

本土化SCIEX Triple Quad™系统测定中药中的59种植物生长调节剂

Quantitation of 59 Plant growth regulators in Traditional Chinese Medicine by Localize SCIEX Triple Quad™ System

雷敏, 龙志敏, 郭立海

Lei Min, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX, 中国

Key words: Plant growth regulators, Traditional Chinese Medicine, *Atractylodes macrocephala* Koidz., Localize SCIEX Triple Quad™ System

引言

植物激素是指植物体内天然存在的对植物生长、发育有显著作用的微量有机物质, 也被称为植物天然激素或植物内源激素。它的存在可影响和有效调控植物的生长和发育, 包括从细胞生长、分裂, 到生根、发芽、开花、结实、成熟和脱落等一系列植物生命全过程。植物生长调节剂, 是人工合成的(或从微生物中提取的天然), 具有和天然植物激素相似生长发育调节作用的有机化合物。按照登记批准标签上标明的使用剂量、时期和方法, 使用植物生长调节剂对人体健康一般不会产生危害。如果使用上出现不规范, 可能会使作物过快增长, 或者使生长受到抑制, 甚至死亡。2023年7月, 在上海举办的2023国家中药科学监管大会中药标准平行论坛^[2]上, 有专家提到针对植物生长调节剂滥用可能引起的药材质量变化、中药疗效弱化问题, 要逐步完善植物生长调节剂检测方法体系, 并进行标准规定和限量要求, 为中药材植物生长调节剂的有效控制提供技术支撑。

本文中实验方法特点

本方法采用QuEChERS前处理方法对中药材进行前处理, 使用本土化SCIEX Triple Quad™系统对59种植物生长调节剂进行定量, 方法特点如下:

- 1、使用本土化SCIEX Triple Quad™系统, 建立15 min 色谱梯度, 能够实现高通量定量分析。
- 2、方法灵敏度高(在中药基质中LOQ在1-10 ng/mL, 其中49个化合物LOQ低至1-2 ng/ml); 在各化合物线性范围内线性关系良好。
- 3、该方案中采用QuEChERS前处理方法对中药进行前处理, 流程简单易操作; 59个化合物回收率均满足要求, 不同浓度提取回收率在80~120%, 且RSD在11%以内。
- 4、该方案中包含59种植物生长调节剂的液质条件和前处理方法, 为中药中植物生长调节剂的定量工作提供参考。

实验方法

1. 样本QuEChERS前处理流程

本方案以中药白术为例, 进行前处理方案提取。

3 g 中药粉末+15 ml 0.1% 乙酸水置 50 ml离心管, 涡旋混匀, 静置30min, 再加入15 ml 乙腈, 涡旋混匀; 再加入QuEChERS盐包(无水硫酸镁 6 g, 氯化钠 1.5g), 立即摇散, 涡旋混匀1min, 置冰浴中10min, 离心5 min(4000 rpm/min), 取上清5 ml, 冷冻干燥浓缩至1 ml以下, 加入乙腈补足体积至1 ml; 离心5 min(4000 rpm/min), 取上清液进样。

其中, QuEChERS盐包(无水硫酸镁 6 g, 氯化钠 1.5g, Agela, 货号: MS-MG5051)

2. 仪器设备



图2. ExionLC™ 2.0系统和本土化SCIEX LC-MS/MS系统

3. 液相条件

液相：SCIEX Exion LC™ 2.0系统

色谱柱：HSS T3(2.1 × 100mm, 1.8 μm)

流动相A相: H₂O(含 0.1% 甲酸), B相: 甲醇

流速：0.3 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：2 μL

梯度洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	98	2
1.0	98	2
4.0	50	50
8.0	20	80
10.0	5	95
12.5	5	95
12.6	98	2
15	98	2

4. 质谱条件

SCIEX Triple Quad™系统

数据采集方法：Schedule MRM (分时间窗口多反应监测)

离子源：ESI源

极性：正、负离子模式同时检测

离子源参数：

气帘气CUR: 35 psi IS电压: 5500 V/-4500 V

源温度 TEM: 500°C 雾化气Gas1: 50 psi

辅助气Gas2: 50 psi 碰撞气CAD: 8 psi

59种植物生长调节剂的分时间窗口多反应监测离子通道 (Schedule MRM), 部分正、负离子对分别见表2-1, 2-2。

表2-1. 部分MRM离子对信息(正离子)

母离子Q1 (m/z)	子离子Q3 (m/z)	保留时间 (min)	化合物	DP (V)	CE (V)
213.1	94	7.61	1,3-二苯基脲-1	85	30
213.1	77	7.61	1,3-二苯基脲-2	85	35
215.2	141.1	9.09	萘乙酸乙酯-1	85	35
215.2	115.1	9.08	萘乙酸乙酯-2	85	45
186.1	141.1	6.51	萘乙酰胺-1	94	28
186.1	115.1	6.51	萘乙酰胺-2	94	45
200	155	6.92	坐果胺-1	75	20
200	91.1	6.91	坐果胺-2	75	30
204.1	186.1	7.08	3-吡啶丁酸-1	90	22
204.1	130	7.08	3-吡啶丁酸-2	90	35
257.2	81.2	6.97	环丙嘧啶醇-1	118	39
257.2	135	6.97	环丙嘧啶醇-2	118	34
212.1	170.2	6.04	莠去通-1	100	27
212.1	100.1	6.04	莠去通-2	100	35
296.2	240.2	11.09	仲丁灵-1	90	23
296.2	222.1	11.09	仲丁灵-2	90	30
214.1	172	8.77	氯苯胺灵-1	90	16
214	154	8.77	氯苯胺灵-2	90	25
240.1	125.1	8.19	异噁草松-1	65	35
240.1	89.1	8.19	异噁草松-2	65	65

表2-2. 部分MRM离子对信息(负离子)

母离子Q1 (m/z)	子离子Q3 (m/z)	保留时间 (min)	化合物	DP (V)	CE (V)
233	161	8.56	果实增糖剂-1	-90	-22
235	163	8.56	果实增糖剂-2	-90	-22
237	165	8.13	吲熟酯-1	-85	-25
237	135	8.13	吲熟酯-2	-85	-30
459	439	10.15	氟铃脲-1	-110	-18
459	276	10.15	氟铃脲-2	-110	-26
337	122	8.32	抗倒胺-1	-105	-23
337	78	8.32	抗倒胺-2	-105	-40
211	167	6.27	调环酸-1	-86	-20
211	193	6.27	调环酸-2	-86	-21
498.7	127.1	9.2	2,3,5-三碘苯甲酸-1	-45	-28
498.7	454.7	9.2	2,3,5-三碘苯甲酸-2	-45	-15
252.9	194.9	8.69	2,4,5-三氯苯氧乙酸-1	-50	-20
254.9	196.9	8.69	2,4,5-三氯苯氧乙酸-2	-50	-20
218.9	160.9	7.84	2,4-二氯苯氧乙酸-1	-90	-23
220.9	162.9	7.84	2,4-二氯苯氧乙酸-2	-90	-23

实验结果

典型色谱图

200 ng/mL 基质加标样品典型谱图见图2。从图2可以看出，色谱峰峰形良好。

灵敏度和线性考察

按照实验方法中样本QuEChERS前处理流程对中药白术进行提取后，获得白术空白基质样本。以空白基质样本作为溶剂，分别加入不同浓度的标准溶液，最终配置成 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100,

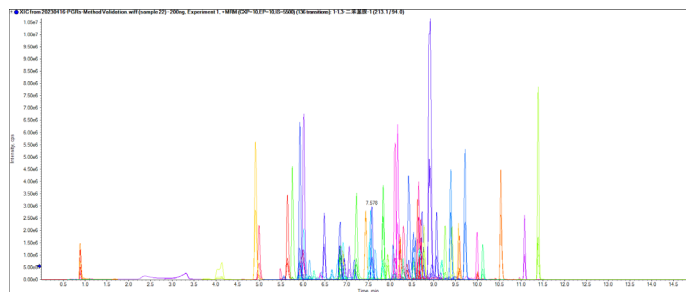


图2. 典型色谱图 (200 ng/mL白术基质加标样品)

200 ng/mL的标准溶液，进LC-MS/MS系统分析。不同浓度与峰面积计算线性回归方程，线性相关系数见表4。所有化合物的线性相关系数均在0.995以上，表明该方法线性关系良好。表4中的LOQ以两个离子对均能检出并定量的浓度展示。因部分化合物两个离子对响应差异大，或基质中基线提高，导致定性离子对的灵敏度无法做到更低。

提取回收率考察

称量9份白术粉末，分别加入标准溶液配制最终进样浓度为5, 20, 100 ng/ml低、中、高三个浓度，每个浓度平行配制3个，每个浓度进样两次，按照实验方法中样本QuEChERS前处理流程进行提取，该样本做为前加标样本。

低、中、高3个不同浓度的提取回收率结果中（见表4），回收率在均80~120%之间；每个浓度下6针提取回收率结果RSD均在11%以内，表明不同浓度的提取回收率结果基本一致，回收率满足药典对方法学要求。

结论

本方法采用QuEChERS前处理方法对中药材进行前处理，使用本土化SCIEX Triple Quad™ 系统对59个植物生长调节剂进行定量。该方法中空白溶剂无干扰，专属性好，特异性高；该方案中，基质样本中的LOQ在1-10 ng/ml，其中49个化合物LOQ在1-2 ng/ml，灵敏度高；且在各化合物的线性范围内，线性关系良好；15分钟梯度方法，检测通量高。前处理方法，提取流程简单易操作，提取回收率远满足药典要求。该方案中包含的液质条件和前处理提取方法，为中药材中植物生长调节剂的定量提供参考。

表4. 定量限 (LOQ)、相关系数 (r)、3个不同浓度的提取回收率及相对标准偏差

序号	化合物	中药基质 中LOQ(ng/ ml)	相关系数 (r)	5 ng/ml		20 ng/ml		100 ng/ml	
				回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
1	1,3-二苯基脲	1	0.999	102.61	5.47	102.53	4.53	101.63	2.26
2	萘乙酸乙酯	1	0.999	98.23	6.96	100.42	3.91	92.03	4.28
3	萘乙酰胺	1	0.998	104.40	4.44	104.43	5.90	105.68	2.01
4	坐果胺	2	0.998	102.25	5.43	95.22	6.91	105.36	7.27
5	3-吡啶丁酸	2	0.999	103.81	6.91	101.97	6.62	102.43	2.59
6	环丙嘧啶醇	1	0.997	107.97	6.98	107.87	3.83	109.83	5.35
7	莠去通	1	0.998	105.95	2.42	109.95	2.29	107.13	2.77
8	仲丁灵	1	0.998	98.75	3.80	85.32	2.72	93.15	3.09
9	氯苯胺灵	10	0.999	N/A	N/A	100.86	10.28	93.33	9.28
10	异噁草松	1	0.998	98.47	5.18	104	2.98	99.41	3.81
11	环己酰亚胺	10	0.997	N/A	N/A	115.3	8.02	107.97	4.93
12	烯唑醇	5	0.997	85.29	7.90	102.3	4.74	102.82	5.56
13	果实增糖剂	5	0.999	119.01	4.89	98.29	8.81	113.8	7.44
14	吡啶酯	1	0.998	98.08	4.12	103.12	4.39	105.78	1.89
15	咪唑醇	1	0.998	103.47	4.83	108.62	3.35	110.4	2.49
16	增产胺	1	0.997	105.15	5.13	104.88	4.32	105.5	3.41
17	氟铃脲	1	0.999	102.92	2.54	108.64	3.10	104.95	4.97
18	抗倒胺	1	0.998	103.19	7.77	98.26	7.93	106.06	4.14
19	稻瘟灵	1	0.998	99.16	6.77	107.66	6.02	111.27	2.71
20	6-咪喃氨基嘌呤	1	0.997	84.34	3.74	96.28	3.94	91.29	4.81
21	茉莉酸甲酯	2	0.998	86.72	7.11	94.97	3.91	93.23	10.82
22	烯腺嘌呤	1	0.998	89.61	5.57	99.59	1.98	92.42	4.67
23	多效唑	1	0.999	104.65	4.90	104.01	3.80	106.84	2.15
24	吡草醚	1	0.999	102.27	2.37	100.77	5.73	102.91	2.97
25	调环酸	2	0.995	92.96	7.22	89.92	2.27	94.57	3.75
26	茉莉酮	10	0.998	N/A	N/A	94.2	7.47	90.54	8.79
27	嘧啶胍草醚	1	0.999	89.06	2.87	93.89	3.85	89.66	3.17
28	环酯草醚	1	0.999	110.41	3.93	104.33	3.15	104.24	2.94
29	抑食肼	1	0.998	109.24	2.57	107.41	3.42	107.9	3.43
30	西玛津	2	0.999	100.08	5.79	99.66	8.23	108.43	8.92
31	戊唑醇	1	0.998	104.06	3.98	106.61	2.92	106.22	3.08
32	噻菌灵	1	0.998	98.69	1.77	101.49	1.94	98.97	2.81
33	三唑酮	1	0.998	101.17	2.85	101.66	2.97	102.37	3.27
34	抑芽唑	5	0.998	103.42	4.46	106.55	3.57	110.24	2.94
35	脱叶磷	1	0.998	95.88	4.18	91.85	4.82	95.45	3.52
36	抗倒酯	2	0.998	99.92	8.68	101.7	4.15	101.73	1.72
37	烯效唑	1	0.998	102.78	3.49	103.29	2.93	106.49	3.01
38	2,3,5-三碘苯甲酸	1	0.998	92.21	3.01	99.1	3.63	101.75	2.09
39	2,4,5-三氯苯氧乙酸	1	0.999	101.94	3.11	103.84	8.53	107.06	1.84

表4. 定量限 (LOQ)、相关系数 (r)、3个不同浓度的提取回收率及相对标准偏差 (续)

序号	化合物	中药基质 中LOQ(ng/ ml)	相关系数 (r)	5 ng/ml		20 ng/ml		100 ng/ml	
				回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
40	2,4-二氯苯氧乙酸	1	0.999	100.46	6.73	109.07	3.99	111.08	2.31
41	5-硝基邻甲氧基苯酚钠	5	0.999	102.71	5.55	99.47	4.44	98.52	3.39
42	2-萘氧乙酸	1	0.998	99.61	3.13	103.82	3.96	105.42	2.88
43	4-氯苯氧乙酸	1	0.999	103.64	2.77	99.6	4.95	104.13	2.1
44	4-氟苯氧乙酸	1	0.999	99.01	1.98	98.69	4.73	99.61	2.23
45	4-碘苯氧乙酸	1	0.999	104.22	1.73	104.78	2.98	106.44	1.41
46	灭草松	10	0.997	N/A	N/A	106.55	7.81	109.78	9.86
47	6-苄氨基嘌呤	5	0.997	90.90	2.72	97.29	1.84	92.59	4.44
48	苯吡嗪钾	1	0.999	101.39	7.92	101.33	9.73	102.84	3.13
49	调果酸	1	0.997	105.59	3.15	101.43	4.36	104.32	2.9
50	坐果酸	1	0.999	95.38	4.43	93.81	5.57	98.45	1.65
51	环丙酸酰胺	1	0.996	107.78	7.14	117.48	6.17	116.06	3.96
52	2,4-滴丙酸	2	0.999	81.90	4.48	99.28	7.56	117.95	2.36
53	地乐酚	1	0.998	109.48	1.53	116.86	1.71	105.14	1.67
54	氯吡脞	1	0.998	102.45	3.06	105.2	1.52	105.41	4.64
55	赤霉素3	5	0.999	96.59	8.46	97.54	6.38	99.46	3.49
56	赤霉素7	1	0.998	107.01	2.82	105.26	6.21	109.23	2.97
57	伏草胺	1	0.999	92.84	5.52	94.28	8.24	113.68	8.23
58	4-溴苯氧乙酸	1	0.999	105.72	2.86	100.62	5.27	98.32	2.17
59	脱叶脞/噻苯隆 (脱叶灵、脱叶脞)	1	0.998	105.22	3.71	103.18	7.35	102.65	2.27

注：LOQ以两个离子对均能检出并定量的浓度展示。因部分化合物两个离子对响应差异大，或基质中基线提高，导致定性离子对的灵敏度无法做到更低。

参考文献

- Sutcharitchan, C., Miao, S., Li, W., Liu, J., Zhou, H., Ma, Y., Ji, S., Cui, Y., High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for residue determination of 39 plant growth regulators in root and rhizome Chinese herbs, Food Chemistry (2020).
- 《中国医药报》，2023.07.25，国家中药科学监管大会中药标准平行论坛举办。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15747-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333

官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：SCIEX-China