

解决方案

金银花中33种禁用农药及其单体残留量的测定

关键字

中国药典；高效液相色谱-串联质谱；气相色谱-串联质谱；农药残留；固相萃取

介绍

金银花是我国传统的药食两用中药材之一，具有清热解毒、疏风散热的功效，应用领域广泛，市场需求量大。金银花在种植过程中易染病虫害，化学农药是其防治的最主要手段。因此金银花的农药残留问题也越发引起人们的关注。由于金银花中含有挥发油、绿原酸、色素等成分，提取液不宜直接上机测试，需要经过一定的净化。

本文参照2020版《中国药典》2341通则农药残留量测定法新增第五法《药材及饮片（植物类）中禁用农药多残留测定法》中的固相萃取法，使用乙腈对金银花试样进行均质提取，经盐析和离心后，GC-MS/MS组化合物采用GCB/NH₂柱净化，LC-MS/MS组化合物采用HLB柱净化，最后上机检测。本方法采用睿科AH-30全自动均质器进行批量提取，提取液经睿科MPE高通量真空平行浓缩仪进行浓缩，然后用Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪对提取液进行净化，最后再用MPE高通量真空平行浓缩仪对洗脱液进行浓缩，实现了金银花前处理过程全流程自动化。在40 µg/kg的加标水平下GC-MS/MS法中33种化合物的回收率在71.5-118.4%之间，RSD值小于10%；在20 µg/kg的加标水平下LC-MS/MS法中30种化合物的回收率在72.1-120.5%之间，RSD值小于10%，满足实验要求。

1. 仪器与试剂

仪器

Raykol AH-30 全自动均质器

Raykol MPE-16 高通量真空平行浓缩仪

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取

取仪

Agilent 1290+6470 高效液相色谱/质谱联用仪

Agilent 8890+7000D 气相色谱/质谱联用仪

试剂

乙腈：HPLC 级，甲苯：HPLC 级

GC-MS/MS 法 33 种农药混合标准储备液：40 $\mu\text{g/mL}$

LC-MS/MS 法 30 种农药混合标准储备液：20 $\mu\text{g/mL}$

GC-MS/MS 法内标使用液：磷酸三苯酯 0.1 $\mu\text{g/mL}$

GCB/ NH_2 柱 (RayCure, 500 mg/500 mg/6 mL, RC-204-13822)

HLB 柱 (RayCure, 200 mg/6 mL, RC-204-36476)

2. 样品前处理

准确称取 5 g 试样 (精确至 0.01 g) 于 100 mL 离心管中, 加入 1 g 氯化钠后立即摇散, 加入 50 mL 乙腈, 用 Raykol AH-30 全自动均质器在 12000 r/min 的搅拌速度下均质 2 min, 转速 4000 r/min 下离心 5 min, 均质条件如图 1 所示。将上清液倒入浓缩杯中, 残渣再加入 50 mL 乙腈, 继续均质 1 min, 离心 5 min, 合并两次提取液, 在 Raykol MPE-16 高通量真空平行浓缩仪中浓缩至 3~5 mL, 放冷的样液转移至 10 mL 容量瓶中, 用乙腈多次润洗浓缩杯并转移至容量瓶中, 最终用乙腈定容至刻度。

GC-MS/MS 法: 量取上述溶液 2mL 至 15mL 上样管中, 以石墨化碳氨基复合固相萃取小柱 (500 mg, 6mL) 为净化柱, 先用 10 mL 乙腈-甲苯 (3:1) 活

化小柱, 弃去流出液, 之后以 1 mL/min 的速度上样, 再用 2×3 mL 的乙腈-甲苯 (3:1) 清洗样品瓶并过柱, 最后用 14 mL 的乙腈-甲苯 (3:1) 洗脱, 收集以上流出液, 具体的固相萃取条件如图 3 所示。用 MPE 将洗脱液浓缩至近干, 用乙腈转移并稀释至 2 mL, 混匀。精确移取 1 mL 上述定容液, 精密加入 0.3 mL 磷酸三苯酯内标溶液, 过 0.22 μm 滤膜后上气相色谱/串联质谱仪测定。

LC-MS/MS 法: 量取直接提取法制备的溶液 3mL, 通过 HLB 柱净化, 收集全部流出液, 混匀。精确移取 1 mL 上述净化液, 精密加入 0.3 mL 水后过 0.22 μm 滤膜, 上高效液相色谱/串联质谱仪测定。



图-1 金银花样品的均质条件



图-2 金银花样品的浓缩条件

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	填充样品路径	C2H3N+C7H8...		5	3	2.9
2	清洗样品通道	C2H3N+C7H8...				2.8
3	活化	C2H3N+C7H8...	有机废液	5	10	2.6
4	上样		收集	1	3	3.5
5	清洗样品瓶	C2H3N+C7H8...	收集	50	3	3.8
6	清洗样品瓶	C2H3N+C7H8...	收集	50	3	3.8
7	洗脱	C2H3N+C7H8...	收集	3	14	5.3
8	气推		收集	20	5	0.8
9	结束					
10						

图-3 Fotector Plus 对金银花中多农残的固相萃取条件

3. 检测条件

气相色谱质谱联用条件

采用 SCAN 全扫描模式进行定性分析,MRM 多反应检测模式进行定量分析。

GC-MS/MS 检测条件: 进样口温度 280 °C, 不分流进样, 隔垫吹扫流量为 3 mL/min, 进样量 1.0 μ L; 载气为高纯 He 气, 恒流模式, 流速为 1.0 mL/min; 电子轰击电离源(EI), 离子源温度 280 °C,

传输线温度 280 °C。色谱柱为 Agilent CP9151 VF-1701MS (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m)。

GC 程序升温程序: 初始温度 40°C, 保持 1 min; 以 40 °C/min 速度升温至 120 °C; 以 5 °C/min 升温至 240 °C, 以 12 °C/min 升温至 300°C, 保持 4 min。

MRM 参数

表-1 各农药的保留时间、监测离子对及碰撞电压

编号	名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (V)
1	灭线磷	15.99	199.7	157.8	5.0
			199.7	114.0	5.0
			157.8	96.7	20.0
			157.8	113.8	15.0
2	杀虫脒	16.51	152.0	117.0	15.0
			196.0	181.0	5.0
			260.0	75.0	5.0
3	甲拌磷	17.01	230.8	175.0	10.0
			230.8	128.6	25.0
4	α -BHC	17.64	181.0	145.0	15.0
	γ -BHC	19.29	218.7	182.9	5.0
	β -BHC	22.34	218.9	147.0	10.0
	δ -BHC	23.21	218.9	111.0	10.0
5	氟虫腈	29.29	367.0	213.0	35
			367.0	255.0	25
			367.0	332.0	15
			351.0	255.0	20

6	氟甲腈	27.13	388.0	333.0	20
			388.0	281.0	35
7	氟虫腈亚砷	29.02	420.0	351.0	12
			420.0	255.0	20
8	氟虫腈砷	31.92	383.0	255.0	20
			383.0	213.0	32
			452.0	383.0	8
9	艾氏剂	21.15	262.7	192.7	30
			255.0	220.0	20
			262.7	202.7	20
10	狄氏剂	26.19	276.8	240.7	10
			276.8	169.7	35
			276.8	172.0	35
			263.0	193.0	35
11	α -硫丹	24.81	240.8	205.6	15
			240.8	170.0	25
			194.8	159.0	10
12	β -硫丹	28.53	194.8	159.0	10
			194.8	124.7	30
			206.8	171.8	15
13	硫丹硫酸酯	30.38	271.8	236.7	15
			273.8	238.9	15
			271.8	141.0	40
			271.8	117.0	40
14	4,4'-滴滴伊	25.71	246.0	176.0	30
			246.0	220.0	15
			246.0	210.0	28
			316.0	246.0	25
15	2,4'-滴滴涕	27.31	235.0	165.0	25
			237.0	165.0	25
			235.0	199.0	15
			246.0	176.0	15
16	4,4'-滴滴滴	28.43	235.0	165.0	25
			237.0	165.0	25
			235.0	199.0	18
17	4,4'-滴滴涕	28.89	235.0	165.0	25
			237.0	165.0	25
			235.0	199.0	18
18	内吸磷	15.39	88.0	60.0	4

			88.0	59.0	20
			88.0	45.0	25
19	久效磷	20.86	127.0	109.0	12
			127.0	95.0	16
			127.0	79.0	20
20	特丁硫磷	18.56	230.8	129.0	25
			230.8	203.0	5
			230.8	175.0	13
21	甲基对硫磷	22.95	263.1	109.0	13
			263.1	79.0	35
			263.1	136.0	5
22	对硫磷	24.44	291.0	109.0	25
			291.0	81.0	30
			139.0	109.0	10
23	三氯杀螨醇	23.31	250.0	139.0	15
			250.0	215.0	5
			139.0	111.0	15
24	甲基异硫磷	24.51	241.0	199.0	5
			241.0	166.7	10
			241.0	120.8	20
25	水胺硫磷	25.05	135.7	108.0	15
			120.7	65.0	20
			229.7	211.7	10
			121.0	93.0	15
26	甲基硫环磷	26.62	227.0	92.0	10
			227.0	60.0	30
			227.0	167.8	10
			168.0	109.0	15
27	除草醚	28.20	201.8	138.7	28
			282.8	201.8	15
			282.8	253.0	10
28	蝇毒磷	33.92	361.8	109.0	16
			361.8	225.8	14
29	苯线磷	27.32	326.0	233	10
			326.0	215	25
			326.0	169	30
30	治螟磷	17.14	322.0	202.0	20
			322.0	294.0	10
			322.0	174.0	15

Mass spectrum plot showing relative intensity versus m/z. The x-axis ranges from 40 to 240 m/z, and the y-axis ranges from 0.00 to 1.00 relative intensity. The base peak is at m/z 105. Other significant peaks are labeled at m/z 41, 43, 55, 67, 77, 91, 107, 121, 135, 151, 167, 181, 195, 209, 223, 237, and 251.

图-4 33 种禁用农药标准品的总离子流图 (1 $\mu\text{g/mL}$)

柱子	ACQUITY UPLC BEH C18 (100mm ×2.1 mm×1.7 μm)
流速	0.30 mL/min
流动相	A: 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (含 0.1% 甲酸) , B: 乙腈
柱温	35 ℃
进样量	2 μL
检测器	Agilent 6470
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	8 L/min
氮气温度	330 ℃
簇电压	3500
雾化压力	45 psi
梯度洗脱	0.0-4.0 min, 5-15%流动相 B; 4.0-14.0 min, 15-100%流动相 B; 14.0-15.0 min, 100-5%流动相 B; 15.0-17.0 min, 5-5%流动相 B。

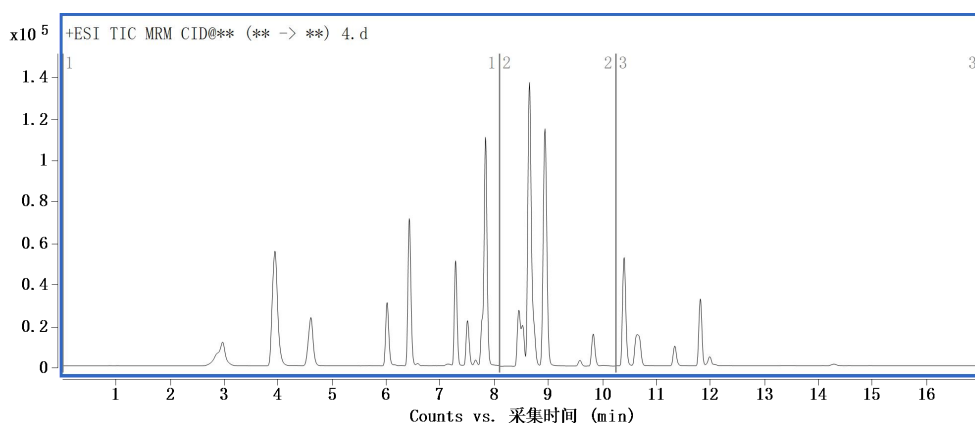
表-2 各农药的保留时间、监测离子对及碰撞电压

编号	名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (V)
1	涕灭威亚砷	2.93	207.1	132.4	5
			207.1	89.2	13
2	涕灭威砷	3.90	240.0	223.0	5
			240.0	86.0	21
3	久效磷	4.58	224.1	193.1	5
			224.1	127.1	13
4	杀虫脒	6.01	197.2	152.1	21
			197.2	117.2	33
			197.2	46.2	25

5	3-羟基克百威	6.42	238.1	220.2	5
			238.1	181.1	9
			238.1	163.2	13
6	硫环磷	7.28	256.0	168.1	17
			256.0	140.1	25
7	涕灭威	7.65	208.1	116.2	5
			208.1	89.2	13
8	苯线磷亚砷	7.77	320.0	292.1	13
			320.0	233.2	25
			320.0	171.3	25
9	甲拌磷砷	7.78	293.0	247.1	13
			293.0	171.0	25
			293.0	115.1	53
10	磷胺	7.83	300.0	174.1	13
			300.0	127.1	21
11	甲磺隆	8.45	382.0	199.2	21
			382.0	167.3	17
12	苯线磷砷	8.52	336.0	266.2	21
			336.0	188.3	29
13	克百威	8.65	222.0	165.2	9
			222.0	123.2	25
14	氯磺隆	8.72	358.0	167.3	17
			358.0	141.3	17
15	胺苯磺隆	8.92	411.1	196.3	17
			411.1	168.3	33
16	甲拌磷亚砷	8.94	277.0	199.0	5
			277.0	171.1	13
			277.0	143.0	21
			277.0	97.1	41
17	内吸磷	9.58	259.1	89.2	5
			259.1	61.1	41
18	特丁硫磷亚砷	9.83	305.1	187.2	9
			305.1	97.0	49
19	水胺硫磷	9.98	312.0	270.2	13
			312.0	236.2	13
20	苯线磷	10.40	304.0	234.3	17
			304.0	217.2	25
			304.0	202.0	41
21	灭线磷	10.63	243.2	131.1	21

			243.2	97.0	37
22	特丁硫磷砒	10.68	321.1	171.2	9
			321.1	97.0	53
23	氯唑磷	11.34	314.0	162.3	17
			314.0	120.2	29
24	硫线磷	11.81	271.1	159.2	13
			271.1	131.1	25
			271.1	97.1	45
25	蝇毒磷	11.81	363.0	307.1	17
			363.0	227.2	29
26	甲基异柳磷	11.85	332.2	273.1	5
			332.2	231.2	21
27	地虫硫磷	11.95	247.0	137.1	9
			247.0	109.1	17
28	治螟磷	11.99	323.0	171.2	13
			323.0	115.0	33
			323.0	97.1	53
29	甲拌磷	12.08	260.9	75.1	5
			260.9	47.0	45
30	甲胺磷	14.25	142.1	125.1	9
			142.1	94.1	37

液质联用色谱图

图-5 30 种禁用农药标准品的总离子流图 (1 $\mu\text{g/mL}$)

4. 样品测试

基质加标回收实验

在金银花样品中添加浓度为 40 $\mu\text{g/kg}$ 的 33 种农药 (GC-MS/MS) 和 20 $\mu\text{g/kg}$ 的 30 种农药 处理方法,最后分别经 GC-MS/MS 和 LC-MS/MS 检测, 平均回收率和 RSD 结果如下所示。

(LC-MS/MS) 进行加标回收验证, 使用上述样品前

表-3 GC-MS/MS 法 33 种化合物的平均回收率和相对标准偏差 (n=3)

化合物	回收率 (%)			平均回收率 (%)	RSD (%)
	样品 1	样品 2	样品 3		
杀虫脒	93.1	81.6	84.4	86.4	6.9
内吸磷	71.6	77.6	72.3	73.8	4.4
灭线磷	118.8	109.7	113.6	114.0	4.0
甲拌磷	89.1	83.7	78.9	83.9	6.1
治螟磷	95.3	87.0	82.8	88.4	7.2
特丁硫磷	92.1	87.1	85.8	88.3	3.8
BHC-alpha	78.7	75.2	72.7	75.5	4.0
BHC-gamma	78.6	74.5	71.5	74.9	4.8
久效磷	110.8	107.7	115.7	111.4	3.6
艾氏剂	76.2	81.0	74.0	77.1	4.6
BHC-beta	84.8	76.9	72.7	78.1	7.9
甲基对硫磷	89.3	82.7	93.0	88.3	5.9
BHC-delta	76.1	81.9	78.9	79.0	3.7
三氯杀螨醇	85.6	78.0	82.9	82.2	4.7
对硫磷	110.7	107.7	118.4	112.3	4.9
甲基异硫磷	88.0	84.5	98.0	90.2	7.8
水胺硫磷	91.4	85.7	101.3	92.8	8.5
alpha-硫丹	75.5	82.4	73.8	77.2	5.9
4,4'-滴滴伊	77.4	83.2	75.1	78.6	5.3
狄氏剂	85.6	82.4	71.5	79.8	9.3
甲基硫环磷	101.4	105.9	114.2	107.2	6.1
氟甲腈	87.1	81.8	98.3	89.1	9.5
苯线磷	113.1	116.3	96.7	108.7	9.7
除草醚	102.2	89.5	107.6	99.8	9.3
2,4'-滴滴涕	73.5	76.1	80.8	76.8	4.8
4,4'-滴滴滴	83.6	76.2	81.3	80.4	4.7
4,4'-滴滴涕	80.7	78.1	82.8	80.5	2.9
beta-硫丹	81.9	78.9	71.6	77.5	6.8
氟虫腈亚砷	89.1	88.0	103.6	93.6	9.3
氟虫腈	90.2	88.7	104.4	94.4	9.2
硫丹硫酸酯	80.5	83.6	76.3	80.1	4.6
氟虫腈砷	82.1	80.1	92.2	84.8	7.6

蝇毒磷	77.0	71.8	81.8	76.9	6.5
-----	------	------	------	------	-----

表-4 LC-MS/MS 法 30 种化合物的平均回收率和相对标准偏差 (n=3)

化合物	回收率 (%)			平均回收率 (%)	RSD (%)
	加标 1	加标 2	加标 3		
3-羟基克百威	78.8	78.1	84.3	80.4	4.2
胺苯磺隆	79.3	76.2	72.9	76.1	4.2
苯线磷	79.8	81.3	73.8	78.3	5.1
苯线磷砒	84.7	78.6	79.5	80.9	4.1
苯线磷亚砒	85.6	80.7	80.3	82.2	3.6
地虫硫磷	76.3	80.9	82.4	79.9	3.9
甲胺磷	89.0	95.8	86.5	90.4	5.3
甲拌磷	81.6	82.3	79.5	81.2	1.8
甲拌磷砒	91.2	94.9	85.8	90.6	5.0
甲拌磷亚砒	83.3	78.7	72.1	78.0	7.2
甲磺隆	80.9	76.7	75.7	77.8	3.5
甲基异柳磷	82.3	83.5	76.6	80.8	4.6
久效磷	83.4	84.8	80.2	82.8	2.9
克百威	81.9	76.8	79.5	79.4	3.2
磷胺	84.5	80.1	81.0	81.8	2.9
氯磺隆	85.2	83.2	78.4	82.3	4.3
硫环磷	86.3	83.8	75.9	82.0	6.6
硫线磷	83.1	79.0	74.3	78.8	5.6
氯唑磷	80.2	76.4	77.9	78.2	2.5
灭线磷	79.8	80.5	86.3	82.2	4.4
内吸磷	82.4	84.5	80.0	82.3	2.7
水胺硫磷	120.5	119.5	106.2	115.4	6.9
杀虫脒	79.5	72.8	73.2	75.2	5.0
特丁硫磷砒	79.9	79.1	86.9	82.0	5.2
特丁硫磷亚砒	80.7	76.8	81.3	79.6	3.1
涕灭威	73.6	85.2	75.4	78.0	8.0
涕灭威砒	85.7	81.2	77.6	81.5	5.0
涕灭威亚砒	84.5	79.7	90.5	84.9	6.4
蝇毒磷	80.4	80.6	83.4	81.5	2.1

治螟磷	85.7	84.8	89.6	86.7	2.9
-----	------	------	------	------	-----

5. 总结

分取上清液时为防止下层残渣倒入浓缩杯中，可在浓缩杯上放置漏斗和滤纸，将上清液过滤于杯中，并用乙腈洗涤滤纸。

在减压浓缩过程中需控制好温度和压力以防止部分化合物分解和损失，温度不能超过 40° C，压力不要低于 80 mbar。

LC-MS/MS 法需取 1 mL 提取液并加 0.3 mL 水，注意先不要将 1 mL 提取液装进 2 mL 色谱瓶中，因为提取液加了水之后会变浑浊需要过膜导致操作不便。可将 1 mL 提取液转移到子弹头离心管中再

加入 0.3 mL 水，混匀后再过滤到 2 mL 色谱瓶中。

浓缩洗脱液时不可浓缩至干也不可残留过多洗脱液，至干会严重影响回收率，而残留过多甲苯则会在检测时产生溶剂效应。

用 GCB/NH₂ 净化时可适当增加乙腈-甲苯（3:1）的洗脱量。

由于 GCB/NH₂ 复合柱中的 NH₂ 对酸性除草剂（甲磺隆、氯磺隆和胺苯磺隆）具有很强的吸附作用，磺酰脲类除草剂的回收率非常低，因此 LC-MS/MS 法建议用 HLB 柱净化。

6. 解决方案优势

AH-30 全自动均质器可自动进行试样均质和刀头清洗，无需人员值守，避免有机溶剂毒害，操作简单、便捷，为批量样品的均质提供帮助。

MPE-16 高通量真空平行浓缩仪采用数字型的真空控制系统，能精确、实时地检测真空度，避免样液中目标物在过低真空度下损失，同时采用水浴加热和平稳的圆周震荡模式，保证样品的平行性和可靠性，16 个大体积提取液同时浓缩，可实现批量、快速、高效的浓缩过程。

睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取

仪在对金银花中多农残进行固相萃取净化时，使用高精度注射器和十二通阀切换等动作，实现了活化、上样、淋洗、洗脱整个固相萃取过程的全自动化，6 通道同时运行，8 种溶剂可选，3 种排废可选，还带有自动清洗样品瓶的功能来防止目标化合物在瓶壁上的残留，实现全自动化过程的同时保证了回收率。采用该仪器进行固相萃取避免了手动固相萃取人为值守、流速不可控、耗时耗力和平行性差等缺点，并且减少了实验人员与甲苯这类有毒有害溶剂的接触时间，保护实验人员的健康安全。



全自动均质器
均质



高通量真空平行浓缩仪
浓缩



高通量全自动固相萃取仪
净化



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

自动化样品前处理解决方案领先供应商

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020 年 7 月版