

# 高色素高油脂终极之王——中药补骨脂的 33 种农残测定分析

## 背景

c 又名黑故子、破故纸，为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实。据报道，补骨脂含挥发油约 20%、还含有碱溶性树脂、不挥发性萜类油、有机酸、香豆素、黄酮和皂苷等成分。近期很多中药检测企业反馈补骨脂中药农残测定非常难做，GCMSMS 分析中化合物干扰大且色谱柱污染较为严重极易造成目标物丢峰，同样 LCMSMS 分析中也有个别化合物干扰导致的丢峰，常规的固相萃取法一、固相萃取法二、固相萃取法三都无法解决。针对以上含重色素、挥发油和树脂的样品分析存在的问题，纳谱分析优化了 HLB 产品对于挥发油和树脂的吸附能力。相比常规固相萃取产品，优化后的 HLB 柱可以吸附更多色素、挥发油、树脂类成分，从而降低了样品中色素对色谱柱的污染和树脂挥发油类照成丢峰拖尾的基质效应，有效的提高了补骨脂样品分析时仪器的灵敏度。今天，我们来看看补骨脂项目的前处理效果吧。



补骨脂药材

## 适用范围

本方法参考中国药典 2020 版 2341 第五法中的固相萃取法 2，前处理方法做了部分调整，适用于含有挥发油类基质干扰大和色素较多的中药材农残检测。

## 实验步骤

### 1 对照品溶液的制备

#### 1.1 混合对照品配制

精密量取禁用农药混合 1mL，置 20mL 量瓶中，加乙腈稀释至刻度，摇匀，备用；

#### 1.2 气相色谱-串联质谱法分析用内标溶液的制备

取磷酸三苯酯对照品适量，精密称定，加乙腈溶解并制成每 1mL 含 1.0mg 的溶液，即得。精密量取适量，加乙腈制成每 1mL 含 0.1 $\mu$ g 的溶液。

#### 1.3 空白基质溶液的制备

取空白基质样品，同供试品溶液的制备方法处理制成空白基质溶液。

## 1.4 基质混合对照溶液的制备

分别精密量取空白基质溶液 1.0mL(6 份)，置氮吹仪上，40°C 水浴浓缩至约 0.6mL，分别加入混合对照品溶液 10μL、20 μL、50 μL、100μL、150μL、200μL，加乙腈稀释至 1mL，涡旋混匀，即得。

## 2 供试品溶液的制备

### 2.1 提取

精密称取 5g 样品（3 号筛），加氯化钠 1g，加入 50mL 乙腈，匀浆处理 2 分钟，离心后分取上清液，残渣再加 50mL 乙腈，匀浆处理 1 分钟，离心后，合并两次提取上清液，减压浓缩至 3~5mL，加乙腈定容至 10mL，摇匀，置-20°C 冷藏 3h 或家用冰箱冷藏过夜，取出趁冷离心，分取所有上清液置离心管中，摇匀，待净化。

## 3 净化

### GCMSMS 样品:

SPE 柱: SelectCore HLB-C 固相萃取柱 500mg/6mL

净化: 取 SelectCore HLB-C 固相萃取柱 500mg/6mL 小柱，加乙腈 5mL 活化，再取补骨脂提取液 2mL 置已活化的 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 5mL 乙腈洗脱，合并样品液与洗脱液，氮吹至 2mL 即得。

GC/MS/MS 测定: 精密量取过固相萃取柱氮吹定容后的溶液 1mL，氮吹至 0.4mL 加入混合对照溶液，乙腈定容至 1mL，再加入 0.3 mL 磷酸三苯酯溶液，混匀，过 0.22μm 尼龙针式过滤器，上机分析。

注意事项: 样品洗脱定容后只有 2mL, 故需要配置 6 个浓度点标准曲线时可合并 5 次分别 5 根 SelectCore HLB-C 固相萃取柱 500mg/6mL 小柱净化的样品液与洗脱液，40°C 以下减压回收至 5mL，转移至 10mL 容量瓶，再取适量乙腈冲洗减压回收瓶并入样品液，定容至 10mL。如若做快速样品筛查时可直接将净化的样品液与洗脱液并入 10mL 已校准的刻度具塞试管中氮吹至 2mL 即得。

### LCMSMS 样品:

SPE 柱: SelectCore HLB 固相萃取柱 500mg/6mL; 30/pkg

净化: 量取补骨脂提取液 3mL，过 SelectCore HLB 固相萃取柱 500mg/6mL，收集全部净化液，混匀，即得。

LC/MS/MS 测定: 精密量取过固相萃取柱后溶液 1mL 氮吹至 0.4ml 加入混合对照品液，乙腈定容至 1mL，再加入 0.3 mL 水，混匀，过 0.22μm 尼龙针式过滤器，上机分析。

## 4 气相色谱-串联质谱法（岛津 GC-MS -TQ8040 NX）

### 色谱条件

色谱柱: SHIMADZU SH-Rxi-17Sil MS, 30m×0.25mm, 0.25μm;

进样口温度: 250°C;

升温程序: 初始温度为 60°C，保持 1min；以 10°C/min 升温至 160°C；再以 2°C/min 升温至 230°C，最后以 15°C/min 升温至 300°C，保持 6min；

载气: 高纯氮气（纯度>99.999%）；

进样方式：不分流进样；

恒压模式：146kPa；

进样量：1 $\mu$ L。

#### 质谱条件

电离方式：电子轰击电离源（EI）；

电离能量：70Ev；

接口温度：250 $^{\circ}$ C；

离子源温度：250 $^{\circ}$ C；

监测方式：多反应检测模式（MRM）；

溶剂延迟：10.0min。

#### GCMSMS 监测目标物注意事项：

挥发油类基质中：氟虫腈类化合物偶见飘逸、可采取 LCMSMS 监测提高实验效率。

补骨脂基质中氟甲腈、氟虫腈、氟虫腈亚砷、内吸磷、甲基异柳磷、久效磷、水胺硫磷采用 LCMSMS 监测结果，GCMSMS 可不监测以上化合物。

甲基对硫磷药典配套参考离子对响应低可选用：125.0>47.0 CE：10 作为参考离子对，响应较高。

$\alpha$ -硫丹定量离子为：240.80>205.60 参考离子为：194.80>159.00

除草醚定量离子为：282.80>253.00 参考离子为：282.80>201.80

对硫磷定量离子为：139.00>109.00 参考离子为：291.00>81.00

#### 5 高效液相色谱-串联质谱法（岛津 LC-MS 8045）

##### 色谱条件

色谱柱：ChromCore C18-MS Pesticides 中药农残专用柱(2.1 $\times$ 100 mm，2.6  $\mu$ m)

流动相：

A：0.1%甲酸水溶液（含有 5mmol/L 甲酸铵）

B：乙腈-0.1%甲酸水溶液（含有 5mmol/L 甲酸铵）=95:5

流速：0.3 mL/min

柱温：40  $^{\circ}$ C

进样量：2  $\mu$ L

梯度：

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	0.3	70	30
1	0.3	70	30
12	0.3	0	100
14	0.3	0	100
14.1	0.3	70	30
16	0.3	70	30

##### 质谱条件

离子源：电喷雾离子源（Electrospray ionization, ESI）正离子扫描

监测方式：多反应监测（Multiple Reaction Monitoring, MRM）

离子源接口电压：4.5kV

雾化气：氮气 3.0L/min

加热气：干燥空气 10.0L/min

DL 温度：250°C

加热模块温度：400°C

接口温度：300°C

干燥气：N<sub>2</sub> 10 L/min

**LCMSMS 监测目标物注意事项：**

目标物	定量离子	CE 电压	参考离子	CE 电压	msec	保留时间（参考）
氟虫腈	434.90>81.00	15	434.90>249.80	30	5	7.341
氟甲腈	386.90>350.80	10	386.90>281.80	35	5	7.656
氟虫腈砒	450.90>281.80	30	450.90>243.80	66	5	8.093
氟虫腈亚砒	419.10>383.10	10	419.10>262.10	27	5	8.103
水胺硫磷	291.00>231.00	-15	291.00>121.00	-30	5	5.106

以上目标物中氟虫腈类化合物均为负离子模式采集，水胺硫磷为正离子模式采集。

由于分析化合物多，且存在正负离子模式同时采集，为提高仪器灵敏度可采用分段采集模式进行，分段采集可设置测定时间为各目标物保留时间前 0.5min 开始-目标物保留时间后 0.5min 结束。

挥发油基质样品自动进样器托盘温度不宜过低，否则个别样品会出现分层，导致分析结果不准确，建议 25°C 为宜。

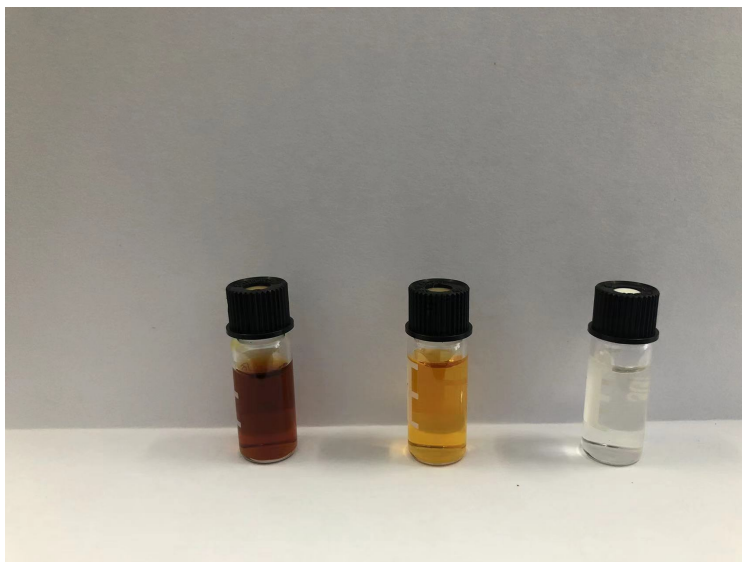
表 1 补骨脂中 33 种农药残留的测定添加回收结果（%）

农残成分	回收率	农残成分	回收率	农残成分	回收率
甲胺磷	76.8%	地虫硫磷	83.9%	涕灭威砒	103.5%
甲基对硫磷	84.5%	硫线磷	109.5%	涕灭威亚砒	91.0%
对硫磷	102.7%	蝇毒磷	89.5%	灭线磷	83.1%
久效磷	102.5%	治螟磷	83.8%	氯唑磷	101.1%
磷胺	109.5%	特丁硫磷	87.4%	水胺硫磷	83.6%
α-六六六	84.1%	特丁硫磷砒	98.4%	α-硫丹	88.2%
β-六六六	83.3%	特丁硫磷亚砒	88.4%	β-硫丹	85.0%
γ-六六六	83.9%	甲基硫环磷	66.5%	硫丹硫酸酯	90.6%
δ-六六六	83.3%	甲磺隆	88.2%	氟虫腈	91.8%
2,4'-滴滴涕	76.6%	氯磺隆	73.5%	氟虫腈砒	86.7%
4,4'-滴滴涕	83.7%	胺苯磺隆	71.4%	氟虫腈亚砒	98.5%
4,4'-滴滴涕	79.2%	甲拌磷	81.3%	氟甲腈	100.8%
4,4'-滴滴伊	75.3%	甲拌磷砒	86.8%	o,p'-三氯杀螨醇	77.2%
杀虫脒	80.9%	甲拌磷亚砒	88.9%	p,p'-三氯杀螨醇	80.2%
除草醚	86.6%	甲基异柳磷	91.7%	硫环磷	88.5%
艾氏剂	77.3%	内吸磷	85.5%		
狄氏剂	76.5%				
苯线磷	70.5%	克百威	91.7%		

苯线磷砒	100.9%	3-羟基克百威	78.3%
苯线磷亚砒	82.3%	涕灭威	87.1%

## 6 处理后溶液的颜色比对

### GCMS/MS 样品:



从左至右分别是补骨脂提取液、补骨脂提取液过常规固 3 SPE 柱、补骨脂提取液过 SelectCore HLB-C 固相萃取柱 500mg/6mL

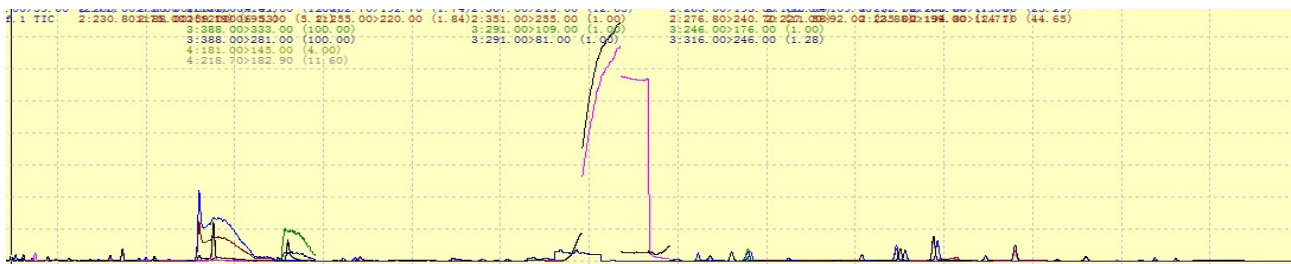
### LCMS/MS 样品:



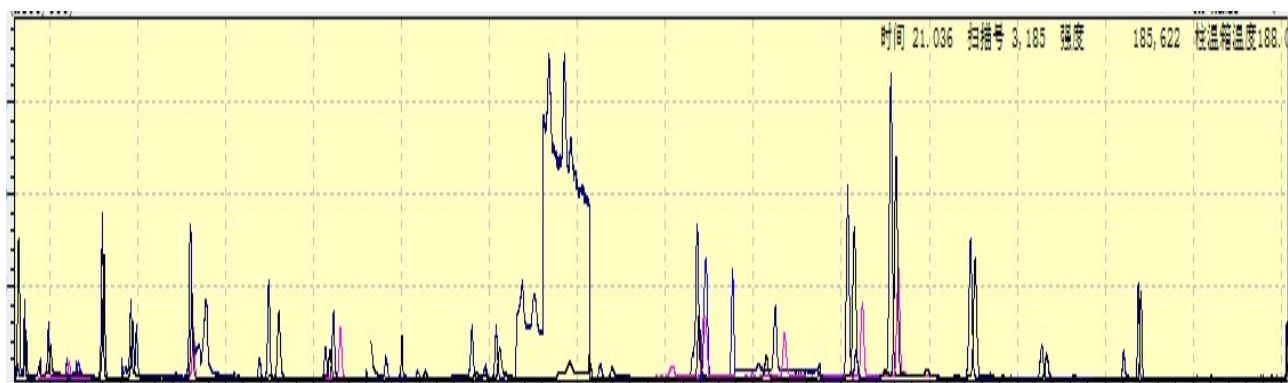
从左至右分别是补骨脂提取液、补骨脂提取液过常规固 2 SPE 柱、补骨脂提取液过 SelectCore HLB 固相萃取柱 500mg/6mL

## 7 补骨脂 GCB/NH<sub>2</sub>柱与 HLB-C 柱净化的 CGMSMS 数据分析图

常规固 3 净化 (TIC 图)



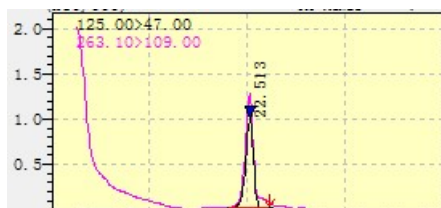
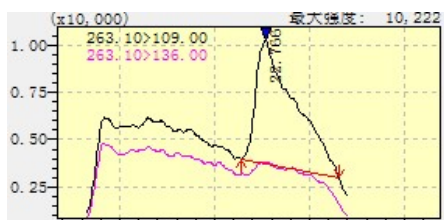
HLB-C 净化 (TIC 图)



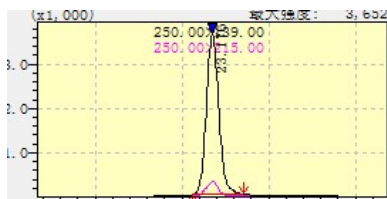
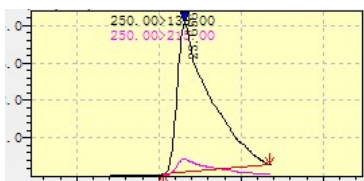
对硫磷 (左边为固 3 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)



甲基对硫磷 (左边为固 3 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)



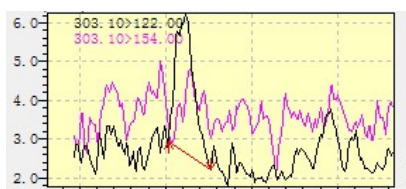
OP-三氯杀螨醇 (左边为固 3 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)



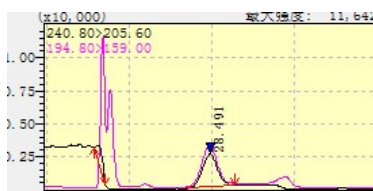
PP-三氯杀螨醇 (左边为固 3 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)



苯线磷 (左边为固 3 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)

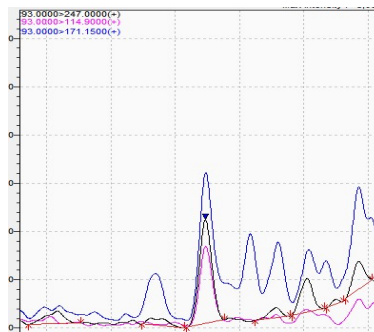
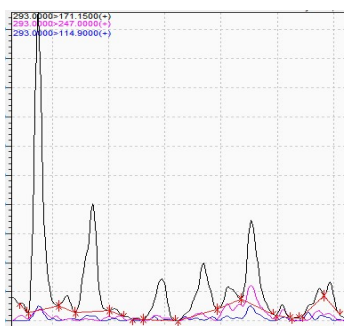


$\alpha$ -硫丹 (左边为固 3 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)

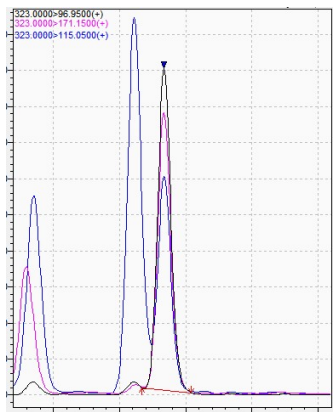
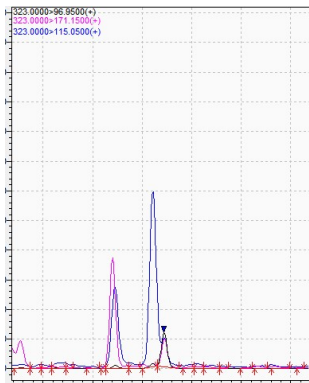


### 补骨脂常规 HLB 柱与 SelectCore HLB 固相萃取柱 500mg/6mL 净化的 LCMSMS 数据分析图

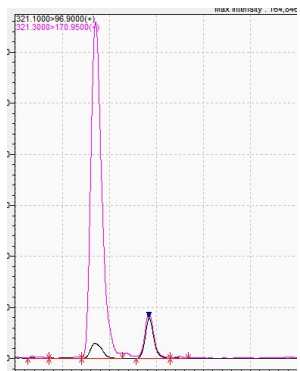
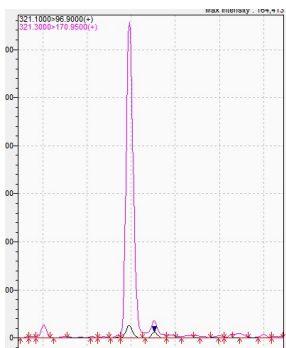
苯线磷 (左边为常规 HLB 净化样品, 右边为 SelectCore HLB 固相萃取柱 500mg/6mL 净化样品)



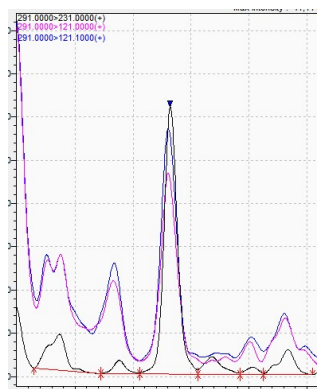
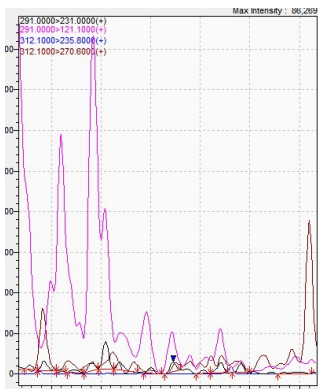
治螟磷 (左边为常规 HLB 净化样品, 右边为 SelectCore HLB 固相萃取柱 500mg/6mL 净化样品)



特丁硫磷砷 (左边为常规 HLB 净化样品, 右边为 SelectCore HLB 固相萃取柱 500mg/6mL 净化样品)



水胺硫磷 (左边为常规 HLB 净化样品, 右边为 SelectCore HLB 固相萃取柱 500mg/6mL 净化样品)



补骨脂基质加标 LCMSMS 氟虫腈类的出峰情况

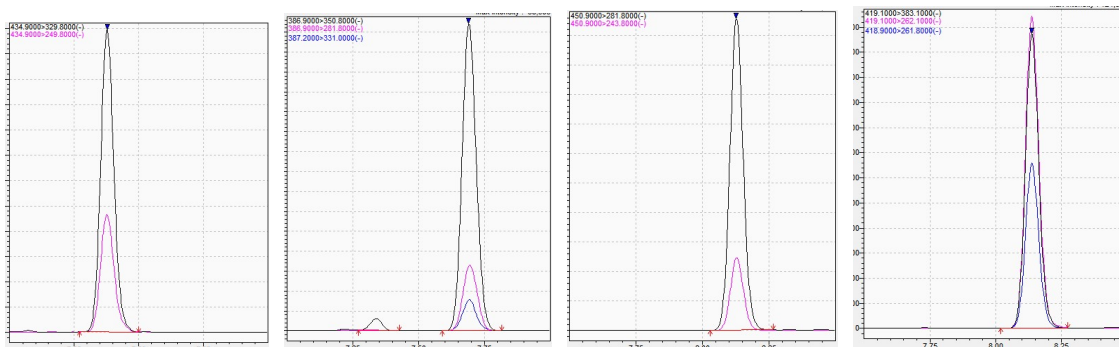
氟虫腈

氟甲腈

氟虫腈砷

氟虫腈亚砷





## 8 实验讨论

我们实验室曾用药典推荐的四种前处理方法，无论怎么调整填料的比例，都无法解决补骨脂的基质效应问题，因此我们借鉴了固相萃取 3 的上样和洗脱方式，发现把 HLB 填料量增加一倍以后，反而比传统固相萃取 3 做出的数据还要好，而且不需要用到大量的甲苯溶剂，对人员和环境都比较友好。通过以上实验数据比对，可以看出，增加填料后的 SelectCore HLB-C 500mg/6mL 中药农残专用固相萃取柱，针对补骨脂中大量色素、挥发油和树脂类成分去除效果良好，且溶液颜色较浅，减少污染气相色谱柱、衬管和离子源的风险，还极大的消除了由于基质效应带来的 $\alpha$ -硫丹、苯线磷、甲基对硫磷、对硫磷、三氯杀螨醇等农残成分的拖尾、丢峰、目标物线性不好，回收率差的问题。另外 SelectCore HLB 500mg/6mL 农残专用固相萃取柱，对补骨脂中树脂、挥发油类成分祛除效果良好，减轻了由于基质中干扰物导致的 LCMSMS 上样品中目标化合物响应低和苯线磷砷丢峰的问题，极大地减小了对离子源的污染，且目标化合物回收率高而稳定。两款固相萃取柱结合使用可为补骨脂的农药残留实验数据的稳定性和可靠性提供良好的帮助。