

3 种新烟碱类杀虫剂在蜂蜜中 HPTLC 残留分析方法的研究

梁睿¹, 岳永德^{2*}, 汤锋²

(1. 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036; 2. 国际竹藤中心国家林业局竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

摘要: 建立了吡虫啉、噻虫胺和噻虫嗪在蜂蜜中残留的高效薄层色谱 (HPTLC) 检测方法, 用乙腈机械震荡提取后涡旋并离心样品, 于 C-18 固相萃取柱净化, CAMAG Linomat IV 点样仪点样, 二氯甲烷: 乙酸乙酯= 3:1 (V:V) 混合溶液单向上行展开, 于 254 nm 波长进行 HPTLC 检测。结果表明, 当 3 种农药在蜂蜜中的添加浓度分别 0.05、0.5 和 1.0 mg·kg⁻¹ 时, 添加回收率分别为 71.58%~101.25%、72.29%~109.47% 和 79.88%~108.92%, 相对标准偏差分别为 9.31%~14.47%、7.79%~12.86% 和 9.24%~14.23%, 均满足农残分析的基本要求。

关键词: 新烟碱类杀虫剂; 蜂蜜; 高效薄层色谱; 农残分析

中图分类号: S481.8

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0735-05

Study on the residue analysis method of three neonicotinoid insecticides in honey

LIANG Rui¹, YUE Yongde², TANG Feng²

(1. School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Key Laboratory of Science and Technology of Bamboo and Rattan, International Centre for Bamboo and Rattan, State Forestry Administration, Beijing 100102)

Abstract: A method was developed for analysis of imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam residues in honey by high performance thin layer chromatography (HPTLC). Samples were extracted with acetonitrile (accompanied by mechanical shaking), and cleaned up by C-18 solid-phase extraction column. The extracts were applied as bands to the glass-backed silica gel 60F₂₅₄ HPTLC plates with system of methylene chloride: ethyl acetate = 3:1 (V/V) under unidirectional upward. The plates were developed with TLC scanner at 254 nm. The recoveries were respectively 71.58%-101.25%, 72.29%-109.47% and 79.88%-108.92% when the concentrations of three pesticides in honey added were 0.05, 0.5 and 1.0 mg·kg⁻¹, and RSDs were 9.31% - 14.47%, 7.79% - 12.86% and 9.24% - 14.23%, respectively. The method meets the basic requirements of pesticide residues analysis.

Key words: neonicotinoid insecticides; honey; HPTLC; pesticide residue analysis

新烟碱类杀虫剂是在烟碱结构修饰的基础上成功开发出来的继拟除虫菊酯类、有机磷类和氨基甲酸酯类之后的第 4 大类杀虫剂。自 20 世纪 80 年代末, 新烟碱类杀虫剂已成为全球应用最为广泛的一类杀虫剂, 并广泛应用于植物保护 (农作物、蔬菜和水果)、兽药和水产养殖以及无脊椎动物害虫抑制剂等不同领域^[1]。新烟碱类杀虫剂具有良好的根部内吸性、广谱、高效、与环境友好相容并对哺乳动物低毒等特点, 主要用于防治刺吸式口器害虫, 如蚜虫、粉虱和飞虱等, 通过抑制乙酰胆碱酯酶作用

于神经中枢, 阻断中枢神经的正常传导从而引发剧烈的神经毒害效应使得昆虫神经受损, 最终发生麻痹反应, 导致死亡。此类药物的优势是对哺乳动物的危害性小, 并且与常规杀虫剂不存在交互抗性, 是农业生产中应用最广泛的一种杀虫剂^[2-5]。

农药施用到环境后, 农药残留对有益生物如传粉昆虫的影响也在逐渐增加^[6]。有研究表明: 新烟碱类杀虫剂在与蜜蜂接触时会使得蜜蜂迷失回巢的方向, 从而导致蜂群的数量明显减少。继而使得蜜蜂的重要产出物—蜂蜜也会产生不同程度的农药残

收稿日期: 2017-12-05

基金项目: 十二五国家科技计划课题 (项目标号: 2012BAD23B03) 资助。

作者简介: 梁睿, 讲师。E-mail: liangrui@ahau.edu.cn

* 通信作者: 岳永德, 教授, 博士生导师。E-mail: yueyd@icbr.ac.cn

留。2002年欧盟颁布“关于禁止使用新烟碱类杀虫剂”的文件以保护蜜蜂等有益昆虫，首次规定的农药品种有噻虫胺，噻虫嗪和吡虫啉^[7-9]。

新烟碱类杀虫剂残留检测方法主要包括气相色谱法(GC-MS)^[10-12]、高效液相色谱法(HPLC)^[13-18]、酶联免疫法(ELISA)^[19-20]、荧光免疫分析法(FIA)^[21]、毛细管电泳仪法(CE)^[22]、电化学法^[23]、分光光度法^[24]和传感器法^[25]等。而高效薄层色谱法(HPTLC)则鲜有报道。高效薄层色谱与气相和液相色谱法相比在灵敏度、检测的稳定性上都不具备优势，但其保持了薄层色谱法的样品制备简单易操作等特点，改变了传统薄层色谱法在再现性和灵敏度方面的不足，操作简便，分析速度快，可同时分析几十个样品，大大提高了使用效率。Milz等^[26]报道了一种简单的高效薄层色谱法结合紫外检测器直接检测烯啶虫胺、吡虫啉、噻虫啉、噻虫嗪、啉虫脒及噻虫胺，其定量限为12~26 ng。将此方法用于蜂蜜中新烟碱类杀虫剂残留的检测时，用乙腈提取、Chromabond SiOH柱净化，检测限为48~108 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

考虑到新烟碱类杀虫剂不断扩大的商业影响力、在作物中存在的持久性以及环境中的转归，再加上关于这些化合物的毒性及其代谢产物的有限报道，对新烟碱类可能造成的环境风险研究更加具有现实意义^[27]，而蜂蜜作为蜜蜂的主要产出物，对新烟碱类杀虫剂的毒性研究亦能起到一定的指示作用。本研究旨在通过HPTLC的检测手段建立欧盟首次禁用的3种新烟碱类杀虫剂吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺在蜂蜜中的农药残留分析方法，以期作为其他已有检测方法的参考和补充，并为这3种农药的环境风险评估提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 农药 吡虫啉(纯度99.0%)、噻虫胺(纯度99.0%)和噻虫嗪(纯度99.0%)标准品购自德国奥格斯堡市Dr.Ehrenstorfer实验室专供。试验所有有机溶剂均为分析纯；实验用水均为超纯水。

1.1.2 仪器与设备 机械料理机(九阳股份有限公司)；DHG-9023A电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)；HYQ-3110涡旋混匀器(南京华奥仪器有限公司)；N-EVAPTM112氮吹仪(美国Organomation公司)；KQ-600B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；WHY-2水浴恒温振荡器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)；电子天平(精确至万分之一，北京赛多利斯科学仪器有限公司)；

IKA-RV10旋转蒸发仪(广州艾卡仪器设备有限公司)；固相萃取柱，半自动点样仪(CAMAG Linomat IV点样仪，带不锈钢盖的10 cm×20 cm双槽展开缸，100 μL 进样针，薄层扫描仪(CAMAG TLC SCANNER 3)均来自瑞士CAMAG公司；硅胶G₆₀F₂₅₄HPTLC板(20 cm×10 cm)，德国Merck公司。

1.2 方法

1.2.1 农药标准溶液配制 称取农药标准品约10 mg于10 mL容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，贮存于冰箱(4℃)中备用。使用时用甲醇稀释成所需混合标准工作液。

1.2.2 样品采集与预处理 称取5.0 g蜂蜜于离心管中，加入2 mL水、2 g NaCl，混匀后静置待添加农药。

1.2.3 农药的添加 添加10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 吡虫啉、噻虫嗪、噻虫胺的混合标准溶液至3个浓度0.05、0.5和1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，每个浓度3次重复，并做空白对照，暗处静置1 h。

1.2.4 样品处理 在样品中加入10 mL乙腈，振荡提取30 min，在4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离心5 min，取上清液8 mL，浓缩至2 mL，用固相萃取柱净化。将C-18小柱(3 mL)以5 mL乙腈预洗，上样后以2 mL×2 mL乙腈洗脱，收集淋洗液，氮吹至干，用甲醇定容至1 mL，供HPTLC检测。

1.2.5 检测 使用CAMAG Linomat IV点样仪在高效薄层板上点样，静置1 h后放入10 cm×20 cm双槽展开缸中展开，展开剂为二氯甲烷-乙酸乙酯(3:1, V/V)，单行上行展开。展开后的薄层板放入CAMAG TLC SCANNER 3薄层扫描仪，使用Wincats工作站扫描。

薄层扫描条件。光源：氙灯和氙灯；扫描速度：20 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ；数据分辨率：100 $\mu\text{m}\cdot\text{步}^{-1}$ ；扫描狭缝：6.00 $\text{mm}\times 0.45\text{ mm}$ ；扫描起始位置(由硅胶板左端开始)：15 mm；扫描间距：9 mm；扫描位置：距离薄层板底部10~80 mm之间；测量模式：吸收，采用优化的光系统进行扫描，扫描波长为254 nm。设置完成后，即进行扫描。

定性定量分析。根据比移值(Rf)定性，采用外标法定量。通过农药标准溶液色谱峰的峰高或峰面积进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 检测条件优化

2.1.1 展开剂优化 分别以①甲醇，②甲醇-二氯甲烷(1:1, V/V)，③甲醇-二氯甲烷(1:3, V/V)，

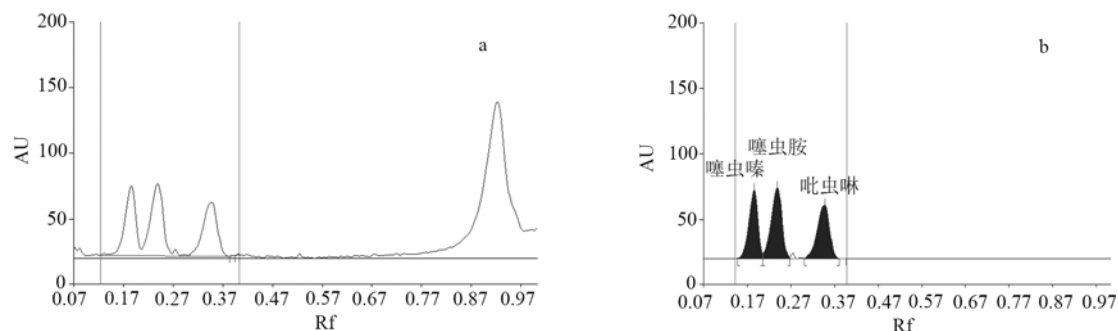
④石油醚-甲醇 (3:1, V/V), ⑤二氯甲烷-丙酮 (3:1, V/V), ⑥二氯甲烷-丙酮 (17:3, V/V), ⑦二氯甲烷-乙酸乙酯 (3:1, V/V) 组成单溶剂展开系统和多溶剂展开系统进行反复试验筛选优化。结果表明, 当以二氯甲烷-乙酸乙酯 (3:1, V/V) 展开时能得到较为满意的分离效果。

2.1.2 扫描波长的选择 通过对吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺的紫外吸收曲线的测定, 3 种农药的最大吸收

波长均在 254 nm 左右。因此, 扫描波长定为 254 nm。

2.2 标准曲线的绘制

用甲醇配制系列浓度的吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺混合标准溶液进行点样、展开并扫描, 以点样量 (ng) 为横坐标, 峰面积 (AU) 为纵坐标作图, 得到吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺的标准曲线, 在 30~120 ng 的测定范围内, 3 种物质呈现良好的线性关系, 结果见表 1 所示。



a. 三药混标扫描图; b. 三药混标积分图

a. Scannogram obtained from imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam standards;

b. Integrogram obtained from imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam standards

图 1 吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺混合标准品高效薄层色谱图

Figure 1 HPTLC chromatograms obtained from imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam standards

表 1 吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺的标准曲线方程和最小检测限

Table 1 Regression equations and detection limits of imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam

农药名称 Pesticide	R_f	标准曲线方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	最小检测限/ng Detection limit
吡虫啉 Imidacloprid	0.32	$Y=1.145+0.359X$	0.998 3	20
噻虫嗪 Clothianidin	0.19	$Y=0.242+0.453X$	0.999 4	20
噻虫胺 Thiamethoxam	0.23	$Y=-0.294+0.489X$	0.999 7	20

表 2 蜂蜜中吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺的添加回收试验结果*

Table 2 Recoveries and RSDs of imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam in honey*

农药名称 Pesticide	添加浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Fortified level	点样量/ μL Testing dose	平均添加回收率/% Average recoveries	相对标准偏差/% RSD
吡虫啉	0.05	50	101.25	9.31
Imidacloprid	0.5	20	73.09	14.47
	1.0	5	71.58	10.57
噻虫嗪	0.05	50	109.47	7.79
Clothianidin	0.5	20	108.98	11.10
	1.0	5	72.29	12.86
噻虫胺	0.05	50	108.92	14.23
Thiamethoxam	0.5	20	92.75	11.58
	1.0	5	79.88	9.24

注: “*”表示每次处理重复 3 次。Note: “*” indicates three replicate extractions were performed for each treatment

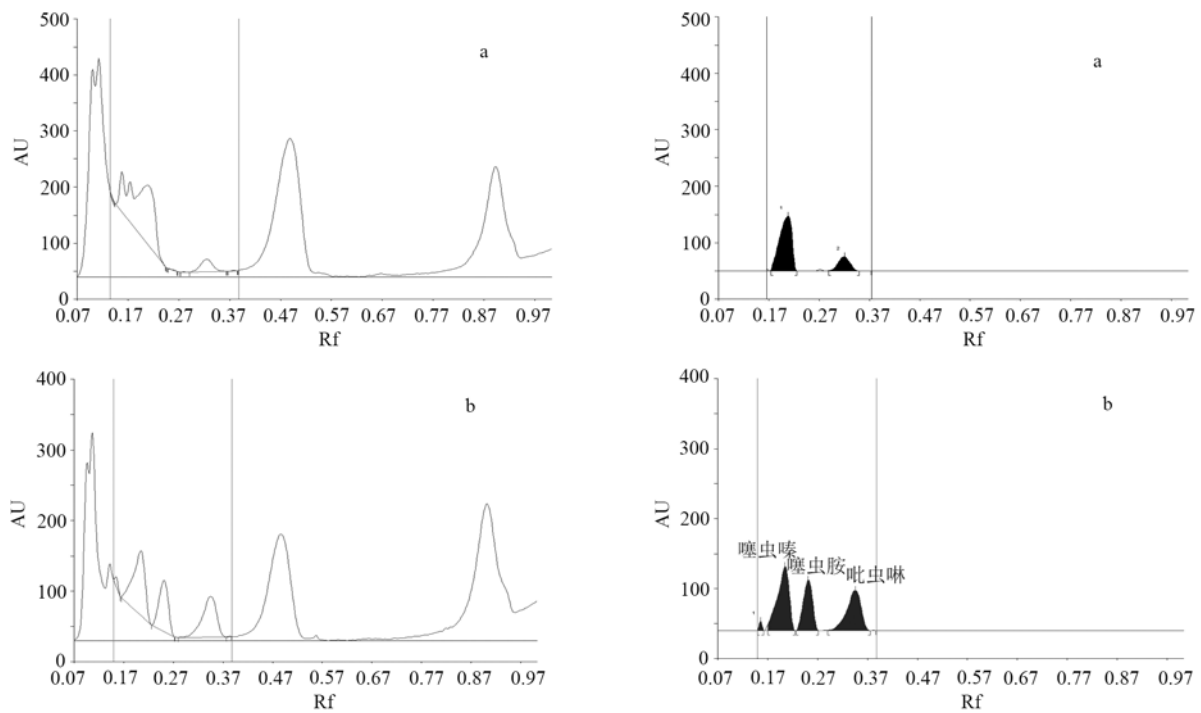
2.3 方法的准确度和精密度

在优化后的色谱条件下, 称取 5.0 g 蜂蜜, 添加吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺的混合标准溶液, 使得 3 种新烟碱类杀虫剂在蜂蜜中的添加浓度分别为 0.05、0.5 和 1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。进行添加回收试验, 结果

见表 2 和图 2 所示。

2.4 方法的灵敏度

在上述检测条件下, 以信噪比为 3:1 时相应的点样量, 确定吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺的最小检测限为 20 ng。



a.空白样品扫描图谱、积分图谱 b.添加样品扫描图谱、积分图谱

a. Scanning spectra and integral map of blank sample b. Scanning spectra and integral map of add sample

图2 蜂蜜中吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺添加回收色谱图

Figure 2 HPTLC chromatography of (a) unspiked honey (b) honey spiked with imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam

3 结论

实验结果表明:当3种农药吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺在蜂蜜中的添加浓度分别0.05、0.5和1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,添加回收率分别为71.58%~101.25%、72.29%~109.47%和79.88%~108.92%,相对标准偏差分别为9.31%~14.47%、7.79%~12.86%和9.24%~14.23%。该检测方法对蜂蜜中3种新烟碱类杀虫剂的添加回收率均满足农残分析的基本要求,可以作为已有检测方法的有效补充。

参考文献:

- [1] SIMON-DELSON, AMARAL-ROGERS V, BELZUNCES L P, et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites[J]. Environ Sci Pollut R, 2015, 22(1): 5-34.
- [2] 张国生, 侯广新. 烟碱类杀虫剂的应用、开发现状及展望[J]. 农药科学与管理, 2004, 25(3): 22-26.
- [3] 程霞, 亦冰. 第二代新烟碱类杀虫剂噻虫嗪的开发[J]. 世界农药, 2001, 23(4): 17-25.
- [4] SUCHAIL S, GUEZ D, BELZUNCES L P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies[J]. Environ Toxicol Chem, 2000, 19(7): 1901-1905.
- [5] JESCHKE P, NAUEN R, SCHINDLER M, et al. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids[J]. J Agr Food Chem, 2011, 59(7): 2897-2908.
- [6] BEGUM A, ALAM S N, UDDIN M J. Management of Pesticides: Purposes, Uses, and Concerns[M]//Pesticide Residue in Foods. Berlin:Springer, Cham, 2017: 53-86.
- [7] 王钰冲, 陈伟文, 董诗浩, 等. 吡虫啉对东方蜜蜂的毒性研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2015, 30(1): 147-150.
- [8] 代平礼, 周婷, 王强, 等. 吡虫啉对意大利蜜蜂学习行为的影响[J]. 农药, 2013, 52(7): 512-514.
- [9] 黄庆, 欧晓明, 欧阳承虎, 等. 新烟碱类农药在环境介质中的残留检测方法研究概况[J]. 世界农药, 2013, 35(2): 37-42.
- [10] TOKIEDA M, OZAWA M, KOBAYASHI S, et al. Method to determination of total residues of the insecticide acetamiprid and its metabolites in crops by gas chromatography[J]. J Pestic Sci, 1997, 22(2): 77-83.
- [11] NAVALÓN A, GONZÁLEZ-CASADO A, EL-KHATTABI R, et al. Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Analyst, 1997, 122(6): 579-581.
- [12] ROSSI S, SABATINI A G, CENCIARINI R, et al. Use of high-performance liquid chromatography-uv and gas chromatography-mass spectrometry for determination of the imidacloprid content of honeybees, pollen, paper filters, grass, and flowers[J]. Chromatographia, 2005, 61(3/4): 189-195.
- [13] OBANA H, OKIHASHI M, AKUTSU K, et al. Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection[J]. J Agr Food

- Chem, 2002, 50(16): 4464-4467.
- [14] SECCIA S, FIDENTE P, MONTESANO D, et al. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1214(1/2): 115-120.
- [15] WANG P, YANG X, WANG J, et al. Multi-residue method for determination of seven neonicotinoid insecticides in grains using dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid micro-extraction by high performance liquid chromatography[J]. *Food Chem*, 2012, 134(3): 1691-1698.
- [16] WATANABE E, BABA K, EUN H. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in agricultural samples by solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography equipped with diode-array detection[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(10): 3798-3804.
- [17] GUZSVÁNY V, MADŽGALJ A, TREBŠE P, et al. Determination of selected neonicotinoid insecticides by liquid chromatography with thermal lens spectrometric detection[J]. *Environ Chem Lett*, 2007, 5(4): 203-208.
- [18] RANCAN M, ROSSI S, SABATINI A G. Determination of Thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1123(1): 60-65.
- [19] WATANABE E, BABA K, MIYAKE S. Analytical evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for neonicotinoid dinotefuran for potential application to quick and simple screening method in rice samples[J]. *Talanta*, 2011, 84(4): 1107-1111.
- [20] WATANABE E, BABA K, EUN H, et al. Application of a commercial immunoassay to the direct determination of insecticide imidacloprid in fruit juices[J]. *Food chem*, 2007, 102(3): 745-750.
- [21] KIM H J, SHELVER W L, HWANG E C, et al. Automated flow fluorescent immunoassay for part per trillion detection of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 571(1): 66-73.
- [22] SEGURA CARRETERO A, CRUCES-BLANCO C, PÉREZ DURÁN S, et al. Determination of imidacloprid and its metabolite 6-chloronicotinic acid in greenhouse air by application of micellar electrokinetic capillary chromatography with solid-phase extraction[J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1003(1/2): 189-195.
- [23] GUZSVÁNY V J, GAÁL F F, BJELICA L J, et al. Voltammetric determination of imidacloprid and thiamethoxam[J]. *J Serb Chem Soc*, 2005, 70(5): 735-743.
- [24] GUZSVÁNY V J, PAPP Z J, LAZIĆ S D, et al. A rapid spectrophotometric determination of imidacloprid in selected commercial formulations in the presence of 6-chloronicotinic acid[J]. *J Serb Chem Soc*, 2009, 74(12): 1455-1465.
- [25] DING X K, ZHANG W, CHENG D, et al. Oligopeptides functionalized surface plasmon resonance biosensors for detecting thiacloprid and imidacloprid[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 35(1): 271-276.
- [26] MILZ B, IDROS I B, SPANGENBERG B. Limits of quantification of some neonicotinoid insecticides measured by thin-layer chromatography[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2012, 35(10): 1404-1414.
- [27] AMARAL-ROGERS V, BELZUNCES L, BONMATIN J M, et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites[J]. *Environ Sci Pollut R*, 2015, 22(1): 5-34.