

茶鲜叶中拟除虫菊酯类农药残留的检测方法*

侯如燕, 宛晓春, 朱旭君

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 教育部、农业部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 安徽 合肥, 230036)

摘 要 拟除虫菊酯农药用量少, 杀虫效果好, 广泛应用于茶园害虫的控制, 是我国出口茶叶中必检的农药。为实现茶叶生产危害分析关键控制点(HACCP)体系中农药残留的源头控制, 提供农药源头监督检验方法依据, 避免大量使用农药对茶园土壤环境造成的污染, 开发茶鲜叶中菊酯类农药的多残留检测方法有重要的实践意义。本实验用 $V(\text{石油醚}):V(\text{丙酮})=1:1$ 混合溶剂提取, 经弗罗里硅土柱层析净化除去干扰物质, 采用气相色谱, 微电子捕获检测器(μECD)测定茶鲜叶中主要的 6 种拟除虫菊酯类农药残留量。方法最低检出浓度为 $0.005\sim 0.01\text{ mg/kg}$; 茶鲜叶中拟除虫菊酯农药的添加浓度为 $0.05, 0.2, 1.0\text{ mg/kg}$, 其回收率在 $83.6\%\sim 104.5\%$, 相对标准偏差(RSD)为 $2.7\%\sim 10.2\%$, 符合农药残留分析要求。

关键词 茶鲜叶, 拟除虫菊酯农药, 多残留分析, 气相色谱

茶叶是我国的一种传统出口农产品, 当前存在的主要卫生问题是农药残留超标^[1]。国际上一些茶叶进口国制定了严格的农药残留限量标准, 对于超过农药残留限量标准的茶叶采取就地封存、销毁或退回原产地国的政策, 对我国茶叶贸易造成了很大影响。

拟除虫菊酯农药用量少, 杀虫效果好, 在茶园广泛应用, 也是我国出口茶叶中必检的农药。为了监督茶园用药情况, 确定合理的采摘时间, 以便在源头控制茶叶农药残留问题, 把茶叶安全生产的危害分析关键控制点(HACCP, hazard analysis critical control points)前移。直接测定茶鲜叶中的农药残留量有着现实意义, 可以实现茶叶农药源头控制, 有效引导农民合理使用农药, 降低茶园农药喷施量, 提高饮茶安全性, 并且可以减少农药违规使用而对茶园土壤环境造成污染。由于鲜叶中提取物中含有比成茶更多的干扰物质, 例如简单儿茶素等多酚类及叶绿醇等色素类, 因此文献报道的茶叶中菊酯类农药检测方法^[2~9]不适用于茶鲜叶基质检测, 因此有必要建立茶鲜叶农药残留的检测方法。本实验用有机溶剂提取, 弗罗里硅土柱层析净化, 气相色谱法检测茶鲜叶中 6 种主要的拟除虫菊酯农药残留量, 并通过加标回收实验证明了方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

第一作者: 博士研究生, 讲师(宛晓春为通讯作者)。

* 国家科技部支撑计划资助项目(No. 2006 BAK 02A26), 安徽省教育厅资助项目(No. 2005kj170)

收稿日期: 2008-02-27, 改回日期: 2008-06-02

Agilent6890 气相色谱仪, 配 μECD 检测器; 79 型温控多用高速组织捣碎机(江阴保利科研器械公司); R-201 旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司); SX2-2.5-1.0 箱式电阻炉(上海跃进医疗器械厂)。

弗罗里硅土(60~100 目, 美国 Sigma 公司, 140°C 活化 2 h, 5% 水脱活), 无水硫酸钠(用前 550°C 灼烧 4 h), 活性碳(60~40 目, 层析用, 放于浓 HCl 中, 加热煮沸 1 h, 用蒸馏水洗至中性, 烘干后, 600°C 灼烧 2 h, 用前 105°C 烘 4 h), 石油醚、正己烷、丙酮、乙醚、乙酸乙酯、盐酸, 所用试剂均为分析纯, 有机溶剂重蒸后使用; 试验用水为双蒸水。

1.2 方法

1.2.1 农药标准样品的配制

联苯菊酯(bifenthrin, 97%), 甲氰菊酯(fenpropathrin, 98.5%), 三氟氯氰菊酯(cyhalothrin, 98%), 氯氰菊酯(cypermethrin, 91%), 氰戊菊酯(fenvalerate, 98%), S-氰戊菊酯(esfenvalerate, 98%)德国 Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) 产品; 分别准确称取上述的标准品, 用正己烷溶解配成 $1\ 000\ \mu\text{g/mL}$ 的原始储备液, 使用时再根据不同农药在仪器上的灵敏度稀释到所需浓度。

1.2.2 样品制备

取茶鲜叶样品 200 g(一芽 2~3 叶, 采自安徽农业大学茶园, 未施用任何农药), 置组织捣碎机中捣碎。

1.2.3 样品提取与净化

提取: 称取捣碎茶鲜叶 25.0 g, 加 100 mL $V(\text{石}$

油醚):V(丙酮)=1:1,置组织捣碎机中匀浆提取 2 min,真空抽滤,分别用 25 mL 混合溶剂洗涤滤渣,过滤好的溶液用等体积饱和硫酸钠溶液加入分液漏斗萃取,剧烈振摇 1 min,分出有机相,浓缩至 2 mL 上净化柱。

净化:在 1.5 cm(ID)×20 cm 玻璃层析柱中,加入 1cm 高无水硫酸钠,再加入 5 g 弗罗里硅土载体(5%蒸馏水脱活),上层再加入 1 cm 高无水硫酸钠。加正己烷 20 mL 预洗层析柱,弃去淋洗液。从提取滤液中移取 1mL 入柱中,用 100 mL V(石油醚):V(乙酸乙酯)=98:2 淋洗,浓缩至 10mL 待测。

1.2.4 色谱条件

色谱柱:HP-5,30 m×0.25 mm×0.25μm;气体流速:氮气;柱前压:15psi;尾吹气:60 mL/min;温度:柱温:60℃保持 2 min,再以 30℃/min 升到 280℃,保持 20 min;进样口:250℃;检测器:300℃。

2 结果与分析

2.1 方法的线性实验

分别将配制的农药标准母液依次稀释成浓度为 0.05、0.1、1.0、5.0μg/mL 4 个系列浓度,进样 1 μL,以峰面积值为纵坐标,标准样品浓度为横坐标绘制标准曲线,其线性回归方程,相关系数如表 1 所示。

表 1 标准曲线回归方程及相关系数

农药名称	标准曲线方程	相关系数
联苯菊酯	$Y = 14\,764.802X + 28.005\,536$	1.000 00
甲氰菊酯	$Y = 135\,988.695X - 21.339\,89$	0.999 99
三氟氯氰菊酯	$Y = 181\,515.268X - 205.599\,7$	0.999 88
氯氰菊酯	$Y = 131\,288.739X - 163.363\,96$	0.999 77
氰戊菊酯	$Y = 252\,530.914X - 410.139\,93$	0.999 75
S-氰戊菊酯	$Y = 326\,436.128X - 619.539\,4$	0.999 65

2.2 净化条件的选择

弗罗里硅土是菊酯类农药固相萃取净化常用的吸附剂,由于其吸附活性较高,通常加入 5%左右的双蒸水以降低其活性,减少洗脱溶剂用量,实验选用 5%脱活的弗罗里硅土 5.0 g,尝试用不同极性的洗脱溶剂来洗脱加标(加标浓度为 0.05 mg/kg)后的提取液,洗脱剂用量均为 100 mL,用净化后的洗脱液中所含基质重量占净化前基质重量的百分率,即基质干扰的洗脱率来验证这些溶剂对基质干扰的洗脱能力,用 6 种农药的平均回收率来判断洗脱剂对农药的洗脱能力,若洗脱剂对农药的洗脱效果满足准确度和精密度要求,且洗脱的干扰基质含量最小,则该洗脱剂为

最佳选择,实验结果见表 2。相同体积的丙酮、乙酸乙酯、乙醚、石油醚 4 种单一溶剂相比,溶剂极性越小,洗脱基质干扰量越小,净化效果越好,溶剂极性越高,则干扰越严重,例如丙酮、乙酸乙酯、乙醚已不能准确回收到农药。石油醚作为洗脱溶剂,干扰最小,但农药平均回收率低于 70%。为了增加洗脱剂极性,提高农药的回收率,则采用加入少量乙酸乙酯的混合溶剂,结果表明,随加入的乙酸乙酯量增加,回收率明显增加,但基质干扰也同样增加,而 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=98:2,所得色谱峰干扰最小,平均回收率在 94.5%以上,因此选定其为洗脱剂。为了进一步增加净化效果,实验曾在弗罗里硅土填料中加入 0.1~2.0g 活性炭作为色素的吸附剂,随活性炭加入量增加,净化效果明显改善,但农药洗脱率显著下降,加入量过少,净化效果未有明显改善。因此方法未选用活性炭作为净化材料。

表 2 不同淋洗溶剂的洗脱效果(3 次重复) %

淋洗溶剂种类	基质干扰物质的洗脱率	农药平均回收率 ¹⁾
丙酮	86.5±5.6	—
乙酸乙酯	76.8±3.8	—
乙醚	36.4±7.3	—
石油醚	16.9±6.4	67.9±2.8
V(石油醚):V(乙酸乙酯)=98:2	32.5±3.2	96.5±2.5
V(石油醚):V(乙酸乙酯)=95:5	46.5±3.8	102.1±15.2
V(石油醚):V(乙酸乙酯)=70:30	54.8±5.2	—

注:1)一基质干扰明显,6 种农药平均回收率大于 120%。

为了进一步确定洗脱剂的最佳用量,实验选用一定浓度的混合标样上柱,用 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=98:2 洗脱,收集 10 管,每管 10 mL,6 种菊酯农药在弗罗里硅土柱上的洗脱行为和洗脱曲线见表 3 和图 1。前 20 mL 洗脱液未见农药洗出,6 种菊酯的洗脱峰高点略有差异,联苯菊酯洗脱容易,40 mL 即取得 90%以上的回收率,甲氰菊酯稍易,其他菊酯均需较多溶剂才能洗脱,而 100 mL 洗脱剂用量 6 种农药均取得 90%以上的回收率,因此,方法选择 100 mL 洗脱体积。

表 3 菊酯农药在弗罗里硅土柱上的洗脱行为

农药名称	洗脱体积/mL	峰最高点/mL
联苯菊酯	20~40	30
甲氰菊酯	20~70	30
三氟氯氰菊酯	20~90	45
氯氰菊酯	20~80	30
氰戊菊酯	20~90	40
S-氰戊菊酯	20~90	40

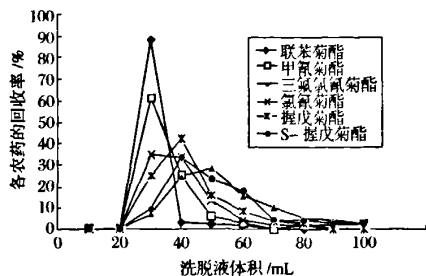


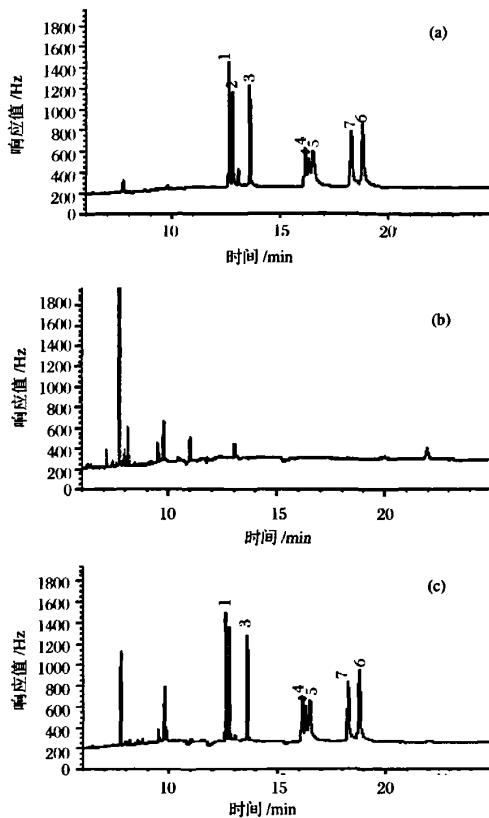
图1 六种菊酯农药的洗脱曲线

2.3 茶鲜叶中菊酯农药的添加回收实验

选用空白茶鲜叶样品,分别按0.0、0.05、0.2、1.0 mg/kg的添加浓度进行回收率实验,每个水平重复3次,进样1 μ L,6种菊酯农药的平均添加回收率为83.6%~104.5%,相对标准偏差(RSD)为2.7%~10.2%,准确度和精密性好,满足茶鲜叶中菊酯农药残留分析的要求,添加回收结果见表4,气相色谱图见图2。按空白样品加标试验中农药峰面积为基线噪音的3倍信号的浓度计算方法的最小检出浓度,结果见表4。

样品加标浓度为:联苯菊酯、甲氰菊酯、氰戊菊酯,S-氰戊菊酯为0.1 mg/kg,三氟氯氰菊酯为0.05 mg/kg,氯氰菊酯为0.2 mg/kg。

色谱峰峰号:1. 联苯菊酯,2. 甲氰菊酯,3. 三氟氯氰菊酯,4、5、6 为氯氰菊酯,7. 氰戊菊酯,8. S-氰戊菊酯。



(a) 标准样品气相色谱图;(b) 茶鲜叶空白样品;
(c) 茶鲜叶中菊酯农药添加回收气相色谱图。

图2 六种菊酯农药添加回收气相色谱图

表4 茶鲜叶中六种菊酯农药的添加回收结果

农药名称	加标浓度/mg · kg ⁻¹	平均回收率/%	标准偏差/%	最小检出浓度/mg · kg ⁻¹
联苯菊酯	0.05	87.4	7.3	0.005
	0.2	86.9	3.2	
	1.0	87.0	10.2	
甲氰菊酯	0.05	104.5	6.0	0.005
	0.2	92.3	5.4	
	1.0	92.9	9.4	
三氟氯氰菊酯	0.05	86.5	3.4	0.002
	0.2	87.5	4.7	
	1.0	95.0	9.9	
氯氰菊酯	0.05	85.8	5.5	0.01
	0.2	88.9	5.5	
	1.0	95.5	2.7	
氰戊菊酯	0.05	86.7	3.6	0.01
	0.2	88.8	5.7	
	1.0	83.6	2.8	
S-氰戊菊酯	0.05	92.2	8.6	0.01
	0.2	84.0	7.9	
	1.0	90.1	4.0	

3 结 论

本实验方法具有有机溶剂用量适中、毒性小、试验成本较低等优点,茶鲜叶中的菊酯农药的添加回收率在 83.6%~104.5%,相对标准偏差为(RSD) 2.7%~10.2%。

本实验采用窄口径毛细管柱分离,不分流模式进样,取得了较好的分析质量。尤其是采用了窄口径毛细管柱分离技术,微池 ECD 检测器检测,具有分离效果好,灵敏度高等优点,方法中 6 种农药的检测限均低于 0.01 mg/kg,完全满足茶鲜叶样品农药残留分析要求,可作为调查茶园菊酯农药使用背景,监督茶园农药合理使用的一种手段。

参 考 文 献

- 1 岳永德、花日茂、张承祥. 茶叶农药残留与控制[M]. 北京:中国农业出版社,2001. 24~25
- 2 汤富彬,刘光明,罗逢健,等. 用薄层层析法检测茶叶中甲氰菊酯和氰戊菊酯农药残留[J]. 中国茶叶, 2005, (1): 24~25
- 3 徐 倩,刘静明,诸思燕,等. 茶叶有机磷及菊酯类农药残留检测中净化处理的研究[J]. 食品科学,2005,26(8): 299~302
- 4 易 军,李云春,弓振斌,等. 茶叶中多种农药残留的气相色谱法测定[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(3): 334~339
- 5 罗逢健,刘光明,陈宗懋. 茶叶中 23 种农药残留的多检出分析技术[J]. 现代科技仪器, 2003(1): 13~16
- 6 刘 忠,谢克锦,陈启祥,等. 气相色谱法测定茶叶中 7 种拟除虫菊酯类农药残留[J]. 分析试验室, 2002, 21(6): 103~104
- 7 杨丽莉,纪 英,赫元萍. 茶叶中拟除虫菊酯农药残留快速测定法[J]. 化学分析计量, 2005, 14(5): 38~40
- 8 杨 广,程章平,刘 新,等. 茶叶中拟除虫菊酯类农药残留的检测[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(3): 339~342
- 9 植物性食品中有机氯和拟中华除虫菊酯类农药多种残留的测定[S]. GB/T 5009. 146-2003
- 10 Huang Z Q, Li Y J, et al. Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 853(1~2): 154~162

A Novel Method for Determination Pyrethroid Pesticides in Fresh Tea Leaves with GC- μ ECD

Hou Ruyan, Wan Xiaochun, Zhu Xujun

(Key Laboratory of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Agriculture, PRC, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

ABSTRACT Pyrethroids were used widely in tea cultivation for its low dosage, excellent efficacy, and general safety to users and environment. However, the pyrethroids should be legally inspected in organic tea products. In order to carrying out HACCP system in tea production, supervising pesticides in tea plant, the analysis method of target pesticides in fresh tea leaves need to be established. In this paper, a novel method for determination pyrethroids in fresh tea leaves was proposed. Fresh tea leaf samples were extracted with acetone; n-hexane = 1 : 1, then cleaned with Florisil column followed by GC- μ ECD determination. Average recoveries of the six pyrethroids were between 83.6 and 104.5% at three spiking levels 0.05mg/kg, 0.2mg/kg, 1.0mg/kg. Relative standard deviations (RSDs) were less than 10.2% for all of the recovery tests, limit of lowest detection was 0.002~0.01mg/kg. The proposed method was easy to perform and could be utilized for monitoring pyrethroids from pesticide residues in fresh tea leaves.

Key words fresh tea leaves, pyrethroids, multiresidues analysis, gas chromatography