

量标准提供了依据。

3.5 由于回心草主要在民间作民族草药使用,人们对其的关注和研究不及其他广泛使用的中药,因而对回心草化学成分的文献报道不是很多。王波等<sup>[3]</sup>报道回心草 11 kg, 95% 乙醇提取物依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇进行充分萃取,用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱反复对醋酸乙酯部位进行成分分离、纯化,共分离鉴定了 8 个化合物。根据化合物波谱数据与文献报道比较,这些化合物分别被鉴定为胡椒碱(11 mg)、咖啡酸甲酯(10 mg)、尿嘧啶苷(17 mg)、熊果酸(13 mg)、3 $\beta$ -羟基-5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -氧桥-6, 22-二烯(41 mg)、3 $\beta$ -羟基-5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -氧桥-6, 9(11), 22-三烯(7 mg)、 $\beta$ -谷甾醇(34 mg)、胡萝卜苷(22 mg)。戴畅<sup>[4]</sup>将回心草全草 9.8 kg 95% 的乙醇提取物分为石油醚、醋酸乙酯、正丁醇和水 4 个部位,进行充分

萃取,对活性筛选中活性较好的醋酸乙酯部位进行成分分离纯化,共分离得到 26 个化合物,鉴定了其中 23 个化合物。本实验用胡椒碱、熊果酸、齐墩果酸、咖啡酸、原儿茶酸、槲皮素、芹菜素为对照品,指纹谱色谱峰中未发现相应的对照品峰,可能由于在药材中量极低所致,有些文献报道把胡椒碱、槲皮素、芹菜素作为回心草的有效成分值得进一步研究,所以,对回心草有效成分的探索显得尤为必要。

参考文献:

- [1] 蔡宝昌, 刘训红. 常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [3] 王波, 刘屏, 沈月毛, 等. 回心草化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 895-897.
- [4] 戴畅. 藜类植物回心草的化学成分和生物活性研究 [D]. 北京: 解放军总医院军医进修学院, 2006.

## 三唑酮及其代谢产物在人参中的残留分析方法研究

戴博<sup>1</sup>, 金红宇<sup>2</sup>, 田金改<sup>2</sup>, 孙鹏<sup>3</sup>, 林瑞超<sup>2</sup>

(1 空军总医院药学部, 北京 100036; 2 中国药品生物制品检定所, 北京 100050;

3 延边大学附属医院药剂科, 吉林 延吉 133000)

**摘要:**目的 建立凝胶渗透色谱(GPC)和活性炭固相萃取柱(ENV+Carb-SPE)结合的方法对样品进行净化处理,采用气相色谱-负化学电离源质谱联用(GC-NCIMS)的方法分析人参根及茎叶中三唑酮及其代谢产物三唑醇 A、三唑醇 B 残留量的方法。方法 样品以丙酮为提取溶剂超声提取,并采用凝胶渗透色谱(GPC)和活性炭固相萃取柱(ENV+Carb-SPE)结合的方法进行样品的净化, DB-5MS 毛细管柱程序升温分离,采用气质联用负化学电离源(NCI)SIM 方式检测,以空白样品提取液配制对照品溶液,以克服基质效应,外标法测定。结果 3 种农药在 10 min 内完全分离,根及茎叶样品在 3 个水平添加回收率在 90%~105%,均小于 6%( $n=6$ )。三唑酮和三唑醇的检测限分别为 0.1 和 10  $\mu\text{g/L}$ ,仪器进样精密度均小于 2%( $n=6$ )。结论 本方法简便、快速、灵敏度高,适用于人参中三唑酮和三唑醇农药残留量测定与安全监控。

**关键词:** 人参; 三唑酮; 三唑醇 A; 三唑醇 B; GC-MS

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)01-0127-04

## Investigation on residue of triadimefon and its metabolites in ginseng

DAI Bo<sup>1</sup>, JIN Hong-yu<sup>2</sup>, TIAN Jin-gai<sup>2</sup>, SUN Peng<sup>3</sup>, LIN Rui-chao<sup>2</sup>

(1. Air Force General Hospital, Beijing 100036, China; 2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Product, Beijing 100050, China; 3. Department of Pharmacy, Hospital Affiliated to Yanbian University, Yanji 133000, China)

**Abstract: Objective** To set up a clean-up method using gel permeation chromatography (GPC) and ENV+Carb-SPE. The residues of triadimefon and its metabolites, triadimenol A and triadimenol B in ginseng were detected by GC-MS with negative chemical ionization (NCI). **Methods** The sample was extracted with acetone and the extract was cleaned using GPC and ENV+Carb-SPE. Based on GC-MS (NCI) the

<sup>1</sup> 收稿日期: 2008-04-10

基金项目: “十一五”国家科技支撑项目“中药材资源与生产标准规范”(项目号: 2006BA121B07)

pesticides were separated on a DB-5MS column using a temperature program and were detected with a mass selective detector in selective ion monitoring (SIM) mode. The reference solution was prepared by the blank sample extract to overcome the matrix effect, the external reference method was used to detect. **Results** Three pesticides were separated within 10 min. The average spiked recoveries in three levels were 90%–105% with relative standard deviations (RSD) below 6% ( $n=6$ ) in roots and stems. The limits of detection (LOD) of triadimefon and triadimenols were 0.1 and 10  $\mu\text{g/L}$ . The precision was below 2% ( $n=6$ ). **Conclusion** The method is sensitive for the residue analysis of three pesticides and could be used to the triadimefon and triadimenols detection and security control in ginseng.

**Key words:** ginseng; triadimefon; triadimenol A; triadimenol B; GC-MS

中药来源于天然,植物药占绝大部分。以农药残留为代表的外源性有害残留物污染已成为影响中药品质和安全的因素。有害残留物问题同样严重影响中药的国际形象,越来越受到各国政府和公众的关注,重金属、黄曲霉毒素及农药残留检测与限量标准已成为影响中药国际贸易的最重要技术壁垒之一,成为制约中药走向国际化、现代化的“瓶颈”。人参作为我国传统中药材,目前多为种植,检测及控制其农药残留对中药现代化和国际化具有重要意义。

三唑酮又称粉锈宁,是一种高效、低毒、持效期长、内吸性强的三唑类杀菌剂,喷施三唑酮后,它由茎叶吸收后可分布到全植株,一般认为其代谢产物三唑醇起主要的灭菌作用<sup>[1]</sup>。现栽培人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 等药材为防治锈腐病普遍均施三唑酮农药,为控制中药材中农药安全使用,建立中药中三唑酮农药残留量测定方法很有必要。国外对三唑酮残留限量有较严格的规定,如在《欧洲药典》中规定植物药中最大允许残留限量(MRL)为 0.1 mg/kg<sup>[1]</sup>。联合国粮农组织(FAO)规定鸡蛋、牛奶、肉类的 MRL 为 0.05 mg/kg,规定小麦、黑麦、燕麦以及果实类蔬菜和胡椒的 MRL 为 0.1 mg/kg,蕃茄的 MRL 为 0.2 mg/kg,葡萄和梨的 MRL 为 0.5 mg/kg,粗小麦、粗大麦、粗燕麦 MRL 为 2 mg/kg,在国内对三唑酮的控制也日益引起有关部门的重视,在 2005 年发布的《中华人民共和国国家标准》中就对其 MRL 做了相应的规定,三唑酮在稻谷、玉米、梨果类水果中 MRL 为 0.5 mg/kg,在小麦、黄瓜、甜菜中的 MRL 为 0.1 mg/kg,在豌豆中 MRL 为 0.05 mg/kg<sup>[2]</sup>。三唑醇在小麦、玉米、高粱中规定 MRL 为 0.1 mg/kg<sup>[2]</sup>。

关于三唑酮和三唑醇的分析方法有多种报道,党宏斌等<sup>[3]</sup>报道了采用高效液相色谱法对三唑醇进行分析,田映<sup>[4]</sup>采用气相色谱法测定三唑酮并进行方法学研究。三唑酮和三唑醇在食品和水果中的分

析有相关的报道,周昱等<sup>[5]</sup>采用气相色谱和气相色谱-质谱法对水果中的三唑酮进行测定;张伟国等<sup>[6]</sup>采用了气相色谱-质谱法测定玉米中三唑酮、三唑醇 A、三唑醇 B 的残留量。中药材中含水量低,基质复杂,干扰成分较多,农药分析又属于痕量分析范畴,故对样品前处理和分析测定技术有着更高的要求,在中药材中三唑酮的检测方法等未见文献报道。本实验采用 GPC 和 SPE 结合的方法对人参茎叶和根分别进行净化处理,建立了采用 NCI 离子源的气相色谱-质谱测定的方法,该方法灵敏度高,回收率能达到定量分析的要求,可以推广应用于人参药材中农药残留的测定。

## 1 实验材料

1.1 仪器与试剂: GCMS-QP2010 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津),色谱柱为 DB-5MS(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ); GPC-I122 凝胶渗透色谱仪(LCTech, 德国), Bio-Beads S-X3(200~400 目); N-EVAP<sup>TM</sup> 111 氮吹仪(Organomation Associates INC, 美国); ENV-F-Carb-SPE 柱(Supelco, 美国)。

三唑酮(triadimefon)对照品购自国家标准物质中心,三唑醇(triadimenol)对照品购自 Chem Service; 所用丙酮、醋酸乙酯、环己烷、石油醚均为重蒸馏后使用,二氯甲烷为农残级试剂。

1.2 药材来源: 本实验所用的人参采自吉林省临江市六道沟镇人参规范化种植园,经中国药品生物制品检定所标本馆张继老师鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer, 符合研究要求。

## 2 方法与结果

### 2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件: 载气为高纯氮气,柱体积流量 1.40 mL/min; 进样口温度为 250  $^{\circ}\text{C}$ , 150 kPa 高压不分流进样模式,这样时间为 1.0 min,进样量 1  $\mu\text{L}$ 。柱升温程序: 初始温度 60  $^{\circ}\text{C}$ , 以 35  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 200  $^{\circ}\text{C}$ , 以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 250  $^{\circ}\text{C}$ , 以 40  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

升至 270 ℃, 保持 0.5 min。

2.1.2 质谱条件: 负化学电离源(NCI), 离子源温度为 200 ℃, 接口温度为 250 ℃。在 SIM 模式下 3 个组分可达到基线分离, 峰形良好, 各成分保留时间及定性定量离子见表 1。

表 1 3 种农药的保留时间和选择离子

Table 1 Retention times and selected ions of three pesticides

| 编号 | 农药名称  | 特征离子( $m/z$ ) |            |            |
|----|-------|---------------|------------|------------|
|    |       | 保留时间/min      | 定量离子(相对丰度) | 定性离子(相对丰度) |
| 1  | 三唑酮   | 7.540         | 127(1.00)  | 166(1.75)  |
| 2  | 三唑醇 A | 8.136         | 127(1.01)  | 295(1.00)  |
| 3  | 三唑醇 B | 8.238         | 127(1.01)  | 295(1.00)  |

2.2 农药混合对照品的配制: 称取各农药对照品约 5 mg, 用丙酮溶解并分别定容至 50 mL, 制成 100 mg/L 的对照储备液, 4 ℃保存。由于样品基质比较复杂, 测定时基质效应显著, 为保证测定结果的准确, 按 2.3 项样品的前处理方法提取空白根及茎叶样品, 用此空白溶液配置标准工作溶液, 制备随行标准曲线。

2.3 样品的前处理: 取样品粉碎, 精密称取 2 g, 精密加入丙酮 25 mL, 超声处理 10 min, 加入氯化钠 1

表 2 3 种农药的线性范围、回归方程及相关系数

Table 2 Linear ranges, regression equations, and  $r$  value of three pesticides

| 编号 | 农药    | 线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ | 根                                   |        | 茎叶                                  |        |
|----|-------|-------------------------------------------|-------------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
|    |       |                                           | 回归方程                                | $r$    | 回归方程                                | $r$    |
| 1  | 三唑酮   | 0.5~500                                   | $Y = 0.7915X^2 + 695.76X + 9752.2$  | 0.9999 | $Y = 0.3698X^2 + 764.78X - 907.27$  | 0.9999 |
| 2  | 三唑醇 A | 2~2000                                    | $Y = -0.0138X^2 + 72.595X + 295.6$  | 0.9997 | $Y = -0.0088X^2 + 81.938X - 315.48$ | 0.9999 |
| 3  | 三唑醇 B | 3~3000                                    | $Y = -0.0126X^2 + 77.928X + 376.05$ | 0.9999 | $Y = -0.0099X^2 + 105.01X - 606.04$ | 0.9999 |

2.5 检出限: 将对照液逐级稀释, 分别以信噪比为 3 倍作为指标, 考察 3 种农药的检测限, 结果表明采用本法三唑酮、三唑醇 A 和三唑醇 B 的检测限分别为 0.1、10、10  $\mu\text{g/L}$ 。

2.6 精密度试验: 取三唑酮、三唑醇 A 和三唑醇 B 分别为 0.1、1 和 1  $\mu\text{g/L}$  的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, RSD 分别为 1.34%、1.82% 和 1.19%。

2.7 重现性试验: 取根和茎叶样品各 6 份, 每份 2 g, 分别按 2.3 样品的前处理方法项下方法提取、净化, GC-MS 分析, 测得三唑酮、三唑醇 A 和三唑醇 B 的量, 计算 RSD 分别为 1.62%、1.45% 和 2.18%, 均小于 3%。

2.8 稳定性试验: 取三唑酮、三唑醇 A 和三唑醇 B 分别为 0.1、1 和 1  $\mu\text{g/L}$  的混合对照品溶液, 分别在 1、3、5、10、12、24 h 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算 RSD 分别为 1.79%、2.76% 和 2.38%。

2.9 回收率试验: 采用加样回收法, 取根和茎叶空白样品各 2 g, 按低、中、高 3 个水平添加对照品, 分别为三唑酮 0.05、0.5、3  $\mu\text{g}$ , 三唑醇 A 0.2、2、12

$\mu\text{g}$ , 再精密加入二氯甲烷 15 mL, 超声处理 10 min, 离心, 将上清液迅速移入装有 1 g 无水硫酸钠的具塞锥形瓶中, 放置 30 min。精密量取 20 mL 置蒸发皿中, 于 60 ℃恒温水浴上挥至近干。用环己烷-醋酸乙酯(1:1)溶解并定容至 5 mL, 移入凝胶渗透色谱(GPC)进样瓶中。进行 GPC 净化洗脱, 进样量 1 mL, 以环己烷-醋酸乙酯(1:1)为流动相, 体积流量 1 mL/min, 收集 900~1600 s 的洗脱液, 50 ℃以下氮吹浓缩至近干, 丙酮定容至 1 mL。茎叶样品因含大量叶绿素, 所以 GPC 净化后再通过活性炭固相萃取柱进行净化, 以增强其净化的效力, 用 15 mL 石油醚-醋酸乙酯(4:1)洗脱, 收集洗脱液, 50 ℃以下氮吹浓缩至近干, 丙酮定容至 1 mL。

2.4 线性关系考察: 将质量浓度为 1 mg/L 的三唑酮、10 mg/L 三唑醇农药混合对照品分别用根、茎叶空白样品的提取液逐级稀释成 0.5~3000  $\mu\text{g/L}$  系列的 10 个浓度, 采用上述色谱条件进行气质分析, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明在一定范围内, 标准曲线线性关系良好, 相关系数均  $\geq 0.9997$ , 见表 2。

$\mu\text{g}$ , 三唑醇 B 0.3、3.18  $\mu\text{g}$ , 每个水平平行 2 份, 分别按“2.3”样品的前处理方法提取、净化, GC-MS 分析, 计算回收率及 RSD( $n=6$ ), 均符合要求, 见表 3。

2.10 样品的测定: 为保证建立的方法准确可靠, 对人参在其生长期进行施药, 采集施药后 7 d 的人参, 将茎叶与根分开, 分别粉碎并包装好, 按照上述的样品前处理方法和气相色谱-质谱分析条件下进行检测, 计算质量分数, 人参根中三唑酮、三唑醇 A 及三唑醇 B 的量分别为 43.61、11.21、8.39  $\mu\text{g/kg}$ ; 茎叶中三唑酮、三唑醇 A 及三唑醇 B 的量分别为 31.143、52.54、537.27、167.44  $\mu\text{g/kg}$ 。人参根及茎叶的总离子流色谱图见图 1。

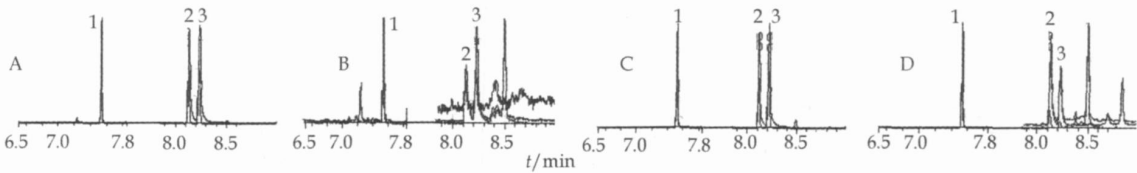
### 3 讨论

3.1 离子源的选择: 对 EI 源与 NCI 源进行比较, 两种离子源均能达到检测目的, 考虑到中药基质比较复杂, 杂质干扰比较多, 再将人参供试品溶液加入对照品进行比较, 结果表明, NCI 作为检测离子源谱图比较简单, 干扰较少, 故选择 NCI 作为检测离子源。

表 3 3 种农药的回收率及相对标准偏差

Table 3 Recoveries and RSD of three pesticides

| 编号 | 农药    | 根      |       |       |        | 茎 叶    |        |        |        | 平均回收率/ % |
|----|-------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
|    |       | 回收率/ % |       |       | RSD/ % | 回收率/ % |        |        | RSD/ % |          |
|    |       | 低      | 中     | 高     |        | 低      | 中      | 高      |        |          |
| 1  | 三唑酮   | 91.28  | 98.50 | 90.22 | 4.41   | 102.52 | 96.30  | 102.36 | 6.82   | 96.86    |
| 2  | 三唑醇 A | 99.05  | 92.42 | 99.44 | 4.53   | 94.38  | 87.28  | 90.10  | 4.35   | 93.78    |
| 3  | 三唑醇 B | 88.12  | 93.04 | 95.95 | 4.37   | 103.51 | 102.76 | 94.61  | 5.46   | 96.33    |



1-三唑酮 2-三唑醇 A 3-三唑醇 B A-根对照品 B-根样品 G-茎叶对照品 D-茎叶样品  
1-triadimefon 2-triadimenol A 3-triadimenol B A-reference substance of roots B-sample of roots  
G-reference substance of stems and leaves D-sample of stems and leaves

图 1 三唑酮、三唑醇 A 及三唑醇 B 的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of triadimefon, triadimenol A, and triadimenol B by GC/MS

3.2 GPC 净化条件: 人参所含成分复杂, 净化不好, 极易污染色谱柱及离子源, 严重影响分离效果及检测灵敏度。三唑醇为强极性的农药, 用传统的柱色谱方法, 净化效果差、回收率低。本实验采用了新的净化技术凝胶渗透色谱法(GPC)用以去除样品中的大分子干扰。GPC 净化步骤的切割时间要考虑渗透排除基体与混合对照品的分离, 分别收集样品与混合对照品从 900~ 1 740 s 的 GPC 流动相, 每份 60 s, 分别用于 GG-MS 的检测。观察柱净化的过程发现在 1 500 s 之前可以完全去除叶绿素杂质, 而样品收集液在 960 s 时的 GG-MS 测定即有响应。为了保证回收率, 故提前切割时间为 900 s, 在 GPC 之后再选用 SPE 再净化, 能满足分析物回收率要求<sup>[7]</sup>。

3.3 SPE 净化条件: 样品中的色素会对质谱检测器产生污染。本实验采用活性炭-SPE 小柱作为净化柱, 15 mL 石油醚-醋酸乙酯(4: 1)为淋洗液, 大部分色素保持在柱中, 目标化合物被淋洗下来。实验发现, 淋洗速度对净化效果有直接的影响, 淋洗速度过快, 较多的色素会随着农药同时淋洗下来, 速度保持在每秒 1 滴时净化效果较为理想。

3.4 空白样品的制备: 为了消除基质影响, 本实验用空白样品基质溶液配制标液。空白样品来源于空白地块中采集的新鲜人参, 按上述方法先进行定量, 确定没有待测农药后, 将作为空白样品进行试验。对不同产地、不同年份的人参空白样品进行比较, 结果不影响测定结果。

3.5 GG-MS 中质谱常规扫描模式(SCAN)与选择

离子检测模式(SIM)结合: 农药检测为痕量分析过程, MS 检测中的 SCAN 扫描模式在多数情况下由于灵敏度低, 难以满足检测要求, 因此高灵敏度的 SIM 方式更为常用。由于中药中基质成分复杂, 除用于定量的特征离子外, 必须选择 1~ 3 个特征性离子作为辅助性定性离子, 以保证没有假阳性结果的产生。

GG-MS 在农药残留的定性定量分析方面具有较强的优越性, 尤其是在样品中干扰杂质较多的情况下, 利用质谱检测可准确鉴定化合物结构的特点, 真正实现了中药材中多种类农药的同时测定, 效率高。

3.6 安全使用情况: 人参喷施三唑酮后, 根部锈斑较空白组明显减少, 而以正常剂量喷施, 7 d 后采收时, 根中三唑酮及三唑醇已经降解到很低的水平, 达到我国及欧洲各国的限量标准; 在叶中还残留较多的农药, 是因为采集时未进行任何清洗, 附着在茎叶表面的农药也进行最终的测定。

参考文献:

[1] 欧洲药典[S]. 2004  
[2] 中华人民共和国国家标准(GB 2763-2005) [S]. 2005  
[3] 党宏斌, 范志金, 艾应伟. 三唑醇的高效液相色谱分析[J]. 现代农药, 2003, 2(2): 21-22  
[4] 田 映. 气相色谱法测定粉锈宁[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 699  
[5] 周 昱, 林立毅. 水果中三唑酮残留量的气相色谱和气相色谱-质谱分析[J]. 分析化学, 1997, 25(25): 510-540  
[6] 张伟国, 高金山, 陈姗姗, 等. 凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱测定玉米中 3 种农药的残留[J]. 分析化学, 2005, 33(10): 1442  
[7] 李 樱, 储晓刚, 仲维科. 凝胶渗透色谱和固相萃取净化-气相色谱分离组合法测定糙米中的残留农药[J]. 分析化学, 2004, 32(10): 1325-1328