

气相色谱-质谱法同时测定三七须根中的 5 种杀菌剂残留

李彦生¹, 刘建辉¹, 段毅宏¹, 朱鹏静¹, 宋妮泽², 张 婷^{1*}

(1. 云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022; 2. 昆明市东川区疾病预防控制中心, 昆明 654100)

摘要: **目的** 建立一种气相色谱串联质谱法同时检测三七须根中 5 种杀菌剂残留量的方法。**方法** 用乙腈提取三七须根样品中的 5 种杀菌剂, 经氯化钠盐析, QuEChERS 净化后, 利用气相色谱-质谱联法进行定性、定量检测。**结果** 5 种杀菌剂在 0.05~5.00 µg/mL 的浓度范围线性关系良好, 相关系数为 0.9993~0.9998, 检出限为 0.0001~0.0011 mg/kg, 高中低 3 种加标浓度的平均回收率为 84.0%~102.5%, 相对标准偏差在 2.52%~5.22% ($n=5$)。**结论** 该方法简单灵敏、高效可靠, 适用于三七须根中 5 种杀菌剂的快速检测。

关键词: 三七须根; 杀菌剂残留; QuEChERS; 气相色谱-质谱联用法

Determination of 5 fungicides residues in fibrous root of *Panax notoginseng* by gas chromatography-mass spectrometry

LI Yan-Sheng¹, LIU-Jian-Hui¹, DUAN Yi-Hong¹, ZHU Peng-Jing¹, SONG Ni-Ze², ZHANG Ting^{1*}

(1. Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China;

2. Dongchuan District of Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 654100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of five fungicides in fibrous root of *Panax notoginseng* by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS). **Methods** Totally 5 kinds of fungicides in the samples of fibrous root of *Panax notoginseng* were extracted with acetonitrile, salted out by sodium chloride, purified by QuEChERS, then qualitative and quantitative detected by gas chromatography-mass spectrometry. **Results** All 5 fungicides had good linear relationships in the range of 0.05–5.00 µg/mL, and the correlation coefficients were 0.9983–0.9998. The limits of detection were 0.0001–0.0011 mg/kg. The average recoveries at 3 spiked levels (high, middle and low) were 84.0%–102.5%, with the relative standard deviations of 2.52%–5.22% ($n=5$). **Conclusion** The method is simple, sensitive, efficient and reliable, and is suitable for the rapid detection of 5 fungicides in *Panax notoginseng* root.

KEY WORDS: fibrous root of *Panax notoginseng*; fungicide residue; QuEChERS; gas chromatography mass spectrometry

1 引 言

三七(*Panax notoginseng*)为传统的名贵中药材, 也是我国最早的药食同源的植物之一^[1]。近年来, 随着三七产

业的迅速发展, 对三七根须的食用和药用价值的研究也逐年增加。研究显示, 三七须根的主要成分, 如皂苷类物质^[2-5]、微量元素^[6,7]、多糖^[8-11]等有效成分和三七相似^[12,13], 有着较高的药用和食用价值, 且民间也有用三七根须代替三七药

*通讯作者: 张婷, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为理化检验, 食品风险监测和食品安全。E-mail: zting15@163.com

*Corresponding author: ZHANG Ting, Master, Chief Technician, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, No.158, Dongsijie Street, Kunming 650022, China. E-mail: zting15@163.com

用,以及以三七根须炖鸡、炖肉、泡酒等为滋补佳品。因此加强对三七根须的质量控制,为充分利用资源,促进三七产业的健康发展提供有力保障。

由于三七为多年生喜阴喜温植物,连年单一品种大面积种植极易引发各种病害^[14-16],其中以黑斑病较为普遍且严重,该病会导致病株早期落叶,不能结籽和根块腐烂,严重影响三七及其附属产品的产量和数量。杀菌剂由于毒性较低,能有效防治黑斑病而被广泛应用^[17,18],多年的使用导致部分三七产地的土壤遭到污染,本实验室前期的研究表明,三七中杀菌剂的检出率较高,长期食用会对人体健康造成危害^[19]。而目前我国前尚无相关的检测和限值标准。

本研究根据实际调查,利用 QuEChERS 前处理方法溶剂用量少,处理步骤简单,提取效率高等优点^[20-22],结合气相色谱-质谱法灵敏度高,定性定量准确的特点^[23,24],建立一种同时检测三七须根中腐霉利、醚菌酯、腈菌唑、恶霜灵和丙环唑等 5 种在三七种植中常用杀菌剂残留的分析方法,为三七及其附属产品中杀菌剂的残留检测提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Trace 1310-ISQ 气相色谱-质谱联用仪(附带 AI1310 自动进样器,美国 Thermo Scientific 公司); DB-5 MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm, 美国 Agilent 公司); GP324S 电子天平(万分之一,美国 Satorous 公司); Heating Bath-49 旋转蒸发仪、Mixtre B-400 均质机(瑞士 BUCHI 公司); Multi Reax 全能型振荡器(德国 Heidolph 公司); 1-16 离心机(德国 Sigma 公司); ImaD-78224 Singen/Htw 超声波提取仪(德国 IKA 公司)。

氯化钠(农残级,上海 Aladdin 工业公司); 无水硫酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,450 °C 干燥后使用); 乙腈(色谱级,美国 J.T Baker 公司); QuEChERS 小柱(通用型,内含 50 mg PSA, 50 mg C₁₈, 7.5 mg GCB, 150 mg MgSO₄, 规格 2 mL, 美国 Agilent 公司)。

腐霉利、醚菌酯、腈菌唑、恶霜灵、丙环唑 5 种杀菌剂的标准物质均为北京坛墨质检科技有限公司产品,其浓度均为 100 μg/mL。

三七须根均购于云南省文山三七国际交易市场。

2.2 仪器条件

气相色谱(gas chromatography, GC)进样口温度: 280 °C; 色谱柱温度: 初温 170 °C 保持 1.0 min, 以 10 °C/min 升至 260 °C, 保持 2 min; 进样量 1.0 μL; 不分流进样, 载气为高纯氮, 纯度≥99.999%, 柱流量 1.0 mL/min。

质谱(mass spectrometry, MS)电离方式: 电子轰击离子

源(electron impact ion source, EI); 离子源温度: 240 °C; 传输线温度: 240 °C; 扫描方式: 全扫描(full scanning, SCAN)和选择离子检测(selected ion monitor, SIM)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品制备

三七须根样品采用四分法缩分,取样品约 10 g,粉碎备用。

准确称取粉碎好的三七须根样品 2.5 g(精确至 0.0001 g)置于 50 mL 离心管中,加水 5 mL 混匀浸泡 3 h,加乙腈 20 mL,全能型振荡器 1800 r/min 涡旋 10 min,之后超声提取 5 min,加入约 2 g 氯化钠,再涡旋 1 min,以 4000 r/min 离心 5 min,上清液备用。

2.3.2 样品净化

将上述提取液过无水硫酸钠后于 45 °C 水浴中减压蒸馏至近干,用 1.0 mL 乙腈复溶后转移至 QuEChERS 小柱中,以 800 r/min 涡旋 2 min, 4000 r/min 离心 5 min,取上清液置于进样瓶中,供 GC-MS 测定。

2.3.3 标准混合溶液的配制

取 5 种杀菌剂空白样品三七须根 5 份,按照以上方法处理后,加入一定量的标准物质,以乙腈定容至 1.0 mL,配制浓度均为 0.05、0.10、0.50、1.00、5.00 μg/mL 的标准工作曲线,按照浓度从低到高,均取 1.0 μL 进行 GC-MS 检测分析,并绘制标准曲线。

2.3.4 计算方法

利用表 1 中的监测离子定性、定量离子定量,回归方程计算出 2.3.2 中待测液的浓度(μg/mL),再按公式(1)计算三七须根样品中杀菌剂残留的含量。

$$X = \frac{A \times V \times 1000}{m \times 1000} \tag{1}$$

其中: X 为三七须根试样中杀菌剂残留的浓度, mg/kg;

A 为由标准曲线方程计算得到的待测液中杀菌剂浓度, μg/mL;

V 为样品提取液的最终定容体积, mL;

m 为三七须根试样的称样量, g。

表 1 5 种杀菌剂的保留时间和监测离子
Table 1 Retention time and monitoring ions of 5 flungicides

名称	保留时间/min	定性离子	定量离子
腐霉利	8.56	96,258	283.0
醚菌酯	9.45	131.1,116.1,313.2	206.1
腈菌唑	9.57	150,181, 245	179
恶霜灵	10.33	233,278	163
丙环唑	10.93	259,175	259.0

3 结果与分析

3.1 定性定量离子的选择

在选定的 GC-MS 仪器条件下, 结合 Scan 和 SIM 两种扫描方式的特点, 先采用 Scan 扫描进行定性分析, 溶剂延迟 4 min, 质谱采集时间为 4~15 min, 扫描质量(m/z)数范围: 30~550, 用以确定 5 种杀菌剂的保留时间, 样品色谱峰的保留时间需要与标准物质的 Scan 扫描色谱图(图 1)保持一致, 谱图相似, 全部监测离子以及丰度一致, 才可确定样品中有该种杀菌剂残留; 使用标准物质 SIM 扫描色谱图(图 2)对待测物进行定量分析, 建立标准曲线。各杀菌剂的保留时间和监测特征离子详见表 1。

3.2 标准曲线和检出限

在选定仪器条件下, 以标准溶液的浓度为横坐标, 标准品峰面积为纵坐标绘制标准曲线。5 种杀菌剂在 0.05~5.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内均有良好的线性关系, 结果详见表 2。

3.3 重现性实验、回收率和精密度

在三七须根基质中分别添加高中低 3 种不同浓度的杀菌剂混合标准溶液做加标回收实验。结果表明(见表 3), 回收率为 84.0%~102.5%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 2.52%~5.22%之间。表明本方法具有较好的回收率、稳定性和可靠性。

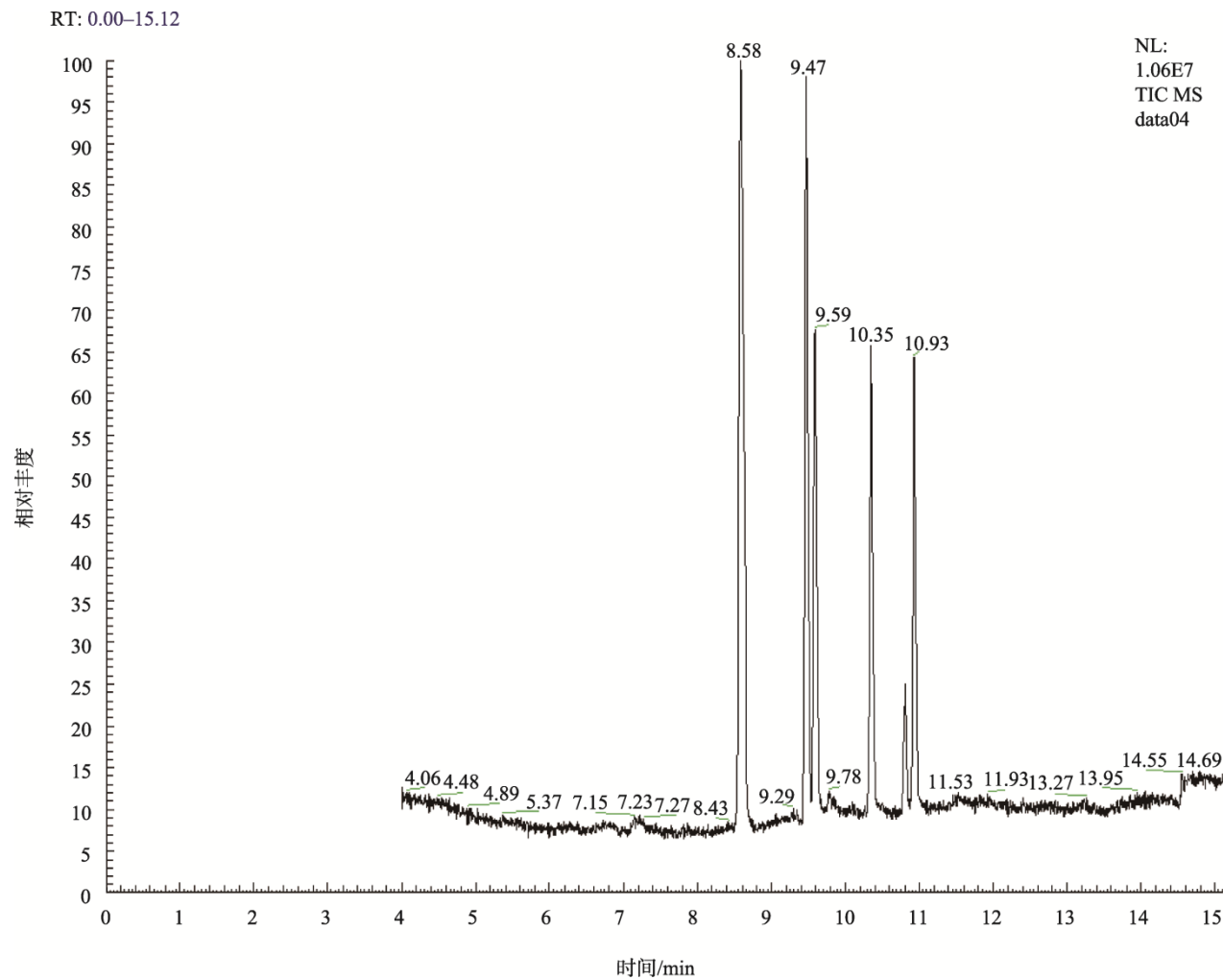


图 1 混合标准物质的 SCN 图
Fig.1 SCN chromatogram of the mixed standard solution

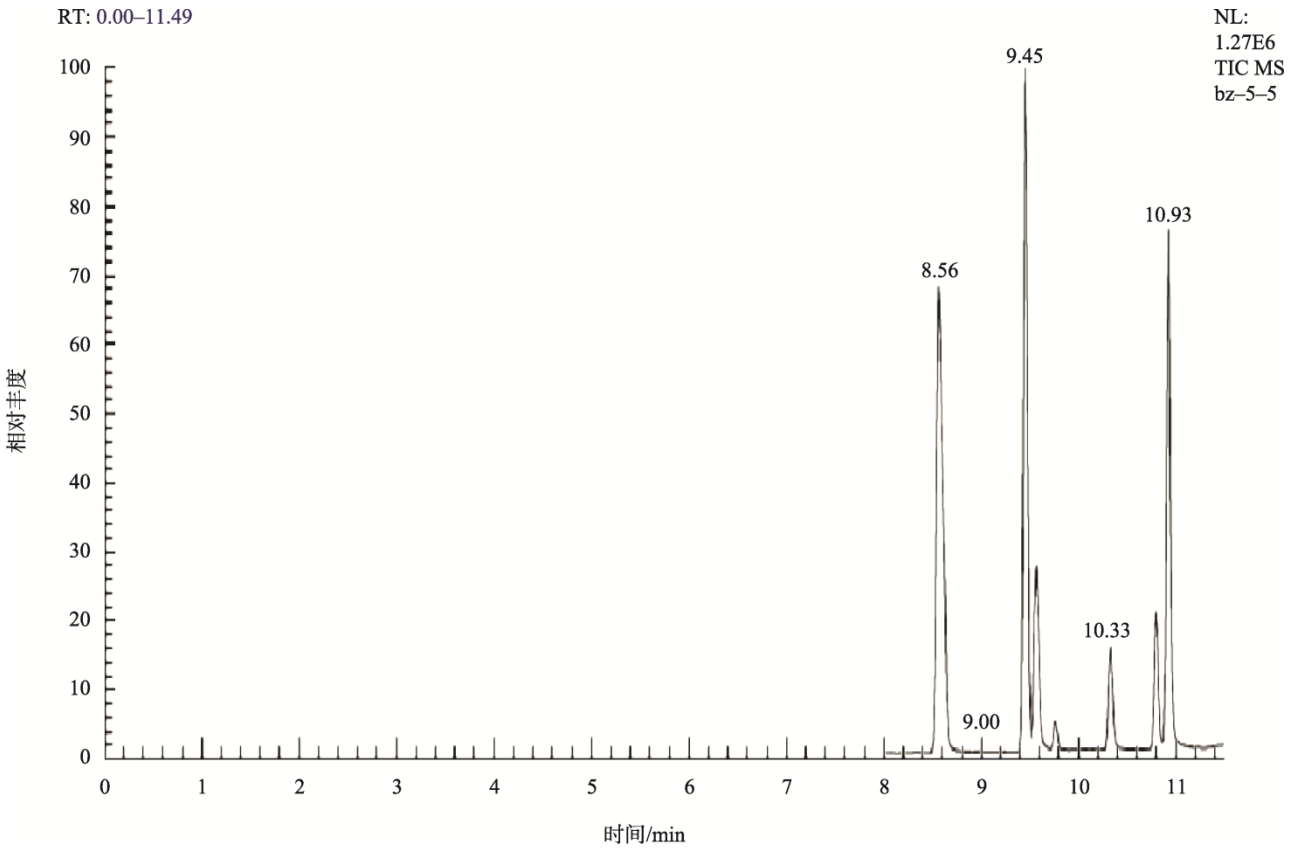


图 2 混合标准物质的 SIM 图
Fig.2 SIM chromatogram of the mixed standard solution

表 2 5 种杀菌剂的回归方程和相关系数和检出限
Table 2 Regression equations, correlation coefficients and limits of detections of 5 flungicides

名称	回归方程	相关系数/ <i>r</i>	检出限/(mg/kg)
腐霉利	$Y=649958X+182435$	0.9993	0.0006
醚菌酯	$Y=725146X+181573$	0.9996	0.0001
腈菌唑	$Y=116559X+20033.7$	0.9996	0.0008
恶霜灵	$Y=88520X+11444$	0.9998	0.0011
丙环唑	$Y=499458X+124571$	0.9995	0.0007

表 3 回收率和精密度结果(*n*=5)
Table 3 Results of recovery and precision (*n*=5)

名称	本底值/(mg/kg)	添加水平/(mg/kg)	平均检测值/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
腐霉利	0.2420	0.020	0.2604	92.0	4.92
		0.080	0.3188	96.0	3.24
		0.400	0.6312	97.3	3.98

续表 3

名称	本底值/(mg/kg)	添加水平/(mg/kg)	平均检测值/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
醚菌酯	0	0.020	0.0176	88.0	5.01
		0.080	0.0804	100.5	4.21
		0.400	0.3604	90.1	2.64
腈菌唑	0.1328	0.020	0.1504	88.0	5.22
		0.080	0.2132	100.5	3.52
		0.400	0.4932	90.1	3.33
恶霜灵	0.3700	0.020	0.3868	84.0	4.42
		0.080	0.4424	90.5	4.02
		0.400	0.7436	93.4	2.52
丙环唑	0	0.020	0.0188	94.0	3.96
		0.080	0.0820	102.5	3.44
		0.400	0.3760	94.0	2.94

3.4 三七须根样品检测

按照本方法检测了在云南省文山三七国际交易市场购买的 34 个样品, 检测表明恶霜灵的检出率最高, 为 76.5%, 检出浓度在 0.0036~0.0343 mg/kg, 其余依次为腐霉利, 检出率为 58.8%, 检出浓度在 0.0015~1.1000 mg/kg, 腈菌唑为 35.3%, 检出浓度在 0.0087~0.6340 mg/kg, 丙环唑为 29.4%, 检出浓度为 0.0667~1.2500 mg/kg, 而醚菌酯在各样品中均未检出。检出率结果详见图 3。

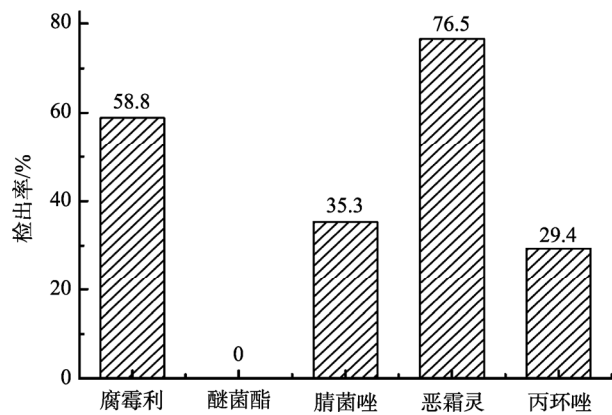


图 3 三七须根中各杀菌剂组分的检出率
Fig.3 Detection rates of different flungicide in fibrous root of *Panax notoginseng*

4 结 论

本研究采乙腈溶剂对三七须根样品进行提取, 用 QuEChERS 方法进行进化, 利用 GC-MS 同时检测腐霉利、醚菌酯、腈菌唑、恶霜灵和丙环唑等 5 种杀菌剂, 利用标准曲线外标法进行定量, 采用基质加标的方法进行回收率和精密度的测定。结果表明, 该方法简单可靠, 灵敏度高, 适用于同时对三七须根中以上 5 种杀菌剂残留量的定性定量检测。在目前尚无同时检测这 5 种杀菌剂相关标准方法和限值的情况下, 本实验也可以为相关工作提供参考。

参考文献

[1] 李琳, 王承潇, 崔秀明. 活性三七药材质量特征研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(35): 12457-12460, 12471.
Li L, Wang CX, Cui XM. Study on quality characteristics of active *Panax notoginseng* [J]. J Anhui Agric Sci, 2014, 42(35): 12457-12460, 12471.

[2] Cui Q, Liu JZ, Xu WJ, *et al.* Enhanced extraction and preconcentration of main target saponins from *Panax notoginseng* root using green and efficient formulated surfactant aqueous systems [J]. J Cleaner Prod, 2019, 210: 1507-1516.

[3] Jia XH, Wang CQ, Liu JH, *et al.* Comparative studies of saponins in 1-3-year-old main roots, fibrous roots, and rhizomes of *Panax notoginseng*,

- and identification of different parts and growth-year samples [J]. J Nat Med, 2013, 67(2): 339–349.
- [4] Shi SM, Liu YZ, Tai W, *et al.* Smashing tissue extraction and HPLC determination of active saponins from different parts of *Panax notoginseng* [J]. Chin Herbal Med, 2012, 4(4): 340–344.
- [5] 梁秋云, 刘华钢, 赖茂祥, 等. 三七茎基与须根含量测定方法的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(1): 36–37.
- Liang QY, Liu HG, Lai MX, *et al.* Study of determination of lutou and fibrous root of its radix [J]. J Guangxi Med Univ, 2006, 23(1): 36–37.
- [6] 郝南明, 田洪, 苟利. 三七生长初期不同部位微量元素的含量测定 [J]. 广东微量元素科学, 2004, 11(6): 31–34.
- Hao NM, Tian H, Gou L. Determination of trace element's content in different parts of Wenshangseng in initial stage [J]. Guangdong Trace Elements Sci, 2004, 11(6): 31–34.
- [7] 李密, 史俊友, 景年华, 等. 三七花和三七须根中五种微量元素的测定 [J]. 山东化工, 2018, (47): 78–80.
- Li M, Shi JY, Jing NH, *et al.* The determination of five kinds of microelements for flower buds and fibrous root of *Panax notoginseng* [J]. Shandong Chem Ind, 2018, (47): 78–80.
- [8] Feng SL, Cheng HR, Xu Z, *et al.* Antioxidant and anti-aging activities and structural elucidation of polysaccharides from *Panax notoginseng* root [J]. Process Biochem, 2018, (78): 189–199.
- [9] 陈金娥, 刘慧, 赵志刚, 等. 响应面法优化超声波提取三七根多糖工艺研究 [J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(4): 138–136.
- Chen JE, Liu H, Zhao ZG, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Panax notoginseng* root polysaccharides using response surface methodology [J]. J Agric Sci Technol, 2018, 20(4): 138–136.
- [10] 刘岩, 范开, 李龙军, 等. 三七多糖含量的测定方法及不同部位多糖的含量变化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 118–120.
- Liu Y, Fan K, Li LJ, *et al.* Studies on content determination the polysaccharides in *panax notoginseng* and change of polysaccharides in *Panax notoginseng* collected at different parts [J]. Chin J Exp Trad Med Formul, 2012, 18(19): 118–120.
- [11] 杨娟, 袁一征, 尉广飞, 等. 三七植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 世界科学技术-中医现代化, 2017, 10(19): 1641–1647.
- Yang J, Yuan YZ, Wei GF, *et al.* Research of progress of chemical composition and pharmacological actions of *Panax notoginseng* [J]. World Sci Technol-Mod Trad Chin Med Mater Med, 2017, 10(19): 1641–1647.
- [12] Xiong Y, Chen LJ, Man JH, *et al.* Chemical and bioactive comparison of *Panax notoginseng* root and rhizome in raw and steamed forms [J]. J Ginseng Res, 2017, (11): 1–9.
- [13] Yang ZZ, Zhu JQ, Zhang H, *et al.* Investigating chemical features of *Panax notoginseng* based on integrating HPLC fingerprinting and determination of multiconstituents by single reference standard [J]. J Ginseng Res, 2017, (42): 334–342.
- [14] 谭勇, 崔尹贻, 季秀玲, 等. 三七连作的根际、根内微生物变化与生态学进展 [J]. 中草药, 2018, 2(48): 391–399.
- Tan Y, Cui YS, Ji XL, *et al.* Research progress in microorganism changes of rhizospheric soil and rootendogenous and ecology during continuous cropping of *Panax notoginseng* [J]. Chin Trad Herbal Drug, 2018, 2(48): 391–399.
- [15] 刘立志, 王启芳, 张克勤, 等. 三七根腐病拮抗菌的筛选及活性长武的初步分离 [J]. 云南大学学报(自然科学版), 2004, 26(4): 357–359.
- Liu LZ, Wang QF, Zhang KQ, *et al.* The selection of antifungal bacteria against root rot of *Panax notoginseng* and the isolation of active metabolism substance [J]. J Yunnan Univ (Nat Sci Ed), 2004, 26(4): 357–359.
- [16] 孙雪婷, 李磊, 龙光强, 等. 三七连作障碍研究进展 [J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 885–893.
- Sun XL, Li L, Long GQ, *et al.* The progress and prospect on consecutive monoculture problems of *Panax notoginseng* [J]. Chin J Ecol, 2015, 34(3): 885–893.
- [17] 王勇, 陈昱君, 杨建忠, 等. 多种杀菌剂对三七黑斑病防效及与三七质量关系研究 [J]. 文山学院报, 2013, 26(6): 4–7.
- Wang Y, Chen YJ, Yang JZ, *et al.* Prevention effect of several fungicides on black spot disease and its influence on the quality of *Panax notoginseng* [J]. J Wenshan Univ, 2013, 26(6): 4–7.
- [18] 张连娟, 高月, 董林林, 等. 三七主要病害及其防治策略 [J]. 世界科学技术-中医现代化, 2017, 10(19): 1635–1640.
- Zhang LJ, Gao Y, Dong LL, *et al.* Major Diseases of *panax notoginseng* and their control strategies [J]. World Sci Technol-Mod Trad Chin Med Mater Med, 2017, 10(19): 1635–1640.
- [19] 李彦生, 刘建辉, 张婷, 等. QuEChERS-气相色谱质谱法同时测定三七中 20 种农药残留 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5725–5728.
- Li YS, Liu JH, Zhang T, *et al.* Determination of 20 kinds of pesticide residues in *Panax notoginseng* by QuEChERS-gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 9(21): 5725–5728.
- [20] Schenck FJ, Hobbs JE. Evaluation of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (quenchers) approach to pesticide residue analysis [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2004, 73: 24–30.
- [21] Rosa P, Pedro S, Priscilla PF, *et al.* QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1070: 1–28.
- [22] 段毅宏, 张婷, 刘建辉, 等. QuEChERS-气相色谱-质谱联用法检测茶叶中 3 种杀虫剂残留 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(10): 3814–3818.
- Duan YH, Zhang T, Liu JH, *et al.* Determination of 3 kinds of pesticide residues in tea by QuEChERS-gas chromatography-mass spectrometry [J].

J Food Saf Qual, 2017, 8(10): 3814-3818.

- [23] 王飞, 蒋阔, 郑屏. 食品中有害物质残留分析检测技术进展[J]. 安徽化工. 2007, 33(6): 3-7.

Wang F, Jiang H, Zheng P. Analyse & Test Technique of Harmful Material Remain in Food [J]. Anhui Chem Ind, 2007, 33(6): 3-7.

- [24] 劳哲, 韦丽丽, 江恩源. 气相色谱-质谱联用技术的应用研究进展[J]. 医药前沿, 2017, 7(10): 7-9.

Lao Z, Wei LL, Jiang EY. Research progress on application of GC-MS [J]. J Front Med, 2017, 7(10): 7-9.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



李彦生, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为理化检验。

E-mail: yshli@126.com



张 婷, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为理化检验, 食品风险监测和食品安全。

E-mail: zting15@163.com