

分散液液微萃取-高效液相色谱法 测定金银花中拟除虫菊酯类农药残留

周卿, 周旭美

(遵义医学院药学院药物分析教研室, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的:建立分散液液微萃取-高效液相色谱法测定金银花中氟氰戊菊酯、氰戊菊酯、高效氟氯氰菊酯、氯菊酯、联苯菊酯 5 种拟除虫菊酯类农药残留的方法。方法:以乙腈为分散剂,三氯甲烷为萃取剂富集金银花中 5 种菊酯类农药,并优化影响富集效率的因素;采用 HPLC 测定,Agilent ZORBAX XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水梯度洗脱,检测波长 230 nm,流速 1 mL·min⁻¹。结果:氟氰戊菊酯、氰戊菊酯、高效氟氯氰菊酯、氯菊酯、联苯菊酯在 0.05 ~ 5.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好($r > 0.999 0$),富集倍数在 18.6 ~ 29.7,高、中、低 3 种浓度平均加样回收率在 72.1% ~ 110.4%。结论:该方法操作简便、准确性好,灵敏度高,可满足菊酯类农药残留分析的要求。

[关键词] 金银花; 菊酯类农药; 分散液液微萃取; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0070-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200070

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140829.1356.001.html>

[网络出版时间] 2014-08-29 13:56

Determination of Pyrethroid Pesticide Residues in *Lonicerae Japonicae* Flos by Disperse Liquid-liquid Microextraction Coupled with HPLC

ZHOU Qing, ZHOU Xu-mei

[收稿日期] 20131223(003)

[基金项目] 贵州省中医药管理局项目(QZYY2012-D406)

[第一作者] 周卿,副教授,硕士,从事药物分析新技术的研究,E-mail: zhouqing_zmc@sina.cn

- [5] Wu B, He S, Wu X D, et al. Bioactive terpenes from the roots of *Chloranthus henryi* Hemsl [J]. *Planta med*, 2006, 72(14): 1334.
- [6] Kawabata J, Fukushi Y, Tahara S, et al. Structures of novel sesquiterpene alcohols from *Chloranthus japonicus* [J]. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(3): 713.
- [7] Tahara S, Fukushi Y, Kawabata J, et al. Lindenanolides in the root of *Chloranthus japonicus* [J]. *Agric Biol Chem*, 1981, 45(6): 1511.
- [8] Masaaki U, Yutaka K, Genjiro K, et al. Six sesquiterpenes from *Chloranthus japonicus* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(1): 92.
- [9] 李松林, 崔熙, 乔传卓, 等. 五种金粟兰属植物挥发油成分及其抗真菌活性研究[J]. *中药材*, 1992, 15(7): 28.
- [10] 江泽荣. 我国金粟兰药用植物的研究进展[J]. *沈阳药学院学报*, 1988, 5(1): 75.
- [11] 刘启, 韩定献, 苏明武, 等. 宽叶金粟兰收缩子宫成分的研究[J]. *中国医院药学报杂志*, 1994, 14(11): 509.
- [12] 李旭, 刘停. 杜仲叶总黄酮微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(4): 243.
- [13] 成兰英, 梁书凤, 张治强. DPPH 法研究麦冬提取物抗氧化活性[J]. *精细化工*, 2012, 29(9): 870.
- [14] 邢懿, 梁波, 汪璐, 等. 黄山杜鹃总黄酮的体外抗氧化活性研究[J]. *华西药学杂志*, 2013, 28(1): 53.
- [15] 周劝娥, 田呈瑞, 关为, 等. 陕西苦菜叶总黄酮的提取及抗氧化活性的测定[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(9): 97.
- [16] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 813.

[责任编辑 顾雪竹]

(Teaching and Research Section of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy,
Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China)

[Abstract] Objective: This study was aimed to establish disperse liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography (DLLME-HPLC) method for determination of five pyrethroid pesticides (flucythrinate, fenvalerate, lambda-cyhalothrin, permethrin, bifenthrin) in *Lonicerae Japonicae Flos*. **Method:** The five pyrethroid pesticides in *Lonicerae Japonicae Flos* were extracted by trichloromethane, with acetonitrile as dispersant, then analysed by HPLC. Some important parameters that influenced the extraction efficiency were optimized. The five pesticides were separated by an Agilent ZORBAX XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column in the wavelength at 230 nm. The mobile phase was acetonitrile-H₂O with gradient elution and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. **Result:** Flucythrinate, fenvalerate, lambda-cyhalothrin, permethrin and bifenthrin showed good linear relation within range of 0.05-5.0 mg · L⁻¹ ($r > 0.999 0$). The enrichment factors ranged from 18.6 to 29.7. The average recovery of high, medium and low concentration ranged from 72.1% to 110.4%. **Conclusion:** The method is accurate and sensitive, simple and fast, and can meet the requirement of pyrethroid pesticides residue analysis in *Lonicerae Japonicae Flos*.

[Key words] *Lonicerae Japonicae Flos*; pyrethroid pesticides; disperse liquid-liquid microextraction; HPLC

拟除虫菊酯类农药是一类人工合成的仿生杀虫剂,近来研究表明此类农药有蓄积性,长期接触即使是低剂量也会引起慢性疾病,有些品种甚至有致癌、致畸的作用,广泛应用于中药材的栽培过程中^[1]。金银花自古被誉为清热解毒的良药,既能宣散风热,又善清解血毒,是药食两用的道地药材^[2-3]。由于金银花在种植过程中易受病虫害^[4],农户的不合理用药会造成农药残留,严重影响药材的质量和安全性。建立高效、快速的农药残留检测技术是其质量保证的基础。分散液液微萃取是一种新型、绿色的样品前处理方法,具有样品使用量少,有机溶剂使用量少等特点,目前已在环境监测、食品及生物医药等领域得到应用^[5-10]。本文采用分散液液微萃取技术萃取浓缩金银花中5种拟除虫菊酯类农药,采用HPLC测定,为金银花的质量控制提供实验依据。

1 仪器与试剂

1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),TGL16M型离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司),DCY-12S型氮气吹干仪(青岛海科仪器有限公司),XW-80A型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),BT125D型1/10万电子天平(赛多利斯北京有限公司)。

高效氟氯氰菊酯、氰戊菊酯、氯菊酯、联苯菊酯、氟氰戊菊酯对照品(批号BW7099, BW7030, BW7041, BW7090, BW3584)均购自中国计量科学研

究院,甲醇和乙腈为色谱纯(百灵威化学有限公司),三氯甲烷为分析纯,金银花样品采自贵州遵义绥阳县小关乡经遵义医学院药剂科杨建文副教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾,实验用水为乐百氏纯净水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 分别准确称取适量氟氰戊菊酯、高效氟氯氰菊酯、氰戊菊酯、氯菊酯、联苯菊酯对照品于10 mL量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,分别制得为500 mg · L⁻¹的对照品溶液,置于4 °C冰箱中保存,待用。

2.2 样品的预处理

2.2.1 样品的提取 取金银花样品适量置于粉碎机中粉碎,过30目筛,准确称取1.0 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,加入乙腈20 mL,称定质量,超声30 min后,放冷,加乙腈补足减失的质量,待萃取。

2.2.2 微萃取过程 精密吸取100 μL样品溶液,置于尖底玻璃离心管中,加入2% NaCl溶液900 μL混匀,快速注入乙腈-三氯甲烷(200 μL:20 μL)萃取剂,涡旋振荡3 min,静置2 min,3 500 r · min⁻¹离心5 min,弃上层溶液,下层氮气吹干,用乙腈50 μL复溶,取20 μL进样分析。

2.3 色谱条件 采用Agilent Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~21 min, 80%~90% A),检测波长

230 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取 2.1 项下对照品溶液适量, 用乙腈稀释, 配制一系列质量浓度为 0.05 ~ 5.0 mg · L⁻¹ 的混合对照品溶液, 在上述色谱条件下分别进样分析, 记录色谱峰面积, 以对照品溶液浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得氟氰戊菊酯回归方程 $Y = 751.83X - 40.911$, $r = 0.999 0$; 氰戊菊酯回归方程 $Y = 1 208.9X + 7.36$, $r = 0.999 1$; 高效氟氯氰菊酯回归方程 $Y = 1 380.1X + 118.72$, $r = 0.999 9$; 氯菊酯回归方程 $Y = 1 118.0X + 127.39$, $r = 0.999 0$; 联苯菊酯回归方程 $Y = 1 018.7X + 80.51$, $r = 0.999 4$ 。结果表明, 氟氰戊菊酯、氰戊菊酯、高效氟氯氰菊酯、氯菊酯、联苯菊酯在 0.05 ~ 5.0 mg · L⁻¹ 线性关系良好, 最低检测限按 $S/N = 3$ 测定分别为 2, 1, 1, 1, 1 μg · L⁻¹, 富集倍数按 $EF = \frac{C_{sed}}{C_0}$ (C_{sed} 待测物在沉积相中的浓度, C_0 待测物在样品中的原始浓度) 计算, 分别为 22.1, 18.6, 29.7, 24.9, 22.9 倍。

2.5 精密度试验 精密吸取 0.5 mg · L⁻¹ 的对照品混合溶液, 连续测定 5 次, 以峰面积计算氟氰戊菊酯、氰戊菊酯、高效氟氯氰菊酯、氯菊酯和联苯菊酯的 RSD, 分别为 3.54%, 5.37%, 4.02%, 4.04%, 6.19%, 结果表明方法精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称定同一金银花样品, 按照 2.2 项下方法制备样品溶液, 在上述色谱条件下测定, 计算各农药含量的 RSD 分别为 3.83%, 5.47%, 4.66%, 5.03%, 6.26%, 结果表明重复性良好。

2.7 加样回收率试验 称取粉碎后金银花干品 9 份, 每份 1.0 g, 分别精密加入氟氰戊菊酯、氰戊菊酯、高效氟氯氰菊酯、氯菊酯和联苯菊酯对照品溶液适量, 按 2.2 项方法制成所需溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 计算回收率, 结果见表 1。

2.8 样品的测定 取遵义绥阳小关乡 5 块不同土地产金银花干品按照 2.2 项下制备, 在上述色谱条件下测定, 结果均未检测到 5 种农药, 见图 1。

3 讨论

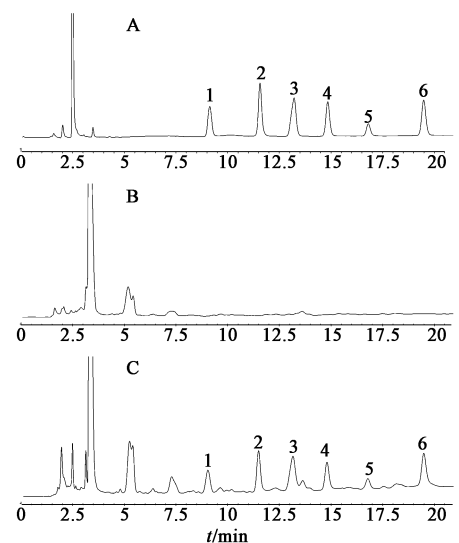
3.1 分散液液微萃取条件的优化

3.1.1 萃取剂及萃取剂体积的选择 考察了三氯甲烷、二氯甲烷、四氯化碳、1,2-二溴乙 4 种萃取剂对氟氰戊菊酯、氰戊菊酯、高效氟氯氰菊酯、氯菊酯和联苯菊酯萃取效率的影响, 结果显示, 三氯甲烷、二氯甲烷对 5 种待测物的萃取回收率较好, 但是在

表 1 金银花中农药残留的加样回收率测定

组分	加入量 /mg · L ⁻¹	平均加样 回收率/%	RSD /%
氟氰戊菊酯	0.05	79.9	4.19
	0.5	72.2	6.41
	2	90.8	1.63
氰戊菊酯	0.05	76.7	6.14
	0.5	74.8	2.95
	2	94.9	3.10
高效氟氯氰菊酯	0.05	74.9	7.17
	0.5	92.2	3.95
	2	89.0	2.88
氯菊酯	0.05	81.4	8.93
	0.5	73.6	4.47
	2	110.4	1.75
联苯菊酯	0.05	72.1	3.22
	0.5	84.6	4.16
	2	89.4	3.91

注: 样品中量均为 0 mg · L⁻¹。



A. 对照品; B. 金银花样品;

C. 金银花样品中添加 5 种拟除虫菊酯类对照品;

1. 氟氰戊菊酯; 2. 氰戊菊酯; 3. 高效氟氯氰菊酯;

4, 5. 氯菊酯; 6. 联苯菊酯

图 1 金银花样品中 5 种拟除虫菊酯类农药 HPLC

$\lambda = 230$ nm 的检测条件下, 二氯甲烷有较大杂质峰干扰, 三氯甲烷的干扰较小, 故选择三氯甲烷作为萃取剂。同时考察了当加入不同体积三氯甲烷对浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 的 5 种待测物萃取效率的影响, 见图 2, 结果显示当加入三氯甲烷体积为 20 μL 时, 对 5 种待测物的萃取回收率最高。

3.1.2 分散剂和分散剂体积的选择 分别考察了

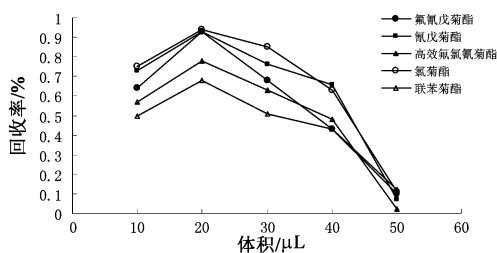


图2 萃取剂体积对回收率的影响

乙腈、甲醇、丙酮和四氢呋喃作为分散剂对5种待测物的萃取效率,结果显示,采用丙酮、四氢呋喃作为分散剂时,在上述色谱条件下对待测物测定有较大干扰,甲醇的分散效果不佳,乙腈可使溶液形成较好的三氯甲烷/乙腈/水的乳浊液体系,对5种待测物的提取回收率高且无干扰,故选择乙腈作为分散剂。并考察了乙腈体积为100,200,300,400 μL 时对质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的5种待测物萃取效率的影响,结果显示,随着乙腈体积的增大,待测物在溶液中的浓度增大,萃取回收率反而降低,所以选择乙腈的体积为200 μL 。

3.1.3 萃取时间 本实验中萃取时间是指注入分散剂与萃取剂后至离心前的时间。分别考察了涡旋振荡1,2,3,4,5 min 时对5种待测物的萃取效率,结果显示,振荡3 min 时,萃取回收率最高。经振荡混合后的两相溶液,需静置一定时间,以保证待测物分子充分迁移到萃取剂中,实验中考察了静置时间为0,1,2,3,5,7 min 时对萃取效率的影响,结果表明当平衡时间为2 min 后,萃取回收率不再有明显变化,所以选择静置时间为2 min。

3.1.4 盐效应 在体系中加入适量盐可降低待测物在水相中的溶解度,促进分层。实验中考察了在体系中加入1%~5%的NaCl,结果表明,体系中加入盐后,萃取回收率明显提高,当加入2%的NaCl时,萃取回收率最高。

3.2 提取方法的选择 参考菊酯类农药常用提取方法,采用乙腈为提取溶剂,比较了超声提取、索氏提取2种方法,其结果显示对5种待测物的提取效果基本一致,考虑操作的简便性和快捷,选择超声提取法。

3.3 色谱条件的选择 经紫外扫描5种待测物在210~230 nm 左右有最大吸收,但当采用三氯甲烷为萃取剂,检测波长为210 nm 时,在13.5 min 有一较大吸收峰,干扰氰戊菊酯的测定;而在230 nm 时,

吸收峰较弱,故选择230 nm 作为检测波长。

4 结论

本文建立了采用分散液液微萃取法,以三氯甲烷为萃取剂,乙腈为分散剂,萃取浓缩金银花干品中氟氰戊菊酯、氰戊菊酯、高效氟氯氰菊酯、氯菊酯和联苯菊酯5种拟除虫菊酯类农药残留,并采用高效液相色谱法快速测定该5种菊酯类农药,方法操作简便,有机溶剂使用量少,结果准确、可靠,可用于金银花中该5种菊酯类农药残留的测定。

[参考文献]

- [1] 王兆守,李顺鹏.拟除虫菊酯类农药微生物降解研究进展[J].土壤,2005,37(6):577.
- [2] 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,2010:205.
- [3] 宋建华.金银花解热抗炎作用的实验研究[J].重庆医学,2011,40(25):2552.
- [4] 易思荣,申明亮,黄娅,等.中药材金银花常见病虫害综合防治技术[J].亚太传统医药,2011,7(7):23.
- [5] M Rezaee, Y Assadi, M Milanihosseini, et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction [J]. J Chromatography A,2006,1116(1/2):1.
- [6] 谢红学,何丽君,吴秀玲,等.分散液液微萃取-气相色谱法测定水样中甲拌磷农药[J].分析化学,2008,3(11):1543.
- [7] D Nagaraju, Huang S D. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid liquid microextraction with gas chromatography ion trap mass spectrometry [J]. J Chromatography A,2007,1161(1/2):89.
- [8] 于秀培,冯芳,腾宝,等.分散液液微萃取-HPLC法测定藿香正气口服液液中厚朴酚与和厚朴酚含量[J].药学与临床研究,2012,20(3):264.
- [9] Wu H, Guo J B, Du L M, et al. A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar-and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, 2013, 141:182.
- [10] 张彦杰,白小红,李利华,等.分散液液微萃取快速测定中药中4种呋喃香豆素化合物[J].分析化学,2009,37(12):1805.

[责任编辑 顾雪竹]