

牛奶中双甲脒含量快速检测方法的研究

吴 腾*, 魏文平, 扎木则仁, 常建军, 宋晓东, 高永亮
(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011517)

摘 要: **目的** 建立快速检测牛奶中双甲脒的气相色谱法。**方法** 试样中的双甲脒经酸水解成 2,4-二甲基苯胺, 碱化后用正己烷提取, 七氟丁酸酐衍生, 气相色谱-电子捕获检测器检测, 外标法定量。**结果** 该方法检测双甲脒回收率范围在 83.6%~97.4%之间, 相对标准偏差在 1.02%~4.23%之间, 最低检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 该方法简单、快速、分离度好, 适用于牛奶中双甲脒含量的测定。

关键词: 双甲脒; 牛奶; 气相色谱; 毛细管色谱柱

Development of the rapid detection method for amitraz content in milk

WU Teng*, WEI Wen-Ping, ZHAMU Ze-Ren, CHANG Jian-Jun, SONG Xiao-Dong, GAO Yong-Liang
(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co., Ltd., Hohhot 011517, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for rapid determination of amitraz content in milk by gas chromatography (GC). **Methods** The amitraz in a sample was hydrolyzed into 2,4-dimethylaniline by acid, and reacted with alkalinity. The resultant was extracted by N-hexane, and then derived by heptafluorobutyric anhydride. The derivatives were detected and quantified by GC with electron capture detector and external standard method, respectively. **Results** The recoveries of amitraz were 83.6%~97.4%, the relative standard deviation were 1.02%~4.23%, and the detection limit was 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** This method is simple, rapid, and has a good separating degree, and it is suitable for the determination of amitraz in milk.

KEY WORDS: amitraz; milk; gas chromatography; capillary-column chromatography

1 引 言

双甲脒(amitraz)是一种中等毒性的杀螨剂, 主要用于果树、蔬菜、茶叶、棉花等作物的螨害防治^[1]。双甲脒及其代谢产物对人体具有潜在的危害^[2], 近 10 年来, 食品中农药残留物已广泛引起人们的关注, 但对双甲脒残留物研究较少^[3-5]。世界上多数国家和地区对食品中双甲脒规定了严格的最大残留限量, 欧盟、日本规定蜂蜜中双甲脒的最高残留限

量为 0.2 mg/kg ^[6]。

文献报道的测定双甲脒残留量的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[7,8]、气相色谱法-电子捕获器法(GC-ECD)^[9-13], 也有报道用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[14]和气相色谱法-氮磷检测器(GC-NPD)^[15]直接测定双甲脒及其代谢产物, 但在实际操作中, 发现双甲脒在进样口易分解, 回收率低。本研究是将牛奶中的双甲脒经酸水解, 碱化后用正己烷提取, 七氟丁酸酐衍生进行气相色谱(GC)分析。

*通讯作者: 吴腾, 初级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。E-mail: wuteng@mengniu.cn

*Corresponding author: WU Teng, Junior Engineer, Inner Mongolia Dairy Industrial Co., Ltd., Hohhot 011517, China. E-mail: wuteng@mengniu.cn

2 材料与方法

2.1 试剂

双甲脒标准品: 纯度 99.0%(10 mg, Accustandard); 2,4-二甲基苯胺对照品: 纯度 95%(0.5 g, DR. Ehrenstorfer GmbH); 碳酸氢钠(优级纯, 天津福晨); 氯化钠(优级纯, 天津福晨); 正己烷(色谱纯, 天津福晨); 无水硫酸钠(优级纯, 天津福晨); 七氟丁酸酐(色谱纯, Alfa Aear); 盐酸(优级纯, 天津福晨)。水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

1 mol/L 盐酸溶液: 量取浓盐酸 86 mL, 用水溶解并稀释至 1000 mL。

4 mol/L 氢氧化钠溶液: 称取氢氧化钠 160 g, 用水溶解并稀释至 1000 mL。

饱和碳酸氢钠溶液: 称取碳酸氢钠 10.35 g, 用水溶解并稀释至 1000 mL。

2.2 仪器与设备

气相色谱仪(GC-450 VARIAN, 配电子捕获检测器); 天平(万分之一, 十万分之一天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); 漩涡混合器(MS3 basic, 德国 IKA); 恒温干燥箱(DGX-9243B-1, 上海福玛实验设备有限公司); 高速冷冻离心机(Nefuge 23R, 上海力申科学仪器有限公司); 超声波清洗机(QC10260, 天津市旗美科技有限公司)。

2.3 标准溶液配制

双甲脒标准储备液(1 mg/mL): 准确称取双甲脒 10 mg, 用正己烷溶解并定容至 10 mL 容量瓶中, 配制成浓度为 1 mg/mL 的双甲脒标准储备液, 2~8 °C 避光保存, 有效期 3 个月。

2,4-二甲基苯胺标准储备液(1 mg/mL): 准确称取 2,4-二甲基苯胺 10 mg, 用正己烷溶解并定容至 10 mL 容量瓶中, 配制成浓度为 1 mg/mL 的 2,4-二甲基苯胺标准储备液, 2~8 °C 避光保存, 有效期 3 个月。

10 µg/mL 混合标准工作液: 准确量取 1 mg/mL 的双甲脒标准储备液和 2,4-二甲基苯胺标准储备液各 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用正己烷定容至刻度, 配制成浓度为 10 µg/mL 的混合标准工作液, 2~8 °C 避光保存, 有效期 7 d。

准确量取标准工作液, 用正己烷稀释配制成浓度为 10、20、50、100 和 200 ng/mL 的系列标准溶液, 各取 2.00 mL, 按衍生化步骤处理, 供气相色谱仪测

定。以峰面积为纵坐标, 对应的标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线(相关系数 $r^2 > 0.99$)。标准系列溶液的浓度根据标准曲线线性范围和样品含量灵活配制, 但要注意试样液浓度读数必须在标准曲线范围之内。

2.4 方法

2.4.1 样品提取和水解

称取混合均匀的试样约(5±0.05) g 于 50 mL 离心管中, 加入 1 mol/L 盐酸溶液 10 mL, 混匀后于 60 °C 的恒温干燥箱中静置 30 min, 冷却后以 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液于另一离心管中, 加入 4 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL、正己烷 5 mL、氯化钠 5~6 g 漩涡混匀后, 5000 r/min 离心 5 min, 取上层正己烷液 2 mL 于 15 mL 离心管中, 备用。

2.4.2 衍生和净化

在备用液中加入七氟丁酸酐 10 µL, 混匀后于 60 °C 恒温 90 min 衍生, 期间每隔 30 min 取出超声 5 min, 衍生后静置 5 min, 加饱和碳酸氢钠溶液 2 mL, 混匀后取上层有机相, 加入 2 g 无水硫酸钠去除水分, 经 0.22 µm 有机系滤头过滤后供气相色谱测定。

2.4.3 结果计算

试样中双甲脒的含量 $X(\mu\text{g}/\text{kg})$:

$$X = \frac{C \times V \times 1.21}{m} \times 1000$$

式中:

X : 试样中双甲脒的含量, $\mu\text{g}/\text{kg}$;

C : 试样溶液中 2,4-二甲基苯胺的浓度, ng/mL ;

V : 萃取用正己烷的体积, mL ;

m : 试样质量, g ;

1.21: 2,4-二甲基苯胺计算成双甲脒的校正系数。

2.4.4 检出限

使用 20 次空白基质样品进行检出限验证($S/N > 3$), 检出限计算公式:

$$XL = Xb + k \times Sb$$

式中: Xb ——空白多次测得信号的平均值;

Sb ——空白多次测得信号的标准偏差;

k ——根据一定置信水平确定的系数。

当 $k=3$ 时, XL 对应的样品浓度即为 90% 置信度的方法检出限($LOD=90\%$)按以上公式计算得到的检出限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5 色谱条件

进样口温度 260 °C; ECD 检测器温度: 300 °C;

柱流速: 1.0 mL/min, 载气: 氮气(纯度 99.999%);
分流比: 20:1; 进样量: 1 μ L;

色谱柱: VF-5ms 毛细管柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)或性能相当者;

柱温: 程序升温, 具体见表 1。

备注: 以上仪器条件是参考条件, 在实际操作过程中可以根据样品特性和仪器状态做适当调整。

3 结果与讨论

3.1 准确度和精密度

在牛奶样品中加入 3 个浓度的双甲脒进行加标回收率实验, 回收率范围在 83.6%~97.4%之间, RSD 范围在 1.02%~4.23%之间, 结果见表 2。

3.3 相关图谱

标准溶液色谱图、本底样品色谱图、加标样品色谱图见图 1~3。

3.4 讨论

由于牛奶基质复杂, 按照 GB 29707-2013《牛奶中双甲脒残留标志物残留量的测定气相色谱法》用碱液直接水解双甲脒, 不能很好去除蛋白质及脂肪, 导致后续步骤不能进行。双甲脒既可以酸水解, 也可以碱水解。所以, 本方法是先用酸水解之

后再碱化, 用正己烷提取, 此法能够很好地水解并提取目标物。

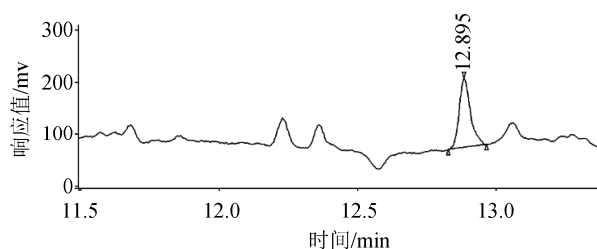


图 1 标准溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard solution

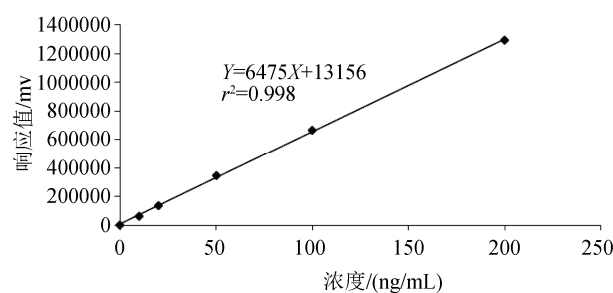


图 2 标准曲线图

Fig. 2 The standard curve

表 1 程序升温

Table 1 Program raising of temperature

初始温度/°C	升温速率/°C/(min)	保留时间(min)	总时间(min)
50	/	1.0	1.0
120	10	1.0	9.0
170	6	1.0	18.33
250	10	2.0	28.33

表 2 样品的准确度和精密度分析(n=6)

Table 2 Results of accuracy and precision test (n=6)

样品名称	加标量(μ g/kg)	平均结果(μ g/kg)	回收率(%)	RSD(%)
牛奶	5	4.65	83.6 ~ 96.4	4.23
	10	9.61	95.6 ~ 96.6	1.23
	25	24.2	94.8 ~ 97.4	1.02

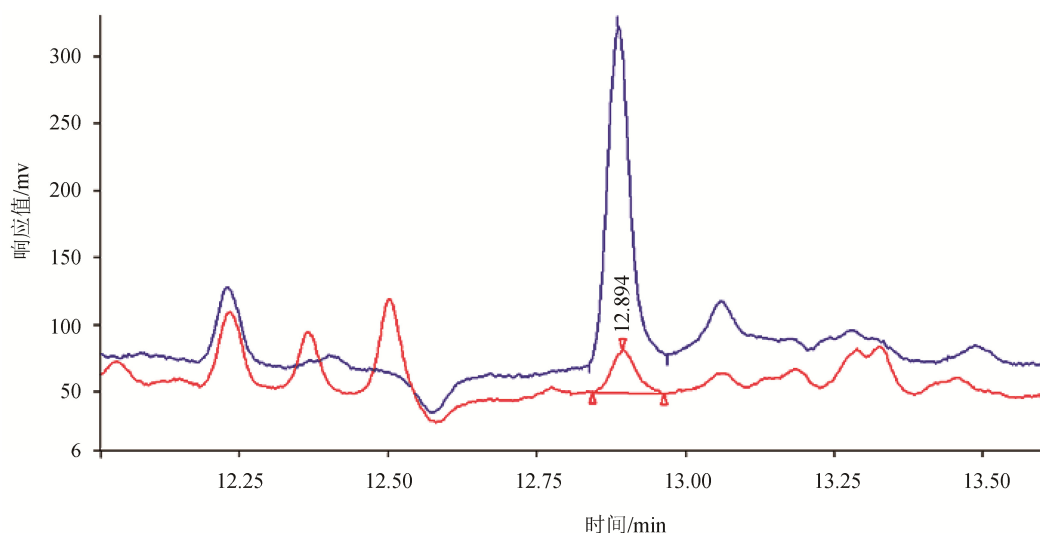


图3 加标样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of spiked sample

4 结论

本研究建立了一种牛奶中双甲脒检测的气相色谱方法。该方法前处理简单、重复性好、分析时间短,检出限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 平均回收率范围为 83.6%~97.4%, RSD 范围为 1.02%~4.23%, 能较好地满足牛奶中双甲脒的快速检测需求。

参考文献

- [1] 王焕民. 新编农药手册[M3][M]. 北京: 农业出版社, 1989.
Wang HM. Manual of new pesticide [M3] [M]. Beijing: Agricultural Press, 1989.
- [2] 吴建明. 双甲脒毒性研究[J]. 化工劳动保护, 1992, 13(3): 134-136.
Wu JM. Amitraz toxicity studies [J]. Chem Ind Lab Protac, 1992, 13(3): 134-136.
- [3] 罗毅. 粮食中玉米赤霉烯酮的电子捕获气相色谱分析[J]. 环境化学, 1991, 9(1): 59-62.
Luo Y. The corn gibberellic ketene in the grain electron capture gas chromatography analysis [J]. Environ Chem, 1991, 9(1): 59-62.
- [4] 赵婴荣. 单甲脒在苹果中残留量的测定[J]. 农药, 1991, 30(50): 26-30.
Zhao YR. Monomethyl amidine residues determination in the apple [J]. Chin J Pestic, 1991, 30(50): 26-30.
- [5] 马峰. 高效液相色谱法分析双甲脒及其代谢物[J]. 色谱, 1985, 5(2): 117-119.
Ma F. Determination of amitraz by high performance liquid chromatographic method [J] J Chromatogr, 1985, 5(2): 117-119.
- [6] 葛志荣. 食品中农业化学品残留限量(药品卷)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
Ge ZR. Agricultural chemicals residue limits in food (drug) [M]. Beijing: China Standard Publishing House, 2006.
- [7] 赵增运, 吴斌. 高效液相色谱法测定蜂蜜中的双甲脒残留[J]. 中国养蜂, 2005, 56(5): 4-6.
Zhao ZY, Wu B. High performance liquid chromatographic method for determination of amitraz residues in honey [J]. China Apicul, 2005, 56(5): 4-6.
- [8] 杨容, 刘海燕. 基质固相分散分离-高效液相色谱法测定食物中痕量抗蚜威和双甲脒[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(2): 114-117.
Yang R, Liu HY. Matrix solid-phase dispersion separation high performance liquid chromatographic determination of trace pirimicarb and amitraz in food [J]. J Hebei Agric Univ, 2003, 26(2): 114-117.
- [9] 郑永权, 姚建仁. 蜂蜜中双甲脒残留量检测方法[J]. 农药科学与管理, 2000, 21(3): 14-16.
Zheng YQ, Yao JR. Amitraz residues detection method in honey [J]. Sci Manage Pestic, 2006, 21(3): 14-16.
- [10] 戴华. 出口柑桔中双甲脒及代谢物残留量测定[J]. 农药, 1994, 34(1): 27-29.

- Dai H. Amitraz exports the oranges and the metabolite residues determination [J]. Chin J Pestic, 1994, 34(1): 27-29
- [11] 杨容, 刘海燕. 气相色谱法检测柑桔中痕量双甲脒[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(4): 127-129.
- Yang R, Liu HY. Determination of amitraz residues in citrus by gas chromatographic method [J]. J Hebei Agric Univ, 2003, 26(4): 127-129.
- [12] 薛晓锋, 赵静. 气相色谱—质谱法同时测定蜂蜜中的双甲脒及其代谢物残留[J]. 现代科学仪器, 2005, 1: 65-67.
- Xue XF, Zhao J. Gas chromatography-mass spectrometry determination amitraz and its metabolite residues at the same time in the honey [J]. Mod Sci Instrum, 2005, 1: 65-67.
- [13] 王建华, 李广领. 上海青中双甲脒和噻嗪酮农药残留分析[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 191-195.
- Wang JH, Li GL. Analysis of amitraz and thiamethoxam oxazine ketone pesticide residue in Shanghai green [J]. J Northwest Agric, 2008, 17(4): 191-195.
- [14] GB/T 17329-1998 食品中双甲脒残留量的测定[S].
GB/T 17329-1998 Determination of amitraz residues in foods [S].
- [15] GB/T 29707-2013 牛奶中双甲脒残留标志物残留量的测定-气相色谱法[S].
GB/T 29707-2013 Determination of marker residues of amitraz in milk by gas chromatographic method [S].

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



吴 腾, 初级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。
E-mail: wuteng@mengniu.cn