

高效液相色谱法检测蜂蜜中氟氯苯氧菊酯的残留

吴虹¹, 余林生^{1*}, 檀华蓉², 阮祥春³, 陈杨¹, 宗超¹, 苏红晓⁴

(1. 安徽农业大学蜂业研究所, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036;

3. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 4. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要: 建立了蜂蜜中氟氯苯氧菊酯残留的高效液相色谱检测的方法。样品经正己烷-二氯甲烷(4:6, V/V)提取, 旋转蒸发进行浓缩, Oasis HLB 固相萃取柱萃取净化, 在 267 nm 波长下用紫外检测器进行检测。通过前处理条件的优化大大减少了基质的干扰, 氟氯苯氧菊酯的最低检测限达到 0.005 mg·kg⁻¹, 平均回收率在 80.8%~96.8% 之间, 变异系数为 0.6%~1.5%。该方法精密度和重现性良好, 适用于蜂蜜中氟氯苯氧菊酯残留的检测。

关键词: 氟氯苯氧菊酯; 高效液相色谱法; 蜂蜜

中图分类号: S896.1; O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2013)02-0258-04

Determination of flumethrin residues in honey by HPLC

WU Hong¹, YU Lin-sheng¹, Tan Hua-rong², RUAN Xiang-chun³, CHEN Yang¹, ZONG Chao¹, SU Hong-xiao⁴

(1. Apiculture Research Institute, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Biotechnology Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

3. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

4. School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: A method for determination of flumethrin residues in honey by using HPLC (high performance liquid chromatography) has been developed and validated. The sample was extracted from honey by the mix extractions of *n*-hexane and dichloromethane (4:6, V/V), concentrated by rotary evaporator, purified by HLB SPE cartridge, and detected at a wavelength of 267 nm. The pre-treatment conditions were optimized in order to decrease the matrix interference. The detection limit for flumethrin was 0.005 mg·kg⁻¹. The average recoveries for flumethrin were between 80.8% and 96.8%. Coefficients of variation ranged from 0.6% to 1.5%. The method has good repeatability and high sensitivity, and can be applied for the determination of flumethrin residues in the honey.

Key words: flumethrin; HPLC; honey

氟氯苯氧菊酯 (flumethrin) 属拟除虫菊酯类农药, 商品用为氟氯苯氧菊酯药条, 中文名为蜂螨清, 主要用于禽畜及蜜蜂体外寄生虫的防治, 可抑制螨虫成虫产卵和抑制卵孵化活性, 因其使用方便、效果好, 已广泛用于蜜蜂螨病^[1-2]。

氟氯苯氧菊酯对蜂蜜的污染途径主要是通过已污染的巢脾向巢脾中的蜂蜜扩散, 且巢脾使用年限长, 残留会随之增加。尤其在流蜜期曾发现蜂蜡 (为巢脾的主要成分) 样品中有残留 30、40、90 直至 130 μg·kg⁻¹, 欧洲一些国家均在蜂蜡中检测到氟氯

苯氧菊酯的残留^[3-4]。2006 年我国农业部标准 (NY/T 1243-2006) 对其规定了最高残留限量 (MRLs) 为 0.01 mg·kg⁻¹^[5]。目前, 关于蜂产品中氟氯苯氧菊酯的残留检测的研究主要是气相色谱法^[6], 此外还有超高效液相色谱法, 气相色谱-质谱法等^[7-8]。试验建立了一种高效液相色谱法来检测蜂蜜中氟氯苯氧菊酯的残留。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 600E 高效液相色谱仪, 配有 UV 检测器

收稿日期: 2012-10-12

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-45-KXJ9) 资助。

作者简介: 吴虹, 女, 硕士研究生。

* 通信作者: 余林生, 男, 博士, 教授。E-mail: yulinsheng@yahoo.com.cn

(美国 Waters 公司); XTerra MS C₁₈ 色谱柱 (5 μm, 4.6×250 mm, Waters 公司); 超纯水制备系统 (Milli-Q, 美国密理博); 旋涡振荡仪; R 系列-旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司); Oasis HLB 固相萃取小柱 (6 mL/500 mg, Waters 公司)。

氟氯苯氧菊酯标准品 (Sigma 公司, 纯度 >99%); 正己烷、二氯甲烷、丙酮 (均为分析纯, 上海中试化工总公司); 甲醇, 乙腈 (色谱纯); 超纯水 (电阻率达到 18.2 MΩ)。

1.2 标准溶液的配制

1.2.1 标准储备液的配制 准确称取 1.00 mg 氟氯苯氧菊酯标准品, 用乙腈溶解, 定容至 10 mL, 即浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的标准储备液。置于 -18℃ 条件下避光保存。

1.2.2 标准工作液的配制 根据分析需要准确吸取适量的标准储备液, 用 80% 的乙腈水溶液稀释至 0.1、0.25、0.5、1、2 和 4 μg·mL⁻¹ 做标准曲线。

1.3 样品的前处理方法

1.3.1 样品的提取 准确称取 5±0.05 g 蜂蜜样品置于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 水和不同体积丙酮溶液用旋涡仪混合 1 min 使样品溶解, 加入 20 mL 不同比例的正己烷与二氯甲烷混合提取液, 涡旋混合 3 min, 将上层有机相收集于浓缩瓶中, 继续加入上述体积丙酮和 20 mL 混合提取液重复提取一次, 合并上层有机相后, 在 40℃ 下用旋转蒸发仪进行旋转蒸发至近干, 用 4 mL 80% 的乙腈水溶液分 2 次溶解残渣, 收集溶液, 待净化。

1.3.2 样品的净化 将 Oasis HLB 固相萃取柱用 3 mL 丙酮和 5 mL 正己烷进行活化, 然后将样液过柱, 再用 6 mL 甲醇淋洗, 在负压下抽干。最后用不同体积洗脱剂洗脱, 收集全部洗脱液在 40℃ 下进行旋转蒸发至近干, 用 2 mL 80% 的乙腈水溶液溶解, 样液过 0.22 μm 的有机相滤膜后, 待测。

1.4 色谱条件

色谱柱: XTerra MSC₁₈ 色谱柱 (5 μm, 4.6 mm×250 mm, Waters 公司); 流动相: 乙腈:水 (90:10, V/V); 检测波长: 267 nm; 流速: 1.4 mL·min⁻¹; 柱温: 30.0 ℃; 进样量: 20 μL。

2 结果与分析

2.1 提取条件的优化

2.1.1 丙酮溶剂体积的选择 试验发现丙酮溶液的体积用量多少可直接影响提取率。本试验考察了 5 mL 水分别加 4、5、6、7 和 8 mL 丙酮溶液时对提取率的影响 (见图 1), 结果显示用量为 6 mL 及以上

时提取率达到 90% 以上, 但 7 mL 和 8 mL 时提取率无明显增加, 综合考虑选择丙酮溶液用量为 6 mL。

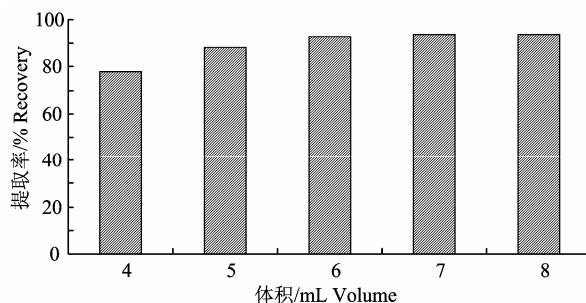


图 1 丙酮体积对氟氯苯氧菊酯提取率的影响
Figure 1 Extracting rates of flumethrin with different acetone volumes

2.1.2 提取液体积比例的选择 氟氯苯氧菊酯属于拟除虫菊酯类药物, 常用的提取液有丙酮、二氯甲烷和正己烷 3 种溶剂^[9]。本试验使用了正己烷与二氯甲烷的混合提取液, 并考察了正己烷与二氯甲烷溶液的体积比分别为 5:5、4:6、3:7、2:8 时对氟氯苯氧菊酯提取率的影响 (见图 2), 结果表明正己烷:二氯甲烷为 4:6 时提取率较高。

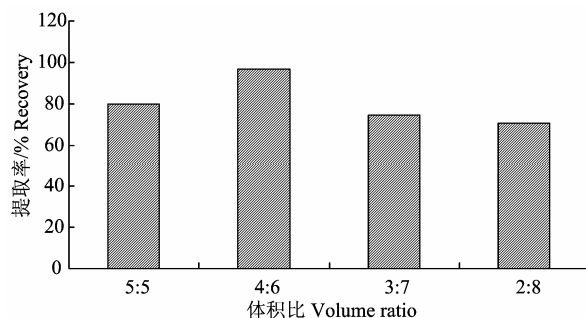


图 2 提取液体积比对氟氯苯氧菊酯提取率的影响
Figure 2 Extracting rates of flumethrin with different extraction ratios

2.1.3 洗脱剂的选择 对蜂蜜的净化方法通常包括溶剂萃取法 (SE)、固相萃取法 (SPE)、超临界流体萃取法 (SFE) 等^[10]。本试验采用了 SPE, 分别用乙腈和提取液作为洗脱剂对样品进行洗脱, 结果表明用乙腈进行洗脱时基线平稳, 杂质干扰少, 因而选用乙腈作为样品净化时的洗脱剂 (见图 3 和图 4)。

2.1.4 洗脱剂体积的选择 分别用 3、4、5、6 及 7 mL 体积的乙腈对添加相同浓度的样品进行净化和回收率试验, 通过洗脱曲线可见, 用 6 mL 时的回收率最高且达到 80% 以上 (见图 5)。

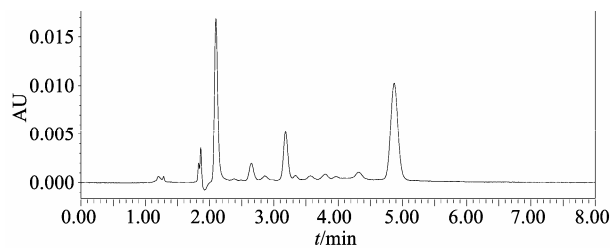


图 3 乙腈洗脱后的色谱图

Figure 3 Chromatogram of honey elute by acetonitrile

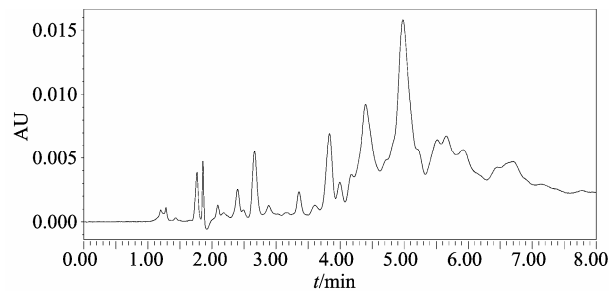


图 4 提取液洗脱后的色谱图

Figure 4 Chromatogram of honey elute by extracting solution

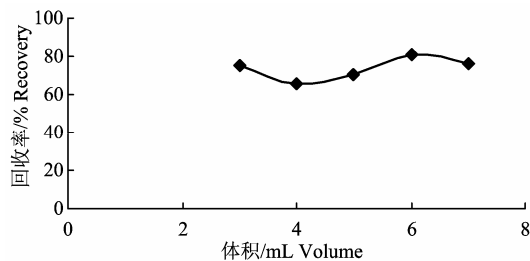


图 5 乙腈体积对氟氯苯氧菊酯回收率的影响

Figure 5 Recoveries of flumethrin with different acetonitrile volumes

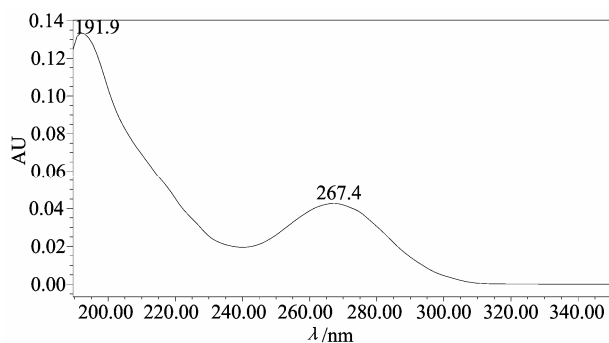


图 6 氟氯苯氧菊酯紫外光谱图

Figure 6 Ultraviolet spectrogram of flumethrin

2.2 色谱分离条件的优化

对氟氯苯氧菊酯在 190~350 nm 波长区间进行全波长扫描, 结果见图 6。由图 6 可见, 在 191.9 和

267.4 nm 处附近均有较大吸收, 在 267 nm 处时对氟氯苯氧菊酯有特征吸收同时对流动相和杂质峰的吸收相对较低, 分离效果最好, 干扰最小。因而最后选定 267 nm 作为检测波长。

2.3 线性关系

用 80% 的乙腈水溶液将标准储备液分别配制成质量浓度为 0.1、0.25、0.5、1、2 和 4 μg·mL⁻¹ 的标准工作液, 在上述色谱条件下进行测定, 进样量 20 μL。得到氟氯苯氧菊酯的线性回归方程为: $y = 40\ 135x - 337.65$, 相关系数 $R^2 = 1.000\ 0$, 峰面积和质量浓度之间呈正比例, 线性关系良好; 由图可见, 该色谱条件下氟氯苯氧菊酯出峰时间为 4.9 min 左右, 峰型较好, 基线稳定 (见图 7 和图 8)。

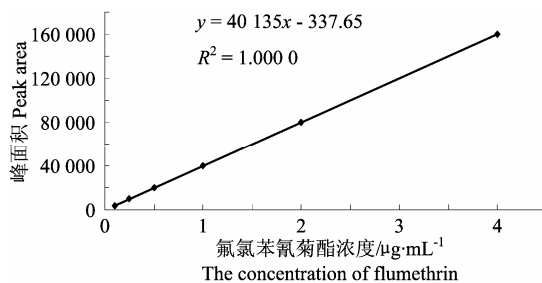


图 7 氟氯苯氧菊酯标准曲线

Figure 7 Standard curve of flumethrin

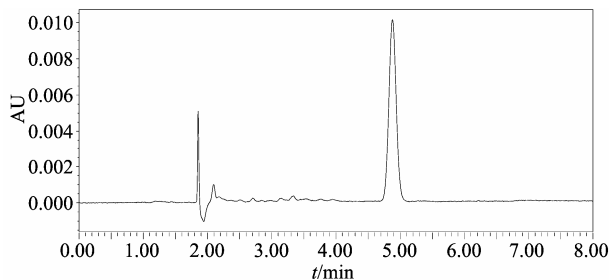


图 8 氟氯苯氧菊酯标准溶液色谱图

Figure 8 Chromatogram of flumethrin standard solution

2.4 回收率及精密度

向空白蜂蜜样品中分别添加 0.2、0.5、1.0 mg·kg⁻¹ 3 种水平的氟氯苯氧菊酯标准工作液, 按照上述方法对加标蜂蜜样品进行前处理, 通过 HPLC 紫外检测法进行测定。每个水平平行测定 3 次, 氟氯苯氧菊酯回收率在 80.8%~96.8%, 变异系数为 1.5%、1.3% 和 0.6% (见表 1)。图 9 和图 10 分别为空白蜂蜜样品和加入氟氯苯氧菊酯蜂蜜样品的色谱图。

2.5 检测限 (LOD)

以出现药物峰是基线噪音的 3 倍峰高的最低组

织药物浓度作为药物在组织中的检测限。HPLC 紫外检测法测得氟氯苯氧菊酯标准品在蜂蜜中的检测限为 $0.005 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

表 1 回收率及变异系数

Table 1 Recoveries and variable coefficient

添加浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Spiked	平均回收率/% Average recovery	变异系数/% C.V.
0.2	80.8	1.5
0.5	83.8	1.3
1.0	96.8	0.6

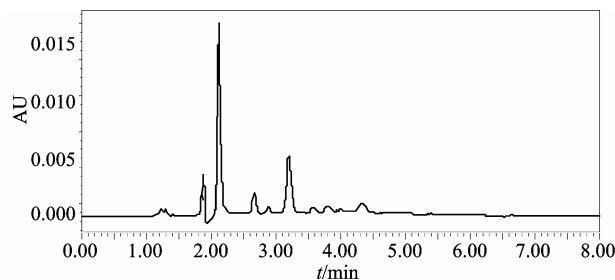


图 9 空白蜂蜜样品色谱图

Figure 9 Chromatogram of blank honey sample

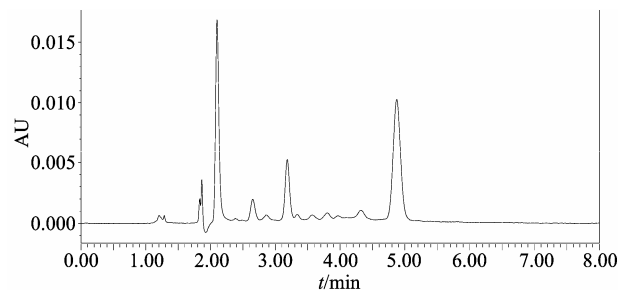


图 10 加入氟氯苯氧菊酯蜂蜜样品色谱图

Figure 10 Chromatogram of honey sample added with flumethrin

3 结论

本试验建立了高效液相色谱—紫外法用于检测

蜂蜜中氟氯苯氧菊酯的残留。通过对前处理方法的改进和对色谱条件的优化提高了方法的回收率和准确性, 在 $0.2\sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度范围内, 回收率达到 $80.8\%\sim 96.8\%$, 变异系数在 $0.6\%\sim 1.5\%$ 之间, 氟氯苯氧菊酯标准品在蜂蜜中的检测限为 $0.005 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。此方法前处理简单易操作, 可以有效的去除蜂蜜中的大量杂质, 药物峰出峰时间快, 缩短了检测时间, 满足蜂蜜中氟氯苯氧菊酯残留的检测要求。

参考文献:

- [1] 赵静, 李熠, 薛晓峰. 治螨新药—氟氯苯氧菊酯的性能和应用[J]. 中国养蜂, 2004, 55(4): 17-18.
- [2] Bogdanov St. Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products[J]. Apiacta, 2003, 38: 190-197.
- [3] 霍春生, 姚昌莉, 颜志立. 世界蜂蜜主要进口国和欧盟对蜂蜜药物残留及常规指标的合同要求[J]. 蜜蜂杂志, 2003(3): 7-8.
- [4] Swiss Bee Research Center. Beeswax replacement in organic beekeeping is there a risk of contamination by residue in hive walls[J]. Apiacta, 2003, 38: 178- 181.
- [5] 农业部蜂产品质量监督检验测试中心. NY/T 1243-2006. 中华人民共和国农业行业标准—蜂蜜中农药残留限量(一)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [6] 农业部蜂产品质量监督检验测试中心. 农业部 781 号公告—7—2006. 蜂蜜中氟氯苯氧菊酯残留量的测定气相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [7] 董盛月. 蜂王浆中氟胺菊酯与氟氯苯氧菊酯残留的提取净化及超高效液相色谱测定方法研究[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 272-274.
- [8] 金珍, 林竹光, 陈美瑜, 等. 气相色谱—质谱法分析蜂蜜中的多种农药残留[J]. 色谱, 2006, 4(5): 440-446.
- [9] 柳刚, 朱威, 胡福良. 色谱法测定蜂蜜中农残的预处理方法[J]. 蜜蜂杂志, 2007(4): 6-7.
- [10] 孙成玲, 汪付星, 颜冬云, 等. 拟除虫菊酯类农药残留检测前处理技术研究进展[J]. 农药, 2010, 49(1): 11-14.