

# 中药石斛的 33 种农残测定分析

## 背景

石斛为兰科植物金钗石斛、霍山石斛、鼓槌石斛、流苏石斛的栽培品及其同属植物近似种的新鲜或干燥茎，含有较多色素类成分，常规固 3 净化能力不够，需要用到纳谱分析净化能力更好的 GCB/NH<sub>2</sub>-A 产品。今天，我们来看看石斛项目的前处理效果吧（以下实验样品为“干流苏石斛”）。



石斛

## 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二和固相萃取法三，适用于含色素、挥发油类成分的中药材的农残检测。

## 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 1 mL，置 20 mL 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 1 mL 含 1.0 mg 的溶液，即得。精密量取适量，加乙腈制成每 1 mL 含 0.1 μg 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 1.0 mL(6 份)，置氮吹仪上，40 °C 水浴浓缩至约 0.6 mL，分别加入混合对照品溶液 10 μL、20 μL、50 μL、100 μL、150 μL、200 μL，加乙腈稀释至 1 mL，涡旋混匀，即得。

### 2 供试品溶液的制备

#### 2.1 粉碎

取干石斛样品用铡刀将其切成碎段，取碎段置粉碎机内粗粉碎，取出置开刀口的粉碎机或破壁粉碎机内细粉碎，取出过 3 号筛即得。

#### 2.2 提取（直接提取法）

精密称取 2.5 g 样品（3 号筛），加氯化钠 1 g，加入 50 mL 乙腈，匀浆处理 2 分钟，离心后分取上清液，残渣再加 50 mL 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 mL 左右，加乙腈定容至 5 mL，摇匀，待净化。

### 3 净化

GC- MS/ MS 样品净化：

SPE 柱：SelectCore GCB/NH<sub>2</sub>-A 固相萃取柱 500mg/500mg/6mL；

净化：取 SelectCore GCB/NH<sub>2</sub>-A 固相萃取柱，用乙腈：甲苯（3：1）10 mL 活化，量取上述石斛提取液 2 mL，置上述已活化的固相萃取柱中，用乙腈：甲苯（3：1）20 mL 洗脱，收集全部样品液与洗脱液，40 °C 水浴减压回收至 2 mL，即得。

GC- MS/ MS 测定：

基质加标配制：精密量取上述减压回收后的样品溶液 1 mL，氮吹至 0.6 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。

样品溶液配制：精密量取上述减压回收后的样品溶液 1 mL 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。

LC- MS/ MS 样品净化：

SPE 柱：SelectCore HLB 固相萃取柱 200mg/6mL；

净化：量取上述石斛提取液 3 mL，过 SelectCore HLB 固相萃取柱，收集全部净化液，混匀，即得。

LC- MS/ MS 测定：

基质加标配制：精密量取过固相萃取柱后的溶液 1 mL 氮吹至 0.6 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。

样品溶液配制：精密量取过固相萃取柱后的溶液 1 mL 加入 0.3 mL 水，混匀，过 0.22 μm 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：NanoChrom BP-50+ MS 气相柱 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 1 min；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 6 min；

载气：高纯氦气（纯度>99.999%）；

进样方式：不分流进样；

恒压模式：146 kPa；

进样量：1 μL。

#### 质谱条件

电离方式：电子轰击电离源（EI）；

电离能量: 70 eV;  
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: 10.0 min。

## 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 × 100mm, 2.6µm

流动相:

A: 0.1%甲酸水溶液 (含有 5 mmol/L 甲酸铵)

B: 乙腈-0.1%甲酸水溶液 (含有 5 mmol/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: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 干燥空气 10.0 L/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

## 6 注意事项

由于干石斛质地柔韧且纤维性较强，粉碎时间应适当延长以确保样品完全粉碎且能通过 3 号筛，粉碎时应注意粉碎机的温度，温度过高可能导致分析结果不准确。石斛粉碎后质地较为松泡，称取 5 g 样品加入乙腈 50 mL 匀浆容易使样品成糊状，导致提取不完全，影响实验结果，故将样品称量减半称取 2.5 g 提取，最终定容至 5 mL。

GC-MS/MS: 杀虫脒参考 LC-MS/MS 分析结果，久效磷参考 LC-MS/MS 分析结果。

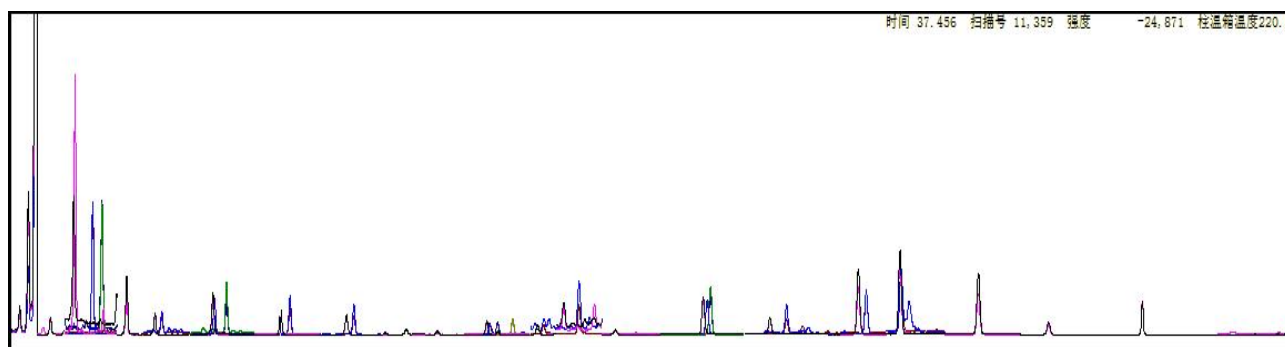
## 7

### 实验结果

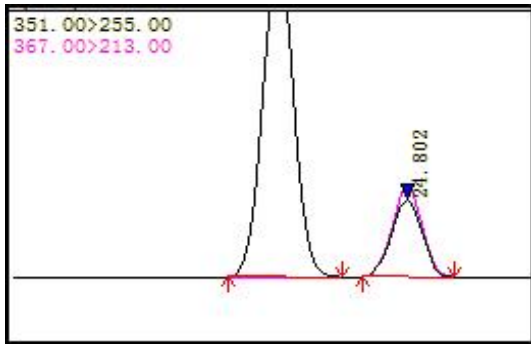


- 1 : 为石斛提取液原液
- 2 : 为 SelectCore HLB 净化后的石斛提取液
- 3 : 为 SelectCore GCB/NH<sub>2</sub>-A 净化后的石斛提取液

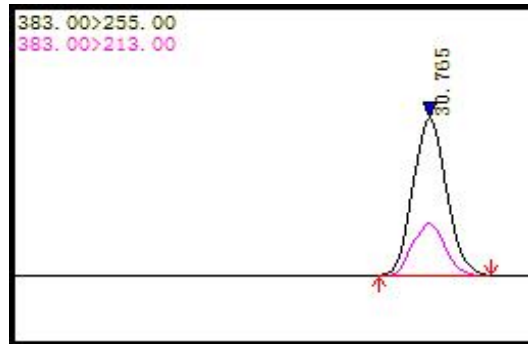
### 石斛基质加标 GC-MS/MS 部分化合物分析结果谱图



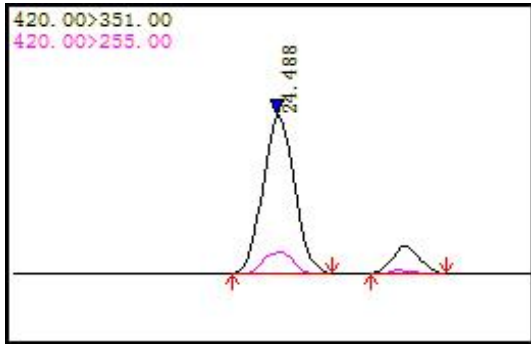
固相萃取法三处理石斛基质 LOQ 浓度点加标谱图 (GC-MS/MS 方法)



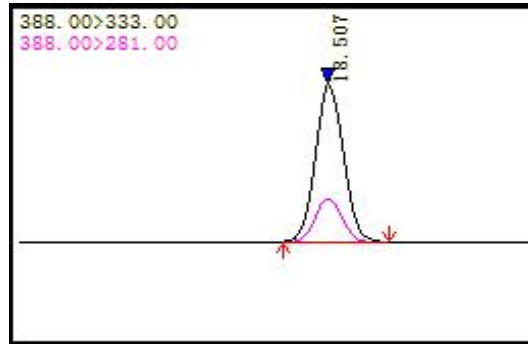
氟虫腈



氟虫腈砒

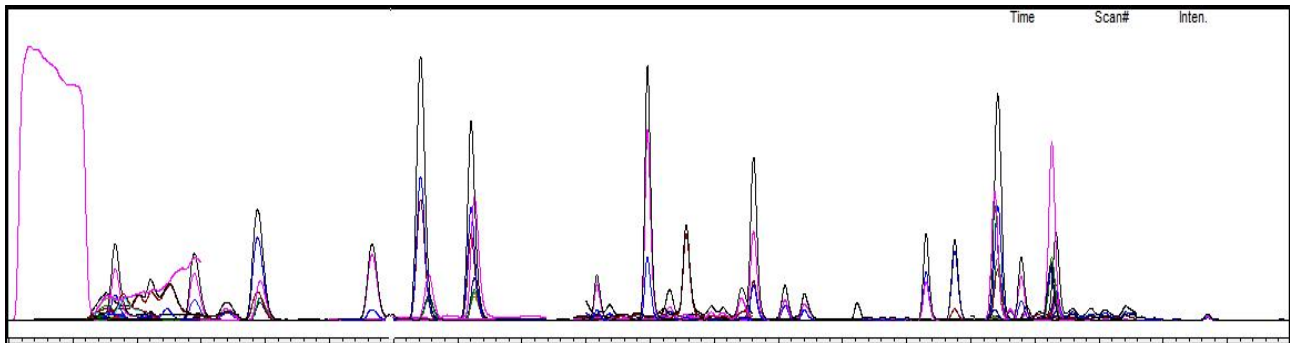


氟虫腈亚砒

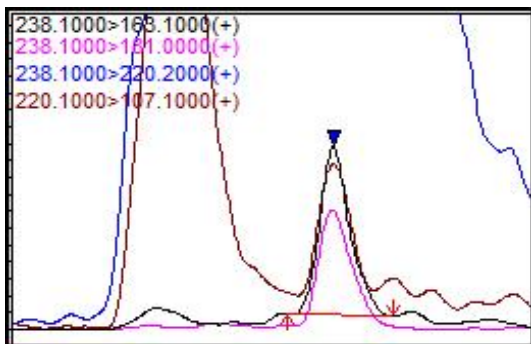


氟甲腈

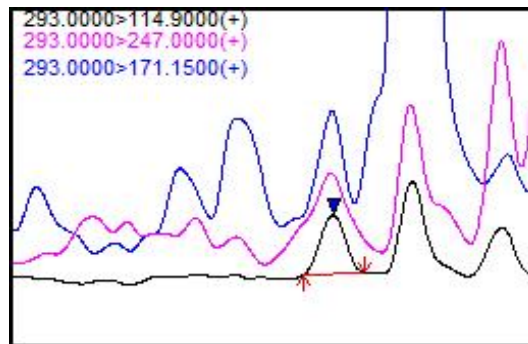
石斛基质加标 LC-MS/MS 部分化合物分析结果谱图



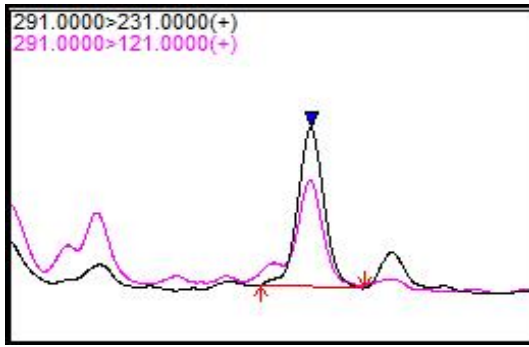
固相萃取法二处理石斛基质 LOQ 浓度点加标谱图 (LC-MS/MS 方法)



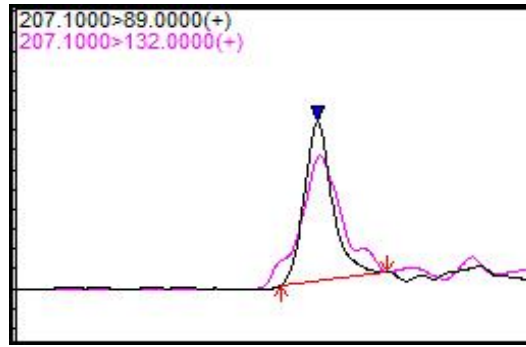
3-羟基克百威



甲拌磷砒



水胺硫磷



涕灭威亚砷

表 1 石斛中 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%	苯线磷亚砷	88.7%	3-羟基克百威	81.7%
甲基对硫磷	85.5%	地虫硫磷	67.3%	涕灭威	83.7%
对硫磷	79.8%	硫线磷	88.4%	涕灭威砷	91.2%
久效磷	82.7%	蝇毒磷	88.5%	涕灭威亚砷	91.0%
磷胺	84.0%	治螟磷	86.1%	灭线磷	87.9%
$\alpha$ -六六六	84.3%	特丁硫磷	85.6%	氯唑磷	84.9%
$\beta$ -六六六	84.1%	特丁硫磷砷	81.4%	水胺硫磷	81.5%
$\gamma$ -六六六	84.7%	特丁硫磷亚砷	90.4%	$\alpha$ -硫丹	81.7%
$\delta$ -六六六	83.5%	甲基硫环磷	78.8%	$\beta$ -硫丹	78.6%
2,4'-滴滴涕	78.1%	甲磺隆	82.1%	硫丹硫酸酯	88.3%
4,4'-滴滴涕	79.1%	氯磺隆	79.0%	氟虫腈	93.7%
4,4'-滴滴涕	76.8%	胺苯磺隆	79.7%	氟虫腈砷	82.5%
4,4'-滴滴伊	78.8%	甲拌磷	82.5%	氟虫腈亚砷	85.2%
杀虫脒	85.8%	甲拌磷砷	90.5%	氟甲腈	87.7%
除草醚	80.2%	甲拌磷亚砷	79.9%	<i>o,p'</i> -三氯杀螨醇	82.6%
艾氏剂	77.8%	甲基异柳磷	84.7%	<i>p,p'</i> -三氯杀螨醇	80.6%
狄氏剂	80.5%	内吸磷-O	69.3%	硫环磷	83.7%
苯线磷	77.9%	内吸磷-S	77.8%		
苯线磷砷	82.5%	克百威	89.6%		

## 8 实验讨论

通过以上实验数据可以看出，石斛使用 SelectCore GCB/NH<sub>2</sub>-A 固相萃取柱处理对其色素类成分吸附良好，有效地减轻了样品中色素成分对 GC- MS/MS 柱前端的污染和基质中干扰物对目标物的影响；另外使用 SelectCore HLB 固相萃取柱处理的石斛 LC- MS/MS 基质加标液中化合物出峰良好，搭配上上述解决办法有效地解决了石斛中农残回收率偏低的问题，提高了实验效率，为石斛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。