

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)01-0062-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.01.013



亲水亲油平衡固相萃取小柱结合气相色谱-串联质谱法 测定大果木姜子药材中禁用农药残留*

汪洋^{1,2}, 蒋礼^{1,2}, 黎雪^{1,3}, 朱帮会^{1,3}, 郑林^{1,2}, 李勇军^{1,2,3}, 马雪^{1,2,Δ}

(1. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心·省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室·国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 561113)

摘要:目的 建立检测大果木姜子药材中禁用农药残留量的亲水亲油平衡(HLB)固相萃取小柱结合气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法。方法 样品经正己烷-乙腈-饱和氯化钠水溶液三相分配除去部分杂质,农药组分转移至乙腈提取液中,以加强型HLB固相萃取小柱净化,采用GC-MS/MS多反应监测模式(MRM)进行测定,以基质内标法定量。结果 大果木姜子药材中禁用农药残留物在各自质量浓度范围内与待测成分峰面积/内标峰面积线性关系良好($R^2 > 0.99, n = 6$);在3个添加水平下,平均回收率为61.80%~125.53%,RSD为1.90%~14.77%($n = 6$)。15批大果木姜子药材中均未检出禁用农药残留。结论 该方法操作简便、准确性和重复性好,可用于大果木姜子药材中禁用农药残留量的测定。

关键词:大果木姜子;气相色谱-串联质谱法;亲水亲油平衡;固相萃取;禁用农药残留

Determination of Forbidden Pesticide Residues in *Cinnamomum Migao* by HLB-SPE with GC-MS/MS

WANG Yang^{1,2}, JIANG Li^{1,2}, LI Xue^{1,3}, ZHU Banghui^{1,3}, ZHENG Lin^{1,2}, LI Yongjun^{1,2,3}, MA Xue^{1,2}

(1. Guizhou Medical University Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM < Ministry of Education > · State Key Laboratory for Functions and Applications of Medicinal Plants, Guiyang, Guizhou, China 550004; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory for Pharmaceutics · National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 3. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 561113)

Abstract: Objective To establish a hydrophilic-lipophilic equilibrium (HLB)-solid-phase extraction (SPE) combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method for determination of forbidden pesticide residues in *Cinnamomum migao*. **Methods** The sample was partitioned into three-phases distribution with n-hexane-acetonitrile-saturated sodium chloride aqueous solution to remove some impurities. The pesticide components were transferred to the acetonitrile extraction solution and purified by the enhanced HLB-SPE column. GC-MS/MS with multi-reaction monitoring mode (MRM) was used for determination, with matrix internal standard method for quantification. **Results** There was a good linear relationship between the peak area of the tested component and the peak area of the internal standard within the respective mass concentration ranges of the forbidden pesticide residues in *Cinnamomum migao* ($R^2 > 0.99, n = 6$). At three levels of addition, the average recoveries were in the range of 61.80% - 125.53%, with RSDs of 1.90% - 14.77% ($n = 6$). No forbidden pesticide residue was detected in the 15 batches of *Cinnamomum migao*. **Conclusion** This method is simple, accurate, and has good repeatability, which can be used for the determination of forbidden pesticide residues in *Cinnamomum migao*.

Key words: *Cinnamomum migao*; GC-MS/MS; HLB; SPE; forbidden pesticide residues

大果木姜子为贵州省苗族习用药材,别名米槁 *Cinnamomum migao* H. W. Li, 是樟科植物米槁的干燥成熟果实,多分布于贵州、云南、广西等省/自治区,主要含挥发油类、脂肪油类、倍半萜类、香豆素类等化合物^[1-3]。大果木姜子富含大量挥发油^[4-6],是发挥药理学作用的主要活性成分^[5,7-8],治疗胸痛、胸闷及哮喘的效果较好,以大果木姜子为主药的产品有心胃止痛

胶囊、米槁心乐滴丸、理气活血滴丸^[9]。为减少病虫害等对中药材种植造成的损失,广泛使用农药,故中药材在生长、收获、储存和加工过程中会受到农药等外部污染物的影响,其农药残留等质量安全问题受到了广泛关注^[10]。国家药典委员会结合我国中药发展现阶段的情况,制定了2020年版《中国药典(一部)》中药材及饮片(植物类)中33种禁用农药残留一致性限量标准

*基金项目:国家自然科学基金委-贵州喀斯特中心项目[U1812403-5-1];贵州省科技计划项目[黔科合中引地[2023]006]。

第一作者:汪洋,男,硕士研究生,助理实验师,研究方向为中药药效物质基础及质量控制,(电子信箱)291584813@qq.com。

Δ通信作者:马雪,女,博士研究生在读,副教授,研究方向为中药药效物质基础及质量控制,(电子信箱)xuema0111@163.com。

和有关指导原则,以进一步加强中药材的质量安全控制^[11-13]。气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法为当前常用的农药残留检测方法,但挥发油等低极性基质使用该法进行检测时的干扰较大。2020年版《中国药典(四部)》通则2341 农药残留量测定法第五法药材及饮片(植物类)中禁用农药多残留测定法中提供了3种样品前处理方法^[11],但很多特殊基质的药材按规定方法无法达到检测要求^[14-15]。高挥发油药材大果木姜子在使用这3种前处理方法时,无法将大果木姜子提取的高油脂基质净化完全,导致部分农残成分丢失,无法达到检测要求。因此,本研究中考考虑高挥发油基质干扰因素,建立了测定大果木姜子药材中禁用农药残留量的亲水亲油平衡(HLB)固相萃取小柱结合GC-MS/MS法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

GCMS-TQ8040型三重四极杆气质联用仪(日本Shimadzu公司),配有电子轰击源(EI);AE240型分析天平(梅特勒<上海>有限公司,精度为十万分之一);高速中药粉碎机(浙江铂欧电器有限公司);MTN2800D型氮吹仪(天津奥特塞恩斯仪器公司);MX-S型涡旋振荡器(杭州米欧仪器有限公司);Allegra 30R Centrifuge型低温高速离心机(美国Beckman Coulter有限公司);HY-5B型回旋式振荡器(金坛区白塔新宝仪器厂);LC-SFJ-10型手持式高速匀浆机(上海力辰西仪器科技有限公司);加强型SelectCore HLB-C固相萃取柱(纳谱分析技术<苏州>有限公司,规格为500 mg:6 mL)。

1.2 试剂

33种禁用农药混合标准溶液[北京曼哈格生物科技有限公司,批号为D0018095,含55种农药残留化合物,其中10种GC-MS/MS法和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法共测成分分别为久效磷、杀虫脒、苯线磷、蝇毒磷、治螟磷、甲拌磷、甲基异柳磷、内吸磷、灭线磷、水胺硫磷,详见表1];磷酸三苯酯对照品溶液(内标,上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号为S060565,质量浓度为100 μg/mL);乙腈(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号为20230814);冰乙酸、氯化钠、无水硫酸镁、正己烷均为分析纯;15批大果木姜子药材来源于贵州省罗甸县,经贵州医科大学药学院刘春花副教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 GC条件

色谱柱:Shimadzu SH-Rxi-17Sil MS柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm);进样口温度:250 °C,不分流进样;

载气:高纯度氦气(He);进样口模式:恒压模式;柱前压力:146 kPa;程序升温:初始温度60 °C,保持1 min,以5 °C/min的速率升至120 °C,再以2 °C/min的速率升至160 °C,再以2 °C/min的速率升至230 °C,最后以10 °C/min的速率升至310 °C,保持6 min;进样量:1 μL。

2.1.2 MS条件

离子源:EI;离子源电压:70 eV;离子源温度:250 °C;溶剂延迟时间:21 min;碰撞气:氩气(Ar);质谱传输接口温度:250 °C;监测模式:多反应监测(MRM)。各农药残留物的保留时间与MS参数见表2。

2.2 溶液制备

农药混合对照品溶液:精密量取33种禁用农药混合标准溶液1 mL,置10 mL容量瓶中,加乙腈定容,摇匀,即得33种禁用农药中间贮备液;精密量取33种禁用农药中间贮备液1 mL,置2 mL容量瓶中,加乙腈定容,即得农药混合对照品溶液,-20 °C避光保存。各浓度见表3。

内标溶液:精密量取磷酸三苯酯对照品溶液1 mL,置10 mL容量瓶中,加乙腈定容,即得质量浓度为10 μg/mL的内标贮备液;精密量取内标贮备液0.1 mL,置10 mL容量瓶中,加乙腈定容,即得质量浓度为100 ng/mL的内标溶液,转移至棕色储液瓶中,-20 °C避光保存。

供试品溶液:1)提取。取大果木姜子粉末(过3号筛)5 g,精密称定,加入15 mL正己烷、50 mL正己烷饱和乙腈、10 mL饱和氯化钠水溶液,涡旋,混匀,置振荡器上剧烈振荡,离心(转速为1 000 r/min)10 min,收集中间乙腈层,取出;再用50 mL正己烷饱和乙腈萃取1次,离心;合并2次乙腈提取液,40 °C减压旋转蒸发至10 mL,即得大果木姜子提取液。2)净化。取加强型SelectCore HLB-C固相萃取柱,加乙腈5 mL活化,再取大果木姜子提取液2 mL,置已活化的加强型SelectCore HLB-C固相萃取柱中,收集样品液,待所有样品液进入柱体填料后,取5 mL乙腈洗脱,合并样品液与洗脱液,氮气吹至2 mL,即得供试品溶液。

空白基质溶液:取空白基质样品,按供试品溶液制备方法制备空白基质溶液。

基质标准曲线溶液:分别精密量取空白基质溶液1 mL,平行6份,置氮吹仪上,40 °C浓缩至约0.6 mL,分别加入农药混合对照品溶液10, 20, 50, 100, 150, 200 μL,加乙腈稀释至1 mL,涡旋,混匀,即得。基质标准曲线系列质量浓度见表4。

2.3 测定方法与数据处理

分别精密吸取基质标准曲线溶液和供试品溶液各1 mL,精密加入内标溶液0.3 mL,混匀,滤过,取续滤液,精密吸取1 μL,按2.1项下试验条件进样测定,按内

表1 33种禁用农药混合标准溶液相关信息

Tab.1 Information on mixed standard solutions of 33 forbidden pesticides

编号	农药名称	残留物	质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	纯度 (%)	定量限 (mg/kg)	可检出残留物		编号	农药名称	残留物	质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	纯度 (%)	定量限 (mg/kg)	可检出残留物		
						GC-MS/ MS法	LC-MS/ MS法							GC-MS/ MS法	LC-MS/ MS法	
1	甲胺磷	甲胺磷	10.0	98.2	0.05		*	19	胺苯磷隆	胺苯磷隆	10.0	96.4	0.05		*	
2	甲基对硫磷	甲基对硫磷	4.0	98.4	0.02	*		20	甲磷隆	甲磷隆	10.0	99.2	0.05		*	
3	对硫磷	对硫磷	4.0	99.1	0.02	*		21	甲拌磷	甲拌磷	4.0	96.8	0.02	*	*	
4	久效磷	久效磷	6.0	98.1	0.03	*	*			甲拌磷砒	4.0	99.0	0.02		*	
5	磷胺	磷胺	10.0	97.9	0.05		*			甲拌磷亚砒	4.0	99.9	0.02		*	
6	六六六	α -六六六	10.0	99.5	0.1	*		22	甲基异柳磷	甲基异柳磷	4.0	93.8	0.02	*	*	
		β -六六六	10.0	98.0	0.1	*		23	内吸磷	内吸磷-0	1.8	98.4	0.02	*	*	
		γ -六六六	10.0	99.8	0.1	*				内吸磷-S	2.2	95.5	0.02	*	*	
		δ -六六六	10.0	98.0	0.1	*		24	克百威	克百威	10.0	99.3	0.05		*	
7	滴滴涕	4,4'-滴滴涕	10.0	99.9	0.1	*				3-羟基克百威	10.0	97.4	0.05		*	
		2,4'-滴滴涕	10.0	97.7	0.1	*		25	涕灭威	涕灭威	20.0	98.9	0.1		*	
		4,4'-滴滴伊	10.0	99.5	0.1	*				涕灭威砒	20.0	98.3	0.1		*	
		4,4'-滴滴滴	10.0	98.9	0.1	*				涕灭威亚砒	20.0	99.9	0.1		*	
8	杀虫脒	杀虫脒	4.0	98.9	0.02	*	*	26	灭线磷	灭线磷	4.0	98.5	0.02	*	*	
9	除草醚	除草醚	10.0	99.9	0.05	*		27	氯唑磷	氯唑磷	2.0	99.2	0.01		*	
10	艾氏剂	艾氏剂	10.0	98.4	0.05	*		28	水胺硫磷	水胺硫磷	10.0	99.4	0.05	*	*	
11	狄氏剂	狄氏剂	10.0	98.2	0.05	*		29	硫丹	α -硫丹	10.0	98.2	0.05	*		
12	苯线磷	苯线磷	4.0	99.4	0.02	*	*				β -硫丹	10.0	99.0	0.05	*	
		苯线磷砒	4.0	99.7	0.02	*					硫丹硫酸酯	10.0	98.2	0.05	*	
		苯线磷亚砒	4.0	99.4	0.02	*		30	氟虫腈	氟虫腈	4.0	98.5	0.02	*		
13	地虫硫磷	地虫硫磷	4.0	98.5	0.02	*				氟甲腈	4.0	99.4	0.02	*		
14	硫线磷	硫线磷	4.0	99.7	0.02	*				氟虫腈砒	4.0	99.9	0.02	*		
15	蝇毒磷	蝇毒磷	10.0	99.2	0.05	*	*			氟虫腈亚砒	4.0	95.3	0.02	*		
16	治螟磷	治螟磷	4.0	97.1	0.02	*	*	31	三氯杀螨醇	o,p' -三氯杀螨醇	8.9	99.8	0.2	*		
17	特丁硫磷	特丁硫磷	4.0	99.1	0.02	*					p,p' -三氯杀螨醇	1.1	96.4	0.2	*	
		特丁硫磷砒	4.0	99.5	0.02	*		32	硫环磷	硫环磷	6.0	99.5	0.03		*	
		特丁硫磷亚砒	4.0	99.9	0.02	*		33	甲基硫环磷	甲基硫环磷	6.0	99.0	0.03	*		
18	氯磷隆	氯磷隆	10.0	99.2	0.05		*									

注:*表示该项下检测到残留物。

Note:* indicates residue detected under this item.

标准曲线法计算。采用Microsoft Office 365 Excel软件处理数据,采用Shimadzu分析工作站分析数据。

2.4 方法学考察

基质效应(M_e)考察:基质效应是在提取基质中的目标物时,基质中的干扰物影响目标化合物的离子化,使目标化合物在仪器上的响应发生了增强或抑制的现象。在GC-MS/MS分析中常为基质增强效应,主要表现为基质匹配标准溶液与相同浓度的纯溶剂标准溶液相比,具有更高的吸收值和更好的色谱峰峰形。基质效应的相对强度(%)=(基质标准溶液的峰面积比值/溶剂标准溶液的峰面积比值)×100%。将相同浓度的基质加标准曲线溶液点和溶剂标准曲线溶液点分别按2.1

项下试验条件和2.3项下测定方法同时进样测定,结果显示,所有农药均为强基质增强效应,溶剂标准曲线溶液点中各农药色谱峰峰形的响应差,必须使用基质加标准曲线溶液才能最大限度地减小由基质效应带来的测定不准确性^[16-18]。

线性关系考察:取2.2项下基质标准曲线溶液,按2.1项下试验条件及2.3项下测定方法进样测定,以各待测成分的质量浓度($X, \text{ng}/\text{mL}$)为横坐标、待测成分峰面积/内标峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表5,表明各农药残留物在各自质量浓度范围内与待测成分峰面积/内标峰面积线性关系良好,相关系数(R^2)均大于0.99,满足农药残留的分析要求。

表2 各农药残留物保留时间与质谱参数

Tab. 2 Retention time and mass spectrometry parameters of each pesticide residue

编号	农药残留物	保留时间(min)	质荷比(m/z)		碰撞电压(V)	编号	农药残留物	保留时间(min)	质荷比(m/z)		碰撞电压(V)
			定量离子	定性离子					定量离子	定性离子	
1	灭线磷	27.2	157.8>96.7	199.7>114.0	20*/5	17	p,p'-三氯杀螨醇	46.2	250.0>139.0	250.0>215.0	15*/5
2	治螟磷	29.5	322.0>174.0	322.0>294.0	15*/10	18	甲基异柳磷	47.1	241.0>120.8	241.0>199.0	20*/5
3	甲拌磷	29.4	260.0>75.0	230.8>175.0	5*/10	19	α-硫丹	48.9	240.8>205.6	240.8>170.0	15*/25
4	α-六六六	30.4	181.0>145.0	218.7>182.9	15*/5	20	氟虫腈砒	55.0	383.0>255.0	383.0>213.0	20*/32
5	特丁硫磷	32.1	230.8>129.0	230.8>175.0	25*/13	21	狄氏剂	51.8	263.0>193.0	276.8>240.7	35*/10
6	内吸磷-S	33.0	88.0>60.0	88.0>59.0	4*/20	22	4,4'-滴滴伊	52.3	246.0>176.0	316.0>246.0	30*/25
7	γ-六六六	34.6	181.0>145.0	218.7>182.9	15*/5	23	苯线磷	55.3	303.1>154.0	303.1>122.0	30*/20
8	氟甲腈	40.2	388.0>333.0	388.0>281.0	20*/35	24	甲基硫环磷	56.4	227.0>92.0	227.0>60.0	10*/30
9	β-六六六	39.4	181.0>145.0	218.7>182.9	15*/5	25	除草醚	57.7	201.8>138.7	282.8>253.0	28*/10
10	δ-六六六	41.3	181.0>145.0	218.7>182.9	15*/5	26	2,4'-滴滴涕	56.8	235.0>199.0	235.0>165.0	18*/25
11	艾氏剂	39.1	262.7>192.7	255.0>220.0	30*/20	27	4,4'-滴滴滴	58.6	235.0>165.0	237.0>165.0	25*/25
12	甲基对硫磷	42.7	263.1>109.0	125.0>47.0	13*/10	28	β-硫丹	58.4	206.8>171.8	194.8>124.7	15*/30
13	o,p'-三氯杀螨醇	43.4	250.0>139.0	250.0>215.0	15*/5	29	4,4'-滴滴涕	60.7	237.0>165.0	235.0>199.0	25*/15
14	氟虫腈亚砒	47.2	420.0>351.0	420.0>255.0	12*/20	30	硫丹硫酸酯	63.1	271.8>236.7	273.8>238.9	15*/15
15	氟虫腈	47.6	367.0>213.0	351.0>255.0	35*/20	31	蝇毒磷	73.8	361.8>109.0	361.8>81.0	16*/32
16	对硫磷	45.6	291.0>109.0	291.0>81.0	25*/30	32	磷酸三苯酯(内标)	66.4	326.0>233.0	326.0>215.0	10*/25

注:*为定量离子。

Note:* refers to quantitative ions.

表3 农药混合对照品溶液质量浓度

Tab. 3 Mass concentration of mixed reference solution of pesticides

编号	农药残留物	33种禁用农药混合	中间贮备液	混合对照品	编号	农药残留物	33种禁用农药混合	中间贮备液	混合对照品
		标准溶液(μg/mL)	(μg/mL)	溶液(ng/mL)			标准溶液(μg/mL)	(μg/mL)	溶液(ng/mL)
1	灭线磷	4.0	0.40	200	17	p,p'-三氯杀螨醇	8.9	0.89	445
2	治螟磷	4.0	0.40	200	18	甲基异柳磷	4.0	0.40	200
3	甲拌磷	4.0	0.40	200	19	α-硫丹	10.0	1.00	500
4	α-六六六	10.0	1.00	500	20	氟虫腈砒	4.0	0.40	200
5	特丁硫磷	4.0	0.40	200	21	狄氏剂	10.0	1.00	500
6	内吸磷-S	2.2	0.22	110	22	4,4'-滴滴伊	10.0	1.00	500
7	γ-六六六	10.0	1.00	500	23	苯线磷	4.0	0.40	200
8	氟甲腈	4.0	0.40	200	24	甲基硫环磷	6.0	0.60	300
9	β-六六六	10.0	1.00	500	25	除草醚	10.0	1.00	500
10	δ-六六六	10.0	1.00	500	26	2,4'-滴滴涕	10.0	1.00	500
11	艾氏剂	10.0	1.00	500	27	4,4'-滴滴滴	10.0	1.00	500
12	甲基对硫磷	4.0	0.40	200	28	β-硫丹	10.0	1.00	500
13	o,p'-三氯杀螨醇	1.1	0.11	55	29	4,4'-滴滴涕	10.0	1.00	500
14	氟虫腈亚砒	4.0	0.40	200	30	硫丹硫酸酯	10.0	1.00	500
15	氟虫腈	4.0	0.40	200	31	蝇毒磷	10.0	1.00	500
16	对硫磷	4.0	0.40	200					

加样回收试验:分别取大果木姜子空白基质样品5g,根据2020年版《中国药典(四部)》通则2341 农药残留量测定法中第五法药材及饮片(植物类)禁用农药规定定量限,分别以1倍定量限、2倍定量限、4倍定量限3个浓度水平加入混合对照品溶液,即分别加0.5,1.0,

2.0 mL混合对照品溶液,按2.2项下空白基质溶液制备方法处理样品,每个浓度水平各平行6份,按2.1项下试验条件及2.3项下测定方法进样测定,记录峰面积,并计算平均回收率。结果平均回收率为61.80%~125.53%,RSD为1.90%~14.77%(n=6),2020年版

表4 基质标准曲线系列溶液质量浓度(ng/mL)

Tab. 4 Mass concentration of standard curve series solution of each matrix (ng/mL)

编号	农药残留物	Std-1 (10 μL)	Std-2 (20 μL)	Std-3 (50 μL)	Std-4 (100 μL)	Std-5 (150 μL)	Std-6 (200 μL)	编号	农药残留物	Std-1 (10 μL)	Std-2 (20 μL)	Std-3 (50 μL)	Std-4 (100 μL)	Std-5 (150 μL)	Std-6 (200 μL)
1	灭线磷	2	4	10	20	30	40	17	<i>p,p'</i> -三氯杀螨醇	4.45	8.9	22.25	44.5	66.75	89
2	治螟磷	2	4	10	20	30	40	18	甲基异柳磷	2	4	10	20	30	40
3	甲拌磷	2	4	10	20	30	40	19	α -硫丹	5	10	25	50	75	100
4	α -六六六	5	10	25	50	75	100	20	氟虫腈砒	2	4	10	20	30	40
5	特丁硫磷	2	4	10	20	30	40	21	狄氏剂	5	10	25	50	75	100
6	内吸磷-S	1	2	5	10	15	20	22	4,4'-滴滴伊	5	10	25	50	75	100
7	γ -六六六	5	10	25	50	75	100	23	苯线磷	2	4	10	20	30	40
8	氟甲腈	2	4	10	20	30	40	24	甲基硫环磷	3	6	15	30	45	60
9	β -六六六	5	10	25	50	75	100	25	除草醚	5	10	25	50	75	100
10	δ -六六六	5	10	25	50	75	100	26	2,4'-滴滴涕	5	10	25	50	75	100
11	艾氏剂	5	10	25	50	75	100	27	4,4'-滴滴涕	5	10	25	50	75	100
12	甲基对硫磷	2	4	10	20	30	40	28	β -硫丹	5	10	25	50	75	100
13	<i>o,p'</i> -三氯杀螨醇	0.55	1.1	2.75	5.5	7.5	11	29	4,4'-滴滴涕	5	10	25	50	75	100
14	氟虫腈亚砒	2	4	10	20	30	40	30	硫丹硫酸酯	5	10	25	50	75	100
15	氟虫腈	2	4	10	20	30	40	31	蝇毒磷	5	10	25	50	75	100
16	对硫磷	2	4	10	20	30	40								

表5 线性关系考察与加样回收试验结果

Tab. 5 Results of the linear relation test and the recovery test

农药残留物	回归方程	线性范围 (ng/mL)	R^2	加样回收试验[平均回收率(RSD),%, $n=6$]			农药残留物	回归方程	线性范围 (ng/mL)	R^2	加样回收试验[平均回收率(RSD),%, $n=6$]		
				高	中	低					高	中	低
灭线磷	$Y=0.036167X+0.014042$	2~40	0.9938	108.81(3.77)	108.36(5.57)	112.50(5.11)	<i>p,p'</i> -三氯杀螨醇	$Y=0.028191X+0.089419$	4.45~89	0.9955	108.75(6.90)	115.04(5.10)	112.11(12.51)
治螟磷	$Y=0.020156X+0.010301$	2~40	0.9982	114.88(6.64)	121.83(3.15)	116.69(5.92)	甲基异柳磷	$Y=0.041566X+0.019864$	2~40	0.9960	110.23(7.00)	120.68(3.31)	119.54(9.91)
甲拌磷	$Y=0.015270X+0.007233$	2~40	0.9951	111.71(3.21)	115.38(2.15)	110.88(5.19)	α -硫丹	$Y=0.007639X+0.017089$	5~100	0.9965	97.04(6.35)	104.58(5.15)	103.37(10.29)
α -六六六	$Y=0.061940X+0.057513$	5~100	0.9986	113.47(5.41)	116.49(5.89)	111.44(7.64)	氟虫腈砒	$Y=0.034343X-0.007137$	2~40	0.9974	98.35(3.39)	104.02(4.16)	100.43(7.69)
特丁硫磷	$Y=0.055247X+0.106124$	2~40	0.9945	110.61(4.87)	121.37(3.74)	108.23(7.26)	狄氏剂	$Y=0.005658X+0.019287$	5~100	0.9970	102.83(5.27)	117.44(4.33)	103.73(6.52)
内吸磷-S	$Y=0.143227X+0.594028$	1~20	0.9906	102.83(10.18)	80.12(12.66)	108.71(9.01)	4,4'-滴滴伊	$Y=0.087258X+0.203430$	5~100	0.9990	75.04(4.56)	81.77(5.41)	79.36(4.84)
γ -六六六	$Y=0.043232X+0.738127$	5~100	0.9951	114.56(9.64)	119.22(4.67)	101.81(8.50)	苯线磷	$Y=0.007530X+0.010547$	2~40	0.9894	109.39(6.79)	113.08(8.98)	111.10(6.44)
氟甲腈	$Y=0.038225X+0.030596$	2~40	0.9967	115.96(3.39)	121.66(3.40)	119.97(5.90)	甲基硫环磷	$Y=0.007990X+0.022797$	3~60	0.9946	100.22(7.51)	111.31(13.03)	96.69(9.89)
β -六六六	$Y=0.047589X+0.330977$	5~100	0.9934	105.82(6.04)	95.71(11.20)	114.59(11.09)	除草醚	$Y=0.001669X+0.000969$	5~100	0.9992	111.78(9.99)	119.17(6.42)	112.14(9.45)
δ -六六六	$Y=0.041413X+0.593097$	5~100	0.9928	110.81(8.34)	99.49(10.22)	99.44(14.77)	2,4'-滴滴涕	$Y=0.044647X+0.163110$	5~100	0.9953	84.44(2.88)	86.83(5.18)	81.40(4.55)
艾氏剂	$Y=0.008986X-0.021600$	5~100	0.9989	61.80(3.73)	71.58(4.04)	77.14(8.50)	4,4'-滴滴涕	$Y=0.186059X+0.540368$	5~100	0.9981	107.64(2.27)	115.71(2.19)	113.12(1.90)
甲基对硫磷	$Y=0.006291X+0.042288$	2~40	0.9939	108.01(5.95)	85.22(11.03)	104.96(8.97)	β -硫丹	$Y=0.006382X-0.010515$	5~100	0.9974	104.21(6.56)	114.25(6.43)	113.65(8.68)
<i>o,p'</i> -三氯杀螨醇	$Y=0.395948X-0.128198$	0.55~11	0.9982	107.22(6.40)	93.81(4.28)	102.30(12.05)	4,4'-滴滴涕	$Y=0.117147X+0.492138$	5~100	0.9954	89.60(1.90)	92.30(3.43)	87.07(2.02)
氟虫腈亚砒	$Y=0.035201X+0.035180$	2~40	0.9946	115.26(7.47)	125.53(6.00)	120.00(8.56)	硫丹硫酸酯	$Y=0.025426X+0.068869$	5~100	0.9970	105.86(3.98)	107.85(4.87)	105.56(4.98)
氟虫腈	$Y=0.023702X+0.027155$	2~40	0.9964	112.92(4.88)	115.17(10.47)	116.00(14.19)	蝇毒磷	$Y=0.004485X+0.024912$	5~100	0.9940	106.99(5.56)	115.61(3.82)	112.54(8.38)
对硫磷	$Y=0.002265X+0.003908$	2~40	0.9911	100.19(8.05)	79.77(13.46)	105.11(8.79)							

《中国药典(四部)》通则 2341 农药残留量测定法中第五法药材及饮片(植物类)中禁用农药多残留测定法中规定,加样回收率应在70%~120%范围内,在满足重复性要求的情况下部分农药回收率可放宽至60%~130%,表明准确度和精密密度均满足农药残留分析的要求。

精密密度试验:样品为空白基质,均未检出上述农药

残留物,故将加样回收试验中的加标回收数据作为连续测定的数据,结果的RSD为1.90%~14.77%($n=6$)。详见表5。

2.5 样品中农药残留量测定

取15批大果木姜子药材各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件和2.3项下测定方法进行测定。结果15批大果木姜子药材中均未检出农药。

3 讨论

3.1 前处理方法选择

中药材成分复杂,包含色素、油脂、有机酸等干扰成分,干扰基质会影响目标化合物的出峰、响应响度、保留时间等,故应选择适合药材自身特性的前处理方法,才能保证目标农药化合物的检测条件。2020年版《中国药典(四部)》中的药材前处理方法为乙腈直接提取后,根据药材基质特性选择过分散型净化材料的净化管(无水硫酸镁 1 200 mg, *N*-丙基乙二胺 300 mg,十八烷基硅烷键合硅胶 100 mg), HLB SPE 固相萃取柱(200 mg: 6 mL)或石墨化炭黑氨基复合固相萃取小柱(500 mg / 500 mg: 6 mL)对药材基质进行净化。通过前期的试验结果可知,采用乙腈直接提取法提取的大果木姜子基质提取液,常温下为清澈黄色液体,且伴强烈挥发性气味,直接提取液分别通过3种净化管后各离子对的色谱峰均不满足要求,尤其是 $\alpha/\gamma/\beta/\delta$ -六六六、4,4'-滴滴伊、2,4'-滴滴涕、4,4'-滴滴滴、4,4'-滴滴涕及艾氏剂为亲脂性农药,难以与大果木姜子的油脂基质分离。通过不断考察,最终采用正己烷-乙腈-饱和氯化钠水溶液三相分配方式结合加强型 SelectCore HLB-C 固相萃取柱的方式进行大果木姜子的农药残留量测定,该前处理方法通过正己烷-乙腈-饱和氯化钠水溶液三相分配能除去部分杂质,农药组分转移至乙腈提取液中,然后以加强型 SelectCore HLB-C 固相萃取柱净化能有效去除大果木姜子中高挥发油复杂基质的严重影响,达到较好的净化效果,满足检测条件要求。

3.2 色谱条件选择

β -六六六、内吸磷-S、*o,p'*-三氯杀螨醇3种农药按2020年版《中国药典(四部)》通则2341 农药残留量测定法第五法气相色谱-质谱法中色谱条件无法从基质中分离,通过优化程序升温条件,使其从基质中分离出来,最终确定2.1项下试验条件。

3.3 禁用农药残留共测成分响应情况

在2020年版《中国药典(四部)》通则2341 农药残留量测定法药材及饮片(植物类)中33种禁用农药残留均采用LC-MS/MS法和GC-MS/MS法同时测定55种农药残留物(33种禁用农药),其中10种农药残留物为LC-MS/MS法和GC-MS/MS法的共同检测成分。在长期的检测过程中发现,采用GC-MS/MS法检测时受到的基质干扰严重,主要体现在复杂的中药材基质的进样严重污染进样口及气相色谱柱前端,导致部分GC-MS/MS法检测共测成分无法响应或基质严重干扰化合物出峰。杀虫脒受影响最严重,随着进样次数的增加,杀虫脒的响应度随之减弱甚至消失,通过清

洗进样口及切除进样口前段受污染色谱柱能有效缓解杀虫脒不响应的情况;其次为内吸磷-O/S、久效磷、水胺硫磷,均受药材基质干扰严重,在复杂基质中响应弱甚至无法观察到离子对响应。通过试验发现,在大果木姜子复杂基质中共测化合物内吸磷-O、杀虫脒、久效磷、水胺硫磷无法通过GC-MS/MS法准确识别离子对信息,故这4种农药残留物采用LC-MS/MS法检测。

3.4 方法评价

通过液液萃取结合加强型 SelectCore HLB-C 固相萃取柱净化,将挥发油等低极性基质干扰除去,该方法进一步优化了2020年版《中国药典(四部)》通则2341 农药残留量测定法第五法药材及饮片(植物类)中禁用农药多残留测定法中有关高挥发油类药材的前处理方法。本研究中建立的方法操作简便、准确性和重复性好,可有效减少挥发油等强基质干扰物质和克服离子干扰,可用于大果木姜子中禁用农药残留量的同时测定,为类似大果木姜子等高挥发油类药材中农药残留的测定提供参考。

参考文献

- [1] 孙恒灿,李 军,周智宦,等. 大果木姜子化学成分、药理作用与产业化研究进展[J]. 中南药学,2022,20(3):668-671.
- [2] DONG SH, DUAN ZK, AI YF, et al. Guaiane-type sesquiterpenoids with various ring skeletons from *Daphne bholua* uncovered by molecular networking and structural revisions of previously reported analogues[J]. Bioorganic Chemistry,2022,129:106208.
- [3] ZHANG YJ, BAI M, LI KX, et al. Small Molecule Accurate Recognition Technology accelerated isolation of structurally diverse sesquiterpenes from *Litsea lancilimba* Merr. [J]. Fitoterapia, 2022,158:105168.
- [4] 刘 杰,郭江涛,刘 耀,等. 大果木姜子挥发油的提取工艺优化、成分分析及抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2022,43(19):211-219.
- [5] 晏 婷,周祖英,骆弟元,等. GC-MS分析三种不同方法提取大果木姜子鲜果、干果挥发油成分[J]. 中药材,2022,45(1):123-129.
- [6] 张永萍,林亚平,邱德文,等. 大果木姜子挥发油的提取工艺研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(14):1120-1122.
- [7] 刘 杰,郭江涛. 大果木姜子挥发油的研究进展[J]. 化学工程师,2019,33(12):48-50.
- [8] ZHANG Y, BAI M, ZHOU W, et al. Volatile oil from *Litsea lancilimba* Merr.: a review of its chemical structure and biological activity [J]. Asian Journal of Traditional Medicines, 2022, 17(4):181-185.
- [9] 郑亚玉,邱德文,梁光义,等. 贵州苗药大果木姜子的研究及产业化[J]. 世界科学技术,2005,7(2):112-114.
- [10] 孙新琪,安 芳,鹿 倩,等. 我国中药材禁用农药残留现状、毒性及分析方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2022,47(3):611-627.