

QuEChERS-反相高效液相色谱-串联质谱法测定麦冬中多效唑、烯效唑

翟宇瑶^{1,2}, 段万里³, 中国安², 郭宝林^{2*}

1. 西安市第四医院 药剂科, 陕西 西安 710004
2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193
3. 陕西省人民医院 泌尿外科, 陕西 西安 710068

摘要:目的 建立 QuEChERS-反相高效液相色谱-串联质谱法测定麦冬药材中多效唑、烯效唑的农药残留的方法。方法 采用 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.4 mm); 流动相: 0.1%甲酸的 0.005 mol/L 醋酸铵溶液 - 乙腈 (25 : 75); 柱温: 25 °C; 体积流量: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长: 223 nm。采用电喷雾正离子模式进行多反应监测, 喷雾电压: 5 000 V, 毛细管温度: 450 °C, 鞘气: 206 kPa, 辅助气: 15 mL/min。结果 多效唑、烯效唑浓度在 1.0~100 ng/mL 线性关系良好。多效唑、烯效唑的检出限分别为 0.05、0.01 ng/mL, 定量限分别为 0.22、0.03 ng/mL。多效唑、烯效唑的平均回收率分别为 94.7%、85.5%, RSD 值分别为 5.3%、4.1%。在 33 个实际样品中有 31 个样品检出多效唑残留, 检出率为 94%, 残留量为 0.02~2.08 mg/kg; 有 9 个样品检出烯效唑残留, 检出率为 27%, 残留量为 0.02~0.13 mg/kg。结论 本方法可快速、简便、准确地测定麦冬药材中的多效唑、烯效唑残留量。

关键词: 麦冬; 多效唑; 烯效唑; QuEChERS-反相高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)03-0591-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.03.003

Determination of paclobutrazol and uniconazole in *Ophiopogonis Radix* by QuEChERS-HPLC-MS/MS

ZHAI Yu-yao^{1,2}, DUAN Wan-li³, SHEN Guo-an², GUO Bao-lin²

1. Department of Pharmacy, Xi'an No.4 Hospital, Xi'an 710004, China
2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
3. Department of Urology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China

Abstract: Objective To establish a QuEChERS-HPLC-MS/MS method for the determination of pesticide residues of paclobutrazol and uniconazole in *Ophiopogonis Radix*. **Methods** The separation was carried out on Thermo BDS Hypersil C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 2.4 mm). The mobile phase was consisted of 0.005 mol/L ammonium acetate solution of 0.1% formic acid - acetonitrile (25:75). The column temperature was set at 25 °C, flow rate was 0.3 mL/min, and volume of injection was 10 μL. The detective wavelength was set at 223 nm. Electrospray positive ion mode was used for multi reaction monitoring, the spray voltage was set at 5 000 V, and the capillary temperature was set at 450 °C. Sheath gas was 206 kPa and the auxiliary gas was 15 mL/min. **Results** The linear ranges of paclobutrazol and uniconazole were 1.0 — 100 ng/mL. The detection limits of paclobutrazol and uniconazole were 0.05, 0.01 ng/mL, and quantitative limits were 0.22, 0.03 ng/mL, respectively. The average recoveries of paclobutrazol and uniconazole were 94.7% and 85.5% with RSD of 5.3% and 4.1%, respectively. In the 33 actual samples, 31 samples were detected with the paclobutrazol detection rate of 94% and with the residual amount of 0.02 — 2.08 mg/kg. In 9 samples, the uniconazole detection rate was 27%, and the residues were 0.02 — 0.13 mg/kg. **Conclusion** The method is rapid, simple, and accurate for the determination of paclobutrazol and uniconazole residues in *Ophiopogonis Radix*.

Key words: *Ophiopogonis Radix*; paclobutrazol; uniconazole; QuEChERS-HPLC-MS/MS

收稿日期: 2018-11-01

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程协同创新团队项目 (2017-12M-3-013)

作者简介: 翟宇瑶, 女, 主管药师, 硕士, 研究方向为中药质量分析。Tel: (029)87480635 E-mail: zyy529@163.com

*通信作者 郭宝林, 女, 研究员, 研究方向为中药质量分析。Tel: (010)57833172 E-mail: guobaolin010@163.com

麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L.f) Ker.-Gawl.的块根, 是滋阴生津、润肺止咳的常用中药材。麦冬多采用人工栽培。本研究在麦冬主产地四川省三台县调查发现, 植物生长延缓剂多效唑、烯效唑在种植全过程中使用极为普遍和频繁。植物生长延缓剂属农药, 在各国水果蔬菜中的残留量均有相应的规定, 如多效唑因其在土壤中的半衰期长, 有可能对非靶目标产生危害, 许多欧盟国家已经禁用。日本、新西兰、韩国和澳大利亚等国规定多效唑的最高残留限量为 0.5 mg/kg, 我国规定了多效唑在水果谷物中最高残留限量(MRL)为 0.2~0.5 mg/kg, 对于中药材的残留量无相关规定^[1]。2003 年 Anastassiades 和 Lehotay 提出 QuEChERS 前处理方法, 是一种应用于农药残留的检测方法, 其技术核心是在样品提取液中加入除水剂和净化剂, 除水剂用于以除去新鲜样品中多余的水分, 净化剂则是除去样品溶液中可能影响测定的其他杂质。净化后的溶液经过离心处理后可以直接进行进样分析^[2]。QuEChERS 法简单、快速、稳定, 在实际应用中经过不断改良, 已经用于各类食品、蔬菜、水果等样品的前处理^[3-4]。中药中往往含有丰富而多样的次生代谢产物, 这给农残检测带来不便, 如麦冬中含有皂苷类、甾醇类和多种糖类化合物, 所以选择合适的中药中农残检测的样品前处理方法非常重要^[5]。本实验通过优化高效液相色谱、质谱等仪器的相关参数, 考察了不同流动相配比、前处理方法等影响因素, 建立了麦冬样品中多效唑、烯效唑胺残留的 QuEChERS - 液相色谱 - 串联质谱法检测方法。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); API3200Q-trap 质谱仪(美国应用生物系统公司); KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Sartorius B310P 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); NewClassic MS-SMS105 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

乙腈(Fisher, 色谱纯); 乙腈(西陇化工股份有限公司, 分析纯); 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 无水 $MgSO_4$ (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 丙基乙二胺(PSA, 博纳艾吉尔公司); 石墨化炭黑(GCB, 博纳艾吉尔公司); 烯效唑(规格 U114871-100 mg, 分析对照品, 质量分数 >97.5%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 多效唑(规格 P109932-250 mg, 分析对照品, 质量分数 >99%,

德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

33 份麦冬药材样品于 2012 年 12 月在四川省三台县采集, 均由中国医学科学院药用植物研究所郭宝林研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

Thermo BDS Hypersil C_{18} 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.4 mm); 流动相: 0.1%甲酸的 0.005 mol/L 醋酸铵溶液 - 乙腈(25:75); 柱温: 25 °C; 体积流量: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μ L; 检测波长: 223 nm。电离方式: 电喷雾(ESI⁺), 喷雾电压: 5 000 V, 毛细管温度: 450 °C, 鞘气: 206 kPa, 辅助气: 15 mL/min, 质谱采集参数见表 1, 色谱图见图 1。

表 1 高效液相 - 串联质谱条件下目标化合物的检测离子和质谱采集参数

Table 1 Detection ions of target compounds and mass spectrum acquisition parameters by HPLC-MS/MS

化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	去簇电压/ V	碰撞电压/ V
多效唑	294	70*, 125	86	25、20
烯效唑	292	70*, 125	83	31、23

*定量离子对

*quantitative ions

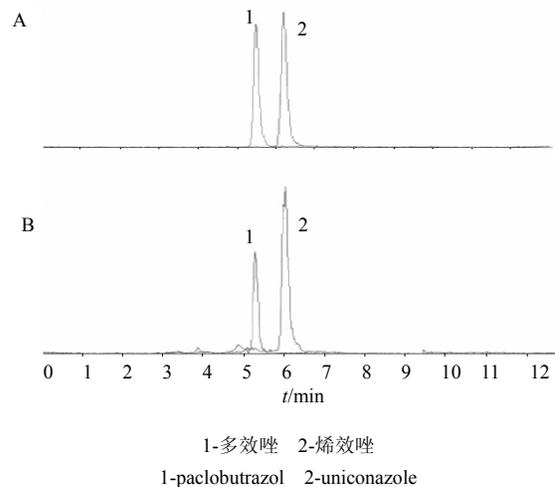


图 1 多效唑、烯效唑对照品(A)和麦冬样品(B)的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 HPLC-MS/MS chromatograms of paclobutrazol and uniconazole reference substance (A) and *Ophiopogon Radix* (B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定多效唑、烯效

唑对照品 5 mg, 用乙腈定容至 5 mL 量瓶中, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 然后用乙腈稀释成所需的 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL 混合标准液, 于棕色试剂瓶中保存。

2.2.2 供试品溶液的制备 将干燥的麦冬样品粉碎(过 40 目筛)。精密称取 2.0 g 样品于 50 mL 塑料离心管中, 加入 30 mL 乙腈, 称定质量, 超声(功率 450 W, 频率 59 kHz)提取 30 min 后, 再称定质量, 用乙腈补足减失的质量。在 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min。于室温静置, 待上清液分层后, 定量吸取 2 mL 离心上清液于 10 mL 具塞塑料离心管中, 加入 50 mg PSA 固相分散萃取净化剂, 称定质量, 高速涡旋 0.5 min 后, 在 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 称定质量, 用乙腈补足减失的质量。取上清液, 用 0.45 μm 有机相滤膜滤过, 即得。

2.3 线性关系和检出限试验

为减少基质对定量测定的影响, 用空白麦冬样品提取液配制不同浓度范围的植物生长调节剂混合标准溶液, 采用基质匹配-外标法定量分析。采用空白麦冬样品加入 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100 ng/mL 对照品作为工作溶液, 获得混合标准液。按色谱条件进样测定, 分别以质量浓度为横坐标, 定量离子对峰面积为纵坐标, 进行线性回归计算, 多效唑、烯效唑在 1.0~100 ng/mL 的线性关系良好, 多效唑回归方程为 $Y=3\ 864.7\ C-168.94$ ($R^2=0.998\ 4$), 烯效唑回归方程为 $Y=1\ 461.8\ C+5\ 293.3$ ($R^2=0.995\ 7$)。以 3 倍信噪比估算检出限 (LOD), 以 10 倍信噪比对应质量浓度作为定量限 (LOQ)。多效唑检出限为 0.05 ng/mL, 定量限为 0.22 ng/mL, 烯效唑检出限为 0.01 ng/mL, 定量限为 0.03 ng/mL。

2.4 精密度试验

取 10.0 ng/mL 混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算得多效唑和烯效唑的峰面积的 RSD 值分别为 0.7%、1.0%。

2.5 重复性试验

取批号 A-1 麦冬样品, 制备供试品溶液, 进行测定, 计算多效唑、烯效唑质量分数, 结果 RSD 值分别为 1.3%、1.1%。

2.6 稳定性试验

取批号 A-1 麦冬样品, 制备供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10 h 进行测定。计算多效唑、烯效唑质量分数, 结果其 RSD 值分别为 1.5%、1.6%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.7 回收率试验

根据 GB/T5009.1-2003 对分析方法中色谱的检出限规定, 取批号 A-1 麦冬样品 1 g, 添加 0.005、0.01、0.02 mg/kg 多效唑、烯效唑, 经提取净化等样品前处理过程后, 进样测定, 计算得平均回收率分别为 94.7%、85.5%, RSD 值分别为 5.3%、4.1% ($n=9$)。

2.8 样品测定

将实验中测得样品中多效唑、烯效唑的峰面积带入标准曲线, 计算出样品中多效唑、烯效唑的质量分数。在 33 个实际样品中有 31 个样品检出多效唑残留, 检出率为 94%, 残留量为 0.02~2.08 mg/kg, 与国内水果谷物限量 (0.5 mg/kg) 相比, 有 3 个样品超标, 超标率为 9%; 有 9 个样品检出烯效唑残留, 检出率为 27%, 残留量为 0.02~0.13 mg/kg, 见表 2。

3 讨论

3.1 质谱条件的优化

采用针泵进样分析化合物的标准溶液 (0.1 mg/L), 离子源为电喷雾电离源, 多反应监测模式下对多效唑、烯效唑质谱条件进行优化。多效唑、烯效唑进入一级质谱后, 较易产生稳定的 $[M+H]^+$ 分子离子。最终确定多效唑的母离子为 $m/z\ 294.5$, 烯效唑的母离子为 $m/z\ 292.5$ 。 $[M+H]^+$ 母离子在质谱二级裂解时可能会发生重排、断裂等裂解相关反应, 从而生成不同质量数的碎片离子。在碎片离子扫描方式下, $[M+H]^+$ ($m/z\ 294.5$) 作为多效唑的母离子产生有显著丰度的 $m/z\ 70.2$ 、125.3 等离子碎片, 其中 $m/z\ 70.2$ 丰度最高。因此选择 $m/z\ 294.5 \rightarrow 70.2$ 作为定量离子对, 其他作为定性离子对。同理确定了烯效唑 $m/z\ 292.5 \rightarrow 70.2$ 作为定量离子对。这与 Sancho 等^[6]的报道一致。

3.2 流动相条件的优化

分别以不同比例甲醇、乙腈为流动相, 结果表明, 采用流动相含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 醋酸铵溶液-乙腈 (25:75) 等度洗脱分离时分离效果较好。

3.3 样品提取方法的优化

3.3.1 提取溶剂的选择 比较了在多效唑、烯效唑加标浓度为 0.5 mg/kg, 固定 4 g $MgSO_4$ 为净化剂时, 不同的提取溶剂对多效唑、烯效唑的提取效果。结果表明: 采用 60% 乙腈-水溶液时, 由于提取出较多的糖类成分可能对多效唑、烯效唑的提取产生影响导致回收率较低, 甲醇、乙腈、80% 乙腈-水溶

表 2 麦冬样品中多效唑和烯效唑的残留量

Table 2 Paclobutrazol and uniconazole residues in samples

编号	多效唑/(mg·kg ⁻¹)	烯效唑/(mg·kg ⁻¹)	编号	多效唑/(mg·kg ⁻¹)	烯效唑/(mg·kg ⁻¹)
A-1	0.04	0.11	F-5	0.07	-
A-2	1.49	0.13	F-6	0.11	--
A-3	0.05	0.06	F-7	0.35	-
A-4	0.03	-	F-8	0.08	--
A-5	0.05	-	F-9	0.03	--
A-6	2.08	0.02	L-1	0.03	--
A-7	0.05	--	L-2	0.02	--
A-8	--	-	L-3	0.12	--
A-9	0.03	--	L-4	0.13	0.53
B-1	1.56	--	L-5	0.02	0.03
C-1	0.09	0.05	L-6	0.04	--
D-1	0.02	-	L-7	0.12	--
E-1	--	0.03	L-8	0.07	0.04
F-1	0.02	--	L-9	0.04	--
F-2	0.02	--	L-10	0.11	-
F-3	0.04	--	L-11	0.06	-
F-4	0.02	--			

--: 低于定量限; --: 未检出

-, Values lower than the LOQs; --, not detected

液对多效唑、烯效唑的回收率均满足方法学要求。考虑到乙腈提取可避免样品基质中蜡质、脂肪和脂溶性色素的干扰,降低提取液中的杂质,提高目标物的回收率,所以选择乙腈作为提取溶剂^[7]。

3.3.2 液料比的选择 将 2.00 g 粉碎后的麦冬样品分别用 5:1、10:1、15:1、20:1 液料比乙腈超声(功率 400 W)提取 10 min,研究不同液料比对多效唑、烯效唑的回收率的影响。结果随着液料比的增加,多效唑、烯效唑的回收率提高,但当液料比大于 15:1 时,液料比对多效唑、烯效唑的回收率影响不明显,所以选择液料比 15:1 为提取条件。

3.3.3 超声时间的选择 在液料比 10:1 的条件下,考察不同超声时间对多效唑、烯效唑回收率的影响。结果表明,当超声提取样品中的多效唑、烯效唑时,0~10 min 回收率随着超声时间的增加而明显增加;当超声时间从 10 min 至 30 min 时,多效唑、烯效唑的萃取回收率有所增加,但变化不大;当超声时间超过 30 min 时,多效唑、烯效唑的回收率基本不变。所以最终实验选择了 30 min 作为超声提取时间。

3.3.4 固相吸附剂的选择 PSA (N-丙基乙二胺)

是一种弱离子交换的固相萃取材料,可通过离子交换作用或氢键的形成以去除样品中的有机酸、脂肪酸、糖、色素、甾醇和维生素等。由于麦冬含有大量的糖分、黏液质,所以适合用 PSA 净化。GCB (石墨化碳黑)固相吸附柱可以有效去除色素、维生素和甾醇,但其对具有平面结构的化合物有很大的吸附作用,有可能影响目标物的回收率。实验考察了 50 mg PSA、50 mg C₁₈、10 mg GCB 以及 50 mg PSA+10 mg GCB、50 mg C₁₈+10 mg GCB 对多效唑、烯效唑回收率的影响。结果表明经过 GCB 净化的样品基本澄清,对目标物质无干扰。但当 GCB 过量时会吸附烯效唑,使其回收率降低,最终确定 50 mg PSA 为固相吸附剂的用量。

3.4 药材中的残留情况

根据检测结果可以发现麦冬中多效唑的残留较烯效唑严重。这反映了麦冬种植过程中多效唑使用强度较大,这与前期种植调研一年喷洒多次的情况相符合^[8]。另外麦冬是连作植物,一个地块收获以后仍旧继续种植,土壤中的残留会继续累积作用于植物。但相比果蔬而言,受煎煮方式和服用疗程的影响,多效唑、烯效唑在麦冬以及其他中药材中的

风险应低于果蔬,因此建议国家监管部门加快中药材农药残留风险评估工作,形成针对中药材的农药残留限量标准。

参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部 [S] NY1500.41.3-1500.41.6-2009. NY1500.5.0-1500.92-2009. 农产品中农药最大残留限量.
- [2] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce [J]. *JAOAC Int*, 2003, 86(2): 412-431.
- [3] Peromingo B, Rodríguez M, Núez F, *et al.* Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and UHPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2018(263): 275-282.
- [4] 孙 菡, 袁 浩, 徐艳梅, 等. QuEChERS 结合气相色谱-串联质谱法测定吐根药材中 38 种农药残留 [J]. *中国药业*, 2018, 27(10): 19-22.
- [5] 马 雯, 薛晓利, 秦雪梅, 等. 中药材农药残留及脱除方法研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(3): 745-753.
- [6] Sancho J V, Pozo O J, Zamora T, *et al.* Direct determination of paclobutrazol residues in pear samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(15): 4202-4206.
- [7] 宋 莹, 张耀海, 黄 霞, 等. 气相色谱-串联质谱法快速检测水果中的多效唑残留 [J]. *分析化学*, 2011, 39(8): 1270-1273.
- [8] 翟宇瑶, 郭宝林, 黄文华. “壮根灵”类药剂检测及植物生长延缓剂在根及根茎类道地药材栽培中使用情况调查 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(3): 414-420.