

吡虫啉和多杀菌素在丹参中的残留及消解动态分析

王亮¹, 李敏², 郭威^{1,3}, 管仁伟¹, 周倩^{1,3}, 于宗渊^{1*}

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 济南市食品药品检验检测中心, 济南 250102;
3. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:建立丹参中吡虫啉和多杀菌素的检测方法,并对残留动态情况进行对比研究。方法:样品用有机溶剂提取,利用固相萃取小柱净化,HPLC-DAD进行检测。结果:2种农药残留的前处理均采用固相萃取法,净化较为彻底,检测方法灵敏度高,重复性好,准确度、精密度和检出限均符合农残测定要求。消解动态数据的拟合结果表明,以2 h残留量为初始残留量,吡虫啉和多杀菌素半衰期($t_{1/2}$)分别为3.65 d和1.64 d,表明施药初期多杀菌素消解速度比吡虫啉快;1 d后吡虫啉和多杀菌素在丹参中的消解曲线符合一级动力学方程, $t_{1/2}$ 分别为6.93 d和11.55 d,表明多杀菌素的持效期更长;在相同剂量标准下,多杀菌素的残留量均低于吡虫啉,因此多杀菌素的安全间隔期比吡虫啉更短。吡虫啉在土壤和产品中的最终残留分别为0.02,0.18 mg·kg⁻¹,多杀菌素均未检出(<1.9 μg·kg⁻¹),表明多杀菌素的最终残留更低。结论:在丹参种植中,多杀菌素可作为一种替代吡虫啉的理想农药。

[关键词] 丹参; 吡虫啉; 多杀菌素; 半衰期; 农药残留

[中图分类号] R284.1;F767.2;S481+8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0028-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030028

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151215.0911.006.html>

[网络出版时间] 2015-12-15 9:11

Final Residues and Degradation Dynamics Analysis of Imidacloprid and Spinosad in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

WANG Liang¹, LI Min², GUO Wei^{1,3}, GUAN Ren-wei¹, ZHOU Qian^{1,3}, YU Zong-yuan^{1*}

(1. *Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;*

2. *Ji'nan Center for Food and Drug Control, Ji'nan 250102, China;*

3. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)*

[Abstract] **Objective:** To establish methods for determining residual of imidacloprid and spinosad in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, and investigate dynamic residual of these two pesticides. **Method:** Samples were extracted with organic solvents, purified by solid phase extraction cartridges and detected by HPLC-DAD. **Result:** These two pesticides were pretreated by solid phase extraction (SPE) method, and purified more thoroughly. Detection methods had high sensitivity, good reproducibility, accuracy, precision and detection limits were in line with requirements of determination of pesticide residues. Degradation dynamics data showed that considering residues of 2 h as initial residues, half-life periods ($t_{1/2}$) of imidacloprid and spinosad were 3.65 d and 1.64 d. It showed that spinosad degraded faster than imidacloprid in the beginning. After one day, degradation curves of imidacloprid and spinosad in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* consisted with first-order kinetic equations, $t_{1/2}$ of them were 6.93 d and 11.55 d. It showed that spinosad had a longer duration of pesticide. At

[收稿日期] 20150605(005)

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2011-174)

[第一作者] 王亮, 硕士, 助理研究员, 从事中药分析与质量控制研究, Tel:0531-82949856, E-mail:wliang81@gmail.com

[通讯作者] * 于宗渊, 博士, 研究员, 从事中药现代化及中药质量控制研究, Tel:0531-82949805, E-mail:yuzys@sohu.com

the same dosage level of pesticide, residue of spinosad was lower than imidacloprid, it showed that safe periods of spinosad was shorter than imidacloprid. The final residues of imidacloprid in soil and product were $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and spinosad was not detected ($< 1.9 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) which showed that the final residue of spinosad was lower. **Conclusion:** It is concluded that in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* planting, spinosad can be an ideal alternative pesticide to imidacloprid.

[**Key words**] *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; imidacloprid; spinosad; half-life; pesticide residues

在丹参种植中,常出现鳞翅目和鞘翅目害虫^[1-2],吡虫啉因具有广谱、高效、低毒、低残留及价廉等特点而成为中药种植中使用频率很高的农药^[3]。但是由于缺乏用药指导,多存在农药滥用的问题,从而导致抗药性和农药残留超标,近年在一些国家和地区已经发现害虫对吡虫啉产生了抗药性^[4],且因为对蜜蜂等传粉昆虫可能存在风险,欧盟委员会已于 2013 年对吡虫啉等 3 种烟碱类农药采取了限制使用措施^[5],因此迫切需要新型农药替代。

多杀菌素是一类具有高杀虫活性的大环内酯类化合物,以多杀菌素 A、D 为主要成分,可通过光和微生物等途径降解,多杀菌素能有效控制鳞翅目、鞘翅目、双翅目等害虫,是选择性最高的杀虫剂之一,作用机制亦不同于吡虫啉,兼有生物农药的安全性和化学农药的速效性,目前多杀菌素在中药种植中的研究还不多见^[6-9]。本实验拟比较吡虫啉和多杀菌素在丹参中的消解动态和最终残留量,为多杀菌素在药材种植中的推广应用提供参考。

1 材料

1200 系列高效液相色谱系统(美国安捷伦公司), AE 240 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), Rotavapor R-3 型旋转蒸发器(瑞士步琪公司), TTL-DC 型多功能氮吹仪(北京同泰科技发展有限公司), Simplicity 型纯水仪(美国密理博公司)。

SEP-PAK 固相萃取柱(美国沃特世公司,产品编号 51900), Bond Elut FL 固相萃取柱(美国安捷伦公司,产品编号 12102050), 多杀菌素、吡虫啉对照品(美国 Accustandard 公司,批号分别为 17452, 22203), $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多杀菌素悬浮剂(美国陶氏益农公司), 25% 吡虫啉可湿性粉剂(山东潍坊双星农药有限公司), 液相色谱用乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。丹参种植于山东省中医药研究院苗圃,经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza*。

2 方法与结果

2.1 取样及样品前处理 喷洒农药前,取土壤和丹参茎叶空白样品,吡虫啉和多杀菌素均按 2 倍最高推荐剂量,分别选用 $32 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和 $200 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 剂量喷洒,并于喷洒后 2 h, 1, 4, 7, 10, 13, 20, 27 d 取丹参茎叶,分别用匀浆机匀浆后备用。采收时取土壤和丹参的根,土壤风干后过 3 号筛,丹参按 2010 年版《中国药典》中方法炮制加工成丹参饮片,干燥后粉碎过 3 号筛,以上样品采集后如不能及时分析测定需在 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.2 吡虫啉的含量测定

2.2.1 色谱条件 SciencHome Kromasil C₁₈ 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 25% A; 15 ~ 20 min, 25% ~ 5% A), 柱温 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 258 nm, 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。理论塔板数按吡虫啉计 $> 70\ 000$, 基质无干扰。

2.2.2 对照品溶液的配制 准确称取吡虫啉对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用乙腈定容, 得对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取待测丹参和土壤样品各约 25 g, 分别置 250 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入乙腈 50 mL, 放置 2 h, 超声提取 30 min, 滤过, 滤液收集到装有氯化钠 5 g 的 100 mL 具塞锥形瓶中, 剧烈震荡 1 min, 室温下静置 10 min, 使乙腈相和水相分层。精密吸取乙腈液 10 mL, 浓缩至干, 残渣加丙酮-正己烷(10:90) 10 mL 使溶解。样品溶液通过弗罗里矽柱, 加丙酮-正己烷(10:90) 5 mL 洗脱, 弃去流出液。用丙酮-正己烷(20:80) 10 mL 分 2 次淋洗弗罗里矽柱, 收集洗脱液, $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹至近干, 残渣加乙腈-水(30:70) 定容至 2.0 mL, 混匀, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.2.4 线性范围考察 取对照品储备液, 分别用乙腈-水(30:70) 稀释成质量浓度分别为 0.05, 0.1, 1, 10, 100, 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液, 依次进样, 照 2.2.1 项下色谱条件测定。以峰面积积分值

为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 57.00X + 32.92$ ($r = 0.9999$),线性范围 $0.05 \sim 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。参照 2.2.3 项下方法操作,以 3 倍信噪比 S/N 计算,得该方法的检出限 (LOD) $0.0036 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.2.5 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算吡虫啉峰面积的 RSD 0.4%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取丹参农残样品 6 份,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果吡虫啉峰面积的 RSD 2.1%,表明该方法的重复性良好。

2.2.7 回收率试验 取丹参农残样品 6 份,分别按样品中成分含量-对照品 (1:1) 加入一定量对照品溶液,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 吡虫啉含量测定的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of imidacloprid

称样量 /g	样品中量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
25.28	204.3	391.0	93.35		
25.10	202.8	395.7	96.45		
25.12	203.0	391.1	94.05	95.55	1.6
25.07	202.6	397.5	97.45		
25.17	203.4	395.0	95.80		
25.13	203.1	395.5	96.20		

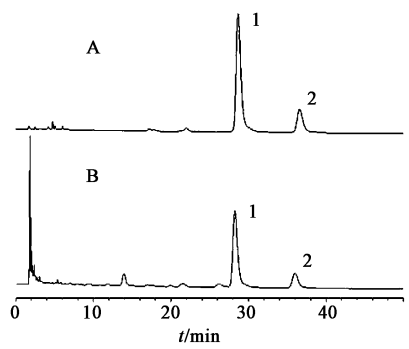
注:加入量均为 $200 \mu\text{g}$ 。

2.3 多杀菌素的含量测定

2.3.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相 甲醇-乙腈-0.1% 氨水 ($32:51:17$), 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 250 nm , 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。见图 1。

2.3.2 对照品溶液的配制 准确称取多杀菌素对照品 10 mg , 置于 10 mL 量瓶中, 用流动相定容, 得储备液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取待测丹参和土壤样品各约 20 g , 精密称定质量, 分别置 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 60 mL , 调 pH 10, 放置 2 h , 超声提取 30 min , 滤过, 滤渣用甲醇 20 mL 分次洗涤, 合并滤液与洗液, 转入装有 5% 氯化钠溶液 30 mL 的分液漏斗中, 调 pH 10, 用二氯甲烷提取 3 次 ($50, 40, 30 \text{ mL}$), 合并提取液, 浓缩至近干, 残渣加正己烷 10 mL 使溶解。分别用二氯甲烷-甲醇 ($75:25$) 10 mL ,



A. 对照品; B. 供试品; 1. 多杀菌素 A; 2. 多杀菌素 D

图 1 多杀菌素 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of spinosad

乙腈 10 mL , 二氯甲烷 10 mL 和正己烷 20 mL 预淋洗硅胶柱。样品溶液通过硅胶柱, 分别用正己烷 50 mL , 二氯甲烷 20 mL , 乙腈 16 mL 淋洗硅胶柱, 弃去流出液。用二氯甲烷-甲醇 ($75:25$) 16 mL 分 2 次淋洗硅胶柱, 收集洗脱液, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下氮吹至近干, 用流动相定容至 5.0 mL , 在漩涡混合器上混匀, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.3.4 线性范围考察 取对照品储备液, 用流动相分别稀释为 $0.05, 0.1, 1, 10, 100, 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 以峰面积积分值 (多杀菌素 A 和 D 峰面积相加) 为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 24.11X - 112.9$ ($r = 0.9999$), 线性范围 $0.05 \sim 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以 3 倍信噪比 S/N 计算 LOD $1.9 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.3.5 精密度试验 取多杀菌素供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果多杀菌素峰面积的 RSD 0.4%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取丹参农残样品 6 份, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算多杀菌素峰面积的 RSD 1.7%, 表明该方法的重复性良好。

2.3.7 回收率试验 取丹参农残样品 6 份, 分别按样品中成分含量-对照品 (1:1) 加入一定量对照品溶液, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 2。

2.4 消解动态 分别以残留量为纵坐标, 采样时间为横坐标拟合动态消解曲线, 第 1 天开始吡虫啉和多杀菌素在丹参茎叶中的消解动态方程分别为 $Y = 56.11e^{-0.10X}$ 和 $Y = 21.53e^{-0.06X}$, r 分别为 0.982 和 0.991。其残留消解动态趋势呈指数回归, 符合一级动力学方程, 见图 2。

表 2 多杀菌素含量测定的回收率试验

Table 2 Recovery test of spinosad

称样量 /g	样品中量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
20.22	128.6	242.1	94.58		
19.90	126.6	232.8	88.50		
20.30	129.1	239.3	91.83	92.08	2.5
20.08	127.7	238.4	92.25		
20.14	128.1	237.2	90.92		
19.92	126.7	240.0	94.42		

注:加入量均为 120 μg 。

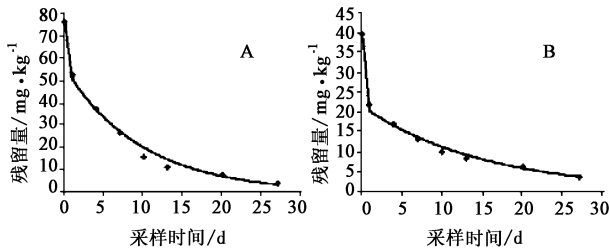


图 2 丹参中吡虫啉(A)和多杀菌素(B)的动态消解曲线

Fig. 2 Degradation dynamics of imidacloprid and spinosad in *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

2.5 产品和土壤中的残留量测定 对空白土壤和丹参空白样品的残留检测均未检出吡虫啉和多杀菌素,说明土壤未受到污染。丹参采收后的土壤残留检测发现,吡虫啉和多杀菌素残留量分别为 0.020 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和未检出 ($<1.9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),丹参产品中这 2 种成分的最终残留分别为 0.18 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和未检出 ($<1.9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

3 讨论

本文建立了丹参中吡虫啉和多杀菌素的 HPLC 残留分析方法,该方法前处理采用固相萃取法,净化较为彻底,灵敏度高,重复性好,准确度、精密度和检出限均符合农残测定要求^[10]。对消解动态数据的拟合结果表明,将吡虫啉和多杀菌素的动态消解方程用通式 $Y = a \cdot e^{-kx}$ 表示,以 2 h 残留量为初始残留量,按公式 $t_{1/2} = (-1/k) \times \ln(\text{初始残留量}/2a)$ 计算半衰期($t_{1/2}$)分别为 3.65, 1.64 d,表明施药初期多杀菌素的降解速度比吡虫啉快。第 1 天开始吡虫啉和多杀菌素在丹参中的消解曲线符合一级动力学

方程,按照公式 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 计算, $t_{1/2}$ 分别为 6.93, 11.55 d,表明在施药 1 d 后多杀菌素降解速度低于吡虫啉,多杀菌素的持效期更长;在相同剂量标准下,多杀菌素的残留量均低于吡虫啉的残留量,因此多杀菌素的安全间隔期比吡虫啉短。吡虫啉在初期防治后,由于降解速度快导致持效期短,治理期间需要多次施药以确保治理效果,从而导致吡虫啉的过量使用,残留量超标;而多杀菌素在初期防治后,由于降解速度慢持效期长,要达到相同的效果需要的药量更低,不易造成残留^[9]。土壤最终残留试验表明多杀菌素在土壤中降解完全,不易造成土壤污染,在丹参产品中多杀菌素的残留水平也更低,目前一直存在的多杀菌素成本较高问题也随着其专利保护到期而得到解决^[6],因此在丹参种植中,多杀菌素可作为一种替代吡虫啉的理想农药。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:70-71.

[2] 李兴权,陈川,文耀东,等. 陕南丹参种植区昆虫调查[J]. 中国现代中药,2010,12(6):12-15.

[3] 邹骝,罗娟,孙晓静. 高效液相色谱法检测金银花中农药吡虫啉的残留量[J]. 湖北中医杂志,2014,36(5):68-69.

[4] 唐振华,陶黎明,李忠. 害虫对新烟碱类杀虫剂的抗药性及其治理策略[J]. 药学学报,2006,8(3):195-202.

[5] 朴秀英,嵇莉莉,林荣华,等. 新烟碱类杀虫剂登记与管理现状分析[J]. 中国植保导刊,2015,35(3):70-74.

[6] 向双云,周珍辉,马建民,等. 新型生物农药-多杀菌素[J]. 现代生物医学进展,2008,8(9):1750-1752.

[7] 华乃震. 绿色环保生物杀虫剂多杀霉素和乙基多杀菌素的述评[J]. 农药,2015,54(1):1-5.

[8] 王彦华,王鸣华. 多杀菌素的作用机理及其抗药性的研究进展[J]. 农药科学与管理,2006,25(11):12-15.

[9] 李姐,汪清民,黄润秋. 多杀菌素的研究进展[J]. 农药学报,2003,5(2):1-12.

[10] 戴华,李拥军,张莹. 稻谷中吡虫啉农药残留量的固相萃取高效液相色谱测定[J]. 分析测试学报,2004,21(1):70-72.

[责任编辑 刘德文]