

冯永刚. SPME-GC-MS 法测定龙胆草中 15 种有机磷农药残留[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(22): 215-218.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.22.051

SPME-GC-MS 法测定龙胆草中 15 种有机磷农药残留

冯永刚

(牡丹江师范学院, 黑龙江牡丹江 157011)

摘要:拟采用乙酸乙酯提取-固相微萃取(SPME)-气相色谱质谱法(GC-MS),建立龙胆草中 15 种有机磷农药残留量检测方法,并优化 SPME 的正交试验条件(萃取温度、萃取时间、搅拌速度)。结果表明,在 5.0~500.0 ng/mL 浓度范围内,15 种有机磷农药具有良好的线性关系, $r^2 \geq 0.999 1$,检出限在 5.0~50.0 $\mu\text{g/kg}$ 之间,回收率在 84.1%~105.8%,相对标准偏差(RSD)在 1.3%~5.7% 之间。该方法具有样品前处理方便、准确度高、精密度好等特点,可为龙胆草中农药的快速测定提供检测技术。

关键词:固相微萃取;气相色谱质谱法;有机磷农药;龙胆草

中图分类号: S481+.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)22-0215-03

龙胆草(*Gentianascabra* Bye) 又称龙胆,为龙胆科龙胆属多年生草本植物,主要产于东北三省。据《神农本草经》记载,龙胆“主骨间寒热,惊痫邪气,续绝伤,定五脏,杀蛊毒”^[1]。2010 版《中环人民共和国药典》记载,龙胆草具有清热燥湿、泻肝胆火,用于“湿热黄疸,阴肿阴痒,带下,湿疹瘙痒,肝火目赤,耳鸣耳聋,胁痛口苦,强中,惊风抽搐”等病症^[2-3],是一种可人工栽培的中药材。目前对龙胆草的研究主要集中在品种选育、组织培养、人工种植及其药用开发方面^[1-2],对其农药残留检测的研究报道较少,但龙胆草种植过程中常使用有机磷农药来防止各种病虫害^[4-5],因此研究龙胆草中有机磷农药残留检测方法对于保障龙胆草质量安全尤为重要。目前对有机磷农药残留的检测方法主要有液相色谱^[6]、气相色谱^[7]、气相色谱质谱法^[8-9]等。

固相微萃取技术(SPME)是一种集采样、萃取、浓缩和进样于一体的无溶剂样品微萃取新技术,与固相萃取技术相比,固相微萃取操作更简单方便,费用低,且克服了固相萃取回收率低的缺点^[10-13]。本研究采用固相微萃取技术对龙胆草进行样品前处理,建立了固相微萃取-气相色谱-质谱仪(SPME-GC-MS)测定龙胆草中 15 种有机磷农药含量的检测方法,该方法具有样品前处理方便、准确度高、精密度好等特点,可为龙胆草中有机磷农药的快速测定提供检测技术。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890 GC/5973i MS 型气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司;SPME 萃取头[50/30 μm DVB(聚二乙烯基苯)/CAR(碳分子筛)/PDMS(聚二甲基硅氧烷)、65 μm DVB/PDMS、75 μm CAR/PDMS、100 μm PDMS],美国 Supelco 公司;AD300S-H 型均质搅拌机上海重逢科学仪器有限公

司;ME204 型电子天平,梅特勒托利多。

15 种有机磷农药:甲胺磷、灭线磷、治螟磷、甲拌磷、二嗪磷、特丁硫磷、地虫硫磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷、马拉硫磷、倍硫磷、对硫磷、甲基异柳磷、丙溴磷、三唑磷,浓度均为 100 mg/L,购自原农业部环境保护科研监测所。乙醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷、石油醚均为色谱纯,购自德国 Merck 公司;龙胆草购于黑龙江省牡丹江市康宁堂大药店。

1.2 GC-MS 条件

色谱条件:DB-5MS 型毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);不分流进样方式;进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;采用程序升温方式,初始温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温到 200 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,再以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温到 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;载气为氦气(纯度为 99.99%),流速为 1.0 mL/min。

质谱条件:电子轰击电离(EI)离子源;接口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;EI 离子源温度为 230 $^{\circ}\text{C}$;四级杆温度为 150 $^{\circ}\text{C}$;电子能量为 70 eV;扫描质量范围 m/z 为 50~350。采用选择离子扫描模式,15 种有机磷农药的其他质谱参数见表 1。

1.3 试验方法

用均质机将龙胆草粉碎,过 200 目筛,精确称取 2 g(精度为 0.1 mg)样品于萃取瓶,加入 10 mL 乙酸乙酯和 5 g 无水 MgSO_4 ,放入转子后盖紧瓶盖,将固相微萃取器的萃取头插入萃取瓶中,推出纤维头,切勿接触溶液及瓶壁。将其置于磁力搅拌器中,恒温搅拌,吸附后缩回纤维头,再从萃取瓶中拔出萃取头,将萃取头插入 GC-MS 进样口,推出纤维头,在进样口解析 5 min,同时开启仪器并采集数据。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

采用 Scan 扫描方式对 15 种农药进行全扫描,确定保留时间及母离子;通过碰撞的方式进行二级质谱分析,并优化碰撞电能量,选择灵敏度高的特征离子对作为定量、定性离子,以所选母离子及其子离子进行选择离子监测(SIM)扫描,优化后参数见表 1,15 种农药总离子色谱扫描结果见图 1。

收稿日期:2017-06-28

基金项目:黑龙江省自然科学基金青年项目(编号:QC2012C125)。

作者简介:冯永刚(1978—),男,黑龙江牡丹江人,博士,副教授,从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:3341163159@qq.com。

表 1 15 种农药的质谱参数

序号	名称	保留时间 (min)	离子对 m/z	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)
1	甲胺磷	7.91	141.1/95.0 *	80	20
			141.1/126.0		30
2	灭线磷	10.57	200.1/158.1 *	70	25
			200.1/114.0		20
3	治螟磷	10.93	322.1/202.0 *	65	15
			322.1/174.0		20
4	甲拌磷	11.51	260.0/75.0 *	60	30
			260.0/231.0		35
5	二嗪磷	11.84	304.1/179.1 *	70	20
			304.1/162.1		25
6	特丁硫磷	13.33	231.1/174.9 *	75	15
			231.1/202.9		20
7	地虫硫磷	14.31	246.0/109.1 *	65	20
			246.0/137.1		30
8	甲基对硫磷	14.91	263.0/109.0 *	70	20
			263.0/246.0		20
9	杀螟硫磷	15.02	277.0/260.0 *	80	30
			277.0/228.0		35
10	马拉硫磷	16.37	173.1/127.0 *	60	40
			173.1/99.0		45
11	倍硫磷	17.44	278.0/109.0 *	45	40
			278.0/169.0		35
12	对硫磷	17.92	291.1/109.0 *	50	35
			291.1/137.0		30
13	甲基异柳磷	19.05	241.1/121.0 *	60	25
			241.1/199.0		30
14	丙溴磷	19.53	336.9/266.9 *	65	25
			336.9/308.9		15
15	三唑磷	20.68	257.0/162.0 *	70	20
			257.0/134.0		15

注：“*”表示定量离子。

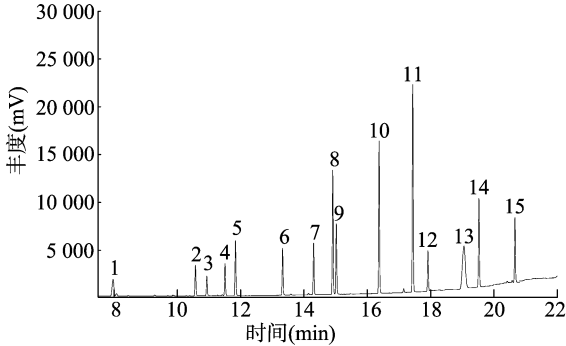


图1 15种农药总离子色谱图

2.2 提取溶剂的选择

考察乙醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷、石油醚等不同溶剂对龙胆草中 15 种农药的提取效果。由图 2 可知,15 种有机磷农药在乙醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷、石油醚等溶剂中溶解度不同,但其中乙酸乙酯具有较好的提取效果,15 种有机磷农药提取率在 87.3% ~ 103.4% 之间,平均提取率为 91.3%。因此选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

2.3 SPME 萃取头的选择

考察了不同 SPME 萃取头对龙胆草中 15 种有机磷农药平均萃取率的影响(图 3)。PDMS 类萃取头对 15 种有机磷农药萃取效果较好,尤其是使用 65 μm PDMS/DVB 萃取头时,萃取效果最佳,这可能是由于在 PDMS 材料上增加高分子材料 DVB,可以增加表面积,还可以增强对极性化合物的萃取能力,从而提高萃取效率。因此选择 65 μm PDMS/DVB 作为 SPME 萃取头。

2.4 SPME 萃取条件的优化

以 65 μm PDMS/DVB 作为萃取头,选取萃取温度(A)、萃取时间(B)、搅拌速度(C)3 个因素,选用 3 个水平,设计不同因素水平组合(表 2),采用 $L_9(3^3)$ 正交设计(表 3),进行 SPME 萃取条件优化。

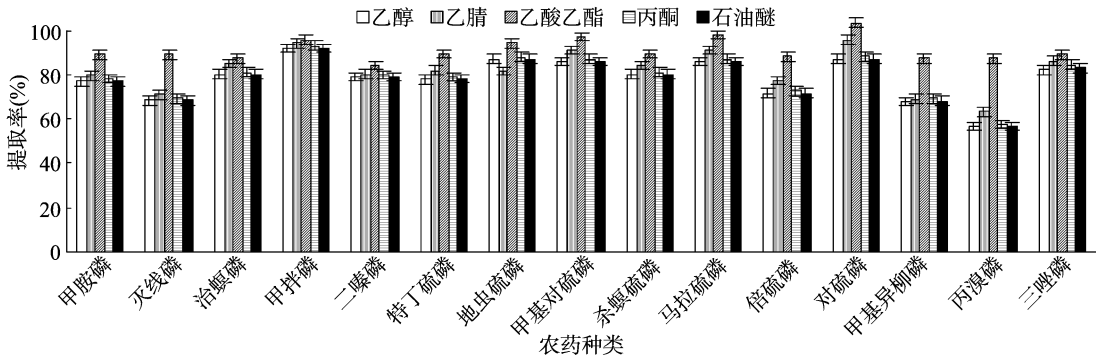


图2 不同溶剂对 15 种农药提取效果的影响

通过正交试验分析(表 3)表明,影响 SPME 萃取效率的因素主次排序为 $B > A > C$,SPME 萃取最优的结果为 $A_2B_1C_2$,即在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下萃取 60 min,转速为 600 r/min。通过方差分析可以看出,萃取温度、萃取时间、搅拌速度对正交试验无显著影响(表 4)。

2.5 方法线性范围与检出限

用正己烷配制 5.0、10.0、50.0、100.0、250.0、500.0 ng/mL 系列 15 种有机磷农药混合标准溶液,按“1.2”节 GC-MS 条件进行测定,以目标物的峰面积(y)和质量浓

度(x)建立线性回归方程(表 5)。在 5.0 ~ 500.0 ng/mL 浓度范围内,15 种有机磷农药具有良好的线性关系, $r^2 \geq 0.999 1$ 。

根据国际纯粹和应用化学联合会(IUPAC)的规定,对空白溶液测定 20 次,计算标准偏差,按 3 倍标准偏差计算方法检出限,表 5 结果显示;龙胆草中 15 种有机磷农药的检出限在 5.0 ~ 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。

2.6 回收率与精密度

在空白龙胆草中分别添加 50.0、250.0、500.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 3 种浓度的 15 种有机磷农药混合标准溶液,按“1.2”节 GC-

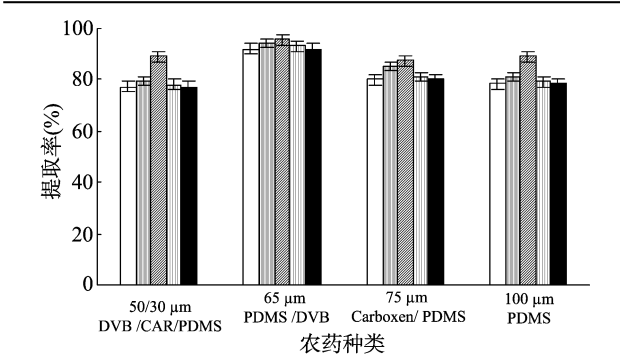


图3 不同萃取头对农药平均提取率的影响

表 2 正交试验的因素水平			
因素	A: 萃取温度 (°C)	B: 萃取时间 (min)	C: 搅拌速度 (r/min)
1	50	60	900
2	60	50	600
3	70	40	300

MS 条件和“1.3”节试验方法进行测定。15 种有机磷农药的平均回收率为 84.1% ~ 105.8%, 相对标准偏差 (*RSD*) 在 1.3% ~ 5.7% 之间 (表 6)。

表 3 正交试验 $L_9(3^3)$ 分析					
因素	A	B	C	试验组合	平均回收率 (%)
1	1	1	1	$A_1B_1C_1$	88.4
2	1	2	2	$A_1B_2C_2$	85.7
3	1	3	3	$A_1B_3C_3$	77.5
4	2	1	2	$A_2B_1C_2$	96.3
5	2	2	1	$A_2B_2C_1$	84.2
6	2	3	3	$A_2B_3C_3$	87.1
7	3	1	3	$A_3B_1C_3$	88.7
8	3	2	1	$A_3B_2C_1$	91.8
9	3	3	2	$A_3B_3C_2$	74.8
k_1	2.50	2.73	2.58		
k_2	2.64	2.57	2.61		
k_3	2.56	2.40	2.50		
R	0.05	0.11	0.04		

表 4 方差分析结果				
方差来源	A	B	C	误差 E
离差平方和	0.00	0.02	0.00	0.00
自由度	2.00	2.00	2.00	2.00
均方 (MS)	0.00	0.01	0.00	0.00
F 值	1.79	10.09	1.23	
F 临界值	$F_{0.01}(1,2) = 99, F_{0.05}(1,2) = 19$			

表 5 线性方程和检出限

名称	线性范围 (ng/mL)	线性方程	r^2	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)
甲胺磷	10.0 ~ 500.0	$y = 2.7 \times 10^4 x + 1.7 \times 10^4$	0.999 6	10.0
灭线磷	5.0 ~ 500.0	$y = 4.3 \times 10^5 x + 0.9 \times 10^5$	0.999 4	5.0
治螟磷	5.0 ~ 500.0	$y = 4.9 \times 10^4 x + 2.1 \times 10^4$	0.999 3	5.0
甲拌磷	5.0 ~ 500.0	$y = 8.7 \times 10^5 x + 2.8 \times 10^5$	0.999 6	5.0
二嗪磷	5.0 ~ 500.0	$y = 2.6 \times 10^4 x + 3.4 \times 10^4$	0.999 5	5.0
特丁硫磷	10.0 ~ 500.0	$y = 5.6 \times 10^4 x + 2.4 \times 10^4$	0.999 7	10.0
地虫硫磷	5.0 ~ 500.0	$y = 1.9 \times 10^5 x + 2.1 \times 10^5$	0.999 6	5.0
甲基对硫磷	5.0 ~ 500.0	$y = 2.4 \times 10^5 x + 1.7 \times 10^4$	0.999 8	5.0
杀螟硫磷	5.0 ~ 500.0	$y = 3.2 \times 10^5 x + 2.9 \times 10^4$	0.999 9	5.0
马拉硫磷	10.0 ~ 500.0	$y = 7.3 \times 10^4 x + 5.4 \times 10^4$	0.999 3	10.0
倍硫磷	50.0 ~ 500.0	$y = 1.6 \times 10^4 x + 0.1 \times 10^4$	0.999 1	50.0
对硫磷	5.0 ~ 500.0	$y = 8.3 \times 10^4 x + 4.8 \times 10^4$	0.999 5	5.0
甲基异柳磷	5.0 ~ 500.0	$y = 3.1 \times 10^5 x + 2.1 \times 10^4$	0.999 6	5.0
丙溴磷	5.0 ~ 500.0	$y = 1.8 \times 10^5 x + 2.3 \times 10^5$	0.999 7	5.0
三唑磷	5.0 ~ 500.0	$y = 3.8 \times 10^5 x + 1.4 \times 10^5$	0.999 4	5.0

表 6 有机磷农药平均回收率和 *RSD* 值 ($n=6$)

名称	50.0 $\mu\text{g/mg}$		250.0 $\mu\text{g/mg}$		500.0 $\mu\text{g/mg}$	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
甲胺磷	84.7	2.4	88.4	1.7	87.1	2.3
灭线磷	86.9	3.1	87.2	2.4	84.8	1.5
治螟磷	89.2	2.3	86.3	1.6	84.3	2.2
甲拌磷	92.8	1.4	96.5	2.9	90.5	2.1
二嗪磷	86.4	1.3	89.8	1.7	90.8	2.7
特丁硫磷	103.8	2.6	101.4	1.9	105.8	2.1
地虫硫磷	100.6	2.9	98.7	2.1	99.6	1.9
甲基对硫磷	86.8	5.2	84.1	2.4	96.4	3.2
杀螟硫磷	89.7	3.4	91.3	1.6	98.7	2.3
马拉硫磷	94.4	1.6	92.4	2.9	99.3	2.6
倍硫磷	96.2	2.4	95.4	3.2	99.2	2.1

续表 6

名称	50.0 $\mu\text{g/mg}$		250.0 $\mu\text{g/mg}$		500.0 $\mu\text{g/mg}$	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
对硫磷	94.6	2.6	97.6	2.4	98.4	1.6
甲基异柳磷	96.1	3.1	98.4	2.9	100.6	5.7
丙溴磷	93.7	5.6	96.4	3.1	92.6	1.6
三唑磷	90.2	2.4	93.2	1.8	86.6	1.7

2.7 实际样品检测

从黑龙江省牡丹江市大药市中随机购买 10 份龙胆草人参样品,按照“1.2”节 GC-MS 条件和“1.3”节试验方法所建立的 SPME-GC-MS 法测定 15 种有机磷农药残留量。结果显示,10 份龙胆草样品中,检出部分农药残留,其中检出率较高的农药依次为对硫磷 (489.7 $\mu\text{g/kg}$)、三唑磷 (321.6 $\mu\text{g/kg}$)、

冯 颖,赫子涵. 无梗五加果黄酮的提取及其提取物的自由基清除活性比较[J]. 江苏农业科学,2018,46(22):218-222.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.22.052

无梗五加果黄酮的提取及其提取物的 自由基清除活性比较

冯 颖,赫子涵

(沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110866)

摘要:在单因素试验的基础上,采用响应面法优化超声波法提取无梗五加果黄酮的提取工艺,利用高效液相色谱分离及保留时间定性法对提取物组分进行分离及初步分析,通过测定无梗五加果黄酮类提取物对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、超氧阴离子自由基、羟自由基的清除作用,比较无梗五加果黄酮类提取物对不同自由基的清除活性。得到的无梗五加果黄酮超声波提取最佳工艺参数如下:乙醇浓度为 30%,料液比为 1 g:50 mL,超声提取时间为 40 min。实际测得黄酮提取量为 54.21 mg/g,达到预期值的 99.71%;高效液相色谱分离及保留时间定性法分析表明,无梗五加果黄酮提取物中含有芸香苷、金丝桃苷、槲皮素;无梗五加果黄酮提取物对羟自由基、超氧阴离子自由基、DPPH 自由基都有清除活性,其中对羟自由基的清除活性最强。

关键词:无梗五加果;超声波提取;组成;自由基

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)22-0218-05

无梗五加(*Acanthopanax sessiliflorus* Seem)别称短梗五加,卫生部于 2008 年第 12 号公告批准其为新资源食品,是一种药食同源的食品^[1]。研究表明,无梗五加的果实具有降血

收稿日期:2017-08-29

基金项目:辽宁省博士科研启动基金(编号:20091068)。

作者简介:冯 颖(1975—),女,辽宁朝阳人,博士,副教授,主要从事果蔬精深加工及其生物活性物质研究。E-mail:fywjg@sina.com。

甲胺磷(241.5 μg/kg)、甲基对硫磷(157.4 μg/kg),这说明龙胆草中存在一定的农药残留风险,应加强其质量监管。

3 结论

本研究建立了 SPME-GC-MS 对龙胆草中 15 种有机磷农药残留量的检测方法。在 5.0~500.0 ng/mL 浓度范围内,15 种有机磷农药具有良好的线性关系, $r^2 \geq 0.999 1$;检出限在 5.0~50.0 μg/kg 之间;回收率在 84.1%~105.8%,相对标准偏差(RSD)在 1.3%~5.7%之间。该方法具有样品前处理方便、准确度高、精密度好等特点,可为龙胆草中有机磷农药快速测定提供检测技术。

参考文献:

- [1] 尤宏娟. 龙胆草的生物特性及种植技术[J]. 吉林农业,2016,13(14):107.
- [2] 张 林,梁茂新. 龙胆草潜在功用的发掘与利用[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2015,17(3):675-678.
- [3] 金香子,徐 明. 龙胆草提取物抗炎、镇痛、耐缺氧及抗疲劳作用的研究[J]. 时珍国医国药,2005,16(9):842-843.
- [4] Branum A M, Collman G W, Correa A, et al. The national children's study of environmental effects on child health and development[J]. Environmental Health Perspectives,2003,111(4):642-646.

脂^[2]、抗肿瘤^[3]、抗血小板^[4-5]、清除自由基、耐缺氧、抗疲劳等作用^[6-8]。近些年来,国内外不断有将无梗五加果制成果汁、果酒、果干等的报道^[9],其作为新型营养健康食品也受到越来越多的关注。已有研究表明,无梗五加果的主要活性成分包括黄酮、皂苷、香豆素、三萜、酚酸、多糖等^[6,10-11],其中黄酮类化合物是研究的热点。安琪研究了无梗五加果中总黄酮含量的测定方法^[10]。李春芳等建立了无梗五加果提取物中

- [5] 杨立新,张永欣,张启伟,等. 毛细管气相色谱法测定中药材中 19 种有机氯类农药残留[J]. 中国试验方剂学杂志,2013,19(4):96-99.
- [6] 汤富彬,楼正云,陈宗懋,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定茶叶中有机氯农药残留量[J]. 理化检验-化学分册,2008,44(10):947-949.
- [7] 郝艳丽,葛红娟,王长文,等. 气相色谱法检测蔬菜中 7 种有机磷农药残留[J]. 食品研究与开发,2015,36(21):136-138.
- [8] 胡 强,王延云,王 燕,等. 气相色谱-质谱法同时测定绿茶中 28 种农药残留[J]. 食品研究与开发,2017,38(1):152-157.
- [9] 韩 飞,郑增尧,陈泽平,等. 气相色谱-质谱法测定气雾剂中 12 种氯苯类化合物的含量[J]. 现代化工,2016,36(9):197-200.
- [10] 王姗姗,李 刚,高丽娜,等. 液液萃取分离-气相色谱-串联质谱法同时测定水中 12 种有机氯农药[J]. 理化检验-化学分册,2016,52(4):384-387.
- [11] 钱宗耀,华震宇,周晓龙,等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定蔬菜及水果中 15 种农药残留量[J]. 理化检验-化学分册,2014,50(8):949-953.
- [12] 赵景煜,李巍霞,张嘉捷,等. 电化学修饰固相微萃取涂层用于气相色谱-质谱法测定纺织品中的芳香胺[J]. 理化检验-化学分册,2016,52(3):296-300.
- [13] 郭 震,常 靖,杨瑞琴,等. 固相微萃取气相色谱质谱联用同时测定鱼塘水中 26 种常见投毒农药[J]. 分析实验室,2015,34(6):635-639.