

LC-MS/MS法测定桑叶药材中100种农药残留量

黄莉莉*,李丽莉,罗 轶,陆敏仪,黄清泉(广西壮族自治区食品药品检验所,南宁 530021)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)15-2122-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.15.36

摘要 目的:建立测定桑叶药材中100种农药残留量的方法。方法:采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。色谱条件:色谱柱为ZORBAX Eclipse plus C₁₈,流动相为乙腈(含5%水、0.1%甲酸、5 mmol/L 甲酸铵)-水(含0.1%甲酸、5 mmol/L 甲酸铵)(梯度洗脱),流速为0.4 ml/min,柱温:40 ℃;进样量:5 μl;质谱条件:电离源为电喷雾离子源,正离子模式,扫描方式为动态MRM,扫描时间窗为2 min;雾化气为氮气,雾化气压为40 psi,干燥气流速为5 L/min,毛细管电压为4 000 V,离子喷雾电压为500 V。结果:100种农药检测质量浓度线性范围均为2.4~150 ng/ml($r>0.990$),加样回收率范围均为69.3%~128.2%,各农药的方法检测限范围为0.003~16 μg/kg。结论:该方法操作简便、快速、灵敏度高,可用于桑叶药材中多种农药残留量的测定。

关键词 农药;桑叶;液相色谱-串联质谱法

Determination of 100 Pesticide Residues in *Morus alba* by LC-MS/MS

HUANG Lili, LI Lili, LUO Yi, LU Minyi, HUANG Qingquan(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nan-ning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of 100 pesticide residues in *Morus alba*. METHODS: LC-MS/MS was conducted on the column of ZORBAX Eclipse plus C₁₈ with mobile phase of acetonitrile (containing 5% water, 0.1% formic acid, 5 mmol/L ammonium formate) - water (containing 0.1% formic acid, 5 mmol/L ammonium formate) (gradient elution) at a flow rate of 0.4 ml/min, column temperature was 40 ℃, injection volume was 5 μl; MS conditions: ionization source was electrospray ionization with positive ion mode, scanning mode was dynamic MRM, scanning time window was 2 min; atomizing gas was nitrogen, atomizing gas pressure was 40 psi, drying gas flow rate was 5 L/min, capillary voltage was 4 000 V, and ion spray voltage was 500 V. RESULTS: The linear range of 100 pesticide residues was 2.4-150 ng/ml ($r>0.990$), recovery was 69.3%-128.2%, and the determination limit was 0.003-16 μg/kg. CONCLUSIONS: The method is simple, stable and reproducible, and can be used for the determination of pesticide residues in *M. alba*.

KEYWORDS Pesticide; *Morus alba*; LC-MS/MS

当今在世界范围内,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术已成为多种残留农药检测的主导检测技术,并实现了一次进样分析上百种农药。目前,LC-MS/MS在食品、环境等领域的农药残留分析中已得到广泛应用,并有相关综述报道^[1],然而对中药材上百种农药残留的分析报道却相对较少^[2]。

桑叶^[3],味苦、甘,性寒;归肺、肝经。具有疏散风热、清肺、明目的作用。主治风热感冒、风温初起、发热头痛、汗出恶风、咳嗽胸痛,或肺燥干咳而无痰,咽干口渴;或风热及肝阳上扰、目赤肿痛等,被人们广泛应用并与其他中药配伍制成制剂。本研究采用LC-MS/MS技术,对桑叶药材中包括有机磷类、有机氮类、氨基甲酸酯类等化学结构在内的100种常用进行检测,旨在建立快速、有效的检测方法,以便对中药材质量进行监控^[4],保障公众用药安全。

1 材料

1.1 仪器

6460 Triple Quad型LC-MS/MS仪,包括均质器、旋转蒸发仪、氮吹仪(美国Agilent公司);石墨化碳/氨基固相萃取串联柱(上海振翔科技仪器有限公司)。

1.2 试剂

试验所用农药标准物均由德国Dr. Ehrenstorfer GmbH提

供;乙腈、甲醇、甲苯、环己烷、乙酸乙酯均为色谱纯,甲酸为优级纯,甲酸铵、无水硫酸钠为分析纯,水为一级水。

1.3 药材

桑叶药材(购于广西玉林药市)经广西壮族自治区食品药品检验所中药民族药室黄清泉主管中药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 试验条件

分A、B两组采集,两组的色谱条件相同,质谱条件不同。

2.1.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相:水(含0.1%甲酸,5 mmol/L 甲酸铵,A)-乙腈(含5%水,0.1%甲酸,5 mmol/L 甲酸铵,B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.4 ml/min;柱温:40 ℃;进样量:5 μl。

表1 梯度洗脱程序
Tab 1 gradient elution

时间,min	A,%	B,%
0~0.3	90%	10
0.3~4.0	90→60	10→40
4.0~13.0	60→40	40→60
13.0~15.0	40→5	60→95
15.0~25.0	5	95

2.1.2 质谱条件 (1)A组条件。电离源:电喷雾离子源;电离源极性:正离子模式;扫描方式:动态质谱多反应监测(MRM);

*主管中药师,硕士。研究方向:中药成分分析及中药材中多农药残留分析。E-mail: lilith28@163.com

扫描时间窗:2 min;雾化气:氮气;雾化气压力:40 psi;干燥气温度:350 ℃;干燥气流速:5 L/min;鞘流气温度:390 ℃;鞘流气流速:10 L/min;毛细管电压:4 000 V;离子喷雾电压:500 V。(2)B组条件。除鞘流气温度为100 ℃,鞘流气流速为6 L/min,干燥气温度为300 ℃外,其余同A组条件。100种农药的保留时间、质谱优化条件、分组见表2;总离子流见图1。

表2 100种农药的保留时间、质谱优化条件、分组

Tab 2 Retention time, MS optimization conditions and grouping of 100 pesticides

待测农药	英文名称	保留时间	母离子	子离子 定量/定性	碎裂电压, V	碰撞能量, V 定量/定性	分组
益棉磷	Azinphos-ethyl	12.4	346.1	233.0/132.0	83	6/14	A
毒虫畏	Chlorfenvinphos	13.0	359.0	155.1/127.0	74	5/13	A
乙硫磷	Etrimphos	14.0	293.1	125.0/265.1	83	25/13	A
氧敌磷	Fenchlorphos-oxon	10.0	304.9	109.0/258.0	88	25/29	A
丰奈磷	Fensulfothion	7.6	309.0	235.0/157.0	83	21/21	A
倍硫磷亚砷	Fenthion-sulfoxide	6.4	295.0	280.0/109.0	88	13/33	A
马拉氧磷	Malaaxon	6.5	315.1	99.0/127.0	69	21/5	A
灭蚜磷	Mecarbam	13.0	330.1	227.0/97.0	64	1/37	A
对氧磷	Paraoxon-ethyl	7.8	276.1	220.1/94.1	64	9/37	A
氧硫磷	Paraoxon-methyl	5.8	248.0	202.1/90.1	88	17/25	A
啉啉磷	Pirimiphos-ethyl	16.6	334.1	198.2/182.2	88	21/21	A
丙溴磷	Profenofos	15.6	373.0	345.0/303.0	120	10/15	A
啉硫磷	Quinalphos	13.3	299.1	147.1/163.1	79	21/21	A
氧化乐果	Omethoate	1.4	214.0	125.0/183.0	59	17/5	A
久效磷	Monocrotophos	3.0	224.1	127.1/193.1	49	9/1	A
甲胺磷	Methamidophos	0.7	142.0	94.1/125.0	64	9/9	A
乐果	Dimethoate	4.5	230.0	199.0/171.0	59	1/9	A
涕灭威砒	Aldicarb-sulfone	2.6	223.1	76.1/148.2	64	1/1	A
涕灭威亚砒	Aldicarb-sulfoxide	1.6	207.1	132.1/89.1	54	1/9	A
甲萘威	Carbaryl	7.0	202.1	145.1/117.1	54	1/21	A
异柳磷	Isofenphos	15.8	346.1	245.0/217.0	69	5/21	A
灭多威	Methomyl	3.0	163.1	106.0/88.1	49	5/5	A
辛硫磷	Phoxim	15.3	299.1	129.1/77.1	60	2/30	A
胺丙畏	Propetamphos	12.4	282.1	138.1/156.1	64	15/5	A
三唑酮	Triadimefon	10.5	294.1	197.1/225.1	69	9/9	A
3-羟基克百威	Carbofuran-3-hydroxy	4.2	238.1	181.1/163.2	59	5/9	A
克百威	Carbofuran	6.6	222.1	165.1/123.1	64	5/17	A
甲草胺	Atrachlor	12.0	270.1	238.1/162.2	74	12/17	A
保棉磷	Azinphos-methyl	9.4	318.0	125.0/261.1	69	13/1	A
杀螟硫磷	Fenitrothion	15.3	278.0	125.1/246.0	186	25/17	A
甲基啉啉磷	Pirimiphos-methyl	15.4	306.1	108.1/164.2	88	33/21	A
杀扑磷	Methidathion	9.2	303.0	145.0/85.1	79	1/17	A
二嗪磷	Diazinon	14.5	305.1	169.1/153.1	78	21/17	A
马拉硫磷	Malathion	11.7	331.1	127.0/99.0	64	5/21	A
三唑磷	Triazophos	11.9	314.1	162.1/119.0	79	13/37	A
啉虫脒	Acetamiprid	4.7	223.1	126.0/90.0	74	17/37	A
苯醚甲环唑	Difenoconazole	13.7	406.1	251.0/337.0	93	25/13	A
甲霜灵	Metalaxyl	7.5	280.2	220.1/192.1	74	9/13	A
甲硫威	Methiocarb	9.2	226.1	121.0/169.1	64	13/5	A
速灭威	Metolcarb	5.86	166.1	109.1/94.0	54	5/33	A
杀线威	Oxamyl	2.7	220.1	72.2/90.0	93	13/1	A
抗蚜威	Pirimicarb	5.0	239.1	72.1/182.1	74	21/9	A
猛杀威	Promecarb	9.8	208.1	109.1/151.1	54	13/1	A
残杀威	Propoxur	6.5	210.1	111.0/168.1	59	9/1	A
三唑醇	Triadimenol	9.0	296.1	70.0/227.0	59	9/1	A
蝇毒磷	Coumaphos	15.0	363.0	227.0/307.0	137	21/13	A
苯线磷	Fenamiphos	10.1	304.1	217.1/202.0	73	21/37	A
氯唑磷	Isazofos	13.0	314.0	162.1/120.0	79	13/29	A
磷胺	Phosphamidon	5.3	300.1	127.0/174.1	83	17/9	A

续表2

Continued tab 2

待测农药	英文名称	保留时间	母离子	子离子 定量/定性	碎裂电压, V	碰撞能量, V 定量/定性	分组
治螟磷	Sulfotep	15.3	323.0	171.0/143.0	74	9/17	A
氯苯嘧啶醇	Fenarimol	9.8	331.0	268.1/81.0	120	25/30	A
吡虫啉	Imidacloprid	4.3	256.1	209.1/175.1	69	9/13	A
腈菌唑	Myclobutanil	10.2	289.0	70.1/125.0	84	17/37	A
敌草胺	Napropamide	11.1	272.2	129.1/171.1	74	13/13	A
吡蚜酮	Pymetrozine	1.0	218.1	105.0/78.0	74	17/49	A
戊唑醇	Tebuconazole	11.0	308.2	70.0/125.0	88	21/41	A
噁虫嗪	Thiamethoxam	3.5	292.0	211.1/181.0	64	5/21	A
氟菌唑	Triflumizole	14.0	346.1	278.1/73.0	49	5/13	A
硫环磷	Phosfolan	5.0	256.0	139.9/228.0	69	21/5	A
灭克磷	Ethoprophos	10.6	243.1	173.0/215.0	59	9/5	A
硫线磷	Cadusafos	14.3	271.1	158.9/130.9	59	9/21	A
异稻瘟净	Iprobenfos	11.6	289.1	91.0/205.0	54	17/5	A
杀虫脒	Chlordimeform	3.6	197.1	117.0/125.0	74	29/33	A
杀虫畏	Tetrachlorvinphos	11.9	364.9	126.9/238.9	79	9/13	A
除虫脲	Diflubenzuron	11.4	311.0	157.9/141.0	79	13/33	A
噻唑酮	Buprofezin	16.3	306.2	201.1/116.0	64	5/13	A
霜脲氰	Cymoxanil	5.0	199.1	128.1/110.9	74	1/13	A
茚虫威	Indoxacarb	15.9	528.1	249.0/149.9	78	13/21	A
啉菌酯	Azoxystrobin	10.4	404.1	372.1/344.1	69	9/21	A
稻瘟灵	Isoprothiolane	11.6	291.1	231.0/188.9	59	5/17	A
丙环唑	Propiconazole	12.2	342.1	158.9/69.0	78	29/17	A
特唑唑	Dimiconazole	12.1	326.1	70.0/159.0	112	25/33	A
杀铃脲	Triflumuron	13.9	359.0	156.0/138.9	64	13/37	A
百治磷	Dicrotophos	3.5	238.1	112.1/193.0	59	1/5	A
速灭磷	Mevinphos	4.58	225.0	127.0/193.0	54	9/1	A
灭菌磷	Dialimfos	8.0	300.1	148.0/243.9	69	17/9	A
定菌磷	Pyrazophos	14.6	374.1	222.0/194.0	84	17/33	A
伐灭磷	Famphur	9.3	326.0	281.0/217.0	69	9/17	A
西玛津	Simazin	5.8	202.0	132.0/124.0	69	13/13	A
阿特拉津	Atrazine	7.2	216.1	174.0/103.9	74	13/25	A
仲丁威	Fenobucarb	9.2	208.1	152.0/95.0	54	9/1	A
异丙威	Isoprocarb	7.7	194.1	95.0/137.1	80	20/5	A
虫酰肼	Tebufenozide	13.2	353.2	133.0/105.0	74	13/45	A
异丙甲草胺	Metolachlor	11.9	284.1	252.1/176.1	69	9/25	A
丁草胺	Butachlor	16.5	312.2	238.1/162.1	69	5/21	A
恶唑禾草灵	Fenoxaprop-ethyl	15.8	362.1	288.0/121.0	73	13/29	A
唑禾灵	Quizalofop-ethyl	15.7	373.1	299.0/91.0	98	13/29	A
乙草胺	Acetochlor	12.0	270.1	224.1/148.0	69	5/13	A
倍硫磷砒	Fenthion-sulfone	8.1	311.0	125.0/279.1	122	17/17	B
毒死蜱	Chlorpyrifos	16.6	349.9	97.0/198.0	69	37/13	B
甲基毒死蜱	Chlorpyrifos-methyl	15.2	321.9	125.0/290.0	80	15/15	B
地虫硫磷	Fonofos	14.9	247.0	109.1/137.1	79	17/5	B
伏杀硫磷	Phosalone	15.3	368.0	182.1/322.1	74	13/5	B
对硫磷	Parathion-ethyl	14.0	292.0	236.1/94.0	74	10/45	B
甲拌磷	Phorate	15.2	261.0	74.9/198.9	74	1/5	B
咯菌腈	Fludioxonil	9.7	266.0	229.0/185.0	64	9/25	B
苯硫磷	EPN	15.6	324.1	296.0/156.9	88	9/25	B
稻丰散	Phenthoate	14.4	321.0	124.9/135.0	59	17/17	B
二溴磷	Naled	8.1	378.8	127.0/109.0	64	5/41	B

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取各农药标准物约10 mg,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容(部分难溶解的样品可溶解至100 ml量瓶中),作为单一对照品贮备液。分别精密量取上述单一对照品贮备液适量,用乙腈制成各待测农药质量浓度均为1 µg/ml的混合对照品溶液。

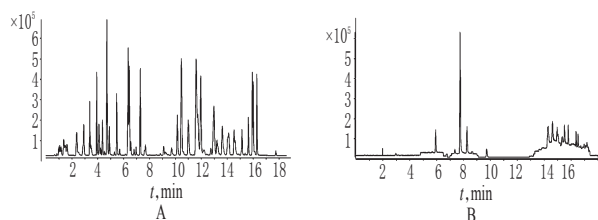


图1 混合对照品的总离子流图

A.A组;B.B组

Fig 1 Total ion chromatogram of mixed reference substance

A. group A; B. group B

2.2.2 供试品溶液的制备 (1)提取。精密称取样品粉末5 g,置于100 ml锥形瓶中,精密加入乙腈50 ml,以离心半径为6 cm、15 000 r/min离心3 min,提取液通过铺有少量无水硫酸钠的漏斗滤过,滤液中加适量无水硫酸钠,放置30 min。(2)净化。精密量取上述提取液20 ml,减压浓缩至近干,浓缩液置于10 ml量瓶中,加乙腈-甲苯(3:1, V/V)溶解并定容。转移至石墨化碳/氨基固相萃取串联柱[柱上加无水硫酸钠约1 cm高,用乙腈-甲苯(3:1, V/V)10 ml预淋洗],容器用乙腈-甲苯(3:1, V/V)洗涤3次,每次1 ml,洗液置同一石墨化碳/氨基固相萃取串联柱上,再用乙腈-甲苯(3:1, V/V)25 ml洗脱,40 °C下减压浓缩至约1 ml,置氮吹仪上吹至近干,加入甲醇600 μl使溶解,再加入水400 μl,混匀,常规离心,即得。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,加60%甲醇制成质量浓度分别为2.4、5、10、20、40、50、80、100、120、150 ng/ml的系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各5 μl,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。以待测农药质量浓度(x, ng/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果表明,待测农药检测质量浓度线性范围为2.4~150 ng/ml($r=0.9999$)。

2.4 检测限考察

将“2.2.1”项下混合对照品溶液不断稀释后测定,通过仪器的最低响应值获得方法的最低检测限($3 < \text{信噪比} < 10$),结果100种农药的方法检测限为0.003~16 μg/kg,该结果均满足《欧洲药典》对各待测农药的最低检测限要求,详见表3。

表3 检测限与加样回收率试验结果($n=3$)

待测农药	添加水平						检测限, μg/kg
	10 μg/kg		50 μg/kg		100 μg/kg		
	加样回收率, %	RSD, %	加样回收率, %	RSD, %	加样回收率, %	RSD, %	
益棉磷	107.0	1.11	85.4	2.39	98.5	2.42	0.2
毒虫畏	116.3	1.79	94.1	6.31	98.9	3.42	0.2
乙噻硫磷	102.6	2.51	83.2	5.25	93.0	0.94	0.02
氧皮蝇磷	107.8	3.75	91.0	0.70	93.6	4.74	0.6
丰索磷	111.5	3.45	92.4	7.53	107.2	1.70	0.02
倍硫磷亚砷	120.6	0.40	119.5	7.34	117.2	0.85	0.2
马拉氧磷	102.0	2.96	89.1	8.02	110.0	0.29	0.005
灭蚜磷	118.0	2.92	93.8	12.85	114.7	1.37	0.02
对氧磷	89.1	2.87	84.3	5.85	99.9	0.12	0.05
氧硫磷	98.9	5.33	86.5	2.54	96.9	4.92	0.5
噻啉磷	98.8	0	98.8	0.00	76.6	3.19	0.003
丙溴磷	112.2	1.13	86.4	9.42	78.7	0.85	0.2
啶硫磷	117.3	2.91	92.4	9.70	92.7	2.97	0.1
氧化乐果	105.6	3.32	90.1	6.26	120.1	15.69	0.006
久效磷	93.2	3.34	91.2	6.54	110.1	1.09	0.01
甲胺磷	94.5	1.13	74.1	9.04	113.7	13.51	0.02

续表3
Continued tab 3

待测农药	添加水平						检测限, μg/kg
	10 μg/kg		50 μg/kg		100 μg/kg		
	加样回收率, %	RSD, %	加样回收率, %	RSD, %	加样回收率, %	RSD, %	
乐果	89.3	4.26	85.2	4.99	103.6	1.55	0.01
涕灭威砷	100.7	3.03	85.4	3.07	108.7	1.65	0.1
涕灭威亚砷	118.7	2.12	104.4	4.51	118.0	2.41	0.02
甲萘威	106.3	2.27	87.0	2.84	98.4	1.62	0.1
异柳磷	103.2	2.23	94.6	0.49	86.1	4.55	0.2
灭多威	103.4	4.04	89.9	3.30	132.1	7.83	0.05
辛硫磷	90.8	9.33	82.8	3.79	72.8	3.03	0.2
胺丙畏	115.3	3.23	99.1	6.95	99.0	0.88	0.2
三唑酮	118.8	1.65	101.0	8.04	104.5	3.42	0.02
3-羟基克百威	74.7	2.96	73.9	7.18	104.5	3.04	0.02
克百威	86.8	4.98	87.1	6.64	107.2	6.06	0.005
甲草胺	95.3	2.46	88.9	4.29	97.7	0.57	0.2
保棉磷	91.5	5.48	87.2	9.80	104.0	1.10	0.2
杀螟磷	108.1	2.04	95.3	2.79	116.1	31.71	1
甲基嘧啶磷	120.2	1.88	102.4	2.81	84.5	1.69	0.01
杀扑磷	116.4	1.04	97.0	4.96	92.8	6.33	0.1
二嗪磷	104.4	2.52	80.4	8.59	95.4	0.89	0.005
马拉硫磷	121.4	1.17	96.8	3.82	100.8	1.22	0.06
三唑磷	108.2	2.52	87.0	4.91	100.0	1.29	0.01
啶虫脒	99.7	3.32	84.9	2.68	115.8	0.35	0.05
苯醚甲环唑	115.5	2.35	94.6	5.22	77.6	1.66	0.06
甲霜灵	110.0	3.17	94.8	3.65	108.2	2.18	0.003
甲硫威	106.7	3.40	83.2	1.96	94.7	1.25	0.1
速灭威	102.5	2.27	86.7	2.11	106.0	2.13	0.5
杀线威	99.5	14.75	97.4	10.13	131.5	5.73	0.5
抗蚜威	87.9	1.93	81.0	3.08	97.9	0.03	0.003
猛杀威	108.6	1.34	84.0	0.21	94.2	9.17	0.02
残杀威	106.6	0.86	93.6	3.59	109.9	0.17	0.02
三唑醇	111.7	2.91	92.0	5.61	100.7	2.04	0.6
蝇毒磷	107.7	2.78	85.4	3.10	85.5	1.33	0.5
苯线磷	92.3	4.85	70.4	1.91	79.1	6.25	0.006
氯唑磷	111.2	2.21	98.5	3.70	98.6	4.28	0.02
磷胺	109.0	2.95	89.6	3.07	105.4	1.62	0.005
治螟磷	98.9	2.10	85.7	1.12	91.4	0.14	0.02
氯苯嘧啶醇	105.3	5.83	86.1	4.82	97.0	2.07	0.2
吡虫啉	109.7	1.90	90.7	2.81	114.4	2.02	0.1
腈菌唑	100.9	1.09	84.5	0.87	107.0	5.57	0.02
敌草胺	107.0	2.06	91.3	5.69	97.5	0.42	0.01
吡蚜酮	83.0	4.36	68.6	5.93	93.9	22.34	0.02
戊唑醇	115.1	2.75	91.8	5.06	98.6	0.45	0.6
噻虫嗪	105.0	2.95	90.6	7.14	116.4	2.46	0.02
氟菌唑	99.1	3.23	66.0	4.66	70.1	7.17	0.01
硫环磷	107.7	2.38	90.3	4.18	114.3	3.85	0.01
灭克磷	104.9	1.85	90.8	5.72	103.6	3.76	0.02
硫线磷	100.8	3.86	85.3	4.80	97.4	1.81	0.01
异稻瘟净	110.3	3.54	94.6	6.68	104.4	1.73	0.01
杀虫脒	115.1	1.36	87.8	7.60	99.5	11.50	0.02
杀虫畏	118.0	3.33	95.9	2.38	96.5	0.37	0.2
除虫脒	115.5	3.17	85.5	0.15	93.4	4.96	0.5
噻啉酮	104.1	1.67	69.7	4.31	76.5	4.68	0.01
霜脲氰	128.2	2.80	99.4	6.57	127.2	11.17	1
茚虫威	107.2	5.27	82.2	5.36	89.6	0.36	0.2
啶菌酯	112.1	1.49	95.0	3.15	109.9	2.66	0.005
稻瘟灵	116.0	0.95	97.1	3.09	89.6	7.10	0.005
丙环唑	117.3	0.56	90.7	3.82	95.5	0.11	0.1
特谱唑	113.3	2.10	88.2	4.83	95.2	0.35	1

续表3
Continued tab 3

待测农药	添加水平						检测限, μg/kg
	10 μg/kg		50 μg/kg		100 μg/kg		
	加样回收率, %	RSD, %	加样回收率, %	RSD, %	加样回收率, %	RSD, %	
杀铃脲	115.0	4.47	89.0	3.73	89.6	0.28	0.5
百治磷	93.8	5.18	82.2	5.16	113.5	13.61	0.01
速灭磷	85.3	6.01	70.9	7.20	104.9	5.50	0.01
灭菌磷	69.3	3.60	75.6	4.74	74.4	3.85	0.5
定菌磷	112.3	1.90	118.8	52.52	91.3	0.26	0.02
伐灭磷	123.0	3.94	99.6	6.57	97.4	3.72	0.2
西玛津	106.6	1.30	88.6	4.17	103.1	0.48	0.05
阿特拉津	102.9	1.06	82.7	2.84	103.8	2.99	0.02
仲丁威	110.3	3.06	91.2	5.24	104.0	3.12	0.05
异丙威	105.5	2.67	88.3	4.00	104.0	0.78	0.1
虫酰肼	104.3	3.38	87.1	2.01	101.4	0.53	0.2
异丙甲草胺	96.8	1.15	81.1	4.11	96.9	0.41	0.005
丁草胺	104.3	2.06	82.7	5.09	81.6	3.05	0.5
恶唑禾草灵	98.0	1.82	66.3	7.76	74.9	1.09	0.1
唑禾灵	98.3	1.07	66.3	4.29	78.7	0.79	0.1
乙草胺	108.4	2.58	89.8	4.63	98.4	1.29	0.2
倍硫磷	96.9	3.55	69.1	2.72	51.6	18.90	0.6
倍硫磷砒	118.9	3.41	85.0	1.84	136.8	1.36	0.2
毒死蜱	93.5	1.24	69.3	0.48	75.2	2.66	0.5
甲基毒死蜱	92.1	2.89	81.0	4.26	59.3	2.49	2
地虫硫磷	102.2	19.57	71.9	4.55	91.2	4.46	2
伏杀硫磷	116.6	4.23	92.1	7.85	84.5	0.56	2
对硫磷	88.3	8.23	85.6	5.73	77.9	16.77	2
甲拌磷	89.5	7.81	61.7	15.87	79.9	5.33	1
咯菌腈	106.1	2.72	94.7	6.29	84.0	2.97	3
苯硫磷	72.7	5.40	65.6	18.70	70.9	22.15	0.5
稻丰散	113.8	1.36	88.7	3.75	102.1	1.80	1
二溴磷	90.7	2.11	110.3	16.95	75.2	22.68	16

2.5 加样回收率试验

取样品适量,共9份,分别加入低、中、高质量浓度对照品(10、50、100 μg/kg),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,计算样品含量并计算加样回收率,结果见表3。

3 讨论

3.1 前处理条件的选择

样品的前处理主要包括取样、提取、净化、富集浓缩等过程,前处理技术是中药农药残留分析中的难点之一,直接决定分析的成败。

3.1.1 溶剂提取 目前多残留分析常用的提取溶剂有乙腈,丙酮等极性溶剂,乙腈^[5]的选择性相对较好,它可以显著降低对非极性脂肪、蛋白质、盐、糖等杂质的溶解性,对于酸碱敏感的农药也易于通过调节pH等方法改善回收率,而丙酮在提取农药时会大量提取植物组织中的油脂和色素,使净化过程变得复杂^[6],因此本研究采取用乙腈作为提取溶剂。

3.1.2 净化及富集浓缩 目前GPC、SPE柱、PSA、QuEChERS法^[7-8]等被广泛用于复杂基质样品的净化,但由于桑叶成分较复杂,含有色素、甾体、三萜类化合物、黄酮及其苷类、挥发油、氨基酸及小肽类、生物碱及有机酸类等^[9],因此本研究对净化方法进行了考察:一是固相分散法,参考QuEChERS法,提取同“2.2.1”项下提取方法,净化加入PSA0.30 g、C₁₈ 0.40 g、石墨化碳0.20 g,振摇2 min,离心,精密量取上清液5 ml,减压浓缩至

近1 ml,氮吹至近干,精密加入甲醇600 μl使溶解,再精密加水400 μl,混匀,冷冻离心,取上清液过0.2 μm滤膜,即得。二是固相萃取法^[10],同上述制备方法。结果表明,固相萃取法效果良好,更适用于桑叶药材中多种农药残留分析,90个化合物加样回收率为70%~120%,且RSD<10%,有10个化合物受到基质轻微干扰,加样回收率接近限值,而采用固相分散法则有25个化合物受到基质干扰,仅有75个化合物回收达到以上范围,且有24个化合物的相对偏差>10%。因此,本研究决定采取固相萃取法作为净化方法。

3.2 质谱条件的优化

本研究采用Agilent自动优化软件对化合物的碰撞能量及碎裂电压进行自动优化,在试验过程中发现少数对照品对热不稳定,使用较高的离子源温度会将其分解,响应值变低,但是大部分对照品在升高干燥气及鞘流气温度、升高鞘流气流量的条件下响应值变高,故采用分组试验的方法。另外,本研究采用动态正离子模式检测,根据色谱分离中得到的各组分的时间建立正离子表,并设定每个农药的采集时间窗为2 min,从而显著降低样品中多组分分析的质谱循环时间,增加每个化合物的采集点。

3.3 加样回收率结果分析

本研究90%的农药三水平加样回收率为70%~120%,结果理想;二溴磷、地虫硫磷、倍硫磷、霜脲氰等个别农药某一水平加样回收率相对稍不理想或回收率相对变异系数偏大,估计是这些化合物本身响应较低,不适合采用LC-MS/MS法测定,加之检测中多种农药相互影响或干扰造成。

综上,采用LC-MS/MS法测定桑叶药材中100种农药残留量,方法简便、快速、灵敏度高,适用于桑叶药材中多种农药残留的测定;为验证方法的有效性,笔者采用此方法测定其他大约100个品种的中药材,试验结果良好,均达到农药残留分析的各项指标,说明此方法具有通用性。

参考文献

- [1] Soler C, Manes J, Pico Y. The role of liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food[J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2008, 38(2): 93.
- [2] 庞国芳, 范春林, 梁萍, 等. GB/T 23201—2008 桑枝、金银花、枸杞子和荷叶中413种农药及相关化学品残留量的测定液相色谱-串联质谱法[M]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 297.
- [4] 刘静, 周晓梅, 祝与鸣, 等. 中药质量控制方法研究进展[J]. *中国药房*, 2010, 21(3): 281.
- [5] 陈晓水, 边照阳, 唐纲岭, 等. 气相色谱-串联质谱技术分析烟草中的132种农药残留[J]. *色谱*, 2012, 30(10): 1 043.
- [6] 孙莉, 何鹏, 胡杰, 等. 保健食品中农药残留的检测及前处理技术研究[J]. *中成药*, 2013, 35(11): 2 461.
- [7] Lesueurc, Knittlp, Gartnerm, et al. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method[J]. *Food Control*, 2008, 19(9): 906.
- [8] Moreno JLF, Frenich AG, Bolanos PP, et al. Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticide

HPLC法测定八珍丸(浓缩丸)中芍药苷的含量

黄卫娟*,何秀云,刘杰,郑武娟,陈丽英(东莞市第五人民医院,广东东莞 529600)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)15-2126-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.15.37

摘要 目的:建立测定八珍丸(浓缩丸)中芍药苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Wonda Sil C₁₈,流动相为乙腈-1%磷酸(15:85, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为230 nm,柱温为30 ℃。结果:芍药苷检测进样量线性范围为0.219~1.32 μg($r=0.9999$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1%;加样回收率为95.82%~101.82%(RSD=2.13%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于八珍丸(浓缩丸)中芍药苷含量的测定。

关键词 八珍丸(浓缩丸);芍药苷;高效液相色谱法

Content Determination of Paeoniflorin in Bazhen Pill (Concentrated Pill) by HPLC

HUANG Weijuan, HE Xiuyun, LIU Jie, ZHENG Wujuan, CHEN Liying (The Fifth People's Hospital of Dongguan, Guangdong Dongguan 529600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of paeoniflorin in Bazhen pill (concentrated pill). METHODS: HPLC was performed on the column of wondasil C₁₈ with mobile phase of acetonitrile -1% phosphoric acid (15:85, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 230 nm, and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of paeoniflorin was 0.219-1.32 μg($r=0.9999$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recovery was 95.82%-101.82% (RSD=2.13%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, stable and reproducible, and can be used for the content determination of Bazhen pill (concentrated pill).

KEYWORDS Bazhen pill (concentrated pill); Paeoniflorin; HPLC

八珍丸(浓缩丸)由党参、茯苓、熟地黄、白芍、当归等8种中药组合而成,具有补气益血之功效。芍药苷是一种单萜类糖苷化合物,是芍药的主要有效成分之一^[1-2],它在八珍丸发挥疗效过程中起着重要作用,但在现行标准——《卫生部药品标准中药成方制剂》(第八册)中只有显微鉴别方法,并无含量测定方法,且目前少有针对八珍丸(浓缩丸)中芍药苷含量测定的相关报道。为了更好地控制八珍丸(浓缩丸)的质量,笔者建立了采用高效液相色谱(HPLC)法测定八珍丸(浓缩丸)中芍药苷含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-15C型HPLC仪,包括SPD-15C紫外检测器、LabSolutions Essentia色谱工作站、SIL-10AF自动进样器、CTO-16柱温箱(日本Shimadzu公司);BT25S型电子天平(德国Sartorius公司);KQ-300型超声波清洗仪(江苏昆山超声波仪器厂)。

1.2 药品与试剂

八珍丸(浓缩丸)(兰州佛慈制药股份有限公司,批号:14A1、13L3,规格:9 g/粒;兰州太宝制药有限公司,批号:65110524、65110603,规格:9 g/粒);芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110736-201136,纯度>98%);乙腈为

色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Wonda Sil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-1%磷酸(15:85, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:230 nm^[3];柱温:30 ℃;进样量:5 μl(对照品溶液)、10 μl(供试品溶液)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液^[3-4] 取芍药苷对照品约10 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加稀乙醇定容,制成芍药苷质量浓度为109.632 μg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液^[5-7] 取样品适量,研细,取约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇25 ml,称定质量,超声(功率:120 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按八珍丸处方和制备工艺制备缺白芍的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性考察

分别取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,供

residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2008, 43(9):1 235.

[9] 苏方华.桑叶的化学成分及临床应用研究发展[J]. *中国医*

药导报, 2010, 7(14):9.

[10] 戴博,金红宇,田金改.中药中外源性有害残留物检测方法研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(6):1 014.

(收稿日期:2015-05-01 修回日期:2015-08-15)

(编辑:张静)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0769-85010247。
E-mail:710753877@qq.com