

# 金银花中吡虫啉残留量的 HPLC 测定方法

刘清浩<sup>1, 2</sup>, 刘红彦<sup>1\*</sup>, 郭金春<sup>3</sup>, 艾国民<sup>1</sup>, 张玉军<sup>2</sup>

(1. 河南省农业科学院植物保护研究所, 河南 郑州 450002;

2. 河南工业大学, 河南 郑州 450052; 3. 河南农业大学, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 采用 HPLC 外标法测定金银花、土壤中吡虫啉的残留量。样品用甲醇提取, 石油醚反萃取, 二氯甲烷萃取, 其中, 金银花样品经弗罗里硅土与活性炭柱净化, 使用 ZORBAX SB C18 柱, 流动相为乙腈:水(30:70), 流速 0.8 ml/min, DAD 检测器检测波长 270 nm 进行检测。采用该方法, 吡虫啉回收率均大于 80%, 最低检出量为 0.0212 ng, 最低检出浓度为 0.00265 mg/kg (花蕾) 和 0.001325 mg/kg (土壤)。

**关键词:** 金银花; 吡虫啉; 残留量; 高效液相色谱

**中图分类号:** S567.7<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)01-0057-04

## HPLC Determination of Imidacloprid Residue in Honeysuckle

LIU Qing-hao<sup>1, 2</sup>, LIU Hong-yan<sup>1</sup>, GUO Jin-chun<sup>3</sup>, AI Guo-min<sup>1</sup>, ZHANG Yu-jun<sup>2</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China;

3. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** A HPLC method was developed to determine imidacloprid residues in honeysuckle and soil. Samples were extracted by methanol, reversly purified by petroleum ether, cleaned up by dichloromethane. Furthermore, honeysuckle samples were cleaned up on a column of Florisil and activated carbon. The content of imidacloprid was determined by external standard method, ZORBAX SB C18 column was used with acetonitrile and water solution (30:70, V:V) as mobile phrase at a flow rate of 0.8 ml/min, DAD detection wavelength at 270 nm. The recovery of more than 80%, the lowest limit of detectability of 0.0212 ng, the lowest concentrations of detectability of 0.00265 mg/kg (in flower) and 0.001325 mg/kg (in soil) were obtained using this method.

**Key words:** Honeysuckle; Imidacloprid; Residue; HPLC

金银花具有清热解毒、凉散风热之功效, 是常用的中药<sup>[1]</sup>。在金银花生产管理中, 常用吡虫啉防治蚜虫。由于金银花加工过程简单, 周期短, 烘干后即

作药用, 吡虫啉在金银花药中的残留对人身健康造成危害的可能性较大, 因此, 加强吡虫啉残留的检测, 制定该农药在金银花上的安全使用标准是十分

收稿日期: 2005-09-28

基金项目: 国家科技攻关计划(2001BA701A 58-01)

作者简介: 刘清浩(1979-), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要研究方向: 应用化学。

通讯作者: 刘红彦(1964-), 男, 河南嵩县人, 研究员, 博士, 主要从事中药材规范化种植及植物病理学研究。

E-mail: liuhy1219@163.com.

必要的。吡虫啉(imidacloprid)是一种新开发的吡啶类杀虫剂,具有高效、低毒、广谱、内吸、残效期长等特点<sup>[2]</sup>。关于吡虫啉在金银花中的残留测定方法,国内外尚未见报道,为此进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

甲醇、二氯甲烷、石油醚(b. p. 60 ~ 90 °C)、丙酮,均为 A. R. 级,所用溶剂全部经过全玻璃蒸馏装置重蒸馏。

氯化钠、无水硫酸钠、盐酸、经酸性处理过的活性炭<sup>[3]</sup>、装柱子用的无水硫酸钠(700 °C灼烧 5 h),均为 A. R. 级;蒸馏水脱活的弗罗里硅土:60 ~ 100 目,650 °C灼烧 5 h,用前于 130 °C烘 5 h,在干燥器中冷却至室温,加 5% 水脱活,备用;5% 氯化钠水溶液:称取 50 g 分析纯 NaCl,蒸馏水溶解,并定容到 1 000 ml;1 mol/L 的 HCl 溶液:量取 83.3 ml 的浓 HCl,用蒸馏水稀释,并定容到 1 000 ml。

色谱纯乙腈,二次蒸馏水,标样:吡虫啉标准品(99.8%,由国家标准物质研究中心提供)。

样品:试验用金银花、土壤样品取自河南省封丘金银花田。

### 1.2 标准溶液的配制

用电子天平(精确至 0.0001 g)称取约 0.0106 g 的吡虫啉标准品,用甲醇溶解并定容至 100 ml,则所配母液浓度为 106 mg/L,放于冰箱中保存。并用甲醇将上述母液稀释成 0.106, 0.53, 1.06, 2.12, 5.3, 10.6 mg/L 系列浓度的标准液,制作标准曲线。

### 1.3 仪器设备

美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配 G1315B DAD 检测器,Agilent 化学工作站;色谱柱:美国 HP ZORBAX SB-C18 柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm);净化柱:选用内径 1 cm,长 30 cm 的净化柱,在净化柱内自下而上依次加入无水硫酸钠 3 ~ 4 cm、活性炭·弗罗里硅土(1:4)1 g,上端再加入 3 ~ 4 cm 的无水硫酸钠。

### 1.4 样品的提取和净化

1.4.1 提取 准确称取粉碎的金银花(过 60 目筛)5.0 g 或土壤 10.0 g(过 40 目筛),分别置于 250 ml 具塞三角瓶中,加入 3 ml 的 1 mol/L HCl,再用 80 ml 甲醇浸泡过夜。超声提取 60 min,真空抽滤,滤渣再用 50 ml 甲醇、20 ml 蒸馏水超声提取 30 min,并进行抽滤。合并 2 次的滤液。

1.4.2 净化 (1)液-液分配<sup>[4,5]</sup>:将 2 次滤液转

移至 500 ml 分液漏斗中,加入 100 ml 5% NaCl 水溶液混匀,再加入 100 ml 石油醚,振荡 2 min,静止分层。下层水相放入另一分液漏斗中,石油醚液用 50 ml 5% NaCl 水溶液反萃取 1 次,弃去石油醚相,合并水溶液。在水溶液中加入 40 ml、40 ml、20 ml 二氯甲烷分 3 次萃取,合并萃取液,经无水硫酸钠过滤,在旋转蒸发器上(40 °C)减压浓缩至干。土壤样品用 5 ml 色谱纯甲醇定容,过 0.45 μm 的滤膜,上液相测定。

(2)柱层析:用 20 ml 甲醇湿润净化柱,再用 30 ml 甲醇将上述金银花提取液冲入柱内,弃去甲醇,用丙酮:甲醇(40:60)120 ml 洗脱样品,用 250 ml 茄形瓶收集。在旋转蒸发器上(35 °C)将溶剂蒸至近干,待其自然蒸发干后,用 5 ml 色谱纯甲醇定容,过 0.45 μm 的滤膜,上液相测定。

### 1.5 液相色谱条件

柱温:室温;检测波长:270 nm;流动相:V(乙腈):V(水)=30:70(流动相经过 0.45 μm 的微孔滤膜过滤和超声波脱气处理);流速:0.8 ml/min;进样量:8 μl;在上述条件下测得吡虫啉的保留时间约为 4.2 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准工作曲线

分别取系列浓度 0.106, 0.53, 1.06, 2.12, 5.3, 10.6 mg/L 吡虫啉标准溶液,进样测定。以峰面积为纵坐标,以进样量为横坐标绘制标准曲线。吡虫啉标准曲线的回归方程: $y = 5.5917x + 0.4062$ ,  $r = 0.99985$ (图 1)。

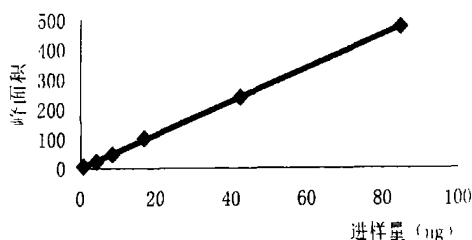


图 1 吡虫啉标准曲线

### 2.2 检测波长的确定

通过二极管阵列检测器的光谱扫描功能,进行波长扫描,吡虫啉在 270 nm 处有最大吸收,见图 2,因此,选择 270 nm 作为检测波长<sup>[9]</sup>。

### 2.3 色谱条件的选择

吡虫啉为一种极性较强的农药,选用反相液相色谱进行测定,采用美国 Agilent 的 HP ZORBAX

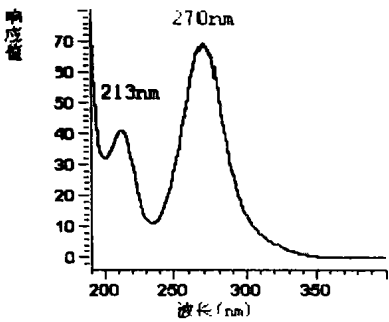


图 2 吡虫啉紫外光谱图

SB-C18 柱(4.6 mm×150 mm 5 μm)。金银花提取液中含有的成分复杂,当选用流动相甲醇和水时,无论如何调节流动相的比例与流速,都不能将吡虫啉与杂质分开。当选用体积比为 7:3 水和乙腈作流动相,流速为 0.8 ml/min 时,样品中的吡虫啉与其他干扰物质分离的效果非常好,增加乙腈的含量或加大流速,吡虫啉保留时间变小不能与杂质完全分开。在本试验条件下,吡虫啉标准品及金银花、土壤样品的液相色谱分离情况见图 3~7。

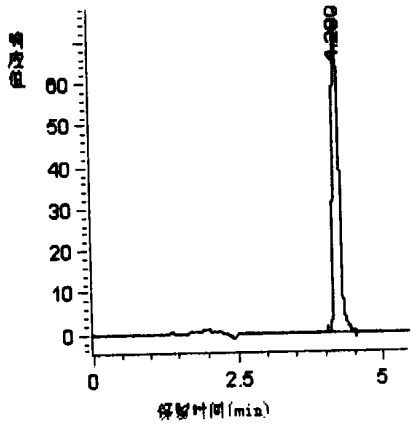


图 3 吡虫啉标液 10.6 mg/L 液相色谱图

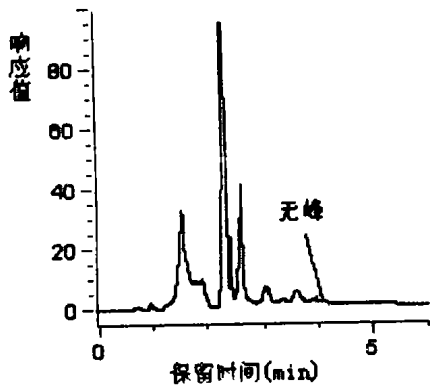


图 4 花蕾空白样液相色谱图

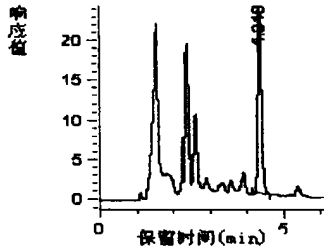


图 5 花蕾样品液相色谱图

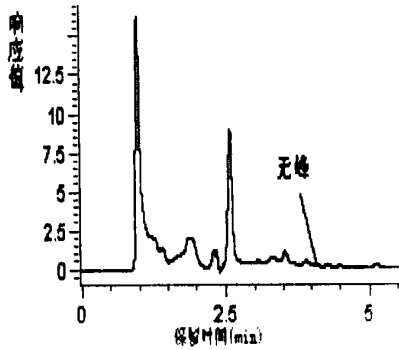


图 6 土壤空白样液相色谱图

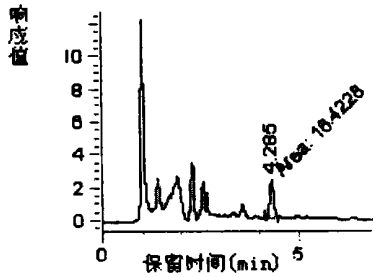


图 7 土壤样品液相色谱图

2.4 回收率及最低检出限测定

在空白样品中分别加入相当于测试样品中含吡虫啉 0.1, 0.5, 5 mg/kg 的标准溶液,按上述提取、净化、测定操作程序进行。平均回收率及变异系数(CV)见表 1。

表 1 样品在不同吡虫啉添加浓度下的回收率

添加浓度 (mg/kg)	花蕾(%)		土壤(%)	
	回收率	CV	回收率	CV
0.1	82.5	8.88	80.9	14.94
0.5	84.6	18.15	81.4	9.71
5.0	83.8	8.96	81.2	7.74

将标准溶液 0.106 mg/L 稀释成一系列浓度,以 2 倍的噪声作为方法最低检出限,(下转第 63 页)

3) 初步判断, 从马桑中分离得到的化合物, 氯仿相的主要活性成分为三萜类, 水相为倍半萜类、乙酸乙酯相为黄酮类, 这些分离得到的化合物将是下一步活性跟踪的重点。

参考文献:

[ 1 ] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第二册) [ M ]. 北京: 科学出版社, 1985.

[ 2 ] 尉芹, 马希汉, 苏印泉. 亟待开发的马桑资源[ J ]. 陕西林业科技, 1995(4): 36—38.

[ 3 ] 马希汉, 郭新荣, 李孟楼. 马桑籽提取物对黑肩毛胸榆叶甲取食及生殖的研究[ J ]. 西北林学院学报, 1995, 10(1): 64—67.

[ 4 ] 李孟楼, 郭新荣, 谢恩魁, 等. 马桑毒素提取物对几种蚜虫的毒力试验[ J ]. 西北林学院学报, 1996, 11(4): 55—59.

[ 5 ] 李孟楼, 郭新荣, 唐光辉, 等. 马桑毒素杀虫机理研究进展[ J ]. 西北农业学报, 1998, 7(5): 30—32.

[ 6 ] 李孟楼, 郭新荣, 唐光辉. 侧柏毒蛾幼虫酯酶对马桑毒素及 4 种杀虫剂的应激性反应[ J ]. 西北农业学报, 2000, 9(3): 23—27.

[ 7 ] 李孟楼, 郭新荣, 庄世宏, 等. 马桑毒素致毒后试虫酯酶同工酶变化的时序分析[ J ]. 西北林学院学报, 2000, 15(4): 57—61.

[ 8 ] 李孟楼, 庄世宏, 宗娜. 马桑毒素 B 对粘虫几种生理生化指标的影响[ J ]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(6): 54—58.

[ 9 ] 陈海珊, 赵肃清, 刘 滨, 等. 八种植物提取物对蔬菜害虫的室内毒力研究[ J ]. 广西植物, 2003, 23(5): 457—460.

[ 10 ] 彭跃峰. 10 种植物乙醇提取物对小菜蛾和菜粉蝶幼虫拒食活性的研究[ J ]. 湖北农学院学报, 2004, 24(2): 90—93.

(上接第 59 页) 以花蕾 5 g 或土壤 10 g 计算出最低检出浓度<sup>[7]</sup>。最低检出量为 0.0212 ng, 最低检出浓度: 金银花花蕾为 0.00265 mg/kg, 土壤为 0.001325 mg/kg。

3 讨论

吡虫啉属极性农药, 易溶于强极性溶剂, 在样品提取过程中, 加入 3 ml、pH 为 1 的盐酸溶液, 有助于样品中吡虫啉的提取, 大大提高回收率。金银花提取液极易产生乳化现象, 先加入 5%NaCl 溶液, 再加二氯甲烷来萃取, 能更好地防止乳化现象。样品提取液中的水经无水硫酸钠干燥后, 不影响测定结果, 同时可减少农药的损失。

农残分析中的净化柱主要为氟罗里硅土柱, 而用氧化铝和硅胶柱的较少。选择净化柱填料时, 由于硅藻土及活性炭在去除杂质、消除干扰方面效果较差; 而中性氧化铝活性太强, 吸附作用太大, 待测组分无法完全洗脱; 降低氧化铝活性时, 色素容易洗脱而无法达到净化的目的<sup>[8]</sup>。考虑到待测组分与干扰组分的分离以及待测组分在净化过程中的回收率, 选用氟罗里硅土/活性炭混合填充为宜。用此法可有效地去除金银花样品中的绿色色素, 避免对色谱柱造成污染。

本试验建立的金银花中吡虫啉残留量测定方

法, 添加回收率在 80%以上, 符合农药残留分析要求, 适用于金银花中吡虫啉残留的检测和金银花质量的评价。

参考文献:

[ 1 ] 杨红娟, 李发美. 几种金银花的模式识别[ J ]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(1): 20—22.

[ 2 ] 花日茂, 汤桂兰, 李学德, 等. 几种农药在烟草上的消解动态与复合效应[ J ]. 中国环境科学, 2003, 23(4): 440—443.

[ 3 ] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. 食品分析大全(第 1 卷)[ M ]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 15—16.

[ 4 ] 吴俐勤, 吴声敢. 高效液相色谱测定吡虫啉的残留研究[ J ]. 现代科学仪器, 2003(1): 52—55.

[ 5 ] 赵莉, 姜忠涛. 吡虫啉在土壤萝卜中的残留分析方法[ J ]. 农药科学与管理, 2003, 24(8): 14—16.

[ 6 ] 戴华, 黄志强, 陈新焕. 土壤中吡虫啉残留量的 HPLC 测定方法[ J ]. 国外分析仪器, 2000(1): 60—63.

[ 7 ] 李月茹, 刘墨祥, 张春红, 等. 连翘等 3 种中药材中有机氯农药残留量研究[ J ]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(1): 72—76.

[ 8 ] 李云春, 易军, 弓振斌, 等. 反相高效液相色谱法测定茶叶中氯氟菊酯和氰戊菊酯农药残留[ J ]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 43(1): 78—82.