

## 气相色谱法测定三七中苯醚甲环唑残留量

张雪燕<sup>1</sup>, 吴文锐<sup>1</sup>, 毛佳<sup>1</sup>, 代雪芳<sup>1</sup>, 尹可锁<sup>1</sup>, 陈昱君<sup>2</sup>, 杨建忠<sup>2</sup>

(1.云南省农业科学院 农业环境资源研究所, 云南 昆明 650205; 2.云南省文山三七研究所, 云南 文山 663000)

**摘要:** 建立了三七中苯醚甲环唑残留量的分析方法, 并应用于三七样品检测。样品采用丙酮超声波提取, 硅胶和中性氧化铝柱净化, GC-ECD 检测。方法的最小检出量(LOD)为 0.004 ng, 最低检测限(LOQ)为 0.02 mg/kg; 样本中添加苯醚甲环唑 0.02~0.5 mg/kg 时( $n=5$ ), 平均回收率为 80.6%~95.0%, 相对标准偏差(RSD)为 1.6%~11.9%, 方法的灵敏度、精密度和准确度均满足农药残留分析要求。市场随机抽样检测表明, 三七中苯醚甲环唑残留量为 0.02~0.6 mg/kg, 检出率 47%, 检出率和残留水平从高到低均依次为三七花、三七须根、三七块根。

**关键词:** 三七; 苯醚甲环唑; 残留; 气相色谱法

中图分类号: O657.7<sup>+1</sup> 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)02-0229-04

### Determination of difenoconazole residue in *Panax notoginseng* by gas chromatography

ZHANG Xue-yan<sup>1</sup>, WU Wen-rui<sup>1</sup>, MAO Jia<sup>1</sup>, DAI Xue-fang<sup>1</sup>, YIN Ke-suo<sup>1</sup>, CHEN Yi-jun<sup>2</sup>, YANG Jian-zhong<sup>2</sup>

(1.Institute of Agro-Environmental Resources, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650205, China; 2. Wenshan Prefecture Sanqi Research Institute, Wenshan, Yunnan 663000, China)

**Abstract:** A residue analytical method was developed for the determination of difenoconazole in *Panax notoginseng*. Difenoconazole residues were extracted by ultrasonic from *Panax notoginseng* with acetone, purified by a column of aluminum and a column of silica gel in turn, then detected by GC-ECD. Its limit of detection was 0.004 ng, its minimum detectable concentration of difenoconazole in the samples was 0.02 mg/kg. Its average recovery of ranged from 80.6% to 95.0% and its relative standard deviation ranged from 1.6% to 11.9% when the samples are spiked difenoconazole at 0.02~0.5 mg/kg( $n=5$ ) level. These results showed that in sensitivity, precision and accuracy, the method met the demand of pesticide residue analysis. Market random tests showed that difenoconazole residues in *Panax notoginseng* between 0.02 to 0.6 mg / kg, the detection rate was 47%, the detection rate and residue levels from high to low were *Panax notoginseng* flowers, *Panax notoginseng* fibril roots, *Panax notoginseng* in turn.

**Key words:** *Panax notoginseng*; difenoconazole; residue; gas chromatography

苯醚甲环唑(difenoconazole), 是瑞士先正达作物有限公司开发的一种三唑类治疗型杀菌剂, 具有内吸性强, 杀菌谱广, 持效期长等特点, 主要通过抑制麦角甾醇的生物合成而干扰病菌的正常生长, 对多种蔬菜和果树的叶斑病、白粉病、锈病及黑星病等具有良好防治效果<sup>[1-2]</sup>。近年来因其对三七黑斑病、圆斑病等有较好的防治效果而被广泛用于三七病害的防治<sup>[3]</sup>。

随着对农产品质量安全的重视, 欧盟、美国、日韩等发达国家对进口中药材及保健品提出了非常严格的农药残留限量指标, 其中欧盟标准涉及的农药品种最多, 《欧洲药典》第 5 版(2004 年)规定了 34 种农药残留限量指标, 韩国食药厅于 2005 年再次修订已经极为严格的中药进口标准, 其中增加苯醚甲环唑在甘草中的残留限量标准为 0.05 mg/kg<sup>[4]</sup>。到目前为止, 国内外尚未专门针对三七制定农药残留

收稿日期: 2009-11-17

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目子课题(2006BAI09B04-03)

作者简介: 张雪燕(1959-), 女, 云南昆明人, 副研究员, 主要从事农药残留研究, zhangxueyanpp@yahoo.com.cn

限量标准。虽然尚未涉及三七,但足以表明国外对中药材产品质量安全的重视以及将来中国三七产品出口所面临的严峻挑战。因此,建立三七中苯醚甲环唑残留量检测方法具有重要的意义。目前,苯醚甲环唑残留检测方法大多集中在水果、蔬菜等农产品<sup>[5-9]</sup>方面,国外也仅在对多残留检测方法研究时有所涉及<sup>[10-11]</sup>,这些检测方法普遍存在诸如需要液相色谱-串联质谱和气相色谱-串联质谱等昂贵的特殊仪器。在中药材方面的研究,仅见刘海涛等<sup>[12]</sup>报道龙胆中苯醚甲环唑气相色谱法检测,而在三七中的残留检测方法还未见报道。三七本底基质较复杂,使得农药的提取、分离、净化难度大,试验表明,苯醚甲环唑在龙胆中的残留检测方法不适合用于三七样品的检测。笔者采用丙酮超声波提取,硅胶和中性氧化铝柱净化,GC-ECD检测,首次建立了三七中苯醚甲环唑残留量气相色谱检测方法。该方法利用不同淋洗剂系统,将硅胶柱净化和中性氧化铝柱净化联合使用,解决了药物成分极为复杂的样品净化问题,方法的灵敏度、准确度和精确度都能很好满足农药残留分析要求。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

三七块根、三七须根、三七花,购自中药材市场和超市。购回后风干,粉碎,过0.45 mm孔径筛,备用。

苯醚甲环唑标准品,纯度99.3%,瑞士先正达公司生产;乙腈、丙酮、石油醚、乙酸乙酯、甲苯、氯化钠、无水硫酸钠均为分析纯,有机溶剂全玻璃重蒸处理;中性氧化铝(粒度0.09~0.18 mm),130℃烘烤5 h,干燥器中保存,使用时加6%水失活;层析用硅胶(粒度0.18~0.225 mm),130℃烘烤5 h,干燥器中保存,使用时加1.5%水失活;Celite 545,Fluka公司生产。

Trace GC带电子捕获检测器(美国热电公司),超声波清洗器(CQ500J,上海超声波仪器厂),高速分散均质机(T25型,德国IKA),氮吹仪(DC-12型,上海安普科贸有限公司),回旋振荡器(Y-5型,上海国华公司),旋转蒸发器(R-200,瑞士BUCHI公

司),离心机(LXJ-II B型,上海安亭科学仪器厂)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 标准溶液配制

准确称取苯醚甲环唑标准品0.010 0 g,用丙酮溶解,定容至10 mL,制成1 000 µg/mL标准储备液。使用时再用石油醚-丙酮(体积比9:1)稀释配制成质量浓度为0.004、0.01、0.02、0.04、0.1、0.2 µg/mL的系列标准液。

#### 1.2.2 气相色谱条件

色谱柱DB-1(15 m×0.53 mm×0.5 µm);进样口温度250℃;检测器温度300℃;载气为高纯氮(纯度99.999%);柱流速12 mL/min(恒流);不分流进样,进样量1 µL;柱温150℃,保持1 min,以40℃/min升至270℃,保持6 min。以能使仪器产生3倍噪音信号所需待测物的质量为最小检出衡量指标;用添加方法能检测出待测物在样品中的最低含量为本方法的最低检测限(mg/kg)。采用外标(峰面积)-标准曲线法定量。

#### 1.2.3 样品提取

称取2.0 g样品置于100 mL具塞三角瓶中,加10 mL蒸馏水,浸泡1 h,然后加入30 mL丙酮,超声波提取30 min,加1 g Celite 545抽滤,用30 mL丙酮清洗滤渣和三角瓶,合并滤液,浓缩,待液-液分配净化。

#### 1.2.4 样品净化

(1) 液-液分配净化。将1.2.3步骤样品用50 mL 20%氯化钠溶液转移至250 mL分液漏斗中,用石油醚-乙酸乙酯(体积比5:1)混合溶剂50、40、30 mL分别萃取3次,收集有机相,过无水硫酸钠漏斗后浓缩至1 mL,氮气吹干后用2~3 mL甲苯-丙酮(体积比9:1)混合溶剂溶解残留物,待硅胶和中性氧化铝柱层析净化。

(2) 硅胶柱层析净化。玻璃层析柱(1 cm×20 cm)内依次填入2 cm厚无水硫酸钠、3 g失活硅胶、2 cm厚无水硫酸钠。用10 mL甲苯-丙酮(体积比9:1)混合溶剂预淋柱子,将液-液分配净化后的残留物转入柱中,用甲苯-丙酮(体积比9:1)混合溶剂6 mL清洗浓缩瓶3次,每次2 mL,依次转入柱中,接着用70 mL此混合溶剂淋洗,弃去前20 mL,收集后

50 mL 洗脱液于 150 mL 浓缩瓶中, 浓缩至近干, 氮气吹干, 用 2~3 mL 石油醚-丙酮(体积比 9:1) 混合溶剂溶解残留物, 待中性氧化铝柱净化。

(3) 中性氧化铝柱层析净化. 玻璃层析柱(1 cm×20 cm)内依次填入 2 cm 厚无水硫酸钠、5 g 失活中性氧化铝、2 cm 厚无水硫酸钠. 用 10 mL 石油醚-丙酮(体积比 9:1)混合溶剂预淋, 将硅胶柱层析净化残留物转入柱中, 用石油醚-丙酮(体积比 9:1)混合溶剂 6 mL 清洗浓缩瓶 3 次, 每次 2 mL, 依次倒入柱中, 接着用 60 mL 此混合溶剂淋洗, 弃去前 10 mL, 收集后 50 mL 洗脱液于 150 mL 浓缩瓶中, 浓缩后用此混合溶剂定容至 5 mL, 待气相色谱测定。

### 1.2.5 准确度及精密度试验

在未施药的对照三七块根、三七花、三七须根样品中均分别添加 0.02、0.05 和 0.5 mg/kg 的苯醚甲环唑标准液, 每浓度设 5 个重复, 静置 1 h, 使

添加的农药被充分吸收, 然后按照上述方法进行样品前处理, 1.2.2 的色谱条件测定, 计算回收率和相对标准偏差。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的选择

苯醚甲环唑的分子结构中含有不对称碳原子, 存在顺反异构体, 其比例为 45:55, 这种结构使得其在 HP-5(30 m×0.32 mm×0.25 μm)长柱上分离为 2 个峰, 且保留时间长达 20 min 以上<sup>[5-6]</sup>. 笔者选用 DB-1(15 m×0.53 mm×0.5 μm)大口径短柱, 将苯醚甲环唑保留时间缩短约为 4 min, 大大节约了分析时间, 虽然将顺反 2 个峰合并为 1 个峰, 但峰型较为对称(图 1). 苯醚甲环唑最小检出量(LOD)为 0.004 ng; 用添加的方法测得苯醚甲环唑在三七块根、三七花和三七须根中最低检测限(LOQ)均为 0.02 mg/kg。

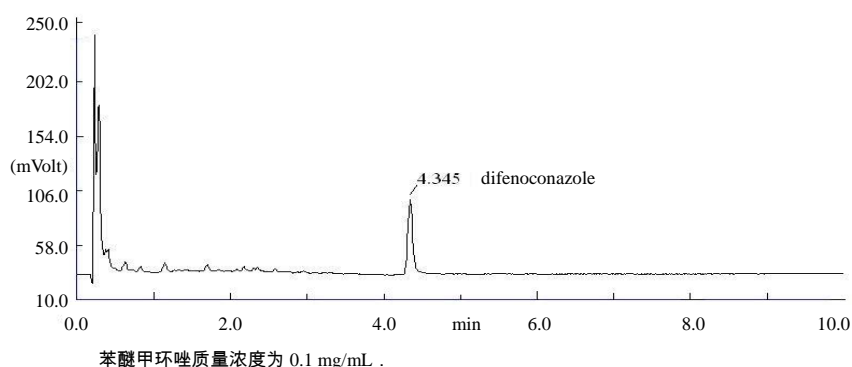


图 1 苯醚甲环唑标样色谱图

Fig.1 Chromatogram of difenoconazole standard solution

### 2.2 苯醚甲环唑含量与峰面积的线性关系

苯醚甲环唑GC标准工作曲线方程为:

$y = 39\ 699\ 352x - 150\ 006$ ,  $r = 0.999\ 4$ , 线性范围 0.004~0.200 ng。

### 2.3 净化条件的优化

三七属五加科人参属植物, 药物成分极为复杂, 其中许多成分的理化性质跟农药相似, 使得残留农药的提取、分离与净化难度增大, 因此, 笔者分别用中性氧化铝和硅胶作吸附剂, 石油醚-丙酮、甲苯-丙酮作淋洗剂进行样品净化和回收率试验. 结果表明, 只要淋洗剂配比和淋洗体积选择恰当, 2 种柱子回收率均能达到 95% 以上, 但净化效果不理想. 如果 2 根柱子联合使用, 其杂质的分离和净化

效果大大改善. 先用硅胶柱净化, 通过调节甲苯-丙酮混合淋洗剂极性, 使得共提取物中分子量较大的色素等干扰物留在柱中不被洗脱, 从而与目标农药分离, 再经过中性氧化铝柱, 用石油醚-丙酮(体积比 9:1)淋洗, 取得了较为理想的净化效果(图 2)。

### 2.4 加样回收率及样品的测定结果

加样回收率试验结果表明, 苯醚甲环唑在三七块根、须根、花中的平均回收率分别为 82.1%~84.3%、80.6%~88.7%、81.1%~88.3%, 相对标准偏差分别为 1.6%~9.0%、2.8%~10.2%、6.1%~10.3%. 分别对 15 个三七块根、须根、花样品中苯醚甲环唑含量进行 GC 法测定, 结果表明, 有 7 个样品检出苯醚甲环唑, 检出范围 0.02~0.60 mg/kg, 检出率 47%. 从

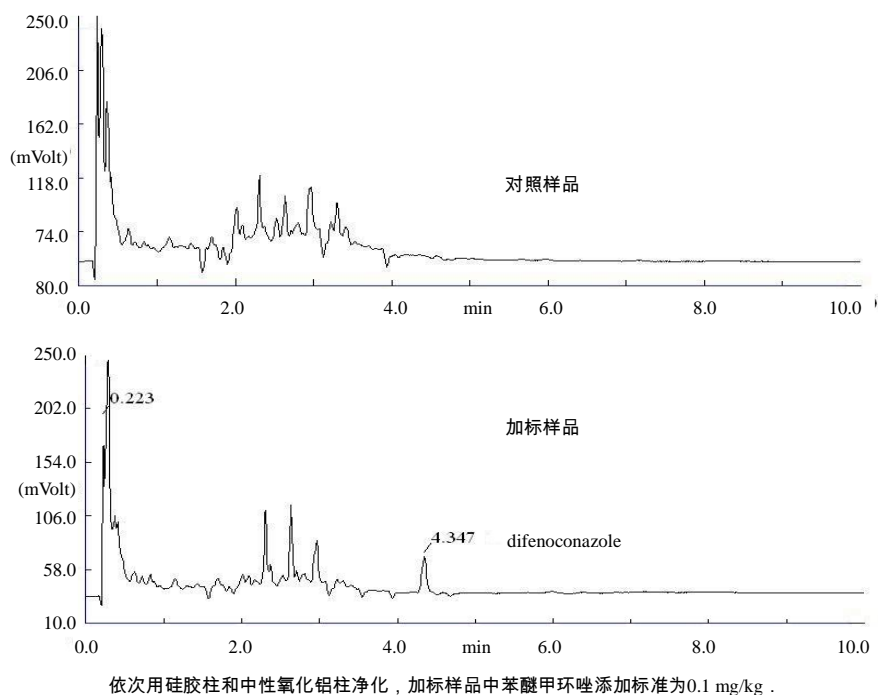


图2 三七块根对照和加标样品苯醚甲环唑色谱图

Fig.2 Chromatogram of blank *Panax notogineseng* root sample and *Panax notogineseng* root sample with difenoconazole

三七不同部位来看,无论是检出率还是残留水平从高到低均依次为三七花、三七须根、三七块根。

### 3 结 语

三七样品用丙酮超声波提取,将传统的液-液分配萃取,硅胶柱和中性氧化铝柱净化结合使用,解决了药物成分极为复杂的三七样品的净化问题,用气相色谱大口径毛细管短柱分离,节约了分析时间,气相色谱ECD检测,方法的灵敏度高,重现性和回收率均满足农药残留分析的要求。市场抽样检测结果表明,中药材三七中农药残留污染不容忽视,应加强对三七中农药残留的研究与监控管理工作。

### 参考文献:

- [1] 曾明华,赵临远,刘旭红,等. 新颖三唑类杀菌剂的合成、应用及结构、毒理述评[J]. 化工时刊, 2000(12): 1-6.
- [2] 王险峰. 进口农药应用手册[K]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 269-271.
- [3] 陈昱君,王勇,刘芸芝,等. 三七黑斑病发生规律调查研究[J]. 中国中药志, 2005, 30(7): 557-558.
- [4] 张玉婷,郭永泽,刘磊,等. 中草药中农药残留量标准国内外对比分析[J]. 世界标准信息, 2008(4): 22-24.
- [5] 王连珠,王登飞,郑俊超,等. 气相色谱质谱法测定荷兰豆中氟硅唑、丙环唑、苯醚甲环唑残留量[J]. 理化检验: 化学分册, 2006, 41(12): 1025-1028.
- [6] 卢声宇,徐敦明,余孔捷,等. 气相色谱/气质联用分析5种农产品中的苯醚甲环唑和丙炔氟草胺残留[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(5): 1827-1831.
- [7] 沈伟健,杨雯莹,沈崇钰,等. 气相色谱-负化学离子源质谱法测定食品中苯醚甲环唑残留量[J]. 色谱, 2007, 25(3): 418-421.
- [8] Wang Zhi-hua, Yang Tong, Qin Dong-mei, et al. Determination and dynamics of difenoconazole residues in Chinese cabbage and soil[J]. Chinese Chemical Letters, 2008, 19(8): 969-972.
- [9] 贺德春,杨仁斌,龚道新,等. 气相色谱法测定面粉和大米中14种农药残留量[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 30(2): 161-164.
- [10] Ellen Thom, Johannes C, Gero Benckiser, et al. Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment[J]. Environmental Pollution, 1997, 96(3): 409-414.
- [11] Kubik M, Nowacki J, Pidek A, et al. Residues of cap tan (contact) and difenoconazole (systemic) fungicides in bee products from an apple orchard[J]. Apidologie, 2000, 31(4): 53.
- [12] 刘海涛,刘洪科,薛健,等. 龙胆规范化种植中农药世高安全使用标准的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2096-2098.

责任编辑: 姜敏  
英文编辑: 罗文翠