

液相色谱 – 串联质谱法同时测定穿心莲中敌克松、甲基托布津、甲萘威和敌百虫的农药残留量

苗水, 郝征伟, 毛秀红, 李雯婷, 王柯, 季申*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的: 建立测定穿心莲叶中常用的 4 种农药残留量的方法, 更好地控制药材的质量。方法: 以灭蚜威为测定内标, 样品经乙腈提取, 采用 Atlantis d C₁₈ 柱分离, 液相色谱 – 串联质谱联用 (LC—MS/MS) 方法测定穿心莲药材中常用的 4 种农药残留量。结果: 4 种农药检测限在 0.003 ~ 0.0093 mg · kg⁻¹ 之间, 回收率在 83% ~ 112% 之间, 回收率相对标准偏差均低于 6%。结论: 方法简便、灵敏、重现性好, 能满足同时测定 4 种农药在穿心莲药材中的残留量。

关键词: 穿心莲; 敌克松; 甲基托布津; 萘威; 敌百虫; 农药残留; 液相色谱 – 串联质谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2011)03 - 0529 - 05

LC – MS/MS simultaneous determination of pesticide residues of fenaminosulf, methyl – thiophanate, carbaryl and trichlorphon in *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees.

MIAO Shui, JIA Zheng – wei, MAO Xiu – hong, LI Wen – ting, WANG Ke, JI Shen*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To establish a reliable method for simultaneous determination of four residual pesticides (fenaminosulf, thiophanate – methyl, carbaryl and trichlorphon) in *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. **Methods:** The analytes were extracted with acetonitrile with macarban as internal standard, then separated on an Atlantis d C₁₈ column. Detection was performed on LC—MS/MS system with ESI resources in positive ion acquisition mode and qualified in multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results:** The LODs of four pesticides were between 0.003 – 0.0093 mg · kg⁻¹. Recoveries were between 83% – 112%, and the RSDs of recoveries were all less than 6%. **Conclusion:** The method established in this study is simple, sensitive and reproducible, which can be applied to the analysis of pesticide residues in *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees.

Key words: *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees; fenaminosulf; thiophanate – methyl; carbaryl; trichlorphon; pesticide residue; LC – MS/MS

穿心莲属爵床科、穿心莲属草本植物。以全草入药, 具有清热解毒、抗菌消炎、消肿止痛等功效, 主治细菌性痢疾、尿路感染、急性扁桃体炎、咽炎、肺炎和流行性感冒等, 外治化脓性中耳炎、外伤感染、疖肿等症。穿心莲原产亚洲热带, 喜温暖气候, 不耐寒, 生长过程中会受病害、虫害作用而影响产量, 为保障药材正常生产, 敌克松、甲基托布津、甲萘威和敌百虫等农药被应用到生产过程, 其中敌克松用来防治立枯病^[1], 甲基托布津用来防治枯萎病^[2], 敌百虫用来防治蝼蛄和小地老虎等常见虫害^[3], 甲萘

威(又名西维因)用于蚜虫的防治^[4]。为保证药材质量, 促进人民用药安全, 本文采用液相色谱 – 串联质谱联用方法, 建立了同时测定穿心莲中敌克松、甲基托布津、甲萘威和敌百虫的 4 种农药残留量的方法。

1 仪器与试剂

仪器: 快速液相色谱 (RRLC): Agilent 1200 SL 系列液相色谱仪, 配置有 G1312B 二元泵, G1379B 脱气机, G1367C 自动进样器, G1316B 柱温箱, G1316B 柱温箱, (安捷伦科技有限公司), 色谱柱: Atlantis d C₁₈, 3 μm, 150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm。

* 通讯作者 Tel: (021) 50798196; E – mail: ji_shen@sohu.com

试药: 穿心莲为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees 的干燥地上部分, 由和记黄埔医药(上海)有限公司提供, 经上海市食品药品检验所吴赵云副主任药师鉴定。敌克松(批号: 70321, 纯度: 94.5%), 甲基托布津(批号: 60915, 纯度: 97.5%), 甲萘威(批号: 60130, 纯度: 98.5%), 敌百虫(批号: 50425, 纯度: 99%), 灭蚜威(批号: 70130, 纯度: 99%) 均购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH, 乙腈, 色谱纯, 由 Burdick - Jackson 公司提供; 水为去离子水; 无水甲酸, 由上海凌峰化学试剂有限公司提供。

2 试验方法

2.1 色谱条件 采用 Atlantis d C₁₈ 柱(3 μm, 150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm, 保护柱为 Phenomenex C₁₈, 柱温 40 °C; 以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 按表 1 的梯度洗脱条件进行分离, 进样量 10 μL。

表 1 流动相及流速

Tab 1 Themobile phase and the flow rate

时间 (time) / min	流速 (flow) / μL · min ⁻¹	A / %	B / %
0	300	99	1
7	300	50	50
10	300	0	100
13	300	0	100
14	300	99	1
20	300	99	1

2.2 质谱条件 Agilent 6410 串联四极杆质谱仪, 配置了 ESI 离子源。在 ESI(+) 模式下采集数据, 经摸索, 确定质谱参数如下: Capillary 4000 V, Drying Gas 11 L · min⁻¹, Neb Press 241.3 kPa, Gas Temp 300 °C, Fragmentor 电压 100 V, 碰撞气为高纯氮气, Q1 和 Q3 的分辨率均为单位质量分辨。MRM 模式下的参数见表 2。

表 2 4 种农药对照品及内标监测离子对和碰撞电压

Tab 2 The MRM transition、collision energy(CE) of the four pesticides and the internal standard

化合物 (compound)	定量离子 (quantitative ion)	定性离子 (qualitative ion)	碰撞电压 (collision energy) / V
敌克松 (fenaminosulf)	230/120	230/120; 230/148	10; 1
甲基托布津 (thiophanate - methyl)	343/151	343/151; 343/311	10; 1
甲萘威 (carbaryl)	202/145	202/145; 207/117	5; 10
敌百虫 (trichlorophon)	257/109	257/221; 257/109	1; 15
灭蚜威 (mecarbam)	330/199	330/199; 330/227	10; 1

2.3 溶液的制备

对照品溶液: 分别精密称取敌克松, 甲基托布津, 甲萘威和敌百虫对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 中分别含 100 μg 的溶液, 作为对照品储备液(制得敌克松、甲基托布津、甲萘威与敌百虫储备溶液浓度分别为 113.967 μg · mL⁻¹、107.25 μg · mL⁻¹、126.08 μg · mL⁻¹ 与 110.88 μg · mL⁻¹, 为表达方便, 以下对照品溶液的浓度不再书写精确浓度, 均以近似整数浓度代替)。精密吸取敌克松对照品储备溶液 10 mL 与甲基托布津、甲萘威和敌百虫对照品储备液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 乙腈溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液。另取灭蚜威对照品适量, 加甲醇制成 1 mL 中分别含 0.2 μg 的溶液, 作为内标储备液。精密吸取混合对照品溶液与内标储备液适量, 加 50% 乙腈制成每 1 L 含敌克松 10, 20, 40, 100, 200, 400 μg, 含甲基托布津、甲萘威和敌百虫 1, 2, 4, 10, 20, 40 μg, 与含内标 4 μg 对照品工作溶液, 即得。

基质混合对照品溶液: 取空白穿心莲药材(系指按照本法测定未检出上述 4 种农药的穿心莲样品), 粉碎, 过三号筛, 取药材粉末 5 g, 精密加入乙腈 50 mL, 放置 30 min, 高速匀浆 3 min, 离心, 取上清液 1 mL, 一式 6 份, 用氮气于 40 °C 水浴上徐徐吹至近干, 加入各浓度的对照品工作溶液 1 mL 涡旋使溶解, 微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 取续滤液即得。

供试品溶液: 取本品, 粉碎, 过三号筛, 取粉末 5 g, 精密称定, 精密加入 0.2 μg · mL⁻¹ 的内标溶液 1 mL 与乙腈 50 mL, 放置 30 min, 高速匀浆 3 min, 离心, 取上清液 1 mL, 用氮气于 40 °C 水浴上缓缓吹至近干, 加 50% 乙腈 1 mL 涡旋使溶解, 微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 取续滤液, 即得。

3 实验结果

3.1 总离子流色谱图

在实验条件下, 4 种农药的基质对照品溶液、加样供试品溶液及空白基质样品溶液总离子流色谱图见图 1, 由图可见待测农药色谱峰形良好, 分离情况良好, 保留时间适中, 空白基质样品色谱图显示, 待测化合物与内标无内源性杂质干扰。

3.2 线性关系考察

精密吸取“基质混合对照品溶液”中各基质对照品溶液 10 μL 分别取进样分析, 记录各待测组分与内标 MRM 色谱峰面积, 以各成分的峰面积与内标峰面积比为横坐标(X), 各成份的浓度与内标浓度比为纵坐标(Y), 进行回归分析, 结果见表 3。

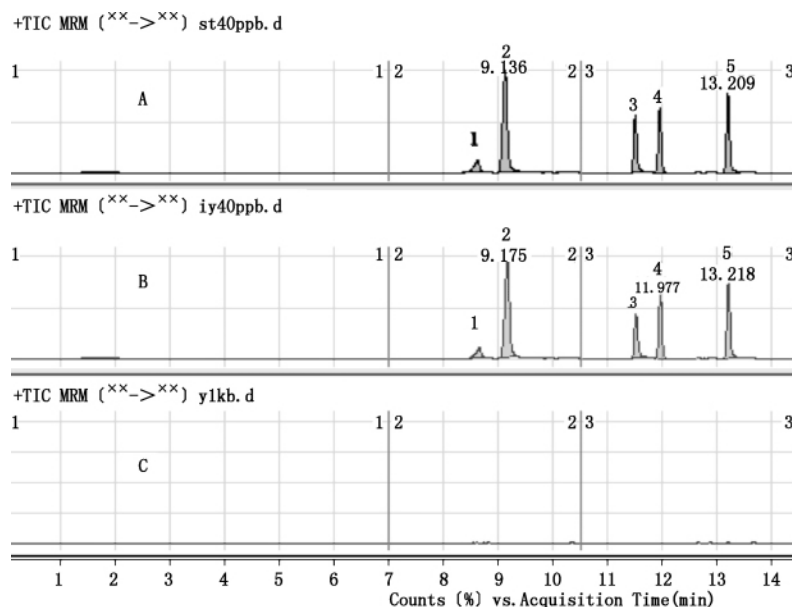


图1 基质对照品溶液(A)、加样供试品溶液(B)及空白基质样品(C)溶液总离子流色谱图

Fig 1 Total ion chromatograms of matrix standard solution(A), recovery solution(B) and blank sample solution(C)

1. 敌克松(fenaminosulf) 2. 敌百虫(trichlorphon) 3. 甲基托布津(thiophanate-methyl) 4. 甲萘威(carbaryl) 5. 内标(internal standard)

表3 线性关系

Tab 3 Regression equations

农药 (pesticide)	线性方程 (regression equation)	<i>r</i>
敌克松 (fenaminosulf)	$Y = 0.00492 X + 0.00820$	0.9998
甲基托布津 (thiophanate-methyl)	$Y = 0.10278 X - 0.00296$	0.99996
甲萘威 (carbaryl)	$Y = 0.083131X + 0.04512$	0.99814
敌百虫 (trichlorphon)	$Y = 1.2941 X + 0.0568$	0.9992

3.3 精密度试验

取基质混合对照品溶液(每L含敌克松约100 μg,含甲基托布津、甲萘威和敌百虫约10 μg),连续进样6次,记录峰面积,计算待测物峰面积与内标峰面积的比值,求比值的RSD值,考察仪器精密度。结果各农药化合物与内标的峰面积比值的RSD介于0.2%与3.8%之间,表明仪器精密度较好。

3.4 待测农药稳定性试验

取基质混合对照品溶液(每L含敌克松约200 μg,含甲基托布津、甲萘威和敌百虫约20 μg)在8 h内进样分析,进样间隔为1 h,计算测得各农药浓度。结果测得甲基托布津、甲萘威和敌百虫的浓度在8 h内RSD值均小于5%,表明此3种农药基本稳定。

而由于敌克松较不稳定,受光照与温度影响而随时间不断降解,8 h即降解25%,但是该农药3 h内降解低于10%(表4),满足残留测定要求,故仍可进行相关测试。

表4 敌克松稳定性考察结果

Tab 4 Stability study of fenaminosulf

农药 (pesticide)	时间 (time)/h	测得浓度 (detected concentration) μg · L ⁻¹	降解百分比 (decomposed percentage) /%
敌克松 (fenaminosulf)	0	222.9215	—
	1	216.5027	2.88
	2	215.8578	3.17
	3	204.3154	8.35
	4	197.2964	11.50
	5	182.8004	18.00
	6	179.8670	19.31
	7	174.4113	21.76
	8	167.9504	24.66

3.5 重现性试验

取本品(批号为GX004-1)5 g,精密称定,一式6份,加入混合对照品溶液(敌克松11.3967 μg · mL⁻¹、甲基托布津1.0725 μg · mL⁻¹、甲萘威1.2608 μg · mL⁻¹与敌百虫1.1088 μg · mL⁻¹)1 mL,按供试品溶液制备法操作,进样分析,测定回收率,并计算回收率的RSD,4种农药RSD值分别为2.2%,3.4%,4.6%与3.2%,表明方法重现性

较好。

3.6 回收率试验

取本品(批号为 GX004-1) 5 g,精密称定,一式 9 份,其中 3 份加入混合对照品溶液(敌克松 $11.3967 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甲基托布津 $1.0725 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甲萘威 $1.2608 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与敌百虫 $1.1088 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL,3 份加入混合对照品溶液(敌克松 $11.3967 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甲基托布津 $1.0725 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甲萘威 $1.2608 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与敌百虫 $1.1088 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5 mL,其余 3 份加入混合对照品溶液(含敌克松 $2.27934 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与甲基托布津 $0.2145 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甲萘威 $0.25216 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与敌百虫 $0.22176 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL,再精密加入 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 1 mL 与乙腈 50 mL,按供试品溶液制备方法制得加样溶液,分别作为高、中、低 3 个浓度水平每一水平各 3 个的加样溶液,分别测定,计算回收率,结果见表 5(其中编号 1~3,4~6 与 7~9 分别为高、中、低 3 个浓度水平的回收率结果)。

表 5 4 种农药加样回收率结果(%)

Tab 5 Recoveries of the four pesticides

农药 (pesticide)	敌克松 (fenaminosulf)	甲基托布津 (thiophanate-methyl)	甲萘威 (carbaryl)	敌百虫 (trichlorphon)
1	82.786	100.836	95.751	98.235
2	85.680	101.020	96.270	95.919
3	91.624	97.149	91.900	92.372
4	82.361	109.663	91.817	93.725
5	87.729	111.336	90.347	94.761
6	86.238	112.970	90.444	99.205
7	96.461	110.336	104.959	92.444
8	87.222	102.877	99.707	86.296
9	95.138	102.033	101.699	87.549
平均(average) /%	88.4	105.4	95.9	93.4
RSD/%	5.7	5.4	5.5	4.7

结果表明本法回收率在 82.3%~113%,RSD 在 4.7%~5.7% 之间,符合农药残留分析的要求。

3.7 检测限

取本品(批号为 GX004-1)粉末 5 g,精密加入 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的灭蚜威内标溶液 1 mL、含敌克松 $0.227934 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甲基托布津 $0.02145 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甲萘威 $0.025216 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与敌百虫 $0.022176 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 2.5 mL 与乙腈 50 mL,放置 30 min,照供试品溶液制备方法制得检测限测定用溶液,进样分析,测定信噪比,以 3:1 信噪比水平计算检测限(LOD),结果见表 6。

表 6 检测限结果

Tab 6 LODs of the four pesticides

农药 (pesticide)	加入浓度 (concentration added) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	加入量 (added amount) $/\mu\text{g}$	S/N	LOD/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
敌克松 (fenaminosulf)	0.227934	0.569835	3.69	0.0927
甲基托布津 (thiophanate-methyl)	0.02145	0.053625	6.06	0.0053
甲萘威 (carbaryl)	0.025216	0.050432	10.22	0.0030
敌百虫 (trichlorphon)	0.022176	0.044352	2.72	0.0098

4 讨论

4.1 测定方法的选择 液相色谱-串联质谱方法为近年来发展较快的分析手段,特别是在农药及兽药残留的测定中,由于其检测灵敏度高、定量与阳性结果确证工作可同时完成,更是发挥着不可替代的作用。由于中药所含成分较为复杂,次生代谢物质种类较多同时含量较高,采用传统的色谱方法测定其农药残留,虽然经过多种繁杂的净化方式的前处理,所得供试品仍可能对相关农残测定产生影响,甚至产生假阳性的测定结果。串联质谱检测技术可有效解决中药农残测定难以克服的基质干扰问题,同时可大大简化前处理过程,提高分析效率,为未来中药农残测定的发展趋势,但是由于质谱电喷雾源(ESI)普遍存在着离子抑制现象,样品中化合物响应与对照品溶液相比存在一定的差异,为了使定量准确,一般可使用相应样品的基质对照品溶液对样品中检出的化合物进行定量。

4.2 待测物质谱 MRM 条件摸索 4 种农药均在 ESI(+) 模式下测定,甲基托布津、甲萘威与敌百虫母离子均为 $[M+1]$ 峰,而敌克松分子结构中含磺酸钠结构,优化条件时会考虑负离子模式测定,发现虽可找到 $[M-\text{Na}]$ 母离子峰,但发现该母离子只会产生一种子离子,增加碰撞能量仍未发现其他子离子,不能满足欧盟两对 MRM 反应才能确证一个农药检出的规定,后在 ESI(+) 模式下摸索,发现该化合物会产生 $[M-\text{Na}+H+1]$ 的母离子,推测该母离子为敌克松磺酸钠结构中钠离子为氢离子取代再加氢而产生的母离子,试验证明流动相中加入适量甲酸可使该种母离子强度提高,化合物灵敏度提高,同时敌克松色谱峰峰形得到明显改善。

4.3 溶剂与提取方式的选择 敌克松溶于极性有

机溶剂,如乙腈,甲醇等,对大多数有机溶剂不溶。可溶于水,常温下溶解度为 2% ~ 3%。极易吸潮,但其在水中呈重氮离子状态而会渐渐分解,且光照能加速分解,同时放出氮气生成二甲氨基苯酚。而甲基托布津在水和有机溶剂中的溶解度很低,易溶于二甲基甲酰胺,溶于丙酮、甲醇、乙腈、乙酸乙酯等;甲萘威、敌百虫可溶于丙酮、甲醇、乙腈、乙酸乙酯等多种有机溶剂,且常温下较稳定。根据待测农药性质及美国药典有关农残测定的提取方法选用农残测定常用的丙酮与乙腈作为提取溶剂,试验中发现,若使用丙酮作为提取溶剂,在浓缩过程中,丙酮若有残留,在色谱图上会影响出峰较早的敌克松的峰形,甚至出现裂分峰形。而选用乙腈作为提取溶剂则可以有效地避免上述情况。同时由于敌克松见光较易分解,所以提取与测定过程应在避光条件下进行。

4.4 净化方式的选择 曾参照国家标准(标准号 GB/T 20769—2006,水果和蔬菜中 405 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱—串联质谱法)收录的净化方法,采用石墨炭—氨丙基串连固相萃取柱(Waters 公司: Envi—Carb 柱—Sep—Pak 氨丙基柱串联小柱)净化,但发现敌克松会完全被吸附;而只采用氨丙基柱净化时,敌克松回收率较低;采用 C₁₈ 固相萃取小柱净化时,甲基托布津由于极性较小而被 C₁₈ 固相萃取小柱吸附,回收率偏低,不能满足测试要求;后尝试采用了提取液吹至近干再以 50%

乙腈进行溶剂替换并不再过柱的净化方式,结果显示,该方法简单,快速,回收率好,较适合敌克松、甲基托布津等易降解类农药的测定。

4.5 流动相考察 由于敌克松、甲基托布津、甲萘威与敌百虫极性差别较大,为了使色谱峰出峰时间适中,故采用了梯度洗脱方法。另外水相中加入 0.1% 甲酸可提高各待测组分的离子化效率,同时可以使出峰较早的敌克松减小拖尾,使峰形改善,综上,采用如表 1 梯度洗脱条件。

参考文献

- 1 ZHANG Jing-jun(张敬君). Model of *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. Cultivation Management (穿心莲栽培管理技术), *Mod Agricult Sci Technol* (现代农业科技), 2007, 17: 45
- 2 LI Qing-hai, LI Lu-jiu, Free-pollution and effective cultivation technique of *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. (穿心莲无公害高效栽培技术), *Mod Agricult Sci Technol* (现代农业科技), 2006, 7: 46
- 3 NIE Zhi-qiang(聂自强), ZHOU Ping(周萍). Good-quality and high-yielding cultivation technique of *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. (穿心莲优质高产栽培技术), *Sci Technol Sichuan Agricult* (四川农业科技), 2007, 26(6): 38
- 4 TANG Zhang-liang(唐章亮), ZHOU Qi(周颀). Producing technology process of *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. in Liuzhou of Guangxi province. (广西柳州市穿心莲生产技术规程). *Guangdong Agricult Sci*, (广东农业科学), 2007, 4: 85

(本文于 2010 年 3 月 19 日收到)