

文章编号: 1674-5566(2010)04-0489-06

气相色谱法测定水产品中敌百虫、 敌敌畏残留量

叶 玫, 余 颖, 贺学荣, 姜琳琳, 吴成业

(福建省水产研究所, 福建 厦门 361012)

摘 要: 通过对色谱条件和样品前处理方法的研究比较, 建立了水产品中敌百虫、敌敌畏残留量测定的气相色谱法。样品用丙酮-水溶液 (2+1, v/v) 提取, 乙酸锌去脂, 活性炭脱色, 二氯甲烷萃取, 浓缩后用气相色谱-火焰光度检测器 (GC-FPD) 测定。敌百虫在 0.1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 敌敌畏在 0.025~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内线性关系良好 ($r^2 \geq 0.9995$); 0.01~4 mg/kg 添加浓度水平的回收率在 74.8%~106.8% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.12%~13.7%; 敌百虫的定量限为 0.04 mg/kg, 敌敌畏的定量限为 0.01 mg/kg。该方法操作简捷, 准确可靠, 能满足水产品中敌百虫、敌敌畏残留的检测要求。

关键词: 水产品; 敌百虫; 敌敌畏; 残留; 气相色谱法

中图分类号: S 948 **文献标识码:** A

Determination of trichlorfon and dichlorvos residues in fishery products by gas chromatography

YE Mei YU Ying HE Xue-rong JIANG Lin-lin WU Cheng-ye

(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China)

Abstract: Gas chromatography method was developed for determination of trichlorfon and dichlorvos residues in fishery products by comparing chromatography conditions and the sample pretreatment. The samples were extracted with acetone-water (2+1, v/v) and discolored by activated carbon; lipids were removed by ZnAc₂; then the residues were re-extracted by dichloromethane and determined by gas chromatography with flame photometric detector (GC-FPD). The linear range of trichlorfon and dichlorvos were 0.1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.025~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r^2 \geq 0.9995$). When spiked with 0.04, 0.4, 4 mg/kg of trichlorfon and 0.01, 0.1, 1 mg/kg of dichlorvos, the average recoveries ranged from 74.8% to 106.8% and their relative standard deviations (RSD) were between 1.12% and 13.7%. The detection limits of trichlorfon and dichlorvos were 0.04 mg/kg and 0.01 mg/kg separately. This method is simple, reliable and can be applied to detection of trichlorfon and dichlorvos residues in fishery products.

Key words: fishery product; trichlorfon; dichlorvos; residue; gas chromatography

敌百虫 (Trichlorfon) 为广谱性磷酸酯类杀虫剂, 目前广泛应用于水产养殖中的虫害防治。敌

百虫在弱碱性条件下, 或进入环境、或在生物体内代谢能分解成毒性更大的敌敌畏

收稿日期: 2009-12-11

基金项目: 2005年福建省地方标准制修订项目 (闽质监标函 [2005]83号)

作者简介: 叶 玫 (1962-), 女, 副研究员, 主要从事水产品质量安全检测方面的研究。E-mail: yemei808@sohu.com

(Dichlorvos)^[1-3],因此,水产养殖中敌百虫的使用,不仅要顾及对养殖鱼本身的毒性效应^[1-2],其残毒对养殖鱼的食用安全也不可忽视^[4-7]。更有不法经营者,在咸鱼、鱼干加工和贮藏过程中违禁使用有机磷杀虫剂,2003年以来,浙江、广西等地对市售的水产品中有机磷农药残留的调查^[8-10]表明,敌百虫、敌敌畏检出率最高。问题样本除同时使用敌百虫、敌敌畏外,也不排除单独使用敌百虫,敌百虫转为毒性更大的敌敌畏残留的可能,因此在实际监控中,有必要同时检测样品中敌百虫、敌敌畏的残留。

我国农业部 235号公告中对畜产品中敌百虫的限量为 0.05 mg/kg 敌敌畏的限量为 0.02~0.10 mg/kg 食品法典委员会、美国、韩国等对动物性食品敌百虫限量为 0.1 mg/kg 敌敌畏限量为 0.02~2 mg/kg^[11]。目前国内针对动物源食品中有机磷残留的检测方法,敌百虫、敌敌畏的检测方法各自不同^[12-16],能一并检测的研究报道不多^[17-19],而适应于水产鲜品及加工制品、能同时检测敌百虫、敌敌畏的方法研究尚未见报道。本研究通过对色谱检测条件、样品中目标物的提取净化方法的优化,以及加标回收率、精密密度、检测限等验证实验,建立水产品(含水产加工制品)中敌百虫、敌敌畏残留量测定的气相色谱法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 仪 器

仪器包括 6890N 气相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有火焰光度检测器、AB204-E 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、FA25 高速组织捣碎机(上海弗克机电有限公司)、SHZ-82 气浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司)、80-2B 低速离心机(上海安亭科学仪器厂)和 R205 旋转蒸发器(上海申生科学有限公司)。

1.1.2 试 剂

试剂有敌百虫、敌敌畏标准溶液(100 μg/mL 农业部环境保护科研监测所);敌百虫、敌敌畏混合标准工作液,根据需要准确移取适量的敌百虫、敌敌畏标准液,用丙酮稀释成适宜浓度的混合标准工作液,即用即配;丙酮、二氯甲烷(色谱纯,美国 Tedia 公司);乙酸锌(分析纯);无水硫酸钠(分析纯);650℃ 灼烧 4 h 置于干燥器内

备用;活性炭(粉末、层析用):用 3 mol/L 盐酸溶液浸泡过夜,去离子水洗至中性,120℃ 烘干备用;丙酮水溶液(2+1, v/v):将 1 份水加入到 2 份丙酮中。

1.1.3 试 样 制 备

实验中所采用罗非鱼、对虾为鲜活样品,咸丁香鱼、鱿鱼干分别为半干和干制品,均购于厦门市农贸市场。罗非鱼去鳞、取带皮肌肉;对虾去头、去壳,取肌肉部分;用高速组织捣碎机匀浆。咸丁香鱼、鱿鱼干取可食部分,剪成不大于 0.25 cm×0.25 cm×0.25 cm 的小块后混匀。将试样于 -18℃ 以下冷冻保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 样 品 前 处 理

提取:称取试样 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 0.5 g 乙酸锌、0.1 g 活性炭,再加入 20 mL 丙酮水溶液,涡旋混合,在振荡器上振荡提取 20 min 以 2 000 r/min 离心 5 min 将上清液转移至 250 mL 分液漏斗中。残渣用 20 mL 丙酮水溶液重复提取 2 次,合并提取液于同一分液漏斗中。

净化:在盛有提取液的分液漏斗中加入 20 g/L 的硫酸钠溶液 100 mL 振摇混匀(如混合液出现絮凝而影响两相分层时,需经两层滤纸抽滤),加入 30 mL 二氯甲烷,剧烈振摇 3 min 静置分层,下层二氯甲烷经无水硫酸钠柱(8.0 cm×1.5 cm 玻璃柱,内装 5 cm 高无水硫酸钠)滤入 250 mL 梨形瓶中,上层液体加入 30 mL 二氯甲烷,按上述方法重复提取 2 次,合并萃取液,在 40℃ 以下减压蒸至近干,残渣以丙酮溶解定容至 2.0 mL 供气相色谱测定。

1.2.2 色 谱 测 定

色谱柱:DB-1701 毛细管柱,30 m×0.32 mm×0.25 μm;柱温:60℃ 保持 1 min 以 10℃/min 升至 150℃,保持 2 min 再以 30℃/min 升至 230℃,保持 2 min;进样口温度:280℃(选用不带玻璃毛的不分流衬管);检测器温度:250℃;载气:高纯氮,纯度≥99.999%,流速 2.0 mL/min;氢气:纯度≥99.99%;进样方式:不分流进样,进样量:1 μL。

选定与样液浓度相近的标准工作溶液,采用外标法进行定量分析;标准工作溶液和样液等体积参插进样测定;标准工作溶液和样液中敌百

虫、敌敌畏响应值均应在仪器检测线性范围内。

2 结果

2.1 标准色谱图和线性范围

在上述色谱条件下,敌百虫以其分解产物亚磷酸二甲酯定量,参考保留时间为 3.3 min;敌敌畏的参考保留时间为 9.2 min。敌百虫 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)、敌敌畏 ($2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)标准溶液色谱图见图 1。

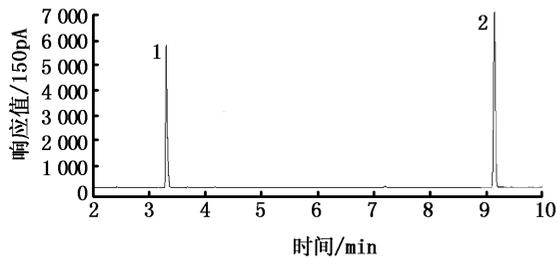


图 1 敌百虫、敌敌畏标准溶液色谱图

Fig 1 Chromatogram of standard solution of trichlorfon and dichlorvos

1. 敌百虫分解产物亚磷酸二甲酯; 2. 敌敌畏

分别以 0.1、0.2、1、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的敌百虫

及 0.025、0.05、0.25、2.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的敌敌畏混合标准溶液进样,以峰高为纵坐标,以质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,并计算相关系数。线性方程与相关系数见表 1,敌百虫在 0.1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、敌敌畏在 0.025~5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性相关良好。

表 1 敌百虫、敌敌畏线性方程及相关系数

Tab 1 Linear equation and correlation coefficient for trichlorfon and dichlorvos

化合物	线性回归方程	相关系数
敌百虫	$y=625.75x-18.06$	0.999 5
敌敌畏	$y=2619.94x+46.62$	0.999 8

2.2 准确度和精密度

以阴性罗非鱼、对虾、咸丁香鱼、鱿鱼干样品作为基质,进行加标回收和精密度实验,以考察方法的准确度和精密度,添加量为敌百虫 0.04 mg/kg、0.4 mg/kg、4 mg/kg、敌敌畏 0.01 mg/kg、0.1 mg/kg、1 mg/kg 每个浓度水平重复 6 次,回收率在 74.8%~106.8%之间,相对标准偏差为 1.12%~13.7%,日内回收率和精密度实验结果见表 2。

表 2 日内平均回收率和精密度 (n=6)

Tab 2 Intra-day average recovery and precision (n=6)

样品名称	化合物	加标量 (mg/kg)	检测值 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
罗非鱼	敌百虫	0.04	0.038 6	96.5	2.54
		0.4	0.334	83.4	10.6
		4	3.68	92	11.0
	敌敌畏	0.01	0.008 56	85.6	5.23
		0.1	0.099 1	99.1	2.39
		1	0.991	99.1	2.82
对虾	敌百虫	0.04	0.038 3	95.8	2.88
		0.4	0.409	102	4.93
		4	3.58	89.4	7.70
	敌敌畏	0.01	0.008 48	84.8	4.34
		0.1	0.083 8	83.8	1.12
		1	0.853	85.3	4.25
咸丁香鱼	敌百虫	0.04	0.032 8	82.1	11.10
		0.4	0.355	88.7	12.60
		4	3.42	85.6	13.70
	敌敌畏	0.01	0.009 96	99.6	4.67
		0.1	0.091 2	91.2	8.99
		1	0.993	99.3	3.75
鱿鱼干	敌百虫	0.04	0.036 0	89.9	11.90
		0.4	0.377	94.3	9.97
		4	3.13	78.3	8.32
	敌敌畏	0.01	0.009 39	93.9	4.12
		0.1	0.092 3	92.3	5.46
		1	0.748	74.8	3.87

为了验证方法的再现性,以空白对虾、鱿鱼干样品作为基质,作敌百虫 0.04 mg/kg、0.4 mg/kg、敌敌畏 0.01 mg/kg、0.1 mg/kg的日间 (n=3) 加标回收实验,回收率在 82.4%~103.1%之间,相对标准偏差为 3.82%~9.15%,日间回收率和

精密度实验结果见表 3。实验结果表明日内和日间加标回收率和精密度均符合动物性产品药物残留分析技术要求。罗非鱼空白样品的色谱图见图 2,罗非鱼空白样品的敌百虫 (1 mg/kg)、敌敌畏 (4 mg/kg)加标色谱图见图 3。

表 3 日间平均回收率和精密度 (n=3)

Tab 3 Inter-day average recovery and precision (n=3)

样品名称	化合物	加标量 (mg/kg)	检测值 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
对虾	敌百虫	0.04	0.0397	99.3	6.04
		0.4	0.411	102	6.00
	敌敌畏	0.01	0.00824	82.4	6.06
		0.1	0.0903	90.3	9.15
鱿鱼干	敌百虫	0.04	0.0412	103	5.70
		0.4	0.352	88.0	8.00
	敌敌畏	0.01	0.00969	96.9	3.84
		0.1	0.0926	92.6	3.51

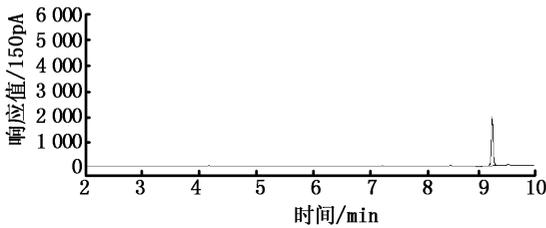


图 2 罗非鱼空白样品色谱图

Fig 2 chromatogram of the blank sample of tilapia

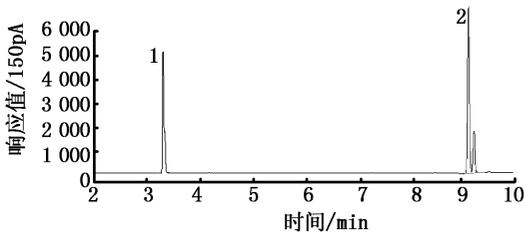


图 3 罗非鱼空白样品添加敌百虫、敌敌畏色谱图

Fig 3 chromatogram of tilapia sample added with trichlorfon and dichlorvos

1. 敌百虫分解产物亚磷酸二甲酯; 2. 敌敌畏。

2.2 方法定量限

方法最低定量限的确定依据是样品的实际加标回收率 70%~120%之间,信噪比 ≥ 10 ,精密度 $\leq 15\%$ 。本方法在加标量敌百虫为 0.04 mg/kg、敌敌畏为 0.01 mg/kg时信噪比大于 10,回收率在 78.3%~105.7%之间,精密度为 4.1%~12.4%,因此将 0.04 mg/kg、0.01 mg/kg分别定

为敌百虫和敌敌畏的定量检测限,敌百虫、敌敌畏定量限水平加标回收率和精密度见表 4。

表 4 定量限水平的回收率和精密度 (n=6)

Tab 4 Average recovery and precision in the limit of quantitative level (n=6)

样品名称	化合物	加标量 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
罗非鱼	敌百虫	0.04	95.9	5.0
	敌敌畏	0.01	86.7	4.9
对虾	敌百虫	0.04	105.7	6.6
	敌敌畏	0.01	79.8	11.0
咸丁香鱼	敌百虫	0.04	78.3	12.0
	敌敌畏	0.01	100.7	4.1
鱿鱼干	敌百虫	0.04	90.3	12.4
	敌敌畏	0.01	93.9	4.1

3 讨论

3.1 色谱分析条件的确定

气相色谱-质谱联用技术 (GC/MS)对敌百虫在气相色谱分析过程产生的分解产物进行定性研究表明^[16,20],敌百虫在进样口受热情况下,分子中的 C-P键断裂,经重排生成三氯乙醛和亚磷酸二甲酯。敌百虫的定量检测,采用测定敌百虫母体的方式存在弊端,检测结果不稳定或测不到,但只要分解产物稳定,分解量同敌百虫的量成正比,通过分解产物对敌百虫定量是可行的,以分解产物三氯乙醛或亚磷酸二甲酯为依据定

量检测敌百虫,已有报道和例证^[14-16]。ECD检测器对三氯乙醛的响应值高,灵敏度好,但其分子量小,出峰早,容易受到杂质峰的干扰;FPD检测器适合于亚磷酸二甲酯,亚磷酸二甲酯在自然条件下存在的可能性极小,在中低极性的色谱柱中有较为合适的保留时间^[16]。考虑到和敌敌畏一并检测,FPD对有机磷的选择性、稳定性、灵敏度为最佳,因此本方法选择 FPD 检测器,以亚磷酸二甲酯为敌百虫的定量目标物。

敌百虫、敌敌畏为弱极性化合物,选用中低极性键合交联柱作为色谱分离柱,试验结果证明,用 DB-1701 毛细管柱 (30 m × 0.25 μm × 0.32 mm),敌百虫分解产物亚磷酸二甲酯、敌敌畏与样品基质的分离效果好。色谱条件的选择和优化,关键点在于对敌百虫分解产物灵敏度和稳定性的把握,有机磷气相色谱分析进样口的温度在 200~280 °C 之间,敌敌畏的响应值在此温度范围内变化不大,而敌百虫分解产物亚磷酸二甲酯,响应值随温度的升高而增大,超过 280 °C,分解产物的含量趋于平缓,根据实验所得数据,进样口选择有利于提高敌百虫检测灵敏度和稳定性的温度,即 280 °C,而柱温则采用尽量温和的升温程序,敌百虫分解产物量在色谱柱分离过程中保持稳定。带玻璃毛的衬管对敌百虫的分解有影响,样品中油脂、蛋白等杂质可能促进敌百虫在玻璃毛的衬管内的分解,造成敌百虫的回收率偏高,但不带玻璃毛的衬管此现象不明显,因此选用不带玻璃毛的不分流衬管。本方法参考保留时间为 3.3 min 的色谱峰,经质谱验证为亚磷酸二甲酯,作为敌百虫的定量峰,敌敌畏的参考保留时间为 9.2 min。

3.2 提取溶剂的选择

水产品和水产加工制品蛋白、脂肪含量较高,因此应选择对敌百虫、敌敌畏溶解性好、脂溶性较差且对动物蛋白有良好沉淀作用的提取剂。敌百虫、敌敌畏为弱极性化合物,易溶于乙酸乙酯、二氯甲烷、乙腈、丙酮等有机溶剂,在水中也有一定的溶解度,敌百虫在水中的溶解较好,为 154 g/L,敌敌畏差些,为 10 g/L。用纯粹的有机溶剂提取,脂肪杂质较高,不易净化;因此考虑用有机溶剂水溶液为提取剂。提取液中水的配比高了,敌敌畏的溶解度较差,后续净化会出现乳化现象,通过不同比例的丙酮和乙腈水溶液提取

效果的优化实验,确定以 2+1 丙酮溶液为提取剂。乙腈溶液提取效果和丙酮溶液差别不大,从试剂的毒性和价格方面考虑,选择丙酮溶液为提取剂。

3.3 净化方法

有机磷检测样品净化通常采用液-液萃取、固-液萃取方式。因敌百虫、敌敌畏两者在有机相或水相中的溶解度差异较大,采用液-液萃取除脂净化的方式,两者难于同时达到理想的回收率;中性氧化铝对蛋白、油脂、色素的吸附性较好,常用于有机磷检测的样品净化^[12],但若中性氧化铝去活化处理控制不好,对目标检测物也有吸附作用,本实验中发现,中性氧化铝对低浓度的敌百虫和敌敌畏有一定的吸附性,低浓度的加标回收率不足 60%;以凝胶作为固相萃取材料虽有较好的净化效果^[13],但成本较高,试剂用量大,整个实验过程也费力费时。

经大量的实验比对,本研究的样品前处理方法在文献 [14] 的基础上改进完善。在提取液中加入乙酸锌,利用乙酸锌水解后,易与脂肪形成脂肪酸锌沉淀,除去提取溶解带来的脂类化合物。水产品及加工制品(甲壳类、头足类等)带有色素,容易被提取需经净化,在提取液中加入少量活性炭,兼有除色素和除脂功能,活性炭对敌百虫有一定的吸附作用,经实验验证,5 g 样品中以加入 0.1 g 活性炭为宜。样品经提取和净化,提取物中的杂质已大大降低,为了进一步除去水溶性杂质,并将目标物转移至有机相,采取有机溶剂反萃的方法。乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷是通常用于萃取有机磷的溶剂,从易于蒸发浓缩和毒性方面考虑,选用提取液在二氯甲烷-硫酸钠水溶液中液-液分配的方式进行相转移并起到进一步净化的作用;水产腌制品、盐、淡干制品基质复杂,在相转移过程中,与硫酸钠水溶液混合时会出现絮凝而影响两相分层,混合液需经两层滤纸抽滤,再加入二氯甲烷萃取。

3.4 方法的适应性

目前国内动物性食品中敌敌畏残留的测定采用《GB/T 5009.20 食品中有机磷残留的测定》^[12]和《GB/T 5009.161 动物食品中有机磷农药多组分残留的测定》^[13],这两个标准均未规定敌百虫残留的检测方法;而敌百虫残留的检测标准《SN 0125-92 出品肉及肉制品中敌百虫残留

的检验方法》^[14]、《农业部 783号公告—3—2006水产品中敌百虫残留量的测定气相色谱法》^[15],也未规定敌敌畏残留的检测方法。本方法能同时检测水产品中敌百虫、敌敌畏残留,敌百虫定量限为 0.04 mg/kg 和《农业部 783号公告—3—2006水产品中敌百虫残留量的测定气相色谱法》^[15]相当,敌敌畏的定量限为 0.01 mg/kg 略优于《GB/T 5009.20 食品中有机磷残留的测定》^[12],能满足目前国内外的相关限量标准要求,适合于水产品养殖、加工、流通环节中对产品敌百虫、敌敌畏残留的日常监控,也可作为参考方法用于其它动物源产品的检测。

参考文献:

- [1] 金天明,孙晓辉.敌百虫对鲤鱼的毒性与 pH 值的关系初探[J].内蒙古民族大学学报:自然科学版,2002,17(5):420-422.
- [2] 钱汝玉.渔业使用敌百虫需知[J].中国水产,1999,(6):30.
- [3] 张春水,刘克林,何毅,等.生物组织中多种农药成份的 GC/MS 分析[J].农药科学与管理,2005,26(1):13-16.
- [4] 李钦云,赵玲玲.有机磷农药对食品的污染及防治[J].工业卫生与职业病,2005,31(4):260-263.
- [5] 周炯林,徐培渝.有机磷农药遗传毒性研究进展[J].国外医学卫生学分册,2007,34(6):339-344.
- [6] Wang T C, Lin C M, Lo L W. Genotoxicity of methoxy-phosphinyl insecticide in mammalian cells[J]. Zool Stud 2003, 42(3): 462-469.
- [7] Mehla A, Rolseth V, Gordon S et al Brain hypoplasia caused by exposure to trichlorfon and dichlorvos during development can be ascribed to DNA alkylation damage and inhibition of DNA alkyltransferase repair[J]. Neurotoxicol 2000, 21(122): 165-173.
- [8] 彭升友,鸣一鸣,吴梦奎.宁波市部分腌制海产品有机磷残留情况调查[J].中国卫生监督杂志,2004,11(1):11-12.
- [9] 吴德仁,刘青华,谭海雯,等.广西北海市海产品中有机磷农药残留调查[J].应用预防医学,2007,13(4):211-212.
- [10] 蒋长征,戎江瑞,张立军,等.宁波市鲜活水产品有机磷农药残留调查分析[J].海峡预防医学杂志,2007,13(5):65-66.
- [11] 葛志农,李元平,黄冠胜,等.主要贸易国家和地区食品中农兽药残留限量标准[M].北京:中国标准出版社,2004.
- [12] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.20-2003,食品中有机磷残留的测定[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [13] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.161-2003,动物食品中有机磷农药多组分残留的测定[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [14] SN 0125-1992,出品肉及肉制品中敌百虫残留的检验方法[S].北京:中国标准出版社,1992.
- [15] 中华人民共和国农业部.农业部 783号公告—3—2006,水产品中敌百虫残留量的测定 气相色谱法[S].北京:中国农业出版社,2006.
- [16] 刘永,杨长志,康庆贺,等.热裂解气相色谱法测定动物源性食品中敌百虫残留量[J].分析实验室,2008,27(2):119-122.
- [17] 吴通华,田真.气相色谱法快速检测火腿中的敌敌畏[J].实用医技杂志,2004,11(6B):1015.
- [18] 殷德荣,周晓萍,王立媛. GC/NPD 双毛细管柱检测咸鲞中敌百虫和敌敌畏[J].中国卫生检验杂志,2005,15(2):185,205.
- [19] 张晶,任一平.火腿、鳃鲞中敌百虫和敌敌畏的气相色谱快速检测[J].中国卫生检验杂志,2006,16(12):1475-1477.
- [20] 于慧娟,蔡友琼,李庆,等.气相色谱-质谱法研究敌百虫在气相色谱分析过程中产生的分解产物[J].色谱,2006,24(1):23-25.