

HPLC/MS/MS 测定铁皮石斛制剂中 12 种农药残留量

方翠芬, 谭春梅, 马临科, 祝明

(浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

摘要 目的 建立同时测定铁皮石斛制剂中 12 种农药残留量的分析方法。方法 样品用乙腈超声提取, 经过石墨化碳/氨基固相萃取柱净化, 用高效液相色谱-质谱串联法测定, 采用内标法定量。结果 方法回收率 72.1% ~ 119.5%, RSD 均 < 15%。各农药检测限均 < 0.001 mg · kg⁻¹。结论 该方法简单, 快速, 灵敏, 结果准确, 重复性好, 可用于铁皮石斛制剂 12 种农药残留量的测定。

关键词 铁皮石斛; 农药残留; 固相萃取; 高效液相色谱-质谱串联法

中图分类号 R286; R927.2

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)11-1481-04

Determination of 12 Kinds of Pesticide Residues in *Dendrobium Officinale* Prescription by HPLC/MS/MS

FANG Cui-fen, TAN Chun-mei, MA Lin-ke, ZHU Ming (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT Objective To establish a method for the simultaneous determination of 12 kinds of pesticide residues in the *Dendrobium officinale* prescription. **Methods** The total of 12 pesticides was extracted by ultrasonic, and then purified through Carb/NH₂ solid phase extraction(SPE) cartridges. The residues were simultaneous identified and quantified by HPLC/MS/MS.

Results The recoveries ranged from 72.1% ~ 119.5%, with their relative standard deviations(RSDs) being less than 15%. The limit of detection (LOD) for each pesticide was below 0.001 mg · kg⁻¹. **Conclusion** This method was simple, sensitive and reproducible, which could be applied to determine 12 kinds of pesticide residues in *Dendrobium officinale* prescription.

KEY WORDS *Dendrobium officinale* prescription; Pesticide residue; Solid-phase extraction; HPLC/MS/MS

铁皮石斛为兰科植物铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo.) 的干燥茎, 具有益胃生津、滋阴清热功效, 用于热病津伤、口干烦渴、胃阴不足、食少干呕、病后虚热不退、阴虚火旺、骨蒸劳热、目暗不明、筋骨痠软^[1]。因本品野生资源较少, 目前市场上多为栽培品, 受病虫害的影响, 难免使用农药防治病虫害。如农药使用不当, 会导致农药残留量超标, 农药可能带入相应制剂, 危及用药安全。在前期课题研究中, 笔者曾对铁皮石斛药材的农药残留进行过筛查, 发现农药检出率较高, 所以选择检出率较高的 12 种农药, 建立制剂中农药残留测定方法, 对含铁皮石斛制剂中的农药残留情况进行评价。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪、Agilent 6430 三重四极杆串联质谱仪; Carb/NH₂ 固相萃取小柱 (500 mg + 500 mg/6 mL, Dikma 公司); BUCHIR-215 型旋转蒸发仪 (瑞士 BUCHI 公司); usc-802 型号超声仪; CP-225D 天平 (德国 Sartorius 公司);

氮吹仪 N-EVAP III (美国 Organomation Associates, Inc); 台式大容量冷冻离心机 5810R (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 试剂 12 种农药的标准品购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司 (具体名称见表 1); 内标物三苯基磷酸酯购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 乙腈、甲苯、甲醇均为色谱纯 (德国 MERCK 公司), 甲酸、甲酸铵均为色谱纯 (美国 TEDIA 公司), 无水硫酸钠为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。样品信息见表 2。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX Eclipse plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL; 流动相 A 相为水 (含 0.1% 甲酸和 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵), 流动相 B 相为乙腈 (含 5% 水, 0.1% 甲酸和 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵), 洗脱条件及流速见表 3。

2.2 质谱条件 电离源模式: 电喷雾离子化; 电离源极性: 正模式; 雾化气: 氮气; 雾化气压力: 345 kPa (50 psi); 离子喷雾电压: 4 000 V; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 12 L · min⁻¹。

配制一定浓度对照品溶液, 进行一级质谱分析, 得到每种农药的分子离子峰, 再对分子离子峰进行分子离子扫描, 得到碎片离子信息, 然后优化每种农药的源

收稿日期 2012-02-01 修回日期 2012-02-28

作者简介 方翠芬 (1979-), 女, 安徽安庆人, 主管中药师, 硕士, 从事中药质量研究。电话: 0571-86459425, E-mail: fcf0507@126.com。

表 1 农药品种及检测参数

Tab. 1 The species and detection parameter of pesticides

中文名称	英文名称	定量离子	定性离子	Frag/V	CE/V
吡虫啉	imidacloprid	256.1/209.1	256.1/175.1	100	10 : 14
克百威	carbofuran	222.1/165.1	222.1/123.1	78	6 : 18
甲霜灵	metalaxyl	280.2/220.1	280.2/192.1	86	10 : 14
异丙威	isoprocarb	194.1/95.0	194.1/137.1	74	9 : 1
腈菌唑	myclobutanil	289.1/70.1	289.1/125.0	124	14 : 34
三唑酮	triazimefon	294.1/197.1	294.1/225.1	98	10 : 6
戊唑醇	tebuconazole	308.2/70.0	308.2/125.0	126	21 : 40
三唑磷	triazophos	314.1/162.1	314.1/119.0	100	14 : 38
丙环唑	propiconazole	342.1/158.9	342.0/69.0	128	29 : 17
氟虫腈	fipronil	437.0/367.9	437.0/254.8	142	13 : 29
噻嗪酮	buprofezin	306.2/201.1	306.2/116.0	90	5 : 13
毒死蜱	chlorpyrifos	349.9/97.0	349.9/198.0	100	34 : 10

表 2 样品信息表

Tab. 2 Informations for the samples

检品名称	批号	生产单位
天目山牌铁皮石斛软胶囊	20100901	杭州天目山药业股份有限公司
寿仙谷牌铁皮枫斗胶囊	20101001	金华寿仙谷药业有限公司
森山牌铁皮枫斗胶囊	20101001	浙江森宇药业有限公司
寿仙谷牌铁皮枫斗颗粒	20100801	金华寿仙谷药业有限公司
铁皮枫斗口服液	20100802	江西豪荣生物科技有限公司
森山牌铁皮枫斗冲剂	20101001	浙江森宇药业有限公司
生命维他牌铁皮枫斗口服液	100802	浙江华立生命科技有限公司
生命维他铁皮枫斗口服液	100108	浙江华立生命科技有限公司
千年牌铁皮枫斗(麦金利)	GT20100716	上海玉安药业有限公司
胡庆余堂牌铁皮枫斗晶	100902	杭州胡庆余堂药业有限公司

表 3 流动相梯度及流速

Tab. 3 Gradient and flow rate of mobile phase

步骤	时间/ min	A 相	B 相	流速/ (mL · min ⁻¹)
		%		
1	0	90	10	0.4
2	0.3	90	10	0.4
3	4	60	40	0.4
4	13	40	60	0.4
5	15	5	95	0.4
6	20	5	95	0.4

内碎裂电压 (Fragmentor)、碰撞气能量 (collision energy, CE) 等参数,使每种农药的分子离子与特征碎片离子强度最佳,根据二级质谱选择每种农药的定性和定量离子对,见表 1。采用选择监测离子定量。混合标准品的总离子流图见图 1。

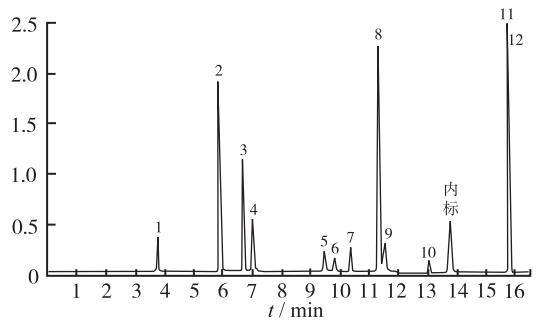


图 1 12 种农药对照品离子流图

1. 吡虫啉; 2. 克百威; 3. 甲霜灵; 4. 异丙威; 5. 腈菌唑; 6. 三唑酮; 7. 戊唑醇; 8. 三唑磷; 9. 丙环唑; 10. 氟虫腈; 11. 噻嗪酮; 12. 毒死蜱; 内标: 三苯基磷酸酯

Fig. 1 TIC of 12 pesticides

1. imidacloprid; 2. carbofuran; 3. metalaxyl; 4. isoprocarb; 5. myclobutanil; 6. triazimefon; 7. tebuconazole; 8. triazophos; 9. propiconazole; 10. fipronil; 11. buprofezin; 12. chlorpyrifos; internal standard: phosphate ester

2.3 标准品溶液的配制

2.3.1 标准品和内标储备溶液的制备 根据各农药标准品和三苯基磷酸酯在检测器上的响应值,精密称取各农药标准品和三苯基磷酸酯适量,用甲醇分别制成约 1 000 mg · L⁻¹ 储备液。

2.3.2 标准品溶液的制备 精密吸取各农药标准品储备溶液适量,用甲醇-水(3 : 2)制成分别为 0.012, 0.018, 0.03, 0.06, 0.12, 0.18, 0.30 mg · L⁻¹ 混合标准品工作溶液,并分别加入内标储备液适量,使三苯基磷酸酯的浓度为 0.025 mg · L⁻¹。

2.3.3 内标溶液的制备 精密吸取内标储备溶液适量,用甲醇-水(3 : 2)制成 0.025 mg · L⁻¹ 溶液,作为内标工作液。

2.3.4 基质混合对照品溶液的制备 取一批不含农药的制剂(铁皮枫斗胶囊),照“样品前处理”项下固体制剂供试品溶液制备方法处理至氮吹仪上吹至近干,加入上述对照品溶液各 1 mL,摇匀,即得。

2.4 样品前处理

2.4.1 提取 固体制剂:取样品适量,研细,取一日服用量,精密称定,置 100 mL 锥形瓶,精密加入乙腈 50 mL,超声处理 30 min,离心,取上清液,加入适量无水硫酸钠,放置过夜。

液体制剂:精密吸取一日服用量,减压浓缩至近干,精密加入乙腈 50 mL,超声处理 30 min,离心,取上清液,加入适量无水硫酸钠,放置过夜。

2.4.2 净化 精密量取上清液 10 mL,减压浓缩至约 1 mL,转移至石墨化碳/氨基固相萃取串联柱[500 mg+500 mg:6 mL,柱上加无水硫酸钠高约 1 cm,用乙腈-甲苯(3:1)10 mL 预淋洗]上,容器用乙腈-甲苯(3:1)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)20 mL 洗脱,收集洗液与洗脱液,40 °C 减压浓缩至约 1 mL,置氮吹仪上吹至近干,精密加入内标工作溶液 1 mL,超声使溶解,离心,取上清液,即得。

2.5 线性关系考察 将 7 组不同浓度基质混合对照品溶液注入高效液相色谱-串联质谱(HPLC/MS/MS)仪测定,记录各待测组分与内标物的色谱峰面积,以各成分的峰面积与内标峰面积之比为横坐标(X),各成分的浓度与内标浓度比为纵坐标(Y),进行线性回归分析。实验结果表明,各种农药对照品在给定范围内线性关系良好,结果见表 4。

2.6 分析方法评价

2.6.1 精密度实验 精密吸取 0.06 mg·L⁻¹ 基质混合对照品溶液,注入 HPLC/MS/MS 仪测定,连续进样,记录峰面积,计算 RSD。12 种农药的 RSD 均在 0.3%~5.5% 之间($n=6$),符合农药残留检测的要求^[2-3]。

2.6.2 重复性实验 取一批不含农药的铁皮枫斗胶囊,一式 6 份,分别精密加入 0.06 mg·L⁻¹ 混合对照品溶液(不含内标)5 mL,按“样品前处理”项下制备加样样品溶液并测定,计算 RSD。12 种农药重复性 RSD 在 1.5%~11.2% 之间,符合农药残留检测的要求^[2-3]。

2.6.3 加样回收率与检测限 取一批不含农药的铁皮枫斗胶囊,一式 9 份,3 份为一组,分别精密加入 0.018,0.06 和 0.18 mg·L⁻¹ 混合对照品溶液(不含内标)各 5 mL,再精密加入乙腈 45 mL,按“样品前处理”项制备加样样品溶液,进样分析,计算加样回收率。同时以低浓度加样中噪音的 3 倍计算每种农药检出限,结果见表 4。12 种农药的回收率在 72.1%~119.5%,检测限均低于 0.001 mg·kg⁻¹,符合农药残留检测要求^[2-3]。

2.8 样品测定 按拟订方法对 10 批铁皮石斛制剂中农药残留进行测定,结果未检出噻嗪酮、克百威、毒死蜱、氟虫腈、异丙威和三唑磷,其余测定结果见表 5。

从表 5 可以看出,10 批样品中,4 批样品阳性检出,6 批样品未检出农药残留,阳性检出率 40.0%。检出的农药品种分别为吡虫啉、甲霜灵、腈菌唑、丙环唑、戊唑醇和三唑酮,含量最高的为甲霜灵(0.022 mg·kg⁻¹),

表 4 12 种农药的线性方程、最低检测限及回收率结果

Tab.4 Linearity, lowest detectable limit and recovery of 12 pesticides

农药名称		线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回归方程	r	最低检测限/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/ %
中文	英文					
噻嗪酮	buprofezin	0.510 ~ 153.12	$Y=0.334 9X-0.041 1$	0.998 5	0.000 02	77.9
克百威	carbofuran	0.591 ~ 177.169	$Y=0.431 8X-0.036 7$	0.999 9	0.000 03	76.3
毒死蜱	chlorpyrifos	5.240 ~ 1 572.1	$Y=0.019 4X+0.001 8$	0.997 9	0.000 22	72.1
氟虫腈	flupyrifos	6.736 ~ 2 020.789	$Y=0.050 2X-0.003 7$	0.999 0	0.000 28	92.3
吡虫啉	imidacloprid	2.363 ~ 708.840	$Y=0.180 2X-0.001 6$	0.999 6	0.000 06	101.4
异丙威	isoprocarb	0.591 ~ 177.169	$Y=0.078 1X-0.010 9$	0.998 9	0.000 04	87.6
甲霜灵	metalaxyl	0.514 ~ 154.159	$Y=0.338 4X-0.010 6$	0.998 8	0.000 03	88.8
腈菌唑	myclobutanil	2.387 ~ 716.1	$Y=0.270 1X-0.024 2$	0.999 7	0.000 10	119.5
丙环唑	propiconazole	2.406 ~ 721.82	$Y=0.161 8X-0.018 6$	0.999 2	0.000 30	90.4
戊唑醇	tebuconazole	1.917 ~ 575.016	$Y=0.321 1X-0.029 9$	0.999 8	0.000 08	77.4
三唑酮	triadimefon	2.504 ~ 751.08	$Y=0.175 7X-0.008 1$	0.999 7	0.000 09	101.1
三唑磷	triazophos	0.358 ~ 107.281	$Y=0.646 1X-0.058 1$	0.999 6	0.000 02	91.7

表 5 10 种样品测定结果
Tab. 5 Detection results of samples

mg · kg⁻¹

药物	吡虫啉	甲霜灵	腈菌唑	丙环唑	戊唑醇	三唑酮
铁皮石斛软胶囊	0.006	0.004	0.004	0.002	...	0.002
铁皮枫斗胶囊	...	0.015	...	0.011	0.013	0.01
铁皮枫斗胶囊
铁皮枫斗颗粒	...	0.022	...	0.007	0.017	...
铁皮枫斗口服液
铁皮枫斗冲剂	0.003	0.002	...
铁皮枫斗口服液
铁皮枫斗口服液
铁皮枫斗(麦金利)
铁皮枫斗晶

“...”为未检出

“...” represents “undetectable”

参考 GB/T 2763-2005^[4] 中的限量要求, 限度最严的为 0.05 mg · kg⁻¹, 各批样品的农药残留量均低于该最严限度值, 所以认为铁皮石斛类保健食品中, 以吡虫啉、克百威、甲霜灵、异丙威、腈菌唑、三唑酮、戊唑醇、三唑磷、丙环唑、氟虫腈、噻嗪酮、毒死蜱 12 种常用农药为监测指标, 农药残留情况总体较好, 含量在安全范围内。

3 讨论

3.1 农药品种的选择 实验前期, 笔者首先建立了中药材中 108 种农药的快速检测方法, 对多种中药材中的农药残留量进行筛查, 发现铁皮石斛药材的农药检出率比较高, 所以选择检出率较高的农药品种, 建立定量检测方法。本方法虽然只是针对铁皮石斛和制剂中 12 种农药残留的测定进行研究, 但是所选用的溶剂系统、前处理手段以及检测方法均属于通用技术, 也可适用于其他种类农药残留量的测定。

3.2 净化方法的选择 参照现行农药残留测定有关国家标准方法及国内外相关文献^[5-8], 主要考察以下几种方式: ①石墨化碳/氨基串联固相萃取柱, ②PSA 固相萃取柱, ③Florisil 柱净化, 结果石墨化碳/氨基串联固相萃取柱的净化效果最好, 供试品溶液颜色最浅, 总离子流中干扰峰较少, 回收率最好, 基质效应也较低, 最终选用石墨化碳/氨基串联固相萃取柱净化。

3.3 样品的基质效应 中药材成分复杂, 对于农药残留的检测也有一定的影响, 有些可能有基质增强作用, 有些可能有基质减弱效应。对于液质农药残留分析, 通常会出现基质减弱效应, 具体表现为使用农药标准

品定量时会出现某种农药的回收率低于可接受范围。为了避免药材本身带来的基质效应, 采取基质混合标准品溶液的方法消除和减弱基质效应, 同时利用选择离子定量检测也可以大大提高分析方法的选择性, 排除一些杂质的干扰, 最终获得较满意的实验结果。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 274.
- [2] European Union, Quality control procedures for pesticide residues analysis[N]. EC; SANCO/10232/2006.
- [3] European Union, Implementing council directive 96/23/EC Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results[N]. EC; 2002/657.
- [4] GB/T 2763-2005. Maximum residues limits for pesticides in food[S]. 2005: 1-58.
- [5] GB/T 23201-2008. Determination of 413 pesticides and related chemicals residues in mulberry twig, honeysuckle, Barbary wolfberry fruit and lotus leaf LC-MS-MS method[S]. 2008: 1-75.
- [6] GB/T 20769-2006. Method for determination of 405 pesticides and related chemicals residues in fruits and vegetables by LC/MS/MS method[S]. 2006: 1-70.
- [7] Council of Europe. European Pharmacopoeia 6.0 volume 1 [M]. Germany: Druckerei C. H. Beck, 2008: 252.
- [8] 毛秀红, 郑征伟, 陈珂, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定中药材中 74 种农药残留量[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(4): 64-70.

DOI 10.3870/yydb.2012.11.030