

· 研究论文 ·

高效液相色谱法测定元参、黄芩和杭白菊中的多菌灵残留

吴加伦^{*1}, 王天玉¹, 王怀昌¹, 杨娜娜¹,
魏厚道¹, 林建², 薛健²

(1. 农业部植物病原及昆虫分子生物学重点实验室/浙江大学 农药与环境毒理研究所 杭州 310029;

2. 中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所 北京 100193)

摘要: 建立了一种测定元参、黄芩和杭白菊 3 种中药材中多菌灵残留的反相高效液相色谱分析方法(R-HPLC)。样品用丙酮提取,柱层析(弗罗里硅土-中性氧化铝=7:4,质量比)和液液分配净化,以甲醇-水(体积比 60:40)为流动相,在波长 281 nm 下对待测组份进行检测,外标法定量。结果表明,多菌灵在 3 种中药材中的添加回收率分别为元参:69.08%~88.31%,相对标准偏差(RSD)为 3.35%~4.67%;黄芩:71.39%~88.40%,RSD 为 3.73%~8.62%;杭白菊:73.33%~97.31%,RSD 为 2.83%~9.44%;均符合农药残留分析的要求。该杀菌剂在 0.05~10 mg/L 之间具有良好的线性关系 $r=0.9997$,仪器的最小检出量(按 $S/N=3$ 计)分别为 0.3、0.5 和 0.3 ng,方法的最低检测浓度分别为 0.01、0.05 和 0.01 mg/kg。该方法简单易行,净化效果较好,适合各种中药材中多菌灵残留的检测。

关键词: 多菌灵;元参;黄芩;杭白菊;农药;残留

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.04.19

中图分类号: O657.72; TQ450.2

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2010)04-0489-05

Determination of carbendazim residue in Radix Scrophulariae, Radix Scutellariae and Flos Chrysanthemi by high performance liquid chromatography

WU Jia-lun^{*1}, WANG Tian-yu¹, WANG Huai-chang¹, YANG Na-na¹,
WEI Hou-dao¹, LIN Jian¹, XUE Jian²

(1. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insect, Pesticide Environmental Toxicology Research Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: A reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method has been developed for carbendazim residue in Radix Scrophulariae, Radix Scutellariae and Flos Chrysanthemi. Carbendazim was extracted with acetone, cleaned up by column chromatography (florisil-neutral

收稿日期: 2010-04-18; 修回日期: 2010-07-15.

作者简介: * 吴加伦(1956-),男,通讯作者(Author for correspondence),浙江嘉兴人,副教授,硕士生导师,主要从事农药环境毒理和农药残留分析研究工作,电话:0571-86971221, E-mail: jlwu@zju.edu.cn

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项课题(2009ZX09502-027);浙江省社会发展项目(2008C23061)。

alumina = 7:4, m/m) and followed by liquid-liquid partition. HPLC conditions were as follows: Diamonsil C18₍₂₎ column with temperature at 30°C, methanol-water(60:40, V/V) as mobile phase with flow rate of 0.8 mL/min and the detection wave length at 281 nm. The fortified recoveries and relative standard deviation (RSD) were from 69.08% to 88.31% and 3.35% to 4.67% in Radix Scrophulariae, from 71.39% to 88.40% and 3.73% to 8.62% in Radix Scutellariae, from 73.33% to 97.31% and 2.83% to 9.44% in Flos Chrysanthemi. The standard curve of carbendazim was linear in the range of 0.05 - 10 mg/L ($r = 0.9997$), the limit of detection ($S/N = 3$) was 0.3, 0.5 and 0.3 ng, the limit of quantification was 0.01, 0.05 and 0.01 mg/kg, respectively. The analytical method is easier, faster, satisfied with the analysis of carbendazim residue in three kinds of Chinese herbal medicines and has better purification effect.

Key words: carbendazim; Radix Scrophulariae; Radix Scutellariae; Flos Chrysanthemi; residue; pesticide

多菌灵(carbendazim, MBC), 化学名称苯并咪唑-2-氨基甲酸甲酯, 是一种高效、低毒、广谱的内吸性杀菌剂, 主要用于水果、蔬菜、中药材等的病害防治, 有研究表明, 多菌灵对鱼和蜜蜂毒性较小^[1-3], 但对人、畜均有一定毒性, 可引起抽搐、精神恍惚、恶心呕吐、胸闷、头晕等中毒症状, 甚至影响哺乳动物精母细胞的减数分裂^[4-5]。中药材中的农药残留严重影响中药材的品质和食用安全, 其超标问题日益受到国内外重视, 西方国家和地区不断修订农药残留安全标准, 增加农药检测种类并降低农药残留最大限量(MRL)值。而我国现行农药残留安全标准还比较滞后, 所以尽快建立和完善我国中药材中农药残留的检测方法和安全标准迫在眉睫^[6]。

目前国内外关于多菌灵残留检测方法的报道较多, 但涉及中药材的较少^[7-9], 主要集中在粮食作物、蔬菜和水果上^[10-13], 其样品易于前处理, 但并不适用于成分复杂的中药材; 而且部分方法还采取了二氧化碳超临界流体萃取^[14]、加速溶剂萃取^[15]等技术, 也不适用于设备比较落后的基层单位和中小企业。因此, 研究针对中药材特点并能普遍应用的多菌灵残留分析方法具有很好的现实指导意义。

1 材料及方法

1.1 仪器、试剂及供试样品

FULI2200 高效液相色谱仪, 带紫外检测器(浙江温岭福立分析仪器有限公司); KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); RE-52AAA 旋转蒸发器(上海嘉鹏科技有限公司); DD01 型中药粉碎机(浙江温岭市大德中药机械有限公司)。

助滤剂 545(硅藻土载体, 国药集团化学试剂有限公司)、弗罗里硅土(粒径 148 ~ 300 μm)、中性氧化铝(粒径 74 ~ 148 μm)、活性炭均为 AR 级; 甲醇为 AR 级和 HPLC 级。甲醇(AR)、二氯甲烷、乙酸乙酯经过全玻璃蒸馏装置重蒸; 弗罗里硅土、中性氧化铝、无水硫酸钠经 600 °C 灼烧 4 h, 用前于 130 °C 烘 2 h, 其中弗罗里硅土需加入质量分数为 3% 的水脱活, 中性氧化铝加入 5% 的水脱活; 活性炭于浓盐酸中加热煮沸 1 h, 用蒸馏水洗至中性, 烘干后, 放入带盖瓷皿中, 在 600 °C 灼烧 2 h, 用前在 105 °C 烘 4 h; 其余试剂均为 AR 级。

多菌灵(carbendazim) 标准品, 纯度为 99.0%, 购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。元参(Radix Scrophulariae) 和黄芩(Radix Scutellariae) 样品, 购于浙江磐安药材市场(经检测不含有多菌灵); 杭白菊(Flos Chrysanthemi) 样品, 购于浙江宁波药材市场(经检测不含有多菌灵)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的提取 将中药材用粉碎机粉碎, 过 20 目(孔径 900 μm) 筛。称取干中药粉 5.00 g(精确至 0.01 g), 置于 250 mL 带螺纹盖样品瓶中, 加入 1 g 助滤剂摇匀后, 再加入 60 mL 丙酮, 旋紧螺纹盖, 超声提取 30 min, 用布氏漏斗抽滤, 并用 50 mL 丙酮分多次洗涤残渣, 合并滤液于平底烧瓶中, 经旋转蒸发器浓缩至 5 mL 左右, 待柱净化。

1.2.2 净化 层析柱(从下往上依次为 2 cm 无水硫酸钠、弗罗里硅土-氧化铝 = 7:4(质量比)、2 cm 无水硫酸钠, 均匀敲实, 淋洗液为乙酸乙酯-无水乙醇(体积比 6:4)。先用 30 mL 淋洗液预淋, 弃去淋出液, 加样, 用 100 mL 淋洗液淋洗, 收集淋洗液于 250 mL 圆底烧瓶中, 经旋转蒸发器浓缩至 5 mL 左

右, 转移到 250 mL 分液漏斗中, 加入 5 mL 1 mol/L 的盐酸和 40 mL 质量分数为 10% 的氯化钠水溶液, 充分混匀后, 加入二氯甲烷 (30 mL × 2), 振荡 1 min。弃去有机相, 水相用 1 mol/L 的氢氧化钠调节 pH 至 7.0 左右, 再分别用 50、40、30 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 有机相经无水硫酸钠脱水后合并, 减压浓缩至 1 mL 左右, 用氮气吹干, 以甲醇定容至 5 mL, 过有机膜, 待 HPLC 检测。

1.3 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C18₍₂₎ 不锈钢柱 (φ 4.6 mm × 250 mm 5 μm, 迪马公司); 流动相: 甲醇-水 (体积比 60:40); 流速 0.8 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C; 检测波长 281 nm; 以保留时间定性, 外标法峰面积定量。

1.4 线性相关性测定

称取多菌灵标准品 0.101 0 g (精确到 0.000 1 g), 用无水乙醇配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准溶液, 精确吸取该溶液 10 mL, 用无水乙醇定容至 100 mL, 得到 100 mg/L 的标准溶液, 进而再稀释成质量浓度分别为 10、5、3、2、1、0.5 和 0.05 mg/L 的一系列标准工作溶液。在 1.3 节的条件下, 分别进样 10 μL, 平行测定 3 次, 以标准溶液质量浓度 x (mg/L) 为横坐标, 峰面积 y (uV · s) 为纵坐标, 建立线性回归方程。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

根据多菌灵在各种溶剂中的溶解度, 选取甲醇和丙酮作为提取溶剂, 其添加回收率明显高于其他溶剂: 甲醇的回收率在 92% 左右, 丙酮在 95% 左右, 二氯甲烷在 68% 左右, 乙酸乙酯在 74% 左右。用甲醇提取时色素虽少, 但由于中药材的成分复杂, 有些脂肪含量高的中药材在提取后进行液液分配时易发生乳化, 或过柱时容易形成白色沉淀, 从而影响农药的回收率; 用丙酮提取虽然选择性较宽, 但不会造成干扰, 且可使脂肪颗粒沉淀, 从而能有效地避免在液液分配时发生乳化现象。因此, 综合农药的内吸性、溶剂的水溶性、溶剂对农药的溶解性以及中药材的特殊性等多方面考虑, 选取丙酮作为中药材中多菌灵的提取溶剂。

2.2 净化方法的选择

分别对弗罗里硅土、中性氧化铝、活性炭层析柱的净化效果进行了比较。结果表明, 活性炭对多菌灵的吸附性太强, 回收率只有 10% 左右, 其他两种

回收率都在 90% 以上。选择弗罗里硅土-中性氧化铝 = 7:4 (质量比) 作为吸附剂, 提取净化效果和回收率都取得满意结果。

2.3 淋洗溶剂的选择

淋洗液的极性对净化效果影响较大: 若极性太大, 则会有大量杂质被淋出, 不利于杂质的去除; 而极性太小则不利于农药的淋出。海云等^[16]曾采用乙酸乙酯-无水乙醇 (5:1, 体积比) 作为辣椒中甲基硫菌灵净化过程的淋洗溶剂, 取得了较好的结果。考虑到多菌灵与甲基硫菌灵有相似的理化性质, 其极性强弱也位于乙酸乙酯和无水乙醇之间, 故测定了不同体积比的乙酸乙酯-无水乙醇对多菌灵的净化效果, 结果 (见表 1) 表明, 当其体积比为 6:4, 淋洗体积为 40 mL 时, 对多菌灵的洗脱能力最强, 分离效果较好。

表 1 乙酸乙酯与无水乙醇不同体积比的回收率

Table 1 Recovery of different proportion of ethyl acetate and anhydrous ethanol

乙酸乙酯-无水乙醇 (体积比) Ethyl acetate-anhydrous ethanol (V:V)	多菌灵回收率 Carbendazim recovery / %
1:0	5.4
5:1	10.5
7:3	49.8
6:4	55.1
5:5	54.6
3:7	25.6
0:1	13.5

2.4 线性范围

经过回归分析, 多菌灵在质量浓度为 0.05 ~ 10 mg/L 之间时具有良好的线性关系, 线性回归方程为 $y = 103.883x - 4700.9$, $r = 0.9997$ 。

2.5 流动相的选择

结果表明, 当流动相为甲醇-水 (体积比 60:40)、进样浓度为 0.25 mg/L、检测波长为 281 nm 时峰形较好, 多菌灵在此条件下的保留时间为 6.089 min。

2.6 方法的准确度和精密度

选取不含多菌灵的 3 种供试中药材进行添加回收率测定。称取粉碎的样品各 5.00 g (精确到 0.01 g), 添加一定量的农药, 按 1.2 节的方法进行样品的提取、净化和检测。结果表明: 元参的回收率在 81.93% ~ 84.85% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 为 3.35% ~ 3.66%; 黄芩的回收率在 82.48% ~ 88.70% 之间, RSD 为 3.73% ~ 4.40%; 杭白菊的回收率在 79.29% ~ 83.38% 之间, RSD 为 2.07% ~

4.43% (见表2)。以3倍基线噪音来确定仪器的最小检出量(LOD),则黄芩为0.5 ng,元参和杭白菊均为0.3 ng;方法的最低检测浓度(LOQ)以最低的

添加水平表示,则黄芩为0.05 mg/kg,元参和杭白菊均为0.01 mg/kg。相应色谱图见图1~6。

表2 多菌灵在元参、黄芩和杭白菊中的添加回收率

Table 2 Recovery of carbendazim in Radix Scrophulariae, Radix Scutellariae and Flos Chrysanthemi

样品 Sample	添加水平 Spiked level/(mg/kg)	回收率 Recovery/%			平均回收率 Average recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
		1	2	3		
元参 Radix Scrophulariae	0.5	88.31	83.55	82.11	83.28	3.35
		83.21	82.59	79.88		
	0.1	82.76	85.09	79.33	81.93	3.66
		77.23	83.65	83.51		
0.01	69.08	72.88	74.19	71.32	4.67	
	73.01	65.55	73.21			
黄芩 Radix Scutellariae	0.5	87.93	85.19	79.88	84.77	3.73
		88.40	83.45	83.78		
	0.1	83.55	81.66	83.29	82.48	3.73
		77.58	88.03	80.77		
0.05	71.39	73.77	71.94	76.60	8.62	
	81.00	88.07	73.43			
杭白菊 Flos Chrysanthemi	0.5	80.99	83.46	86.73	83.38	2.83
		82.67	80.92	85.49		
	0.1	80.53	75.19	83.77	79.29	4.43
		76.59	82.61	77.06		
0.01	83.41	79.58	83.99	83.89	9.44	
	85.69	73.33	97.31			

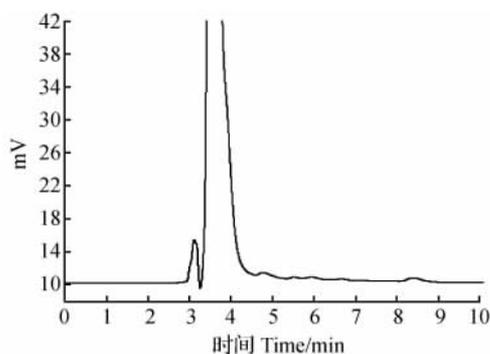


图1 空白元参样品色谱图

Fig. 1 The chromatogram of Radix Scrophulariae blank sample

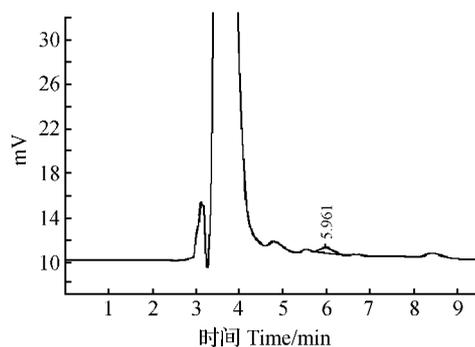


图2 添加0.01 mg/kg多菌灵的元参样品色谱图

Fig. 2 The chromatogram of Radix Scrophulariae sample fortified with 0.01 mg/kg carbendazim

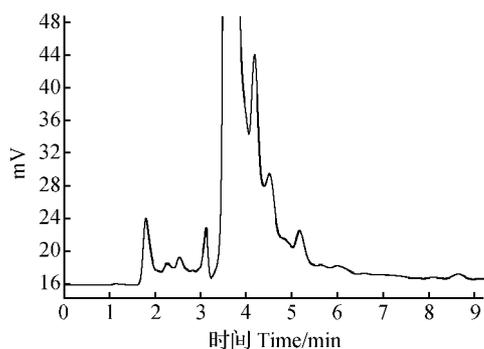


图3 空白黄芩样品色谱图

Fig. 3 The chromatogram of Radix Scutellariae blank sample

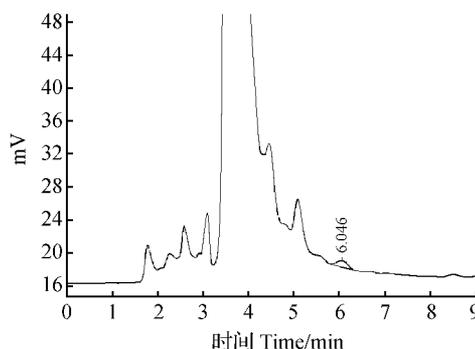


图4 添加0.05 mg/kg多菌灵的黄芩样品色谱图

Fig. 4 The chromatogram of Radix Scutellariae sample fortified with 0.05 mg/kg carbendazim

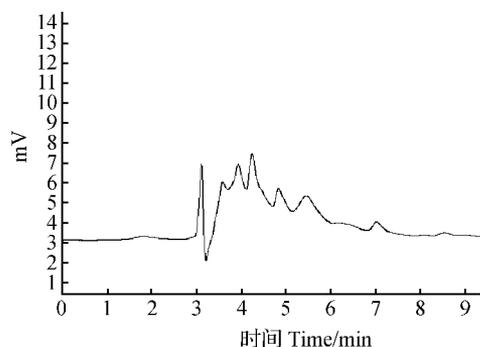


图5 空白杭白菊样品色谱图

Fig. 5 The chromatogram of Flos Chrysanthemi blank sample

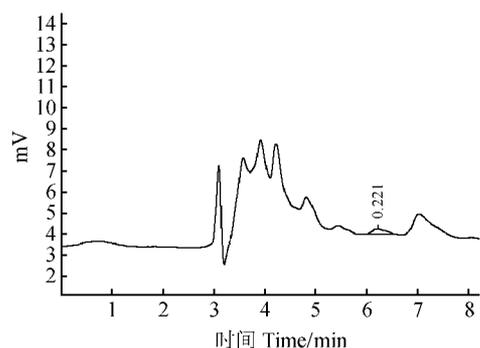


图6 添加 0.01 mg/kg 多菌灵的杭白菊样品色谱图

Fig. 6 The chromatogram of Flos Chrysanthemi sample fortified with 0.01 mg/kg carbendazim

2.7 重复性实验

分别在3种中药材的同一批样品中各取6份,按照1.2节的方法和1.3节的色谱条件进行样品的制备和测定。结果显示,元参、黄芩和杭白菊的RSD分别为1.36%、2.86%和1.97%。

3 结论

多菌灵属于苯并咪唑类杀菌剂,其化学性质较为独特,易溶于无机酸及醋酸,并可形成相应的盐,当pH在7~8之间时又可转化为多菌灵。其残留分析方法大多采用酸性溶液提取,调节pH值后进行液液分配处理。但由于中药材成分复杂,在多菌灵的提取净化过程中经常会发生乳化,而使其无法测定。本研究先通过柱层析(弗罗里硅土-中性氧化铝=7:4,质量比),再通过液-液分配对提取的样品进行净化处理,有效地避免了乳化现象的发生,取得了较高的回收率,能满足多种中药材中多菌灵的残留测定。

谨以此文敬贺李正名院士八十华诞!

参考文献:

- [1] FAN Dan(樊丹), GAN Xiao-ze(甘小泽), LU Yao-ying(卢耀英). 多菌灵在茶叶中的残留动态研究[J]. *J Agro-Environ Sci* (农业环境科学学报) 2005 24: 298-300.
- [2] LIU Qian-kai(刘乾开), ZHU Guo-nian(朱国念). Pesticide Manual(新编农药使用手册) [M]. 2nd Ed. (2版). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 1999: 309.
- [3] ZHAO Gui-zhi(赵桂芝). The Use of One Hundred New Pesticides(百种新农药使用方法) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社) 2002: 73-75.
- [4] AKBARSHA M A, KADALMANI B, GIRIJA R, et al. Spermatotoxic effect of carbendazim [J]. *Indian J Exper Biology*, 2001 39: 921-924.
- [5] NAKAI M, HESSR A. Effects of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate; MBC) on Meiotic Spermatocytes and subsequent spermatogenesis in the rat testis [J]. *Anatomical Record*, 1997 247: 379-387.
- [6] GU Ye-ting(顾叶挺), LI Duo(李铎). 透过农药残留量标准看我国食品安全体系[J]. *Food Safety*(食品安全) 2009(5): 64-66.
- [7] XUE Jian(薛健), GE Xing(葛兴), CHEN Jian-min(陈建民), et al. 高效液相色谱法测定金银花中保卫田残留量[J]. *Anal Lab*(分析实验室), 1996 15(3): 82-83.
- [8] CHEN Jian-min(陈建民). HPLC法测定多菌灵在西洋参中的残留量[J]. *Environ Chem*(环境化学), 1995 14(6): 541-545.
- [9] WU Yong-jiang(吴永江), ZHU Wei(朱炜), CHENG Yi-yu(程翼宇). 液-质联用法测定铁皮石斛和西洋参及制剂中多菌灵残留[J]. *Analy Chem*(分析化学) 2006 34(2): 235-238.
- [10] HAO Jin-zhi(郝金芝). 高效液相色谱法测定水果中的多菌灵[J]. *Chinese J Sanitary Inspection*(中国卫生检验杂志) 2004, 14(5): 586-587.
- [11] XU Xiang-yang(徐向阳), LUO Ai-lan(骆爱兰), LIU Xian-jin(刘贤进). 小麦中多菌灵残留量的HPLC分析方法研究[J]. *Modern Agrochem*(现代农药) 2004 3(1): 17-19.
- [12] GUI Wen-jun(桂文君), HUANG Ya-li(黄雅丽), WU Hui-ming(吴慧明) et al. 多菌灵在柑桔及土壤中的HPLC残留分析方法[J]. *Modern Agrochem*(现代农药) 2004 3(3): 25-27.
- [13] ZHANG Hao(张浩), ZHANG Xiang-hui(张祥辉), LU Zhong-bin(逯忠斌) et al. 高效液相色谱法同时测定食用菌中的多菌灵和噻菌灵残留量[J]. *Pesticides*(农药) 2008 47(7): 517-518.
- [14] ANASTASSIADES M, SCHWACK W. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction [J]. *J Chromatog A*, 1998 825(1): 45-54.
- [15] WU Gang(吴刚), WU Jian-jian(吴俭), ZHAO Shan-hong(赵珊红) et al. 加速溶剂萃取-固相萃取结合液相色谱分析茶叶中多菌灵残留量[J]. *J Chinese Institute Food Sci Tech*(中国食品学报) 2008 8(4): 165-168.
- [16] HAI Yun(海云), KONG Xiang-hong(孔祥虹), LI Jian-hua(李建华) et al. 固相萃取-高效液相色谱法测定辣椒中甲基硫菌灵的残留量[J]. *Chromatography*(色谱) 2005 23(3): 319.

(责任编辑: 金淑惠)