

浊点萃取-高效液相色谱法检测牛奶中的六种农药

王 健, 崔艳梅, 刘 伟, 杨明敏, 陈建波

(南京农业大学理学院, 江苏 南京 210095)

摘要 :建立了应用浊点萃取法对牛奶中的残留除草剂进行萃取富集后用高效液相色谱(HPLC)检测的方法。以 60 g/L 的表面活性剂 Tween 20 或 Triton X-100 为萃取剂,在一定浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 NaCl 的存在下加热萃取。牛奶中 6 种不同的除草剂被胶束相富集后被 HPLC 分离检测。结果表明 :莠草酮、嗪草酮和溴苯腈在 20 ~ 10 000 $\mu\text{g/L}$ 、苯噻草胺在 30 ~ 10 000 $\mu\text{g/L}$ 、苄嘧磺隆和烟嘧磺隆在 50 ~ 10 000 $\mu\text{g/L}$ 时其浓度和检测信号呈线性关系,相关系数为 0.998 1 ~ 0.999 7,平均加标回收率为 85.09% ~ 96.74%,相对标准偏差为 1.90% ~ 3.98%。6 种农药的定量检测限均小于国家规定的农药残留限量(MRL)。该方法简便、快速、灵敏、污染少,实际应用性好。

关键词 浊点萃取 ;高效液相色谱 ;除草剂 ;牛奶

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2007)06-0853-04 栏目类别 :研究论文

Determination of Six Pesticides in Milk Using Cloud Point Extraction-High Performance Liquid Chromatography

WANG Jian , CUI Yanmei , LIU Wei , YANG Mingmin , CHEN Jianbo

(College of Science , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : The feasibility of employing cloud point extraction (CPE) as extraction and preconcentration method for the recovery of herbicides from milk samples followed by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis is demonstrated. An aqueous surfactant solution containing 60 g/L Tween 20 or Triton X-100 was heated with an appropriate concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or NaCl for the extraction of herbicides. The extract was analyzed by HPLC subsequently. Six herbicides in milk were analyzed simultaneously. The results showed that the linear dynamic ranges of detection were 20 - 10 000 $\mu\text{g/L}$ for tralkoxydim , metribuzin and bromoxynil , 30 - 10 000 $\mu\text{g/L}$ for mefenacet , and 50 - 10 000 $\mu\text{g/L}$ for bensulfuron-methyl and nicosulfuron. The correlation coefficients were 0.998 1 - 0.999 7. The average recoveries of the six herbicides ranged from 85.09% to 96.74%. The relative standard deviations for the six herbicides were in the range of 1.90% - 3.98%. The limits of detection for the six pesticides were lower than the maximum residue limits (MRL) of China. The results indicate that the method is easier , faster , sensitive and produces less pollutants.

Key words : cloud point extraction (CPE) ; high performance liquid chromatography (HPLC) ; herbicide ; milk

浊点萃取(cloud point extraction , CPE)是近年出现的一种新型液-液萃取技术。许多表面活性剂的水溶液被加热到某一温度时,溶液产生浑浊并进而分离成二相,一相是表面活性剂富集相,另一相是表面活性剂浓度小于原溶液的水溶液,在此过程中,原溶液中含有的疏水性物质往往被萃取到表面活性剂富集相。这一温度称为浊点温度,这个过程称为浊点萃取。因为萃取剂是表面活性剂,不影

响环境并且容易处理,国外最初是将这一技术用于金属离子络合物的萃取分离^[1],进而应用于膜蛋白及某些有机物的分离和纯化^[2-4,5],目前在环境样品的前处理中也有应用。在农药分析中,浊点萃取技术往往作为气相色谱和高效液相色谱(HPLC)分析的前处理方法^[6,7]。国内将浊点萃取法用于金属离子络合物的报道很多,但在农药分析中的应用尚未见报道。

在检测牛奶中的残留农药时,往往需要把牛奶中的蛋白质、脂肪以及其他干扰物质去掉,目前有多种前处理提取方法,如:加入碱皂化去除干扰,再用有机溶剂提取^[5];加入氯化四乙胺和乙腈后在 4℃ 下放置一夜去除干扰^[8];加入 Tris 缓冲液、乙二胺四乙酸(EDTA)或其他缓冲液离心后,再用有机溶剂提取^[9,10];加入一定的酸如盐酸^[11]、磷酸、醋酸或甲酸^[12]去除干扰。破乳后再用传统的液-液萃取(LLE)^[13]、水蒸气蒸馏有机溶剂萃取(SDE)^[14]、基质固相分散净化技术(MSPD)^[15]、固相萃取技术(SPE)^[16]、固相微萃取技术(SPME)^[17]、支载液体膜(supported liquid membrane, SLM)萃取技术^[18]萃取等富集分离。以上所有前处理方法所需时间都较长并或多或少使用了有机溶剂。本工作采用表面活性物质在一定条件下使牛奶破乳,然后改变实验参数应用浊点萃取技术富集牛奶中的农药,整个过程避免了有机试剂的使用,快速方便,成本低,富集提取效果好,绿色无污染,提取完毕后胶束富集相能够直接用于 HPLC 分析。

1 实验部分

1.1 仪器

UV1700 PC 型紫外分光光度计(日本,Shimadzu 公司);Shimadzu 双泵液相色谱仪:LC-20AT 泵,SPD-M20A 二极管阵列检测器,20 μL 环形定量取样器,CBM-20A 系统控制器;离心机(4 000 r/min);KQ3200E 超声仪(昆山市超声仪器有限公司);Lichrospher 5-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm)(江苏汉邦科技有限公司)。

1.2 试剂

苄嘧磺隆(bensulfuron-methyl)、苯噻草胺(mefenacet)和溴苯腈(bromoxynil)购自农业部农药检定所,嗪草酮(metribuzin)和肟草酮(tralkoxydim)购自德国拜尔公司,烟嘧磺隆(nicosulfuron)购自美国杜邦公司,纯度都在 95% 与 99% 之间,用色谱纯甲醇溶解,配制成质量浓度为 100 mg/L 的储备液放在冰箱中于 4℃ 保存。NaCl、(NH₄)₂SO₄、CuSO₄、CaCl₂、AlCl₃、MgCl₂ 为分析纯,用二次蒸馏水配制成适当浓度的溶液。表面活性剂溶液:取适量的 Tween 20、Tween 60、Tween 61、Tween 80 和 Triton X-100 用蒸馏水配制成质量浓度为 200 g/L 的溶液,同时用蒸馏水配制质量浓度为 300 g/L 的聚乙二醇 6000 和聚乙二醇 4000 溶液。甲醇、乙腈、丙酮、正丁醇、乙二醇、正己烷、环己烷都是色谱纯试剂。所用的溶液、试剂和蒸馏水都经过 0.22 μm 的滤膜过滤,且所用流动相在进入色

谱柱前已超声脱气。

1.3 实验方法

1.3.1 前处理方法

在刻度试管中分别加入 10 mL 的牛奶,再分别加入 Tween 20 和 (NH₄)₂SO₄ 使它们的质量浓度分别为 60 g/L 和 50 g/L,用二次蒸馏水定容到 15 mL,混匀放置 10 min,在 90℃ 水浴中加热 15 min 破乳,然后在离心机中以 4 000 r/min 的速度离心 30 min,取上清液。加入 (NH₄)₂SO₄ 使其质量浓度达到 300 g/L (目的是加速相分离),在沸水浴中加热 10 min 后,移走水相,剩余表面活性剂胶束层的体积约为 0.5 mL,即所测样品的浓度浓缩了 20 倍。

1.3.2 色谱方法

采用 C18 反相色谱柱,以甲醇和水为流动相(体积比为 73:27),以 0.6 mL/min 的流速,定量进 20 μL 的胶束富集样,在 220 nm 的波长下进行分析,色谱图见图 1。

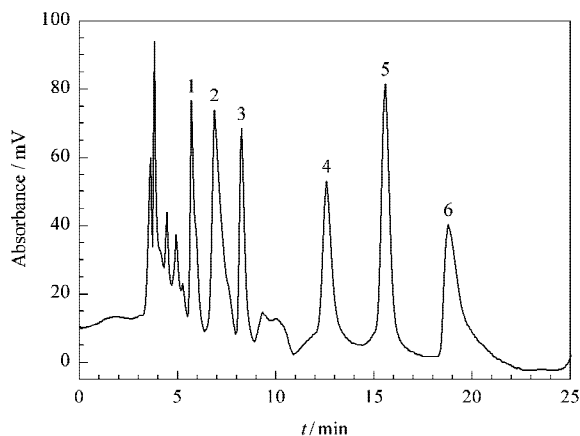


图 1 牛奶加标样品中除草剂的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of a milk sample spiked with herbicide standards with 60 g/L of Tween 20
Concentration of each herbicide: 12.5 μg/L.

1. tralkoxydim; 2. metribuzin; 3. bensulfuron-methyl; 4. mefenacet; 5. bromoxynil; 6. nicosulfuron.

2 结果与讨论

2.1 牛奶样品破乳条件的选择

2.1.1 盐的种类和用量

为能够充分破乳,去除牛奶中其他物质的影响,在加入 60 g/L 的表面活性剂后,我们尝试使用 NaCl、(NH₄)₂SO₄、CuSO₄、CaCl₂、AlCl₃、MgCl₂ 6 种盐对牛奶进行破乳,实验结果发现 CuSO₄ 能够破乳但本身颜色干扰太严重, CaCl₂ 和 MgCl₂ 没有很明显的破乳效果, AlCl₃ 能够破乳但在加热时易引起体系的不稳定和颜色变化,只有 (NH₄)₂SO₄ 和 NaCl 的破乳效果好,在选定 50 g/L 的质量浓度下也不会使表面活性剂分层并能充分破乳。

2.1.2 加热温度和时间以及离心的条件

考察了破乳加热的温度(50 ~ 100 ℃)、加热时间(2 ~ 30 min)以及加热完毕后离心的转速和时间对破乳效果的影响,结果发现 90 ℃ 下水浴加热 15 min 破乳,然后在离心机中以 4 000 r/min 的速度离心 30 min 的破乳效果最好。

2.2 浊点萃取条件的选择

2.2.1 表面活性剂的种类及含量

为寻找合适的能够有效地对溶液中的除草剂进行提取和富集的表面活性剂,考察了 7 种不同的表面活性剂 Tween 20、Tween 60、Tween 61、Tween 80、Triton X-100、聚乙二醇 6000 和聚乙二醇 4000 ,比较了它们实际使用的可行性、粘度和富集的回收率等。结果发现,Tween 60、Tween 61、Tween 80 生成的胶束相过于粘稠,不能直接进样,需加有机试剂稀释,这将引起富集因子下降;而聚乙二醇 6000 和聚乙二醇 4000 提取的农药的回收率低于 50%,只有 Tween 20 和 Triton X-100 能够在本实验条件下实现相分离且粘度合适,便于进行下一步的液相色谱分析,所以适用于浊点萃取。通过改变这两种表面活性剂的浓度,比较提取回收率,可得知质量浓度大于 60 g/L 的 Tween 20 和 Triton X-100 的提取回收率均在 85% 以上(见图 2)。

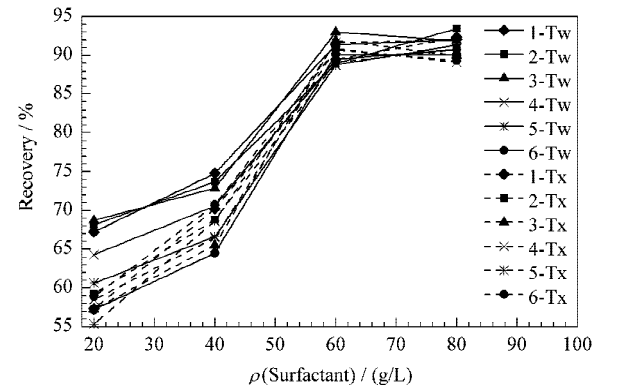


图 2 表面活性剂浓度对六种除草剂回收率的影响

Fig. 2 Effect of surfactant concentration on recovery
CPE conditions : 100 ℃ , 10 min. Identification number as in Fig. 1. Tw : Tween 20 ; Tx : Triton X-100.

2.2.2 盐的种类和用量

盐可以加速表面活性剂溶液的相分离。考察了 NaCl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 2 种表面活性剂相分离和 6 种除草剂的富集效率的影响,结果如图 3、4 所示,可知在加热的条件下 300 g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 NaCl 对 Tween 20 和 Triton X-100 溶液的相分离效果和回收率最好,所以选用 300 g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行实验。

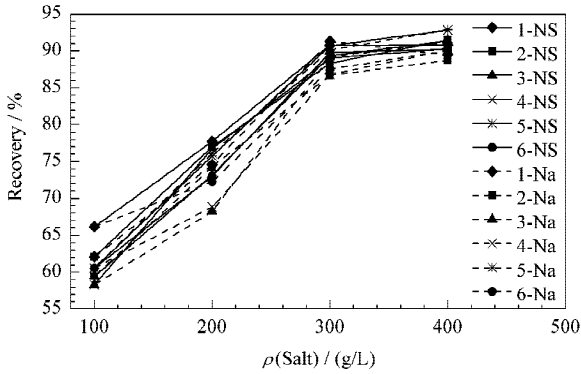


图 3 在 60 g/L Tween 20 溶液中盐浓度对六种除草剂回收率的影响

Fig. 3 Effect of salt addition on recovery of six herbicides when using 60 g/L Tween 20
CPE conditions : 100 ℃ , 10 min. Identification number as in Fig. 1. NS : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Na : NaCl.

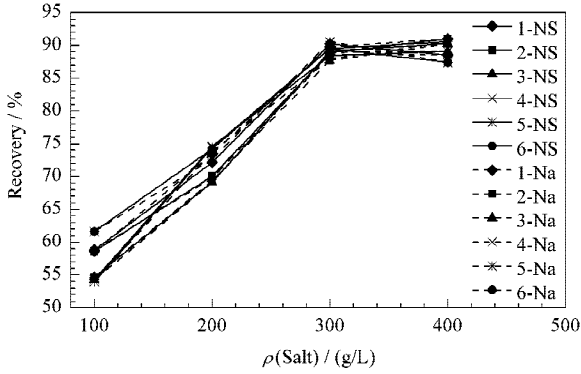


图 4 在 60 g/L Triton X-100 溶液中盐浓度对六种除草剂回收率的影响

Fig. 4 Effect of salt addition on recovery of six herbicides when using 60 g/L Triton X-100
CPE conditions : 100 ℃ , 10 min. Identification number as in Fig. 1. NS : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Na : NaCl.

2.2.3 浊点萃取的温度以及时间

为使表面活性剂实现相分离,进行充分的分层和减小表面活性剂富集相的体积,我们在表面活性剂的浊点之上,改变萃取温度(50 ~ 100 ℃),同时改变萃取时间(2 ~ 30 min),发现在 100 ℃ 下水浴加热 10 min 的条件下表面活性剂相分离的效果最好。

2.3 标准曲线、最低检测限、浊点萃取的回收率

按照“ 1.3 ”节实验方法,对 6 种农药的定量范围和标准曲线进行了检测(y 表示峰面积, x 表示样品的质量浓度,单位是 $\mu\text{g/L}$),并以信噪比为 3 确定最低检测限,结果见表 1。与国家规定的农药残留限量(MRL)^[18]相比,6 种农药的最低检测限都低于国家规定的农药残留限量。

在样品中分别添加 3 种质量浓度(100、200、300 $\mu\text{g/L}$)的农药,计算它们的添加回收率,结果为 85.09% ~ 96.74%(见表 2)。

表 1 浊点萃取法的各种分析数据
Table 1 Analytical parameters of the cloud point extraction method

Herbicide	Linear range/ (μg/L)	Linear equation	Correlation coefficient	RSD/% (n = 9)	Limit of detection (S/N = 3)/(μg/L)
Tralkoxydim	20 – 10000	$y = 3454x - 3242.2$	0.9981	2.25	1.00
Metribuzin	20 – 10000	$y = 3760x - 1562.9$	0.9982	3.61	0.50
Bensulfuron-methyl	50 – 10000	$y = 3671x - 1441.7$	0.9997	2.60	0.80
Mefenacet	30 – 10000	$y = 5487x - 2138.7$	0.9989	2.27	0.80
bromoxynil	20 – 10000	$y = 3611x - 77.836$	0.9996	1.90	0.60
Nicosulfuron	50 – 10000	$y = 4570x - 4909$	0.9988	3.98	1.10

y : peak area ; x : mass concentration , μg/L.

表 2 6 种农药的回收率($n = 9$)
Table 2 Recovery of six herbicides ($n = 9$) %

Herbicide	Levels/(μg/L)		
	100	200	300
Tralkoxydim	85.09 – 90.52	87.58 – 92.58	91.62 – 96.74
Metribuzin	86.14 – 93.82	87.12 – 93.15	85.45 – 93.46
Bensulfuron-methyl	86.10 – 91.57	90.87 – 92.97	88.97 – 94.60
Mefenacet	86.31 – 89.27	85.43 – 90.20	90.53 – 95.78
bromoxynil	85.44 – 90.04	85.76 – 93.05	87.66 – 93.97
Nicosulfuron	85.56 – 90.93	85.56 – 91.33	87.61 – 92.94

2.4 样品的检测

取不同产地的 3 种牛奶样 ,按“ 1.3 ”节方法进行实验 ,没有检测出上述 6 种农药。分别向其中添加除草剂标准液 ,使其质量浓度为 25 μg/L 和 100 μg/L ,然后按照“ 1.3 ”节方法处理检测 ,每个样品测定 3 次 ,其回收率范围分别为 85.7% ~ 91.5% 和 86.8% ~ 90.7% ,相应的相对标准偏差分别为 0.99% ~ 3.3% 和 0.87% ~ 3.0%。

3 结论

表面活性剂先后在牛奶的破乳和牛奶中农药的分离富集中起作用 ,大大简化了牛奶样品的前处理步骤。由于是对破乳后的上清液进行浊点萃取 ,所以要得到高的回收率 ,破乳时盐的种类和用量、加热温度和时间也是关键因素 ,在我们的实验条件下 ,回收率可达 90% 左右 ,而且富集因子达 20 以上 ,基本可满足牛奶中 6 种农药的检测。

参考文献 :

[1] Watanabe H , Tanaka H. Talanta , 1978 , 25(10) : 585

[2] Shen J C , Shao X G. Anal Chim Acta , 2006 , 561 : 83
[3] Purkait M K , Banerjee S , Mewara S , DasGupta S , De S. Water Research , 2005 , 39 : 3 885
[4] Carabias-Martínez R , Rodríguez-Gonzalo E , Moreno-Cordero B , Perez-Pavon J L , Garcia-Pinto C , Laespada E F. J Chromatogr A , 2000 , 902 : 251
[5] Page-Sharp M , Hale T W , Hackett L P , Kristensen J H , Ilett K F. J Chromatogr B , 2003 , 796 : 173
[6] Sanz C P , Halko R , Ferrera Z S , Rodriguez J J S. Anal Chim Acta , 2004 , 524 : 265
[7] Carabias-Martínez R , Rodríguez-Gonzalo E , Garcia-Jimenez M G , Garcia-Pinto C , Perez-Pavon J L , Hernandez-Mendez J. J Chromatogr A , 1996 , 754 : 85
[8] Msagati T A M , Nindi M M. Food Chem , 2007 , 100 : 836
[9] Spisso B F , Jesus A L D E , de Araujo M A G , Monteiro M A. Anal Chim Acta , 2007 , 581 : 108
[10] Koesukwiat U , Jayanta S , Leepipatpiboon N. J Chromatogr A , 2007 , 1 140 : 147
[11] Lamba S , Sanghi S K , Asthana A , Shelke M. Analytica Chimica Acta , 2005 , 552 : 110
[12] Jaraczewska K , Lulek J , Covaci A , Voorspoels S , Kaluba-Skotarczak A , Drews K , Schepens P. Sci Total Environ , 2006 , 372 : 20
[13] Soto-Chinchilla J J , Gamiz-Gracia L , Garcia-Campana A M , Imai K , Garcia-Ayuso L E. J Chromatogr A , 2005 , 1 095 : 60
[14] Filek G , Bergamini M , Lindner W. J Chromatogr A , 1995 , 712 : 355
[15] Zou Q H , Liu Y , Xie M X , Han J , Zhang L. Anal Chim Acta , 2005 , 551 : 184
[16] Pico Y , Redondo M J , Font G , Manes J. J Chromatogr A , 1995 , 693 : 339
[17] Arthur C L , Pawliszyn J. Anal Chem , 1990 , 62 : 2 145
[18] Yang Y Z , Liu G X , He Y B. The Compilation of Farm Produce Pesticide Residue Limitation. Beijing : China Agriculture Press (杨永珍 , 刘光学 , 何艺兵. 农产品农药残留限量标准汇编. 北京 : 中国农业出版社) , 1996 : 8