

◆ 环境与残留 ◆

天然化合物蛇床子素在黄瓜和土壤中残留的高效液相色谱分析

陈浩, 徐庆宣, 黄晓艳, 王春梅, 石志琦*

(江苏省农业科学院 产地环境与投入品安全研究室, 南京 210014)

摘要: 建立了蛇床子素在黄瓜和土壤中的残留分析方法。样品经甲醇和丙酮提取, 石油醚液-液分配, 固相萃取小柱净化后, 进行高效液相色谱分析。仪器最小检出量 (LOD) 为 0.2 ng, 在黄瓜和土壤中的最低检出质量分数 (LOQ) 均为 0.02 mg/kg。蛇床子素在黄瓜中的平均回收率为 88.80%~93.61%, 变异系数为 1.94%~4.92%; 在土壤中的平均回收率为 90.74%~94.55%, 变异系数为 3.20%~6.45%。

关键词: 天然化合物; 蛇床子素; 残留分析; 高效液相色谱

中图分类号: TQ 450.2+63; 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2010.01.011

Determination of Natural Compound Osthol in Cucumber and Soil by HPLC

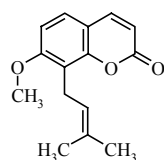
CHEN Hao, XU Qing-xuan, HUANG Xiao-yan, WANG Chun-mei, SHI Zhi-qi*

(Environment of Production Areas and Safety of Agricultural Inputs Lab, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: A method for analysis of osthol residues was developed, which used methanol and acetone to extract osthol in the cucumber and soil, followed by liquid-liquid partition with petroleum ether, and purified with SPE, utilizing HPLC to quantify the extract. The limit of detection (LOD) was 0.2 ng, while the quantification limit (LOQ) was 0.02 mg/kg. The average recoveries and coefficients of variation of the method were 88.80% - 93.61%, and 1.94% - 4.92% for cucumber samples, 90.74% - 94.55%, and 3.20% - 6.45% for soil sample, respectively.

Key words: natural compound; osthol; residue analysis; HPLC

蛇床子素 (osthol) 是从传统中草药蛇床子种籽中提取的天然化合物, 其化学名称为 7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素, 属香豆素类化合物。它除具有香豆素的核心结构苯环和吡喃酮环外, 还有重要的农药活性基团——异戊烯结构。结构式如下:



蛇床子素在药理上研究应用较多^[1], 江苏省农业科学院最先将其应用于农用杀菌剂领域, 并开发

出具有自主知识产权的植物源杀菌剂——1%蛇床子素水乳剂 (临时登记号: LS20060620)。研究表明蛇床子素对白粉病菌具有很强的抑制作用^[2], 1%蛇床子素水乳剂对黄瓜白粉病3次药后7 d防效在95%以上^[3], 对草莓白粉病药后10 d防效仍能达到80%左右^[4]。蛇床子素能够抑制真菌菌体葡萄糖、钙吸收和三磷酸腺苷酶活性^[5-6], 且本身作为香豆素类化合物可能提高植株对病虫害的抵抗力^[7]。其作用机理独特, 不易产生交互抗性, 微毒, 活性高, 对作物安全, 是一种应用前景广阔的杀菌剂。

关于蛇床子素的残留分析方法国内未见公开

收稿日期: 2009-09-14; 修回日期: 2009-10-10

基金项目: 农业科技成果转化资金项目 (2006GB2C100096)

作者简介: 陈浩 (1981—), 男, 江苏省南京市人, 实习研究员, 研究方向为植物源农药开发。Tel: 025-84390422; E-mail: chen hao@jaas.ac.cn

通讯作者: 石志琦, 研究员。Tel: 025-84391863。E-mail: shizhiqi@jaas.ac.cn

报道。本文采用高效液相色谱法,研究建立了蛇床子素在黄瓜和土壤中的残留分析方法。该法采用固相小柱进行净化,大大减少了有机溶剂的用量,且能有效去除黄瓜和土壤中杂质的干扰,简便、快捷,方法的灵敏度、准确度、精确度均符合农药残留分析的要求。

1 材料与方法

1.1 试剂

蛇床子素标准对照品(购自中国药品生物制品检定所),甲醇(色谱纯),石油醚、丙酮、正己烷(分析纯,需重蒸),氯化钠(用前650℃烘2h),双蒸水,佛罗里硅土固相萃取柱(1 000 mg, 6 mL)。

1.2 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配可变波长紫外检测器(VWD),Cosmosil C₁₈-AR-II柱(4.6 mm×250 mm, i.d, 5 μm),T25分散器,RE-2000旋转蒸发仪;其他均为常规仪器。

1.3 试验步骤

1.3.1 样品提取

黄瓜:准确称取20.0 g黄瓜试样,加入甲醇50 mL,用T25分散器匀浆2 min,过滤(漏斗中加入7 g氯化钠),滤渣用10 mL甲醇分2次洗涤后,将滤液转入分液漏斗中,加100 mL石油醚,剧烈摇动约2 min,静置10 min,量取上层石油醚相50 mL,用旋转蒸发仪浓缩至少量(约2 mL左右)。

土样:将从田间采集的表层园土磨碎,过40目筛,准确称取20.0 g土样,加入50 mL丙酮,超声处理15 min,真空抽滤(加7 g氯化钠),滤渣用10 mL丙酮分2次洗涤后,将滤液转入分液漏斗中,分3次加入100 mL(40 mL+30 mL+30 mL)石油醚,剧烈摇晃2 min,静置10 min,量取50 mL石油醚萃取液,用旋转蒸发仪浓缩至少量(约2 mL左右)。

1.3.2 净化

先用正己烷10 mL预淋固相萃取小柱,将以上浓缩液加入柱中,用10 mL洗脱液[V(丙酮):V(正己烷)=7:3]洗脱两次,将滤液合并,用氮气吹至近干,甲醇定容至5 mL,过0.22 μm滤膜,待液相色谱分析。

1.4 液相色谱测定条件^[8]

色谱柱:Cosmosil C₁₈-AR-II柱(4.6 mm×250 mm, i.d, 5 μm);流动相:V(甲醇):V(水)=70:30;流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测

波长:322 nm;进样量:20 μL;保留时间:14.5 min。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线和线性范围

采用外标法定量,以甲醇为溶剂,由500 mg/L蛇床子素标准溶液配制成0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/L,测定各个浓度对应的峰面积。结果表明,蛇床子素的浓度与峰面积有很好的相关性,满足定量分析的需要。回归方程为 $y=62.772x+0.2781$,相关系数为0.9993。

2.2 准确度和精密度

在黄瓜、土壤空白样中添加蛇床子素标样0.02、0.5、2 mg/kg,重复5次,按上述条件测定方法回收率。蛇床子素标准色谱图见图1,黄瓜、土壤中蛇床子素的添加样品色谱图见图2、图4,黄瓜、土壤空白样品的色谱图见图3、图5。研究结果表明(见表1),蛇床子素在黄瓜中平均回收率为88.80%~93.61%,变异系数为1.94%~4.92%;在土壤中平均回收率为90.74%~94.55%,变异系数为3.20%~6.45%。方法准确度和精密度均符合农药残留分析要求。

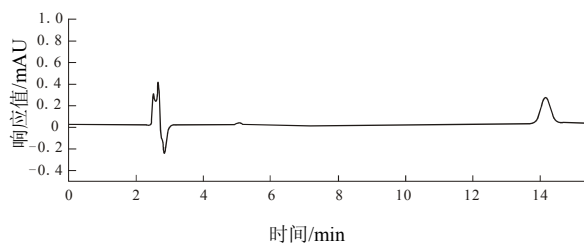


图1 蛇床子素标准图谱

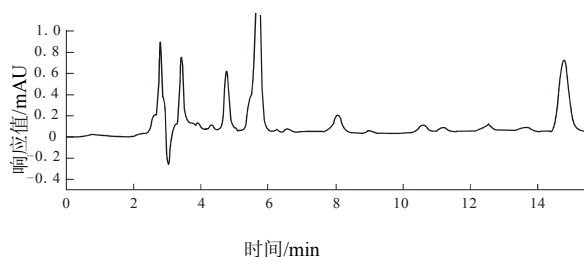


图2 黄瓜添加图谱

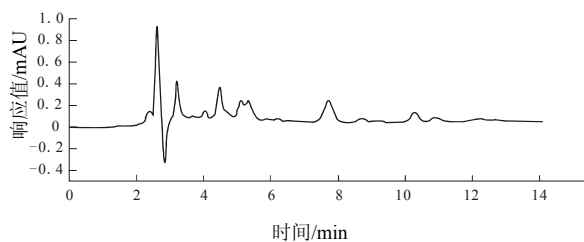


图3 黄瓜对照图谱

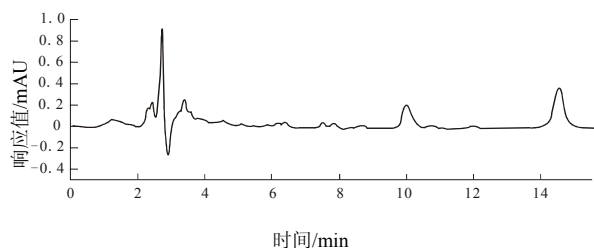


图4 土壤添加图谱

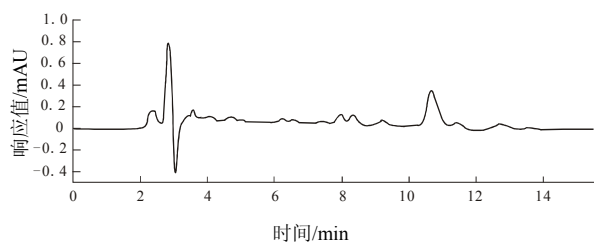


图5 土壤对照图谱

表1 黄瓜和土壤中蛇床子素的添加回收率试验结果

添加对象	添加浓度/mg·kg ⁻¹	平均回收率/%	相对标准偏差/%
黄瓜	0.02	88.80	3.54
	0.5	93.61	4.92
	2	91.55	1.94
土壤	0.02	90.74	3.20
	0.5	92.12	4.04
	2	94.55	6.45

2.3 方法的最小检出量和最低检测质量分数

仪器对蛇床子素标准品最小检出量为0.2 ng, 方法对黄瓜和土壤中蛇床子素残留最低检测质量分数均为0.02 mg/kg。

3 讨论

本研究首次建立了一种测定黄瓜和土壤中蛇床子素残留的高效液相色谱分析方法。本法采用固相

萃取小柱净化方法, 比其它萃取法净化时间短, 而且节省了试剂的使用量, 灵敏度也有很大提高。该方法对黄瓜果实和土壤中蛇床子素的最小检出量为 0.2 ng, 蛇床子素在黄瓜中的平均回收率为 88.80%~93.61%, 变异系数为 1.94%~4.92%; 在土壤中的平均回收率为 90.74%~94.55%, 变异系数为 3.20%~6.45%, 方法的灵敏度、准确度、精密度和重现性均能满足农残分析的要求。

参考文献

- [1] 马玉明. 蛇床子素的药理进展及剂型开发 [J]. 中国现代药物应用, 2008, 2 (15): 112 - 114.
- [2] 李彩霞, 周威, 纪明山, 等. 天然化合物蛇床子素对南瓜白粉病菌侵染的影响 [J]. 农药学报, 2007, 9 (1): 49 - 53.
- [3] 王春梅, 吴桂本, 王英姿, 等. 蛇床子素防治黄瓜白粉病研究 [J]. 江苏农业科学, 2005, 4: 57 - 58.
- [4] 严清平, 陆信仁, 石志琦, 等. 天然化合物蛇床子素防治草莓白粉病 [J]. 农药, 2005, 44 (3): 136 - 137.
- [5] 石志琦, 沈寿国, 徐朗莱, 等. 蛇床子素对植物病原真菌抑制机制的初步研究 [J]. 农药学报, 2004, 6 (4): 28 - 32.
- [6] 沈寿国, 石志琦, 徐朗莱, 等. 蛇床子素对小麦赤霉病菌葡萄糖、钙吸收和三磷酸腺苷酶活性的抑制 [J]. 农药学报, 2005, 7 (2): 28 - 32.
- [7] 朱述钧, 沈寿国, 石志琦. 香豆素类化合物在农业上的应用 [J]. 江西农业学报, 2006, 18 (2): 97 - 100.
- [8] Yun Wei, Tianyou Zhang, Yoichiro Ito. Preparative Isolation of Osthol and Xanthoxol from Common Cnidium Fruit (Chinese Traditional Herb) Using Stepwise Elution by High-speed Counter-current Chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1033: 373 - 377.

◆ 简讯 ◆

欧盟降低 11 种农药的最大允许残留量

出于安全性方面的考虑, 欧洲委员会降低了 11 种有效成分在某些作物上的最大允许残留量 (MRLs)。这 11 种有效成分是: 杀虫剂乐果、苯线磷、甲胺磷、灭多威、氧乐果、亚砷磷和硫双威; 杀菌剂氯苯嘧啶醇、腐霉利和乙烯菌核利; 以及植物生长调节剂乙烯利。其中, 乐果、乙烯利、苯线磷和灭多威已在欧盟重新登记; 氯苯嘧啶醇、甲胺磷和腐霉利于 2007 年延长登记 18 个月, 现已期满; 其它品种除氧乐果保留部分用途外, 均已撤消登记。

欧盟委员会表示, 对安全性顾虑加重, 是由于欧洲食品

安全局 (EFSA) 提供了有关毒理学、消费者接触以及预期农药残留等方面的最新资料。EFSA 认为, 对于一个或多个消费者群体 (例如儿童) 来说, 某些特定的农药/作物组合存在着有可能超出其可接受吸入量的风险。有关这些组合的 MRLs 被降低了。

新的 MRLs 将于修订本在欧盟官方杂志上发表 6 个月后将开始使用。此前生产、并被保存或冷冻的食品以及果汁, 仍将沿用原先的 MRLs。

(FJ)