1.12	815.94	1.84×10^{-4}	6.13×10^{-4}
B	125/79	$A=615.311m-173$	0.999 8 0.1~1.0	245 986	0.40	246 063	0.71	1.01	5.23	2.87×10^{-2}	9.56×10^{-2}
C	313.9/257.9	$A=1278.304m-68$	0.999 3 0.1~1.0	511 833	0.80	511 436	0.60	0.96	857.55	1.75×10^{-4}	5.83×10^{-4}

注:A为敌敌畏,B为乐果,C为毒死蜱。下表同。



1. 敌敌畏 2. 乐果 3. 毒死蜱
A. 标准品溶液 B. 样品溶液
C. 样品加标溶液 D. 空白溶液
图1 二级离子扫描色谱图

的因素进行考察,结果表明, f 值的波动不大。详见表2。
精密度试验:精密量取标准品贮备溶液 40 μL ,置 1 mL 容量瓶中,加丙酮稀释至刻度,摇匀。按 2.3.1 项下色谱条件重复进样 6 次。结果见表 1。
重复性试验:精密量取标准品贮备溶液 40 μL ,分别置 6 个 1 mL 容量瓶,加丙酮稀释至刻度,摇匀。按 2.3.1 项下色谱条件分别进样。结果见表 1。
稳定性试验:取 2.4 项下样品加标溶液,按 2.3 项下测定条件分别在 0, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 20, 24 h 时进



A. 敌敌畏 B. 乐果 C. 毒死蜱
图2 二级离子碎片图谱

表2 相对校正因子耐受性考察结果

项目	$f_{\text{敌/乐}}$	$f_{\text{毒/乐}}$
进样体积(μL)	0.9	3.280 3 2.069 9
	1.0	3.277 3 2.077 5
	1.1	3.277 8 2.067 8
速度(cm/s)	46.2	3.276 5 2.074 3
	47.2	3.277 3 2.077 5
	48.2	3.273 8 2.078 1
仪器	GCMS-TQ8030(Shimadzu)	3.275 6 2.078 1
	GC-MS/MS 7008(Agilent)	3.277 3 2.077 5
	TSQ8000(Thermo Scientific)	3.278 2 2.078 7
色谱柱	Rxi-5SilMS(Shimadzu)	3.276 3 2.076 5
	Rxi-5SilMS(Agilent)	3.277 3 2.077 5
	Rxi-5SilMS(Restek)	3.278 8 2.079 2

样,结果乐果、敌敌畏、毒死蜱色谱峰峰面积变化不大。结果见表 1。
检出限确定:取 2.4 项下样品加标溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,测得信噪比(S/N),以 3 倍 S/N 计算检出限、10 倍 S/N 计算定量限。结果见表 1。
加样回收试验:取 2.2 项下样品粉末 9 份,每份约

表3 加样回收试验结果($n=9$)

样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量(μg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.000 0	0.400 0	0.382 0	0.386 0	0.384 9	95.50	96.50	96.23						
0.000 0	0.400 0	0.384 8	0.390 1	0.379 6	96.20	97.53	94.90						
0.000 0	0.400 0	0.378 9	0.379 6	0.386 0	94.73	94.90	96.50						
0.000 0	0.500 0	0.485 6	0.477 2	0.479 1	97.12	95.44	95.82						
0.000 0	0.500 0	0.476 7	0.481 5	0.481 6	95.34	96.30	96.32	95.46	96.21	96.01	0.99	0.92	0.74
0.000 0	0.500 0	0.469 1	0.487 1	0.485 6	93.82	97.42	97.12						
0.000 0	0.600 0	0.570 2	0.579 1	0.578 4	95.03	96.52	96.40						
0.000 0	0.600 0	0.571 9	0.574 9	0.574 9	95.32	95.82	95.82						
0.000 0	0.600 0	0.576 7	0.573 1	0.570 1	96.12	95.52	95.02						

1 g,精密称定,分别置9个50 mL离心管中,分为3组,每组3份,第1组中每份加标准品贮备溶液40 μL ,第2组中每份加标准品贮备溶液50 μL ,第3组中每份加标准品贮备溶液60 μL ,依法制备样品溶液,取样品溶液按2.3.1项下色谱条件分别进样,记录色谱图,按回归方程计算含量。结果见表3。

2.6 样品含量测定

取3批(批号分别为20160516,20160721,20170815)样品,各20 g,粉碎过三号筛,分别取约1 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,取供试品溶液按2.3.1项下色谱条件分别进样,记录色谱图,按加样回收试验方法计算含量。结果3批样品中敌敌畏、乐果、毒死蜱残留量均为0。

3 讨论

本研究证实了可以采用GC-MS/MS测定百合中乐果等3种农药残留,对采用GC-MS/MS法测定样品中物质含量提供了一测多评、数字对照品等的试验设计思路。一测多评法是以一种对照品,建立该成分与其他成分间的相对响应因子,通过相对响应因子来计算其他成分含量的一种质量控制方法,具有成本低、效率高等优点,能有效解决多指标质量控制面临的对照品短缺、不易获得和检测成本相对昂贵等问题。在试验中,对多种药材农药残留的含量测定进行了研究,发现由于中药材含有多种成分,某些成分对测定会有一些干扰,故在测定具体某一品种时应设计具体的试验参数,并进行相应方法学论证。

当色谱条件有细微改变时,相对保留时间有细微变化,但在本试验中,被测定物质的定性主要采用二级离子碎片峰及其丰度比确认,故对相对保留时间的耐受性没有进行考察。

仪器厂家建议进样体积不超过1 μL ,在相对校正因子 f 值耐受性考察时,对进样体积0.9,1.0,1.1 μL 时的 f 进行了比较,结果变化不大。

因乙腈对农药溶解度较大,可溶入的杂质质量适中,故选择乙腈为提取液;在Cleanert TPH固相萃取柱上加入约

2 cm高无水硫酸钠以除去样品溶液及洗脱液中的水分。

质谱分析检测限可达 $10^{-15} \sim 10^{-12}$ mol数量级,适合于农药残留的检测,在定性分析时采用色谱-串联质谱,电子轰击离子化比较待测化合物质谱图谱确定化合物的成分。

GC-MS联用法和GC-串联MS(MS/MS)联用法既具有GC的高分离效能,又具有MS可鉴定化合物结构的特点,可同时快速测定样品中多种残留农药及其衍生物。

参考文献:

- [1] 殷玉杰,夏秀萍,毛福英,等.药用植物中农药残留检测技术的研究进展[J].中国药房,2017,28(12):1271-1275.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:209-223.
- [3] 程志,张蓉,刘韦华,等.气相色谱-串联质谱法快速筛查测定中药材中144种农药残留[J].色谱,2014,32(1):57-58.
- [4] 闫震,聂继云,徐国锋,等.超高效液相色谱-串联质谱法对比4种净化方式对不同色素含量基质中19种农药残留检测的影响[J].分析测试学报,2014,33(9):1000-1009.
- [5] 刘姣,刘雪峰,樊宝娟.GC-MS法测定18种药材中的农药残留量[J].西北药学杂志,2017,32(1):9-13.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:132.
- [7] 朱晶晶,王智民,匡艳辉,等.一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量[J].药学学报,2008,43(12):1211-1216.
- [8] 朱静毅,李静,闻琰毓,等.校正因子法同时测定非洛地平及其片剂中的3个杂质[J].药物分析杂志,2014,34(2):281-286.
- [9] 徐赛华,沈昱翔.一测多评法测定重楼药材中4种皂苷类成分含量[J].医药导报,2017,36(9):1029-1033.
- [10] 吕邵娃,于凤明,苏红,等.中药材一测多评中相对校正因子的规范性文献调查和分析[J].中国药房,2016,27(15):2020-2023.
- [11] 陈杨,徐光临,徐德生,等.一测多评法在中药质量中的控制及关键问题[J].环球中医药,2017,10(5):635-640.

(收稿日期:2017-12-28;修回日期:2018-07-13)