实 验 方 法 与 技 术
Experimental Method & Technology

# 多抗霉素 B 在鲜人参中的储藏稳定性

张睿泓， 侯志广， 李广领， 李迎东， 冯 达， 李忠华， 张鑫宇， 逯忠斌*

（吉林农业大学资源与环境学院，长春 130118）

**摘要** 建立了鲜人参样品中多抗霉素 B 的简易样品前处理程序和 HPLC-MS/MS 检测方法，对 0～150 d 低温储藏的鲜人参添加样品进行了分析，考察了多抗霉素 B 在鲜人参样品中的低温储藏稳定性。结果表明，所建立分析方法在 0.01～2.0 mg/L 范围内线性响应良好，0.2～5.0 mg/kg 添加水平的平均回收率为 78.0%～94.7%，定量检测限为 0.275 mg/kg；鲜人参样品在－18℃和－20℃储藏条件下多抗霉素 B 的平均降解率均小于 30%，说明多抗霉素 B 在鲜人参样品中至少可以稳定储藏 150 d。该结果为多抗霉素 B 在人参上的残留登记试验提供了可靠的科学依据。

**关键词** 多抗霉素 B； 人参； 高效液相色谱-质谱； 储藏稳定性

**中图分类号**： S 451.2 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2018468

## Storage stability of polyoxins B in fresh *Panax ginseng*

ZHANG Ruihong， HOU Zhiguang， LI Guangling， LI Yingdong，
FENG Da， LI Zhonghua， ZHANG Xinyu， LU Zhongbin

（*College of Resource and Environment*, *Jilin Agricultural University*, *Changchun* 130118, *China*）

**Abstract** In order to investigate the low temperature storage stability of polyoxins B in fresh *Panax ginseng* samples, the spiked fresh *P. ginseng* which were stored at －18℃ and －20℃ for 0－150 days were analyzed by the established simple pretreatment program and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry detection method. The results showed that the established method had a good linear response in the range of 0.01－2.0 mg/L, the average recovery of polyoxins B spiked at 0.2－5.0 mg/kg in blank *P. ginseng* was between 78.0% and 94.7%, and the limit of quantitative detection was 0.275 mg/kg. The average degradation rate of polyoxins B in fresh *P. ginseng* samples was less than 30% at －18℃ and －20℃, indicating that polyoxins B can be steadily stored for at least 150 days in fresh *P. ginseng* samples. This result provides a reliable scientific basis for the polyoxins B residue field trials on *P. ginseng* field.

**Key words** polyoxins B； *Panax ginseng*； high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry； storage stability

在农药登记残留试验中，农药残留试验样品从田间取样后往往会因分析仪器、工作安排或人员调配等原因被储藏一段时间后才被检测。残留农药在样品中的储藏稳定性对农药残留分析工作至关重要，另外它也是农药登记试验数据的重要组成部分[1]。

研究表明，农药在样品中的储藏稳定性主要取决于残留农药自身的理化性质、样品基质特性和储藏温度条件三个方面。Afridi 等[2]在对小麦籽粒中氯菊酯、甲基毒死蜱和甲基嘧啶磷的储藏稳定性的研究中发现，储藏稳定性与残留农药的饱和蒸汽压和水溶性呈明显的负相关关系；Mouvet 等[3]比较了水溶性有差异的灭草松、异丙隆、甲草胺和特丁津 4 种除草剂在水中 4℃条件下的储藏稳定性，也发现这 4 种除草剂的水溶性与储藏稳定性存在负相关关系；Leahey 等[4]发现稻谷和小麦样本含水量与其中

**收稿日期**： 2018－11－05 **修订日期**： 2018－11－25
**基金项目**： 农业农村部行业标准专项(181721301092371097-2017)；吉林省参茸办人参产业发展专项资金(201501)
* 通信作者 E-mail：luzong1979@126.com

的甲基立枯磷残留的常温储藏稳定性成反比；Kobayashi 等[5]对黄瓜、香梨和马铃薯中乙撑硫脲在－20℃下的储藏稳定性进行了研究，发现乙撑硫脲在 pH 低的基质里降解速率低于高 pH 基质；Athanasopoulos 等[6]研究了葡萄中甲胺磷常温和 0℃下的储藏稳定性，发现 0℃下储藏的半衰期为 267 d，比常温下高出一个数量级；魏梅等[7]比较了室温、4℃和－20℃3 个储藏温度下联苯菊酯和甲氰菊酯在柑橘匀浆物中的储藏稳定性，发现随着储藏温度降低，两种菊酯类农药在柑橘中的储藏稳定期均表现为增长趋势；董见南[8]研究了 10 种有机磷杀虫剂和 8 种杀菌剂残留在甘蓝、番茄和柑橘等 7 种代表性基质中的储存稳定性，同样发现低温储藏不利于储藏过程中残留农药的降解。残留试验样品的储藏，需要综合考虑待试农药的理化性质及样品基质，并合理地确定储藏条件和储藏时间，这样才能确保储存期间待测物的性质和含量不发生变化，从而确保分析结果的可靠性和科学性。

多抗霉素 B（polyoxins B）为生物源抗生素农药，具有高效、安全、低风险的特点，符合当今食品安全、药品安全和生态安全的大方向，其在防治由 *Alternaria panax* Whetz 导致的人参黑斑病方面应用潜力巨大。本研究采用模拟添加法，建立并优化鲜人参样品中多抗霉素 B 残留的高效、高灵敏度的 HPLC-MS/MS 分析方法，研究不同储存温度下鲜人参中多抗霉素 B 残留的储藏稳定性，为推荐多抗霉素 B 在人参上登记试验的样品有效储藏期提供数据支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品、试剂与供试材料

色谱纯甲醇、甲酸、乙腈（购自 MREDA 公司），分析纯乙酸铵（购自北京鹏彩精细化工有限公司），多抗霉素 B 标准品（纯度 29.0%，购于 Dr. Ehrenstorfer GmbH）。

鲜人参根采自吉林省抚松县有机人参种植基地。

### 1.2 主要仪器设备

1260 系列 HPLC（Agilent Technology Inc.，USA），配置真空脱气机、自动进样器、柱温箱和二元泵。6470 型三重四极杆质谱仪、SHZ-88 型恒温水浴振荡器、IKA T25 型高速分散机、YXJ-A 型高速大容量电动离心机、IKA VORTEX 3 型涡旋仪等。

### 1.3 试验设计

将采集的有机鲜人参样品匀浆液与多抗霉素 B 标准溶液充分混匀，使多抗霉素 B 在人参样品中的最终含量分别为 1 mg/kg 和 2 mg/kg。将每 5 g 混合样品分装于 1 个 50 mL 聚丙烯离心管中，分别置于－18℃和－20℃冷冻条件下储存，按 0、7、14、28、60、90、120 和 150 d 间隔期取样分析，各次的样品均设 3 次重复，共计 96 个样品，另设空白对照和 1 mg/kg的质控样品。

### 1.4 样品前处理

将不同温度下的冷藏样品从冰箱中取出，平衡至室温，加入 0.3%甲酸 25 mL，涡旋1 min，5 000 r/min 离心 5 min，移取 1 mL 上清液，过 0.22 μm 滤膜至 HPLC 进样小瓶，待 HPLC-MS/MS 分析。

### 1.5 色谱和质谱条件

Agilent Zorbax $C_{18}$分离分析柱（3.0 mm×100 mm，1.8 μm），以 0.5 mmol/L 乙酸铵＋0.1%甲酸的溶液（A）和乙腈（B）为流动相，梯度洗脱程序为 0～1 min内，B 由 5%增至 10%；1～2 min 内，B 由 10%增至 20%；2～3 min 内，B 由 20%增至 30%；3～4 min内，B 由 30%增至 40%；4～5 min 内，B 由 40%增至 60%；5～7 min 内，B 由 60%降至 40%；7～9 min 内，B 由 40%降至 10%；9～10 min 内，B 由 10%降至 5%；平衡 5 min。设柱流速 0.3 mL/min、柱温恒定 30℃、进样 5 μL。根据仪器厂商推荐设定质谱各种气体参数、离子源温度、离子喷射电压，其他参数见表 1。

**表 1 正离子模式下多抗霉素 B 的 MRM 参数（ESI＋）**

**Table 1 MRM parameters of polyoxins B in positive ion mode (ESI＋)**

| 母离子 Precursor ion | 定量离子对 Quantity transition | 定性离子对 Quality transition | 碎裂电压/V Fragmentor | 碰撞能/eV Collision energy |
|---|---|---|---|---|
| $[M+H]^+$ (508.1) | 508.1→490.1 | 508.1→490.1 | 120 | 10 |
| | | 508.1→366.0 | 120 | 20 |

### 1.6 方法性能

分别用 10%甲醇将 1 000 mg/L 质量浓度的多抗霉素 B 标准溶液稀释成 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 和 1.0 mg/L 系列浓度的标准溶液；参照 1.4 描述的样品前处理程序处理空白人参样品，获得空白人参样品提取液，再将不同浓度的多抗霉素 B 标准溶液溶于相同体积的空白样品提取液制得 0.02、0.05、

0.1、0.2、0.5 和 1.0 mg/L 系列浓度的基质标准溶液。在 1.5 仪器条件下进样分析,分别以进样浓度($x$)为横坐标、峰面积($y$)为纵坐标,拟合出线性回归方程,评价线性关系,并计算方法的检出限(LOD)及定量限(LOQ)。用基质匹配标准曲线评价基质效应(matrix effects, ME),如果 ME≤10%,可忽略样品基质的影响,如果 ME>10%,需用基质匹配标准曲线进行定量校准,以减小基质的影响。

采用模拟添加法,用有机鲜人参样品匀浆液进行多抗霉素 B 的添加回收率试验,添加水平分别为 0.2、1.0 mg/kg 和 5.0 mg/kg,各添加水平分别做 5 次重复,分别用计算得到的添加回收率和相对标准偏差表示准确度和精密度。

## 2　结果与分析

### 2.1　方法的线性、检出限(LOD)及定量限(LOQ)

图 1 中 a 为 1 mg/L 多抗霉素 B 标准品的定量离子流色谱图、b 为多抗霉素 B 的两个选择离子的质谱图,c 为定性离子色谱图,图 2 为人参空白样品基质的两个选择离子色谱图(a,c)和质谱图(b)。

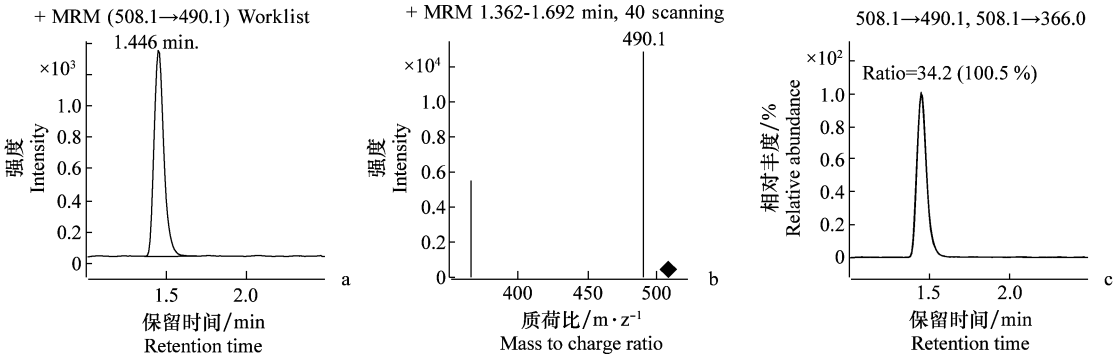



**图 1　1 mg/L 多抗霉素 B 标准样品的两个选择离子的色谱图和质谱图**

**Fig. 1　Total ion chromatogram and mass spectrum of 1 mg/L polyoxins B standard sample**

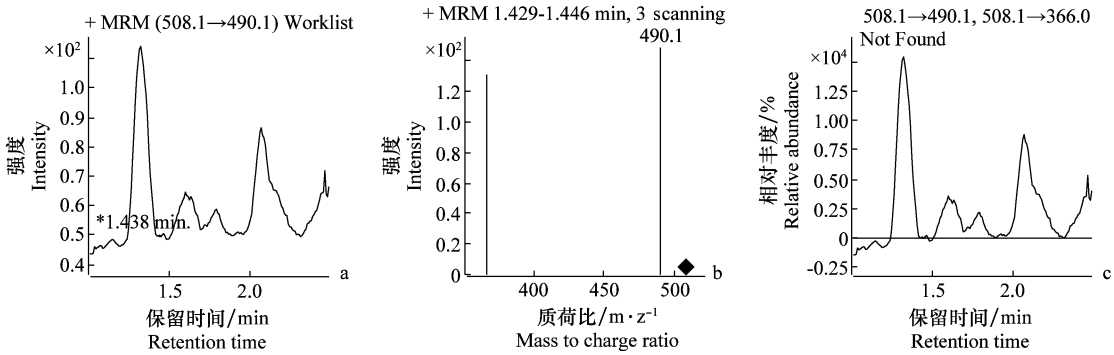



**图 2　人参空白样品提取物的两个选择离子的色谱图和质谱图**

**Fig. 2　Two selective ion chromatogram and mass spectrum of extracts of blank *Panax ginseng* sample**

由图 1 和图 2 可以看出,本研究所用人参样品不含多抗霉素 B,且在确定的色谱/质谱条件下,多抗霉素 B 与人参基质无干扰。

多抗霉素 B 在纯溶剂中和在空白人参样品基质中的线性回归方程分别为 $y=3.8x-17.7$($R^2=0.999\ 5$)和 $y=1.7x+22.7$($R^2=0.997\ 1$),说明在确定的仪器条件下,多抗霉素 B 在 0.01～2.0 mg/L 质量浓度范围内进样浓度和色谱峰积分面积有良好的线性响应。通过在空白基质提取液中添加少量适当浓度的多抗霉素 B 标准溶液进样分析,并分别根据 3 倍信噪比(S/N=3)和 10 倍信噪比(S/N=10)计算出的多抗霉素 B 的 LOD 为 0.413 ng,LOQ 为 0.275 mg/kg。

### 2.2　基质效应

基质效应是基质成分复杂的样品 HPLC-ESI-MS/MS 分析中较常见的现象,一般认为是由于待测组分与样品基质在 ESI 过程中雾滴表面离子化的竞争造成的,该结果可能会显著地抑制或增强目标离子的生成效率及离子强度,进而影响到检出限、定量限、线性、准确度和精密度等方法性能指标[9]。文

献报道的基质效应补偿措施主要有采用基质匹配标准曲线法、样品稀释法和应用分析物保护剂[10]，其中基质匹配标准曲线法是最常用、最简单，也是有效的方法。根据文献介绍方法[11]计算的多抗霉素 B 在空白人参样品基质中基质效应值(ME)为 56%，说明有明显的基质增强效应，因此，本研究中采用基质匹配标准曲线法对人参样品基质中的多抗霉素 B 进行定量校准。

### 2.3 方法的准确度和精密度

鲜人参空白样品中 0.2、1.0 mg/kg 和 5.0 mg/kg 添加水平的回收率和相对标准偏差(RSD)见表 2。其中 0.2 mg/kg 添加水平的平均回收率为 94.7%，5 次重复的 RSD 为 4.2%；1.0 mg/kg添加水平的平均回收率为 74.7%，5 次重复的 RSD 为 3.2%；5.0 mg/kg 添加水平的平均回收率为 78.0%，5 次重复的 RSD 为 1.3%。

**表 2 多抗霉素 B 在鲜人参中的添加回收率和相对标准偏差**

**Table 2 Spiked recovery and relative standard deviation of polyoxins B in fresh *Panax ginseng***

| 添加水平/mg·kg$^{-1}$ Spiked level | 回收率/% Recovery | | | | | 平均回收率/% Average recovery | 相对标准偏差/% RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 0.2 | 92.3 | 100.8 | 91.3 | 92.4 | 96.7 | 94.7 | 4.2 |
| 1.0 | 74.6 | 76.7 | 77.4 | 73.3 | 71.5 | 74.7 | 3.2 |
| 5.0 | 77.7 | 79.1 | 78.7 | 76.5 | 77.8 | 78.0 | 1.3 |

### 2.4 储藏稳定性

按照 1.3 中的试验设计，根据公式(1)计算样品储藏过程中多抗霉素 B 残留的降解率，当人参在冷冻条件下储存时，人参中的多抗霉素 B 残留能够保持稳定长达 5 个月，可以看出，随着样品采集间隔的增长，在鲜人参基质中的残留虽不同程度的减少，但仍然趋于稳定。

$$D = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

式中：$D$ 为降解率，单位为百分率(%)；$C_0$ 为样品的初始浓度，单位为毫克每千克(mg/kg)；$C_t$ 为样品的检测浓度，单位为毫克每千克(mg/kg)。

**表 3 1 mg/kg 多抗霉素 B 在鲜人参添加样品中的储藏稳定性[1)]**

**Table 3 Storage stability of 1 mg/kg polyoxins B in fresh *Panax ginseng***

| 时间/d Time | −18℃残存量/mg·kg$^{-1}$ Residual amount at −18℃ | | | 降解率/% Degradation rate | −20℃残存量/mg·kg$^{-1}$ Residual amount at −20℃ | | | 降解率/% Degradation rate | 质控样品 Quality control sample | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ⅰ | Ⅱ | Ⅲ | | Ⅰ | Ⅱ | Ⅲ | | 回收率/% Recovery | 相对标准偏差/% RSD |
| 0 | 0.79 | 0.60 | 0.72 | 0.24 | 0.79 | 0.60 | 0.72 | 0.24 | 70.5 | 13.2 |
| 7 | 0.75 | 0.82 | 0.78 | −4.03 | 0.71 | 0.77 | 0.79 | −0.49 | 75.3 | 7.2 |
| 14 | 0.67 | 0.80 | 0.75 | −1.93 | 0.70 | 0.78 | 0.70 | −0.09 | 72.6 | 10.0 |
| 28 | 0.87 | 0.84 | 0.91 | −8.22 | 0.86 | 0.85 | 0.88 | −6.98 | 80.7 | 4.6 |
| 60 | 0.76 | 0.72 | 0.76 | 10.79 | 0.76 | 0.71 | 0.71 | 13.18 | 83.7 | 13.4 |
| 90 | 0.91 | 0.99 | 0.89 | −16.10 | 0.89 | 0.89 | 0.90 | −11.53 | 80.1 | 11.2 |
| 120 | 0.93 | 0.89 | 0.93 | −13.03 | 0.93 | 0.89 | 0.90 | −11.80 | 81.1 | 9.8 |
| 150 | 0.86 | 1.02 | 0.94 | −13.94 | 1.02 | 1.01 | 0.90 | −18.38 | 82.7 | 10.3 |

1) 表中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ表示各次取样的 3 个重复。下同。
Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ in the same treatment indicate three repetitions of each sampling. The same below.

由表 3 可以看出，空白鲜人参中 1 mg/kg 多抗霉素 B 添加水平分别在−18℃和−20℃下储藏 0、7、14、28、60、90、120 和 150 d 后多抗霉素 B 降解率最大为 13.18%；整个储藏过程中，各时间点的样品中多抗霉素 B 降解率均小于 30%，根据植物源性农产品中农药残留储藏稳定性判断标准[12]，空白鲜人参中 1 mg/kg 多抗霉素 B 添加水平分别在−18℃和−20℃下 150 d 储藏期间内稳定。

由表 4 可以看出，空白鲜人参中 2 mg/kg 多抗霉素添加水平分别在−18℃和−20℃下储藏 0、7、14、28、60、90、120 和 150 d 后多抗霉素 B 降解率最大为 14.86%；−18℃和−20℃下，各时间点的样品中多抗霉素降解率均小于 30%，根据植物源性农产品中农药残留储藏稳定性判断标准[12]，空白鲜人参中 2 mg/kg 多抗霉素添加水平分别在−18℃和−20℃下 150 d 储藏期间内稳定。

**表 4　2 mg/kg 多抗霉素 B 在鲜人参添加样品中的储藏稳定性**

**Table 4　Storage stability of 2 mg/kg polyoxins B in fresh *Panax ginseng***

| 时间/d Time | −18℃残存量/mg·kg$^{-1}$ Residual amount at −18℃ | | | 降解率/% Degradation rate | −20℃残存量/mg·kg$^{-1}$ Residual amount at −20℃ | | | 降解率/% Degradation rate | 质控样品 Quality control sample | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ⅰ | Ⅱ | Ⅲ | | Ⅰ | Ⅱ | Ⅲ | | 回收率/% Recovery | 相对标准偏差/% RSD |
| 0 | 1.40 | 1.46 | 1.43 | 0.00 | 1.40 | 1.46 | 1.43 | 0.00 | 71.5 | 2.2 |
| 7 | 1.44 | 1.37 | 1.44 | 0.51 | 1.39 | 1.41 | 1.38 | 2.15 | 71.2 | 2.7 |
| 14 | 1.39 | 1.69 | 1.63 | 5.65 | 1.29 | 1.40 | 1.56 | 14.86 | 83.2 | 4.2 |
| 28 | 1.83 | 1.61 | 1.86 | −12.67 | 1.91 | 1.91 | 1.62 | −15.65 | 78.4 | 10.6 |
| 60 | 1.57 | 1.56 | 1.80 | −14.28 | 1.68 | 1.67 | 1.54 | −13.35 | 71.9 | 1.8 |
| 90 | 1.68 | 1.70 | 1.62 | −10.52 | 1.74 | 1.49 | 1.86 | −12.51 | 75.4 | 5.3 |
| 120 | 1.44 | 1.39 | 1.52 | 12.01 | 1.48 | 1.61 | 1.71 | 2.91 | 82.4 | 2.3 |
| 150 | 1.75 | 1.75 | 1.71 | −23.34 | 1.65 | 1.72 | 1.57 | −16.95 | 70.4 | 1.2 |

## 3　结论与讨论

农药在生物样品中的低温储藏稳定性是农药登记残留试验的基础资料,而储藏稳定性研究具有周期长的特点,在较长的试验周期内难以保证各项试验条件的稳定性以及每次试验操作的重复性,为了尽可能减小所获取数据的波动,本研究引入质控样品对每次获取的检测数据进行回收率校准,保证了数据的可用性。本文通过建立鲜人参样品中多抗霉素 B 的简易样品前处理程序和灵敏、可靠的 HPLC-MS/MS 检测方法,对添加多抗霉素 B 的鲜人参样品经低温储藏,并进行了渐进性测定,结果表明,150 d 内各次检测数据均围绕质控上下波动,且在−18℃和−20℃储藏条件下多抗霉素 B 在鲜人参样品中的降解率均低于 30%,说明两个储藏条件下生物农药多抗霉素 B 在鲜人参样品中 150 d 储藏期内稳定,该研究为多抗霉素 B 在人参上的残留登记试验提供了科学依据。

## 参考文献


[1] 朱光艳,张志勇. 美国 EPA 农药登记残留试验中样品储藏稳定性试验[J]. 农药科学与管理,2014,35(12):30－37.

[2] AFRIDI I A K,PARVEEN Z,MASUD S Z. Stability of organophosphate and pyrethroid pesticides on wheat in storage [J]. Journal of Stored Products Research,2001,37(2):199－204.

[3] MOUVET C,JEANNOT R,RIOLLAND H,et al. Stability of isoproturon,bentazone,terbuthylazine and alachlor in natural groundwater,surface water and soil water samples stored under laboratory conditions [J]. Chemosphere,1997,35(5):1083－1097.

[4] LEAHEY J P,CURL E A. The degradation of pirimiphas-methyl on stored grains [J]. Pest Management Science,1982,13(5):467－474.

[5] KOBAYASHI H,NISHIDA M,MATANO O,et al. Effect of cysteine on the stability of ethylenethiourea and ethylenebis (dithiocarbamate)in crops during storage and/or analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1992,40(1):76－80.

[6] ATHANASOPOULOS P E,PAPPAS C,KYRIAKIDIS N V,et al. Degradation of methamidophos on soultanina grapes on the vines and during refrigerated storage [J]. Food Chemistry,2005,91(2):235－240.

[7] 魏梅,孙大利,张耀海,等. 3 种高检出农药在柑桔检测样品中的稳定性研究[J]. 中国南方果树,2016,45(3):21－26.

[8] 董见南. 10 种有机磷杀虫剂和 8 种杀菌剂残留在代表性水果蔬菜中的储存稳定性[D]. 北京:中国农业大学,2014.

[9] TRUFELLI H,PALMA P,FAMNGLINI G,et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Mass Spectrometry Reviews,2011,30(3):491－509.

[10] LI Yan,CHEN Xi,FAN Chunlin,et al. Compensation for matrix effects in the gas chromatography-mass spectrometry analysis of 186 pesticides in tea matrices using analyte protectants [J]. Journal of Chromatography A,2012,1266(6):131－142.

[11] ZHU Yulong,LIU Xingang,XU Jun,et al. Simultaneous determination of spirotetramat and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick,easy,cheap,effective,rugged,and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A,2013,1299(14):71－77.

[12] 农业部农药检定所. NY/T 3094-2017[S]. 北京:中国农业出版社,2017.


(责任编辑:杨明丽)