

高挥发油与高生物碱类中药吴茱萸的 33 种农残测定分析

背景

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸、石虎或疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实，含有大量的挥发油、柠檬苦素类和生物碱类成分，这些成分对 GCMSMS 和 LCMSMS 分析中个别农残化合物干扰大且响应较低，农残线性和回收率较差，偶见丢峰。常规的固相萃取法一、固相萃取法二、固相萃取法三都不能很好的净化。纳谱分析近期针对以上含挥发油和生物碱样品分析存在的问题，在改进填料的吸附能力的同时，推出了一种组合前处理方法。相比常规固相萃取方式，优化后的三种固相萃取柱可以有所针对性的吸附更多色素、挥发油、生物碱、树脂类成分，从而降低了样品中色素对色谱柱的污染和生物碱、挥发油类照成目标物响应低、保留时间漂移、丢峰等基质效应，有效的提高了吴茱萸样品分析时农残目标物的响应值。今天，我们来看看吴茱萸项目的前处理效果吧。



吴茱萸

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，适用于含有挥发油、生物碱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 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°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 1min(4000 转/min)，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，再取吴茱萸提取液 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

净化：量取上述吴茱萸提取液 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。

补充净化办法：（用于吴茱萸 LCMSMS 中 3-羟基克百威、特丁硫磷砒、甲拌磷砒）也可用于除甲胺磷、磺隆类、久效磷以外的化合物联合分析

取：SelectCore GCB/NH₂-A 固相萃取柱，加乙腈：甲苯（3:1）5mL 活化，再取吴茱萸提取液 2mL 置已活化的 SelectCore GCB/NH₂-A 固相萃取柱中，用乙腈：甲苯（3:1）15mL 洗脱，收集样品液与洗脱液，减压回收至 2mL 即得。

注意事项：由于 SelectCore GCB/NH₂-A 固相萃取柱净化洗脱液中含甲苯，减压回收时应尽量浓缩干一点，减少甲苯残留，甲苯残留量高可能导致个别化合物保留时间提前，配制样品液与基质加标和前加标液时应不加水，

由于甲苯与水不溶，可能会导致分层而使分析结果不准确。

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：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。

GCMSMS 监测目标物注意事项：

甲基对硫磷定量离子：263.10>109.00 CE: 13 参考离子：125.00>47.00 CE: 10

地虫硫磷定量离子：245.90>137.00 CE:5 参考离子：245.90>109.00 CE:15 保留时间(参考):16-19min
与γ-666 保留时间接近。

久效磷参考 LCMSMS 分析结果。

经过 SelectCore HLB-C 处理后的吴茱萸样品，GCMSMS 分析化合物均无干扰，且氟虫腈类化合物保留时间均无漂移。

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(2.1×100 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

LCMSMS 监测目标物注意事项:

吴茱萸基质中 3-羟基克百威和甲拌磷响应较低, 在样品出现阳性或线性达不到要求时采用上述补充净化办法来联合分析, 补充净化办法净化的吴茱萸基质中 3-羟基克百威和甲拌磷响应较为良好。

目标物	定量离子	CE 电压	参考离子	CE 电压	msec	保留时间 (参考)
水胺硫磷	291.00>231.00	-15	291.00>121.00	-30	5	5.106

3-羟基克百威定量离子为: 238.1>163.1

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。

地虫硫磷参考 GCMSMS 分析结果 LCMSMS 可不分析此化合物

甲基异柳磷参考 GCMSMS 分析结果

蝇毒磷参考 GCMSMS 分析结果

杀虫脒参考 GCMSMS 分析结果

由于吴茱萸基质复杂, 且目标物在吴茱萸基质中干扰情况为基质减弱, 响应低, 为提高仪器灵敏度, 建议 LCMSMS 样品分析时采用分段采集的办法, 分段采集设置时间段为各目标物保留时间前后 0.5min 即可。

表 1 吴茱萸中 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	79.8%	地虫硫磷	95.7%	涕灭威砒	82.1%
甲基对硫磷	92.9%	硫线磷	83.4%	涕灭威亚砒	94.6%
对硫磷	95.7%	蝇毒磷	85.6%	灭线磷	93.9%
久效磷	79.8%	治螟磷	97.9%	氯唑磷	88.8%
磷胺	92.3%	特丁硫磷	96.7%	水胺硫磷	98.9%
α-六六六	92.8%	特丁硫磷砒	100.3%	α-硫丹	94.8%
β-六六六	91.0%	特丁硫磷亚砒	86.3%	β-硫丹	85.0%
γ-六六六	91.1%	甲基硫环磷	79.0%	硫丹硫酸酯	76.2%

δ-六六六	79.3%	甲磺隆	66.1%	氟虫腈	81.9%
2,4'-滴滴涕	91.5%	氯磺隆	61.2%	氟虫腈砒	95.2%
4,4'-滴滴涕	89.2%	胺苯磺隆	63.2%	氟虫腈亚砒	99.0%
4,4'-滴滴涕	89.3%	甲拌磷	97.0%	氟甲腈	97.6%
4,4'-滴滴伊	91.0%	甲拌磷砒	88.3%	o,p'-三氯杀螨醇	93.5%
杀虫脒	103.4%	甲拌磷亚砒	86.4%	p,p'-三氯杀螨醇	90.2%
除草醚	97.2%	甲基异柳磷	100.6%	硫环磷	85.0%
艾氏剂	94.2%	内吸磷 O	101.3%		
狄氏剂	86.1%	内吸磷 S	108.8%		
苯线磷	81.5%	克百威	77.8%		
苯线磷砒	94.6%	3-羟基克百威	65.2%		
苯线磷亚砒	89.2%	涕灭威	85.8%		

6 处理后溶液的颜色对比

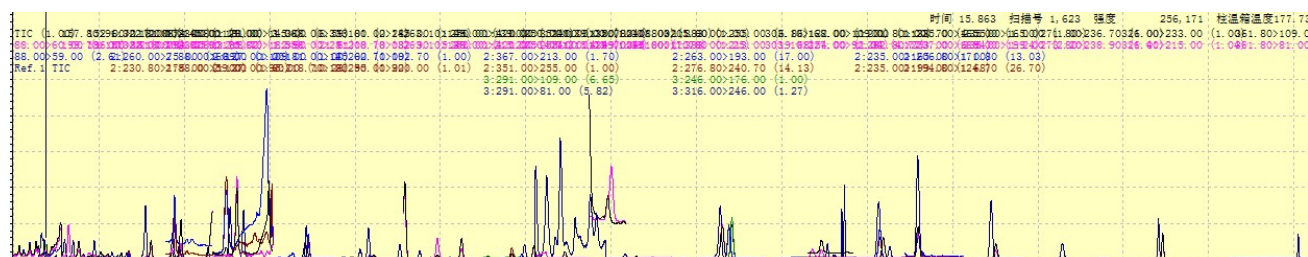
GCMS/MS 样品:



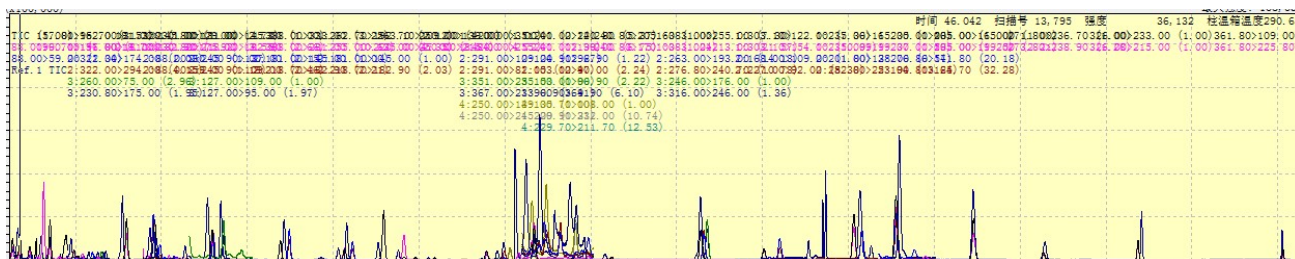
从左至右分别是吴茱萸提取液、吴茱萸提取液过 SelectCore HLB 500mg/6mL 小柱、吴茱萸提取液过 SelectCore GCB/NH₂-A 500mg/500mg/6mL 小柱、吴茱萸提取液过 SelectCore HLB-C 500mg/6mL 小柱

7 吴茱萸普通固 2 柱与 HLB-C 柱净化的 CGMSMS 数据分析图

普通固 2 净化 (TIC 图)

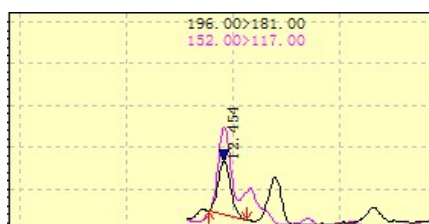
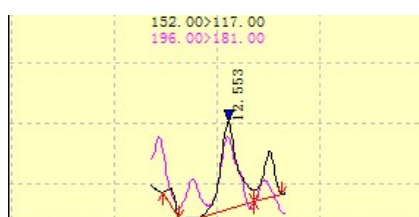


HLB-C 净化 (TIC 图)

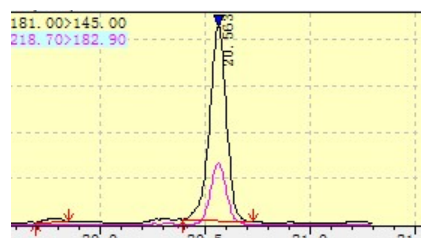


←

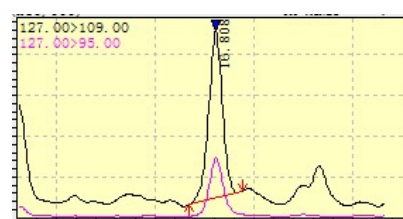
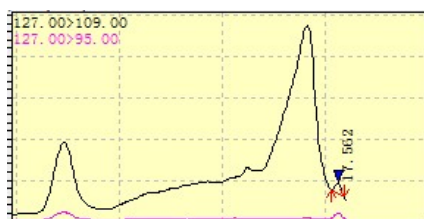
杀虫脒 (左边为固 2 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)



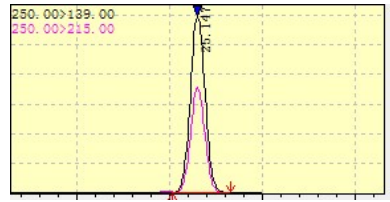
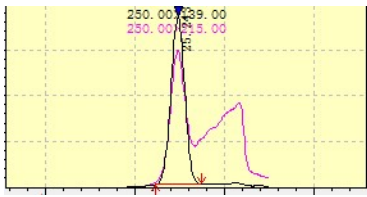
δ -六六六 (左边为固 2 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)



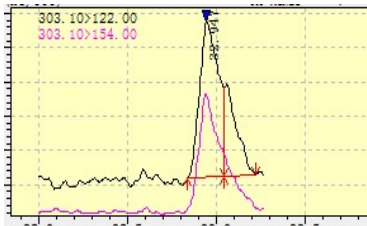
久效磷 (左边为固 2 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)



PP-三氯杀螨醇 (左边为固 2 净化样品, 右边为 HLB-C 净化样品)



苯线磷（左边为固 2 净化样品，右边为 HLB-C 净化样品）

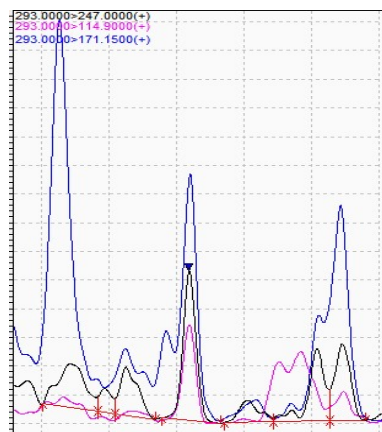
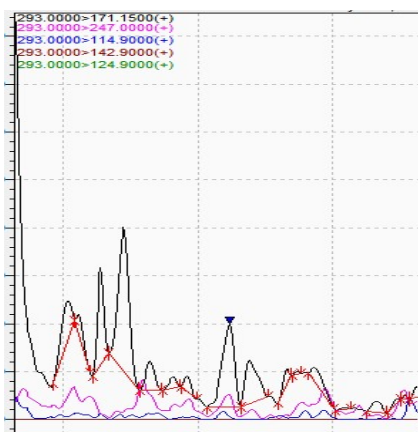


水胺硫磷（左边为固 2 净化样品，右边为 HLB-C 净化样品）

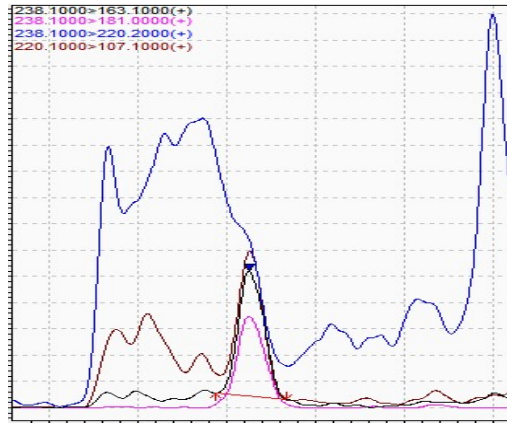
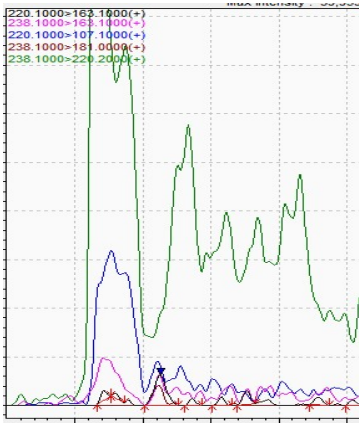


吴茱萸普通固 2 柱与 GCB/NH₂-A 柱净化的 LCMSMS 数据分析图

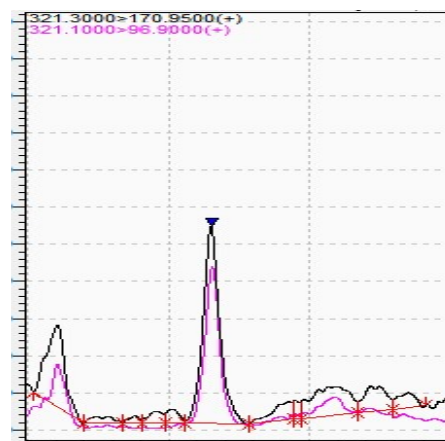
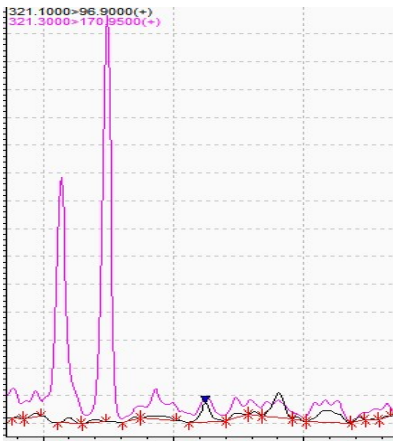
甲拌磷砒（左边为常规 HLB 净化样品，右边为 GCB/NH₂-A 净化样品）



3-羟基克百威（左边为常规 HLB 净化样品，右边为 GCB/NH₂-A 净化样品）



特丁硫磷砒 (左边为常规 HLB 净化样品, 右边为 GCB/NH₂-A 净化样品)



8 实验讨论

通过以上实验对比数据可以看出, SelectCore HLB-C 500mg/6mL 小柱净化后的吴茱萸样品溶液颜色较浅, 减少了污染 GCMSMS 柱前端的风险, 且 GCMSMS 上样品中所有化合物均无干扰, 蝇毒磷响应提高了 6 倍、硫丹硫酸酯响应提高了 8 倍、 δ -六六六响应提高了 5 倍、苯线磷响应提高了 5 倍。SelectCore HLB 500mg/6mL 固相萃取柱对吴茱萸中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 上样品中部分目标物响应低的问题。SelectCore GCB/NH₂-A 500mg/500mg/6mL 解决了 3-羟基克百威和甲拌磷砒响应低, 丢峰的问题, 3-羟基克百威响应提高了 10 倍。这三款农残专用固相萃取柱, 针对吴茱萸中大量色素、挥发油和生物碱类成分去除效果良好, 极大的消除了由于基质效应带来的甲基异柳磷、 α -硫丹、硫丹硫酸酯、 δ -六六六、蝇毒磷、氟虫腈类农残成分的响应低、目标物线性不好、保留时间漂移、回收率差的问题, 为吴茱萸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。

方法类别	推荐产品	货号	适用品种	注意事项
快速样品处理法 (QuEChERS)	SelectCore QuEChERS 萃取盐包 6g MgSO ₄ , 1.5g NaOAc; 50/pkg	QS-002		前处理步骤较多, 提取效率较为充分, 溶液颜色较深, 基质标每次只能一个点 加入盐包时会放热, 注意冰浴降温 对杀虫脒有吸附, 回收率可能偏低
	SelectCore QuEChERS 净化管 15mL, 900mg MgSO ₄ , 300mg PSA, 300mg C18, 300mg Silica, 90mg GCB; 50/pkg	Q-15PC SG01	川桐皮、川赤芍、木通、通草、灯心草、白芍、麦冬、泽泻、益智、姜黄、枸杞、大枣等含碳水化合物和少量色素类	
	SelectCore QuEChERS 净化管 15mL, Pesticide Residue A06(含色素挥发油中药农残 Q 法); 50/pkg	Q-15A0 6	木香、厚朴、羌活等含挥发油和色素类	
	SelectCore QuEChERS 净化管 15mL, Pesticide Residue A07(丹参中药农残 Q 法); 50/pkg	Q-15A0 7	丹参专用	改良后的配方提高了丹参农残测定的稳定性和重现性
固相萃取	SelectCore QuEChERS 净化管 15mL, 1200mg	Q-15PC 04	基质简单, 色素较少如: 人参、西洋参、茯苓、白芍、山药、隔山撬、浙贝母、麦冬、葛根、粉葛、川赤芍、赤芍、白附片、川木通、桑白	适用于含有较多有机酸和糖干扰的样品, 对磺隆类和杀虫脒化合物吸附

取 方 法 一	MgSO ₄ , 300mg PSA, 100mg C18; 50/pkg		皮、三七、黄芪、甘草、天花粉	较强
固 相 萃 取 方 法 二	SelectCore HLB 固 相萃取柱 200mg/6mL; 30/pkg	HLB060 -060200 -1	北柴胡、陈皮、山楂、大黄、柴胡、当归、党 参、地黄、防风、黄芪、桔梗、苦参、益母草、 黄精、灵芝、茯苓、大青叶、板蓝根、甘草等 含少量色素类	吸附色素能力相比固相 1 要好,对滴滴滴类化合 物 吸 附 力 较 强 故 GCMSMS 样品分析不适 用,多用于 LCMSMS 样 品净化
	SelectCore HLB-A 中药农残专用柱 200mg/6mL; 30/pkg	HLBA6 0-06020 0-1	千年健、桃仁、苦杏仁、花椒、没药、紫苏叶、 金银花、艾叶、款冬花、乌梅、桑叶、牛蒡子、 菟丝子、酸枣仁、莪术、槟榔、小茴香、枳实、 郁金、白头翁、菊花、陈皮、白花蛇舌草、褚 实子、化橘红、川防风、当归等富含挥发油和 色素类气质测定项目	对磺隆类化合物吸附力 强,且对三氯杀螨醇类、 滴滴滴类化合物具有一 定 吸 附 作 用 , 故 LCMSMS 样品分析不适 用,GCMSMS 样品分析 需 5mL 样品上柱净化
	SelectCore HLB-B 中药农残专用柱 200mg/6mL; 30/pkg	HLBB6 0-06020 0-1	色素较多,挥发油较多如:火麻仁、菟丝子、 酸枣仁、羌活、川芎、莪术、蛇床子、紫苏叶、 姜黄、干姜、陈皮、枳实、青皮、防风、莱菔 子、槟榔、当归、小茴香、豆蔻、黄连、黄柏、 虎杖、大黄、马钱子、化橘红、当归	对滴滴滴类化合物具有 一定 吸 附 性 , 适用 于 LCMSMS 样品分析, 3mL 样品上柱净化
	SelectCore HLB-C 中药农残专用柱 500mg/6mL; 30/pkg	HLBC6 0-06050 0-1	补骨脂、吴茱萸、木香、厚朴、沉香、没药、 蛇床子、火麻仁、羌活、小茴香、马钱子等富 含挥发油、色素和生物碱类气质测定项目	适用于重油重色素和生 物碱的果实和种子类中 药,GCMSMS 样品分析 需 2mL 样品上柱净化
固 相 萃 取 方 法	SelectCore GCB/NH ₂ -II 固相 萃取柱 500mg/500mg/6m L; 30/pkg	GN100- 061000- 2	色素含量多,含少量挥发油如:金银花、菊花、 款冬花、忍冬花、益母草、淫羊藿、龙胆草、 大黄、虎杖、何首乌、麻黄、苦丁茶、刘寄奴、 山银花、忍冬藤、川牛膝、地黄、桑叶	洗脱液中有甲苯,毒性较 大,且洗脱时间较长; 对磺隆类农药有一定吸 附 LCMSMS 样品分析时 应联合其他净化方式分 析磺隆类数据

三

SelectCore

GCB/NH₂-A 固相

萃取柱

500mg/500mg/6m

L; 30/pkg

GNA10

0-06100

0-1

黄连、黄柏、何首乌、干益母草、吴茱萸、虎杖、大黄、决明子、胡黄连、苕叶细辛、菊花、千里光、蒲公英、艾叶、荆芥、茵陈、金银花、番泻叶、龙胆草、蛇床子、川乌、草乌、车前子、地耳草、金钱草、薄荷、广藿香、老鹳草、紫苏叶、忍冬藤、栀子、连翘、莲子心、竹叶柴胡、矮地茶、红景天、麻黄、白鲜皮、赶黄草、款冬花等

适用于干扰较为严重的 GCMSMS 样品分析。如若用于 LCMSMS 样品分析,应联合其他净化方式

