

· 化学与分析 ·

不同前处理方法测定金银花中有机氯农药残留量的比较

梁金良, 梁妍, 周威, 郝小燕*, 何茂秋*

(贵州医科大学药学院, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:通过固相微萃取(SPME)技术与其他3种前处理方法进行对比,建立一种SPME-GC快速测定金银花中有机氯农药(OCPs)残留量的方法。方法:分别采用2010年版《中国药典》方法、《日本药局方》16版方法、《2014年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册》方法以及SPME技术测定金银花中有机氯农药残留状况,并进行回收率计算。结果:4种前处理方法的回收率均在65%~120%,其中2010年版《中国药典》方法、《日本药局方》16版方法和SPME技术杂质干扰相对较少。结论:分析了4种方法检测金银花药材中有机氯农药残留量的差异,并确定了在中药材中有机氯农药残留量测定中,SPME-GC是一种快速、简单、灵敏的检测方法。

[关键词] 固相微萃取; 前处理方法; 金银花; 有机氯农药残留

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0050-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100050

Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Lonicerae Japonicae Flos by Different Pretreatment

LIANG Jin-liang, LIANG Yan, ZHOU Wei, HAO Xiao-yan*, HE Mao-qiu*

(School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish SPME-GC method for rapid determination of organochlorine pesticide residues (OCPs) in *Lonicerae Japonicae Flos* by comparing solid-phase microextraction (SPME) with other three pretreatment methods. **Method:** OCPs in *Lonicerae Japonicae Flos* were analyzed according to the methods in *Chinese Pharmacopoeia* 2010 edition, *Japanese Pharmacopoeia* 16th revision, *Manual for China National Food Contamination and Harmful Factors Risk Monitoring* in 2014 and solid phase microextraction technology (SPME), and the recovery rates were calculated respectively. **Result:** Recovery rates of the four different pretreatment methods were determined between 65% to 120%. Among the methods, there was fewer impurity interference in *Chinese Pharmacopoeia* 2010 edition method, *Japanese Pharmacopoeia* 16th revision method and SPME. **Conclusion:** The effect of 4 methods on OCPs in *Lonicerae Japonicae Flos* was analyzed, and it was determined that SPME-GC was rapid, simple and sensitive.

[Key words] solid phase microextraction technology; pretreatment; *Lonicerae Japonicae Flos*; organochlorine pesticide residues

在人们的生活水平逐渐提高、环保意识增强、消费观念转变的大环境下,因农药的大批量生产与广

泛的使用,由此衍生出了农药残留问题受到了极大的重视^[1-2]。农药残留问题不仅存在于日常的餐桌

[收稿日期] 20150721(008)

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2013]2033号)

[第一作者] 梁金良,在读硕士,从事药品质量分析与控制研究,Tel:15761600286,E-mail:ljlj73094@126.com

[通讯作者] *郝小燕,教授,从事天然产物成分分析及质量标准研究,Tel:13809468899,E-mail:haoxiaoyan@vip.163.com;

*何茂秋,硕士,讲师,从事天然药物质量分析研究,Tel:13984393194,E-mail:520hmq@163.com

上^[3-5],也已经影响到了中药在国际应用中前行的步伐^[6-8]。近几年来,一些中药材中农药残留量超标的报道凸显了我国在中药外源性有害物质控制方面的疏忽。

固相微萃取 (SPME) 技术是 1989 年由加拿大 Waterloo 大学的 Pawliszyn 和 Belardi 首次提出^[9]。目前,该技术已广泛应用于农药残留的检测中,研究表明^[10-13],SPME 技术广泛应用于土壤、蔬菜、纺织品、水质等方面的农药残留分析中,具有操作简单、方法灵敏度高、环境友好等优点。近年来,在加拿大等国该技术已部分应用于国家标准中^[14]。本文选用金银花药材为试验对象,选用 2010 年版《中国药典》^[15],《日本药局方》16 版^[16],《2014 年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册》(下文简称工作手册)^[17]中 3 种经典的农药残留检测前处理方法与 SPME 技术进行对比,以此来研究不同方法在测定以金银花为代表的中药材有机氯农药残留量之间的差异,并且研究 SPME 技术在检测中的可行性。

1 材料

7890A 型气相色谱仪 (美国 Agilent 公司), BR-1701 色谱柱 (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm, 德国 Bruker 公司), 60 μm PDMS/DVB (美国 Supelco 公司), T460/H 型超声波振荡器 (德国 Elma 公司), 3-18 型台式离心机 (德国 Sigma 公司), C-MAG HS10 型加热磁力搅拌器 (德国 IKA 公司), GL-88B 型旋涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), BP211D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

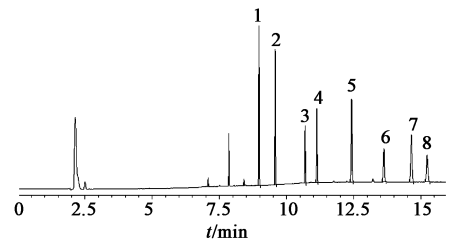
对照品: 六六六 (α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC); 滴滴涕 (*p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD) 质量浓度均为 100 mg · L⁻¹ 由农业部环境保护科研检测所提供。石油醚 (60 ~ 90 °C)、正己烷、丙酮、乙腈、氯化钠、无水硫酸钠均为分析纯,浓硫酸为优级纯,水为超纯水。金银花药材购于贵阳市花果园健康药品经营部。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的制备 分别将质量浓度均为 100 mg · L⁻¹ 的 8 种有机氯对照品 (α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD) 用正己烷制成 2 mg · L⁻¹ 的单个对照品储备液,在 -20 °C 保存,再取各单个对照品储备液适量,用正己烷制成 200 μg · L⁻¹ 的混和对照品储备液,待用。

2.2 气相色谱条件与系统适用性试验 检测器 ⁶³Ni-ECD,载气高纯氮,柱流速 1 mL · min⁻¹,尾吹

59 mL · min⁻¹,进样口温度 250 °C,检测器温度 300 °C,进样分流比 5:1,液体进样体积 1 μL,程序升温 (初始温度为 100 °C,保持 1 min,以 20 °C · min⁻¹ 的速度升温至 230 °C,保持 1 min,再以 10 °C · min⁻¹ 升至 250 °C · min⁻¹,保持 6 min),将进样口温度从 250 °C 调至 230,270 °C,⁶³Ni-ECD 检测器温度从 300 °C 调至 295,305 °C,进样有机氯混合对照品溶液。其保留时间、分离度和对称因子都无明显变化 (R > 1.5,对称因子在 0.97 ~ 1.05)。见图 1。



1. α-BHC; 2. γ-BHC; 3. β-BHC; 4. δ-BHC; 5. *p,p'*-DDE; 6. *o,p'*-DDT; 7. *p,p'*-DDD; 8. *p,p'*-DDT

图 1 有机氯混合对照品色谱

Fig. 1 GC chromatogram of OCPs

2.3 2010 年版《中国药典》方法 取样品于 60 °C 干燥 4 h,粉碎成细粉,准确称取 1.0 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加水 10 mL 浸泡过夜,精密加丙酮 20 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用丙酮补足减失的质量,加氯化钠约 3 g,精密加二氯甲烷 15 mL,称定质量,超声处理 15 min,再称定质量,用二氯甲烷补足减失的质量,静置使分层,将有机相迅速移入装有适量无水硫酸钠的 100 mL 具塞锥形瓶中,放置 4 h。精密量取 20 mL,于 40 °C 水浴上减压浓缩至近干,加少量石油醚如前反复操作至二氯甲烷及丙酮除净,用石油醚溶解并转移至 10 mL 具塞刻度离心管中,加石油醚精密稀释至 5 mL,小心加入硫酸 1 mL,振摇 1 min,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,精密量取上清液 2 mL,置氮吹仪上 40 °C 浓缩至近干,精密加入石油醚至 1 mL 超声溶解,即得。

2.4 《日本药局方》16 版方法 取样品,粉碎成细粉 (过三号筛),准确称取 1.0 g,置 50 mL 聚苯乙烯离心管内,加入丙酮-水溶液 (5:2) 6 mL,振荡混合 15 min,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液于 50 mL 鸡心瓶中。用丙酮-水 (5:2) 6 mL 重复提取残渣 2 次,合并上清液于 40 °C 水浴上减压浓缩至近干。加入到已加饱和氯化钠溶液 100 mL 的分液漏斗中,加入正己烷 10 mL,振荡混合 5 min,静置使分层,有机层取出过已加无水硫酸钠约 6 g 的漏斗。将分液漏斗中的水层再加正己烷 10 mL 重复萃取 1

次,合并滤液,于 40 ℃ 水浴上减压浓缩至约 5 mL。置弗罗里硅土固相萃取小柱[用正己烷-乙醚(17:3)10 mL 预洗]上,用正己烷-乙醚(17:3)15 mL 洗脱,收集洗脱液,于 40 ℃ 水浴上减压浓缩至近干加正己烷定容至 2 mL,移入具塞试管中,加浓硫酸 0.5 mL 振荡混合,4 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液 1 mL,即得。

2.5 工作手册方法 取样品,粉碎成细粉,准确称取 1.0 g,加入水 1 mL 浸泡 5 min,加入氯化钠 1 g 振荡混匀,加入乙腈 5 mL,涡旋混匀 1 min 后超声提取 30 min,加入无水硫酸钠 4 g,涡旋混匀 1 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液至鸡心瓶中。用乙腈 5 mL 重复提取 1 次,合并提取液,30 ℃ 水浴中减压蒸馏浓缩至近干。鸡心瓶中残渣用乙腈 5 mL 复溶后置 Carb/NH₂ 固相萃取小柱[柱上加入无水硫酸钠 2 mL,用乙腈-甲苯(3:1)溶液 5 mL 活化]上并收集,以乙腈-甲苯(3:1)溶液 20 mL 洗脱,合并洗脱液,经 30 ℃ 水浴中减压蒸馏浓缩至近干,用正己烷 1 mL 准确定容过膜,即得。

2.6 SPME 技术 将样品于 60 ℃ 干燥 4 h,粉碎成细粉,准确称取 1.0 g 于具塞离心管中,加入正己烷-丙酮(1:9)2.5 mL,超声 30 min,取出离心 5 000 r·min⁻¹,10 min。取上清液 1 mL 于 20 mL 顶空瓶中,加入水 9 mL 与氯化钠 0.5 g,超声 1 min 使混匀。加入磁力搅拌子,搅拌速率为 400 r·min⁻¹,于 35 ℃ 下插入萃取头萃取 30 min,取出后于气相色谱仪上进样解析,解析温度 250 ℃,解析时间 5 min。

3 结果

3.1 线性及检出限试验 3 种标准方法的线性试验:精密量取上述 200 μg·L⁻¹ 的混和对照品储备液,用正己烷分别制成为 1,5,10,50,100,200 μg·L⁻¹ 的 6 个质量浓度的混合对照品溶液,按照 2.2 项下色

谱条件进样,以峰面积为纵坐标,对照品浓度为横坐标绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 不同方法的线性回归方程和相关系数

Table 1 Linear equations, correlation of different methods

有机氯	标准方法		SPME 技术	
	线性回归方程	r	线性回归方程	r
α-BHC	Y=35.28X-21.73	0.999 8	Y=2 865X+19.02	0.999 2
γ-BHC	Y=30.12X-19.30	0.999 9	Y=1 945.5X+36.29	0.996 0
β-BHC	Y=14.02X+3.80	0.999 9	Y=1 011.8X+71.13	0.999 5
δ-BHC	Y=18.09X-6.21	0.999 8	Y=1 689X+86.54	0.994 9
p,p'-DDE	Y=30.59X-17.05	0.999 8	Y=1 002X+79.56	0.993 9
o,p'-DDT	Y=15.83X-9.58	0.999 8	Y=235X+135.40	0.990 5
p,p'-DDD	Y=24.36X-4.53	0.999 9	Y=771.75X+91.15	0.992 4
p,p'-DDT	Y=14.39X-11.39	0.999 3	Y=182.3X+37.88	0.991 7

运用 SPME 技术的线性试验:精密量取上述 200 μg·L⁻¹ 的混和对照品储备液,用正己烷-丙酮(1:9)制成分别为 5,10,20,50,100 μg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,再分别取 1 mL 于 20 mL 顶空瓶中加入水 9 mL 与氯化钠 0.5 g 制成分别含 0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 μg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。按照 2.6 项下方法用 60 μm PDMS/DVB 的纤维萃取头进行萃取、富集、解析,结果见表 1。

以 3 倍信噪比计算定性检出限。结果《中国药典》方法的检出限为 0.55~1.79 μg·L⁻¹;《日本药局方》方法的检出限为 0.67~2.08 μg·L⁻¹;工作手册方法的检出限为 0.83~2.98 μg·L⁻¹;SPME 技术的检出限为 0.017~0.38 μg·L⁻¹。

3.2 回收率试验 精密称取金银花样品 1.0 g,12 份,每份加入 100 μg·L⁻¹ 混合对照品溶液 1 mL 混匀,过夜自然晾干。按照 2.3~2.6 项下方法进行前处理,每种方法重复 3 份,计算平均回收率以及 RSD,结果见表 2。

表 2 不同方法回收率与 RSD

Table 2 Recoveries and precision of different methods

有机氯	%							
	中国药典		日本药局方		工作手册		固相微萃取技术	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
α-BHC	115.0	3.9	100.7	2.5	85.4	5.2	119.8	8.9
γ-BHC	112.7	1.2	100.9	1.9	66.7	9.8	102.9	10.2
β-BHC	98.1	2.5	92.4	2.1	66.9	10.8	97.2	12.5
δ-BHC	112.4	2.8	110.9	1.6	120.9	7.9	118.8	9.8
p,p'-DDE	105.4	3.7	100.5	4.2	71.7	11.8	114.4	10.3
o,p'-DDT	91.6	4.5	94.4	2.8	75.9	7.3	84.9	13.6
p,p'-DDD	108.1	5.1	101.9	5.2	72.9	8.5	108.5	11.7
p,p'-DDT	86.1	4.3	89.7	4.5	82.1	6.9	75.4	14.1

4 讨论

4.1 净化方法的比较 本试验中有机氯农药残留测定的 4 种前处理方法中,《中国药典》运用了硫酸磺化净化法;《日本药局方》同时运用了固相萃取和硫酸磺化净化法;工作手册运用了固相萃取法来进行净化;而 SPME 技术是没有净化过程的。从色谱图 2~5 看出《中国药典》和《日本药局方》方法的杂质峰较少,尤其是《日本药局方》的方法,而工作手册方法运用固相萃取(Carb/NH₂柱)净化加对照供试品溶液杂质干扰大,不利于分析工作。结果表明有机氯农药残留检测可以用硫酸磺化的方法来净化。

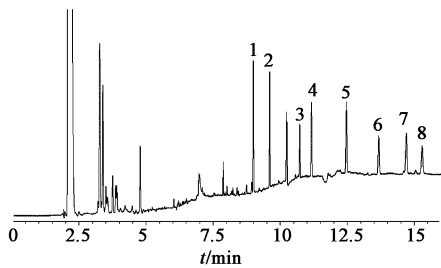


图 2 2010 年版《中国药典》方法样品加样回收率色谱
Fig.2 Chromatogram of spiked sample for Ch. P

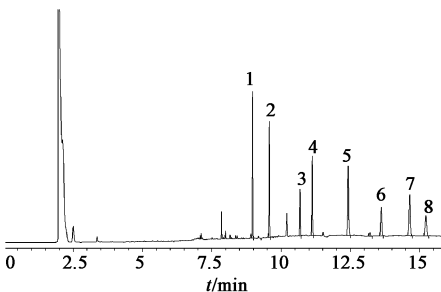


图 3 《日本药局方》16 版方法样品加样回收率色谱
Fig.3 Chromatogram of spiked sample for JP

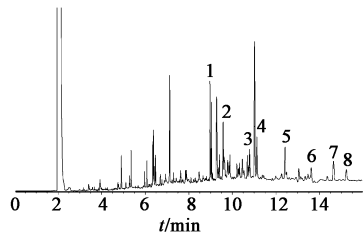


图 4 工作手册方法样品加样回收率色谱
Fig.4 Chromatogram of spiked sample for Manual

4.2 富集率的比较 SPME 技术的富集率高,从而大大降低了检测物的检测限,真正的达到痕量分析的目的。试验中有常规进样和 SPME 进样,以 2 种进样方式进样同一质量浓度混合对照品的峰面积进行比较。SPME 对不同化合物的富集率不同, α -BHC 为 81.72 倍; γ -BHC 为 65.02 倍; β -BHC 为

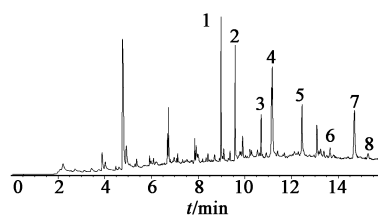


图 5 SPME 技术样品加样回收率色谱
Fig.5 Chromatogram of spiked sample for SPME

72.02 倍; δ -BHC 为 93.74 倍; p,p' -DDE 为 32.97 倍; o,p' -DDT 为 14.77 倍; p,p' -DDD 为 31.78 倍; p,p' -DDT 为 12.79 倍。

4.3 回收率的比较 采用 SPSS 分析软件对 4 种方法的回收率进行分析,以《中国药典》为标准进行 t 检验,结果见表 3。结果表明只有工作手册与 2010 年版《中国药典》方法差异具有统计学意义。4 种方法的回收率都在 65%~120%,工作手册加样回收率没有其他 3 种方法高,并且杂质干扰较大。SPME 技术中 60 μ m PDMS/DVB 的纤维萃取头对 o,p' -DDT 和 p,p' -DDT 的萃取率相对较低,但是满足了检测的需求,表明 SPME 技术与其他标准方法一样都可以应用于有机氯农药的检测中。

表 3 4 种方法回收率统计分析($\bar{x} \pm s, n=6$)

前处理方法	回收率
中国药典	103.68 \pm 10.65
日本药局方	98.92 \pm 6.65
工作手册	80.31 \pm 17.69 ¹⁾
SPME 技术	102.74 \pm 16.11

注:与《中国药典》方法比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4.4 样品检测结果 采用上述 4 种方法对金银花样品农药残留量进行检测,大部分的检测数据是在检出限与定量限之间,视为未检出。因此在样品检测结果中, α -BHC 只在 SPME 技术中检出为 3.75 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, δ -BHC 在 4 种方法中均有检出,依次为 106.72, 102.79, 100.51, 105.20 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$,其他均为未检出。由此可以看出固相微萃取技术的灵敏度较其他方法高。

4.5 结论 金银花具有清热解毒、抗菌、抗病毒等作用^[18-19],是我国最为常见和频繁使用的中药材之一,并且基质复杂,为本次试验对象选择的依据。目前,农药残留前处理方法较多,本文列出了几种常用方法与 SPME 技术的对比,见表 4。数据表明 SPME 技术应用于中药材农药残留检测比传统方法的灵敏度更高,与新型前处理技术比较也是具有一定的优势的。

表 4 农药残留检测常用前处理方法

Table 4 Common pretreatment methods of determination of pesticide residues

样品	前处理方法	LOD	回收率/%	RSD/%	期刊名称	文献
菊花	超声提取-磺化净化法	4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	69.4 ~ 113.9	2.3 ~ 11.9	分析科学学报	[20]
中成药	GPC	0.008 ~ 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	84.3 ~ 123.4	0.1 ~ 9.3	时珍国医国药	[21]
两面针	SPE	0.01 ~ 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	85.33 ~ 103.70	0.85 ~ 3.77	中药材	[22]
穿山龙	QuEChERS	0.08 ~ 0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	84.0 ~ 116.0	2.6 ~ 8.2	中国药理学杂志	[23]
金银花	SPME	0.017 ~ 0.38 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	75.4 ~ 119.8	8.9 ~ 14.1	-	-

注:检测物均为有机氯类。GPC. 凝胶渗透色谱;SPE. 固相萃取;QuEChERS. 分散固相萃取。

SPME 作为新型样品前处理技术,有机溶剂使用量少,操作方便,集取样、萃取、浓缩和进样于一体,很大程度上简化了前处理步骤,SPME 技术检测农残从取样到检测只需 90 min,并且富集倍数高,比传统方法的检出限高,适于检测样品中痕量有机氯农药的残留。本试验建立 SPME-GC 检测金银花药材有机氯农药残留量的新方法,提高了测定方法的效率和灵敏度,为快速、准确、方便地检测其他中药材中外源性有害物质提供参考,具有广泛的应用前景。

[参考文献]

[1] 达晶,王刚力,曹进,等. 农药残留检测标准体系概述及其分析方法进展[J]. 药物分析杂志,2014,34(5):760-763,769.

[2] 张俊清,刘明生,邢福桑,等. 近年来中药材农药残留的研究概况[J]. 中国药理学杂志,2003,38(1):7-9.

[3] 阙朝田. 浅述茶叶农残超标的成因及对策[J]. 茶叶科学技术,2008(1):38-39.

[4] 吴鹏,秦智伟,周秀艳,等. 蔬菜农药残留研究进展[J]. 东北农业大学学报,2011,42(1):138-144.

[5] 张秀玲,牛亮云,山丽杰,等. 我国农产品农药残留成因的理论解释[J]. 黑龙江农业科学,2011(9):106-111.

[6] 徐晓卫,胡思一,潘柔和. 宁夏枸杞中重金属元素和有机氯农药残留的分析[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(10):1487-1489,1492.

[7] 薛健,杨世林,陈建民,等. 我国中药材农药残留污染现状与对策[J]. 中国中药杂志,2001,26(9):637-640.

[8] 薛健,郝丽丽,彭非,等. 55 种中药材的有机氯农药残留状况调查报告[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2008,10(3):62-65.

[9] Belardi R P, Pawliszyn J B. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns[J]. Water Qual Res J Can,1989,24(1):179-191.

[10] 曹国社,赖璐,周红,等. 超声提取辅助浸入式固相微萃取-气相色谱/质谱技术快速检测土壤中的有机氯农药残留[J]. 环境化学,2014,33(4):676-683.

[11] 朱涛,朱莉萍,周宏琛,等. 固相微萃取-气相色谱-质谱法检测 30 种农药残留[J]. 分析实验室,2013,32(3):115-120.

[12] 王若苹. 固相微萃取-毛细管气相色谱法快速同步分析水中有机氯及有机磷农药[J]. 中国环境监测,2004,20(3):23-27.

[13] Zhu F,Ruan W, He M, et al. Application of solid-phase microextraction for the determination of organophosphorus pesticides in textiles by gas chromatography with mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta,2009,650(2):196-202.

[14] 郭彦军,张晓伟,徐燕. 固相微萃取技术在农药残留检测中的应用进展[J]. 现代仪器,2009,15(2):15-17.

[15] 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:附录 57.

[16] JP(2011)[S]. 16th revision,2011.

[17] 国家食品药品监督管理局. 2014 年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册[S]. 2014.

[18] 何显忠,兰荣德. 金银花的药理作用与临床应用[J]. 时珍国医国药,2004,15(12):865-867.

[19] 滕红丽. 金银花药材的综合研究分析[J]. 中药材,2007,30(6):744-748.

[20] 黄晓会,薛建,徐小龙,等. 气相色谱法测定菊花中 25 种有机氯农药残留量[J]. 分析科学学报,2013,29(3):409-412.

[21] 夏品华,张明时,陈文生,等. 凝胶渗透色谱净化/气相色谱测定中成药中有机氯农药的残留量[J]. 时珍国医国药,2008,9(11):2699-2701.

[22] 焦爱军,冯洁,赖茂祥. GC-MS 测定两面针中 8 种有机氯农药残留量[J]. 中药材,2013,36(4):528-531.

[23] 戴荣华,任雪冬,何潇. 分散固相萃取-气相色谱质谱联用法测定穿山龙中 23 种农药残留[J]. 中国药理学杂志,2011,46(2):149-152.

[责任编辑 顾雪竹]