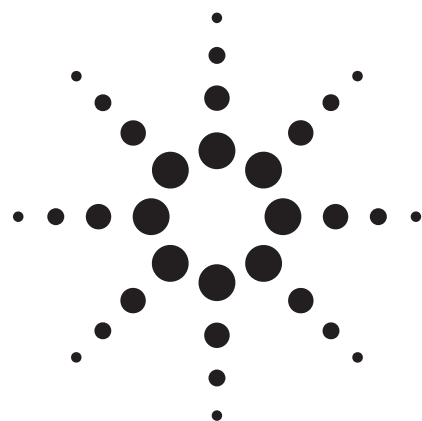




使用 GC/MS 筛选中药中 430 种残留杀虫剂： 从样品制备到报告生成仅需一小时

应用

中药

作者

Wei Luan and Zhixiu Xu
Agilent Technologies (Shanghai) Co., Ltd.
412 Ying Lun Road
Waigaoqiao Free Trade Zone
Shanghai 200131
China (中国)

摘要

本文阐述了中药杀虫剂残留筛选的总体解决方案，包括样品制备方法、仪器采集参数、先进的质谱数据处理，以及自动的定性、定量报告生成。该筛选方法中应用了以下技术：**QuEChERS** 样品处理方法，可以缩短样品预处理时间，降低预处理成本，减小环境污染；微板流路技术，是 **Agilent 7890A** 的一个重要革新，可以通过反吹除去基质中脏东西引起的化学噪声并缩短运行周期；安捷伦解卷积报告软件 (**DRS**)，应用了 **AMDIS** 解卷积算法，能够在 2~3 分钟内用新的日本肯定列表 **RTL** 数据库对 430 种适用于气相色谱分析的杀虫剂进行筛选。总之，这种筛选方法从制备样品到生成报告可在 1 小时内完成。

引言

中药在中国的应用已有数千年历史，在中国和其他国家显示了非常好的治疗效果。与以往相比，越来越多的中药材在农场中进行大规模的栽培。农场使用的杀虫剂应得到监测，以确保其残留量在安全范围内。中药的基质非常复杂，并且常用的杀虫剂有好几百种，但是其残留量却非常小。由于这些因素的存在，在短时间内完成残留杀虫剂的筛选成为非常困难的一项任务。

这一问题的解决涉及以下几个步骤，包括样品预处理、仪器采集、数据处理和报告生成。使用气相色谱/质谱联用仪 (GC/MS) 的基本要求如下：

1. 有效而且简单的样品制备方法
2. 重复性好而且可重现的保留时间
3. 包含保留时间和质谱信息的数据库

QuEChERS 是由 Dr. Steven J. Lehotay 和他的同事们开发的一种食品中杀虫剂分析方法，由 **Quick** (快速)、**Easy** (简便)、**Cheap** (经济)、**Effective** (有效)、**Rugged** (稳定) 和 **Safe** (安全) 的首字



Agilent Technologies

母缩写而命名[1-5]。这里之所以选择 QuEChERS，是因为和传统方法相比，它具有很多优点，例如对于极性和挥发性不同的杀虫剂有高回收率，样品通量大，有机溶剂用量小，不使用氯化物作溶剂[1-5]。QuEChERS 满足上述第 1 条基本要求。

保留时间锁定（RTL）[6]指在不同的 Agilent 6890/7890 GC 系统中使用相同牌号色谱柱，仍然获得非常接近的色谱保留时间的能力。Agilent 7890 GC 的保留时间重复性尤其出色，偏差小于 0.01 分钟。RTL 能够使不同仪器的保留时间精确地匹配，满足上述第 2 条基本要求。

2005 年 11 月 29 日，日本厚生省（MHLW）颁布了一套有关杀虫剂、饲料添加剂和兽药管理的“肯定列表（Positive List）”制度。该制度是世界上有关杀虫剂最为严厉的法规。按照该法规，安捷伦开发了一种新型数据库，名为“日本肯定列表保留时间锁定数据库（the Japanese Positive List RTL Database）”，其中包括了日本肯定列表中所有适用于气相色谱分析的杀虫剂，以及日本检疫机构监测的其它杀虫剂。该数据库中包含各种杀虫剂的保留时间和光谱信息，因此满足上述第 3 条基本要求[7]。

另外，筛选方法还应满足以最低的假阳性和假阴性率对杀虫剂进行快速确认的要求。

安捷伦解卷积报告软件（DRS）[7]设计用于从基质中对质谱进行自动解卷积，从而生成定性和定量报告。DRS 整合来自三个方面的信息：MSD ChemStation、自动质谱解卷积和鉴定系统（AMDIS），以及美国标准与技术研究院（NIST）质谱数据库检索。DRS 增强了从复杂基质中获得结果的信心，一般的数据处理时间只需 2~3 分钟，很好地满足了以上所提的更高要求。

本文阐述了如何应用以上技术手段来开发中药基质中杀虫剂筛选的一整套方法。研究的目标包括中药的不同药用部位，如金银花的花、黄芪的根和茎、银杏叶的叶、人参的根和枸杞的果实。通过约 20 分钟的 QuEChERS 预处理，所得提取物注入 Agilent 7890A/5975C。运行日本肯定清单测试方法，并采用反吹技术，运行时间约 37 分钟。最后，利用日本肯定清单 RTL 数据库，经过 2~3 分钟的 DRS 处理，自动生成一份定性定量报告。

实验部分

中药材购自当地药店，包括金银花、黄芪、银杏叶、人参和枸杞。所有样品均研成细粉。

样品制备

- 称取中药材细粉 1 g，置 50 mL 聚四氟乙烯试管中，加入蒸馏水 6 mL，使样品完全润湿，并于室温中存放 2 小时
- 加入 0.1%的冰醋酸乙腈溶液 4 mL，用手剧烈振摇 1 分钟，然后加入硫酸镁 1.2 g、氯化钠 4 g，继续用手剧烈振摇 1 分钟后，以 4000 rpm 转速离心 3 分钟
- 取 PSA（部件号 5188-5364）500 mg、C18（部件号 189-1302）250 mg、硫酸镁 250 mg，置 5 mL 离心管中，接着移取上述提取液的上清液 1.5 mL 至离心管中，以 3000 rpm 转速离心 1 分钟。如果离心后溶液呈黑色，可加入石墨化碳黑以吸附其中的色素（如叶绿素）
- 移取提取液 1.0 mL 至 GC 样品瓶中

如果在筛选后还需要进行专属的定量分析，可在最终溶液中加入分析保护剂和内标物质。

GC/MS

日本肯定清单方法由日本厚生省发布，用于所有日本生产和进口的农产品中杀虫剂的检测。本文中，对该方法进行改进，加上反吹过程，用以处理复杂的中药基质。方法参数详见表 1。

系统的软件要求

Agilent MSD ChemStation (部件号 G1701EA, Ver. E.02.00)、安捷伦解卷积报告软件(部件号 G1716AA, Ver. A.04.00)、NIST05b 质谱数据库(部件号 G1033A)，包括 NIST MS Search (Ver. 2.0d) 和 AMDIS (Ver. 2.65)，以及安捷伦日本肯定列表杀虫剂 RTL 数据库 (部件号 G1675AA)。

结果与讨论

用于多种中药基质的 QuEChERS 方法优化

在中药制剂中，可以选择中药材不同的可食用部位入药。另外，中药基质的化学成分复杂，含有皂苷、多糖、黄酮、酚酸以及脂肪酸等。因此，测定如此复杂的中药基质中的残留杀虫剂是一项艰巨的任务。

本次研究中，首先对金银花进行了考察，随后，为了在化学成分方面更具代表性，将不同的中药混合在一起。选择了 5 种中药材进行混合，分别是金银花、黄芪（根和茎）、银杏叶、人参（根）和枸杞子。

表 1. 气相色谱仪和质谱仪参数

气相色谱仪				Agilent 7890A 或 6890N		前进样器	
前进样口	分流/不分流			样品清洗		0	
进样类型	不分流			样品泵		6	
进样口温度	280 °C			进样量		2 µL	
进样口衬管	去活双锥螺旋形衬管 (部件号 5188-5398)			注射器大小		10 µL	
压力	17.446 psi			溶剂 A 进样前		0	
吹扫气流速	50 mL/min			溶剂 B 进样前		0	
吹扫时间	0.75 min			溶剂 A 进样后		6	
总流速	54.51 mL/min			溶剂 B 进样后		6	
载气节省功能	开			延迟时间		1 秒	
节省流速	20.0 mL/min			进样速度		快	
节省时间	1.00 min			进样前延迟时间		0 min	
载气类型	氮气			氦气		0 min	
柱温				MSD		带三轴检测器的 Agilent 5975C	
程序升温	°C/min	目标温度 °C	保持时间 (min)	采集模式		扫描	
初始时间		50	1	溶剂延迟		3.30 min	
升温速率	25	125	0	最低质量		35	
升温速率	10	300	10	最高质量		450	
运行结束后		300	5	阈值		100 (或根据噪声水平设定)	
总运行时间	36.5 min			采样次数		2	
平衡时间	0.5 min			四极杆温度		150 °C	
色谱柱				离子源温度		230 °C	
柱长	J&W DB-5ms 超高惰性 (部件号 122-5532UI)			传输管线温度		280 °C	
直径	30 m			调谐文件		Atune.u	
液膜厚度	0.25 mm			增益因子		10	
模式	0.25 µm			痕量离子检测		开	
压力	恒流			RTL		系统的保留时间锁定为甲基毒死蜱在 13.443 min 洗脱	
标称初始流速	17.446 psi (运行结束后 2 psi)			反吹		三通分流器 (部件号 G3183B)	
进样口	1.51 mL/min (运行结束后 4.05 mL/min)			装置		三通分流器 (部件号 G3183B)	
出口	前进样口			限流管尺寸		0.706 m × 0.18 mm id	
出口压力	PCM (部件号 G1530-63309)						
	2 psi (运行结束后 60 psi)						

QuEChERS 方法中，吸附剂的用量对于杀虫剂的回收率有很大的影响。已经证明，PSA 在处理中药提取物的酸性成分方面更为有效。通过对 PSA 不同剂量的筛选发现，500 g 的用量已经足够。经 QuEChERS 处理的混合中药样品典型色谱图见图 1。

微板流路控制技术产生的反吹作用在复杂的中药基质分析研究中的应用

反吹作用通过改变色谱柱中载气流的方向，将高沸点物从色谱柱入口端冲出。经证明，这种反吹作用能够有效地消除一次次运行产生的化学噪声。通常，高沸点物留在色谱柱的前端，只有将柱温升至足够高，才能把它们赶出色谱柱。众所周知，长时间高温烘烤色谱柱易使色谱柱填料严重流失，导致色谱柱寿命缩短。有些复杂基质，即使长时间烘烤仍然无法完全除去高沸点物，则可能在下一次进样时发生保留时间漂移。反吹是避免高温烘烤和保留时间漂移的最高解决方案。反吹能最大程度地减小对检测器的污染，这对于质谱检测器尤为重要，因为它可以减少离子源的清洗次数。反吹的另一个积极贡献在于它能缩短运行周期，从而提高实验室的

效率。有关反吹作用的详情，包括方法开发步骤，可参见安捷伦相应的应用报告[8]。

本实验中，使用带尾吹气的三通分流器来实现反吹作用。该装置有特别的尾吹气补充管路和四个接口，一个接色谱柱，另三个可与三个不同检测器的限流管相连。由于本次研究中仅用到一个质谱检测器，尾吹气前两个接口被封上，第三个接口连接色谱柱，最后一个接口连接限流管。这样设置的主要目的是避免由于死体积的增大而引起色谱峰展宽。限流管的长度和内径分别为 0.706 m 和 0.18 mm。该装置和 GC/MSD 系统设置示意图见图 2。

中药基质中目标杀虫剂的 DRS 鉴定

杀虫剂分析的另一个挑战，是在复杂的基质中对痕量的目标化合物进行鉴定时，通常受到很高的化学噪音的干扰，得到的谱图库匹配因子很低。为改善匹配因子，以前常用的方法是背景扣除，然而，这种方法同时受到基质情况和检测人员水平的影响，有时会给出不一致的结果。

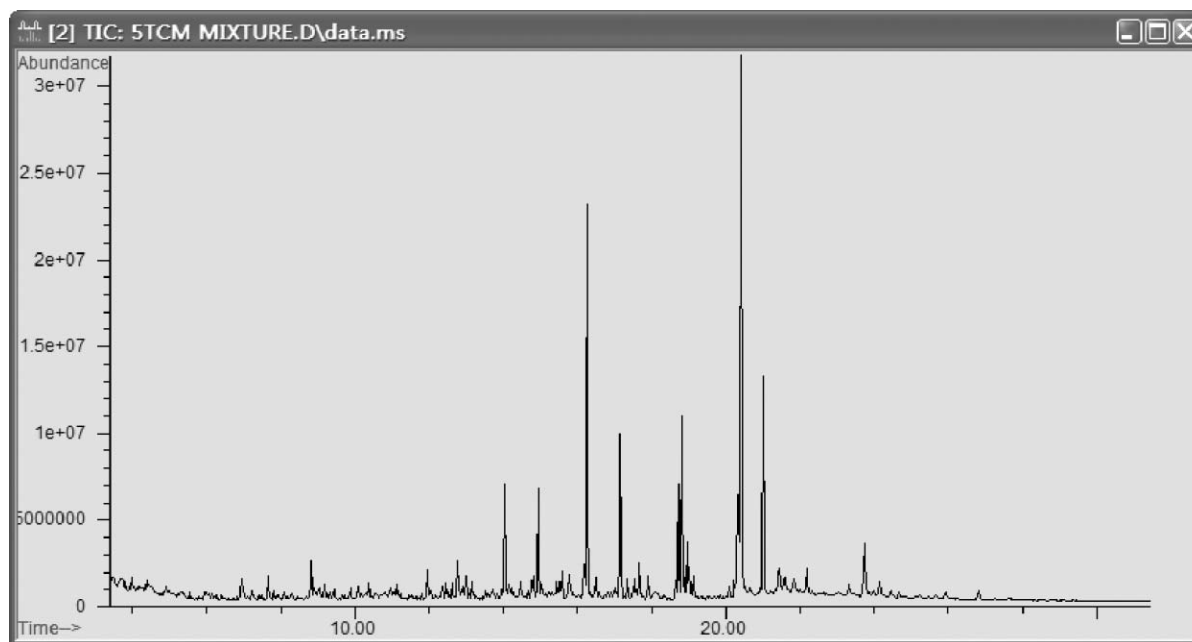


图 1. 混合中药样品（金银花、黄芪、银杏叶、人参和枸杞）经 QuEChERS 处理后的典型总离子色谱图

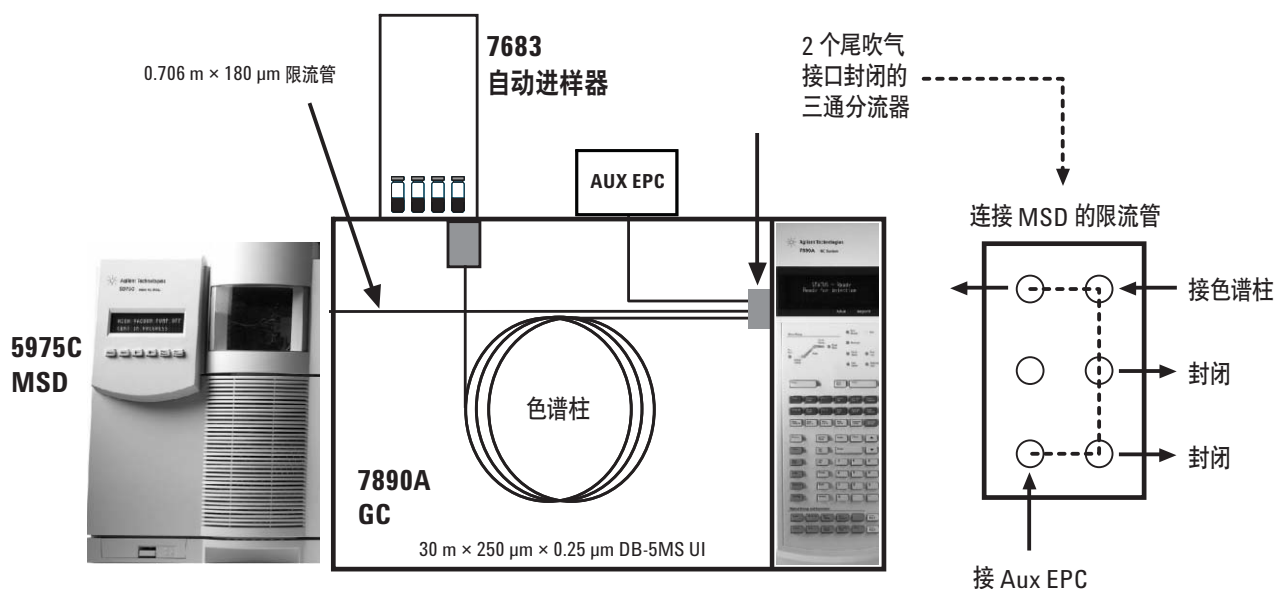


图2. GC/MS 系统设置和三通分流器管路连接示意图

安捷伦于 2004 年投入应用的解卷积报告软件 (DRS) 是一个软件包，将三个不同数据处理软件信息整合成易于阅读的报告。DRS 的最主要优点是大大缩短了从复杂的基质分析中解读结果所需的时间。然而，一个合适的数据库对于成功运用 DRS 非常重要。日本肯定清单 RTL 数据库是用于杀虫剂分析的新型 DRS 数据库，包含 430 种适用气相色谱分析的杀虫剂的保留时间和质谱信息。数据库的详细信息参见安捷伦的应用报告[7]。

中药基质中残留杀虫剂分析的数据处理和报告生成，优先推荐使用 DRS 与日本肯定列表 RTL 数据库。图 3 是加标混合中药样品的典型 DRS 报告的一部分。

图 4 显示了分析中药基质残留杀虫剂时使用 DRS 的优势。在混合中药样品中加入 10 ppb 浓度水平的甲基嘧啶磷。该化合物被 MSD ChemStation 漏过了，却由 DRS 成功检出。上方窗口是总离子色谱图 (TIC)，中间窗口是第 2199 次扫描 (13.981 分钟) 时有干扰的原始光谱，下方窗口是解卷积光谱 (白色曲线) 和日本肯定列表清单 RTL 数据库中甲基嘧啶磷光谱 (黑色曲线) 的对比。经过解卷积，第 2199 次扫描的光谱图变“干净”了，从而能从混合中药样品中轻松鉴定出甲基嘧啶磷。

结论

痕量水平杀虫剂分析最主要的干扰就是复杂中药基质中的化学噪声。本文采用了几种新技术以消除这些干扰。成熟的样品制备方法是尽可能地去化学噪声的主要途径。应用 QuEChERS 方法使样品制备步骤得到了简化，提高了实验室的效率，整个处理过程仅需 20 分钟左右即可完成。然而，即使应用了有如 QuEChERS 这样的预处理方法，仍然不能完全除去化学噪声。反吹是另一种可以消除一次次运行中化学噪声的方法。尽管反吹不是一个新的概念，但是应用微板流路技术能够比以往更有效地实现反吹作用。本研究中，一种带尾吹气的三通分流器用于实施反吹作用，带反吹的数据采集时间约为 37 分钟。在数据处理过程中与化学噪声有关的最后一步利用了一种解卷积的算法。安捷伦的解卷积报告软件能够将数据处理时间缩短至 2~3 分钟，同时应用了日本肯定清单 RTL 数据库，对于中药基质中杀虫剂的分析十分有效。从样品预处理到生成筛选报告，整个中药基质中 430 种残留杀虫剂的筛选仅需 1 小时即可完成。

MSD 解卷积报告

样品名称: Op02spiked stds-1

数据文件: D:\Wei\Pest@TCM\DATA\080625~1
200806~2.D

日期/时间: 07:11 PM Thursday, Jul 17 2008

相邻色谱峰背景扣除 = 1

分辨率 = 中

灵敏度 = 高

峰形要求 = 中

在 AMDIS 目标谱图库中检出的成分用 NIST 谱图库继续检索。

R.T.	Cas #	化合物名称	含量 (ng)		AMDIS		NIST	
			Chem station	AMDIS	匹配	R.T. Diff sec.	反向匹配	匹配数
6.6795	62737	敌敌畏	0.05	0.04	70	5.1	70	1
9.4430	2675776	地茂散			51	1.5	52	77
11.326	6923224	久效磷	0.04					
11.6951	118741	六氯苯			50	0.7		
11.6951	7364207	苯甲酸四乙基甲酯					72	1
12.108	319857	β -BHC		0.05	58	0.7	61	5
12.4776	333415	二嗪农		0.03	63	0.2	45	1
12.8566	319868	δ -BHC		0.05	59	0.2	52	5
13.436	5598130	甲基毒死蜱		0.05	79	-0.4	65	1
13.503	50471448	免克宁			56	-0.5	56	1
13.5616	298000	甲基对硫磷		0.06	54	-0.5	60	2
13.984	29232937	甲基嘧啶磷		0.05	81	-0.9	64	1

图3. 典型 DRS 报告的一部分

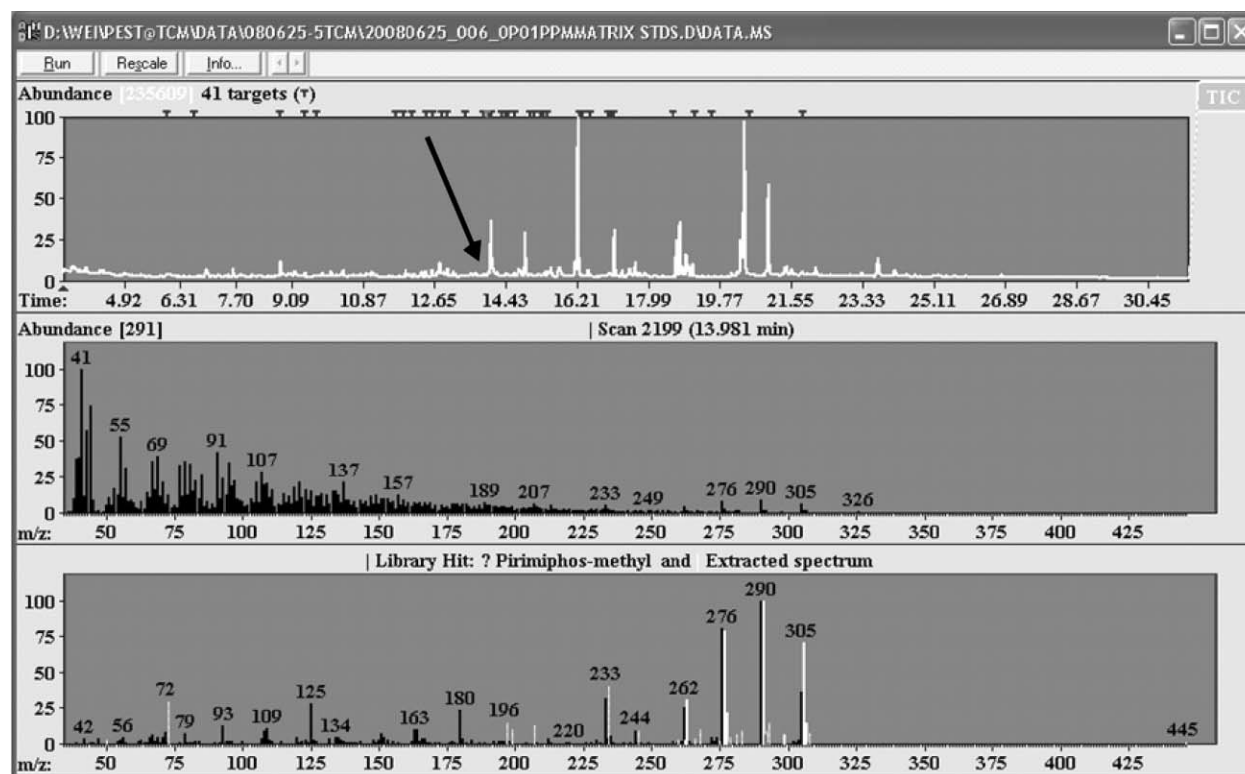


图4. AMDIS 结果显示, 其中, 上方窗口为中药混合样品的总离子色谱图, 中间窗口为甲基嘧啶磷洗脱物光谱图, 下方窗口同时给出解卷积光谱图(白色)与谱图库中甲基嘧啶磷光谱图(黑色)。

参考文献

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. J. Schenck, "Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and 'Dispersive Solid-Phase Extraction' for the Determination of Pesticide Residues in Produce," *J. AOAC Int.*, 2003; 86(2): 412
2. S. J. Lehotay, K. Mastovska, and S. J. Yun, "Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes," *J. AOAC Int.*, 2005; 88(2): 630
3. S. J. Lehotay, K. Mastovska, and A. R. Lightfield, "Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables," *J. AOAC Int.*, 2005; 88(2): 615
4. S. J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, and P. van Bodegraven, "Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of 229 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection," *J. AOAC Int.*, 2005; 88(2): 595
5. M. Anastassiades, K. Mastovska, S. J. Lehotay, "Evaluation of Analyte Protectants to Improve Gas Chromatographic Analysis of Pesticides," *J. Chromatogr. A*, 2003; 1015(1-2): 163
6. V. Giarocco, B. Quimby, and M. Klee, "Retention Time Locking: Concepts and Applications," Agilent Technologies publication 5966-2496E
7. Philip L. Wylie, "Screening for Pesticides in Food Using the Japanese Positive List Pesticide Method: Benefits of Using GC/MS with Deconvolution Reporting Software and a Retention Time Locked Mass Spectral Database," Agilent Technologies publication 5989-7436EN
8. Chin K. Meng, "Improving Productivity and Extending Column Life with Backflush," Agilent Technologies publication 5989-6018EN

更多信息

如需了解更多产品和服务信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2008

中国印刷
2008 年 8 月 18 日
5989-9341CHCN



Agilent Technologies