

采用 MECC 在线堆积同步检测茶叶中七种残留农药

马海乐^{1,2,3}, 祝子坪¹, 刘 姜¹, 骆 琳^{1,2}, 何荣海^{1,2}, 王振斌^{1,2}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 江苏省农产品生物加工与分离工程技术研究中心, 镇江 212013;
3. 河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003)

摘 要: 为解决茶叶中的痕量农药残留的快速检测问题, 建立了一种基于胶束毛细管电泳在线堆积技术的茶叶中 7 种拟除虫菊酯类农药痕量残留的一次进样同步检测方法。通过参数优化, 得到最优的柱上在线堆积浓缩操作工艺: 以 15% 异丙醇、20% 乙腈、60 mmol/L 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 50 mmol/L tris 的混合物为背景缓冲溶液 (BGS)。茶叶的浸提液经过固相萃取净化吹干后, 用 1 mmol/L SDS 溶解溶液残渣。进样 100 s 后施加反向电压, 进行农药反向在线堆积, 当电流恢复至正常分离时的 95% 时改变电压方向, 进行正常分离。经过在线堆积浓缩, 7 种拟除虫菊酯类农药痕量残留堆积因子均高于 17, 回收率在 82% 以上, 检测下限分别达到: 功夫菊酯 0.05 mg/kg、联苯菊酯 0.05 mg/kg、百树菊酯 0.05 mg/kg、高效氯氰菊酯 0.05 mg/kg、溴氰菊酯 0.2 mg/kg、二氯菊酯 0.05 mg/kg、氰戊菊酯 0.05 mg/kg, 满足了 2006 年欧盟茶叶中拟除虫菊酯类农药残留的最低标准。

关键词: 胶束毛细管电泳; 反向电压堆积; 拟除虫菊酯; 茶叶; 残留农药; 同步检测

中图分类号: TP274.5; S481.8; S432

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2008)-8-0157-05

马海乐, 祝子坪, 刘 姜, 等. 采用 MECC 在线堆积同步检测茶叶中七种残留农药[J]. 农业工程学报, 2008, 24(8): 157-161.

Ma Haile, Zhu Ziping, Liu Jiang, et al. Synchronous detection of seven persistent pyrethroid pesticides in tea by MECC using reversed electrode polarity stacking concentration technique[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(8): 157-161. (in Chinese with English abstract)

0 引 言

从 2006 年起欧盟降低了茶叶中拟除虫菊酯类农药残留的最低标准, 使茶叶中农药痕量残留的问题成为出口贸易中的一项障碍^[1,2]。虽然中华人民共和国进出口检验检疫行业标准 SN/T 1117-2002 已经制定了进出口茶叶中氟氯氰菊酯、氯氟氰菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯和二氯菊酯等多种菊酯类农药残留量的 (GC-ECD) 检测方法^[3], 但是 GC-ECD 方法广泛的应用仍然存在一些问题, 难以满足痕量拟除虫菊酯类农药残留快速高效检测的需求。这些问题主要集中在: 1) 有些农药不耐高温, 而有些则沸点较高, 不利于同时检测; 2) ECD 检测器中的放射源需定期更换成本较高。

如果使用高效液相色谱 (HPLC) 检测需要消耗大量的有机溶剂, 对于痕量物质的检测柱效不高, 且有时不同类型的检测物质需要不同 HPLC 柱, 不能满足分析检测机构经常变化检测物质的需要^[4]。

胶束毛细管电泳 (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC) 利用表面活性剂在超过临界胶束浓度后在缓冲溶液中形成的胶束, 实现了色谱和电泳的完美结合, 使毛细管电泳对不带电的中性物质也有很好的分离效果^[5]。因此使用 MECC 有可能可以解决上述存在的问题。然而常规的毛细管电泳存在进样体积小和

在柱检测光程短的缺点。虽然通用性的紫外检测器的质量检测下限很低, 但是样品的浓度检测下限依然很高 (比 HPLC 高出几个数量级), 这使 MECC 在实际样品痕量组分的分离分析中受到了很大的限制。为此, Joselito P 和 Shigeru Terabe^[6-10]开发出了适用于 MECC 的 5 种柱上样品堆积方法^[6-10], 通过对样品、背景缓冲溶液的组成和 pH 值以及进样程序进行简单的调控即可实现, 无需对商品仪器进行改造。对于已经建立的色谱分离方法根据所用缓冲溶液的 pH 值选择合适的柱上堆积方式, 降低样品的浓度检测下限, 拓展 CE 在包括痕量分析的众多领域的应用^[11-13]。

本文的研究方法是将胶束毛细管电泳的柱上样品堆积方法应用于茶叶中痕量拟除虫菊酯类农药残留的检测下限的降低。由于菊酯类农药中的酯基结构在酸性条件下容易发生水解, 故运行缓冲溶液的 pH 值须大于 3, 因此选用了反向电压堆积, 利用电渗流将基质排出, 增强待检测物质的分离度, 减少峰扩散。

1 参数定义

1.1 反向电压堆积模式

所谓的反向电压堆积模式下的 MECC (REPSM-MECC) 不只包括堆积过程本身, 而是囊括了从样品准备到样品区带被检测到这一系列过程, 具体操作分三个步骤: (1) 如图 1A 所示, 首先向毛细管中充满高电导率的背景缓冲溶液 (BGS), 然后通过长时间的进样向毛细管中注入低电导率的样品溶液 (S); (2) 如图 1B 所示, 在进样端处加上负电压, 检测器端加正电压, 将毛细管

收稿日期: 2007-05-13 修订日期: 2008-05-04

作者作者: 马海乐, 博士, 博士生导师, 教授, 河南科技大学兼职教授, 研究方向: 食品功能因子的提取, 食品生物技术与食品安全。镇江 江苏大学食品与生物工程学院, 212013。Email: mhl@ujs.edu.cn

两端分别放入背景缓冲溶液中；(3) 如图 1C 和图 1D 所示，当电流达到正常分离时的 97%~99% 时转换电压方向，维持电压直至分离过程结束。

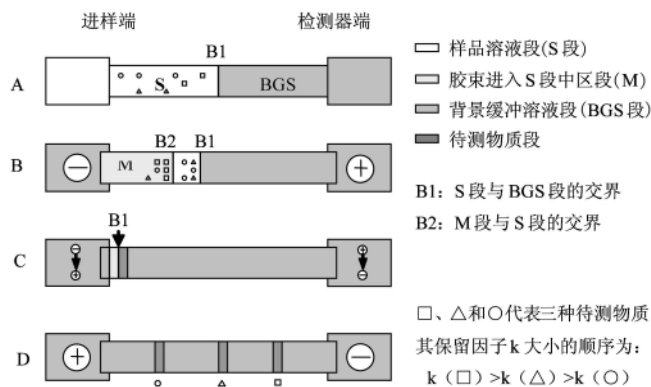


图 1 反向电压堆积 (REPSM) 过程示意图

Fig.1 Behavior of micelles and neutral analytes during REPSM MECC

1.2 堆积增强因子的定义

定义 REPSM-MEKC 中的堆积增强因子 γ 为:

$$\gamma = \frac{\rho_{\text{sample}}}{\rho_{\text{buffer}}} = \frac{1/G_{\text{sample}}}{1/G_{\text{buffer}}} = \frac{G_{\text{buffer}}}{G_{\text{sample}}} \quad (1)$$

式中 ρ_{sample} ——样品溶液的电阻率, $\Omega \cdot \text{cm}$; ρ_{buffer} ——缓冲溶液的电阻率, $\Omega \cdot \text{cm}$; G_{sample} ——样品溶液的电导率, S/cm ; G_{buffer} ——缓冲溶液的电导率, S/cm 。在 REPSM-MEKC 中 γ 值越大, S 段和 BGS 段中的电场强度相差越大, 缓冲溶液中的胶束向正极方向的移动速度就会越快, 堆积效果也就越好。

1.3 堆积因子的定义

用在长时间进样通过堆积浓缩得到的样品峰高 H_{stack} 与短时间进样无堆积浓缩的常规 MEKC 得到的样品峰高 H 之比来衡量堆积效果。因此, 堆积因子 SE_{height} 被定义为:

$$SE_{\text{height}} = \frac{H_{\text{stack}}}{H} \quad (2)$$

1.4 回收率的定义

在实际检测工作中使用反向电压堆积主要是用来提高检测灵敏度, 降低检测下限, 因此除了用堆积因子 SE_{height} 考察堆积效果外, 还要通过回收率 R 考察有多少待测物质被堆积浓缩了。堆积回收率 R 被定义为:

$$R = \frac{H_{\text{stack}}}{H_{\text{expected}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中 H_{stack} ——通过堆积得到的峰高; H_{expected} ——达到理论上的堆积效果时的峰高。

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

P/ACE MDQ 电泳仪、DAD 二极管阵列检测器及 32 Karat 数据采集软件 (Beckman-Coulter 公司); 毛细管 (未涂布弹性石英毛细管 $61 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m.id}$, 有效长度 53 cm)

(河北永年光导纤维厂); PHS-25A 数字酸度计 (上海大普有限公司); E-201-C 复合电极 (上海雷磁仪器厂); 超声波清洗槽 (上海致丰电子科技有限公司)。

十二烷基硫酸钠 (SDS)、三 (羟甲基) 氨基甲烷 (Tris)、乙腈和异丙醇均购于中国医药集团上海化学试剂公司; 高效氯氰菊酯、二氯菊酯、联苯菊酯和溴氰菊酯原药均购于江苏扬农化工集团有限公司; 功夫菊酯、氰戊菊酯和百树菊酯原药均购于南京荣诚化工集团有限公司。试验用水为超纯水。

2.2 试验方法

2.2.1 茶叶样品的制作

市售标注绿色无污染的茶叶经过检测在待测农药的保留时间上无信号响应 (如图 2), 分别在每 100 g 空白样品中添加 20 mL 的 0.005 mg/mL 和 10 mL 的 0.0005 mg/mL 七种拟除虫菊酯农药的工作标准溶液, 制成含有 1 mg/kg 和 0.05 mg/kg 农药残留的茶叶样品。

2.2.2 正常色谱条件及基本操作

采用正极压力进样, 负极检测的方式进行检测分析。在压力 0.3 psi 下进样 3 s , 分离电压 23 kV , 毛细管温度 25°C , 检测波长 210 nm , 每天试验前分别用甲醇, 0.1 N 盐酸, 0.1 N 氢氧化钠和水各冲洗 15 min , 每次运行前分别用水和缓冲溶液冲洗 5 min , 缓冲溶液配好脱气 15 min , 样品进样前用 $0.45 \mu\text{m}$ 水系膜过滤。缓冲溶液组成: 15% 异丙醇, 20% 乙腈, 50 mmol/L Tris, 60 mmol/L SDS, 用 1 N 的盐酸调 pH 值至 8.2 。

2.2.3 柱上堆积浓缩操作

首先在毛细管中充满不同 SDS 浓度的背景缓冲溶液, 然后将茶叶样品按照国标 GB/T 5009.146 处理后溶解到含有不同 SDS 浓度的基质溶液中。在 0.5 psi 压力下大体积进样 100 s , 之后施加 -25 kV 电压, 当电流达到正常分离过程中电流 $90\% \sim 99\%$ 的时候, 改变电压方向, 进入正常分离模式。与 0.5 psi 下进样 5 s 无堆积浓缩的常规分离所产生的峰进行比较, 根据式 (2) 和式 (3) 计算堆积增强因子和回收率来评价堆积浓缩效果。

本文重点是研究背景缓冲溶液 SDS 浓度、样品基质溶液 SDS 浓度和电流恢复率对堆积浓缩效果的影响, 目的在于针对拟除虫菊酯在茶叶中残留量极低的情况, 通过柱上堆积浓缩, 降低毛细管电泳检测的下限。

3 结果与讨论

3.1 背景缓冲溶液与基质溶液电导率之间的差异对堆积浓缩效果的影响

由反向电压堆积的原理可知, 影响堆积因子最显著的因素就是样品基质溶液和背景缓冲溶液电导率之间的差异, 电导率差距越大, 堆积过程中的驱动力也就越大, 富集因子越高。考虑到待测物质在纯水中的溶解度比较低, 所以使用含 1 mmol/L SDS 的样品基质溶液 (对应电导率 G_{sample} 为 0.103 mS/cm) 和 90% 的电流恢复率进行柱上堆积浓缩时, 不同 SDS 浓度的背景缓冲溶液通过其电导率 G_{buffer} 的变化对堆积增强因子 γ 的影响如表 1 所示。从表 1 可知, 随着缓冲溶液中 SDS 浓度的增加, 由于背

景缓冲溶液电导率增加，导致堆积增强因子 γ 随之增加，堆积效果改善。

表 1 不同 SDS 浓度下缓冲溶液的电导率 G_{buffer} 和增强因子 γ
Table 1 Conductivity G_{buffer} and enhancement factor γ of solution in different SDS concentrations

缓冲溶液 SDS 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$G_{buffer}/\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$	γ
30	1.89	18.3
40	2.19	21.3
50	2.42	23.5
60	2.75	26.7

在不同 SDS 浓度的背景缓冲溶液下堆积因子 SE_{height} 如图 2 所示。从图 2 可以看出，随着背景缓冲溶液中 SDS 浓度的增加，堆积因子有所提升。但随着 SDS 浓度进一步提升，由于缓冲溶液中离子强度逐渐增加，在毛细管两端施加同样电压的时候，产生更多的热量，造成峰的扩散，阻碍了堆积因子的进一步提高，从图 2 可以看出，当缓冲溶液中 SDS 浓度达到 60 mmol/L 时 SE_{height} 的提高趋于平缓，故选用 60 mmol/L SDS。

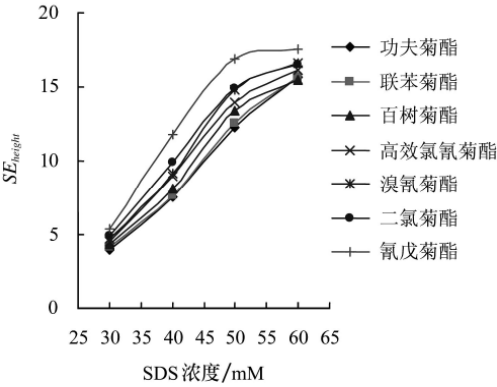


图 2 背景缓冲溶液中 SDS 浓度对 SE_{height} 的影响
Fig.2 Effect of SDS concentration in BGS on SE_{height}

3.2 电流恢复率对堆积效果的影响

当背景缓冲溶液和样品基质溶液中 SDS 浓度分别为 60 mmol/L 和 1 mmol/L 时，电流恢复率对具有不同保留因子的拟除虫菊酯(见表 3)回收率 R 的影响如表 4 所示。

表 3 不同拟除虫菊酯的保留因子 k
Table 3 Retention factors of seven pyrethroid pesticides

拟除虫菊酯	功夫菊酯	联苯菊酯	百树菊酯	高效氯氰菊酯	溴氰菊酯	二氯菊酯	氰戊菊酯
k	3.57	3.65	3.79	3.88	3.95	4.16	4.32

表 4 电流恢复率对具有不同保留因子的拟除虫菊酯回收率 R 的影响
Table 4 Effect of comeback rate of current on recovery rate R of pyrethroid pesticides with different keeping factors k

电流恢复率 /%	$R/\%$						
	功夫菊酯	联苯菊酯	百树菊酯	高效氯氰菊酯	溴氰菊酯	二氯菊酯	氰戊菊酯
90	83.55	85.69	87.75	89.16	90.28	91.47	93.58
95	79.26	77.10	80.19	86.26	88.57	89.45	90.39
99	71.14	73.21	75.16	76.54	78.19	83.25	85.29

从表 4 可以看出，随着电流恢复率的增加，7 种拟除虫菊酯的回收率 R 均有所减少，减少的程度随着保留因子的增加而减少。回收率随着保留因子提高而提高。产生以上变化趋势的原因在于，当向毛细管中注入大体积样品后，反向施加电压，在电流由低逐渐接近常规操作的正常值的过程中，样 S 段中的基质被排出，与胶束结合的中性待测物质被堆积到 S 与 BGS 交界 B1，而没有与

胶束结合待测物质会随着基质排除毛细管。因此随着电流恢复率增加各个待测物质的回收率随着其保留因子的增加而增加。

基于以上分析，得到最佳反向电压堆积操作为：调整背景缓冲溶液中 SDS 的浓度至 60 mmol/L，用含有 1 mmol/L SDS 的水溶液溶解挥干后的残渣；对含有 0.05 mg/kg 拟除虫菊酯农药的茶叶样品进行萃取净化富

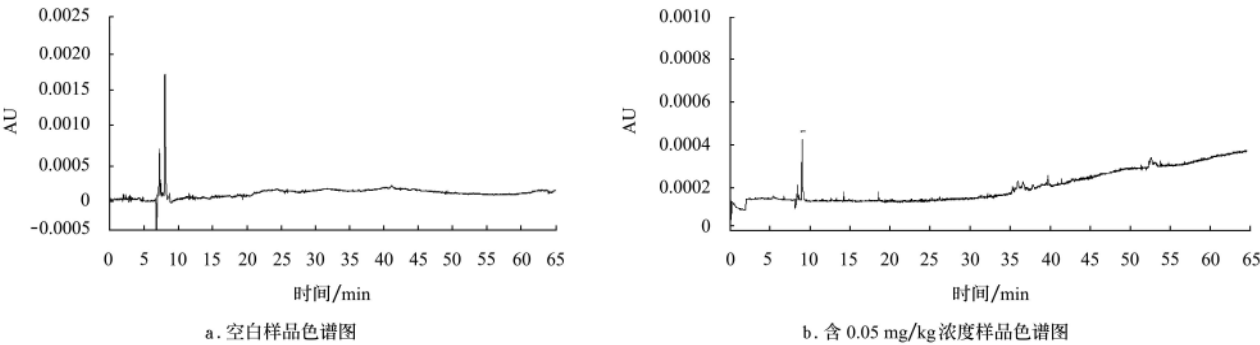


图 3 七种拟除虫菊酯类农药的样品未经过反向电压堆积后的色谱图

Fig.3 Blank sample chromatogram and chromatogram of 0.05 mg/kg concentration of standard seven pyrethroid pesticides without REPSM

集浓缩后,在 0.5 psi 的压力下进样 100 s,进样体积约为正常分离时的 20 倍;进样后施加反向电压,当电流恢复至正常分离时的 95%时,改变电压方向,正常分离样品,用 210 nm 的波长进行检测。背景缓冲溶液的成分为:15%

异丙醇,20%乙腈,60 mmol/L SDS 和 50 mmol/L tris。在以上操作条件下,得到的色谱图如图 4 所示。由图 4 可以看出,各待测物质的峰宽窄,柱效高,达到了较理想的分离效果。

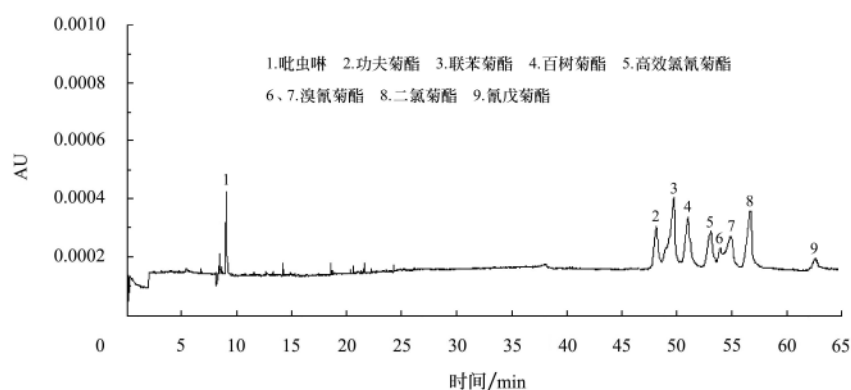


图 4 含 0.05 mg/kg 七种拟除虫菊酯类农药的样品经过反向电压堆积后的色谱图

Fig.4 Chromatogram of 0.05 mg/kg concentration of standard seven pyrethroid pesticides with REPSM

3.3 堆积浓缩方法验证

在如上选出的最优条件下,重复分析样品 6 次,分别考察 7 种拟除虫菊酯的堆积因子、反向电压相堆积阶段的回收率、检测下限、相对保留值和峰面积的变异系

数(RSD),具体结果见表 5,各拟除虫菊酯的堆积因子达到 17 以上,回收率大于 82%定量检测下限和定性检测下限在经过堆积后都有明显的下降,出峰时间和变异系数也基本上达到了色谱分析要求。

表 5 最优条件下 7 种拟除虫菊酯的堆积因子、回收率、检测下限、相对保留值和峰面积的变异系数(RSD)

Table 5 SE_{height} , recovery, detective limit and RSD of relative retention and peak heights of seven pyrethroid pesticides under optimized REPSM conditions

名 称	功夫菊酯	联苯菊酯	百树菊酯	高效氯氰菊酯	溴氰菊酯	二氯菊酯	氰戊菊酯
SE_{height}	17.18	18.96	17.85	18.7	18.17	18.20	18.89
反向电压阶段回收率 $R/\%$	82.17	85.13	87.34	90.49	92.08	94.25	95.71
定量检测下限 (mg/kg) (未堆积)	0.1	0.1	0.1	0.1	1.2	2.4	0.1
定性检测下限 (mg/kg) (未堆积)	0.03	0.03	0.05	0.04	0.04	0.06	0.03
定量检测下限 (mg/kg) (堆积后)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.4	0.05	0.05
定性检测下限 (mg/kg) (堆积后)	0.009	0.001	0.008	0.006	0.009	0.01	0.008
相对保留值 RSD/%	1.1	1.9	2.1	2.3	2.0	1.8	2.3
峰面积变异系数 RSD/%	3.2	2.6	6.5	4.3	6.1	5.2	4.5

4 结 论

以堆积因子和回收率为考核指标,通过改变样品基质与缓冲溶液电导率之间的差异和反转电压时的操作方法,研究了茶叶中 7 种拟除虫菊酯类农药的柱上堆积技术,得到最佳堆积条件为:设定背景缓冲溶液中 SDS 浓度为 60 mmol/L,用含有 1 mmol/L SDS 的水溶液溶解经过固相萃取净化后的茶叶样品残渣,进样时间持续 100 s,进样完成后施加反向电压;当电流恢复至正常分离的 95%时,改变电压方向,正常分离样品,使 7 种拟除虫菊酯的堆积因子达到 17 以上,反向电压堆积阶段的回收率大于 82%。在最优操作条件下,该方法对 7 种待测拟除虫菊酯的检测下限降低到了 0.05 mg/kg,基本上可以满足欧盟规定的最低限量标准的要求。

[参 考 文 献]

[1] 鲁成银. 茶叶质量安全[J]. 茶叶, 2004, 02.

- [2] 江用文,陈宗懋. 我国茶叶的安全质量现状与建议[J]. 中国农业科技导报, 2002, 4(5): 24—27.
- [3] 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1117-2002 进出口茶叶中多种菊酯类农药残留量检测方法.
- [4] 方 梅,江晓玲. 21 世纪毛细管电泳在食品分析中的应用[J]. 食品工业科技, 2006, (3): 192—199.
- [5] Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K et al. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries[J] *Anal Chem*, 1984, 56(1): 111—113.
- [6] Joselito P.Quirino, Shigeru Terabe. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography I. Normal stacking mode[J]. *J. Chromatogr. A*, 1997, 781(1-2): 119—128.
- [7] Joselito P Quirino, Shigeru Terabe. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography II. Reversed electrode polarity stacking mode[J]. *J. Chromatogr. A*, 1997, 791(1-2): 255—267.
- [8] Joselito P Quirino, Koji Otsuka, Shigeru Terabe. On-Line Concentration of Neutral Analytes for Micellar Electrokinetic

- Chromatography. III. Stacking with Reverse Migrating Micelles[J]. *Anal Chem*, 1998, 70(1): 149—157.
- [9] Joselito P Quirino, Shigeru Terabe. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography VI. Stacking using reverse migrating micelles and a water plug[J]. *J. Chromatography B*, 1998, 714(1): 29—38.
- [10] Joselito P Quirino, Shigeru Terabe. Sweeping of Analyte Zones in Electrokinetic Chromatography[J]. *Anal Chem*, 1999, 71(8): 1638—1644.
- [11] Wu Y S, Lee H K, Li S F Y. Separation and determination of pesticides by capillary electrophoresis. II. Determination of *N*-methylcarbamates in drinking water by micellar electrokinetic chromatography with SPE and on-column enrichment[J]. *J. Microcolumn Separation*, 1998, 10(6): 529—535.
- [12] Quirino J P, Inoue N, Terabe S. Reversed migration micellar electrokinetic chromatography with off-line and on-line concentration analysis of phenylurea herbicides[J]. *J. Chromatogr A*, 2000, 892(1-2): 187—194.
- [13] Lin C, Liu Y, Yang T, et al. On-line concentration of *s*-triazine herbicides in micellar electrokinetic chromatography using a cationic surfactant[J]. *J. Chromatogr. A*, 2001, 916(1): 239—245.

Synchronous detection of seven persistent pyrethroid pesticides in tea by MECC using reversed electrode polarity stacking concentration technique

Ma Haile^{1,2,3}, Zhu Ziping¹, Liu Jiang¹, Luo Lin^{1,2}, He Ronghai^{1,2}, Wang Zhenbin^{1,2}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Jiangsu Provincial Research Center of Bio-Processing and Separation Engineering, Zhenjiang 212013, China;

3. School of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: For rapid detection of trace residues of pesticides in tea, a synchronous detection method for seven kinds of pyrethroid pesticide residues in sample was established with micellar electrokinetic capillary chromatography(CMECC) based on the on-column stacking. The optimal operation condition of on-column stacking was described as follows: the background solution consists of 15% isopropyl alcohol, 20% acetonitrile, 60 mmol/L sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50 mmol/L tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris). After the extract of tea was cleaned by solid phase extraction for removing some impurities, and dried by nitrogen, the sample residue was dissolved in 1 mmol/L SDS solution. Reverse voltage was imposed after the 100s injection, and then the polarity was exchanged when the current returned to 95% of the normal. After on-column stacking, the enrichment factors of seven pyrethroid pesticide residues were higher than 17, and their recoveries were more than 82%. Under the optimal operation condition, the detected concentration limits of seven kinds of pyrethroid pesticide residues in tea were 0.05 mg/kg for cyhalothrin, 0.05 mg/kg for bifenthrin, 0.05 mg/kg for yfluthrin, 0.05 mg/kg for alpha-cypermethrin, 0.4 mg/kg for deltamethrin, 0.05 mg/kg for permethrin and 0.05 mg/kg for fenvalerate, respectively.

Key words: micellar electrokinetic capillary chromatography(MECC); reversed electrode polarity stacking; pyrethroid pesticide; tea; persistent pesticide; synchronous detection