

浊点萃取 异辛烷反萃取 气相色谱测定 茶叶中拟除虫菊酯农药残留

莫小荣 郑春慧 陈建伟 赵道远 杨明敏*

(南京农业大学理学院, 南京 210095)

摘 要 建立了浊点萃取 异辛烷反萃取 气相色谱 (ECD) 检测茶叶中联苯菊酯 (Bifenthrin)、甲氰菊酯 (Fenpropathrin)、功夫菊酯 (Cyhalothrin)、氯菊酯 (Permethrin)、氰戊菊酯 (Fenvalerate)、溴氰菊酯 (Deltamethrin) 6 种拟除虫菊酯农药残留的方法。对含 1.2% (*m/V*) 聚乙二醇 6000 (PEG6000) 表面活性剂和 40% (*m/V*) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 6 种拟除虫菊酯溶液进行加热萃取, 所获得的富集相用异辛烷超声反萃取, 并经离心对上层异辛烷溶液进行进一步净化处理, 即可获得富集倍数达 75 倍的 6 种农药。本方法的检出限 (LOD) 为: 联苯菊酯、甲氰菊酯和功夫菊酯 0.4 $\mu\text{g/kg}$; 氰戊菊酯 2.1 $\mu\text{g/kg}$; 氯菊酯和溴氰菊酯 3.0 $\mu\text{g/kg}$; 用本方法测定了新鲜茶叶中 6 种拟除虫菊酯农药, 含量分别为 4.17, 4.15, 4.09, 4.01, 3.93 和 3.51 $\mu\text{g/kg}$ 。在上述茶叶样品中添加 20 $\mu\text{g/kg}$ 的 6 种农药后测定, 添加回收率为 72.3% ~ 85.6%; 相对标准偏差为 2.2% ~ 5.6%。

关键词 浊点萃取, 反萃取, 气相色谱, 拟除虫菊酯农药, 茶叶

1 引言

茶叶中拟除虫菊酯类农药残留检测方法主要有气相色谱法 (GC)^[1~4] 和液相色谱法 (HPLC)^[5,6]。茶叶成分复杂, 在检测前需要进行有效的前处理。其前处理方法主要有固相萃取法 (SPE)^[7]、固相微萃取法 (SPME)^[8]、超声波提取法^[6]、微波辅助萃取法 (MAE)^[9] 和基质固相分散法 (MSPD)^[10] 等。这些方法耗时繁琐。浊点萃取 (cloud point extraction, CPE) 在某些方面可以代替上述萃取方法。浊点萃取常用于液相色谱分析前有机样品的前处理^[11~14], 其优点是基本不使用非水溶剂, 操作方便, 但是在分析过程中常需要解决胶束富集相的粘性、表面活性剂在固定相上吸附、表面活性剂本身在紫外区的背景干扰及表面活性剂易堵塞气相色谱柱等问题, 所以浊点萃取方法不能与气相色谱直接联用。为了解决此问题, Sikalo 等^[15] 用反萃取方法从浊点萃取的富集相中反萃取 6 种多联芳烃 (PAHs); Jia 等^[16] 也用同样方法从人尿中反萃取有机磷农药; Zygora 等^[17] 用浊点萃取 反萃取方法富集了增塑剂。由此可见, 由于采用了反萃取方法, 进一步浓缩了样品, 被分析物质的检出限大为降低。

本实验采用浊点萃取方法萃取了茶叶样品中 6 种拟除虫菊酯农药, 然后用异辛烷反萃取, 使原富集相体积从 0.5 mL 减少到 0.2 mL。再用高灵敏的电子捕获器检测, 与浊点萃取后用液相色谱直接检测相比, 甲氰菊酯、溴氰菊酯、功夫菊酯、氰戊菊酯、氯菊酯和联苯菊酯的检出限分别从 2.7, 10.2, 2.3, 7.7, 9.8, 2.5 $\mu\text{g/kg}$ 下降到 0.4, 3.0, 0.4, 2.1, 3.0, 0.4 $\mu\text{g/kg}$ 。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

6820 气相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 配有 ECD 检测器; 色谱工作站 -SiradV 色谱数据处理系统 (上海军锐信息技术有限公司); KQ 3200E 超声仪 (昆山市超声仪器有限公司); Anke TDL-60B 离心机 (上海安亭科学仪器厂制造); HH-S26S 数显恒温水浴锅 (江苏通州试验仪器厂)。

甲氰菊酯 (92.4%)、溴氰菊酯 (98.8%)、功夫菊酯 (95.0%)、氰戊菊酯 (96.5%)、氯菊酯 (94.0%) 和联苯菊酯 (90.0%) 均由江苏省农药研究所提供。分别称取 6 种农药各 0.1 g, 用乙腈溶解, 配制成 1000 mg/L 的标准储备液, 用于浊点萃取过程条件研究; 同样称取 6 种农药各 0.1 g, 用异辛烷溶解, 配

2009-03-30 收稿; 2009-05-06 接受

* E-mail: y7mm452002@yahoo.com.cn

制成 1000 mg/L 标准储备液,用于气相色谱定量分析。上述储备液在冰箱中保存(4),根据实验需要稀释至不同浓度。聚乙二醇 6000(PEG6000),配制成 20% (m/V)的水溶液; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为分析纯;乙腈和异辛烷均为色谱纯,8% (V/V)乙腈水溶液,实验用水均为二次重蒸水。

2.2 浊点萃取 反萃取实验步骤

用 8% (V/V)乙腈水溶液将标准储备液 稀释到 0.01 mg/L 后,取 10 mL 于 20 mL 刻度试管中,加入 0.9 mL 20% (m/V) PEG-6000和 6.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,待 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 完全溶解后再用 8% (V/V)乙腈水溶液定容至 15 mL,置于 30 水浴中保持 30 min,最后以 3500 r/min 转速离心 10 min。用长细针头的注射器吸出水相后,剩余的富集相体积 < 0.5 mL,用蒸馏水稀释至 0.5 mL 后,加入 0.2 mL 异辛烷,超声 25 min,取上层异辛烷相 1 μL 进气相色谱检测。在浊点萃取 反萃取过程中,溶液相当于富集了 75 倍。

2.3 样品处理

称取 1.0 g 已粉碎的市售茶叶样品于 20 mL 刻度试管中,加入 1.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 5.0 mL 8% (V/V)乙腈水溶液,充分振荡摇匀后置于超声波清洗仪中,超声 60 min,过滤后,用 6.0 mL 8% (V/V)乙腈水溶液分 3 次冲洗残渣并过滤,滤液置于离心管中,依次往离心管中加入 0.9 mL 20% PEG-6000和 4.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,用 8% (V/V)乙腈水溶液定容至 15 mL,使 PEG6000、乙腈和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的最终浓度分别为 1.2% (m/V)、8% (V/V)和 40% (m/V)。然后按 2.2 项步骤处理。

2.4 色谱条件

HP-5 石英毛细管柱 (30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm); 高纯氮气 (> 99.999%) 为载气;进样口温度 280 ;检测器温度 300 ;柱升温程序:起始温度 90 ,恒温 1 min 后以 20 /min 升温至 210 ;恒温 1 min 后再以 3 /min 的速率升温至 280 ,恒温 3 min 后再以 10 /min 的速率升温至 310 ;恒温 10 min 待测样品组分全部流出;进样方式:分流进样,分流比 2 8;进样量为 1 μL 。

3 结果与讨论

3.1 色谱分离条件的选择

考察了不同的程序升温条件下 6 种农药标准溶液的分离情况。结果表明,采用 2.4 项的程序升温条件时,6 种农药都能较好的分离。按 2.3 项样品处理方法分别对不含以上农药的茶叶和添加标准农药(添加浓度 0.01 mg/L)的茶叶,其色谱图如图 1。从图 1 可见,茶叶基体对这 6 种农药色谱分析无影响。

3.2 浊点萃取条件的选择

3.2.1 表面活性剂种类和浓度的选择 研究了表面活性剂 Tween-20、TX-100 和 PEG6000 为萃取剂时 6 种农药的回收率。结果发现, Tween-20 和 TX-100 为萃取剂时,平衡温度均需达 50 以上,回收率较低;PEG6000 为萃取剂时,平衡温度较低,萃取效果好,故选用 PEG6000 为萃取剂。以 PEG6000 为浊点萃取的表面活性剂,当其浓度为 0.2% ~ 1.2% (m/V) 时,各农药的回收率增大;当其浓度再增大,对回收率基本没有影响(图 2),但增大了表面活性剂富集相的体积会降低富集倍数。本实验 PEG6000 的浓度选择为 1.2% (m/V)。

3.2.2 盐浓度的选择 电解质的加入可加快相分离行为,并且降低浊点, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 易溶解,而且它的加入使聚乙二醇 6000 体系在室温下即能够完成相分离。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度增加,萃取回收率增大,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度达到 40% (m/V) 时回收率最好,此时溶液接近饱和,再增加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度对回收率无影响(图 3)。故实验中所用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度为 40% (m/V)。

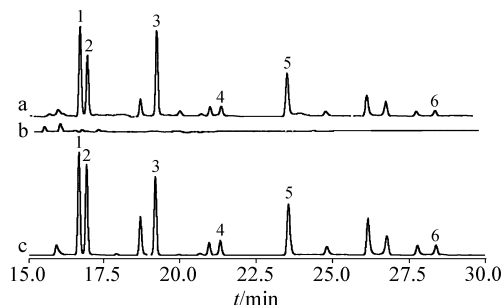


图 1 6 种农药色谱图 (a), 茶叶空白 (b) 和加标茶叶样品色谱图 (c)

Fig 1 Chromatograms of six pesticides (a), blank tea sample (b) and tea sample spiked with standard pesticides (c)

1. 联苯菊酯 (bifenthrin); 2. 甲氰菊酯 (fenpropathrin); 3. 功夫菊酯 (cyhalothrin); 4. 氯菊酯 (permethrin); 5. 氰戊菊酯 (fenvalerate); 6. 溴氰菊酯 (deltamethrin)。

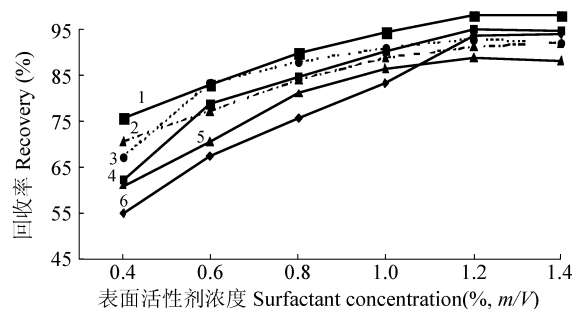


图 2 表面活性剂浓度对 6 种农药萃取回收率的影响

Fig 2 Effect of surfactant concentration on extraction recovery of six pesticides

1. Bifenthrin; 2. Fenpropathrin; 3. Cyhalothrin; 4. Permethrin;
5. Fenvalerate; 6. Deltamethrin

3.2.3 平衡时间的选择 实验探讨了不同平衡时间对浊点萃取的影响,浊点萃取体系在 30 ℃ 水浴中分别保持 10 ~ 70 min。实验表明,当平衡时间为 30 min 时,各个农药的回收率达到最大;但当平衡时间过长,会导致浊点萃取向相反方向变化,表面活性剂相逐渐消失。在两相完全分离的情况下,平衡 30 min 即可。为使富集相和稀释相分层清晰,两相分离后以 3500 r/min 离心 10 min。

3.2.4 平衡温度的选择 温度对于表面活性剂胶束的性质,尤其是分相后形成的凝聚相体积和含水量均有较大的影响。样品按照前面优化条件处理后,在 20, 30, 40, 50 和 60 ℃ 水浴中分别平衡 30 min。实验表明(图 4);从 20 ~ 30 ℃ 所有农药回收率上升;30 ~ 40 ℃ 联苯菊酯、氯菊酯和甲氰菊酯回收率基本不变;但温度高于 40 ℃ 后回收率下降。而功夫菊酯、溴氰菊酯和氰戊菊酯在 30 ℃ 后回收率下降。故本实验采用的浊点萃取温度为 30 ℃。

3.3 异辛烷反萃取条件的选择

按 3.2 条件分成清晰两相的体系,用长注射针从下层移去稀释相后加入水不互溶溶剂进行反萃取。正己烷和氯仿也可以用于反萃取,但是正己烷和氯仿具有强的挥发性,超声反萃取过程易挥发导致结果重现性差。故选择异辛烷作为反萃取剂^[15-17]。

3.3.1 异辛烷反萃取体积选择 考察了异辛烷的体积对回收率的影响,异辛烷体积为 0.1 ~ 0.15 mL 时,虽然被测组分富集倍数高,但体积小表面活性剂浓度大,并给转移异辛烷离心净化带来不便,检测重现性差;异辛烷体积过大,被测组分富集倍数越小;当异辛烷体积为 0.2 ~ 0.3 mL 时,即可获得满意结果。故选择 0.2 mL 异辛烷进行反萃取。

3.3.2 超声时间对反萃取效率的影响 超声能加快被测组分从表面活性剂相中转移到异辛烷中,为防止异辛烷挥发,在封闭状态下进行超声。图 5 显示反萃取效率随超声时间增加而增加。当超声 25 min 时,异辛烷的萃取效率最高。

3.3.3 离心净化 经超声分离后的异辛烷 表面活

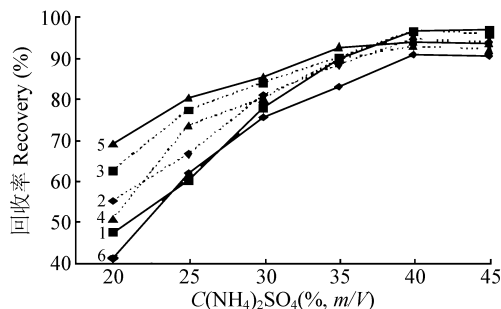


图 3 盐浓度对 6 种农药萃取回收率影响

Fig 3 Effect of salt addition concentration on extraction recovery of six pesticides

1. Bifenthrin; 2. Fenpropathrin; 3. Cyhalothrin; 4. Permethrin;
5. Fenvalerate; 6. Deltamethrin

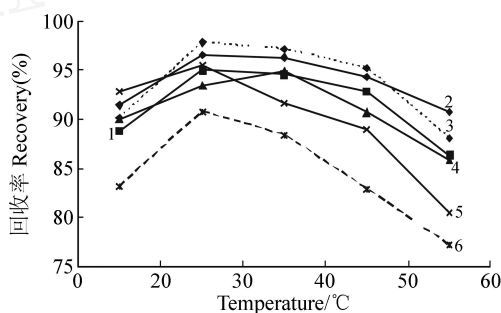


图 4 温度对 6 种农药萃取回收率影响

Fig 4 Effect of temperature on extraction recovery of six pesticides

1. Bifenthrin; 2. Fenpropathrin; 3. Cyhalothrin; 4. Permethrin;
5. Fenvalerate; 6. Deltamethrin

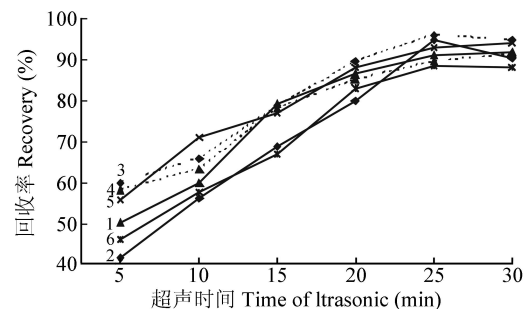


图 5 超声反萃取时间对 6 种农药萃取回收率影响

Fig 5 Effect of time of ultrasonic back extraction on extraction recovery of six pesticides

1. Bifenthrin; 2. Fenpropathrin; 3. Cyhalothrin; 4. Permethrin;
5. Fenvalerate; 6. Deltamethrin

性剂富集相界面不清晰,为净化异辛烷相,将上层异辛烷小心移到 1.5 mL 离心管中,以 6000 r/min 离心 3 min 后,取上层清液进样。

3.4 线性关系、检出限、线性范围

取不同浓度的 6 种拟除虫菊酯类农药标准溶液按照 2.4 项的色谱条件分别进样,确定它们的定量范围和检出限。为了与高效液相色谱法比较,将按步骤 2.2 取得的表面活性剂富集相直接注入 HPLC 系统,得到的检出限列入表 1。从表 1 可见,反萃取法检出限比 HPLC 方法下降了 2.3~5.8 倍。

表 1 浊点萃取 反萃取法的各种分析数据

农药 Pesticide	回归方程 Linear equation	R ²	Linear range (μg/kg)	RSD ^a (%, n = 5)	LOD ^b (μg/kg)	CPE-HPLC LOD ^c (μg/kg)
联苯菊酯 Bifenthrin	$Y = 2.705 \times 10^7 X + 9.521 \times 10^5$	0.9987	0.9~500	2.3	0.4	2.5
甲氰菊酯 Fenpropathrin	$Y = 1.375 \times 10^6 X + 5.765 \times 10^4$	0.9975	1.2~500	3.8	0.4	2.7
功夫菊酯 Cyhalothrin	$Y = 3.222 \times 10^6 X + 4.872 \times 10^4$	0.9989	1.1~500	2.0	0.4	2.3
氯菊酯 Pemethrin	$Y = 5.115 \times 10^4 X + 2.317 \times 10^3$	0.9896	8.9~500	4.4	3.0	9.8
氰戊菊酯 Fenvalerate	$Y = 1.074 \times 10^5 X + 0.899 \times 10^4$	0.9885	6.3~500	5.2	2.1	7.7
溴氰菊酯 Deltamethrin	$Y = 3.083 \times 10^4 X - 1.025 \times 10^3$	0.9704	9.5~500	5.1	3.0	10.2

a concentration: 0.01 mg/kg; b S/N = 3

3.5 回收率与精密度

在 1.00 g 空白茶样里分别添加 3 种不同浓度 (0.01, 0.05 和 0.1 mg/kg) 的混合标准溶液各 1.0 mL,充分混匀后测定 5 次,结果见表 2。

表 2 浊点萃取 反萃取法添加回收率 (n = 5)

农药 Pesticide	添加浓度 Added (0.01 mg/kg)		添加浓度 Added (0.05 mg/kg)		添加浓度 Added (0.1 mg/kg)	
	平均回收率 Recovery (%)	RSD (%)	平均回收率 Recovery (%)	RSD (%)	平均回收率 Recovery (%)	RSD (%)
联苯菊酯 Bifenthrin	85.6	5.8	88.9	4.0	94.8	3.6
甲氰菊酯 Fenpropathrin	83.1	2.5	85.7	5.1	92.4	3.2
功夫菊酯 Cyhalothrin	86.8	2.1	90.3	2.8	95.6	2.5
氯菊酯 Pemethrin	82.8	3.3	84.1	6.9	93.9	8.2
氰戊菊酯 Fenvalerate	80.3	6.4	86.6	7.1	90.1	4.5
溴氰菊酯 Deltamethrin	71.5	7.2	77.2	5.3	80.3	5.9

3.6 样品检测

将浓度约 50 μg/kg 的 6 种农药的混合溶液喷洒在未喷洒过农药的新鲜茶叶上,2 h 后采集;取风干后 (剪碎) 的新鲜茶叶 1.00 g 于 20 mL 刻度试管中,添加浓度为 20 μg/kg 的 6 种农药混合标准溶液 1.0 mL,以本方法进行检测,结果见表 3。

表 3 新鲜茶叶样品中农药检测结果 (n = 3)

农药 Pesticide	检出浓度 Found (μg/kg)	添加检出浓度 Total found (μg/kg)	回收率 Recovery (%, n = 3)	RSD (%, n = 3)
联苯菊酯 Bifenthrin	4.17	21.29	85.6	3.3
甲氰菊酯 Fenpropathrin	4.15	20.59	82.2	4.3
功夫菊酯 Cyhalothrin	4.09	20.89	84.0	5.0
氯菊酯 Pemethrin	4.01	20.71	83.5	2.2
氰戊菊酯 Fenvalerate	3.93	20.49	82.8	4.4
溴氰菊酯 Deltamethrin	3.51	17.97	72.3	5.6

Standard added: 20 μg/L.

4 结 论

采用浊点萃取 异辛烷反萃取 气相色谱法测定茶叶中多种除虫菊酯农药残留,能显著提高检测灵敏度,并能满足欧盟对茶叶制定农药最高残留限量 (MRLs) 的要求 (如欧盟规定茶叶中一些农药的 MRLs 为:甲氰菊酯 0.02 mg/kg,溴氰菊酯为 5 mg/kg,功夫菊酯为 0.1 mg/kg,氰戊菊酯为 0.05 mg/kg,氯菊酯为 0.1 mg/kg,联苯菊酯为 5 mg/kg 等);本方法可用于进出口茶叶中上述 6 种农药残留的检测。

References

- 1 Hu Bei-Zhen(胡贝贞), Song Wei-Hua(宋伟华), Xie Li-Ping(谢丽萍), Shao Tie-Feng(邵铁锋). *Chinese J. Chromatogr*(色谱), **2008**, 26(1): 22 ~ 28
- 2 Liu Zhong(刘忠), Xie Ke-Jin(谢克锦), Chen Qi-Xiang(陈启祥), Wang Sheng-Hua(王圣华). *Chinese Journal of Analysis Laboratory*(分析实验室), **2002**, 21(6): 103 ~ 104
- 3 Li Yong-Jun(李拥军), Huang Zhi-Qiang(黄志强), Dai Hua(戴华), Zhang Ying(张莹). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2002**, 30(7): 865 ~ 868
- 4 Hu Y Y, Zheng P, He Y Z, Sheng G P. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1098: 188 ~ 193
- 5 Wen Yu-Yun(温裕云), Gong Zhen-Bin(弓振斌), Yao Jian-Min(姚剑敏). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2005**, 33(3): 301 ~ 304
- 6 Duan Wei(段伟), Li Zheng-Guo(李正国), Wang Guo-Min(王国民), Yang Ying-Wu(杨迎五), Li Ying-Guo(李应国), Xia Yu-Xian(夏玉先). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2006**, 34(12): 1776 ~ 1778
- 7 Lou Zheng-Yun(楼正云), Chen Zong-Mao(陈宗懋), Luo Feng-Jian(罗逢健), Tang Fu-Bin(汤富彬), Liu Guang-Ming(刘光明). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2008**, 26(5): 568 ~ 576
- 8 Zeng J B, Chen J M, Lin Z Q, Chen W F, Chen X, Wang X R. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 619: 59 ~ 66
- 9 Zeng Xiao-Xing(曾小星), Wan Yi-Qun(万益群), Xie Ming-Yong(谢明勇). *Food Science*(食品科学), **2008**, 29(11): 562 ~ 566
- 10 Jiang Ying(蒋迎), Zheng Ping(郑平), Lu Cheng-Yin(鲁成银). *Journal of Tea*(茶叶), **2007**, 33(3): 147 ~ 149
- 11 Delgado B, Pino V, Ayala J H, González V, Afonso A M. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 518: 165 ~ 172
- 12 Cantero M, Rubio S, Bendito D P. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1046: 147 ~ 153
- 13 Halko R, Huttá M. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 466: 325 ~ 333
- 14 Sanz C P, Halko R, Ferrera Z S, Rodríguez J J S. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1078: 13 ~ 21
- 15 Sikabots T I, Paleologos E K. *Anal. Chim.*, **2005**, 77: 2544 ~ 2549
- 16 Jia G F, Li C G, Zhu W T, Qiu J, Wang X Q, Zhou Z Q. *J. Hazardous Materials*, **2008**, 159: 300 ~ 305
- 17 Zygora P D, Paleologos E K, Riganakos K A, Kontomina M G. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1093: 29 ~ 35

Cloud Point Extraction Coupled with Ultrasonic-assisted Back-extraction for Determination of Pyrethroid Pesticides in Tea by Gas Chromatography with Electron Capture Detection

MO Xiao-Rong, ZHENG Chun-Hui, CHEN Jian-Wei, ZHAO Dao-Yuan, YANG Ming-Min*

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

Abstract A method was developed for the determination of pyrethroid pesticides: bifenthrin (BF), fenpropathrin (FP), cyhalothrin (CH), permethrin (PM), fenvalerate (FV) and deltamethrin (DI) in tea proposed using the cloud point extraction (CPE) coupled with ultrasonic-assisted back-extraction prior to gas chromatography with electron capture detection. A pyrethroid solution containing 1.2% (*m/V*) polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) and 40% (*m/V*) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was heated for the extraction of the pyrethroid pesticides. The coacervation phase obtained was back-extracted with isooctane. The upper isooctane solution was centrifuged simply for further cleanup. A preconcentration factor of 75 was obtained for these six pesticides. The limits of detection (LODs) were 0.4 $\mu\text{g/kg}$ for BF, FP and CH, 2.1 $\mu\text{g/kg}$ for FV and 3.0 $\mu\text{g/kg}$ for PM and DI respectively. Six pyrethroid pesticides, BF, FP, CH, FV, DM and DI, were determined, the amounts were 4.17, 4.15, 4.09, 4.01, 3.93 and 3.51 $\mu\text{g/kg}$. Six pyrethroid pesticides standards of 20 $\mu\text{g/kg}$ were added in the tea samples mentioned above, the spiked recoveries were 72.3% - 85.6% and the relative standard deviations were 2.2% - 5.6%.

Keywords Cloud point extraction, back-extraction, gas chromatography, pyrethroid pesticide, tea

(Received 30 March 2009; accepted 6 May 2009)