

人参提取物中腐霉利残留的 HPLC 分析

任刚, 廖卫波, 胡志成, 易文芳, 刘荣华, 邵峰, 黄慧莲, 袁金斌*
(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立人参提取物中农药残留-腐霉利的 HPLC 含量测定方法。方法: BDS HYPERSIL C₁₈ 分析色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (40:60), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm。结果: 腐霉利进样量 0.001 ~ 0.6 μg 与色谱峰面积呈良好线性关系 ($R^2 = 0.9994$), 平均加样回收率 100.0% ($n = 9$), RSD 3.0%。结论: 该法简便、准确、可靠, 可用于人参提取物中腐霉利残留的含量测定。

[关键词] 人参提取物; 腐霉利; 高效液相色谱; 农药残留

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0107-04

[doi] 10.11653/syjf2013230107

Analysis of Procymidone Residues in Ginseng Extract by HPLC

REN Gang, LIAO Wei-bo, HU Zhi-cheng, YI Wen-fang, LIU Rong-hua,
SHAO Feng, HUANG Hui-lian, YUAN Jin-bin*

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University
of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of procymidone residues in ginseng extract. **Method:** The BDS HYPERSIL C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used as analytical column with the mobile phase of acetonitrile-water (40:60) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detective wavelength was set at 220 nm. **Result:** Good linear range was obtained for the procymidone with an injection amount ranging from 0.001 to 0.6 μg ($R^2 = 0.9994$). The average recovery was 100.0% ($n = 9$), and RSD was

[收稿日期] 20130424(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160509,81260605)

[第一作者] 任刚, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel:0791-87119065, E-mail:firmblue@163.com

[通讯作者] *袁金斌, 博士, 副教授, 从事中药物质基础与质量控制研究, Tel:0791-87118659, E-mail:kings2008@163.com

- [6] 蔡佳良, 黄洁燕, 李蕾蕾, 等. 运用近红外光谱法建立广藿香含叶量定量分析模型[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(3):260.
- [7] 蔡佳良, 郭念欣, 黄洁燕, 等. 近红外光谱法建立测定广藿香中百秋李醇的定量模型[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14):2113.
- [8] 郭念欣, 蔡佳良, 姬生国. 近红外光谱技术在陈皮道地性分析中的应用[J]. 中国药房, 2013, 24(15):1394.
- [9] 郭念欣, 蔡佳良, 李蕾蕾, 等. 运用近红外技术建立藿香正气胶囊中厚朴酚的定量模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8):146.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [11] 周芸, 张晓玲, 吴永江, 等. 近红外漫反射光谱法快速测定莲房原花青素及多酚含量[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(3):220.
- [12] 王星, 白雁, 陈志红, 等. 近红外光谱法测定连翘中连翘酯苷含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16):2071.
- [13] 封银曼, 张威, 白杨, 等. 黄芩提取物有效成分的近红外光谱定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):84.
- [14] 宋丽丽, 范丙义, 徐晓杰, 等. 近红外光谱法用于六味地黄丸模拟样品中熊果酸的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19):1590.

[责任编辑 顾雪竹]

3.0%。 **Conclusion:** The HPLC method is simple, accurate and effective, which can be used for the detection of procymidone pesticide residues in ginseng extract.

[**Key words**] ginseng extract; procymidone; HPLC; pesticide residues

腐霉利 procymidone 又名速克灵、杀霉利、二甲菌核里利等,纯品为白色结晶,mp166 ~ 166.5 °C,相对密度 1.42 ~ 1.46 (25 °C),分子量 284.14。

腐霉利属环酰亚胺类、广谱内吸性杀菌剂,在园艺作物及中药材的栽培中,广泛用于菌物侵染所致的各种病害的防治^[1-2]。人参是著名的中药材,在我国栽培面积规模很大,目前仅吉林省就占全国栽培面积的 80%,占世界栽培面积的 70%^[3]。腐霉利在人参栽培中主要用于栽前与其他药剂合用进行土壤消毒以及栽后疫霉病、灰霉病的防治。由于腐霉利化学性质稳定,在自然环境中降解缓慢,多年来的频繁施用不仅造成了人参产地环境的污染,更导致了参体组织中大量的腐霉利残留。研究表明,腐霉利具有雄性激素样活性,微量摄入即可导致睾丸间质细胞瘤的风险^[4]。因此,欧盟及美国纷纷出台标准限制人参中腐霉利的最大残留量,对我国人参及其提取物的出口贸易形成了巨大压力。因此快速、准确的检测人参相关产品中腐霉利的残留量具有重要意义。

目前腐霉利残留的检测方法有气相色谱法(GC)^[5-6]、高效液相色谱法(HPLC)^[7-9]、毛细管电泳色谱-质谱法(CE-MS)^[10]等。人参药材中腐霉利含量的气相色谱及液相色谱分析方法已见报道^[11]。为了有效控制人参提取物中腐霉利残留含量,本文建立了 HPLC 测定人参提取物中腐霉利的方法。

1 材料

Agilent 1100 型液相色谱仪(包括 UV 检测器,美国安捷伦公司),BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(美国热电公司),CPA225D 型电子天平(北京赛多利斯科技仪器有限公司),KQ3200E 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司),R210 型旋转蒸发器(瑞士 Buchii 公司)。

人参对照药材购自中国药品生物制品检定所(批号 120917-200609),经检测不含腐霉利,作为阴性对照样品。市售人参提取物由西安瑞芬生物工程有限公司友情提供,制备工艺为:药材先以 8 倍量的 70% 乙醇回流提取(2 次,每次 2 h),然后以 8 倍量的水煎煮(2 次,每次 2 h)。合并所有提取液,再经过滤,浓缩,喷雾干燥,得淡灰色粉末。按其用材部

位及所得人参总皂苷含量(UV 比色法测得)分为 4 种规格,Ⅰ. 人参茎叶提取物(5% UV),Ⅱ. 人参茎叶提取物(30% UV),Ⅲ. 人参根提取物(5% UV),Ⅳ. 人参根提取物(30% UV)。人参对照药材提取物也按以上工艺进行制备。

腐霉利对照品(批号 00604)购自 DGA 公司(germany),乙腈(色谱纯)为西陇化工股份有限公司产品,丙酮(AR)和石油醚(AR)均为国药集团化学试剂有限公司产品,甲醇(AR)为上海振兴化工一厂产品,双蒸水为实验室自制。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液制备 选取市售 I 号人参提取物,采用以下 4 种方法制备人参提取物供试品溶液,以筛选腐霉利提取率高的方法。

①精密称取样品 10.0 g,加入 150 mL 石油醚,超声提取 5 min,过滤得滤液,滤渣再重复提取 2 次,合并 3 次滤液,以旋转蒸发器减压蒸干,残渣用乙腈定容至 0.5 mL,摇匀后过 0.22 μm 微孔滤膜,得 A 供试品溶液。

②精密称取样品 10.0 g,加入 150 mL 丙酮,超声提取 5 min,过滤得滤液,滤渣再重复提取 2 次,合并 3 次滤液,以旋转蒸发器减压蒸干,残渣用乙腈定容至 0.5 mL,摇匀后过 0.22 μm 微孔滤膜,得 B 供试品溶液。

③精密称取样品 10.0 g,加入双蒸水 40 mL,超声至提取物完全溶解,静置使泡沫消失,将溶液转移至分液漏斗,加入 40 mL 石油醚萃取,重复 3 次,合并 3 次萃取液,以旋转蒸发器减压蒸干,乙腈定容至 0.5 mL,摇匀后过 0.22 μm 微孔滤膜,得 C 供试品溶液。

④精密称取样品 10.0 g,加入 150 mL 甲醇,超声提取 5 min,过滤得滤液,滤渣再重复提取 2 次,合并 3 次滤液,用旋转蒸发器减压蒸干,残渣加双蒸水 40 mL,超声至完全溶解,静置使泡沫消失,将溶液转移至分液漏斗,加入 40 mL 石油醚萃取,重复 3 次,合并 3 次萃取液,以旋转蒸发器减压蒸干,乙腈定容至 0.5 mL,摇匀后过 0.22 μm 微孔滤膜,得 D 供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取腐霉利对照品

2.00 mg,置于 10 mL 量瓶中,加丙酮溶解并定容至刻度,摇匀,得 $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品母液,使用时根据需要稀释成不同浓度。

2.2 色谱条件与系统适用性试验 BDS HYPERSIL C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(40:60),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 220 nm,柱温室温,进样量 20 μL 。理论塔板数以腐霉利峰计算不低于 2 500。在该色谱条件下,对照品及样品的分离色谱图见图 2。

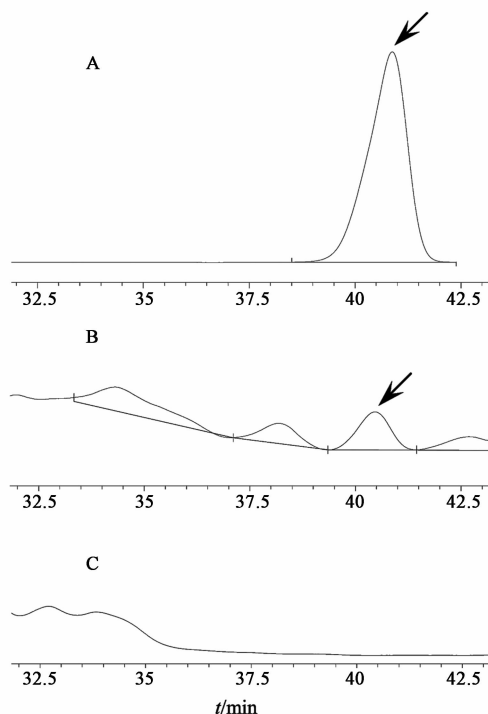


图 2 对照品(A)、供试品(B)和阴性对照品(C)的 HPLC(箭头所示为腐霉利的色谱峰)

2.3 供试品溶液制备方法的确定 按 2.2 项下色谱条件测定 4 种制备方法所获供试品溶液,记录色谱图,对色谱图中腐霉利的峰面积分别积分,根据回归方程计算出腐霉利含量,结果见表 1。表 1 可见,采用 2.1.1 供试品溶液制备方法③制备的供试品 C 溶液中腐霉利含量约为其他 3 种方法的 2~3 倍,表明该提取方法对样品中的腐霉利提取效果良好。以下实验中,供试品溶液采用方法③制备。

表 1 4 种制备方法对样品中腐霉利的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

供试品溶液	腐霉利含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%
A 溶液	24.8 ± 0.7	2.6
B 溶液	28.5 ± 0.8	3.0
C 溶液	76.9 ± 1.3	1.6
D 溶液	38.1 ± 0.9	2.3

2.4 线性关系考察 精密吸取腐霉利标准母液用丙酮分别稀释为 0.05, 0.10, 0.5, 2.0, 10.0, 20.0, 30.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液,在上述相同色谱条件下分析,以色谱峰面积对腐霉利的浓度进行线性回归,得回归方程为 $Y = 86.847X + 700.07$,进样量 0.001~0.6 μg ,相关性良好($r^2 = 0.9994$)。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 20 μL ,按上述色谱条件重复进样 5 次,结果峰面积的 RSD 0.78%,说明仪器操作过程中精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取市售 I 号人参提取物 6 份,按 2.1 项下方法③制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进行分析,结果样品中腐霉利含量的 RSD 2.5%。说明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取供试品 C 溶液 20 μL ,分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 测定,结果供试品腐霉利峰面积的 RSD 2.2%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定,符合试验的时间要求。

2.8 回收率试验 取人参对照药材(不含腐霉利) 10.0 g 进行加标回收试验。由于腐霉利的含量限量标准为 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,故设置 3 个添加浓度 0.05, 0.10, 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,每个浓度水平设 3 个重复。按 2.1 项下方法③制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件下测定腐霉利的含量,计算回收率,结果见表 2。

表 2 人参对照药材提取物加标腐霉利的回收率

加入量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	测得量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.05	0.050	100.1	100.0	3.0
	0.047	94.7		
	0.049	97.4		
0.10	0.102	102.4	100.0	3.0
	0.102	101.9		
	0.098	98.1		
0.20	0.207	103.4	100.0	3.0
	0.206	103.1		
	0.198	99.0		

2.9 样品测定 取市售 4 种规格的人参提取物,按 2.1 项下方法③制备供试品溶液,在 2.2 项下色谱条件下,每份溶液进样 3 次。测定色谱峰面积,根据 2.4 项下的标准曲线方程计算腐霉利含量,结果见表 3。

表 3 市售人参提取物中腐霉利的含量测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

No.	腐霉利	RSD/%
I	3.84 ± 0.09	2.1
II	17.9 ± 0.4	2.0
III	2.60 ± 0.07	2.8
IV	5.12 ± 0.14	2.6

3 讨论

准确测定人参及其相关产品中腐霉利残留量的前提是,尽可能完全地将待测样品中的腐霉利转移到供试品溶液中,这就对样品前处理方法(包括提取溶剂和提取方法)提出了较高的要求,这也是本研究的难点。腐霉利作为一种非极性杀菌剂,易溶于丙酮、氯仿、石油醚等有机溶剂中。长城等^[11]曾采用 HPLC 分析了人参药材中的腐霉利残留量,其供试品溶液的制备采用石油醚超声萃取方法。我们在预实验中尝试用该方法进行了人参提取物供试品溶液的制备,但是没有获得好的效果,所得腐霉利的峰面积较小,且与干扰峰的分度不佳(延长保留时间也未获满意结果)。这提示,要想定量检测存在于不同化学背景中的腐霉利,样品前处理方法应有所差异。根据腐霉利的理化性质,我们设计了 4 种提取方法,结果表明,采用水溶解-石油醚超声萃取的方法具有较高的提取率,干扰峰少,且操作简便,适合供试样品的制备。

尽管人参及其制品中人参皂苷类成分的 HPLC 检测方法已多有报道,但用 HPLC 测定人参提取物中腐霉利残留还未见文献报道。本文比较了多种比例的乙腈-水(60%, 50%, 45%, 40%, 35%)溶液作为流动相的分离效果,结果以乙腈-水(40%)分离效果较好,保留时间较适中,且无干扰。

灵敏度是评价农药残留测定方法可行性的一项重要指标。通常灵敏度以方法的检测限表示,该值应低于检测标的物最高残留限量值一个数量级(10 倍)。国内暂未见有关人参中腐霉利的最高残留限量标准,而日本和欧盟规定的限量标准值分别为 0.5, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[12]。本方法的检测限为 0.012 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 定量限为 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 符合目前国际上对人参中腐霉利农药残留量检测的限量标准要求。

对市场销售的不同规格人参提取物中的腐霉利

含量测定结果表明,不同规格人参提取物的腐霉利残留量均高于高于国际限量标准,且含量存在着一定的差异,有必要对其进行质量控制。同时,本文建立的方法可用于快速、准确地测定人参提取物中的腐霉利含量。

[参考文献]

[1] 王伟民, 盛亚红. 腐霉利在葡萄中的残留分析方法[J]. 上海农业学报, 2000, 16 (增刊): 111.

[2] 舒馨, 李宁. 腐霉利的气相色谱分析[J]. 广西化工, 2000, 29 (3): 39.

[3] 刘思洁, 李青, 杨明远, 等. 吉林人参中木质素含量的测定[J]. 人参研究, 2011(2): 12.

[4] Hosokawa S, Murakami M, Ineyama M, et al. Effects of procymidone on reproductive organs and serum gonadotropins in male rats [J]. J Toxicol Sci, 1993, 18 (2): 111.

[5] 王平, 王旗, 刘庆, 等. 灵芝、茯苓中 5 种拟除虫菊酯农药残留分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13 (1): 5.

[6] Zhang C, Zhao H, Wu M, et al. Simultaneous determination of procymidone, pyridaben and beta-cypermethrin residues in tea solution by GC-ECD [J]. J Chromatogr Sci, 2012, 50 (10): 940.

[7] 李志坚. SPE-HPLC 法同时测定大白菜中吡虫啉等 5 种农药残留方法研究[J]. 湖南农业科学, 2012, (13): 85.

[8] 何进林, 张志华. 高效液相色谱法测定水果中吡虫啉农药残留量[J]. 食品科学, 2011, 32 (6): 230.

[9] 高国文, 朱红霞. 液相色谱法测定香菇中多菌灵农药残留方法研究[J]. 农药科学与管理, 2010, 31 (9): 36.

[10] Rodríguez R, Picó Y, Font G, et al. Analysis of thiabendazole and procymidone in fruits and vegetables by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2002, 949 (1/2): 359.

[11] 长城, 刘文丛, 李伟, 等. HPLC 和 GC 分析人参中腐霉利残留含量[J]. 人参研究, 2011(4): 16.

[12] 章强华, 董国望, 姚晗璐, 等. 人参常用农药国外残留限量标准的分析及对策[J]. 人参研究, 2009, 21 (1): 2.

[责任编辑 顾雪竹]