

超高效液相色谱-串联质谱法测定中药材中 三唑类杀菌剂及三嗪类除草剂的残留量

王 菲, 李 彤, 马 辰*

(中国医学科学院 & 北京协和医学院药物研究所分析室, 北京 100050)

摘要: 建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS) 同时测定甘草、西洋参、三七、人参、丹参 5 种中药材中 10 种三唑类杀菌剂、18 种三嗪类除草剂(包括有毒代谢物) 残留量的分析方法。采用 QuEChERS 前处理方法, 样品经 1% (v/v) 醋酸乙腈提取, 乙二胺-*N*-丙基硅烷(PSA) 净化处理, 以 Shim-pack XR-ODS II (75 mm × 2.0 mm) 为色谱柱, 0.05% (v/v) 甲酸溶液-乙腈为流动相梯度洗脱, 在多反应监测(MRM) 模式下测定。25 种农药及其 3 种有毒代谢物的定量限($S/N \geq 10$) 为 0.20 ~ 5.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 检出限($S/N \geq 3$) 为 0.10 ~ 2.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在各自的考察浓度范围内线性关系良好($r \geq 0.999$) ; 在 0.20 ~ 55.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平内, 平均加标回收率为 70.6% ~ 125.7%, RSD 为 0.7% ~ 14.2%。该方法样品前处理简单、快速、灵敏, 可用于中药材中三唑类杀菌剂和三嗪类除草剂农药残留量的快速筛查。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 三唑类杀菌剂; 三嗪类除草剂; 中药材

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013) 03-0191-09

Determination of triazole fungicide and triazine herbicide residues in Chinese herbs by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Fei, LI Tong, MA Chen*

(Department of Analysis, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of
Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: A method using QuEChERS clean-up followed by UPLC-MS/MS has been established for the quantitative determination of the residues of 10 triazole fungicides and 18 triazine herbicides in Chinese herbs including *Radix Glycyrrhizae*, *Radix Panacis Quinquefolii*, *Salvia miltiorrhiza*, *Radix Notoginseng* and *Panax ginseng* C. The pesticide residues were extracted from the samples by acetonitrile containing 1% (v/v) acetic acid, cleaned-up with primary secondary amine (PSA) and then analyzed using UPLC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode with positive electrospray ionization. The analytical column was Shim-pack XR-ODS II (75 mm × 2.0 mm) and the mobile phases were water containing 0.05% (v/v) formic acid and acetonitrile in gradient elution. The limits of quantification ($S/N \geq 10$) of the 28 pesticides were 0.20 ~ 5.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limits of detection ($S/N \geq 3$) were 0.10 ~ 2.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$. All of the pesticides had good linear responses with $r \geq 0.999$ and the average recoveries of the pesticides spiked in the Chinese herbs ranged from 70.6% ~ 125.7% with the RSDs of 0.7% ~ 14.2%. The results demonstrated that the method is simple, fast and sensitive to meet the requirements for the triazole fungicide and triazine herbicide residues and can be used for the analysis of the 28 pesticides in the above five Chinese herbs.

Key words: QuEChERS; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) ; triazole fungicides; triazine herbicides; Chinese herbs

* 通讯联系人. Tel: (010) 63165239, E-mail: mach@imm.ac.cn.

基金项目: 科技部创新工作专项基金项目(2011 IM 030200) .

收稿日期: 2012-12-09

三唑类杀菌剂(triazole fungicides)是一类影响细菌甾醇类生物合成,使其细胞膜功能受到破坏的高效、广谱、低毒的内吸性杀菌剂,是目前销售量最大、最有发展前景的一类杀菌剂。三嗪类除草剂(triazine herbicides)是一类抑制植物光合作用的高效选择性除草剂。目前,这两类农药被广泛用于中药材的种植。虽然这些农药的使用给人们带来了巨大的利益,但过多使用会对人类造成潜在的危害。如三嗪类除草剂可能引起人类癌症及先天性缺陷,同时能干扰激素的正常功能^[1]。世界多国已将莠去津、西玛津和噻草酮等多种三嗪类除草剂列入内分泌干扰剂化合物名单^[2]。另外,某些三嗪类除草剂易在微生物作用下代谢为与母体具有相同毒性的产物,如莠去津的两种代谢物脱乙基莠去津(DEA)与脱异丙基莠去津(DIA),特丁津的代谢物脱乙基特丁津(DET),它们与母体具有相同的毒性^[3]。在对农药残留测定时应同时关注这些代谢物的存在情况。目前,欧盟、美国、日本及国际食品法典委员会(CAC)等国家和组织已经明确规定这两类农药的最高残留限量(MRL)^[4]。为了保障人类安全和满足我国中药资源进军国际市场的迫切要求,建立中药材中三唑类杀菌剂和三嗪类除草剂的检测方法势在必行。

目前国内外对三嗪类除草剂及三唑类杀菌剂残留的研究集中在土壤^[5]、水^[6]、食品^[7-9]及水果^[10]中,常用的检测方法包括液相色谱法^[11]及气相色谱-质谱联用法^[5,6,9-12]等,也有用液相色谱-质谱法进行测定的报道^[7,13,14]。而有关中药材中这两类农药残留同时检测的报道较少。虽然气相色谱-质谱法联用得到了较多的推广,但其定量限一般较低;随着各国农药残留检测项目的不断增多及限量要求的日益严格,气相色谱-质谱联用法已很难满足国外对农药残留的检测要求。另外,有文献^[15]比较了 300 多种农药的 LC-MS 与 GC-MS 方法,结果发现,GC-MS 检测时杂质干扰较为明显,约有 70% 的农药更适合进行 LC-MS 分析。由于中药材成分复杂,LC-MS 因其抗干扰能力强、定性和定量准确,可以在较短时间内对复杂基质中的痕量残留物进行检测,而成为分析中药材中杀菌剂和除草剂残留的首选方法。本文根据欧盟、美国等国家和组织对食品中有关农药残留检测项目,利用 QuEChERS 前处理方法和超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)检测技术,建立了同时测定三七等中药材中 10 种三唑类杀菌剂和 18 种三嗪类除草剂(包括 3 种有毒代谢物)残留的方法。该方法样品前处理简单,重现性

和稳定性较好,减少了实验操作者的偶然误差,分析时间短,灵敏度、准确度及精确度均符合要求,可用于中药材中农药残留的快速筛查。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

QTRAP 5500 质谱仪,配有电喷雾离子源、三重四极杆-线性离子阱质量分析器及 Analyst 1.5.1 工作站(美国 AB SCIEX 公司);LC-20AD UFLC 快速液相色谱系统(日本岛津公司);TP150 超声波清洗器(天鹏电子新技术北京有限公司);DT5-2 低速离心机(北京时代北利离心机有限公司);METTLER TOLEDO XP205 型电子天平(瑞士 METTLER 公司);Sartorius CP224S 电子天平(德国 Sartorius 公司);涡旋混合器(江苏医疗器械厂)。

乙腈、甲醇为色谱纯(Honeywell 公司);冰醋酸为色谱纯(ROE SCIENTIFIC INC.);无水硫酸镁为分析纯(北京北化精细化学品有限责任公司);醋酸钠为分析纯(广东西陇化工厂);乙二胺-N-丙基硅烷(PSA, Agela 科技有限公司)。

三唑类杀菌剂标准品:三唑醇(triadimenol)、腈菌唑(myclobutanil)、苯醚甲环唑(difenoconazole)、三唑酮(triadimefon)、戊唑醇(tebuconazole)、氟菌唑(triflumizole)购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度大于 97%;腈苯唑(fenbuconazole)、戊菌唑(penconazole)、丙环唑(propiconazole)、多效唑(bonzi)购于美国 AccuStandard 公司,纯度大于 97%。

三嗪类除草剂标准品:西玛津(simazine)、仲丁通(secbumeton)、莠去津(atrazin)、扑草净(prometryn)、特丁津(terbuthylazine)、敌稗(propanil)购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度大于 97%;环噻酮(hexazinone)、草津净(cyanazine)、莠灭净(ame-tryn)、噻草酮(metribuzin)、特丁净(preban)、吡唑草胺(metazachlor)及莠去津代谢物脱乙基莠去津(atrazin-desethyl, DEA)与脱异丙基莠去津(atrazin-desisopropyl, DIA),特丁津的代谢物脱乙基特丁津(terbuthylazine-desethyl, DET)购于美国 AccuStandard 公司,纯度大于 97%;甲草胺(alachlor)、异丙甲草胺(metolachlor)、丙草胺(pretiachlor)为标准物质溶液,质量浓度为 0.1 g/L,购于中国计量科学院国家标准物质中心。

中药材样品:12 种甘草、10 种西洋参、9 种丹参、8 种三七及 4 种人参共 5 类 43 种,来源于北京、山东、广西、云南、甘肃、浙江等全国各不同产地。

1.2 混合标准溶液的配制

称取 28 种农药标准品 2 ~ 10 mg(精确至 0.01 mg),分别置于棕色容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配成质量浓度为 0.01 ~ 0.498 g/L 的各农药标准储备液。精密量取各农药标准储备液适量于 50 mL 棕色容量瓶中,配成质量浓度为 9.9 ~ 514 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液储备液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.3 样品前处理

样品干燥后经粉碎机粉碎,过 20 目筛,于常温下保存。称取 2 g(精确至 0.001 g)中药材粉末于 50 mL 离心管中,加入 2 mL 水浸润 3 h。用移液管准确加入含 1%(v/v)醋酸的乙腈溶液 20 mL,冰水浴中超声处理 20 min。向离心管中加入 4 g 无水硫酸镁和 1 g 醋酸钠,涡旋振摇 2 min,然后离心(5 000 r/min) 5 min。取上清液 5 mL,置于 50 mL 离心管中,向离心管中加入 900 mg 无水硫酸镁和 300 mg PSA,涡旋振摇 2 min,离心(5 000 r/min) 5 min,取上

清液,经 0.22 μm 滤膜过滤,滤液用于分析。

1.4 UPLC-MS/MS 条件

1.4.1 UPLC 条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS II 柱(75 mm $\times$ 2.0 mm);柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量: 1.0 μL 。以 0.05%(v/v)甲酸溶液(A相)和乙腈(B相)为流动相进行线性梯度洗脱;流速: 200 $\mu\text{L/min}$ 。梯度洗脱程序: 0 ~ 3.0 min, 65% A ~ 40% A; 3.0 ~ 5.0 min, 40% A; 5.0 ~ 8.0 min, 40% A ~ 1% A; 8.0 ~ 13.0 min, 1% A; 13.0 ~ 13.05 min, 1% A ~ 65% A; 13.05 ~ 15 min, 65% A。

1.4.2 MS/MS 条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI);扫描方式: 正离子扫描;检测方式: 多反应监测(MRM)模式;喷雾电压(IS): 5 500 V;雾化温度(TEM): 550 $^{\circ}\text{C}$;碰撞气压力(CAD): medium;扫描速度: 10 000 Da/s;扫描范围: 50 ~ 1 000 Da。其他质谱参数如表 1 所示。

表 1 28 种农药的保留时间、母离子、子离子及部分质谱参数
Table 1 Retention times, precursor ions, product ions and some MS/MS parameters for the 28 pesticides

No.	Pesticide	t_{R}/min	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Declustering potential/V	Collision energies/V
1	DIA	2.99	174.1	104.0 [*] , 96.1	90	31, 25
2	secbumeton	3.70	226.2	170.1 [*] , 142.2	25	15, 30
3	DEA	4.03	188.3	146.0 [*] , 104.1	30	20, 33
4	hexazinone	4.87	253.2	171.1 [*] , 70.9	20	20, 40
5	simazine	5.69	202.1	132.1 [*] , 124.1	30	24, 24
6	cyanazine	5.68	241.2	214.3 [*] , 104.1	20	20, 40
7	ametryn	5.71	228.2	116.0 [*] , 96.1	30	30, 30
8	DET	5.72	202.1	146.0 [*] , 110.0	50	23, 32
9	metribuzin	6.11	215.3	187.0 [*] , 130.9	30	25, 30
10	atrazin	6.84	215.9	96.1 [*] , 174.0	20	30, 23
11	prometryn	7.04	242.2	200.1 [*] , 158.0	26	26, 26
12	prebane	7.17	242.3	91.1 [*] , 158.0	30	35, 35
13	metazachlor	7.57	278.2	134.1 [*] , 105.1	30	30, 60
14	propanil	8.23	218.0	162.0 [*] , 127.0	22	21, 35
15	terbuthylazine	8.71	230.1	174.1 [*] , 104.1	40	23, 41
16	alachlor	10.14	270.2	162.1 [*] , 238.2	90	30, 15
17	metolachlor	10.14	284.3	252.2 [*] , 176.1	36	20, 25
18	pretiachlor	11.40	312.2	252.2 [*] , 176.2	20	20, 40
19	bonzi	7.96	294.2	69.9 [*] , 125.0	30	40, 40
20	triadimenol	7.92	296.1	70.1 [*] , 99.1	50	20, 30
21	myclobutanil	8.88	289.1	125.1 [*] , 70.0	30	44, 24
22	triadimefon	9.23	294.2	197.1 [*] , 225.0	10	20, 20
23	tebuconazole	9.45	308.2	70.2 [*] , 125.3	20	30, 30
24	fenbuconazole	9.52	337.1	125.0 [*] , 70.0	20	30, 30
25	penconazole	9.93	284.2	158.9 [*] , 70.1	30	40, 20
26	propiconazole	10.19	342.1	159.0 [*] , 69.1	20	40, 30
27	triflumizole	10.32	346.3	278.1 [*] , 73.0	30	13, 20
28	difenoconazole	10.48	406.3	251.1 [*] , 374.1	50	30, 20

* Quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 UPLC-MS/MS 条件的优化

为了达到最佳的色谱分离和良好的色谱峰形,考察了以甲醇-水、乙腈-水以及乙腈-0.05% (v/v) 甲酸溶液、乙腈-0.05% (v/v) 乙酸溶液作流动相时的分离情况。以甲醇为有机相时,大多数农药的峰形分叉;而以乙腈为有机相时,色谱峰形及分离度均可达到要求,因此选用乙腈作为有机相。在水溶液中加入 0.05% (v/v) 的甲酸或乙酸时,色谱峰形对

称、尖锐,且甲酸更有利于农药化合物的离子化,因此选择 0.05% 甲酸溶液作为流动相的水相。在 1.4 节的色谱和质谱条件下各农药化合物峰形良好且无杂质干扰,灵敏度高。

对质量浓度约为 20 $\mu\text{g/L}$ 的 25 种农药及 3 种代谢产物 (DIA、DEA、DET) 进行电喷雾正离子扫描:一级质谱分析 (Q1 扫描) 得到各农药的分子离子峰,二级质谱分析 (Q3 扫描) 得到相应的碎片离子信息;在 MRM 下优化得到各农药标准品的质谱参数。各农药标准品的 MRM 谱图见图 1。

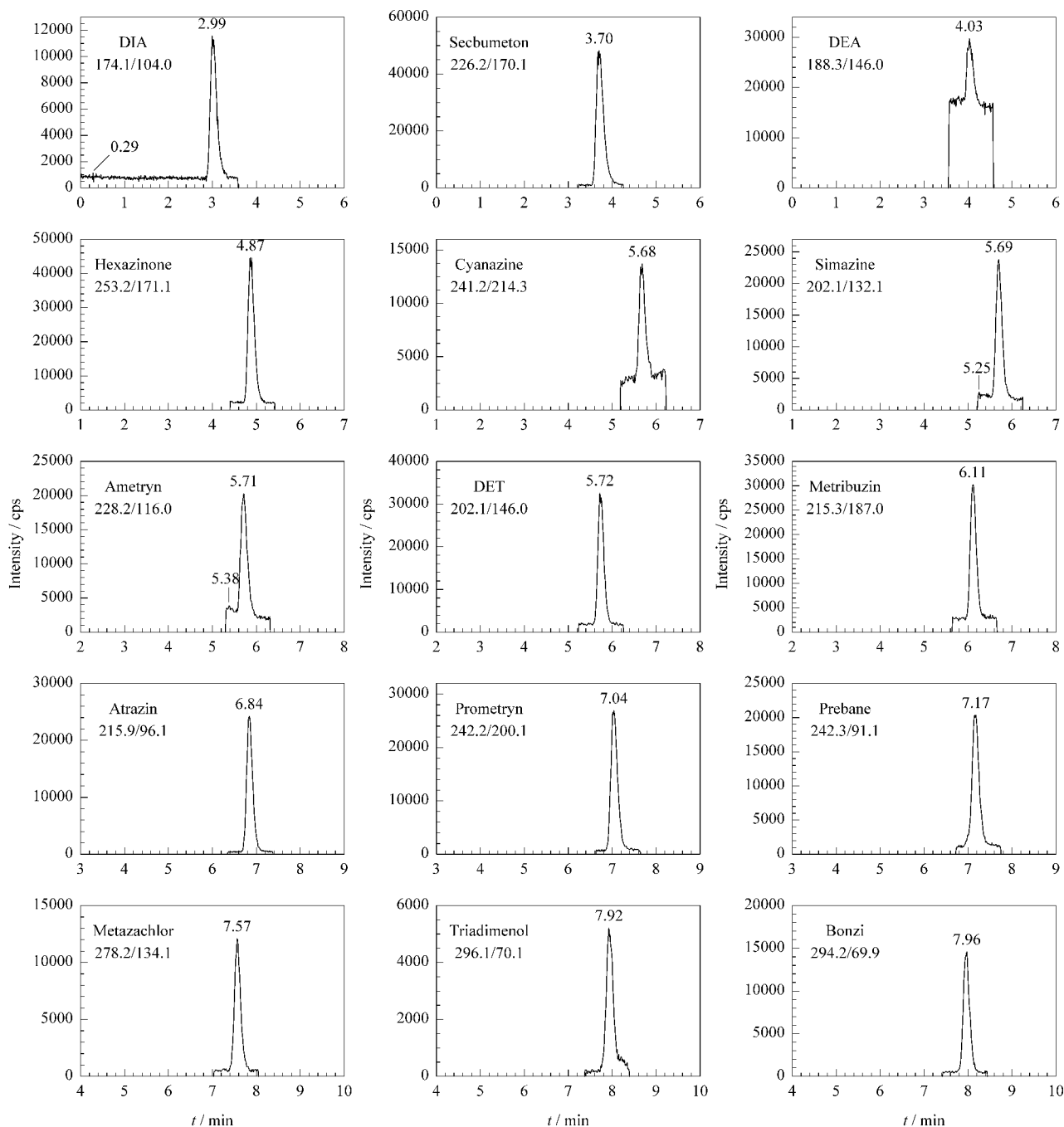


图 1(1) 28 种农药标准品在 MRM 模式下的 UPLC-MS/MS 谱图

Fig. 1(1) Chromatograms of the 28 pesticide standards by UPLC-MS/MS in MRM mode

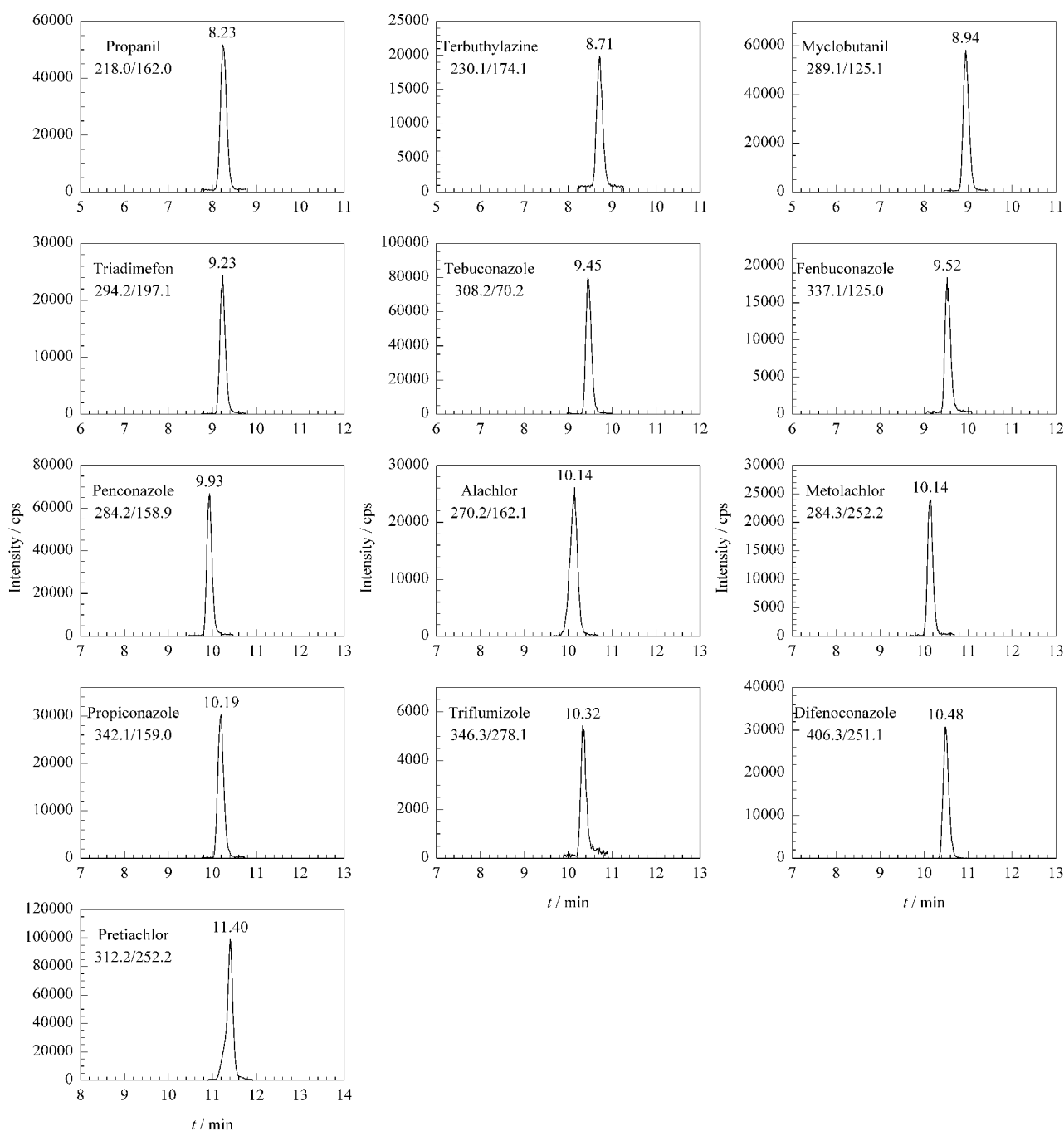


图1(II) 28种农药标准品在MRM模式下的UPLC-MS/MS谱图

Fig. 1(II) Chromatograms of the 28 pesticide standards by UPLC-MS/MS in MRM mode

2.2 样品前处理方法的优化

2.2.1 提取溶剂的选择

样品中痕量农药残留分析时采用的提取溶剂主要有乙腈、乙酸乙酯、丙酮、正己烷以及一些混合提取溶剂^[14]。本实验所检测农药的理化性质表明大部分农药在酸性介质中较稳定。本实验以三七样品中的加标回收率为指标,考察了含1%醋酸的乙腈、乙腈以及丙酮-正己烷(80:20, v/v)为提取溶剂时各农药的提取效率。结果表明,当使用丙酮-正己烷混合溶剂作提取溶剂时,90%农药的回收率均低于

50%;当使用乙腈时,西玛津、DET、多效唑及甲草胺的回收率低于70%;而采用含1%醋酸的乙腈时,大部分农药的回收率大于80%,且普遍大于以乙腈为提取溶剂时的提取回收率。因此选用的提取溶剂为含1%醋酸的乙腈。结果如表2所示。

2.2.2 净化条件的优化

与传统的SPE纯化方法不同,QuEChERS是把SPE的填料(PSA、Carbon-GCB(石墨化炭黑)、C18)和提取液混合达到净化的效果,然后再通过离心取上清液直接进色谱系统。该方法快速、简单、实惠、

有效、安全。QuEChERS 法最常用的吸附剂是 PSA, 这是因为 PSA 对复杂基质中的中等极性或极性范围较广的多种农药均具有良好的选择性。而 GCB 适合去除基质中的色素、甾醇类等杂质。由于中药材成分复杂, 为了达到满意的净化结果, 以 PSA 为吸附剂的基础上, 考察了不添加 GCB 及添加 GCB 对 28 种农药回收率的影响, 结果分别见表 3 中的方法 1 和方法 2。虽然添加吸附剂 GCB 可以使环嗪酮、噻草酮、扑草净等 11 种农药的回收率增高, 但其他 17 种农药的回收率都有所降低, 尤其是戊唑醇、腈苯唑以及苯醚甲环唑的回收率低于 70%, 不符合要求; 而单独使用 PSA 时, 28 种农药的回收率均大于 70%。因此确定单独使用 PSA 更适合对中药材中三唑类杀菌剂和三嗪类除草剂测定的样品净化处理。

表 2 不同提取溶剂对三七样品中农药加标回收率的影响
Table 2 Effects of different extraction solvents on the spiked recoveries of the pesticides in *Radix Notoginseng*

No.	Pesticide	Recoveries / %		
		Acetonitrile (containing 1% formic acid)	Acetonitrile	Acetone- hexane
1	DIA	80.1	76.1	42.1
2	sebumeton	83.9	81.2	28.6
3	pretiachlor	86.4	80.9	45.5
4	DEA	92.3	89.9	39.7
5	hexazinone	79.4	82.5	25.8
6	simazine	89.1	59.8	31.1
7	cyanazine	77.4	86.6	17.9
8	ametryn	88.4	79.4	45.3
9	DET	80.7	44.2	12.7
10	metribuzin	85.6	82.3	55.1
11	atrazin	106.5	74.4	27.0
12	prometryn	93.6	86.2	16.8
13	prebane	90.7	86.0	41.9
14	metazachlor	81.3	85.4	37.4
15	bonzi	79.2	65.3	46.2
16	triadimenol	80.5	81.4	14.5
17	propanil	93.1	86.3	11.7
18	terbuthylazine	85.6	74.2	46.2
19	myclobutanil	87.4	79.0	62.1
20	triadimefon	84.6	83.1	37.6
21	tebuconazole	89.3	123.6	50.7
22	fenbuconazole	88.2	81.5	58.9
23	penconazole	91.2	80.6	32.8
24	alachlor	96.7	67.8	45.9
25	metolachlor	102.8	75.4	43.2
26	propiconazole	83.9	118.7	36.6
27	triflumizole	97.5	86.6	20.4
28	difenoconazole	85.8	86.2	45.3

2.2.3 缓冲体系的选择

为了减弱某些对 pH 较为敏感农药的降解, QuEChERS 法需要加入缓冲盐, 目前最常用的是分别采用乙酸钠^[17]和柠檬酸钠^[18]作缓冲盐体系, 适用于不同 pH 的基质。为了获得更好的提取效果, 研究比较了乙酸钠和柠檬酸钠作缓冲体系时的回收率, 如表 3 中的方法 1 和方法 3 所示。结果表明, 当用柠檬酸钠作缓冲体系时, 只有敌稗、异丙甲草胺、西玛津及丙环唑的回收率大于 70%, 其余 24 种农药均不符合要求; 而使用乙酸钠时, 28 种农药的回收率均大于 70%。

表 3 3 种提取和净化方法对 28 种农药回收率的影响
Table 3 Effects of the recoveries of the 28 pesticides by the three extraction and clean-up methods

No.	Pesticide	Recoveries / %		
		Method 1*	Method 2*	Method 3*
1	DIA	104.7	95.3	66.7
2	sebumeton	81.1	75.9	53.6
3	pretiachlor	96.1	82.5	65.2
4	DEA	89.9	86.2	63.3
5	hexazinone	89.4	91.4	62.3
6	simazine	92.5	89.2	74.5
7	cyanazine	89.2	84.0	59.2
8	ametryn	89.4	75.6	59.4
9	DET	89.6	87.3	61.6
10	metribuzin	81.4	89.6	63.6
11	atrazin	83.0	82.3	61.3
12	prometryn	84.7	88.7	63.1
13	prebane	92.2	86.6	64.0
14	metazachlor	95.0	93.8	66.6
15	bonzi	83.2	99.7	67.8
16	triadimenol	78.5	83.8	56.2
17	propanil	94.9	76.6	76.5
18	terbuthylazine	85.6	87.2	60.1
19	myclobutanil	83.8	84.5	57.1
20	triadimefon	87.0	91.8	66.1
21	tebuconazole	73.9	60.1	51.7
22	fenbuconazole	85.8	65.0	57.8
23	penconazole	72.5	91.1	66.5
24	alachlor	89.0	95.9	68.0
25	metolachlor	95.3	99.1	75.5
26	propiconazole	87.2	96.8	77.0
27	triflumizole	95.0	81.5	50.0
28	difenoconazole	74.4	67.4	52.0

* Method 1: sodium acetate buffer system + PSA. Method 2: sodium acetate buffer system + PSA + GCB (graphitized carbon blacks). Method 3: sodium citrate buffer system + PSA.

2.2.4 PSA 用量对回收率的影响

考察了 PSA 的用量对农药回收率的影响。当 PSA 的加入量分别为 150、300、400、500 mg 时,以三七加标回收率为考察指标,图 2 显示的是部分农药的结果。可以看出:当 PSA 的加入量为 300 mg 时,各农药的回收率为最高。由于 PSA 同时含有伯胺和仲胺基团,具有弱阴离子交换能力,可以有效地与有机酸、色素等发生离子交换作用,对中药材基质中的相应成分具有较强的吸附能力,从而达到净化效果。但是增大 PSA 用量,虽然净化效果明显,但对农药也会产生吸附从而使回收率降低,不能满足检测要求。因此通过实验最终确定 PSA 的用量为 300 mg。

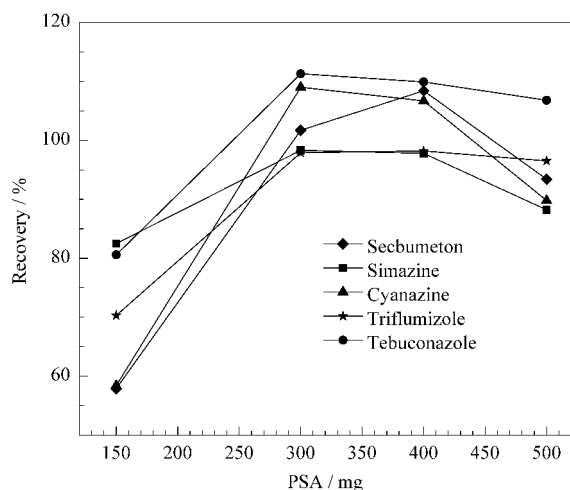


图2 不同 PSA 用量对 5 种农药回收率的影响
Fig. 2 Effect of the amount of PSA on the recoveries of the five pesticides

2.3 定性依据

每种农药标准品选择 1 个母离子、2 个以上子离子(其中响应值最高的峰为定量离子峰,次高峰为定性离子峰),在相同实验条件下,能够保证样品中待测物的保留时间与相应标准品的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内;同时样品中各农药定性离子的相对丰度与相应标准品定性离子的相对丰度必须符合下述标准:相对丰度大于 50%,偏差在 $\pm 10\%$;相对丰度为 20%~50%,偏差在 $\pm 15\%$;相对丰度小于 10%,偏差在 $\pm 50\%$ 。表 1 中选择的 28 种待测物的母离子及子离子均符合上述定性要求。

2.4 方法学确证

2.4.1 基质效应

分别以三七、西洋参、甘草、人参及丹参的空白提取液作为标准溶液的稀释液,以各组分的峰面积(Y)对质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)绘制基质加标标准曲

线,将其斜率与标准品的标准曲线的斜率相比,斜率比为 80%~120%。结果表明三七、西洋参等 5 种中药材对各农药的基质效应影响不明显。

2.4.2 线性关系、检出限和定量限

将混合标准溶液逐级稀释,在 1.4.1 节、1.4.2 节条件下测定。以各组分的峰面积(Y)对质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)绘制标准曲线。结果表明,10 种三唑类杀菌剂和 18 种三嗪类除草剂在各自的浓度范围内线性关系良好($r \geq 0.999$),可以满足定量分析的要求。以 $S/N \geq 10$ 确立方法的定量限为 0.20~5.52 $\mu\text{g/kg}$,以 $S/N \geq 3$ 确立方法的检出限为 0.10~2.57 $\mu\text{g/kg}$ 。28 种农药的线性关系、检出限和定量限见表 4。

2.4.3 回收率和精密度

分别在定量限、5 倍定量限及 10 倍定量限 3 个水平下进行空白加标回收率试验,每个水平重复 6 次,测定平均回收率及精密度,结果见表 4。低添加水平时农药的回收率为 70.8%~125.7%,RSD 为 1.2%~14.2%;中等添加水平时农药的回收率为 70.7%~112.4%,RSD 为 1.1%~13.8%;高添加水平时农药的回收率为 70.6%~116.7%,RSD 为 0.5%~7.9%,均符合残留检测的要求^[19,20]。

2.5 实际样品的测定

按本方法分析测定了 5 种常用根类中药材甘草、西洋参、丹参、三七和人参等共 43 个药材。在 39 个药材中检出农药残留,检出率高达 90%,但其残留量均低于“日本肯定列表制度”^[21]中的相关规定。18 种三嗪类除草剂中有 9 种被检出,其中异丙甲草胺、扑草净、特丁净及环嗪酮 4 种农药易在中药材中残留,且其不同种类的药材中残留情况也不一样,如特丁津、特丁净在西洋参及三七 2 种中药材中检出率高达 90%,而在其他 3 种中药材中未检出。环嗪酮仅在丹参中检出,其余 4 种药材均未检出,但其残留量都低于 0.01 mg/kg 。10 种三唑类杀菌剂中有 8 种杀菌剂在中药材中有不同程度的残留,尤其是三唑醇在三七中残留量最高,为 0.0246~0.1900 mg/kg ,低于 CAC 规定的三唑醇的 MRL (0.5 mg/kg),其余三唑类杀菌剂的残留量均低于 0.01 mg/kg 。分析结果发现三唑类杀菌剂残留情况高于三嗪类除草剂,这可能与储存药材时使用较多的杀菌剂有关,这类农药虽然对人类的急性毒性不大,但是其在中药材内不易分解,残留期长,进入人体内会长期积累造成慢性中毒的后果。

表 4 28 种农药的检出限、定量限、线性范围、相关系数、不同添加水平下的加标回收率及精密度

Table 4 LODs, LOQs, linear ranges, correlation coefficients (r), recoveries and relative standard deviations of the 28 pesticides

No.	Pesticide	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Linear range/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	r	Recoveries (RSD) /% ($n=6$)		
						Spiked at LOQ	Spiked at 5LOQ	Spiked at 10LOQ
1	DIA	0.80	4.00	0.800–40.0	0.9999	81.9(5.4)	74.8(1.3)	70.6(3.0)
2	seebumeton	1.01	2.02	0.405–20.24	0.9999	102.9(3.3)	94.5(1.9)	99.1(1.3)
3	DEA	0.20	1.00	0.200–10.0	0.9993	91.9(7.7)	75.3(7.0)	73.2(2.2)
4	hexazinone	0.97	1.94	0.389–19.44	0.9998	94.8(3.2)	85.0(3.4)	82.1(3.6)
5	simazine	0.68	3.38	0.676–33.8	0.9999	89.0(6.1)	77.7(2.5)	79.4(1.0)
6	cyanazine	0.92	1.85	0.370–18.48	0.9996	86.2(3.4)	73.4(2.6)	77.7(0.8)
7	ametryn	1.10	5.52	1.104–55.2	0.9998	125.7(14.2)	94.9(3.6)	100.2(1.7)
8	DET	0.20	1.00	0.200–10.0	0.9999	90.2(9.6)	74.0(8.3)	73.5(0.7)
9	metribuzin	2.57	5.14	1.028–51.4	0.9999	86.6(3.9)	78.2(3.4)	79.6(3.1)
10	atrazin	1.03	5.14	1.028–51.4	0.9996	118.6(12.2)	86.2(4.7)	85.4(0.7)
11	prometryn	0.21	1.02	0.205–10.24	0.9999	105.0(2.9)	93.1(2.5)	94.3(1.5)
12	prebanc	0.39	1.94	0.102–5.12	0.9998	110.1(2.5)	112.9(4.3)	105.9(4.6)
13	metazachlor	0.50	1.07	0.214–10.68	0.9998	101.2(7.2)	100.5(2.1)	116.7(1.2)
14	bonzi	0.21	1.03	0.206–10.32	0.9997	75.9(11.2)	75.7(13.6)	99.9(7.9)
15	triadimenol	0.08	0.38	0.076–3.784	0.9993	101.3(11.0)	94.8(13.8)	105.7(3.1)
16	propanil	0.40	1.98	0.397–19.8	0.9997	100.8(2.7)	93.3(1.7)	98.2(2.9)
17	terbuthylazine	1.02	0.51	0.389–19.44	0.9999	77.9(5.4)	74.5(2.5)	72.9(1.2)
18	myclobutanil	0.22	1.09	0.218–10.88	0.9998	109.6(3.4)	99.7(2.3)	104.5(1.0)
19	triadimefon	0.59	2.95	0.59–29.5	0.9996	114.3(8.4)	104.8(5.2)	100.8(3.1)
20	tebuconazole	0.094	0.47	0.094–4.68	0.9997	116.4(11.2)	100.2(2.0)	99.2(1.2)
21	fenbuconazole	0.22	2.00	0.400–20.0	0.9997	107.3(4.8)	97.7(2.3)	103.7(2.0)
22	penconazole	0.97	4.86	0.972–48.6	0.9996	106.7(1.2)	95.9(2.5)	101.5(0.5)
23	alachlor	1.19	2.38	0.475–23.76	0.9996	102.6(1.4)	90.6(2.2)	97.7(1.4)
24	metolachlor	0.10	0.50	0.100–5.0	0.9998	92.1(4.8)	95.8(1.3)	101.4(1.7)
25	propiconazole	1.01	2.02	0.404–20.2	0.9997	96.4(4.1)	93.4(2.1)	100.9(2.7)
26	triflumizole	0.10	0.20	0.040–2.004	0.9999	102.1(8.9)	83.4(1.1)	87.9(1.3)
27	difenoconazole	0.046	0.23	0.046–2.304	0.9996	82.1(6.5)	79.1(1.7)	104.6(2.6)
28	pretiachlor	0.20	1.00	0.200–10.0	0.9997	70.8(14.0)	70.7(6.9)	78.1(4.7)

3 结论

本研究通过对中药材中三唑类杀菌剂和三嗪类除草剂的提取、分离、净化等试验,建立了超高效液相色谱-串联质谱同时对三七等 5 种中药材中 10 种三唑类杀菌剂和 18 种三嗪类除草剂残留分析的方法,能够对农药残留量进行准确的定性及定量,并应用于实际样品的测定。该方法样品前处理简单,线性关系良好,精密度、准确度与回收率均符合要求,可用于中药材中三唑类杀菌剂与三嗪类除草剂农药残留的快速筛查。

参考文献:

- [1] Wang X C, Jiao X C. Agrochemical (王晓春, 焦杏春. 农药), 2011, 50(5): 11
- [2] Baranowska I, Barchanska H, Pacak E. Environ Pollut, 2006, 143: 206
- [3] Hernandez F, Sancho J V, Ibanez, et al. Trends Anal Chem, 2008, 27(10): 863
- [4] Lin W X. The Compilation of Residue Limits Standards for Pesticides and Veterinary Drugs in Foodstuffs in the World. Dalian: Dalian Maritime University Press (林维宣. 各国食品中农药兽药残留限量规定. 大连: 大连海事大学出版社), 2002
- [5] Zhang X Z, Ma X D, Zhang W G, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (张新忠, 马晓东, 张伟国, 等. 分析化学), 2008, 36(6): 781
- [6] Ren J, Huang C L, Zhao G D, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (任晋, 黄翠玲, 赵国栋, 等. 分析化学), 2001, 29(8): 876
- [7] Li Y Z, Zhang R, Wang H T, et al. Journal of Instrumental Analysis (李育左, 张睿, 王海涛, 等. 分析测试学报), 2009, 28(3): 315
- [8] Qi Y, Zhan C R, Zhang X Z, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (祁彦, 占春瑞, 张新忠, 等. 分析化学), 2006, 34(6): 787
- [9] Shen W J, Gui Q W, Yu K Y, et al. Chinese Journal of Chroma-

- tography (沈伟健, 桂茜雯, 余可垚, 等. 色谱), 2009, 27(1): 91
- [10] Li J G, Wang Y F, Shi J W, et al. Chinese Journal of Chromatography (李继革, 王玉飞, 施家威, 等. 色谱), 2012, 30(3): 262
- [11] Wang Y, Jin H Y, Ma S C, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 334
- [12] Yang X, Zhang H, Liu Y, et al. Food Chem, 2011, 127: 855
- [13] Chen L N, Song F R, Liu Z Q. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society (陈丽娜, 宋凤瑞, 刘志强. 质谱学报), 2010, 31(6): 342
- [14] Cao Z Y, Mou R X, Ying X H, et al. Journal of Instrumental Analysis (曹赵云, 牟仁祥, 应兴华, 等. 分析测试学报), 2010, 29(10): 1030
- [15] Pihlström T, Blomkvist G, Friman P, et al. Anal Bioanal Chem, 2007, 389: 1773
- [16] Yang Y Z, Wu G P, Jiao B N. Modern Agrochemicals (杨玉柱, 吴桂苹, 焦必宁. 现代农药), 2007, 6(1): 34
- [17] AOAC Official Method 2007.01
- [18] EN 15662-2008
- [19] SN/T 0001-1995
- [20] 2002/657/EC
- [21] WTO/TBT-SPS Notification and Enquiry of China. Query Database of Japan Positive List (中国技术贸易措施网. 日本肯定列表制度查询库). [2012-04-09]. <http://www.tbtsps.com/foodstuff/xbz/Pages/japan.aspx>