

# QuEChERS-高效液相色谱法测定铁皮石斛中多菌灵和甲基硫菌灵的残留量\*

陈思颖<sup>1,2,3</sup>, 吴 耽<sup>1,4</sup>, 巩仔鹏<sup>1,2</sup>, 谭 丹<sup>1</sup>, 孙 佳<sup>1,2</sup>, 杨 畅<sup>1,2,3\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550004)

**[摘 要]** 目的: 建立 QuEChERS-高效液相色谱法测定不同产地铁皮石斛中多菌灵与甲基硫菌灵农药残留量的方法。方法: 铁皮石斛样品用乙腈溶液提取, 经 QuEChERS 方法净化, 采用 Waters C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)、乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵缓冲溶液 (20:80) 为流动相, 流速 1 mL/min、柱温 35 ℃、检测波长 280 nm, 对不同产地铁皮石斛中多菌灵与甲基硫菌灵残留量进行检测。结果: 多菌灵在 0.05 ~ 25 mg/L 范围内呈良好的线性关系, 相关系数等于 0.999 4, 检测限为 0.01 mg/kg, 定量限为 0.04 mg/kg, 3 个添加水平下的平均回收率是 98.28 %, RSD 是 2.68 %; 甲基硫菌灵在 0.025 ~ 12.5 mg/L 范围内呈良好的线性关系, 相关系数等于 0.999 5, 检测限为 0.02 mg/kg, 定量限为 0.06 mg/kg, 3 个添加水平下的平均回收率是 101.03 %, RSD 是 3.64 %; 50 批铁皮石斛中有 4 批分别检出多菌灵与甲基硫菌灵农药残留, 均低于《中国药典》2015 年版中药有害残留物限量制定指导原则农药残留量最大限量理论值。结论: 建立的 QuEChERS-高效液相色谱法检测多菌灵和甲基硫菌灵, 具有操作简单、高效、专属性好、重复性强、结果准确可靠等优点。

**[关键词]** 植物, 药用; 铁皮石斛; 色谱法, 高效液相; 多菌灵; 甲基硫菌灵

**[中图分类号]** R932 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)08-0913-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.08.010

## Determination of Carbendazim and Thiophanate-methyl in *Dendrobium officinale* by QuEChERS-HPLC

CHEN Siying<sup>1,2,3</sup>, WU Dan<sup>1,4</sup>, GONG Zipeng<sup>1,2</sup>, TAN Dan<sup>1</sup>, SUN Jia<sup>1,2</sup>, YANG Chang<sup>1,2,3</sup>

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of residual carbendazim and thiophanate-methyl in *Dendrobium officinale* from different regions by QuEChERS-HPLC. **Methods:** The samples were extracted by acetonitrile and purified by the optimized QuEChERS method. Then the carbendazim and thiophanate-methyl residues in *Dendrobium officinale* from different regions were determined by HPLC method with Waters C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.02 mol/L ammonium acetate buffer for isocratic elution (20:80). The flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup>. The column temperature was 35 ℃ and the detection wavelength was 280 nm. **Results:** When the concentrations ranged from 0.05 to 25 mg/L, the linear relationship was good ( $r = 0.999\ 4$ ) in the case of with carbendazim. The detection limit was 0.01 mg/kg, the quantitative limit was 0.04 mg/kg, and the average recovery and RSD under three different levels of addition were

\*[基金项目] 贵州省中药现代化科技产业研究开发项目[黔科合 SY 字(2014)3032-2 号]; 民族药与中药开发应用产学研基地建设项目[黔科合 KY 字(2013)122]; 民族药化学成分及活性研究[黔科合人字(2015)11 号]

\*\* 通信作者 E-mail: 723499701@qq.com

网络出版时间: 2018-08-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180821.0759.023.html>

98.28% and 2.68% ; When the concentrations ranged from 0.025 to 12.5 mg/L , the linear relationship was also good ( $r=0.9995$ ) in the case with thiophanate-methyl. The detection limit was 0.02 mg/kg, the quantitative limits was 0.06 mg/kg, and the average recovery and RSD under three different levels of addition were 101.03% and 3.64%. The residue of carbendazim and thiophanate-methyl were detected in 4 batches among 50 batches of *Dendrobium officinale*, but lower than the theoretical value of maximum limit of pesticide residue in the guideline for the limitation of harmful residues of traditional Chinese medicine from *China Pharmacopeia* (2015 edition). **Conclusion:** The QuEChER-HPLC method was established for the determination of carbendazim and thiophanate-methyl in the *Dendrobium officinale*. This method is simple and efficient with good specificity and strong repeatability. The results are accurate and reliable, providing real and effective basis for the quality control of *Dendrobium candidum*.

[ **Key words** ] plants, medicinal; *Dendrobium officinale*; chromatography, high performance liquid; carbendazim; thiophanate-methyl

铁皮石斛是中国传统名贵药材,是兰科石斛属植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)的干燥茎,因具有强阴益精、补内绝不足、平胃气、益智除惊等功效,在医药领域被广泛应用<sup>[1-3]</sup>。近年来,国内很多铁皮石斛种植基地在栽培过程中有时会发生病虫害,特别是高温高湿季节病虫害繁殖快,易发生炭疽病及白绢病等,导致植株很快死亡或者腐烂,形成毁灭性危害<sup>[4-5]</sup>。通过对铁皮石斛种植基地的调研发现,针对此类症状,基地常选用多菌灵与甲基硫菌灵对铁皮石斛感染炭疽病和白绢病进行防治。多菌灵又称苯并咪唑 44 号、棉萎灵等,是一种高效低毒、广谱、内吸性杀菌剂,对菌核病、炭疽病和枯萎病等具有良好的防治效果,是中药栽培过程中常用的农药。多菌灵化学性质稳定,能通过作物叶片和种子渗入植物体内,耐雨水冲洗,残效期长<sup>[6-7]</sup>。国内外对果蔬中的多菌灵残留量检测已有大量报道,但对中药材及制剂中多菌灵残留量的分析报道较少<sup>[8-9]</sup>。甲基硫菌灵是一种广谱性内吸低毒杀菌剂,具有内吸、预防和治疗作用。多菌灵和甲基硫菌灵对人、畜有一定毒性,可引起抽搐、恶心呕吐等症状,并能干扰内分泌<sup>[10-14]</sup>。因此,本实验对铁皮石斛中多菌灵与甲基硫菌灵农药残留量进行研究,确保铁皮石斛用药安全。本实验样品前处理采用 QuEChERS 方法,该法快速简单、经济有效安全,是近年来国际上最新发展起来的一种用于农产品检测的快速样品前处理技术,与传统的固相萃取(SPE)法相比其用时更短,有机试剂消耗更少,操作更为简单方便<sup>[15-16]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 仪器

美国戴安 UltiMate3000 高效液相色谱仪(包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、阵列二极管检测器等),AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),超声清洗仪(CQ-250A-ST,上海跃进医用光学器械),实验室超纯水机(WP-UP-11-20,四川沃特尔水处理设备有限公司),大容量离心机(TDL80-2B,上海安亭科学仪器厂),Allegra64R 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司),ZH-2 涡旋混合器(天津药典标准仪器厂),GILSON 移液器(四川吉尔森仪器有限责任公司)。

### 1.2 试剂

多菌灵(D1527047,99%,aladdin),甲基硫菌灵(T109974,98%,aladdin),乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司),QuEChERS 试剂盒[美国 Agilent 公司,含氯化钠、无水硫酸镁、GCB(石墨化炭黑)、C<sub>18</sub>-E(十八烷基硅胶)、PSA(乙二胺-N-丙基硅胶)等],水为超纯水。

### 1.3 样品信息

50 批铁皮石斛样品为 2014 年 9 月~2016 年 9 月收集的国内 5 个产地,其中福建 2 批、广西 3 批、贵州 29 批(乌当 15 批、白云 2 批、大方 3 批、罗甸 3 批、独山 3 批、铜仁 1 批、余庆 1 批、镇宁 1 批)、云南 9 批、浙江 7 批。样品由贵州省食品药品检验所熊惠林主任药师以及贵州医科大学生药教研室龙庆德副教授鉴定,均为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的干燥茎。样品信息见表 1。

表 1 样品信息表  
Tab. 1 Sample information Table

序号	样品 ID	采购时间	产地	序号	样品 ID	采购时间	产地
1	FJ-17	2015.03	福建	26	GZLD-39	2016.02	贵州罗甸
2	FJ-18	2015.03	福建	27	GZLD-40	2016.02	贵州罗甸
3	GX-15	2014.12	广西	28	GZLD-45	2016.04	贵州罗甸
4	GX-16	2014.12	广西	29	GZDS-1	2014.09	贵州独山
5	GX-14	2014.12	广西	30	GZDS-23	2015.07	贵州独山
6	GZWD-20	2015.06	贵州乌当	31	GZDS-48	2016.07	贵州独山
7	GZWD-28	2015.11	贵州乌当	32	GZTR-44	2016.04	贵州铜仁
8	GZWD-35	2016.01	贵州乌当	33	GZYQ-49	2016.08	贵州余庆
9	GZWD-19	2015.05	贵州乌当	34	GZZN-50	2016.09	贵州市镇宁
10	GZWD-22	2015.07	贵州乌当	35	YN-41	2016.02	云南
11	GZWD-24	2015.08	贵州乌当	36	YN-13	2014.11	云南
12	GZWD-25	2015.09	贵州乌当	37	YN-12	2014.10	云南
13	GZWD-27	2015.10	贵州乌当	38	YN-8	2014.10	云南
14	GZWD-30	2015.12	贵州乌当	39	YN-11	2014.10	云南
15	GZWD-31	2015.12	贵州乌当	40	YN-7	2014.10	云南
16	GZWD-34	2016.01	贵州乌当	41	YN-9	2014.10	云南
17	GZWD-38	2016.02	贵州乌当	42	YN-10	2014.10	云南
18	GZWD-42	2016.03	贵州乌当	43	YN-6	2014.10	云南
19	GZWD-43	2016.04	贵州乌当	44	ZJ-36	2016.01	浙江
20	GZWD-46	2016.05	贵州乌当	45	ZJ-37	2016.01	浙江
21	GZBY-32	2015.12	贵州白云	46	ZJ-5	2014.09	浙江
22	GZBY-33	2015.12	贵州白云	47	ZJ-26	2015.09	浙江
23	GZDF-21	2015.06	贵州大方	48	ZJ-3	2014.09	浙江
24	GZDF-29	2015.11	贵州大方	49	ZJ-4	2014.09	浙江
25	GZDF-47	2016.05	贵州大方	50	ZJ-2	2014.09	浙江

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取多菌灵对照品 5 mg, 甲基硫菌灵对照品 2.5 mg, 置同一 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并定容至刻度, 摇匀后, 精密量取 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 得对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取铁皮石斛样品粉末 10.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞离心管中, 加水 5 mL, 0.1% 甲酸乙腈 15 mL, 振摇 2 min 后, 加入 4 g 无水硫酸镁, 5 g 氯化钠后, 再次涡旋 5 min, 静置片刻, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 取离心后上清液 5 mL, 采用 QuEChERS 技术处理, 涡旋 5 min, 静置后以 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL, 即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Waters C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.02 mol/L 乙酸铵缓冲溶液

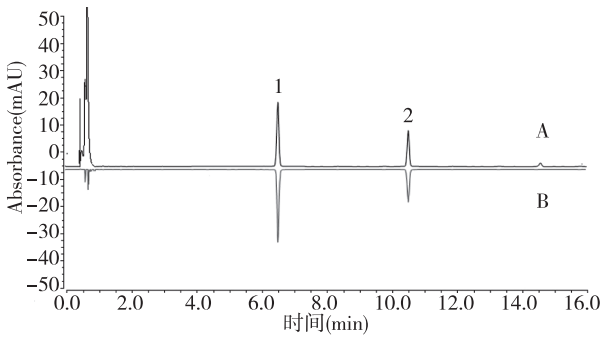
(20: 80), 流速 1 mL/min, 柱温 35 ℃, 进样体积 10 μL, 检测波长 280 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 精密称取铁皮石斛样品 (6 号, 未检出多菌灵与甲基硫菌灵) 粉末 10.0 g, 精密加入混合对照品溶液, 按“2.2”法制备供试品溶液, 多菌灵与甲基硫菌灵对照品按“2.1”法制备混合对照品溶液, 进样量 10 μL, 供试品与对照品所得的色谱图比较, 可以看出目标峰不受其他成分干扰, 专属性良好, 结果见图 1。

2.4.2 线性范围、检测限、定量限 分别精密吸取“2.1”项下混合对照品液 0.01、0.05、0.5、2.5、5 mL 分别置于 50 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 得对照品溶液 1、2、3、4、5。进样量: 10 μL。按“2.3”项下色谱条件测定, 以色谱峰峰面积 (Y) 为纵坐标, 以浓度 (X) 为横坐标, 得到多菌灵和甲基硫菌灵两种农药残留的回归方程、相关系数和线性范围; 再逐步稀释对照品溶液至信噪比 (S/N) 约为 10 计算定量限 (limit of quantitation, LOQ), 信噪比

(S/N) 约为 3 计算检测限 (limit of detection, LOD),结果见表 2。



注:A 为供试品,B 为对照品,1 为多菌灵,2 为甲基硫菌灵  
图 1 供试品与对照品液相色谱图

Fig. 1 The HPLC of *Dendrobium officinale* sample and the mixed standards

表 2 2 种农药残留的回归方程  
标准曲线、检测限和定量限

Tab. 2 Calibration curves, LODs, LOQs of 2 pesticide residue		
指标	多菌灵	甲基硫菌灵
线性回归方程	$Y=5.21X+1.169$	$Y=5.009X+0.405$
$r^2$	0.999 4	0.999 5
线性范围(mg/L)	0.05 ~ 25	0.025 ~ 12.5
LOQ (mg/kg)	0.04	0.06
LOD (mg/kg)	0.01	0.02

**2.4.3 精密度试验** 精密吸取同一混合对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件测定,连续进样 6 次,测定峰面积。结果显示多菌灵峰面积的 RSD 为 1.81%,甲基硫菌灵峰面积的 RSD 为 1.96%,表明仪器精密度较好。

**2.4.4 重复性试验** 精密称取同一铁皮石斛样品(6 号,未检出多菌灵与甲基硫菌灵)粉末 10.0 g,精密加入混合对照品溶液,按“2.2”法制备 6 份供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件测定,结果显示多菌灵含量的 RSD 为 1.55%,甲基硫菌灵含量的 RSD 为 2.25%,表明方法的重复性较好,可满足农药残留测试要求。

**2.4.5 稳定性试验** 取“2.4.4”重复性项下制备的供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下,分别于 0、2、4、6、8、24 h 进样,测定各指标成分峰面积,多菌灵峰面积的 RSD 为 1.63%,甲基硫菌灵峰面积的 RSD 为 2.08%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.4.6 回收率试验** 精密称取铁皮石斛(6 号)粉末 5 g,共 9 份,分别加入低、中、高 3 种质量浓度的对照品溶液,按“2.2”法制备供试品溶液,计算平均回收率,结果 3 个添加水平下的多菌灵平均回收率为 98.28%,RSD 为 2.68%,甲基硫菌灵的平均回收率为 101.03%,RSD 为 3.64%。

表 3 多菌灵及甲基硫菌灵回收率试验结果( $n=3$ )

Tab. 3 Recovery test results of carbendazim and thiophonate-methyl						
组号	称量(g)	加入 (mg)	回收率(%)			平均回 RSD 收率(%) (%)
			1	2	3	
多菌灵	5.012 3	63	95.24	96.82	98.41	
	5.002 1	127	97.64	95.27	103.15	98.28 2.68
	5.010 1	254	98.42	98.03	101.57	
甲基硫菌灵	5.005 8	32	96.87	96.87	103.12	
	5.008 3	64	101.56	104.69	95.31	101.03 3.64
	5.004 2	129	102.32	104.65	103.87	

2.5 样品测定

分别取各批样品 10.0 g,精密称定,按“2.2”项下供试品溶液制备方法和“2.3”项下拟定的色谱条件测定 50 批铁皮石斛药材中多菌灵与甲基硫菌灵成分的含量,结果见表 4。样品测定结果显示 8 号 GZWD-35 和 49 号 ZJ-4 检出多菌灵,5 号 GX-14 和 27 号 GZLD-40 检出甲基硫菌灵,其余批次均为检出多菌灵和甲基硫菌灵,根据农药残留量最大限量理论值计算公式可得铁皮石斛的农药最大限量为多菌灵 0.5 mg/kg 甲基硫菌灵为 4 mg/kg,50 批铁皮石斛均未超过最大残留限量。

表 4 铁皮石斛中多菌灵和甲基硫  
菌灵检出情况( $n=2$ )

Tab. 4 Determination results of carbendazim and thiophonate-methyl in			
序号	样品 ID	多菌灵(mg/kg)	甲基硫菌灵(mg/kg)
5	GX-14	ND	0.16
8	GZWD-35	0.22	ND
27	GZLD-40	ND	0.23
49	ZJ-4	0.34	ND

注:ND 表示未检出,多菌灵、甲基硫菌灵的检出限分别为 0.01 及 0.02 mg/kg,定量限分别为 0.04 及 0.06 mg/kg

3 讨论

目前国内外尚未制定铁皮石斛中药材中的多菌灵及甲基硫菌灵最高残留限量,根据《中国药

典》2015 年版四部通则 9302“中药有害残留物限量制定指导原则”，有害残留物限量制定主要依赖于风险评估结果。风险评估是在有害残留物的毒理学、流行病学和其他相关数据的基础上，通过对污染物暴露情况和可能的膳食摄入量等信息进行综合分析评价，针对风险性质确定有害残留物人体暴露危害的一种方法。针对铁皮石斛通常由于栽植过密、通风不良或者由于夏季高温高湿等引起的炭疽病、白绢病病害，会常用多菌灵与甲基硫菌灵对其进行防治，但这类农药对人、畜有一定毒性可引起抽搐、恶心呕吐等症状，因此实验对铁皮石斛药材中多菌灵与甲基硫菌灵农药残留进行研究，建立了铁皮石斛中多菌灵与甲基硫菌灵农药残留测定方法，样品测定结果表明仅有 8 号 GZWD-35 和 49 号 ZJ-4 检出多菌灵，5 号 GX-14 和 27 号 GZLD-40 检出甲基硫菌灵。目前国内外尚未制定铁皮石斛中药材中的多菌灵及甲基硫菌灵最高残留限量，根据 2015 版《中国药典》中药有害残留物限量制定指导原则农药残留量最大限量理论值计算公式可以得到铁皮石斛的农药最大限量为：多菌灵 0.5 mg/kg，甲基硫菌灵为 4 mg/kg，50 批铁皮石斛均未超过最大残留限量。

综上，研究建立了 QuEChERS 方法净化、高效液相色谱法检测铁皮石斛中多菌灵与甲基硫菌灵农药残留量的测定方法，该方法在同一条件下测定多菌灵、甲基硫菌灵农药成分，其回收率、相对标准偏差、准确度和精密度符合要求，且具有简便、快速、准确、分离效果好等优点，本研究为铁皮石斛多菌灵及甲基硫菌灵的残留检测提供了可靠的实验依据，对铁皮石斛质量控制评价具有较好的应用价值。

4 参考文献

[1] 孙恒,胡强,金航,等. 铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(11): 225 - 234.

[2] 杨传玉,刘帆,吴耽,等. 铁皮石斛抗阿司匹林诱导急性胃黏膜损伤活性组分筛选及作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016,28(11):1699 - 1705.

[3] 吴耽,江婷婷,赵青,等. 铁皮石斛多糖抗阿司匹林诱导人胃黏膜上皮细胞 GES-1 损伤的保护作用机制研究[J]. 中国药理学通报, 2017,33(10):1479 - 1480.

[4] 李戈,李荣英,高微微. 药用石斛规模化种植中的病害问题及防治策略[J]. 中国中药杂志, 2013,38(4):485 - 488

[5] 戴燕萍. 铁皮石斛生产质量管理规范研究[D]. 浙江农林大学, 2012.

[6] 吴永江,朱炜,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]. 分析化学, 2006,34(2):235 - 238.

[7] 吴浪,张勇,李存雄,等. HPLC 法测定苦荞中多菌灵的残留量[J]. 江西师范大学学报:自然科学版, 2015, 39(3):246 - 248.

[8] 沈菁,刘军,刘建. 高效液相色谱法测定柑橘和土壤中残留的多菌灵[J]. 色谱, 2009,27(3):308 - 312.

[9] 高国文,刘育清,朱家香. 液相色谱法检测柑橘中多菌灵残留的方法研究[J]. 农药科学与管理, 2006,27(5):10 - 11.

[10] 刘静,李明. 高效液相色谱法测定水稻及土壤中甲基硫菌灵和多菌灵[J]. 湖北农业科学, 2013,52(5): 1151 - 1153.

[11] 周雪晴,谢艳丽,张青,等. 高效液相色谱法测定香蕉中的多菌灵、噻菌灵、甲基硫菌灵[J]. 化学分析计量, 2012,21(2):34 - 36.

[12] 刘杰,杨春亮,查玉兵,等. 高效液相色谱法 - 荧光检测器同时检测龙眼中多菌灵和噻菌灵残留[J]. 广东农业科学, 2010,37(3):150 - 152.

[13] 张念洁,吴信子,姜旭. 高效液相色谱法同时测定人参中多菌灵和甲基硫菌灵农药残留的含量[J]. 现代食品科技, 2013,29(4):907 - 910.

[14] 朱军,陈琴华,李鹏,等. LC-MS/MS 法测定金银花中多菌灵的残留量[J]. 中国药师, 2016,19(4):664 - 666.

[15] 张志勇,龚勇,单炜力,等. QuEChERS-高效液相色谱 - 串联质谱法测定黄瓜和土壤中甲基硫菌灵和多菌灵[J]. 色谱, 2012,30(1):91 - 94.

[16] 赵连海,于淑新,孙元社,等. QuEChERS-高效液相色谱法测定果蔬中多菌灵残留[J]. 农业工程, 2012,2(7):42 - 44.

(2018-02-15 收稿,2018-05-16 修回)  
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 丁廷森