

中药金银花的 33 种农残测定分析（固相萃取法）

背景

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花，含有挥发油和色素类成分。近期国家开始逐步实施 33 项中药农残抽检工作，比如这两天湖北省药监在 2022 年第一期药品质量公告中就首次发布金银花的 33 项农残抽检不合格，这也预示着今年各省的中药农残抽检逐步常态化和系统化，这也为人民吃上放心药提供了保障。今天，我们用固相萃取法来看金银花项目的前处理效果吧。



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方式二和方式三，适用于含色素、挥发油、基质复杂中药材的农残检测。

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 μ g 的溶液。

1.3 空白基质溶液的制备

取金银花空白基质样品，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 $^{\circ}$ C 水浴浓缩至约 0.6mL，分别加入混合对照品溶液 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 供试品溶液的制备（固相萃取法）

2.1 提取

取金银花粉末（过3号筛）5 g，精密称定，加氯化钠1 g，加入50 mL乙腈，匀浆处理2 min，离心后分取上清液，残渣再加50 mL乙腈，匀浆处理1 min，离心后，合并两次提取上清液，减压浓缩至3~5 mL，加乙腈定容至10 mL，摇匀，待净化。

2.2 净化

GC-MS/MS 样品：

SPE 柱：SelectCore GCB/NH₂-II 固相萃取柱 500mg/500mg/6mL



净化：取 SelectCore GCB/NH₂-II 固相萃取柱用乙腈：甲苯（3：1）10 mL 活化，量取上述金银花提取液 2 mL，置已活化的 SelectCore GCB/NH₂-II 固相萃取柱中，用乙腈：甲苯（3：1）15 mL 洗脱，收集全部样品液与洗脱液，减压回收至 2 mL，即得。

LC-MS/MS 样品：

SPE 柱：SelectCore HLB 固相萃取柱 200mg/6mL



净化：量取上述金银花提取液 3 mL，过 SelectCore HLB 固相萃取柱 200mg/6mL，收集全部净化液，混匀，即得。

3 仪器分析

GC-MS/MS 测定（气相色谱-串联质谱法）：

精密量取上述减压回收后的样品溶液 1 mL，氮吹至 0.4 mL 加入混合对照溶液，乙腈定容至 1 mL，再加入 0.3 mL 磷酸三苯酯溶液，混匀，过 0.22 μm 尼龙针式过滤器，上机分析。

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: 高纯氦气 (纯度>99.999%);

进样方式: 不分流进样;

恒压模式: 146kPa;

进样量: 1μL。

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°C;

离子源温度: 250°C;

监测方式: 多反应检测模式 (MRM);

溶剂延迟: 10.0min。

LC-MS/MS 测定 (高效液相色谱-串联质谱法):

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

色谱条件

色谱柱: ChromCore C18-MS Pesticides 中药农残专用柱(2.1×100 mm, 2.6 μm)

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 °C

进样量: 2 μL

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：N₂ 10 L/min

4 注意事项

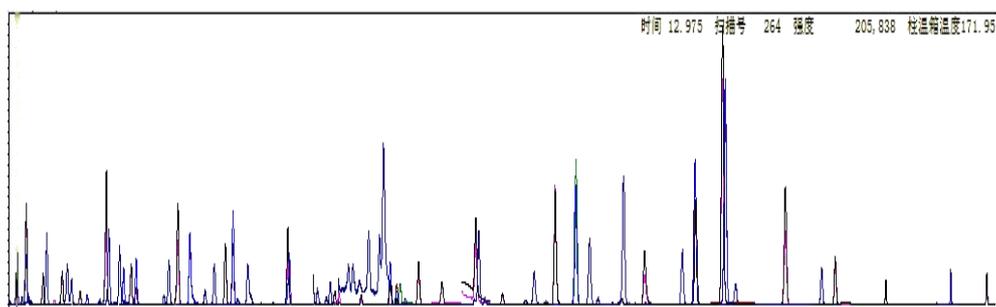
LC-MS/MS：挥发油基质，自动进样器温度不宜设置过低，否则可能出现分层导致分析结果不准确；

GCB/NH₂-II 固相萃取柱需要提前进行活化平衡，该过程可以用 SPE 转接头加快溶剂活化速度；

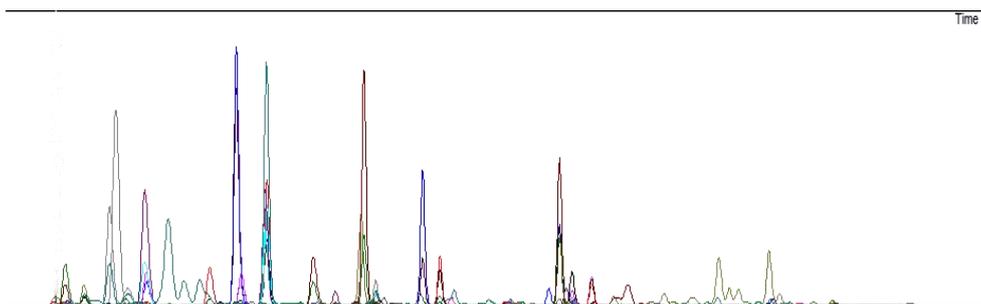
上样后流出液和后续洗脱液都要接收，上样过程中可通过自重力将样品进行过柱，而洗脱过程中如滴速较慢，也可选择 SPE 转接头加快过柱速度；



5 实验结果



固相萃取法 3 处理金银花基质 LOQ 浓度点加标谱图 (GC-MS/MS 方法)



固相萃取法 2 处理金银花基质 LOQ 浓度点加标谱图 (LC-MS/MS 方法)

金银花回收率考察

| 农残成分 | 回收率 | 农残成分 | 回收率 | 农残成分 | 回收率 |
|---------------|--------|---------|--------|--------------------|--------|
| 甲胺磷 | 73.9% | 地虫硫磷 | 72.8% | 涕灭威砒 | 82.4% |
| 甲基对硫磷 | 93.2% | 硫线磷 | 86.9% | 涕灭威亚砒 | 75.2% |
| 对硫磷 | 110.9% | 蝇毒磷 | 92.2% | 灭线磷 | 84.8% |
| 久效磷 | 71.3% | 治螟磷 | 90.3% | 氯唑磷 | 85.6% |
| 磷胺 | 77.4% | 特丁硫磷 | 90.1% | 水胺硫磷 | 89.2% |
| α -六六六 | 85.3% | 特丁硫磷砒 | 93.0% | α -硫丹 | 88.9% |
| β -六六六 | 91.8% | 特丁硫磷亚砒 | 89.2% | β -硫丹 | 93.2% |
| γ -六六六 | 89.5% | 甲基硫环磷 | 82.6% | 硫丹硫酸酯 | 90.7% |
| δ -六六六 | 86.3% | 甲磺隆 | 80.3% | 氟虫腈 | 81.7% |
| 2,4'-滴滴涕 | 95.6% | 氯磺隆 | 77.8% | 氟虫腈砒 | 93.7% |
| 4,4'-滴滴涕 | 90.5% | 胺苯磺隆 | 80.9% | 氟虫腈亚砒 | 93.5% |
| 4,4'-滴滴涕 | 98.3% | 甲拌磷 | 92.3% | 氟甲腈 | 92.9% |
| 4,4'-滴滴伊 | 91.8% | 甲拌磷砒 | 102.5% | <i>o,p'</i> -三氯杀螨醇 | 91.5% |
| 杀虫脒 | 72.7% | 甲拌磷亚砒 | 89.0% | <i>p,p'</i> -三氯杀螨醇 | 101.6% |
| 除草醚 | 92.8% | 甲基异柳磷 | 98.9% | 硫环磷 | 71.2% |
| 艾氏剂 | 87.5% | 内吸磷-O | 88.9% | | |
| 狄氏剂 | 91.9% | 内吸磷-S | 86.8% | | |
| 苯线磷 | 83.8% | 克百威 | 80.6% | | |
| 苯线磷砒 | 89.1% | 3-羟基克百威 | 77.3% | | |
| 苯线磷亚砒 | 85.5% | 涕灭威 | 86.0% | | |

6 实验讨论

通过以上实验对比数据可以看出, SelectCore GCB/NH₂-II 500mg/500mg/6mL 固相萃取柱和 SelectCore HLB 200mg/6mL 固相萃取柱搭配使用, 针对金银花中干扰成分去除效果良好, 且各化合物回收都较为良好, 为金银花的农药残留实验数据的稳定性和可靠性提供了良好的帮助。