

· 中药农业 ·

金银花中烯啶虫胺测定方法的研究[△]侯少岩^{1,2}, 李嘉欣², 薛健^{2*}, 王鹏思², 武晓丽², 袁亚莉^{1*}

(1. 南华大学 化学化工学院, 湖南 衡阳 421000;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 建立气相色谱法测定金银花中烯啶虫胺的方法。方法: 对比不同溶剂的提取率以及固相萃取材料对金银花样品中干扰基质的净化效果, 甲醇洗脱, 采用 DB-1701 石英毛细管柱, GC-ECD 测定金银花中的烯啶虫胺。结果: 该方法在 0.005 ~ 0.5 mg·L⁻¹ 范围内线性良好 ($r=0.999\ 3$); 添加 0.02、0.1、0.2 mg·kg⁻¹ 时的回收率在 79.14% ~ 98.37% 之间, RSD 在 3.66% ~ 4.39% 之间; 方法的检出限为 0.006 mg·kg⁻¹。结论: 建立的检测方法灵敏度高, 准确度高, 线性好, 符合农药残留分析要求, 可用于金银花中烯啶虫胺的测定。

[关键词] 金银花; 烯啶虫胺; 气相色谱法; 残留测定

Study on the Determination of Nitenpyram in *Lonicera Japonicae* FlosHOU Shao-yan^{1,2}, LI Jia-xin², XUE Jian^{2*}, WANG Peng-si², WU Xiao-li², YUAN Ya-li^{1*}

(1. University of South China, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Hengyang 421000, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Object:** To establish a gas chromatographic method for the determination of nitenpyram in *Lonicerae Japonicae* Flos. **Methods:** The extraction rate of different solvents and the purification effect of solid phase extraction material on the interference matrix in the sample were eluted with methanol. The DB-1701 quartz capillary column and GC-ECD were used to determine nitenpyram in *Lonicerae Japonicae* Flos. **Results:** The method showed a good linearity ($r=0.999\ 3$) in the range of 0.005 ~ 0.5 mg·L⁻¹. The recoveries were 79.14% ~ 98.37% with addition of 0.05, 0.1 and 0.2 mg·kg⁻¹ respectively, and with RSDs of 3.66% ~ 4.39%. The detection limit of the method is 0.006 mg·kg⁻¹. **Conclusion:** The established detection method has the advantages of high sensitivity, high accuracy and good linearity, in line with the requirements of pesticide residue analysis, and can be used for the determination of nitenpyram residues in *Lonicerae Japonicae* Flos.

[Key words] *Lonicera Japonicae* Flos.; nitenpyram; gas chromatography; residue determination

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180112001

金银花 *Lonicera Japonicae* Flos. 自古被誉为清热解毒的良药, 其性甘寒气芳香, 甘寒清热而不伤胃, 芳香透达又可祛邪^[1]。种植过程中常伴有多种病虫害, 尤以蚜虫最为严重^[2]。经调研发现, 烟碱类农药对蚜虫有优良的杀灭作用, 其中烯啶虫胺(Nitenpyram)为常用除虫剂^[3], 金银花生产中也有使用。研究表明, 新烟碱类杀虫剂对传粉昆虫具有严重危

害, 威胁蜜蜂的种群, 造成依靠蜜蜂传粉的作物产量降低, 欧盟现已经禁用包括吡虫啉在内的 3 种新烟碱类杀虫剂^[4]。烯啶虫胺在金银花上的使用, 可能在药材上残留, 对环境及人体健康造成危害^[5]。为准确评估其残留风险, 需要对药材残留情况进行测定。目前虽然已有文献报道烯啶虫胺的测定方法^[6-8], 但未发现在金银花中建立测定方法的相关报

[△] [基金项目] 国家食品药品监督管理总局项目(ZG2016-2-03); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2017-12M-3-013)

* [通信作者] 袁亚莉, 教授, 研究方向: 生物样品及水质中有害成分分析; Tel: (0734)8825258, E-mail: yuanyali6439@126.com
薛健, 研究员, 研究方向: 中药成分分析及农药残留重金属研究; Tel: (010)57833097, E-mail: xuejian200@sina.com

道, 本研究金银花中烯啶虫胺残留量的测定方法。

1 材料

1.1 供试药材

本实验所用样品由田间获得, 经中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾, 即金银花。

1.2 试剂

乙腈、丙酮、甲醇(分析纯, 北京化工厂); 丙酮(色谱纯, 美国 Mreda 公司); 烯啶虫胺标准品(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 农业部环境保护科研监测所, 批号: 20170428); 中性氧化铝(200~300目, 国药集团化学试剂有限公司, 550 $^{\circ}\text{C}$ 中活化 5 h, 贮存于干燥器中, 过夜冷却。活化后的中性氧化铝中小心加入 5% 蒸馏水, 充分摇匀, 放置过夜); 弗罗里硅土(60~100目, 天津市光复精细化工研究所, 650 $^{\circ}\text{C}$ 中活化 5 h, 贮存于干燥器中, 过夜冷却。活化后的弗罗里硅土中小心加入 5% 蒸馏水, 充分摇匀, 放置过夜)。

1.3 仪器

Agilent 6890N 气相色谱仪, 电子捕获检测器, 美国安捷伦公司; SB-2500DT 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; LABOROTA4000/4 旋转蒸发器, 德国 Heidolph 公司; TDZ5-WS 低速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

2 方法

2.1 气相色谱条件

安捷伦 DB-1701 石英毛细管柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm); 电子捕获检测器; 载气为高纯氮气(>99.999%); 进样口温度 260 $^{\circ}\text{C}$, 不分流进样; 检测器温度 320 $^{\circ}\text{C}$; 升温程序: 初始温度 110 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 20 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度升温至 240 $^{\circ}\text{C}$, 保持 15 min; 恒流模式, 流速 1 mL $\cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: 1 μL ; 外标法定量。在该色谱条件下, 烯啶虫胺典型色谱图如图 1A 所示, 保留时间为 7.68 min。

2.2 标准品溶液的配制

取烯啶虫胺标准溶液(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL 于 10 mL 茶色容量瓶中, 加色谱丙酮至刻度, 得到 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液作为母液保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。取该

母液 1 mL, 稀释 10 倍得到 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。

2.3 样品提取及净化方法研究

2.3.1 样品的提取 本实验采用简单、经典的超声提取法对样品进行提取。对烯啶虫胺溶解度较好的溶剂有丙酮和乙腈, 对这两种溶剂进行考察, 通过比较提取率和对金银花基质的提取情况择优选择溶剂。

选择丙酮、乙腈分别对样品进行提取。精密称取金银花粉样品 2.0 g(过《中华人民共和国药典》2号筛)于 50 mL 具塞离心管中, 加入提取溶剂 30 mL 超声提取 15 min, 静置, 过滤。样品残渣再加入提取溶剂 20 mL 超声提取 15 min, 重复 2 次, 静置, 过滤。合并所有滤液。40~45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋蒸浓缩至近干, 待净化。

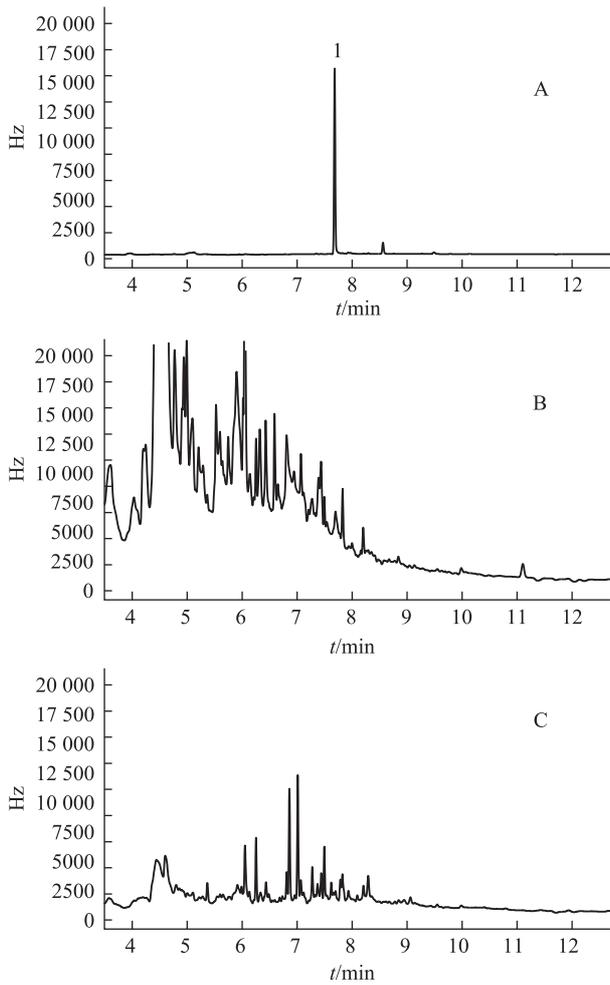
2.3.2 样品的净化 样品提取后在烯啶虫胺出峰位置存在干扰峰, 为了将农药与样品的杂质分离, 降低样品对仪器的损害, 需要对样品进行净化。与其他方法相比, 固相萃取操作简便、选择性高, 故采用固相萃取法。固相萃取净化柱有商品柱和自组装柱, 相同填料时自组装柱成本较低。金银花基质复杂, 且含有较多叶绿素, 中性氧化铝和弗罗里硅土对色素等复杂基质有较好的吸附, 故通过比较中性氧化铝与弗罗里硅土的净化效果, 择优选择。

分别填装中性氧化铝、弗罗里硅土作为净化填料。玻璃柱(12 mm \times 250 mm)中依次加入 2 g 无水硫酸钠、5 g 填料、2 g 无水硫酸钠。轻敲玻璃柱身使其装填尽量均匀、紧密, 保持表面水平, 用 20 mL 甲醇预淋玻璃柱内的填料, 弃去流出液。待净化样品用少量甲醇转移至净化柱内, 用 25 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液于圆底烧瓶内, 于 40~45 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至近干, 冷却后用色谱丙酮定容至 2 mL, 4000 r $\cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液注入气相色谱仪, 检测。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂的选择

由表 1 可知, 丙酮、乙腈对 0.5 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ 添加的金银花样品中烯啶虫胺的提取率分别为 86.90%、95.40%; 根据图 1 中丙酮和乙腈对金银花基质的提取效果可知, 乙腈提取的金银花基质色谱图中的杂峰明显少于丙酮, 故选择乙腈作为本实验的提取溶剂。



注：1. 烯啶虫胺；A. 烯啶虫胺标准品溶液；B. 丙酮提取空白样品溶液；C. 乙腈提取空白样品溶液。

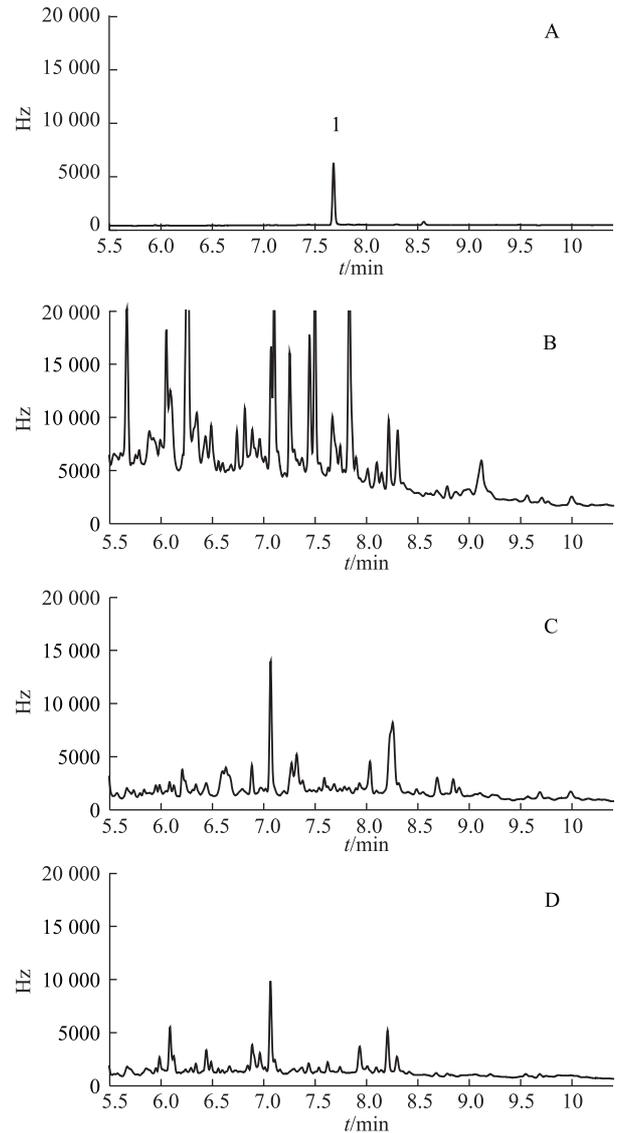
图1 不同溶剂提取空白金银花基质溶液的GC图

表1 不同溶剂对金银花中烯啶虫胺的提取率

烯啶虫胺添加浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	提取溶剂	提取率 (%)	平均提取率 (%)	RSD (%)
0.5	丙酮	88.37	86.90	2.78
		84.10		
		88.21		
	乙腈	91.28	95.40	3.79
		97.99		
		96.94		

3.2 净化方法的选择

净化效果如图2所示，D和B相比，经中性氧化铝净化后，烯啶虫胺出峰位置干扰峰消失，基线明显降低；D与C对比，杂质峰较低，基线也更低，即中性氧化铝填充柱的净化效果更佳。



注：1. 烯啶虫胺；A. 烯啶虫胺标准溶液；B. 未净化空白样品溶液；C. 经弗罗里硅土净化后的空白样品溶液；D. 经中性氧化铝净化后的空白样品溶液。

图2 不同填料对金银花基质净化效果比较

3.3 金银花中烯啶虫胺测定的方法学考察

3.3.1 线性范围 将母液稀释成质量浓度分别为5、10、20、100、200、500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列的对照品溶液，分别进样1 μL ，以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，线性拟合，得回归方程为 $Y = 35.729X + 239.98$ ，相关系数 $r = 0.9993$ 。说明在5~500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 烯啶虫胺浓度与峰面积线性关系良好。

3.3.2 仪器的精密度 取0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液重复进样6次，连续3d进行GC-ECD测定，得到烯啶虫胺含量的精密度。结果显示，日内精密度以RSD计为1.08%，日间精密度为2.76%，符合测定要求。

3.3.3 方法的检出限与定量限 测定添加回收样品溶液谱图烯啶虫胺色谱峰的信噪比,以信噪比(S/N)3为方法的检出限,以信噪比(S/N)10为方法的定量限。结果显示,方法对烯啶虫胺的检出限(LOD)为 $0.006 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,定量限(LOQ)为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

3.3.4 方法的准确度和精密度 精密称取空白样品2.0 g,分别精密添加烯啶虫胺标准品溶液得到 0.02 、 0.1 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 烯啶虫胺添加样品,按照所建立的方法进行提取、净化,分别重复3次,测得峰面积并计算含量,得到各添加浓度回收率及精密度(见表2)。3个添加浓度的回收率在79.14%~98.37%之间,精密度(以RSD计)在3.66%~4.39%之间,符合农残规定(回收率在70%~110%, $\text{RSD} < 15\%$)^[11]及本实验要求。

表2 金银花中烯啶虫胺添加回收率及精密度($n=3$)

添加水平/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.02	79.76	79.14	3.69
	75.96		
	81.70		
0.1	95.86	98.37	4.39
	95.89		
	103.36		
0.2	88.20	86.39	3.66
	82.74		
	88.24		

3.4 样品测定

为验证所建立方法的适用性,按照本实验确定的方法对收集的施药后的金银花样品进行测定,结果见表3。

表3 金银花样品中烯啶虫胺残留量

施药后 时间/d	残留量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$			
	1	2	3	平均值
0.1	0.286	0.281	0.278	0.282
1	0.122	0.129	0.132	0.128
2	0.047	0.056	0.051	0.051
3	0.037	0.031	0.037	0.035
4	<LOQ	<LOQ	0.023	<LOQ
5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
7	ND	ND	ND	ND

注:ND指残留量低于检出限。

4 讨论

目前未有金银花中烯啶虫胺的最大残留限量标

准,我国国家标准GB 2763-2016食品中农药最大残留限量^[12]中要求在糙米中最大残留限量(MRL)为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,稻谷中的MRL为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,蔬菜的MRL为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。若以最严格的糙米中的最大残留限量 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为参考标准,本方法的检出限远低于食品安全国家标准对烯啶虫胺的限量标准。

本研究建立了GC-ECD测定金银花中烯啶虫胺残留量的分析方法,灵敏度较高,准确度和精密度均能达到分析要求。此外,本方法还具有操作简便、成本低、线性好的特点,同时,运用该方法对施用烯啶虫胺的金银花样品进行测定,验证了检测方法的适用性。

参考文献

- [1] 韩君. 清热解毒金银花[J]. 长寿, 2016(4):9.
- [2] 王玉洁,薛健,顾炎,等. 溴氰菊酯残留测定方法及其在金银花中残留动态研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8):1435-1438.
- [3] 田桂琴,黄永红. 11%阿维·烯啶虫胺乳油防治棉叶螨和蚜虫实验[J]. 农村科技, 2012(1):29-30.
- [4] 袁晓龙. 新烟碱类杀虫剂会降低熊蜂的传粉效率[J]. 中国蜂业, 2016, 67(3):63-63.
- [5] 王广驰. 烯啶虫胺和啶虫脒对蚯蚓的氧化胁迫及基因毒性[D]. 泰安:山东农业大学, 2015.
- [6] 赵方方,林靖凌,谢德芳,等. 气相色谱法测定农田土壤和水中烯啶虫胺残留[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2014, 42(10):57-62.
- [7] 刘飞,陈永煊. 超高效液相色谱-串联质谱法测定黄瓜中烯啶虫胺残留[J]. 福建轻纺, 2011(11):40-42.
- [8] 黄勇平,潘晓威, HUANG Yong-ping, 等. 气相色谱法测定豇豆和土壤中烯啶虫胺的残留[J]. 现代农业科技, 2015(16):125-126.
- [9] 杨金川,胡德禹,张钰萍,等. 烯啶虫胺在水稻和稻田环境中的残留及消解动态[J]. 农药学报, 2012, 14(5):521-526.
- [10] 张贵群,聂思桥,龙丽萍,等. 气相色谱法分析甘蓝及其土壤中的烯啶虫胺残留[J]. 色谱, 2010, 28(11):1103-1106.
- [11] 中华人民共和国农业部. NY/T 788-2004 农药残留试验准则[S]. 北京:中国农业出版社, 2004.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中华人民共和国农业部, 国家食品药品监督管理总局. GB 2763-2016 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]. 北京:中国标准出版社, 2016.

(收稿日期 2018-01-12)