

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)20-0097-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.20.021



玄麦甘桔制剂中多效唑残留量检测*

胡亮^{1,2}, 孙辉^{1,2}, 丁野^{1,2}, 罗艳^{1,2}, 李文莉^{1,2}, 李靖云^{1,2,Δ}

(1. 湖南省药品检验检测研究院, 湖南长沙 410001; 2. 湖南省药品质量评价工程技术研究中心, 湖南长沙 410001)

摘要:目的 建立检测玄麦甘桔制剂中多效唑残留量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 色谱柱为 Welch Ultimate LP-C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈-含0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液(55:45, V/V), 流速为0.2 mL/min, 柱温为30℃, 进样量为3 μL; 采用电喷雾离子源正离子(ESI⁺), 多反应监测(MRM)模式, 检测离子对为 m/z 294.0→70.2、 m/z 294.0→125.0。结果 多效唑质量浓度在4.812~240.6 ng/mL范围内与离子相对丰度线性关系良好($r=0.9998$); 仪器检测限为0.11 pg, 方法检测限为0.055 ng/g(含糖型颗粒剂、胶囊剂、片剂), 0.11 ng/g(无糖型颗粒剂)。精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于3.0%; 平均加样回收率为86.87%, RSD为3.33%($n=6$)。237批次样品中有208批次(87.76%)检出多效唑, 3种剂型(颗粒剂、胶囊剂、片剂)均有涉及, 最高残留量为0.3773 mg/kg; 24批次超出拟订限度, 均为含糖型颗粒剂。结论 该方法操作简便、结果准确, 可用于检测玄麦甘桔制剂中多效唑的残留量。

关键词:超高效液相色谱串联质谱法; 玄麦甘桔制剂; 多效唑

Detection of Paclobutrazol Residues in Xuanmai Ganju Preparation

HU Liang^{1,2}, SUN Hui^{1,2}, DING Ye^{1,2}, LUO Yan^{1,2}, LI Wenli^{1,2}, LI Jingyun^{1,2}

(1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha, Hunan, China 410001; 2. Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation, Changsha, Hunan, China 410001)

Abstract: Objective To establish an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the detection of paclobutrazol residues in Xuanmai Ganju Preparation. **Methods** The chromatographic column was Welch Ultimate LP-C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate solution containing 0.1% formic acid (55:45, V/V), the flow rate was 0.2 mL/min, the column temperature was 30℃, and the

*基金项目: 2022年国家药品抽检专项。

第一作者: 胡亮, 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品质量标准, (电子信箱)530289007@qq.com。

Δ通信作者: 李靖云, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品质量标准, (电话)0731-82275853。

且最大鉴定率均为100%的情况, 因此本研究中还结合了形态学观察结果, 以得到准确的鉴定结果^[9]。霉菌的ITS序列在结构和功能上具有高度保守性, 是微生物核酸测序鉴定分类中得到广泛应用的DNA特征性核酸序列之一, 方法易于标准化^[10-11]。这也是本研究中采用ITS序列分析技术进行霉菌污染溯源的原因, 且该方法简单、快速、重复性好。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 502-504.
- [2] 李超银, 魏鲜娥. 食品实验室检验超标结果的调查[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 8152-8156.
- [3] 刘卫德, 刘绪平, 熊骏, 等. 无菌药品生产洁净车间环境菌鉴定与溯源分析[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(11): 1335-1340.
- [4] 黄结, 覃思. 白砂糖中出芽短梗霉的鉴定及溯源[J]. 中国酿造, 2017, 36(9): 78-79.
- [5] 张国林, 邢以文, 薛满. 基于16S核糖体序列分析对无菌药品检出菌溯源的分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(8): 1473-1480.

- [6] 谢春霞, 孙玉娟, 马艳辉, 等. MALDI-TOF-MS技术在临床分离丝状真菌鉴定中的应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(8): 950-955.
- [7] PETTI CA, WEINSTEIN MP, RELLER LB. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing[J]. Clinical Infectious Diseases, 2007, 44: 1108-1114.
- [8] STACKEBRANDT E, EBERS J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. Microbiol Today, 2006, 33(4): 152-155.
- [9] 孙雪奇, 陈婕, 秦力, 等. 16SrDNA序列分析法在注射剂微生物污染鉴定及溯源分析中的应用[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(1): 53-57.
- [10] 李琼琼, 范一灵, 宋明辉, 等. 基于高通量测序的6类中药饮片污染微生物群落特征分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 1945-1953.
- [11] 冯震, 李芳, 宋明辉, 等. 16S核糖体RNA基因片段分析及在药品葡萄球菌污染控制应用中的探讨[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 680-687.

(收稿日期: 2023-02-10; 修回日期: 2023-03-02)

injection volume was 3 μL . The positive-ion electro-spray ionization (ESI^+) was adopted with the multiple reaction monitoring (MRM) mode, the detected ion pair was m/z 294.0 \rightarrow 70.2, m/z 294.0 \rightarrow 125.0. **Results** The linear range of paclitaxel was 4.812 - 240.6 ng/mL ($r = 0.9998$). The limit of detection of instrument was 0.11 pg, the limits of detection of method were 0.055 ng/g (sugar-containing granules, capsules, tablets) and 0.11 ng/g (sugar-free granules). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The average recovery rate of paclitaxel was 86.87% with an RSD of 3.33% ($n = 6$). Among the 237 batches of samples, paclitaxel was detected in 208 batches (87.76%), involving three dosage forms (granules, capsules and tablets), with a maximum residues of 0.3773 mg/kg. Paclitaxel in 24 batches of samples was over the prescribed limit, and these samples were all sugar-containing granules. **Conclusion** This method is simple and accurate, which can be used to detect the residues of paclitaxel in Xuanmai Ganju Preparation.

Key words: UPLC-MS/MS; Xuanmai Ganju Preparation; paclitaxel

玄麦甘桔制剂主要有颗粒、胶囊和含片3种剂型,全国共有生产企业65家,国药准字65个,应用较广。其处方由玄参、麦冬、桔梗和甘草4味药材组成,具有清热滋阴、祛痰利咽功效,可用于治疗阴虚火旺、虚火上浮、口鼻干燥、咽喉肿痛^[1-3]。处方中麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker - Gawl. 的干燥块根^[4],质量标准收载于2020年版《中国药典(一部)》,具有养阴生津、润肺清心功效,多用于治疗肺燥干咳、喉痹咽痛、津伤口渴、内热消渴等证^[5]。目前,麦冬多为栽培品,在栽培过程中可能使用以多效唑、丁酰肼、矮壮素、缩节胺等植物生长调节剂,可显著促进麦冬块根的形成,达到增产目的^[6-9]。其中“壮根灵”类生长调节剂中多效唑使用普遍,其理化性质相对稳定,但降解较缓慢,在土壤中的吸附率高,残留较严重。植物根系在吸收土壤中营养的同时,也会吸收土壤中残留的多效唑,再通过饮食或食物链的富集进入体内,对人体健康造成安全隐患^[10-13]。本研究中基于 QuEChERS 技术,建立了检测成方制剂中多效唑残留量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法,同时考察了16批次麦冬药材中多效唑的残留量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Dionex UltiMate 3000型超高效液相色谱仪、TSQ Endura 三重四极杆质谱系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); AE240型电子天平(精度为0.1 mg)、XSE205DU型电子天平(精度为0.01 mg),均购自瑞士 Mettler Toledo 公司; KQ500DE型超声波清洗机(昆山舒美超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

多效唑对照品(上海安谱瑾世标准技术服务有限公司,批号为2100922,含量95.2%); WondaPak QuEChERS 醋酸钠提取包[批号为5010050021,含无水硫酸镁与无水乙酸钠的混合粉末(4:1, m/m)7.5 g], 净化包[含无水硫酸镁900 mg、*N*-丙基乙二胺(PSA)300 mg、十八烷基硅烷键合硅胶300 mg、硅胶300 mg、石墨化炭黑90 mg], 固相萃取净化管,均购自日本 Shimadzu 公

司; 甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为纯化水; 237批次玄麦甘桔制剂样品,涉及32家生产企业,其中颗粒剂229批次、胶囊和含片各4批次,来源为2022年国家药品监督管理局玄麦甘桔制剂品种抽验工作抽验样品; 麦冬药材16批,均为企业提供。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件: 色谱柱为 Welch Ultimate LP - C_{18} 柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-含0.1%甲酸的5 mmol/L 乙酸铵溶液(55:45, V/V); 流速为0.2 mL/min; 柱温为30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为3 μL 。

质谱条件: TSQ Endura 三重四极杆质谱仪,采用电喷雾正离子(ESI^+)模式,喷雾电压为3800 V,鞘气流速为35 Arb,辅助气流速为15 Arb,离子传输管温度为350 $^{\circ}\text{C}$,蒸发温度为300 $^{\circ}\text{C}$,扫描模式为多反应监测(MRM)。多效唑选择 m/z 294.0 \rightarrow 70.2、 m/z 294.0 \rightarrow 125.0作为检测离子对,碰撞能量分别为20, 36 V。取对照品溶液,进样3 μL ,按上述离子对测定的MRM色谱峰的信噪比应大于10:1。

2.2 溶液制备

对照品溶液: 取多效唑对照品12.03 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得对照品溶液 I(质量浓度为120.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 精密吸取1 mL,置50 mL容量瓶中,用甲醇定容,即得对照品溶液 II(质量浓度为2.406 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 精密吸取1 mL置10 mL容量瓶中,用甲醇定容,即得对照品溶液 III(质量浓度为240.6 ng/mL)。

供试品溶液与阴性对照品溶液: 取样品内容物[颗粒10 g(含糖型)或5 g(无糖型),胶囊、含片各10 g], 研细,精密称定,置50 mL聚苯乙烯具塞离心管中,加入1%冰醋酸溶液15 mL,超声(功率500 W、频率40 kHz,下同)处理15 min,精密加入乙腈15 mL,1500次/分振荡5 min,冰浴中冷却30 min; 加入 QuEChERS 提取包,立即摇散,1500次/分振荡5 min,8000 r/min离心5 min; 取上清液9 mL,置已预先装有净化材料的分散固相萃取净化管中,净化管中加入 QuEChERS 净化包,涡旋使

充分混匀, 2 000次/分振荡5 min使净化完全, 8 000 r/min离心5 min; 取上清液, 滤过。以供试品溶液中未检出多效唑的为阴性对照品溶液, 检出多效唑的为供试品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取对照品溶液Ⅲ、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量, 按2.1项下试验条件进样测定, 记录离子流图。结果, 阴性对照品溶液在与多效唑对照品溶液保留时间相同处无干扰峰, 表明专属性良好。详见图1。

线性关系考察:分别精密量取2.2项下对照品溶液Ⅱ 1 mL, 分别置10, 20, 50, 100, 200, 500 mL容量瓶

中, 用甲醇定容, 即得系列对照品溶液。精密量取3 μ L, 按2.1项下试验条件进样测定, 记录离子相对丰度。以多效唑质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、 m/z 294.0 \rightarrow 70.2离子相对丰度(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 10\,574X - 10\,766$ ($r = 0.999\,8$)。结果表明, 多效唑质量浓度在4.812 ~ 240.6 ng/mL范围内与离子相对丰度线性关系良好。

检测限考察:取线性最低点(质量浓度4.812 ng/mL)及供试品溶液各适量, 倍比稀释, 以 m/z 294.0 \rightarrow 70.2作为检测离子, 按2.1项下试验条件进样测定, 按信噪比(S/N)约为39进行折算。结果仪器检测限为0.11 μ g, 方法检测限分别为0.055 ng/g(含糖型颗粒剂、胶囊剂、片剂), 0.11 ng/g(无糖型颗粒剂)。

精密度试验:取2.2项下供试品溶液适量, 按2.1项下试验条件连续进样测定6次, 记录离子相对丰度。结果的 RSD 为2.74% ($n = 6$), 表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置0, 2, 12, 18, 24 h时按2.1项下试验条件进样测定, 记录离子相对丰度。结果的 RSD 为1.76% ($n = 5$), 表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:精密称取同一批样品适量, 各6份, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 再按2.1项下试验条件进样测定, 记录离子相对丰度并计算含量。结果多效唑平均含量为101.77 ng/g, RSD 为1.76% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(101.77 ng/g)适量, 共6份, 分别加入一定质量浓度的多效唑对照品溶液, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 再按2.1项下试验条件进样测定, 记录离子相对丰度, 并计算加样回收率, 结果见表1。

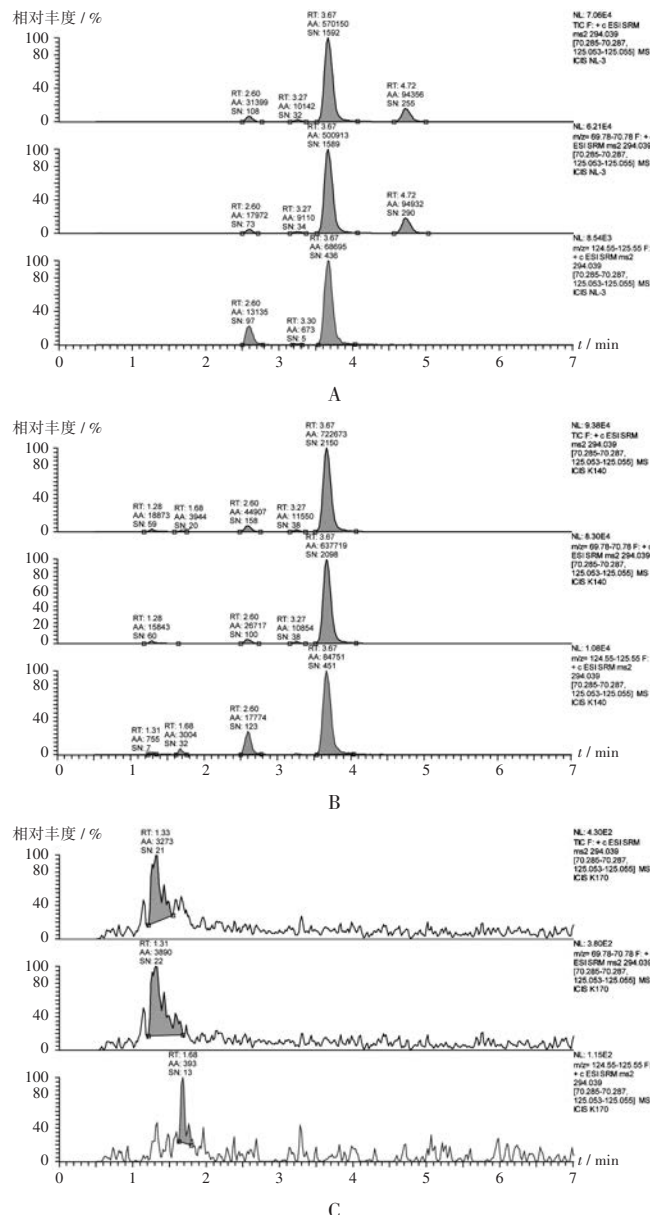
表1 加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(ng)	加入量(ng)	测得量(ng)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
5.032 9	512.20	458.10	933.27	91.92	86.87	3.33
5.001 5	509.00	458.10	891.16	83.42		
5.000 7	508.92	458.10	906.51	86.79		
4.986 4	507.47	458.10	907.41	87.30		
5.003 9	509.25	458.10	897.74	84.80		
4.997 8	508.63	458.10	907.17	87.00		

2.4 样品含量测定

取16批麦冬药材样品及237批玄麦甘桔制剂样品各适量, 分别按2.2项下方法制备供试品溶液, 再按2.1项下试验条件进样测定, 平行测定3次, 记录离子相对丰度, 并计算样品含量。结果16批麦冬药材样品均检出多效唑, 检出含量范围0.006 ~ 0.469 mg/kg。208批次制剂样品(87.76%)检出多效唑, 涉及全部生产企业; 含糖型



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 离子流图

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 Ion chromatograms

颗粒、无糖型颗粒、胶囊剂、含片样品检出范围分别为0.000 7~0.377 3 mg/kg、0.015 0~0.096 2 mg/kg、0.214 3~0.246 8 mg/kg、0.037 6~0.059 5 mg/kg。按麦冬中多效唑0.5 mg/kg(我国规定其在水果谷物中最高残留限量为0.2~0.5 mg/kg)折算,各制剂中的多效唑限度分别不得过0.04,0.08,0.137,0.571 mg/kg。结果24批次超出拟订限度,均为含糖型颗粒剂,涉及7家生产企业,详见表2。

表2 多效唑超限玄麦甘桔颗粒样品(含糖型)含量(mg/kg)
Tab. 2 Content of paclobutrazol in the sugar-containing Xuanmai Ganju Granules with paclobutrazol over the limit (mg/kg)

企业	批号	含量	企业	批号	含量	企业	批号	含量
A	210018	0.0597	D	211214	0.0525	E	210905	0.2888
B	211202	0.0807	E	211105	0.2944	E	211109	0.0880
B	220504	0.0705	E	211109	0.1102	F	2210801	0.0722
B	220501	0.0538	E	210901	0.1955	F	2210703	0.0483
B	220503	0.0637	E	211106	0.3773	F	2220203	0.0547
C	211004	0.0589	E	210904	0.1784	F	2220204	0.0515
D	210820	0.0543	E	211109	0.0810	G	220202	0.0510
D	211217	0.0536	E	211003	0.3328	G	220401	0.0489

3 讨论

本研究中采用质谱检测器对多效唑进行检测,具有灵敏度高、专属性强的特点。采用ESI⁺模式,设定在质谱二级裂解过程中碎片离子的扫描范围(从50 amu到比母离子大50 amu),监测其分子离子峰丰度变化情况, m/z 294.0作为母离子产生显著丰度的 m/z 70.2及 m/z 125.0等碎片离子,其中以丰度最高的子离子 m/z 70.2作为定量离子对。以多效唑的回收率为指标对超声时间(5, 10, 15, 20 min)进行考察,结果表明随着时间的延长回收率增加明显,但15 min和20 min回收率相当,故最终选择15 min作为超声时间。对不同提取溶剂(甲醇、乙腈)提取效果进行了考察,乙腈提取可避免样品基质中糖类和脂溶性色素等因素的干扰,提取更完全,故选择乙腈作为提取溶剂。

植物生长延缓剂属农药,不同国家水果蔬菜中的残留量均有相应规定,多效唑因其在土壤中的半衰期较长,有可能对非靶目标产生危害,许多欧盟国家已经禁用。日本、新西兰、韩国、澳大利亚等国规定多效唑的最高残留限量为0.5 mg/kg,我国规定多效唑在水果谷物中最高残留限量为0.2~0.5 mg/kg^[14-16],但对中药材、中成药无相关规定。考察玄麦甘桔制剂样品和麦冬药材中多效唑成分时以不同体质量患者多效唑每日允许摄入量为基准,按2020年版《中国药典(一部)》麦冬项下最大使用量12 g和多效唑最高含量0.469 mg/kg计算^[16],麦冬成人(体质量以50 kg计,下同)每日安全

服用量为10 660 g,为2020年版《中国药典(一部)》规定用量的888倍。以多效唑每日允许摄入量5 mg计,含糖型颗粒样品每日摄入量为0.015 mg,无糖型颗粒样品为0.001 9 mg,胶囊剂样品为0.001 mg,含片样品为0.000 7 mg。

综上所述,该方法操作简便、结果准确,可用于检测玄麦甘桔制剂中多效唑的残留量。样品中多效唑的每日摄入量远低于每日允许摄入量。从此方面看,样品中检出多效唑成分对人体的危害风险较低,但药品具有特殊性,多效唑在体内的具体作用机制尚不明确,是否存在与各药味中化学成分间相互反应有待进一步考证。

参考文献

- [1] 毛 靖. 玄麦甘桔颗粒(胶囊)治疗慢性咽喉炎疗效和安全性的系统评价[J]. 光明中医, 2015, 30(6): 1201-1205.
- [2] 林 菁. 加味玄麦甘桔膏的制备工艺研究[J]. 医学食疗与健康, 2020, 23(12): 26-27.
- [3] 周先富, 朱小平, 姜 帅. 加味银蒲玄麦甘桔汤防治鼻咽癌放疗后口腔干燥症的临床观察[J]. 全科医学临床与教育, 2022, 20(8): 755-757.
- [4] 旷湘楠, 朱 娜, 刘时乔. 麦冬化学成分研究[J]. 中国药业, 2018, 27(2): 19-22.
- [5] 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, 2020: 27-28, 162-163.
- [6] 杨江春, 刘广娜, 王贺玲. 缩节胺和多效唑在农业中的应用现状[J]. 吉林农业科技学院学报, 2018, 27(1): 20-21.
- [7] 刘洪峰. 植物生长延缓剂在药用植物栽培中的应用[J]. 农村实用技术, 2018(12): 48-49.
- [8] 林秋霞, 李 敏, 罗远鸿, 等. 植物生长调节剂对川麦冬生长发育影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1994-1996.
- [9] 王 婧, 石文鑫, 李 伟, 等. 探究植物生长调节剂对果树生长及水果品质的影响[J]. 果树资源学报, 2022, 3(6): 75-80.
- [10] 李翠英. 多效唑在小麦生产上的合理使用[J]. 农业知识, 2021(4): 14-15.
- [11] 叶坤浩, 赵 丹, 陈 杰, 等. 多效唑的作用机制及其对中药材的影响[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(13): 27-29.
- [12] 王宏霞. 生长抑制剂多效唑对大庆地区常用绿篱植物生长的抑制效应分析[J]. 现代园艺, 2022(8): 5-6.
- [13] 成 臣, 廖雅汶, 王志雯, 等. 不同多效唑残留浓度对生菜苗期生长的影响[J]. 北方园艺, 2022(6): 1-7.
- [14] 史晓梅, 金 芬, 黄玉婷, 等. 水果中常用植物生长调节剂的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 417-422.
- [15] 朱杰丽, 杨 柳, 柴振林, 等. 国内外植物生长调节剂限量标准分析研究[J]. 生物灾害科学, 2013, 36(2): 232-236.
- [16] GB 2763-2021, 食品安全国家标准: 食品中农药最大残留限量[S].

(收稿日期: 2023-01-03; 修回日期: 2023-04-19)