

GC-MS 法测定白芍总苷原料药中 22 种有机氯类农药残留量

沈君子¹, 武晓剑¹, 殷红², 陈永建², 马长雨², 钱勇^{3,4*}

(1. 上海佰年诗丹德检测技术有限公司, 上海 201314; 2. 宁波立华制药有限公司, 浙江 宁波 315174; 3. 上海诗丹德标准技术服务有限公司, 上海 201314; 4. 国家中药现代化工程技术研究中心中药标准分中心, 上海 201314)

摘要: 目的 建立 GC-MS 法测定白芍总苷原料药中 22 种有机氯类农药残留量。方法 采用甲苯提取、凝胶净化处理白芍总苷原料药样品, GC-MS 选择离子模式 (SIM) 对农药特征离子扫描检测。结果 22 种有机氯类农药在各自的范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9933$), 回收率 58%~104%, RSD 6%~19%。结论 该方法操作简易、准确可靠、灵敏度高可用于白芍总苷原料药中 22 种农药残留的同时测定。

关键词: 白芍总苷原料药; 有机氯类农药; 凝胶; GC-MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)03-0820-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.050

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。夏、秋二季采挖, 洗净, 除去头尾和细根, 置沸水中煮后除去外皮或去皮后再煮, 晒干。白芍具养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳的功能。用于血虚萎黄、月经不调、自汗、盗汗、胁痛、腹痛、四肢挛痛、头痛眩晕^[1]。白芍在种植过程中易感染多种病虫害且发病率高, 滥用农药造成了白芍的直接污染, 此外, 白芍生长周期长(一般 3~4 年^[2]), 土壤和空气中残留的农药容易在植物组织中富集, 又会对白芍产生间接污染^[3]。杜雪纯等^[4]通过 CE-MS 建立了一种测试白芍中 19 种有机氮类农药残留的方法。程玲等^[5]通过大体积进样-气相色谱-质谱联用方法建立了一种测试白芍中有机氯、有机磷和拟除虫菊酯类等 15 种农药残留的方法。刘小勤等^[6]建立的 SPE 净化和 GC-QqQ-MS 相结合的检测方法适用于白芍中多农药残留的同时筛查测定。

随着我国药品标准提高计划的实施和不断推进, 国家药品标准体系已初步建立, 药品监管信息化建设步伐加快, 药品标准管理工作更加趋于规范和完善。但中药提取物标准化工作仍显得相对滞后。白芍总苷原料药, 是宁波立华制药有限公司将白芍饮片经过乙醇提取, 乙酸乙酯、正丁醇萃取后得到的白芍浓缩干燥粉末^[7]。浦锦宝等^[8]对白芍总苷原料药中芍药苷及总皂苷的含量研究发现, 其中芍药苷含量均大于 15%, 总皂苷的含量均大于 60%。贺妮等^[9]研究发现白芍总苷原料药对小鼠有抗抑郁及抗炎作用, 可能通过影响中枢单胺神经功能对抑郁及炎症进行调节。杨德芳等^[10]研究发现当归/白芍组提取物可通过抑制子宫收

缩, 改善子宫供血, 从而对原发性痛经产生治疗作用。目前针对白芍中农药残留的报道较多, 尚未见有关白芍总苷原料药测试农药残留方面的资料。白芍总苷原料药中主要成分为皂苷类, 极性大, 如参考常规药材前处理方法用酸水浸泡或乙腈等极性较大的溶剂对农药残留进行提取, 会将皂苷类成分同时萃取出来, 干扰农药残留的检测。本实验采用甲苯提取、硅胶净化, 建立 GC-MS 法测定白芍总苷原料药中 22 种有机氯类农药的残留量, 以期对白芍总苷原料药标准制订和质量控制提供依据。

1 材料

Agilent 7890A/5977AGC-MS 联用仪 (美国安捷伦公司); FA2004 电子天平、XS205 电子天平 (瑞士梅特勒托利多公司); L500 离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 氮吹仪 (美国 Organomation Assoc. INC 公司); W2-100SP 恒温水浴锅 (上海申生科技有限公司); Vortex Genins3 涡旋振荡器 (德国 IKA 公司)。

农药对照品 α -六六六、六氯苯、 β -六六六、 γ -六六六、五氯硝基苯、 δ -六六六、七氯、艾氏剂、氧化氯丹、顺式环氧七氯、反式环氧七氯、反式氯丹、 β -硫丹、顺式氯丹、4, 4'-滴滴伊、狄氏剂、异狄氏剂、 α -硫丹、4, 4'-滴滴滴、2, 4'-滴滴涕、4, 4'-滴滴涕、硫丹硫酸盐 (上海安谱实验科技股份有限公司)。白芍总苷原料药 (批号 171209, 宁波立华制药有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 称取 22 种对照品 10 mg, 精密称定,

收稿日期: 2019-09-16

基金项目: 上海市科委科研计划项目 (18DZ2291600)

作者简介: 沈君子 (1985—), 女, 硕士, 中级工程师, 研究方向为药品分析检测。Tel: 15821341108, E-mail: shenjj@nature-standard.com

* 通信作者: 钱勇, 高级工程师, 研究方向为天然产物分离及合成。E-mail: cary@nature-standard.com

置于10 mL量瓶中,用丙酮溶解并定容至刻度,配置成1 mg/mL贮备液;取100 μL贮备液,用丙酮定容至10 mL,制备成质量浓度为10 μg/mL的溶液,取1 mL,用丙酮稀释至10 mL,得1 μg/mL混合对照品溶液。

2.1.2 基质标准曲线溶液 提取物直接取样,称取供试品2 g,称定,置15 mL具塞离心管中,加入10 mL甲苯,分别加入混合对照品溶液10、20、40、100、200、400、800 μL,超声20 min,4 000 r/min,离心5 min,取上清液至15 mL离心管中,加入无水硫酸镁900 mg,硅胶300 mg,涡旋1 min,4 000 r/min,离心5 min,取上清液,置于40 ℃水浴中氮吹至干,加入甲苯2 mL定容,经0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液即得。

2.2 供试品溶液 提取物直接取样,称取供试品2 g,称定,置15 mL具塞离心管中,加入10 mL甲苯,超声20 min,4 000 r/min离心5 min,取上清液至15 mL离心管中,加入无水硫酸镁900 mg,硅胶300 mg,涡旋1 min,4 000 r/min离心5 min,取上清液,置于40 ℃水浴中氮吹至干,加入甲苯2 mL定容,经0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液即得。

2.3 色谱条件 HP-5MS色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm);程序升温(60 ℃维持2 min,以16 ℃/min升至150 ℃维持0 min,以10 ℃/min升至200 ℃维持0 min,以3 ℃/min升至220 ℃维持0 min,以25 ℃/min升至290 ℃维持8 min);进样口温度250 ℃;进样量1 μL;载气体积流量1 mL/min;分流模式不分流。

2.4 质谱条件 离子源电子轰击源(EI);离子源温度230 ℃;质谱传接口温度280 ℃;质谱监测模式SIM,监测离子结果见表1。

表1 22种有机氯类农药残留质谱监测离子结果

农药	t_R /min	离子-1	离子-2	离子-3
α-六六六	12.285	219	183	181
六氯苯	12.435	284	286	282
五氯硝基苯	13.043	237	249	265
β-六六六	12.827	181	183	219
γ-六六六	12.935	181	183	219
δ-六六六	13.468	219	181	183
七氯	14.553	274	272	100
艾氏剂	15.454	262.8	260.8	292.9
氧化氯丹	16.680	386.8	388.8	390.8
顺式环氧七氯	16.680	353	351	355
反式环氧七氯	16.765	185	183	253
顺式氯丹	17.905	372.8	374.8	376.8
反式氯丹	17.393	372.8	236.8	271.8
β-硫丹	17.798	339	240.9	195.0
4,4'-滴滴伊	18.701	246	318	176
狄氏剂	18.711	277	263	79
2,4'-滴滴涕	20.179	235	237	165
4,4'-滴滴涕	20.928	237	235	165
异狄氏剂	19.498	243	281	263
α-硫丹	19.814	194.9	240.9	338.8
4,4'-滴滴滴	20.118	235	237	165
硫丹硫酸酯	20.847	272	274	270

2.5 结果计算 基质标准曲线外标法。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 取“2.1.2”项下基质标准曲线溶液,在“2.3”“2.4”条件下测定,以信号强度为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行回归,结果见表2,表明各成分在各自范围内线性关系良好。

表2 22种有机氯类农药残留线性关系

农药	回归方程	r	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)
α-六六六	$Y=36.923\ 3X+215.182\ 5$	0.997 9	6~443
六氯苯	$Y=62.912\ 0X+282.539\ 5$	0.998 3	5~431
β-六六六	$Y=29.136\ 3X+2\ 001.600\ 3$	0.997 3	6~447
γ-六六六	$Y=30.208\ 8X+825.254\ 7$	0.998 7	6~449
五氯硝基苯	$Y=15.886\ 8X+73.872\ 3$	0.998 3	6~452
δ-六六六	$Y=23.398\ 1X+19.044\ 4$	0.998 9	5~410
七氯	$Y=18.698\ 2X+57.958\ 0$	0.998 8	5~432
艾氏剂	$Y=16.807\ 5X+113.616\ 9$	0.998 3	5~400
顺式环氧七氯	$Y=3.525\ 7X-3.433\ 6$	0.996 9	5~370
氧化氯丹	$Y=6.480\ 6X+33.808\ 7$	0.997 3	5~400
反式环氧七氯	$Y=6.286\ 0X-58.197\ 0$	0.996 4	4~353
反式氯丹	$Y=41.118\ 2X+138.810\ 6$	0.998 3	5~417
β-硫丹	$Y=1.041\ 0X+18.109\ 6$	0.998 0	4~337
顺式氯丹	$Y=35.286\ 5X+170.828\ 4$	0.998 7	4~293
4,4'-DDE	$Y=57.944\ 6X+439.507\ 4$	0.996 7	5~400
狄氏剂	$Y=6.117\ 7X+27.119\ 1$	0.997 3	5~400
异狄氏剂	$Y=4.144\ 6X+89.975\ 1$	0.996 7	5~400
α-硫丹	$Y=5.485\ 3X-48.815\ 8$	0.993 3	1~112
4,4'-DDD	$Y=105.926\ 8X+455.820\ 0$	0.997 6	5~423
2,4'-DDT	$Y=92.411\ 8X-62.435\ 1$	0.997 0	6~454
硫丹硫酸盐	$Y=13.385\ 3X+84.448\ 0$	0.996 1	5~409
4,4'-DDT	$Y=50.499\ 4X+140.410\ 0$	0.995 8	5~402

2.6.2 精密度试验 考察不同日期、不同分析人员对精密度的影响,2个检测人员对重复性下浓度的各6份平行进行检测,RSD 6%~19%,均不大于32%,表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 药材粉碎过3号筛,按“2.1”项下方法制备供试品溶液;在“2.3”“2.4”条件下测定,22种农药RSD为5%~13%,表明该方法重复性良好。

2.6.4 加样回收率试验 提取物直接取样,称取供试品2 g,称定,按“2.1”项下方法制备供试品溶液;在“2.3”“2.4”条件下测定,计算每种农药的平均回收率,结果见表3。

2.6.5 定量限 在“2.3”“2.4”条件下,把已知低浓度试样测出的信号与空白样品测出的信号进行比较,计算出能被可靠地检测出的被测物质最低浓度,制备估算浓度的加标样品6份,考察定量限浓度下的准确度和精密度,结果见表3,每种农药的定量限未超过2015年版《中国药典》四部通则2341第二法规定限值。

表3 22种有机氯类农药残留在白芍总苷原料药中的定量限

农药	定量限/ (mg·kg ⁻¹)	回收率/%	规定限值/ (mg·kg ⁻¹)
α-六六六	0.04	64	0.2(总)
六氯苯	0.04	65	0.1
β-六六六	0.04	116	0.2(总)
γ-六六六	0.04	69	0.2(总)
五氯硝基苯	0.01	114	0.1
δ-六六六	0.04	99	0.2(总)
七氯	0.01	82	0.05(总)
艾氏剂	0.01	124	0.05(总)
顺式环氧七氯	0.01	119	0.05(总)
氧化氯丹	0.01	91	0.05(总)
反式环氧七氯	0.01	68	0.05(总)
反式氯丹	0.01	82	0.05(总)
β-硫丹	0.01	67	3(总)
顺式氯丹	0.01	78	0.05(总)
4,4'-DDE	0.01	93	0.2(总)
狄氏剂	0.01	110	0.05(总)
异狄氏剂	0.01	128	0.05(总)
α-硫丹	0.01	119	3(总)
4,4'-DDD	0.01	95	0.2(总)
2,4'-DDT	0.01	97	0.2(总)
硫丹硫酸盐	0.01	114	0.2(总)
4,4'-DDT	0.01	62	3(总)

2.6.6 耐用性考察

2.6.6.1 不同填料对方法耐用性的影响 准备无水硫酸镁900 mg、硅胶300 mg至15 mL具塞离心管中；无水硫酸镁900 mg至另一支10 mL具塞离心管中；市售农残净化管，分别加入6 mL甲苯、农残混合对照品100 μL，涡旋1 min，4 000 r/min离心5 min，取上清液，置氮吹仪上40℃水浴氮吹至干，加甲苯1 mL，涡旋混匀，经0.22 μm微孔滤膜过滤，取滤液即得，在“2.3”“2.4”条件下检测；对比市售农残净化管、无水硫酸镁+硅胶、无水硫酸镁的回收率，考察填料不同对方法的影响。结果见表4，表明单独使用无水硫酸镁无法很好净化白芍药材基质对于农药的干扰，农残净化管与无水硫酸镁+硅胶的净化效果相当。

2.6.6.2 对照品溶液稳定性 制备混合对照品溶液，分别考察在2、4、6、10、14、17、30 h内离子丰度变化；以2 h为对照，核查不同时间内的回收率，在85%~115%范围内判断为符合验收标准。结果显示，除艾氏剂在30 h时，回收率降低至82%，其余化合物在30 h内基本稳定。

2.6.6.3 供试品溶液稳定性 空白样品被证实22种农药残留均低于检出限，因此改为考察加标供试品溶液的稳定性。制备药材加标溶液，分别考察在2、4、6、10、14、17、30 h内离子丰度变化；以0 h为对照，核查不同时间内的回收率，在85%~115%范围内判断为符合验收标准。

表4 不同填料对方法耐用性的影响

农药	农残净化管回收率/无水硫酸镁+硅胶回收率	无水硫酸镁回收率/无水硫酸镁+硅胶回收率
	α-六六六	0.93
六氯苯	1.03	1.23
β-六六六	0.89	1.40
γ-六六六	0.93	1.27
五氯硝基苯	0.95	1.40
δ-六六六	0.80	1.22
七氯	0.86	1.39
艾氏剂	0.85	1.24
顺式环氧七氯	0.71	1.15
氧化氯丹	0.80	1.39
反式环氧七氯	0.79	1.10
反式氯丹	0.86	1.26
β-硫丹	0.89	1.37
顺式氯丹	0.84	1.22
4,4'-DDE	0.86	1.23
狄氏剂	0.93	1.45
异狄氏剂	0.95	1.45
α-硫丹	0.85	1.50
4,4'-DDD	0.82	1.75
2,4'-DDT	0.80	1.55
4,4'-DDT	0.82	1.53
硫丹硫酸盐	0.88	1.11

结果显示，供试品溶液中4,4'-滴滴涕从2 h开始回收率降低、β-硫丹第6 h开始回收率不稳定、异狄氏剂第17 h开始回收率不稳定，其余化合物基本符合要求；建议供试品溶液制备2 h内完成检测。

2.6.6.4 载气体积流量 将设备载气体积流量分别设置为0.8、1.2 mL/min，其他参数不变，选择五氯硝基苯和六氯苯作为代表农药，考察回收率，在85%~115%范围内判断为符合验收标准。0.8~1.2 mL/min的体积流量对加标供试品溶液中五氯硝基苯、六氯苯无影响，见表5。

表5 不同载气体积流量、初始柱温、进样口温度对方法耐用性的影响

改变条件	回收率/%	
	五氯硝基苯	六氯苯
载气体积流量/(mL·min ⁻¹)	0.8	103
	1.2	97
初始柱温/℃	50	94
	70	87
进样口温度/℃	240	99
	260	103
		104

2.6.6.5 初始柱温 将设备初始柱温分别设置为50、70℃，其他参数不变，选择五氯硝基苯和六氯苯作为代表农药，考察回收率，在85%~115%范围内判断为符合验收标准。不同初始柱温对加标供试品溶液中五氯硝基苯基本

无影响,当初始柱温设置为 50 ℃时,对药材加标溶液中六氯苯的回收无影响;当初始柱温设置为 70 ℃时,六氯苯无回收,见表 5。

2.6.6.6 进样口温度 将设备进样口温度分别设置为 240、260 ℃,其他参数不变,选择五氯硝基苯和六氯苯作为代表农药,考察回收率,在 85%~115% 范围内判断为符合验收标准。不同进样口温度对加标供试品溶液中五氯硝基苯、六氯苯基本无影响,见表 5。

3 讨论

白芍总苷原料药制备过程中使用到乙醇、正丁醇、乙酸乙酯,为了减少基质干扰,会避免用该 3 种溶剂对样品进行处理,参考文献 [11] 中方法,最终用甲苯作为提取溶剂。

比较固相萃取净化管、无水硫酸镁+硅胶、无水硫酸镁等不同填料对 22 种有机氯类农药残留的净化效果,发现单独使用无水硫酸镁无法很好净化白芍药材基质对于农药的干扰,农残净化管的净化效果虽然与无水硫酸镁+硅胶相当,但大部分的农药回收率低于无水硫酸镁+硅胶做出来的回收率,这与农残净化管中多种填料在一起,可能对目标成分产生抑制作用有关。农药残留分析过程中的前处理是整个分析的关键所在,目前用的较多的为凝胶渗透色谱法,该方法可除去供试品溶液基质中的大分子干扰物,适用于更多种复杂基质,但成本较高,本方法采用静态吸附去杂方法,成本低,操作简易,且净化效果好。

本研究比较了不同载气体积流量、柱温、进样口温度对方法耐用性的影响,发现不同载气体积流量及不同进样口温度对五氯硝基苯及六氯苯的回收率无影响,降低初始柱温对五氯硝基苯及六氯苯的回收率无影响,当初始柱温升高至 70 ℃时,六氯苯无回收,初始柱温不能设置过高。

本研究用甲苯进行提取,硅胶及无水硫酸镁填料对提取溶液进行净化,结合 GC-MS 进行检测,建立了白芍总苷原料药中 22 种有机氯类农药残留同时检测的分析方法。采用基质标准曲线外标法定量对基质效应进行一定的补偿。

该方法操作简易、准确可靠、灵敏度高,可用于白芍总苷原料药中 22 种农药残留的同时测定,对于富含皂苷类成分的其他中药及中药提取物的农残检测具有借鉴作用。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 杨 斌, 李宪红, 郭翠玲. 白芍高产栽培技术[J]. 现代农业科技, 2013(13): 115; 121.
- [3] 王丽丽, 夏会龙. 我国中草药中农药残留的特点[J]. 中草药, 2007, 38(3): 471-474.
- [4] 杜雪纯, 徐毅敏, 季 申, 等. 白芍中 19 种农药残留的毛细管电泳-质谱联用检测方法[J]. 浙江大学学报(医学版), 2012, 41(1): 25-31.
- [5] 程 玲, 徐毅敏, 季 申, 等. 大体积进样-气相色谱-质谱法测定白芍中 15 种农药残留[J]. 浙江大学学报(医学版), 2012, 41(1): 19-24.
- [6] 刘小勤, 佟 玲, 孟文婷, 等. 气相色谱-三重四极杆串联质谱法测定白芍中 99 种农药残留[J]. 色谱, 2015, 33(8): 869-877.
- [7] 陆静娴, 李文庭, 祝 明, 等. GC 测定白芍总苷原料药中有机溶剂残留[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(11): 1709-1712.
- [8] 浦锦宝, 郑军献, 梁卫青, 等. 白芍提取物中芍药苷及总皂苷的含量测定[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(4): 326-327.
- [9] 贺 妮, 侯 宇, 柏 慧, 等. 白芍提取物抗抑郁及抗炎作用的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(3): 348-352.
- [10] 杨德芳, 张 岩, 韩 莹. 不同配制比例的当归/白芍提取物对原发性痛经大鼠的作用研究[J]. 四川中医, 2018, 36(8): 31-33.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版四部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.