

中药灵芝的 33 种农残测定分析

背景

本品为多孔菌科真菌赤芝或紫芝的干燥子实体。由于灵芝质地松泡，应用直接提取法时匀浆不易将样品完全均质，常见因提取不完全导致回收率偏低，因此针对这个品种我们推荐快速样品处理法（QuEChERS）。今天，我们来看看灵芝项目的前处理效果吧。



灵芝

适用范围

本方法参考中国药典 2020 版 2341 第五法中的 QuEChERS 法。

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

粉碎：先将灵芝药材切成小块或片，使用粉碎机将其粉碎成粉末和絮状物的混合物，再将其转入开刀口的打粉机或破壁打粉机彻底粉碎，过 3 号筛即得。

QuEChERS 法：

提取：取灵芝粉末（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，加入无水硫酸镁与无水乙酸钠的混合粉末(4: 1)7.5g，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，待净化。

附注：由于灵芝粉末质地松泡，如果选择直接提取法可能匀浆不彻底，导致提取不完全；且第二次加入 50mL 乙腈后，样品液极易溢出离心管导致结果不准确；故选择 QuEChERS 法提取较为理想。如使用直接提取法需选择合适的样品量处理，避免出现上述问题。

3 净化

Q 法净化管：Q-15PCSG01 SelectCore QuEChERS 净化管 15mL, 900mg MgSO₄, 300mg PSA, 300mg C18, 300mg Silica, 90 mg GCB

净化：取上述提取液上清液 9mL 置 Q-15PCSG01 净化管中涡旋使充分混匀，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，即得。

GC-MS/MS 测定：精密吸取上清液 5mL，置氮吹仪上于 35°C 水浴浓缩至约 0.4mL，加入混合对照品液再加乙腈稀释至 1.0mL，涡旋混匀，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。

LC-MS/MS 测定：精密吸取上清液 5mL，置氮吹仪上于 35°C 水浴浓缩至约 0.4mL，加入混合对照品液再加乙腈稀释至 1.0mL，涡旋混匀，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：高纯氦气（纯度>99.999%）；

进样方式：不分流进样；

恒压模式：146kPa；

进样量：1 μ 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。

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 μ 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 μ 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

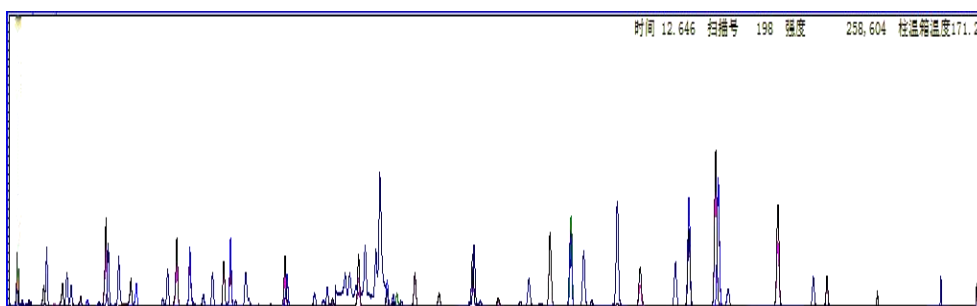
DL 温度：250°C

加热模块温度：400°C

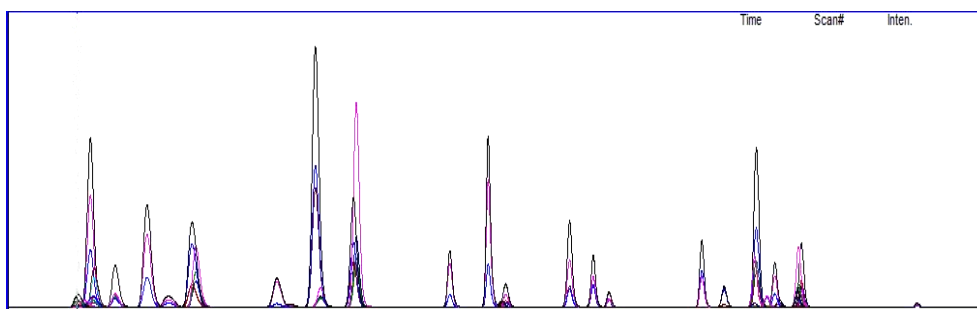
接口温度：300°C

干燥气：N₂ 10 L/min

6 实验结果



QuEChERS 法处理灵芝基质 LOQ 浓度点加标谱图 (GC-MS/MS 方法)



QuEChERS 法处理灵芝基质 LOQ 浓度点加标谱图 (LC-MS/MS 方法)

表 (1) 灵芝中 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	71.4%	地虫硫磷	88.6%	涕灭威砒	70.6%
甲基对硫磷	89.9%	硫线磷	93.5%	涕灭威亚砒	77.5%
对硫磷	76.3%	蝇毒磷	78.9%	灭线磷	87.9%
久效磷	84.5%	治螟磷	85.4%	氯唑磷	78.8%
磷胺	90.6%	特丁硫磷	83.0%	水胺硫磷	86.1%
α -六六六	87.5%	特丁硫磷砒	80.1%	α -硫丹	83.8%
β -六六六	85.7%	特丁硫磷亚砒	82.9%	β -硫丹	85.0%
γ -六六六	86.9%	甲基硫环磷	83.8%	硫丹硫酸酯	83.0%

δ-六六六	85.4%	甲磺隆	81.6%	氟虫腈	87.2%
2,4'-滴滴涕	80.1%	氯磺隆	77.2%	氟虫腈砒	87.9%
4,4'-滴滴滴	85.5%	胺苯磺隆	78.7%	氟虫腈亚砒	87.4%
4,4'-滴滴涕	81.5%	甲拌磷	83.9%	氟甲腈	87.0%
4,4'-滴滴伊	82.7%	甲拌磷砒	96.5%	o,p'-三氯杀螨醇	83.9%
杀虫脒	74.0%	甲拌磷亚砒	86.5%	p,p'-三氯杀螨醇	83.9%
除草醚	83.5%	甲基异柳磷	85.1%	硫环磷	90.8%
艾氏剂	80.3%	内吸磷-O	80.2%		
狄氏剂	83.5%	内吸磷-S	91.2%		
苯线磷	75.4%	克百威	72.9%		
苯线磷砒	70.0%	3-羟基克百威	75.5%		
苯线磷亚砒	68.4%	涕灭威	89.6%		

7 实验讨论

通过以上实验数据可以看出，灵芝使用 QuEChERS 法提取效果较为理想，搭配 Q-15PCSG01 净化管净化后的灵芝样品回收率较好，为灵芝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。