

- (Database issue): D514-D517.
- [18] Smoot M E, Ono K, Ruscchinski J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431-432.
- [19] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (Database issue): D561-D568.
- [20] Pundir S, Martin M J, O'Donovan C, et al. UniProt Tools [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 53: 1.29.1-1.29.15.
- [21] Lill M A, Danielson M L. Computer-aided drug design platform using PyMOL [J]. *J Comput Aid Mol Des*, 2011, 25(1): 13-19.
- [22] 罗心静, 莫选荣, 周玲玲. TNF- $\alpha$  诱导类风湿关节炎滑膜细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路活化的探讨 [J]. *免疫学杂志*, 2012, 28(4): 321-323; 332.
- [23] 瞿芳芳. IKK 相关激酶在 IL-17 信号转导中的功能及其机制研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2012.
- [24] Baeuerle P A. I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structures: at the interface of inflammation control [J]. *Cell*, 1998, 95(6): 729-731.
- [25] Du B X, Cao L, Wang K, et al. Peiminine attenuates acute lung injury induced by LPS through inhibiting lipid rafts formation [J]. *Inflammation*, 2020, 43(3): 1110-1119.
- [26] Lin Q, Qu M K, Zhou B J, et al. Exosome-like nanoparticle modified with targeting ligand improves anti-cancer and anti-inflammation effects of imperialine [J]. *J Control Release*, 2019, 311-312: 104-116.
- [27] Xu J W, Zhao W, Pan L Y, et al. Peimine, a main active ingredient of *Fritillaria*, exhibits anti-inflammatory and pain suppression properties at the cellular level [J]. *Fitoterapia*, 2016, 111: 1-6.

## QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 法测定茵栀黄口服液中 14 种农药残留

李媛, 王娟, 张楠, 谢志民\*  
(西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710054)

**摘要:** 目的 采用 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法, 建立茵栀黄口服液中 14 种农药残留的测定分析方法。方法 样品以 0.1% 乙酸乙腈提取, 经氯化钠和无水硫酸镁盐析后, 提取液加入乙二胺-N-丙基硅烷、石墨化炭黑和无水硫酸镁进行净化, 采用超高效液相色谱-串联质谱在多反应监测模式下进行确证和测定, 外标法定量。结果 各农药含量在各自浓度范围内具有较好的线性关系 ( $r \geq 0.995$ ), 目标化合物在低、中、高 3 个浓度下的平均回收率为 71.64%~127.58% (RSD<15%), 定量限 (LOQ) 为 0.04~3.58  $\mu$ g/L。6 批茵栀黄注射液均未检测到 14 种农药, 而 32 批茵栀黄口服液均检测到啶虫脒、吡虫啉, 含量分别为在 4.7~7.9、8.0~14.6  $\mu$ g/L 范围内。结论 该方法灵敏度高, 准确性好, 适合于茵栀黄口服液中 14 种农药残留的测定。

**关键词:** 茵栀黄口服液; 农药残留; QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS)

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0652-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.059

茵栀黄口服液收载于 2015 年版《中国药典》, 处方由茵陈提取物、栀子提取物、黄芩提取物和金银花提取物<sup>[1]</sup>组成, 具有清热解毒, 利湿退黄的功能。其中栀子、黄芩、金银花商品药材主要为种植产品。据文献报道<sup>[2]</sup>, 花和果实类药材、部分多年生根和根茎类药材农药残留污染比较严重, 尤其是花类药材检出率最高。部分农药残留直接危害人体健康。本品经常用于新生儿黄疸的治疗中, 控制农药残留尤为重要。本实验选取上述栀子<sup>[3]</sup>、黄芩<sup>[4]</sup>、金银花<sup>[5-9]</sup>药材可能使用及常用的农药, 结合已有文献报道<sup>[10]</sup>检出的农药种类, 拟对啶虫脒、仲丁威、敌百虫、毒死蜱、

吡虫啉、灭幼脲、辛硫磷、乐果、托布津、甲基托布津、克百威、吡蚜酮、敌敌畏、马拉硫磷 14 种农药采用液-质联用方法进行测定, 作为茵栀黄口服液安全性的质量控制方法之一。

### 1 材料

1.1 仪器 岛津 LC-30 AD 型超高效液相色谱仪; LCMS 8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions 工作站; 岛津 Shim-pack GIST C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 2  $\mu$ m)。

1.2 试剂 乙腈 (色谱纯, 德国 Fisher 公司); 甲酸、乙酸 (色谱纯, 上海阿拉丁试剂有限公司); 氯化钠、无水

收稿日期: 2020-04-07

基金项目: 2019 年国家药品评价性抽验中央补助地方经费项目 (157)

作者简介: 李媛 (1985—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药质量评价。E-mail: liyuan4252@126.com

\* 通信作者: 谢志民 (1964—), 男, 主任药师, 研究方向为中药质量标准。E-mail: 15229249536@163.com

硫酸镁(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); PSA, GCB(分析纯, 天津博纳艾杰尔公司)。啞虫脒对照品(批号 201905, 含量 100 μg/mL) 由农业部环境保护科研检测所提供; 仲丁威(批号 G170133, 纯度 98.4%)、吡蚜酮(批号 G832819, 纯度 97.8%)、托布津(批号 G980847, 纯度 97.7%)、毒死蜱(批号 G130559, 纯度 99.8%) 对照品均由德国 Dr. Ehrenstorfer 公司提供; 敌百虫(批号 M3H1, 含量 100 μg/mL)、吡虫啉(批号 A3X1, 含量 100 μg/mL)、灭幼脲(批号 1901, 含量 100 μg/mL)、辛硫磷(批号 N222, 含量 100 μg/mL)、乐果(批号 1901, 含量 100 μg/mL)、甲基托布津(批号 1902, 含量 100 μg/mL)、克百威(批号 A3Z1, 含量 100 μg/mL)、敌敌畏(批号 J3X2, 含量 100 μg/mL)、马拉硫磷(批号 M3H2, 含量 100 μg/mL) 对照品均由北京海岸鸿蒙标准物质技术有限责任公司提供。

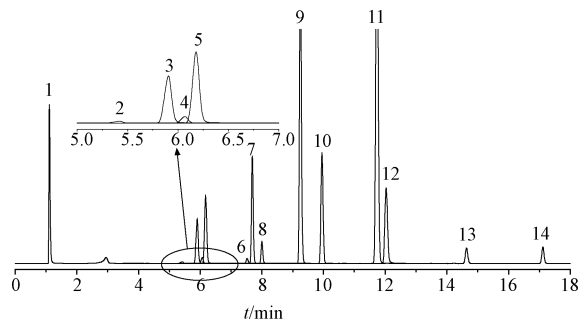
1.3 药物 32 批茵栀黄口服液和 6 批茵栀黄注射液、黄芩提取物(A35190111004)、栀子提取物(T181004) 和金银花提取物(T181201) 均购自北京华润高科天然药物有限公司。低、中、高质量浓度空白茵栀黄口服液样品为本实验室自制, 不含待测农药。

## 2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 精密量取茵栀黄口服液(批号 20181206) 10 mL [注射液(批号 171023A1) 20 mL], 置于 50 mL 离心管中, 加入 0.1% 乙酸乙腈 10 mL (注射液 20 mL), 涡旋混匀 1 min, 加入氯化钠 1 g (注射液 2 g)、无水硫酸镁 4 g (注射液 8 g), 涡旋混匀 1 min, 3 500 r/min 离心 5 min, 精密量取上清液 2 mL (注射液 4 mL), 加入无水硫酸镁 300 mg (注射液 600 mg)、PSA 100 mg (注射液 200 mg)、GCB 20 mg (注射液 40 mg), 涡旋混匀 1 min, 3 500 r/min 离心 5 min, 精密量取上清液 1 mL, 减压浓缩至干, 乙腈: 水(3:2) 定容至 1 mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。同法制备仅含黄芩提取物模拟样品(A35190111004)、仅含栀子提取物模拟样品(T181004)、仅含金银花提取物模拟样品(T181201) 的供试品溶液。

2.2 对照品溶液制备 精密称取/量取各对照品适量, 乙

腈-水(3:2) 制成每 1 mL 分别含托布津 14 ng、吡蚜酮 13 ng、仲丁威 8 ng、毒死蜱 5 ng、克百威 2 ng、乐果 1 ng、辛硫磷 2 ng、敌百虫 4 ng、吡虫啉 10 ng、啞虫脒 10 ng、甲基托布津 12 ng、马拉硫磷 40 ng、灭幼脲 65 ng、敌敌畏 40 ng 的溶液, 摇匀, 即得。取空白茵栀黄口服液样品, 按“2.1”项下方法处理, 作为空白基质, 制备基质匹配对照品溶液, 见图 1。



1. 吡蚜酮 2. 敌百虫 3. 吡虫啉 4. 乐果 5. 啞虫脒  
6. 敌敌畏 7. 甲基托布津 8. 克百威 9. 托布津 10. 仲丁威  
11. 马拉硫磷 12. 灭幼脲 13. 辛硫磷 14. 毒死蜱

图 1 各农药 TIC 色谱图

### 2.3 分析条件

2.3.1 色谱 Shim-pack GIST C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 2 μm); 流动相 0.1% 甲酸(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0~1 min, 95% A; 1~4 min, 95%~70% A; 4~7 min, 70%~50% A; 7~15 min, 50%~30% A; 15~20 min, 30%~5% A); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 2 μL。

2.3.2 质谱 电喷雾离子源(ESI), 灭幼脲采用负离子模式(ESI<sup>-</sup>), 其余均采用正离子模式(ESI<sup>+</sup>); 多反应检测(MRM)模型, 参数见表 1; 雾化气体积流量 3 L/min; 加热气体积流量 10 L/min; 干燥气体积流量 10 L/min; 接口温度 300 °C; DL 温度 250 °C; 加热块温度 400 °C。

2.3.3 监测离子选择 采用 Scan 模式, 以 m/z 150~400 进行扫描, 确定保留时间并进行分段采集, MS 参数见表 1。

表 1 各农药 MS 参数

农药	t <sub>R</sub> /min	前体离子	定量离子	定性离子	CE/V
吡蚜酮	1.198	217.95	105.10	78.15	-25,-42
敌百虫	5.515	258.90	109.05	222.95	-17,-11
吡虫啉	6.010	256.15	175.10	209.15	-19,-17
乐果	6.173	230.15	198.95	124.90	-10,-20
啞虫脒	6.286	223.20	126.05	56.10	-20,-15
敌敌畏	7.630	220.95	109.10	79.10	-18,-26
甲基托布津	7.800	343.10	151.05	311.10	-20,-11
克百威	8.109	222.15	123.20	165.10	-21,-11
托布津	9.368	371.15	151.15	325.00	-21,-13
仲丁威	10.065	208.10	95.15	152.15	-16,-11
马拉硫磷	11.852	331.35	99.05	127.10	-22,-12
灭幼脲	12.161	307.30	153.95	126.05	10,23
辛硫磷	14.763	299.10	77.05	129.25	-36,-12
毒死蜱	17.228	351.50	199.95	96.95	-20,-32

2.4 基质效应 分别以各农药峰面积、对照品系列质量浓度绘制基质对照曲线、溶剂对照曲线, 通过对比两者斜率来考察基质效应<sup>[11-12]</sup> (ME), 公式为  $ME = A/B \times 100\%$ , 其中  $A$  为目标成分在基质匹配对照品溶液中标准曲线的斜率,  $B$  为目标成分在系列对照品溶液中标准曲线的斜率,  $ME > 100\%$  表示呈基质增强效应,  $ME < 100\%$  表示呈基质减弱效应,  $ME > 150\%$  表示呈显著的基质增强效应。精密量取低、中、高质量浓度空白茵栀黄口服液, 按“2.1”项下方法处理后加同一质量浓度对照品溶液准确定容, 得到基质, 在“2.3”项条件下进样测定, 结果见表2。由此可知, 14种农药均存在不同程度的基质效应, 基质浓度越大, 对各农药的影响越强, 其中毒死蜱、马拉硫磷等大部分农药呈基质抑制效应, 而敌敌畏呈显著的基质增强效应。为了减少基质效应对检测结果的影响, 本实验采用空白基质配制对照品溶液。

表2 各农药基质效应测定结果 (%)

农药	低质量浓度	中质量浓度	高质量浓度
吡蚜酮	78	69	61
敌百虫	59	48	35
吡虫啉	66	58	41
乐果	72	69	54
啶虫脒	58	55	46
敌敌畏	110	120	150
甲基托布津	96	92	86
克百威	82	74	65
托布津	79	69	52
仲丁威	86	73	40
马拉硫磷	63	60	54
灭幼脲	74	63	45
辛硫磷	66	47	33
毒死蜱	82	71	63

## 2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 用基质匹配的对照品溶液逐级稀释, 制得农药对照品溶液, 在“2.3”项条件下进样测定, 以各农药质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ) 进行回归, 以信噪比 ( $S/N$ ) = 10 时为定量限, 结果见表3, 可知各农药在各自范围内线性关系良好。

2.5.2 重复性试验 精密量取茵栀黄口服液 (批号 20181206) 10 mL, 以 5  $\mu\text{g/L}$  水平添加, 按“2.1”项下方法处理, 平行检测 6 次,  $RSD < 10\%$ , 重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 分别于 0、1、4、8、12、16、20、24 h 精密吸取重复性考察项同一供试品溶液, 以 5  $\mu\text{g/L}$  水平添加, 按“2.1”项下步骤进行前处理, 在“2.3”项条件下进样测定, 测得各农药峰面积  $RSD$  均  $\leq 10\%$ , 表明农药残留在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 准确度、精密度试验 向空白基质品中添加低、中、高质量浓度 (1、5、10  $\mu\text{g/L}$ ) 农药对照品溶液, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 平行 3 份, 在“2.3”项条件下进样测定, 结果见表4。

2.6 农药残留测定 6 批茵栀黄注射液均未检测到 14 种农药, 而 32 批茵栀黄口服液均检测到啉虫脒、吡虫啉, 含量分别为在 4.7~7.9、8.0~14.6  $\mu\text{g/L}$  范围内。虽均未超出安全限度, 但应引起关注, 特别是婴幼儿制剂尤为重要。

## 3 结果与讨论

3.1 色谱条件及样品制备方法考察 分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-甲酸水、乙腈-甲酸水流动相系统及不同浓度甲酸的效果, 结果乙腈-0.1% 甲酸水为最佳条件。样品提取过程中比较酸性乙腈、丙酮和乙酸乙酯对于目标农药的提取效果, 结果显示酸性乙腈提取效率较高且杂质较少, 故选择酸性乙腈作为提取溶剂。样品中有大量色素

表3 各农药线性关系

农药	回归方程	$r$	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
吡蚜酮	$Y = 21\ 994X - 64\ 957$	0.999 9	1.100~55.02	0.79
敌百虫	$Y = 55\ 873X - 186\ 802$	0.997 8	0.970~72.00	0.59
吡虫啉	$Y = 83\ 762X + 142\ 102$	0.999 8	2.916~360.00	1.85
乐果	$Y = 122\ 704X + 484\ 896$	0.999 3	0.290~20.41	0.13
啶虫脒	$Y = 178\ 131X + 313\ 139$	0.999 9	0.870~360.00	0.62
敌敌畏	$Y = 10\ 169X - 154\ 114$	0.998 5	14.580~729.02	3.58
甲基托布津	$Y = 213\ 116X + 27\ 959$	0.999 9	1.090~65.61	0.06
克百威	$Y = 784\ 618X + 193\ 124$	0.999 9	0.140~18.00	0.06
托布津	$Y = 738\ 233X - 253\ 794$	1.000 0	1.070~53.63	0.05
仲丁威	$Y = 292\ 794X + 147\ 505$	1.000 0	0.770~318.82	0.27
马拉硫磷	$Y = 222\ 883X + 260\ 372$	0.999 9	3.500~129.6	1.20
灭幼脲	$Y = 50\ 968X + 1\ 000\ 000$	0.997 5	5.690~341.17	0.53
辛硫磷	$Y = 218\ 674X + 86\ 500$	0.999 9	0.580~72.00	0.20
毒死蜱	$Y = 73\ 982X - 8\ 579.8$	0.998 6	0.430~178.74	0.04

杂质, 且辅料中含蜂蜜、蔗糖等杂质, 净化采用 PSA、GCB 及无水硫酸镁组合。PSA 吸附剂清除样品中的脂肪酸、亲脂性色素和糖类等极性成分进行分散固相萃取, GCB 用于

除去样品中的色素杂质, 无水硫酸镁吸取多余的水分, 最后根据回收率情况与净化效果优化无水硫酸镁、PSA、GCB 的用量。

表 4 空白样品加样回收试验结果 (n=3)

农药	1 μg/L		5 μg/L		10 μg/L	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
吡蚜酮	72.51	3.69	76.85	2.15	82.67	1.70
敌百虫	81.33	6.12	92.00	3.88	98.00	4.40
吡虫啉	90.47	8.71	96.52	6.52	106.50	4.80
乐果	90.12	4.99	97.04	3.68	94.64	1.40
啶虫脒	71.64	6.33	78.23	5.78	82.86	2.45
敌敌畏	78.36	8.81	82.96	6.22	87.68	5.81
甲基托布津	74.39	11.01	79.63	6.87	78.63	4.43
克百威	75.69	9.26	77.69	7.11	81.66	3.28
托布津	81.06	10.33	83.01	3.77	87.22	3.94
仲丁威	98.67	12.42	118.54	9.03	101.59	2.23
马拉硫磷	101.81	5.34	111.81	6.09	103.81	4.79
灭幼脲	97.58	6.55	103.49	4.03	127.58	3.86
辛硫磷	80.81	5.71	94.81	6.04	103.17	3.95
毒死蜱	100.03	8.03	97.14	7.61	117.03	5.37

3.2 基质效应 由基质效应表可以看出,大部分农药为基质抑制作用,推测可能是由于与被分析物一起流出的其他内源性物质(如盐类、胺类、脂肪酸、甘油酸酯等)造成的。这些物质与分析物共同流出喷雾针,对电荷产生竞争,改变了带电雾滴的表面张力,影响分析物的雾化、挥发、裂分、化学反应及带电过程,致使进入质谱的离子减少<sup>[13]</sup>。由表2看出敌百虫、辛硫磷基质效应较为强烈,分析其原因可能是由于其含有极性的及强氢键的结构P=O、-N=等基团,含有此类结构化合物通常具有较为严重的基质效应。

3.3 农药残留分析 国标中啶虫脒的ADI为0.07 mg/kg,欧盟标准为0.025 mg/kg;国标中吡虫啉的ADI为0.06 mg/kg,按照2015年版《中国药典》四部9302中药有害残留物限量制定指导原则计算,得茵栀黄口服液中啶虫脒的最大限量为1.4 μg/mL、吡虫啉的最大限量为1.2 μg/mL。按照欧盟标准计算啶虫脒的最大限量为0.5 μg/mL。结果32批口服液均未超出限度范围,注射液未检出,分析可能由于工艺影响。同时在金银花提取物检出克百威、啶虫脒和吡虫啉,黄芩提取物检出辛硫磷,栀子提取物未检出农药残留,茵陈多为野生,故不作考虑。茵栀黄口服液中的农药残留来自于处方中的金银花提取物,应关注金银花的农药残留情况。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.  
[2] 康传志, 郭兰萍, 周涛, 等. 中药材农残研究现状的探讨

[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 155-159.  
[3] 肖永良, 王沫, 王文乔, 等. 栀子卷叶螟的发生规律及防治研究[J]. 中药材, 2006, 29(12): 1268-1270.  
[4] 赵瑛博, 田宏哲, 周艳明, 等. HPLC-MS/MS法测定黄芩药材中氨基甲酸酯类农药残留[J]. 农药, 2010, 49(6): 434-438; 438.  
[5] 张文玉. 不同种类农药防治金银花植株蚜虫的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2006.  
[6] 林涛, 陈兴连, 姚清华, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定金银花中77种农药残留[J]. 分析实验室, 2018, 37(9): 1037-1044.  
[7] 孙磊, 金红宇, 王莹, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定人参和金银花中103种农药残留[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 2017-2024.  
[8] 方翠芬, 马临科, 陈勇, 等. RRLC/MS/MS测定菊花中农药残留量[J]. 中成药, 2012, 34(5): 883-887.  
[9] 顾炎, 薛健, 金红宇, 等. GC-ECD法分析金银花中有机氯和拟除虫菊酯类农药的残留状况[J]. 中成药, 2016, 38(6): 1325-1329.  
[10] 孔令军, 张娅婷, 谷令彪, 等. 中药材农药残留的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 231-234.  
[11] 秦瑶, 陈丽娜, 杨晓静, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定生脉饮及其原料药中19种农药残留[J]. 分析实验室, 2016, 35(7): 781-786.  
[12] 刘庆斌. HPLC-MS法对5种中药材中有机磷农药多残留检测研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.  
[13] 徐炎炎, 李森, 张芹, 等. 气质联用和液质联用中基质效应的分析和总结[J]. 农药, 2017, 56(3): 162-167.