

UHPLC-MS/MS 同时测定白芷中 34 种植物生长调节剂残留量

褚悟男¹, 李翔^{2,3}, 韩玲玲^{2,3}, 蒲婧哲^{2,3}, 翟宏焱^{2,3}, 王浩^{2,3}, 张亚中^{2,3,4*} (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051; 3.国家药监局中药质量研究与评价重点实验室, 合肥 230051; 4.中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 合肥 230051)

摘要: 目的 基于 UHPLC-MS/MS 建立同时测定白芷中 34 种植物生长调节剂残留量的分析方法。方法 样品通过乙腈高速匀浆提取, 浓缩后直接进样, 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)色谱柱, 流动相 0.1%甲酸水溶液含 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵(A)-乙腈(B), 用基质匹配标液外标法进行定量。结果 34 种植物生长调节剂在基质中的线性关系良好, 相关系数均>0.995, 检出限为 0.01~9.26 μg·kg⁻¹, 平均回收率为 72.4%~100.6%, RSD 均<15%。采用该法对 35 批白芷样品中的植物生长调节剂残留情况进行筛查, 其中 19 批样品中检测出 6 种植物生长调节剂。结论 建立的植物生长调节剂多残留检测方法灵敏度高, 准确性好, 有针对性, 且前处理简单快速, 可用于筛查和检测白芷中植物生长调节剂多残留量。

关键词: 植物生长调节剂; 白芷; 残留量; 超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)06-0783-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222581

引用本文: 褚悟男, 李翔, 韩玲玲, 等. UHPLC-MS/MS 同时测定白芷中 34 种植物生长调节剂残留量[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 783-791.

Simultaneous Determination of 34 Plant Growth Regulator Residues in Angelicae Dahuricae Radix by UHPLC-MS/MS

CHU Wunan¹, LI Xiang^{2,3}, HAN Lingling^{2,3}, PU Jingzhe^{2,3}, ZHAI Hongyan^{2,3}, WANG Hao^{2,3}, ZHANG Yazhong^{2,3,4*} (1.School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2.Anhui Institute of Food and Drug Control, Hefei 230051, China; 3.NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230051, China; 4.Anhui Provincial Key Laboratory of New Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Hefei 230051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an analytical method for the simultaneous determination of 34 plant growth regulators residues in Angelicae Dahuricae Radix based on UHPLC-MS/MS. **METHODS** The samples were extracted by acetonitrile high-speed homogenization, concentrated, injected directly without purification method, separated by a Waters Acquity UPLC HSS T3(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) column with mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution containing 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate(A)-acetonitrile(B). The matrix-matched external standard method was used for quantitative analysis. **RESULTS** The calibration curves of 34 plant growth regulators showed good linearity with correlation coefficients >0.995. The limits of detection were 0.01~9.26 μg·kg⁻¹, and average recoveries of 72.4%~100.6%, the RSD <15%. The plant growth regulators in 35 batches of Angelicae Dahuricae Radix were analyzed by this method. **CONCLUSION** The established method is sensitive, accurate, targeted, and simple with rapid pre-treatment, and can be used for screening and detection of plant growth regulator multi-residues in Angelicae Dahuricae Radix.

KEYWORDS: plant growth regulator; Angelicae Dahuricae Radix; residue; UHPLC-MS/MS

中药材主要来源于自然界的药用植物, 而随着中药材需求的不断增加, 人工栽培的药用植物逐渐成为了中药材的主要来源。药用植物在种植过程中存在化肥、农药和植物生长调节剂不合理使用的情况, 对中药材的安全和质量均产生一定的影响^[1-2]。植物生长调节剂是具有植物激素活性

的一类物质^[3], 可以促进药用植物的生长发育, 增强植物抗逆性, 增加药材产量^[4]。但植物生长调节剂具有一定的毒性, 不规范使用不仅会造成其在中药材中的残留, 而且可能导致中药材有效成分发生变化^[5-8], 给人类健康造成威胁。目前中国已经制定了食品中相关植物生长调节剂的最大限量

基金项目: 国家药典委员会药品标准制订课题(2021Z04)

作者简介: 褚悟男, 男, 硕士生 E-mail: 497433721@qq.com

*通信作者: 张亚中, 男, 博士, 主任中药师

E-mail:

13956985695@139.com

中国现代应用药学 2023 年 3 月第 40 卷第 6 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2023 March, Vol.40 No.6

· 783 ·

标准^[9],但中药材却没有相关限量标准。笔者所在课题组通过对白芷道地产区四川遂宁和安徽亳州的种植基地进行调研,建立34种植物生长调节剂UHPLC-MS/MS检测方法,以期监测白芷中的植物生长调节剂残留情况提供一种快捷、稳定的检测方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津30A超高效液相色谱仪(日本岛津公司);API 4500 Q-TRAP三重四级杆串联质谱仪(美国AB公司);真空平行浓缩仪、AH-50全自动均质器均购自睿科集团股份有限公司;飞鸽牌离心机(上海安亭科学仪器厂,离心半径9.1 cm);XW-80AO涡旋混合器(上海沪西仪器分析厂);XP205型十万分之一电子分析天平(Mettler);Simplicity-185型超纯水仪(Millipore公司)。

1.2 材料与试剂

对照品:多效唑(批号:Q21M9F61825;纯度:95%)、6-苄基氨基嘌呤(批号:Q08M8C30930;纯度:98%)、环丙嘧啶醇(批号:J01GB153188;纯度:99%)、阿特拉津(批号:ZN1108SA14;纯度:97%)、3-吲哚乙酸(批号:J15GB151364;纯度:98%)、3-吲哚丁酸(批号:M05GB140647;纯度:99%)、吡啶醇(批号:J08GB153695;纯度:98%)、表油菜素内酯(批号:J01GS153189;纯度:92%)、5-硝基愈创木酚钠(批号:J17GB151516;纯度:98%)、赤霉素(批号:S02N11P129556;纯度:90%)、氯吡脲(批号:H11A9Z67505;纯度:98%)、4-氯苯氧乙酸(批号:H13O6T4336;纯度:98%)均购自源叶公司;1-萘乙酰胺(批号:C1410030;纯度:98%)、噻苯唑(批号:J1917099;纯度:98%)、戊唑醇(批号:D1824049;纯度:97%)、矮壮素(批号:E2114109;纯度:99.8%)、2,4-二氯苯氧乙酸(批号:D1728027;纯度:99.1%)均购自Aladdin公司;助壮素(批号:C10805417;纯度:98%)、激动素(批号:C10120166;纯度:99%)、烯效唑(批号:C12700184;纯度:95%)、噻苯隆(批号:C11794800;纯度:99.1%)、4-溴苯氧乙酸(批号:C10100233;纯度:95%)、4-碘苯氧乙酸(批号:C12172399;纯度:98%)、脱落酸(批号:C12273469;纯度:95%)均购自Macklin公司;茉莉酮(批号:FS1611885;纯度:92.3%)、4-硝基苯酚钠(批号:FS1605567;纯度:98%)均购自天津阿尔塔公司;1,3-二苯脲(批号:D0015160;

纯度:99.7%)、环丙酸酰胺(批号:E0025645;纯度:98%)、吲熟酯(批号:D0010273;纯度:97.2%)均购自BePure公司;胺鲜酯(批号:G1193951;纯度:98%)、2,4,5-T(批号:G173030;纯度:97.3%)均购自Ehrenstorfer公司;增产胺(上海一基实业有限公司,批号:P107641;纯度:98%);4-氟苯氧乙酸(Sigma公司,批号:MKCF4064;纯度:98%);抗倒胺(Panphy公司,批号:30J-NPM-25-7;纯度:94%);甲醇、乙腈、丙酮均为色谱纯;乙腈、甲酸、甲酸铵均为质谱级;氯化钠为分析纯;分散固相萃取净化管(无水硫酸镁900 mg, N-丙基乙二胺300 mg,十八烷基硅烷键合硅胶300 mg,硅胶300 mg,石墨化碳黑90 mg)、HLB固相萃取柱(200 mg, 6 mL)、石墨化碳黑氨基复合固相萃取小柱(500 mg/500 mg, 6 mL)购自岛津公司。

1.3 药材收集

35批白芷药材经市场购买和产地收集见表1,由安徽省食品药品检验研究院袁杰主任中药师鉴定。

表1 白芷样品信息

Tab. 1 Sample information of *Angelica dahurica*

序号	批号	来源	序号	批号	来源
1	CD-01	成都市荷花池药材市场	19	SC-13	重庆市潼南区
2	CD-02	成都市荷花池药材市场	20	SC-14	四川省遂宁市蓬溪县
3	CD-03	成都市荷花池药材市场	21	SC-15	四川省遂宁市蓬溪县
4	PR-01	安徽普仁中药饮片公司提供	22	SC-16	四川省遂宁市大英县
5	PR-02	安徽普仁中药饮片公司提供	23	SC-17	四川省遂宁市
6	PR-03	安徽普仁中药饮片公司提供	24	SC-18	四川省遂宁市
7	SC-01	四川省简阳市	25	SC-19	四川省遂宁市青坪村
8	SC-02	四川省安岳县	26	BZ-01	安徽省亳州市药材市场
9	SC-03	四川省达州市达州区	27	BZ-02	安徽省亳州市药材市场
10	SC-04	四川省巴中市巴州区	28	BZ-03	安徽省亳州市药材市场
11	SC-05	四川省遂宁市射洪县	29	BZ-04	安徽省亳州市药材市场
12	SC-06	重庆市大足区	30	BZ-05	安徽省亳州市华佗镇
13	SC-07	四川省南充市仪陇县	31	BZ-06	安徽省亳州市华佗镇
14	SC-08	四川省阆中市	32	BZ-07	安徽省亳州市华佗镇
15	SC-09	四川省绵阳市三台县	33	BZ-08	安徽省亳州市五马镇
16	SC-10	四川省泸州市	34	BZ-09	安徽省亳州市十九里镇
17	SC-11	四川省遂宁市船山区	35	BZ-10	安徽省亳州市古井镇
18	SC-12	四川省简阳市			

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制

分别精密称取对照品适量置量瓶中,用乙腈配置成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液,密封储存于 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。再用乙腈-水混合溶液(50:50)稀释配置成适当浓度的混合对照品溶液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.2 样品前处理

精密称取供试品粉末 3 g (过三号筛),置于 50 mL 离心管中,加入 1 g NaCl 立即摇散,加乙腈 30 mL 匀浆处理 2 min (转速 $\geq 12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),离心 5 min ($4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),分取上清液,减压浓缩至约 1 mL ,用 50% 乙腈溶解并转移定容至 5.0 mL ,摇匀。过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。

2.3 检测条件

2.3.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3($2.1\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$);柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液(含 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵),流动相 B 为乙腈;梯度洗脱($0\sim 4\text{ min}$, $95\%\rightarrow 40\%\text{A}$; $4\sim 8\text{ min}$, $40\%\rightarrow 36\%\text{A}$; $8\sim 8.5\text{ min}$, $36\%\rightarrow 32\%\text{A}$; $8.5\sim 9\text{ min}$, $32\%\rightarrow 25\%\text{A}$; $9\sim 10\text{ min}$, $25\%\rightarrow 5\%\text{A}$; $10\sim 12\text{ min}$, $5\%\text{A}$; $12\sim 12.1\text{ min}$, $5\%\rightarrow 95\%\text{A}$)。流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子扫描方式(MRM);气帘气压 35 psi ,电喷雾电压 $5\text{ }500\sim 4\text{ }500\text{ V}$,雾化器压力 50 psi ,辅助气压力 50 psi ,离子源温度 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。34 种植物生长调节剂的质谱分析参数见表 2。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的优化

考察了 Waters Cortecs UPLC C_{18} ($2.1\times 150\text{ mm}$, $1.6\text{ }\mu\text{m}$)、Waters Acquity UPLC BEH Shield RP_{18} ($2.1\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$)、Waters Acquity UPLC HSS T3($2.1\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$) 3 种不同色谱柱对 34 种待测组分的峰型影响和分离能力。结果表明在相同色谱条件下,矮壮素和助壮素极性大,出峰时间较早;在 Shield RP_{18} 色谱柱下胺鲜酯和增产胺的峰型较差;Cortecs C_{18} 和 HSS T3 柱峰型好,其中 T3 柱各组分间分离度较好。综合 34 种化合物的分离度和峰型考虑,最终选择 Waters Acquity UPLC HSS T3($2.1\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$) 色谱柱。

实验比较了甲醇和乙腈 2 种常用有机溶剂对

34 种植物生长调节剂的洗脱效果,对比得出乙腈较甲醇有更好的洗脱能力。在水中加入甲酸和甲酸铵可以使化合物更好地电离,促进离子化效率,提高响应值和改善峰型。因此,选用乙腈- 0.1% 甲酸水(含 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲酸铵)作为流动相。

3.2 质谱条件的优化

为了获得 34 种植物生长调节剂定性和定量分析的最优质谱参数进行质谱条件的优化。取 34 种植物生长调节剂对照品溶液($100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),采用针泵进样,分别利用正、负离子模式进行扫描选择目标分析物最佳的电离模式和母离子,选取 2 对子离子,响应较高的一对作为定量离子对(PI^{q})并对碰撞能(CE)和去簇电压(DP)进行优化,优化后的参数见表 2。34 种植物生长调节剂的 MRM 色谱图见图 1。

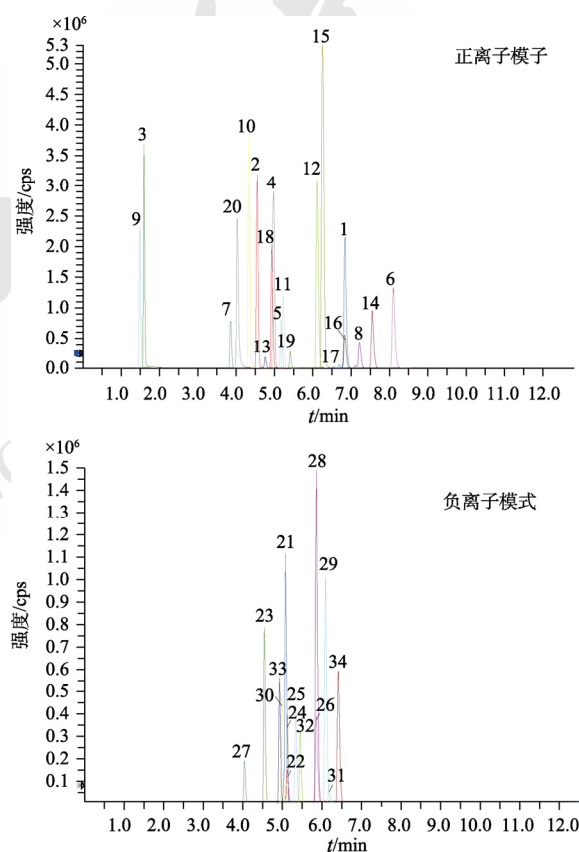


图 1 34 种植物生长调节剂 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of the 34 plant growth regulator mixed standard solution

3.3 稀释溶剂的考察

因 34 种植物生长调节剂本身溶解度和极性差异较大,为了获得更好的峰型及响应值,考察了以甲醇、乙腈、 50% 甲醇、 50% 乙腈作为稀释溶剂下各种植物生长调节剂的峰型和响应差异。结果

显示以甲醇或 50%甲醇稀释助壮素峰型不理想,以乙腈稀释各组分峰型较好,在有机溶剂中加入水可以增加各组分的电离并提高响应值,因此选用 50%乙腈作为供试品和对照品的稀释溶剂。

3.4 前处理方法的优化

通过 UPLC-MS/MS 的正、负离子模式下考察乙腈、甲醇、丙酮 3 种提取溶剂的提取效果。结果显示,甲醇提取后,溶液颜色最深而且较浓稠,提取的色素和糖类物质较多;乙腈和丙酮提取后回收率相近,但乙腈较丙酮提取后颜色较浅,提取杂质较少,考虑对质谱仪的保护,故选用乙腈作为提取溶剂^[10]。

考察了高速匀浆提取、超声提取和 QuEChERS 提取 3 种方法。①高速匀浆提取:精密称取白芷粉末(过三号筛)3 g,置 50 mL 离心管中,加入 1 g NaCl 立即摇散,加入 30 mL 乙腈,匀浆处理 2 min(转速 $\geq 12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),离心,取上清液,减压浓缩至约 1 mL,用 50%乙腈溶解并转移定容至 5.0 mL,摇匀。过 0.22 μm 滤膜,待测。②超声提取:精密称取白芷粉末(过三号筛)3 g,置 50 mL 离心管中,加入 1g NaCl 立即摇散,加入 30 mL 乙腈,涡旋 1 min,超声处理 10 min,离心,取上清液,减压浓缩至约 1 mL,用 50%乙腈溶解并转移定容至 5.0 mL,摇匀。过 0.22 μm 滤膜,待测。③QuEChERS 提取:精密称取白芷粉末(过三号筛)3 g,置 50 mL 聚苯乙烯具塞离心管中,加入 1%冰醋酸

溶液 15 mL,涡旋使药粉充分浸润,放置 30 min,精密加入乙腈 15 mL,涡旋使混匀,置振荡器上剧烈振荡($500\text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$) 5 min,加入无水硫酸镁与无水乙酸钠的混合粉末(4:1)7.5 g,立即摇散,再置振荡器上剧烈振荡($500\text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$)3 min,于冰浴中冷却 10 min,离心,取上清液,减压浓缩至约 1 mL,用 50%乙腈溶解并转移定容至 5.0 mL,摇匀。过 0.22 μm 滤膜,待测。以上 3 种方法使用的样品批号为 SC-10,在处理前加入 $100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 1 mL(溶剂为乙腈),每种方法重复 6 份。回收率按照以下公式计算:回收率=(测得总量-原有量)/加标量 $\times 100\%$ 。通过对比 34 种植物生长调节剂的回收率可以得出高速匀浆法各化合物回收率均在 70%~120%,见图 2。超声提取法中吲哚乙酸的回收率较低。QuEChERS 法中有 15 mL 的 1%冰醋酸溶液,虽然加入了无水硫酸镁与无水乙酸钠进行除水但仍有少量水相残留,而矮壮素与助壮素均为季铵盐类化合物,水溶性较强,不易分配于有机层中,致使回收率较差。同时无水硫酸镁与无水乙酸钠在除水过程中会产生大量的热也可能导致化合物之间回收率的差异。综上,本实验采用高速匀浆提取法作为前处理方法。

3.5 净化方法的选择

分别考察了分散型净化材料的净化管(无水 MgSO_4 1 200 mg+PSA 300 mg+ C_{18} 100 mg)、(HLBSPE)固相萃取柱(200 mg, 6 mL)和(GCB/ NH_2)

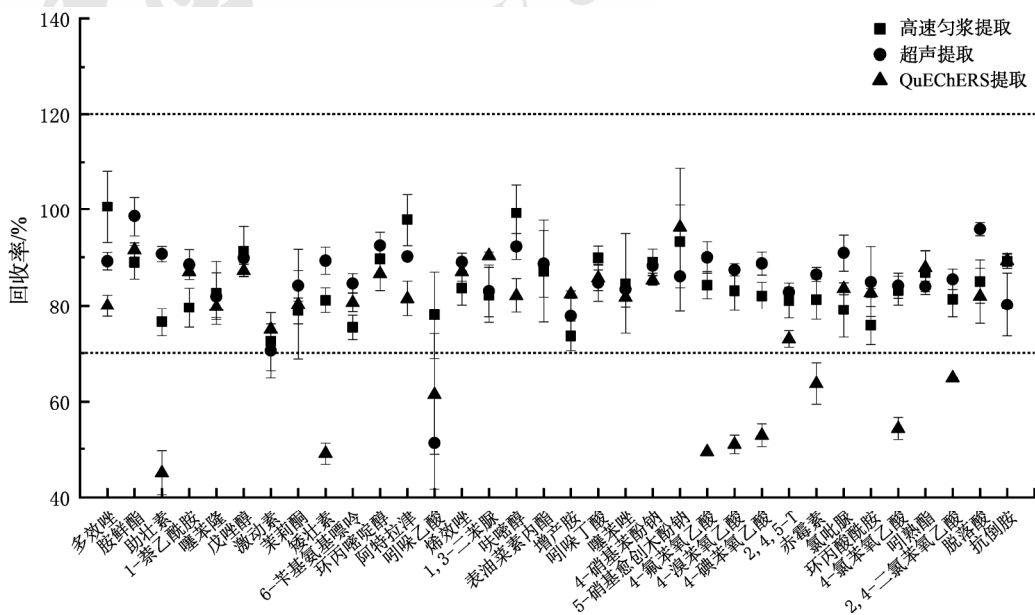


图 2 不同前处理方法的回收率

Fig. 2 Recovery of different preparation methods

石墨化碳黑氨基复合固相萃取柱(500 mg/500 mg, 6 mL) 3 种不同类型的净化方法的加样回收率结果, 见表 3。结果表明, MgSO₄+PSA+C₁₈ 组合中 PSA 为阴离子交换剂, 对结构中有羧基的化合物具有较强的吸附作用, 导致赤霉素、吲哚乙酸、吲哚丁酸、脱落酸、2,4,5-T、2, 4-二氯苯氧乙酸、4-氯苯氧乙酸、4-氟苯氧乙酸、4-碘苯氧乙酸、4-溴苯氧乙酸、环丙酸酰胺回收率几乎为零。HLB

柱由特殊的共聚合技术制备而成, 含有特定比例的亲水基和疏水基, 但仍有 21 种植物生长调节剂回收率<70%。GCB 具有正六元环结构, 使其对 6-苄基氨基嘌呤、赤霉素、吲哚乙酸等平面结构化合物具有较强的吸附作用, 因此 GCB/NH₂ 柱回收率较低。

在分析前对供试品进行净化处理可以有效地除去部分杂质, 减少基质效应的同时可以降低供

表 2 34 种植物生长调节剂的质谱分析参数
Tab. 2 MS/MS parameters of 34 plant growth regulators

序号	化合物	母离子(<i>m/z</i>)		子离子(<i>m/z</i>)				电离模式	保留时间/min
		Q1	DP/V	PI ^a	CE/V	PI ⁱ	CE/V		
1	多效唑	294.1	85	70	52	124.9	52	ESI ⁺	6.8
2	胺鲜酯	216.0	50	143	22	100	21	ESI ⁺	4.55
3	助壮素	114.2	85	98.2	34	58	31	ESI ⁺	1.58
4	1-萘乙酰胺	186.1	74	141.1	19	114.9	49	ESI ⁺	4.94
5	噻苯隆	221.0	87	130.9	45	175.1	35	ESI ⁺	5.16
6	戊唑醇	308.1	90	70.2	55	125.1	50	ESI ⁺	8.07
7	激动素	216.0	90	81	24	147.8	16	ESI ⁺	3.87
8	茉莉酮	165.1	65	81.1	25	123	18	ESI ⁺	7.19
9	矮壮素	122.1	68	58	40	63.1	27	ESI ⁺	1.47
10	6-苄基氨基嘌呤	226.2	93	91	35	64.9	69	ESI ⁺	4.35
11	环丙嘧啶醇	257.2	90	135.1	33	81.2	42	ESI ⁺	5.21
12	阿特拉津	216.3	90	173.8	25	104	35	ESI ⁺	6.08
13	吲哚乙酸	176.0	70	130	20	103	40	ESI ⁺	4.75
14	烯效唑	292.0	90	69	55	124.9	30	ESI ⁺	7.52
15	1,3-二苯脲	212.9	75	94	23	76.9	49	ESI ⁺	6.23
16	呋啉醇	313.0	100	268.9	45	184.9	40	ESI ⁺	6.79
17	表油菜素内酯	481.2	110	445.4	16	315	21	ESI ⁺	6.66
18	增产胺	261.8	80	58.1	50	100.2	25	ESI ⁺	4.93
19	吲哚丁酸	204.0	65	186	18	143.9	30	ESI ⁺	5.39
20	噻苯唑	221.0	85	102	21	127.8	21	ESI ⁺	4.08
21	4-硝基苯酚钠	137.8	65	107.8	22	92	28	ESI ⁻	5.06
22	5-硝基愈创木酚钠	167.7	80	152.8	17	123	25	ESI ⁻	5.1
23	4-氟苯氧乙酸	169.0	40	111	17	90.9	41	ESI ⁻	4.37
24	4-溴苯氧乙酸	228.6	42	170.8	18	78.8	40	ESI ⁻	4.95
25	4-碘苯氧乙酸	276.9	44	218.9	20	126.9	36	ESI ⁻	5.15
26	2,4,5-T	255.0	32	196.9	16	160.7	38	ESI ⁻	5.62
27	赤霉素	345.0	80	239.1	25	143.1	43	ESI ⁻	4
28	氯吡脲	245.6	66	126.9	13	91	36	ESI ⁻	5.83
29	环丙酸酰胺	271.9	60	159.9	25	124	45	ESI ⁻	5.81
30	4-氯苯氧乙酸	185.0	50	126.9	18	91	37	ESI ⁻	4.82
31	吲熟酯	236.9	110	164.7	22	134.8	34	ESI ⁻	6.16
32	2,4-二氯苯氧乙酸	218.9	28	160.9	16	124.9	38	ESI ⁻	5.27
33	脱落酸	263.1	65	203.1	17	203.1	39	ESI ⁻	4.91
34	抗倒胺	337.0	100	77.9	21	77.9	45	ESI ⁻	6.4

表3 不同净化方法的平均回收结果

Tab. 3 Average recovery of different purification methods

净化方法	植物生长调节剂数量		
	平均回收率 <70%	平均回收率 70%~130%	平均回收率 >130%
MgSO ₄ +PSA+C ₁₈	20	12	2
HLB	21	13	0
GCB/NH ₂	20	13	1

试品对质谱的污染。此次研究尝试了3种不同的净化方法,但由于部分植物生长调节剂的回收率无法达到分析要求,本实验选择不净化直接进样的方式以保证实验的准确性。

3.6 基质效应

基质是指提取过程中除分析物以外的共提物,基质效应指基质对目标分析物的分析过程产生干扰从而影响结果的准确性。在基质复杂的样品分析中,基质效应的存在严重影响着分析方法的准确性和灵敏度^[11]。基质效应可通过基质匹配标液和同浓度溶剂标液的仪器响应值的比值来考察,若比值在80%~120%,则基质效应可以忽略不计^[12]。实验对比了白芷基质匹配标液和相同浓度的50%乙腈溶液配置的标液的仪器响应值,发现34种植物生长调节剂中仅有7种符合以上标准,说明存在一定的基质效应。为了实验结果的准确性,本实验采用空白基质匹配标液法进行分析。

3.7 方法学验证

3.7.1 标准曲线、检测限(limit of detection, LOD)、定量限(limit of quantitation, LOQ)、精密度 采用白芷空白基质提取液加标的方式制备系列浓度的混合对照品溶液,按“2.3”项下条件进行分析,以各植物生长调节剂的质量浓度 X 为横坐标,定量离子对峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,以信噪比 ≥ 3 确定LOD,信噪比 ≥ 10 确定LOQ,实验结果显示在0.5~100 ng·mL⁻¹各化合物的相关系数均 >0.995 ,线性关系良好。取标准曲线最高浓度的混合对照品溶液连续进样6次,以各成分定量离子峰面积计算精密度RSD(RSD $<10\%$),表明精密度良好。34种植物生长调节剂的线性关系、相关系数、LOD、LOQ结果见表4。

3.7.2 加样回收率 精密称取白芷空白样品3.0 g,添加100 ng·mL⁻¹的混合对照品溶液1 mL,按“2.2”项下方法进行前处理,平行制备6份,分别进样测定,计算加样回收率,结果见表5。所

有分析物的平均回收率为72.4%~100.6%,RSD值为1.6%~12.3%。结果表明所建立方法可用于白芷中34种植物生长调节剂的定量分析。

3.8 样品测定

利用建立的方法对35批次白芷样品进行检测。其中12批白芷检出脱落酸,残留量为7.18~54.68 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,7批白芷检出多效唑,残留量为0.70~51.10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,6批白芷检出矮壮素,残留量为0.43~12.35 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,5批白芷检出4-硝基苯酚钠,残留量为22.87~135.88 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,2批白芷检出5-硝基愈创木酚钠,残留量为19.28~24.73 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,2批白芷检出胺鲜酯,残留量为0.55~1.15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。35批白芷样品中检出植物生长调节剂残留的白芷批数为19批,占总批数的54.2%,检出情况见表6。图3为样品(批号:PR-03)负离子模式下的MRM色谱图。

根据上述测定结果可得,35批样品中检出的植物生长调节剂种类不多,其中脱落酸和多效唑检出率最高。脱落酸是一种存在于植物体内的内源性倍半萜类激素^[13],GB 2793-2021并未对脱落酸的最大残留限量进行规定,因此无法判断白芷中检出的脱落酸是否属于外源性的植物激素。多效唑的最大残留限量为0.05~0.5 mg·kg⁻¹,其中1批样品检出浓度为51.10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,高于规定的残留限量(豆类蔬菜0.05 mg·kg⁻¹)。多效唑具有增强植物抗逆性,提高产量等作用,在土壤中很难自行分解,且残留时间较长^[14],使得多效唑容易残留在根茎类药材中,有研究指出多效唑原药对大鼠具有繁殖毒性^[15]。矮壮素的最大残留限量为0.04~10 mg·kg⁻¹,各样品均未超出限量规定。4-硝基苯酚钠和5-硝基愈创木酚钠均为复硝酚钠的有效成分之一,通过白芷产地调查,复硝酚钠在种植过程中较为常用,可渗透到植物体内,对植物生长和发根速度均有不同程度的促进作用,但具有致癌、致畸、致突变毒性,对人体健康造成威胁。

经检测与调研可得,植物生长调节剂在中药材种植中被广泛使用,且部分调节剂产品没有明确标注其有效成分。使用植物生产调节剂存在一定的风险,可能影响人体健康和药材品质。在后续研究中将针对白芷中检出率较高的多效唑和矮壮素进一步监测和研究,以促进植物生长调节剂在中药材种植中的合理应用。

表 4 34 种植物生长调节剂在基质中的线性关系、检测限、定量限和精密度

Tab. 4 Linear relationships, LOD, LOQ, and precisions of 34 plant growth regulators in matrixes

序号	化合物	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	精密度 RSD/%
1	多效唑	$y=57\,014.7x+5\,416.185$	0.999 5	0.5~50	0.17	0.55	7.75
2	胺鲜酯	$y=267\,372x-1\,571.148$	0.995 9	0.5~50	0.12	0.43	6.85
3	助壮素	$y=79\,885.9x-1\,582.252$	0.997 9	0.5~50	0.12	0.32	4.61
4	1-萘乙酰胺	$y=80\,830.1x+3\,401.888$	0.999 4	0.5~50	0.17	0.48	2.69
5	噻苯隆	$y=26\,973.161\,94x+1\,791.586$	0.999 2	0.5~50	0.2	0.35	3.95
6	戊唑醇	$y=58\,796.9x+2\,753.111$	0.998 9	0.5~50	0.1	0.23	4.57
7	激动素	$y=50\,149.3x+2\,800.983$	0.998 0	0.5~50	0.78	3.87	2.96
8	茉莉酮	$y=9\,344.184\,64x+10\,961.017$	0.999 1	1~100	3.7	18.94	2.57
9	矮壮素	$y=76\,095.4x+8\,149.393$	0.998 6	1~100	0.02	0.09	2.48
10	6-苄氨基嘌呤	$y=171\,113x+12\,820.220$	0.998 2	0.5~50	0.32	0.64	7.46
11	环丙嘧啶醇	$y=38\,796.6x+4\,438.361$	0.998 6	0.5~50	0.48	1.05	4.94
12	阿特拉津	$y=40\,375.5x+22\,629.988$	0.999 3	0.5~50	0.25	1.35	6.86
13	吲哚乙酸	$y=2\,388.238\,74x+17\,693.002$	0.997 6	5~200	4	15.87	5.29
14	烯效唑	$y=37\,751.6x+2\,990.034$	0.998 2	0.5~50	0.11	0.37	4.71
15	1,3-二苯脲	$y=237\,363x+41\,258.2$	0.998 6	0.5~50	0.01	0.05	7.09
16	呋啉醇	$y=23\,994.503\,09x+2\,016.571$	0.999 0	0.5~50	0.16	0.56	8.17
17	表油菜素内酯	$y=786.359\,83x+2\,392.716$	0.999 5	5~200	9.26	23.81	3.01
18	增产胺	$y=37\,769.9x+2\,902.362$	0.998 2	0.5~50	0.11	0.22	7.66
19	吲哚丁酸	$y=6\,651.698\,59x+3\,256.790$	0.998 6	1~100	4	16.67	4.46
20	噻苯唑	$y=172\,363x+24\,451.532$	0.999 8	1~100	0.27	0.58	1.65
21	4-硝基苯酚钠	$y=80\,097.5x+347\,031$	0.998 0	0.5~50	0.01	0.06	1.68
22	5-硝基愈创木酚钠	$y=1\,858.897\,46x+1\,672.738$	0.998 3	1~100	3.39	15.29	2.36
23	4-氟苯氧乙酸	$y=22\,467.455\,77x+4\,646.282$	0.998 7	1~100	0.37	0.85	1.94
24	4-溴苯氧乙酸	$y=9\,550.210\,44x+844.499$	0.999 3	0.5~50	0.25	1.39	3.95
25	4-碘苯氧乙酸	$y=29\,775.606\,45x+3\,489.315$	0.999 1	0.5~50	0.21	0.98	2.63
26	2,4,5-T	$y=30\,418.8x+7\,132.533$	0.999 0	1~100	0.3	1.06	2.78
27	赤霉素	$y=2\,845.513\,46x+1\,029.185$	0.999 0	1~100	1.82	6.8	2.00
28	氯吡脲	$y=183\,198x+9\,196.569$	0.999 3	0.5~50	0.01	0.04	3.78
29	环丙酰胺	$y=90\,497.1x+6.059$	0.997 6	0.5~50	0.09	0.37	3.22
30	4-氯苯氧乙酸	$y=30\,160.2x+1\,661.660$	0.999 4	0.5~50	0.2	0.81	2.00
31	吲熟酯	$y=1\,543.347\,56x+3\,622.753$	0.997 7	1~100	3.03	14	1.71
32	2,4-二氯苯氧乙酸	$y=25\,615.677\,34x-33.356$	0.999 1	0.5~50	0.36	1.16	2.24
33	脱落酸	$y=20\,080.380\,8x+164\,202$	0.996 7	0.5~50	0.01	0.04	2.92
34	抗倒胺	$y=59\,763.0x-2\,750.863$	0.997 6	0.5~50	0.02	0.17	2.55

表 5 34 种植物生长调节剂的加样回收率结果($n=6$)

Tab. 5 Recovery results of 34 plant growth regulators($n=6$)

序号	化合物	平均回收率/%	RSD/%	序号	化合物	平均回收率/%	RSD/%
1	多效唑	100.6	7.5	18	增产胺	73.5	4.2
2	胺鲜酯	88.9	3.9	19	吲哚丁酸	89.9	2.7
3	助壮素	76.5	3.8	20	噻苯唑	84.5	12.3
4	1-萘乙酰胺	79.5	5.2	21	4-硝基苯酚钠	88.9	3.1
5	噻苯隆	82.6	8.0	22	5-硝基愈创木酚钠	93.2	8.3
6	戊唑醇	91.3	5.6	23	4-氟苯氧乙酸	84.2	3.4
7	激动素	72.4	8.3	24	4-溴苯氧乙酸	83.1	5.0
8	茉莉酮	78.9	3.5	25	4-碘苯氧乙酸	82.0	3.4
9	矮壮素	81.1	3.2	26	2,4,5-T	81.0	4.6
10	6-苄氨基嘌呤	75.3	3.4	27	赤霉素	81.3	5.3
11	环丙嘧啶醇	89.6	3.8	28	氯吡脲	79.1	7.2
12	阿特拉津	97.8	5.6	29	环丙酰胺	75.8	5.4
13	吲哚乙酸	77.9	11.6	30	4-氯苯氧乙酸	83.1	3.6
14	烯效唑	83.6	4.2	31	吲熟酯	86.9	5.2
15	1,3-二苯脲	82.2	7.0	32	2,4-二氯苯氧乙酸	81.3	4.7
16	呋啉醇	99.2	6.1	33	脱落酸	85.0	5.3
17	表油菜素内酯	87.1	12.1	34	抗倒胺	89.2	1.6

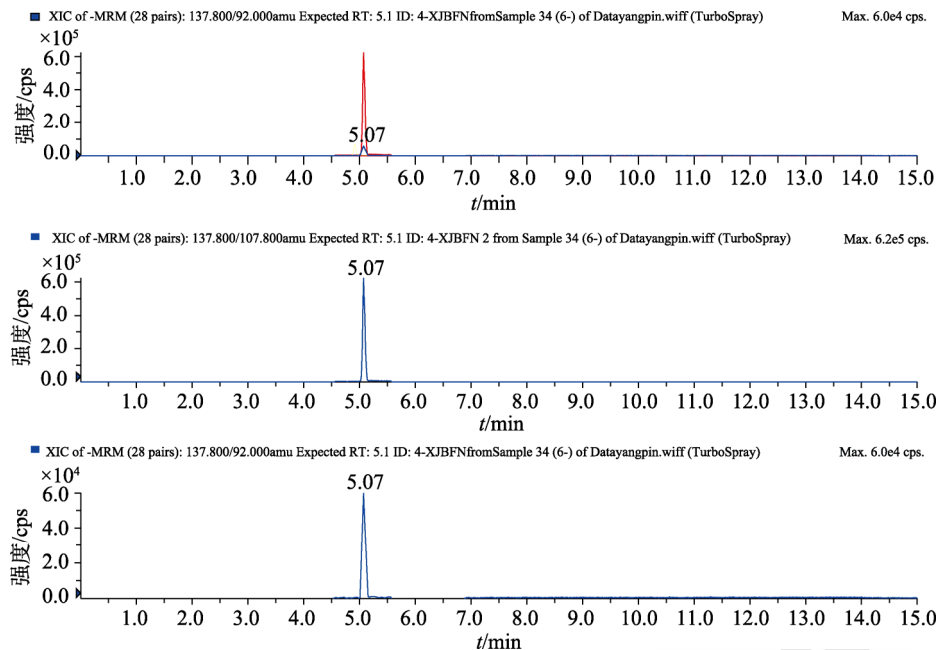


图3 白芷样品的 MRM 色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of Angelicae Dahuricae Radix sample

表6 实际样品残留量测定

批号	脱落酸	多效唑	矮壮素	4-硝基苯酚钠	5-硝基愈创木酚钠	胺鲜酯
CD-02	—	51.17	1.42	—	—	—
CD-03	24.17	—	—	—	—	—
PR-01	42.02	—	—	—	—	—
PR-02	—	6.51	0.75	—	—	—
PR-03	—	—	—	42.23	—	—
SC-02	8.05	—	—	—	—	—
SC-03	33.21	—	—	—	—	—
SC-08	24.35	—	—	—	—	—
SC-12	8.78	36.38	—	—	—	—
SC-16	—	—	0.81	—	—	0.55
SC-17	18.33	0.70	1.93	—	—	1.15
SC-18	—	3.74	—	—	—	—
BZ-01	—	11.94	12.35	—	24.73	—
BZ-05	33.42	—	—	135.88	—	—
BZ-06	10.24	—	—	61.38	—	—
BZ-07	54.68	—	—	57.36	—	—
BZ-08	7.18	—	0.43	—	—	—
BZ-09	—	1.40	—	—	19.28	—
BZ-10	45.52	—	—	22.87	—	—

4 结论

本实验建立了 UHPLC-MS/MS 同时测定白芷中 34 种植物生长调节剂残留的方法, 并对 35 批次白芷样品进行测定。本方法符合残留分析的要求, 并具有前处理简单, 快速准确, 灵敏度高的

优点, 可用于白芷中多种植物生长调节剂残留的快速筛查和确证, 为白芷中植物生长调节剂限量的设定提供技术支持。

REFERENCES

- [1] ZHANG L X, MOU Y, YANG M H, et al. Application and safety evaluation of plant growth regulators in traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(8): 1824-1832.
- [2] ZHAI Y Y, GUO B L, HUANG W H. Detection of agent “Zhuanggenling” and investigation of utilization of plant growth retardants in traditional Chinese medicine cultivation[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(3): 414-420.
- [3] 何瑞, 刘艾平, 曹玉广. 植物生长调节剂使用中的安全问题[J]. 中国卫生监督杂志, 2003(2): 99-101.
- [4] ZHAI Y Y. Plant growth retardant residue and detection method research in traditional Chinese medicine[D]. Shanxi: Shanxi Medical University, 2014.
- [5] YUE K X, YAN Y M, ZHANG H X, et al. Advances in toxicity of plant growth regulators[J]. Agrochemicals(农药), 2021, 60(4): 239-243, 276.
- [6] XU A D. Research advance in the toxicity and residue of plant growth regulator in vegetables in China[J]. China Vegetab(中国蔬菜), 2009(8): 1-6.
- [7] YU J, MOU Y, LUO Z L, et al. Effects of brassinolide on growth, development and quality of *Panax notoginseng*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43(7): 1541-1546.
- [8] ZHANG T T, QIAN X Y, SUN J J, et al. Advances in research on effects of plant growth regulators on the quality of radix and

- rhizome medicinal materials[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(8): 752-761.
- [9] GB 2763—2021. 食品安全国家标准-食品中农药最大残留限量[S]. 2021.
- [10] WEI H, JIN H Y, WANG Y, et al. Simultaneous determination of 23 plant growth regulator residues in Chinese materia medica by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(8): 1653-1660.
- [11] SHI J W. Assessment of matrix effect in LC-MS/MS quantitative analysis with external standard method[J]. Phys Test Chem Anal(Part B: Mater Test)(理化检验: 化学分册), 2012, 48(11): 1261-1264.
- [12] XIANG P, SHEN M, ZHUO X Y. Matrix effects in liquid Chromatographic-Mass spectrometric analysis[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2009, 28(6): 753-756.
- [13] WANG J A, FU Y J, WANG R H, et al. Study on the effects of exogenous abscisic acid on Salt-alkali tolerance of *Scrophularia ningpoensis* seedlings[J]. China Pharm(中国药房), 2017, 28(4): 573-576.
- [14] BAO Y Y, ZHANG X Y, SHAO J L, et al. Dynamics of the residue and degradation of paclobutrazol in tomato and soil[J]. Ecol Envir Sci(生态环境学报), 2014, 23(5): 864-869.
- [15] CHEN R T, DENG Y Y, CHEN X Y, et al. Study on the two-generation reproductive toxicity of paclobutrazol in SD rats[J]. J Toxicol(毒理学杂志), 2008(3): 195-196.
- 收稿日期: 2022-07-21
(本文责编: 沈倩)