

黑老虎药材中 33 种禁用农药残留分析方法研究

谢珊珊¹ 马恩耀^{1,2*} 罗文英² 周劲松^{1,2} 孔箭² 方达锋² 欧阳庆¹ 黄丹虹³

(1.广东汉潮中药科技有限公司, 广东 广州 510360; 2.广州采芝林药业有限公司, 广东 广州 510360; 3.广州白云山中药饮片有限公司, 广东 广州 510360)

摘要: [目的]建立气相色谱-串联质谱法和高效液相色谱-串联质谱法测定黑老虎药材中 33 种禁用农药残留分析方法。[方法]以回收率为指标, 筛选出最佳的样品前处理方法。对气相色谱-串联质谱法和高效液相色谱-串联质谱法的线性和范围、检测限、定量限、准确度、重复性、稳定性等指标进行验证。[结果]直接提取法为最佳前处理方法。气相色谱-串联质谱法和高效液相色谱-串联质谱法所检测的禁用农药, 在所选定的浓度范围内线性关系良好, R^2 均大于 0.990; 定量限均小于 0.01mg/kg; 加样回收率 73.9%~123.3% (RSD 2.1%~9.4%); 重复性的 RSD 为 1.0%~8.4%; 供试品溶液在 48h 内稳定。[结论]所建立的测定方法准确可靠, 可用于黑老虎中 33 种禁用农药残留检测。

关键词: 黑老虎; 禁用农药残留; 直接提取法; 气相色谱-串联质谱法; 高效液相色谱-串联质谱法

黑老虎为岭南地区常用中药, 其为木兰科南五味子属植物黑老虎 *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith var. *coccinea* 的根, 能行气活血, 消肿止痛, 治胃病, 风湿骨痛, 跌打瘀痛, 为妇科常用药^[1]。舒筋健腰丸、壮腰健肾丸(片、口服液)、桂龙药膏(酒)、跌打万花油等多种中成药的处方均含有黑老虎。《中国药典》1977 年版^[2]以及北京市^[3]、广东省^[4]、湖南省^[5]、广西壮族自治区^[6]等地方中药材标准中记载有黑老虎。这些药品标准仅要求检测黑老虎的性状、显微鉴别、薄层鉴别、水分、灰分、浸出物等项目, 对包括农药残留在内的外源性污染物均未做规定。

随着人民生活水平的提高, 消费者对药品安全愈加关注。农药残留是影响中药安全性的一个主要方面^[7]。近年来, 国家对中药农药残留的监管日益严格, 《中国药典》2020 年版新增了 33 种禁用农药(对应 55 个农药单体化合物)不得在植物类药材及饮片中的规定^[8], 并自 2020 年 12 月 30 日起实施。

对黑老虎药材中农药残留进行研究的文献仅见 2 篇^[9,10], 研究内容为采用气相色谱法测定六六六(α -六六六、 δ -六六六、 γ -六六六、 δ -六六六)、五氯硝基苯、滴滴涕(4,4'-滴滴涕、2,4'-滴滴涕、4,4'-滴滴涕、4,4'-滴滴涕)、乐果、氧化乐果、敌百虫等的残留量。本研究对黑老虎药材中《中国药典》2020 年版规定的 33 种禁用农药残留的检测方法进行了研究, 在筛选出最佳前处理方法——直接提取法后, 对所用气相色谱-串联质谱法和高效液相色谱-串联质谱法进行了方法学验证, 确定所建立的方法准确可靠, 适用于黑老虎中 33 种禁用农药残留检测。

1 仪器、试剂和材料

Agilent 1290-6070 超高效液相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司), Agilent 8890-7000D 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司), Comfort I 超纯水机(德国赛多利斯集团), AH-30 全自动均质机(睿科集团(厦门)股份有限公司), TDL-400R 离心机(山东百欧医疗科技有限公司), AH-30 平行浓缩仪(睿科集团(厦门)股份有限公司), ML203T 分析天平(瑞士梅特勒公司), EOAA-VM-B 涡旋仪(上海安谱实验科技股份有限公司), EFAA-DC24 氮吹仪(上海安谱实验科技股份有限公司), SPH-310F 恒温振荡器(上海世平实验设备有限公司)。

55 种禁用农药混合对照溶液(PN: CDAA-M-490407-TY-1.2mL, 20~200mg/L 于丙酮), 磷酸三苯酯标准溶液(PN: CDAA-S-412134-JD-1mL, 1000mg/L 于乙腈), 购自上海安谱实验科技股份有限公司; QuEChERS 提取盐(PN: 60105-335-B, 含 6g 无水硫酸镁、1.5g 无水乙酸钠), QuEChERS 净化盐(PN: 60105-509-B, 含 900mg 无水硫酸镁、300mg-N-丙基乙二胺、300mg 十八烷基硅烷键合硅胶、300mg 硅胶、90mg 石墨化炭黑), 固相萃取第一法净化盐包(PN: 60105-510-B, 含 1.2g 无水硫酸镁、300mg-N-丙基乙二胺、100mg 十八烷基硅烷键合硅胶, 15mL), 固相萃取第二法固相萃取小柱(PN: 60107-212, 200mg,

6mL), 固相萃取第三法固相萃取小柱(PN: 60108-509-B, 500mg, 6mL), 购自赛默飞世尔科技有限公司; 甲酸铵(HPLC), 乙腈(HPLC), 冰醋酸(AR), 购自广州化学试剂厂; 水为 GB/T 682-208 规定下的一级水。

空白黑老虎药材采自野外。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 直接提取法

取供试品粉末(过三号筛)5g, 精密称定, 加氯化钠 1g, 立即摇散, 再加入乙腈 50mL, 匀浆处理 2 分钟(转速不低于每分钟 12000 转), 离心(每分钟 4000 转), 分取上清液, 沉淀再加乙腈 50mL, 匀浆处理 1 分钟, 离心, 合并两次提取的上清液, 减压浓缩至约 3~5mL, 放冷, 用乙腈稀释至 10.0mL, 摇匀, 既得。

2.1.2 快速样品处理(QuEChERS)法

取供试品粉末(过三号筛)3g, 精密称定, 置 50mL 聚苯乙烯具塞离心管中, 加入 1%冰醋酸溶液 15mL, 涡旋使药粉充分浸润, 放置 30 分钟, 精密加入乙腈 15mL, 涡旋使混匀, 置振荡器上剧烈振荡(500 次/分)5 分钟, 加入 QuEChERS 提取盐, 立即摇散, 再置振荡器上剧烈振荡(500 次/分)3 分钟, 于冰浴中冷却 10 分钟, 离心(每分钟 4000 转)5 分钟, 取上清液 9mL, 置于 QuEChERS 净化盐中, 涡旋使充分混匀, 置振荡器上剧烈振荡(500 次/分)5 分钟使净化完全, 离心(每分钟 4000 转)5 分钟, 精密吸取上清液 5mL, 置氮吹仪上于 40℃水浴浓缩至约 0.4mL, 加乙腈稀释至 1.0mL, 涡旋混匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 固相萃取第一法

量取直接提取法制备的样品溶液 5mL, 加入固相萃取第一法净化盐包, 涡旋使充分混匀, 再置振荡器上剧烈振荡(500 次/分)5 分钟使净化完全, 离心, 取上清液, 即得。

2.1.4 固相萃取第二法

量取直接提取法制备的样品溶液 4mL, 通过固相萃取第二法固相萃取小柱净化, 收集全部净化液, 混匀, 即得。

2.1.5 固相萃取第三法

量取直接提取法制备的样品溶液 2mL, 加在固相萃取第三法固相萃取小柱上, 用乙腈-甲苯混合溶液(3:1)20mL 洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩至近干, 用乙腈转移并稀释至 2.0mL。混匀, 即得。

2.2 标准溶液的配制

2.2.1 混合标准储备溶液的制备

精密移取 55 种禁用农药混合标准溶液 0.25mL, 置 10mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 混合标准工作溶液的制备

精密移取混合标准储备溶液 2mL, 置 10mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 内标溶液的制备

精密移取磷酸三苯酯标准溶液适量，加乙腈制成浓度为 0.1 μ g/mL 的溶液。

2.2.4 空白基质溶液的制备

取空白样品黑老虎药材，同 2.1 供试品溶液制备方法处理制成空白基质溶液。

2.2.5 基质混合对照溶液的制备

分别精密量取黑老虎空白基质溶液 1.0mL(6 份)，置氮吹仪上，40 $^{\circ}$ C 水浴浓缩至约 0.6mL，分别加入混合标准工作溶液 10 μ L、20 μ L、50 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L，加乙腈稀释至 1mL，涡旋混匀，即得。

2.3 分析条件

2.3.1 高效液相色谱-串联质谱法

色谱条件：色谱柱：Kinetex，100*2.1mm，2.6 μ m；柱温：40 $^{\circ}$ C；流动相 A：5mmol/L 甲酸铵 0.1% 甲酸水溶液；流动相 B：5% 甲酸铵甲酸溶液-乙腈溶液（5：95，V:V）溶液；梯度洗脱：0-1min，70% 流动相 A；1-12min，70% 流动相 A \rightarrow 0% 流动相 A；12-14min，0% 流动相 A；流速：0.3 mL/min。

质谱条件：扫描方式：正离子；离子监测模式：多反应监测（MRM）；离子源温度：250 $^{\circ}$ C；干燥气温度：350 $^{\circ}$ C；雾化器压力：45psi；毛细管电压：4000V。

2.3.2 气相色谱-串联质谱法

色谱条件：色谱柱：VF-17MS 30m*0.25mm*0.25 μ m；载气：高纯氦气；升温程序：初始温度 60 $^{\circ}$ C，保持 1 分钟，以 30 $^{\circ}$ C/min 升至 120 $^{\circ}$ C，再以每分钟 10 $^{\circ}$ C 的速率升温至 160 $^{\circ}$ C，再以每分钟 2 $^{\circ}$ C 的速率升温至 230 $^{\circ}$ C，最后以每分钟 15 $^{\circ}$ C 的速率升温至 300 $^{\circ}$ C，保持 6 分钟；进样口模式：恒压模式。

质谱条件：离子源：电子轰击（EI）源；轰击能量：70eV；离子源温度 280 $^{\circ}$ C，离子监测模式：多反应监测（MRM）；进样口温度：250 $^{\circ}$ C；质谱传输接口温度：250 $^{\circ}$ C。

2.3.3 测定法

分别精密吸取供试品溶液和基质混合对照品溶液各 1 μ L，注入气相色谱串联质谱仪和液相色谱串联质谱仪。

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化

配制一定浓度的标准溶液，分别注入高效液相色谱-质谱联用仪、气相色谱-质谱联用仪，通过对各化合物的分子离子进行子离

子扫描，选取响应相对较高的离子对，在 MRM 模式下优化去簇电压、碰撞电压等参数，选择合适的母离子、子离子、去簇电压和碰撞电压，再分别对离子化电压、去溶剂温度、辅助加热器压力等进行进一步的优化，得到最终质谱条件，优化结果见 2.3。在 MRM 模式下进行检测，总离子流（TIC）图见图 1、图 2。

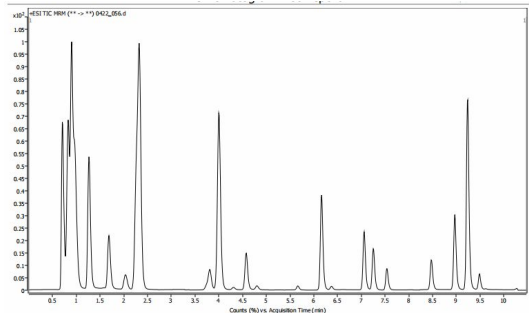


图 1 液相色谱串联质谱基质混合标准溶液 TIC 图

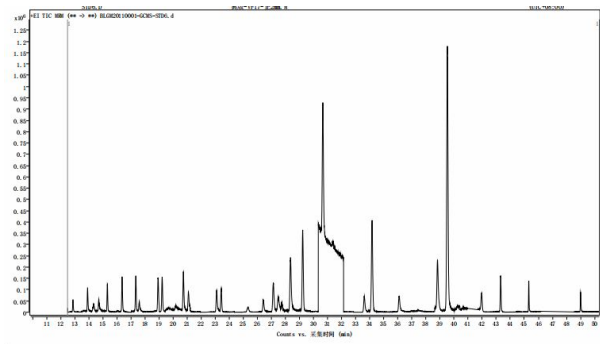


图 2 气相色谱串联质谱基质混合标准溶液 TIC 图

由图 1、图 2 可以看出，55 种化合物在液相色谱串联质谱、气相色谱串联质谱上出峰时间相对稳定，目标峰无其他杂峰干扰，且峰型对称、平滑，说明本实验室可以进行 33 种禁用农药的测定。

3.2 样品前处理方法筛选

取黑老虎空白基质，按 2.1 样品前处理方法中的 5 种前处理方法进行样品加标回收试验，观察样品的加标回收率情况。结果见表 1、表 2。

表 1 高效液相色谱-串联质谱法各化合物的加标回收率表

序号	化合物	回收率%				
		直接提取法	QuEChERS 法	固相萃取第一法	固相萃取第二法	固相萃取第三法
1	涕灭威 (Aldicarb)	112.1	55.6	83.7	8.9	68.7
2	涕灭威砒 (Aldicarb sulfone)	129.6	45.1	61.6	5.0	55.1
3	涕灭威亚砒 (Aldicarb sulfoxide)	111.3	27.5	57.7	34.9	47.6
4	硫线磷 (Cadusafos)	83.3	56.8	102.5	62.2	104.6
5	克百威 (Carbofuran)	92.5	144.0	84.8	53.6	68.3
6	3-羟基克百威 (Carbofuran-3-Hydroxy)	94.9	105.6	98.7	55.6	75.3
7	杀虫脒 (Chlordimeform)	63.5	33.5	90.4	45.1	42.7
8	氯磺隆 (Chlorsulfuron)	106.8	88.3	56.8	74.7	0.6
9	蝇毒磷 (Coumaphos)	69.1	99.7	83.2	40.1	111.5
10	内吸磷 (Demeton)	115.2	37.2	63.9	15.0	53.0
11	胺苯磺隆 (Ethametsulfuron methyl)	68.9	191.0	65.2	73.4	0.2
12	灭线磷 (Ethoprophos)	99.3	94.8	85.7	57.5	76.4
13	苯线磷 (Fenamiphos)	79.9	69.2	114.4	86.9	90.2
14	苯线磷砒 (Fenamiphos sulfone)	96.1	130.3	92.4	36.5	83.9
15	苯线磷亚砒 (Fenamiphos sulfoxide)	102.3	124.7	70.9	73.9	56.9
16	地虫硫磷 (Fonofos)	125.0	323.2	52.2	21.5	38.0
17	氯唑磷 (Isazofos)	78.2	48.3	104.9	62.2	89.1
18	水胺硫磷 (Isocarbofos)	85.0	55.4	85.3	75.1	75.0
19	甲基异柳磷 (Isofenphos methyl)	120.9	44.9	39.7	46.7	28.5
20	甲胺磷 (Methamidophos)	80.3	4.3	94.8	38.8	53.6

21	甲磺隆 (Metsulfuron methyl)	96.0	199.3	82.1	75.6	1.5
22	久效磷 (Monocrotophos)	117.9	24.0	72.5	16.7	59.3
23	甲拌磷 (Phorate)	112.5	30.1	28.8	64.4	52.7
24	甲拌磷砒 (Phorate sulfone)	87.0	103.8	105.3	38.6	93.1
25	甲拌磷亚砒 (Phorate sulfoxide)	106.4	77.6	83.3	43.3	70.8
26	硫环磷 (Phosfolan)	105.8	93.5	79.3	39.4	68.4
27	磷胺 (Phosphamidon)	95.7	61.6	94.6	60.6	70.9
28	治螟磷 (Sulfotep)	99.0	116.7	68.4	32.5	71.0
29	特丁硫磷砒 (Terbufos sulfone)	78.1	162.8	84.1	70.5	94.8
30	特丁硫磷亚砒 (Terbufos sulfoxide)	108.7	50.9	75.2	32.4	68.5

由表 1 可知: 在高效液相色谱-串联质谱法中, 直接提取法回收率范围 63.5% ~ 129.6%, QuEChERS 法回收率范围 4.3% ~ 323.2%, 固相萃取第一法回收率范围 28.8% ~ 114.4%, 固相萃取第二法回收率范围 5% ~ 86.9%, 固相萃取第三法回收率范围 0.2% ~

111.5%。根据药材及饮片 (植物类) 中禁用农药多残留测定法中要求加标回收应在 70% ~ 120% 之间, 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% 的要求, 只有直接提取法能满足要求。

表 2 气相色谱-串联质谱法各化合物的加标回收率表

序号	化合物	回收率%				
		直接提取法	QuEChERS 法	固相萃取第一法	固相萃取第二法	固相萃取第三法
1	艾氏剂 (Aldrin)	84.2	75.4	69.5	80.7	80.6
2	α -六六六 (α -BHC)	106.2	76.2	62.9	91.2	138.7
3	β -六六六 (β -BHC)	124.7	89.0	68.1	82.4	90.2
4	γ -六六六 (γ -BHC)	121.3	73.8	62.4	68.5	132.7
5	σ -六六六 (σ -BHC)	112.9	76.9	59.9	83.2	141.4
6	杀虫脒 (Chlordimeform)	61.8	42.3	62.5	64.2	103.7
7	蝇毒磷 (Coumaphos)	73.5	67.2	72.7	73.5	139.1
8	4,4'-滴滴滴 (4,4'-DDD)	111.0	94.9	68.5	80.8	126.9
9	4,4'-滴滴伊 (4,4'-DDE)	101.4	93.5	69.9	85.1	166.4
10	2,4'-滴滴涕 (2,4'-DDT)	96.0	80.2	48.1	86.0	134.9
11	4,4'-滴滴涕 (4,4'-DDT)	112.7	80.5	44.6	82.7	132.6
12	内吸磷-S (Demeton S)	91.3	92.2	45.2	67.3	127.4
13	内吸磷-O (Demeton O)	102.8	88.5	78.8	64.4	114.1
14	4,4'-三氯杀螨醇 (o,p' -Dicofol)	109.2	90.0	71.7	87.9	120.1
15	2,4'-三氯杀螨醇 (p,p' -Dicofol)	104.9	91.8	71.7	125.2	113.1
16	狄氏剂 (Dieldrin)	102.8	97.1	71.1	84.9	130.8
17	α -硫丹 (α -Endosulfan)	110.2	95.6	62.1	94.6	150.8
18	β -硫丹 (β -Endosulfan)	92.6	96.0	60.7	61.6	106.5
19	硫丹硫酸脂 (Endosulfan sulfate)	127.6	77.1	62.5	67.9	189.1
20	灭线磷 (Ethoprophos)	107.0	105.5	68.9	79.9	131.5
21	苯线磷 (Fenamiphos)	102.8	96.4	52.7	66.7	94.2
22	氟虫腈亚砒 (Fipronil sulfide)	111.8	82.5	56.3	77.2	133.5
23	氟虫腈砒 (Fipronil sulfone)	123.2	95.6	72.1	77.1	161.8
24	氟虫腈 (Fipronil)	119.2	87.8	80.3	75.8	129.2
25	氟甲腈 (Fipronil desulfinyl)	112.1	88.3	71.2	88.9	96.2
26	水胺硫磷 (Isocarbophos)	109.5	90.8	76.7	76.0	148.4
27	甲基异柳磷 (Isofenphos methyl)	106.9	89.9	66.2	83.9	128.1
28	久效磷 (Monocrotophos)	70.3	85.8	78.0	68.6	88.8
29	除草醚 (Nitrofen)	98.3	96.2	74.3	88.6	21.3
30	对硫磷 (Parathion)	110.2	92.2	66.0	68.8	137.6
31	甲基对硫磷 (Parathion methyl)	120.3	98.3	65.6	78.5	145.4
32	甲拌磷 (Phorate)	105.3	94.4	75.7	72.5	127.5
33	甲基硫环磷 (Phosfolan methyl)	78.3	82.3	54.8	65.4	97.0
34	治螟磷 (Sulfotep)	106.6	86.6	68.9	74.3	127.0
35	特丁硫磷 (Terbufos)	102.3	72.6	70.4	85.8	126.4

由表 2 可知: 在气相色谱-串联质谱法中, 直接提取法回收率范围 61.8% ~ 127.6%, QuEChERS 法回收率范围 42.3% ~ 105.5.2%, 固相萃取第一法回收率范围 44.6% ~ 80.3%, 固相萃取第二法回收率范围 61.6% ~ 125.1%, 固相萃取第三法回收率范围 21.3% ~ 189.1%。根据药材及饮片 (植物类) 中禁用农药多残留测定法中要求加标回收应在 70% ~ 120% 之间, 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% 的要求, 直接提取法和固相萃取第二法均能满足要求。

综上, 选择直接提取法作为高效液相色谱-串联质谱法和气相色谱-串联质谱法共用的样品前处理方法。

3.3 方法学验证

3.2.1 线性和范围

选取黑老虎空白基质, 按基质混合对照溶液的制备 (2.2.5) 得到含有 6 个浓度点的基质曲线, 分别在气相色谱串联质谱和高效液相色谱串联质谱上进行分析, 观察其线性回归方程和线性相关系数。以 2.2.5 项下的各基质混合对照溶液制作标准曲线, 结果见表 3、表 4。

3.2.2 检测限、定量限

选取黑老虎空白基质样品, 加入混合对照品工作溶液 20 μ L, 按照 2.1.1 进行实验, 所得供试品溶液进行 10 次的仪器重复进样, 统计这 10 次结果的响应值偏差 δ , 按 LOQ=10 δ 和 LOD=3.3 δ 计算其检测限 LOD 和定量限 LOQ, 结果见表 3、表 4。

表3 高效液相色谱-串联质谱法测定 30 个化合物的线性、范围、检测限、定量限

序号	化合物	线性回归方程	相关系数	范围 ($\mu\text{g/L}$)	检测限(mg/kg)	定量限 (mg/kg)
1	涕灭威 (Aldicarb)	$y=3204x-8539$	0.9996	10.0 ~ 200	0.0007	0.0020
2	涕灭威砒 (Aldicarb sulfone)	$y=1445x-4958$	0.9999	9.99 ~ 200	0.0009	0.0028
3	涕灭威亚砒 (Aldicarb sulfoxide)	$y=1181x+3365$	0.9994	10.2 ~ 204	0.0011	0.0033
4	硫线磷 (Cadusafos)	$y=8581x-4555$	0.9990	2.00 ~ 40.0	0.0002	0.0007
5	克百威 (Carbofuran)	$y=7623x-8102$	0.9991	5.01 ~ 100.2	0.0005	0.0016
6	3- 羟基 克百威 (Carbofuran-3-Hydroxy)	$y=4577x-4136$	0.9995	5.00 ~ 100	0.0010	0.0029
7	杀虫脒 (Chlordimeform)	$y=4916x-3138$	0.9990	2.00 ~ 40.0	0.0002	0.0007
8	氯磺隆 (Chlorsulfuron)	$y=106.2x-351.5$	0.9985	5.00 ~ 100	0.0023	0.0071
9	蝇毒磷 (Coumaphos)	$y=16.89x-30.26$	0.9969	5.01 ~ 100	0.0075	0.0226
10	内吸磷 (Demeton)	$y=1299x-197.7$	0.9993	2.00 ~ 40.0	0.0003	0.0008
11	胺苯磺隆 (Ethametsulfuron methyl)	$y=126.2x-161.4$	0.9996	5.02 ~ 100	0.0025	0.0075
12	灭线磷 (Ethoprophos)	$y=2652x-1854$	0.9983	2.01 ~ 40.1	0.0003	0.0010
13	苯线磷 (Fenamiphos)	$y=4042x-4438$	0.9967	2.01 ~ 40.1	0.0007	0.0022
14	苯线磷砒 (Fenamiphos sulfone)	$y=2104x-1648$	0.9967	2.00 ~ 40.0	0.0005	0.0016
15	苯线磷亚砒 (Fenamiphos sulfoxide)	$y=867.6x+21.17$	0.9901	2.01 ~ 40.1	0.0009	0.0027
16	地虫硫磷 (Fonofos)	$y=34.16x+22.61$	0.9934	1.99 ~ 39.8	0.0016	0.0047
17	氯唑磷 (Isazofos)	$y=4483x-1967$	0.9971	1.01 ~ 20.1	0.0003	0.0009
18	水胺硫磷 (Isocarbophos)	$y=5791x-8969$	0.9990	4.99 ~ 99.9	0.0007	0.0022
19	甲基异柳磷 (Isufenphos methyl)	$y=4138x-3215$	0.9988	2.01 ~ 40.2	0.0007	0.0020
20	甲胺磷 (Methamidophos)	$y=2378x+1992$	0.9991	4.99 ~ 99.8	0.0028	0.0084
21	甲磺隆 (Metsulfuron methyl)	$y=440.8x-162.4$	0.9915	4.99 ~ 99.9	0.0013	0.0040
22	久效磷 (Monocrotophos)	$y=10749x-7469$	0.9996	3.00 ~ 60.0	0.0002	0.0005
23	甲拌磷 (Phorate)	$y=83.26x-47.30$	0.9974	2.00 ~ 40.0	0.0021	0.0065
24	甲拌磷砒 (Phorate sulfone)	$y=156.8x-59.30$	0.9995	2.00 ~ 40.0	0.0013	0.0040
25	甲拌磷亚砒 (Phorate sulfoxide)	$y=4588x-3077$	0.9977	4.01 ~ 40.1	0.0004	0.0011
26	硫环磷 (Phosfolan)	$y=2408x+3327$	0.9901	3.01 ~ 60.1	0.0006	0.0018
27	磷胺 (Phosphamidon)	$y=4881x-8601$	0.9984	5.03 ~ 100	0.0004	0.0011
28	治螟磷 (Sulfotep)	$y=1315x-1236$	0.9976	2.01 ~ 40.1	0.0010	0.0030
29	特丁硫磷砒 (Terbufos sulfone)	$y=1852x+992.4$	0.9983	2.00 ~ 40.0	0.0013	0.0039
30	特丁硫磷亚砒 (Terbufos sulfoxide)	$y=9649x-7104$	0.9984	2.01 ~ 40.1	0.0002	0.0007

表4 气相色谱-串联质谱法测定 35 个化合物的线性、范围、检测限、定量限

序号	化合物	线性回归方程	相关系数	范围 ($\mu\text{g/L}$)	检测限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)
1	艾氏剂 (Aldrin)	$y=0.7341x+0.0025$	0.9991	5.01 ~ 100	0.0026	0.0078
2	α -六六六 (α -BHC)	$y=1.1024x-0.0451$	0.9995	5.00 ~ 100	0.0044	0.0134
3	β -六六六 (β -BHC)	$y=0.9194x-0.0091$	0.9992	5.00 ~ 100	0.0060	0.0181
4	γ -六六六 (γ -BHC)	$y=0.6409x-0.0021$	0.9990	5.00 ~ 100	0.0057	0.0172
5	σ -六六六 (σ -BHC)	$y=0.5955x-0.0123$	0.9947	5.00 ~ 100	0.0068	0.0207
6	杀虫脒 (Chlordimeform)	$y=0.8251x-0.0141$	0.9980	2.00~40.0	0.0037	0.0113
7	蝇毒磷 (Coumaphos)	$y=0.5503x-0.0476$	0.9974	5.01 ~ 100	0.0039	0.0117
8	4,4'-滴滴滴 (4,4'-DDD)	$y=7.7536x-0.4191$	0.9975	5.00 ~ 100	0.0030	0.0092
9	4,4'-滴滴伊 (4,4'-DDE)	$y=4.3348x+0.0027$	0.9988	5.00 ~ 100	0.0043	0.0129
10	2,4'-滴滴涕 (2,4'-DDT)	$y=2.8763x-0.2075$	0.9976	5.00 ~ 100	0.0040	0.0121
11	4,4'-滴滴涕 (4,4'-DDT)	$y=1.5349x-0.1034$	0.9975	5.00 ~ 100	0.0023	0.0069
12	内吸磷-S (Demeton S)	$y=0.3253x-0.0071$	0.9938	1.40 ~ 28.0	0.0018	0.0055
13	内吸磷-O (Demeton O)	$y=0.7240x-0.0013$	0.9976	0.60 ~ 12.0	0.0010	0.0030
14	4,4' 三氯杀螨醇 (o,p' -Dicofol)	$y=1.6167x-0.0381$	0.9979	10.0 ~ 200	0.0065	0.0196
15	2,4' 三氯杀螨醇 (p,p' -Dicofol)	$y=4.1818x+0.3226$	0.9956	10.0 ~ 200	0.0071	0.0214
16	狄氏剂 (Dieldrin)	$y=0.4283x-0.0009$	0.9962	5.00 ~ 100	0.0040	0.0122
17	α -硫丹 (α -Endosulfan)	$y=0.2803x+0.0075$	0.9962	5.00 ~ 100	0.0082	0.0250
18	β -硫丹 (β -Endosulfan)	$y=0.1377x-0.0033$	0.9934	5.00 ~ 100	0.0070	0.0211
19	硫丹硫酸脂 (Endosulfan sulfate)	$y=0.3162x-0.0056$	0.9975	5.00 ~ 100	0.0048	0.0146

20	灭线磷 (Ethoprophos)	$y=1.4166x-0.0008$	0.9994	2.01 ~ 40.1	0.0029	0.0087
21	苯线磷 (Fenamiphos)	$y=0.5366x-0.0262$	0.9968	2.01 ~ 40.1	0.0031	0.0095
22	氟虫腈亚砷 (Fipronil sulfide)	$y=0.9616x-0.0112$	0.9995	2.00 ~ 40.0	0.0024	0.0072
23	氟虫腈砷 (Fipronil sulfone)	$y=3.2503x+0.0266$	0.9983	2.00 ~ 40.0	0.0014	0.0044
24	氟虫腈 (Fipronil)	$y=1.7904x+0.0001$	0.9990	2.00 ~ 40.0	0.0014	0.0044
25	氟甲腈 (Fipronil desulfinyl)	$y=1.4676x-0.0228$	0.9993	2.00 ~ 40.0	0.0024	0.0073
26	水胺硫磷 (Isocarboxiphos)	$y=1.0979x-0.0371$	0.9937	4.99 ~ 99.9	0.0034	0.0103
27	甲基异柳磷 (Isofenphos methyl)	$y=4.3696x-0.0067$	0.9983	2.01 ~ 40.2	0.0017	0.0051
28	久效磷 (Monocrotophos)	$y=0.9016x-0.0240$	0.9984	3.00 ~ 60.0	0.0028	0.0086
29	除草醚 (Nitrofen)	$y=0.4620x-0.0294$	0.9981	5.00 ~ 100	0.0048	0.0146
30	对硫磷 (Parathion)	$y=0.4737x-0.0092$	0.9992	2.00 ~ 40.0	0.0026	0.0079
31	甲基对硫磷 (Parathion methyl)	$y=0.4661x-0.0049$	0.9997	2.00 ~ 40.0	0.0016	0.0050
32	甲拌磷 (Phorate)	$y=0.3846x-0.0013$	0.9958	2.00 ~ 40.0	0.0028	0.0085
33	甲基硫环磷 (Phosfolan methyl)	$y=1.4052x-0.0461$	0.9991	3.00 ~ 60.0	0.0020	0.0062
34	治螟磷 (Sulfotep)	$y=0.7981x+0.0041$	0.9962	2.01 ~ 40.1	0.0033	0.0101
35	特丁硫磷 (Terbufos)	$y=2.1352x-0.0656$	0.9969	2.00 ~ 40.0	0.0015	0.0046

由表 3、表 4 得出,各化合物在设计范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.990。本实验室建立的 33 种禁用农药多残留测定法的定量限均小于药典标准中的定量限。

3.2.3 准确度

选取空白基质黑老虎样品,在样品制备过程中同时进行低、中、高三不同浓度的样品加标,每个浓度的样品加标各做三个平行,计算这三组样品加标的加标回收率,分析其相对标准偏差 *RSD%*。结果显示高效液相色谱-串联质谱法化合物的加标回收率在 73.9% ~ 123.3% 之间, *RSD%* 在 2.1% ~ 9.4% 之间。气相色谱-串联质谱法各化合物的加标回收率在 76.8% ~ 116.7% 之间, *RSD%* 在 3.3% ~ 8.4% 之间。结果表明,本实验室建立的 33 种禁用农药多残留测定法的准确度符合标准要求。

3.2.4 重复性

取空白黑老虎样品,采用直接提取法制备 6 份同一浓度的加标供试品溶液进行测定,计算其响应值的相对标准偏差 *RSD%*,分析该方法的重复性。

最终计算结果为高效液相色谱-串联质谱法化合物的 *RSD%* 在 2.1% ~ 8.4% 之间,气相色谱串联质谱法化合物的 *RSD%* 在 1.0% ~ 8.1% 之间。符合方法学验证要求。

3.2.5 稳定性

精密称定黑老虎样品,在样品制备过程中加入中浓度的标准溶液,制备完成后样液分别放置 0h、6h、12h、24h、36h、48h 后取出测定。高效液相色谱-串联质谱法化合物的 *RSD%* 在 0.5% ~ 4.9% 之间,气相色谱串联质谱法化合物的 *RSD%* 在 0.2% ~ 4.1% 之间。由气相色谱质谱稳定性结果和液相色谱质谱稳定性结果得出 33 种禁用农药在 48h 内 *RSD%* < 5%, 相对稳定。

由此可以证明,本实验室建立的 33 种禁用农药测试方法符合药典要求,其测试的最终结果是科学、有效的。

3.5 实际样品测定

本实验选取了 10 批次来自广西产地的黑老虎样品,选取空白基质的黑老虎样品,在经过直接提取法处理后收集样品溶液,按照本实验室建立的方法进行检测,依照《中国药典》2020 版通则 0212 药材和饮片检定通则的限量要求,均未检出 33 种禁用农药。

4 结论

本文建立了以直接提取法为主要前处理方法,以气相色谱-串联质谱法和高效液相色谱-串联质谱法为主要测定方法,通过方法学确认,考察了本实验方法的准确度、检测限、线性、范围、重复性、稳定性等指标,证明该方法适用于本实验室日常检测。通过使用该方法进行 10 批次黑老虎禁用农药检测,结果均符合《中国药典》2020 版限量要求。

参考文献

- [1]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第三十卷第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 234-236.
- [2]中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典—一九七七年版一部[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 594.
- [3]北京市卫生局. 北京市中药材标准(1998年版)[S]. 北京: 首都师范大学出版社, 1998: 264-265.
- [4]广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第一册)[S]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 188-189.
- [5]湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准(2009年版)[S]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2010: 109.
- [6]广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准第一卷(2014年版)[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2014: 200-201.
- [7]李慧君, 张文生, 吴洁珊, 等. 中药材农药残留研究现状[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1): 48-52.
- [8]国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 30-31, 275-279.
- [9]刘婧, 黄瑞松, 覃丽梅, 等. 广西 21 种大宗药材有机氯农药残留量的研究[J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(6): 837-840.
- [10]徐亮. 黑老虎的质量标准研究[D]. 苏州大学, 2016.
- [基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1707102); 广药集团黑老虎规范化种植基地项目
- [第一作者] 谢珊珊, 助理工程师, 从事药品、食品质量检验技术研究开发.
- [通讯作者] 马恩耀, 主管中药师, 从事中药物质基础及其质量标准研究.