

柱后光化学反应荧光检测高效液相色谱法测定 茶叶中的五种菊酯类农药残留

温裕云¹ 弓振斌^{* 1,2} 姚剑敏¹

¹ (厦门大学海洋学系, 厦门 361005)

² (厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘 要 建立了柱后光化学反应荧光检测高效液相色谱法测定茶叶中菊酯类农药残留的方法。采用 Hypersil ODS 色谱柱, 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱进行分离。用自制的光化学反应器作为荧光衍生装置, 优化了柱后光化学反应的实验条件, 并用于茶叶样品中菊酯类农药残留的测定。方法的检出限为 0.012 ~ 0.048 $\mu\text{g/g}$ (干重); 线性范围 0.040 ~ 8.0 $\mu\text{g/g}$, 相对标准偏差 3.4% ~ 6.4% (0.1 mg/L, $n=8$)。

关键词 柱后光化学反应 荧光检测 高效液相色谱 菊酯类农药残留 茶叶

1 引 言

茶叶是我国重要出口农产品, 为了提高我国茶叶产品在国际上的竞争力, 应依据不同国家和地区对茶叶农药残留限量标准^[1]的规定, 尽快建立和完善茶叶制品中农药残留检测技术和安全卫生保证体系。

拟除虫菊酯类农药残留量测定方法主要有气相色谱法 (GC) 和高效液相色谱法 (HPLC)。GC 测定菊酯类农药残留具有分离效果好、快速、灵敏度高的优点^[2,3], 但拟除虫菊酯具有热不稳定性, 用 GC 测定时需要较高的气化温度, 且对实际样品的净化过程要求严格; 近年来用 HPLC 法测定拟除虫菊酯的报道逐渐增多^[4-6], 但紫外-可见检测器灵敏度低、选择性差, 难以满足实际样品分析的需要; 高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 设备昂贵, 操作复杂, 一般实验室无法实现。

光化学荧光法 (PCF) 是建立在光化学反应基础上的荧光分析技术^[7]。它以光子为衍生试剂, 实验装置简单、灵活, 方法灵敏度和选择性较紫外-可见检测器有较大的改善。近年来 PCF 和流动注射分析 (FIA)^[8-10]、HPLC^[5,11-14] 等技术相结合, 应用于药物分析^[9,10]、环境污染物分析^[11]、农药残留分析^[5,8,14] 等领域, 已逐渐显示其独特的优点。本实验在前期工作^[15,16]的基础上, 系统研究了光化学衍生的各种主要影响因素, 优化了光化学衍生的实验条件, 以光化学衍生荧光检测技术实现了茶叶中菊酯类农药残留的高灵敏检测, 建立了简便、可靠、灵敏的菊酯类农药残留检测方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪 (美国 Hewlett Packard 公司)。系统配置: HP G1312A 二元泵; HP G1315A 二极管阵列检测器 (DAD); HP G1321A 荧光检测器 (FLD); Rheodyne 7725i 进样器; 20 μL 定量环; HP ChemStation 色谱工作站; Hypersil ODS 色谱柱 (5 μm , 250 mm \times 4.0 mm i.d., Germany)。光化学反应器 (自制) 如图 1 所示。反应器包括紫外衍生光源 (15 W 低压汞灯, 螺旋形), 流路 (PTFE 反应管, 美国 Zeus Industrial Products 公司), 光化学反应的温度控制模块 (恒温箱, 实验室自制), 接口 (PEEK 头), 光反射壁 (铝箔)。正庚烷、乙腈为色谱纯 (美国 Tedia 公司)。实验用水为超纯水。甲氰菊酯、氯氰菊酯 (96.8%) 标准品购于德国 Sigma 公司, 氰戊菊酯 (99.9%) 标准品购于 RdH 公司, 联苯菊酯和氟胺氰菊酯购于农业部环境保护科研监测所。上述农药标准品均用正庚烷配制成一定浓度的标准混合物。

2.2 实验方法

色谱分离条件是在前期工作^[15]的基础上进一步优化确定的。进行色谱分离条件优化时检测器仍然用 DAD, 待分离条件确定后用自制的光化学荧光衍生装置在 DAD 检测器后进行光化学衍生反应, 然

后用 FLD 进行检测,从而进行光化学反应条件的优化。实际样品的测定按文献 [15] 的预处理方法进行,最后以本工作优化后的实验条件进行测定。

3 结果与讨论

3.1 流动相及其配比、流速

以前的实验采用乙腈/水为流动相^[15],在乙腈/水 = 74/26 且流速为 1.2 mL/min 时,5 种菊酯类农药能完全分开,但联苯菊酯的保留时间较长且谱峰较宽。因此,本实验采用了梯度洗脱程序,以缩短联苯菊酯的保留时间并改善其峰形。实验结果表明,以下的梯度洗脱程序能使各组分得到良好的分离且分析时间较短: 0 ~ 8.7 min, MeCN/H₂O = 74/26; 8.7 ~ 11.0 min, MeCN/H₂O 从 74/26 变为 85/15; 11 ~ 20 min, MeCN/H₂O = 85/15。流速均为 1.0 mL/min。采用梯度洗脱后荧光检测器基线比二极管阵列检测器基线稳定,并在 15 min 内能分析完毕。

流动相组成会影响柱后光化学反应速度、产物以及产物的荧光发射强度。在实验条件下,选定的流动相配比可以得到满意的荧光信号强度。

3.2 荧光检测器激发、发射波长的选择

5 种菊酯类农药除联苯菊酯外,其它各组分在没有经过紫外光照射时均没有荧光发射;而经紫外光照后,各组分均有较强的荧光(如图 2 所示)。甲氰菊酯、氯氰菊酯、氰戊菊酯、氟胺氰菊酯光化学反应产物的激发光谱曲线均有两个峰值,波长分别为 279 和 221 nm;但各组分在 279 nm 时荧光信号的基线较高且不稳定,因而适宜选择 221 nm 为激发波长。联苯菊酯光化学反应产物的激发光谱曲线也有两个峰值,波长分别为 258 和 206 nm。综合考虑其它组分在这两个激发波长下均不能得到最强的荧光信号,且联苯菊酯的产物在 221 nm 波长下其荧光信号仍然较强,因此选择 λ_{em} 为 221 nm。

甲氰菊酯、氯氰菊酯、氰戊菊酯、氟胺氰菊酯光化学反应产物的最大发射波长为 320 nm,联苯菊酯为 340 nm。为了使甲氰菊酯、氯氰菊酯、氰戊菊酯、氟胺氰菊酯有最大的荧光信号,选择 λ_{em} 为 320 nm。

3.3 PTFE 管内径的选择

实验中采用了 3 种不同内径(分别为 0.46、0.38 和 0.30 mm)的 PTFE 管进行实验。对 PTFE 管内径的选择要考虑以下因素:(1)应该与色谱分离系统采用的连接管内径尽量一致,以减少色谱分离效率的损失;(2)PTFE 管较小的内径容易使紫外光充分照射管内的流体;(3)流动相流速相同时,较小的 PTFE 管内径使流动相的线速度加快,减少了紫外光照射的时间。实验结果表明,采用内径为 0.30 mm 的 PTFE 管,色谱分离效率的损失最小,同时使紫外光的照射较充分,获得较强的荧光信号。

3.4 光化学反应的时间及 PTFE 管长度的选择

在 PTFE 管长度一定时,光化学反应的时间随着流动相流速的加快而缩短,荧光信号也随着流速的

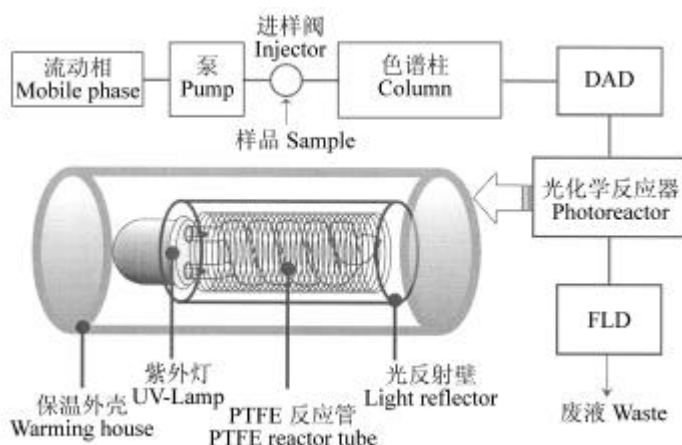


图 1 实验系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of the experimental

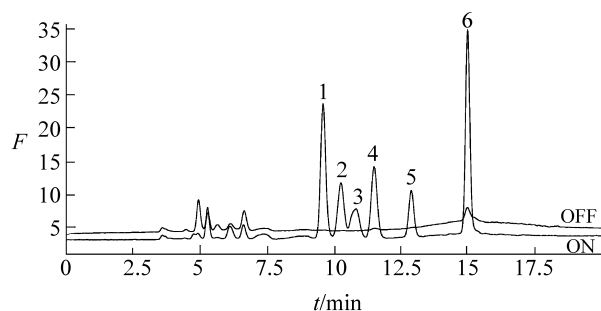


图 2 5 种菊酯类农药色谱图(组分的浓度均为 1.0 mg/L, 20 μ L 进样)

Fig.2 Chromatogram of five pyrethroid pesticides (1.0 mg/L, 20 μ L injection)

1. 甲氰菊酯 (fenpropathrin); 2. 氯氰菊酯 1 (cypermethrin 1); 3. 氯氰菊酯 2 (cypermethrin 2); 4. 氰戊菊酯 (fenvalerate); 5. 氟胺氰菊酯 (tau-fluvalinate); 6. 联苯菊酯 (bifenthrin).
OFF: 衍生光源关 (the ultraviolet (UV)-lamp is OFF); ON: 衍生光源开 (the ultraviolet (UV)-lamp is ON).

加快而变小。图 3 为 PTFE 管长度为 15m 时流动相流速对荧光信号强度的影响。综合考虑荧光信号强度、谱峰变宽和色谱分离效率,确定 1.0 mL/min 为流动相的最佳流速。此外,还进行了在一定流速 (1.0 mL/min) 下,实验了不同长度 (分别为 6 m、10 m 和 15 m) 的 PTFE 管对荧光信号的影响,结果表明:在管长为 15 m 时的荧光信号最大。

3.5 光化学反应温度

光化学反应的温度对光化学反应的速率与效率有重要的影响。实验采用能精确控制温度的恒温箱来调节光化学反应的温度,研究了不同反应温度对荧光信号强度的影响 (如图 4)。图中的结果表明,甲氰菊酯、氯氰菊酯、氰戊菊酯、氟胺氰菊酯在温度为 68 时荧光信号 (峰面积) 最大,联苯菊酯的荧光信号 (峰面积) 随着温度的升高而增大,综合考虑各组分的荧光信号强度,本实验采用的光化学反应的温度为 68 。

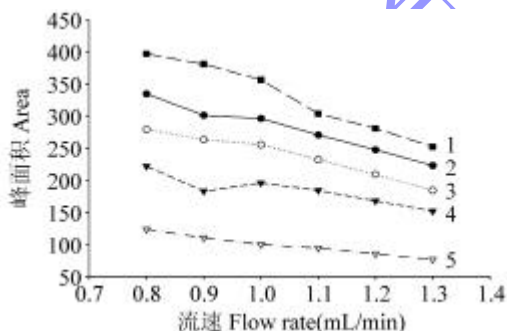


图 3 5 种菊酯类农药不同流速下荧光信号强度图

Fig.3 Fluorescence intensity vs. flow rate

1. 联苯菊酯 (bifenthrin); 2. 甲氰菊酯 (fenpropathrin);
3. 氯氰菊酯 (cypermethrin); 4. 氰戊菊酯 (fenvalerate);
5. 氟胺氰菊酯 (tau-fluvalinate).

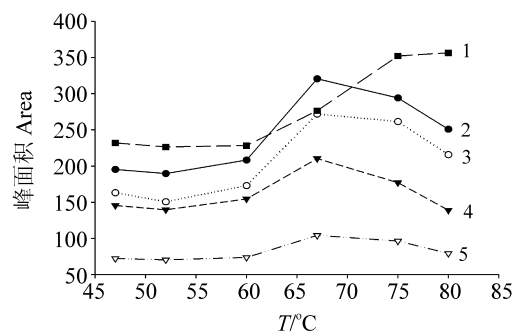


图 4 5 种菊酯类农药不同温度时荧光信号强度图

Fig.4 Fluorescence intensity vs. photoreaction temperature

曲线 1~5 同图 3 (curves 1~5 are the same as in Fig.3).

3.6 方法的检出限、线性范围和精密度

实验采用峰面积的方法对待测目标物进行定量。表 1 列出了方法的检出限、线性范围以及相对标准偏差。检出限定义为信噪比 (S/N) 为 3 时所对应的方法检出限^[17],其中噪音测量的时间为 20 min。表 1 中的检出限已经换算为固体茶叶样品中最终能检出的目标物的含量 ($\mu\text{g/g}$),即样品制备中称取的茶叶样品为 1.000 g,经提取、净化、浓缩后的测定溶液体积为 0.20 mL。表中列出的线性范围是工作中实际验证的目标物含量范围。在此浓度范围内,待测组分浓度与其相应的色谱峰面积呈线性关系,对超出该范围的较低或较高浓度,并未进一步验证。相对标准偏差是 0.1 mg/L 标准溶液平行进样 8 次实验所得。

3.7 实际样品测定

实际样品测定时按文献 [15] 的方法对样品进行预处理,按优化后的实验条件

进行测定。4 个茶叶样品的测定结果见表 2。方法的检测能力完全满足欧盟对茶叶中农药最高残留量 (MRL) 新标准的分析要求。方法具有溶剂使用量少、净化效果好、操作简便、快速、选择性好等特点。

表 1 方法的检出限、线性范围及相对标准偏差

Table 1 Detection limits, linear ranges, and relative standard deviations for the developed method

组分 Components	检出限 ($\mu\text{g/g}$) Detection limit	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/g}$)	相对标准偏差 RSD ($n=8, \%$)
甲氰菊酯 Fenpropathrin	0.020	0.040 ~ 6.4	3.4
氯氰菊酯 Cypermethrin	0.040	0.080 ~ 8.0	6.0
氰戊菊酯 Fenvalerate	0.040	0.080 ~ 8.0	6.4
氟胺氰菊酯 Tau-fluvalinate	0.048	0.096 ~ 8.0	5.0
联苯菊酯 Bifenthrin	0.012	0.024 ~ 4.0	3.4

表 2 实际茶叶样品中菊酯类农药残留量 ($\mu\text{g/g}$)

Table 2 Analytical results of pesticide residues in real world tea samples ($\mu\text{g/g}$)

组分 Components	样品 1 Sample 1	样品 2 Sample 2	样品 3 Sample 3	样品 4 Sample 4
甲氰菊酯 Fenpropathrin	4.94	5.88	1.69	ND
氯氰菊酯 Cypermethrin	7.14	4.99	1.53	ND
氰戊菊酯 Fenvalerate	1.06	1.53	0.904	ND
氟胺氰菊酯 Tau-fluvalinate	ND	ND	ND	ND
联苯菊酯 Bifenthrin	ND	0.898	ND	ND

ND: 未检出 (not detected)

References

- 1 Chen Shirong(陈石榕). World Standardization & Quality Management(世界标准化与质量管理), 2000, (7): 28 ~ 29
- 2 Chen Z M, Wang Y H. J. Chromatogr. A, 1996, 754(1-2): 367 ~ 395
- 3 Li Yongjun(李拥军), Huang Zhiqiang(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 Martínez G M, Martínez V J L, Gamdo F A, Gil G M D. J. Chromatogr. A, 1996, 727(1): 39 ~ 46
- 5 López-López T, Gil-García M D, Martínez Vidal J L, Martínez Galera M. Anal. Chim. Acta, 2001, 447(1-2): 101 ~ 111
- 6 Lin Weixuan(林维宣), Li Jiye(李继业), Wang Mei(王玫), Tian Miao(田苗). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 2001, 11(1): 31 ~ 32
- 7 Guo Xiangqun(郭祥群), Xu Jingou(许金钩), Chen Guozhen(陈国珍). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 1991, 19(2): 244 ~ 252
- 8 Vilchez, J L, Valencia M C, Navalón A, Molinero-Morales B, Capitán-Vallvey L F. Anal. Chim. Acta, 2001, 439(2): 299 ~ 305
- 9 Zhu Jingping(朱京平), Chen Hengwu(陈恒武), Fang Qiongjun(方琼君). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 1997, 25(5): 573 ~ 575
- 10 Ren Yiping(任一平), Chen Hengwu(陈恒武), Chen Qingjun(陈青俊), Bao Lianbin(包敛彬), Huang Baifen(黄百芬), He Qiaohong(何巧红). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2000, 28(5): 554 ~ 558
- 11 Lores M, García C M, Cela R. J. Chromatogr. A, 1994, 683(1): 31 ~ 44
- 12 Lores M, García C M, Cela R. J. Chromatogr. A, 1996, 724(1-2): 55 ~ 65
- 13 Lores M, Cabaleiro O, Cela R. Trends Anal. Chem., 1999, 18(6): 392 ~ 400
- 14 de la Peña M A, Mahedero M C, Bautista-Sánchez A. Talanta, 2003, 60(2-3): 279 ~ 285
- 15 Li Yunchun(李云春), Yi Jun(易军), Gong Zhenbin(弓振斌), Zhang Shuiba(张水坝), Zheng Wenhui(郑文慧). Journal of Xiamen University (Natural Science)(厦门大学学报(自然科学版)), 2003, 42(1): 78 ~ 82
- 16 Wen Yuyun(温裕云), Gong Zhenbin(弓振斌), Yao Jiamin(姚剑敏), Zhang Yingwu(张英武). Analytical Instrumentation(分析仪器), 2004, (2): 14 ~ 17
- 17 Packard H. Understanding Your Chem Station. 5th Edition, Germany 05/98, G2070-91111: 249

Determination of Pyrethroid Pesticides in Chinese Tea by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection of a Post elution Photoirradiation System

Wen Yuyun¹, Gong Zhenbin^{1,2}, Yao Jiamin¹

¹ (Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005)

² (Key Laboratory of Marine Environmental Science of the Ministry Education, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract A method for the determination of fenpropathrin, cypermethrin, fenvalerate, tau-fluvalinate, and bifenthrin residues in Chinese tea using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection of a post elution photoirradiation system has been developed. The pyrethroid pesticides were separated by Hypersil ODS column and eluted using acetonitrile/water with a gradient program. The experimental conditions of post elution photoirradiation system for fluorescence detection were optimized using laboratory-built photochemical reactor for fluorescence derivation. The optimized conditions were applied to determine the pyrethroid pesticide residues in Chinese tea samples. Detection limits ($S/N = 3$) for pesticide analytes were in the range of 0.012 ~ 0.048 $\mu\text{g/g}$ (dry weight). Relative standard deviations ranged from 3.4% to 6.4% (0.1 mg/L, $n = 8$).

Keywords Post elution photoirradiation, fluorescence detection, high performance liquid chromatography, pyrethroid pesticide residues, tea

(Received 9 March 2004; accepted 15 November 2004)