

气相色谱法测定蔬菜中敌百虫的含量

黄航星^{1,2,3*}, 陈燕敏^{1,2,3}, 郭海柔^{1,2,3}, 何焜鹏^{1,2,3}

(1. 广东省食品工业公共实验室, 广州 511442; 2. 广东省食品工业研究所有限公司, 广州 511442;
3. 广东省食品质量监督检验站, 广州 511442)

摘要: 目的 建立气相色谱法测定蔬菜中敌百虫的含量。**方法** 研究不同色谱条件及消除基质效应对敌百虫测定的影响, 并取蔬菜样品(以青瓜为代表)10 g 进行前处理提取后, 用经优化后的色谱条件对敌百虫进行测定, 外标法定量。**结果** 在进样口温度设为 150 °C, 使用内径 0.32 mm 的色谱柱以及设置 3.0 mL/min 的色谱柱流量时, 敌百虫响应较好; 在 0.06~2.0 mg/kg 的加标水平下, 敌百虫回收率在 90.2%~99.8%之间, 相对标准偏差 ≤4.3%。**结论** 通过对敌百虫气相色谱条件的优化以及使用基质标准曲线消除基质效应, 可以大幅提高气相色谱法检测敌百虫的准确度。

关键词: 敌百虫; 温度; 热分解; 基质效应

Determination of trichlorfon in vegetables by gas chromatography

HUANG Hang-Xing^{1,2,3*}, CHEN Yan-Min^{1,2,3}, GUO Hai-Rou^{1,2,3}, HE Kun-Peng^{1,2,3}

(1. Guangdong Provincial Public Laboratory of Food Industry, Guangzhou 511442, China; 2. Guangdong Food Industry Institute Co., Ltd., Guangzhou 511442, China; 3. Guangdong Food Quality Supervision and Inspection Station, Guangzhou 511442, China)

ABSTRACT: Objective To establish the gas chromatography method to determine the content of trichlorfon in vegetables. **Methods** The influence of different chromatographic conditions and elimination of matrix effect on the determination of trichlorfon was studied. After taking 10 g of vegetable samples (represented by cucumber) as pretreatment and extraction, the trichlorfon were determined by optimized chromatographic conditions, and quantified by the external standard method. **Results** When the injector temperature was set to 150 °C, a chromatographic column with an inner diameter of 0.32 mm was used and a flow rate of 3.0 mL/min was set, the response of trichlorfon was better. At the standard level of 0.06–2.0 mg/kg, the recovery rate of trichlorfon ranged from 90.2% to 99.8%, with the relative standard deviation ≤4.3%. **Conclusion** By optimizing the gas chromatography conditions of trichlorfon and using matrix standard curves to eliminate matrix effects, the accuracy of gas chromatography detection of trichlorfon can be greatly improved.

KEY WORDS: trichlorfon; temperature; thermal decomposition; matrix effect

1 引言

敌百虫是一种高效、低毒、低残留的有机磷杀虫剂, 属磷酸酯类^[1], 作用机理兼有胃毒和触杀作用, 因具有良好

的驱虫效果而广泛应用于农林、畜牧、水产养殖中^[2-4]。虽然敌百虫属于低毒类杀虫剂, 但过量及不合理的使用易造成农药污染^[5]。研究表明, 敌百虫有生殖毒性、神经毒性, 长期暴露于敌百虫中, 会产生生殖障碍、精神错乱等症^[6,7],

*通讯作者: 黄航星, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 2416112664@qq.com

*Corresponding author: HUANG Hang-Xing, Assistant Engineer, Guangdong Provincial Public Laboratory of Food Industry, Guangzhou 511442, China. E-mail: 2416112664@qq.com

并可导致细胞氧化损伤、细胞凋亡率上升以及神经系统某些功能性紊乱^[8]。因此为保障人民群众的生命财产安全,敌百虫的检测意义十分重大。

目前敌百虫检测方法有气相色谱法、液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、分子印迹等^[9-12]。其中,液相色谱法的耗时较长,且灵敏度达不到农药残留痕量分析的要求^[13],液相色谱-串联质谱法仪器价格昂贵,需要多种仪器设备支持,运行成本较高,分子印迹技术目前虽有良好的研究前景,但相关技术尚未成熟,目前未见大规模应用于实际检测中,而气相色谱法有仪器价格较便宜,操作快捷方便,分离度好,灵敏度高的优点,非常适用于敌百虫检测。但气相色谱法由于敌百虫的热稳定性差,易发生分解,影响了其定量准确性和重现性^[14]。

本文对敌百虫在气相色谱分析中的条件进行优化,减少敌百虫在气相色谱系统中的热分解,使用基质标准曲线,降低基质效应的影响,为建立可靠的敌百虫气相色谱分析方法提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

7890B 型气相色谱仪,配有 FPD 检测器(美国 Agilent 公司); HP-5 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)、HP-5 色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm)(美国 Agilent 公司); 5190-2293 带玻璃棉去活衬管(美国 Agilent 公司); AR323CN 电子分析天平(上海奥豪斯公司); MS3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); TTL DC II 氮吹仪(北京同泰联公司); 3K15 离心机(德国 Sigma 公司); 0.22 μm 有机相滤膜(上海安谱公司);

丙酮、乙腈(HPLC 级,美国霍尼韦尔公司); 氯化钠(分析纯,广州化学试剂厂); 敌百虫标准品(纯度 97.2%,德国 Dr.Ehrenstorfer 公司)。

市售蔬菜样品购买于当地超市。

2.2 色谱条件

色谱柱: HP-5 色谱柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm); 载气: 高纯氮气; 色谱柱流速: 3 mL/min; 进样口温度: 150 °C, 不分流进样模式; 衬管: Agilent 5190-2293 去活衬管, 不带玻璃棉; 升温程序: 初始温度 45 °C, 以 10 °C/min 的速率升至 200 °C, 保持 2 min; FPD 检测器温度: 180 °C; 进样量: 1 μL;

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液的配制和曲线绘制

称取敌百虫固体标物 10.3 mg, 用丙酮定容至 10 mL 容量瓶, 配制成 1 mg/mL 的敌百虫储备液。将 1 mg/mL 的储备液稀释为 10 μg/mL 的标准中间液, 精密吸取中间液, 分别用丙酮和空白基质液配制为 0.06、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 μg/mL 的标准工作曲线。用气相色谱仪测定, 做峰面积对应浓度的标准曲线, 求出直线回归方程。

2.3.2 样品处理

称取 10.0 g 不含待测物敌百虫的青瓜样品于 50 mL 离心管内, 加入 10 mL 乙腈后用涡旋器涡旋提取 3 min, 置入离心机以 6000 r/min 的转速离心 3 min, 将上清液转移到另一空离心管内, 再往装有样品的离心管内加入 10 mL 乙腈, 重复提取操作并取上清液, 合并两次提取的上清液, 在上清液合并液中加入约 2 g 氯化钠, 振荡均匀, 在离心机以 6000 r/min 离心 3 min 后, 取上清液 4 mL 用氮气吹至近干, 加入 2 mL 丙酮涡旋均匀, 用 0.22 μm 滤膜过滤后备用于检测。

2.3.3 进样口温度

在其他色谱条件不变的情况下, 分别设置进样口温度为 150、180、200、220、250、280 °C, 经气相色谱测定各对应的峰面积。

2.3.4 色谱柱流量

在其他色谱条件不变的情况下, 分别设置色谱柱流量为 1.0、2.0、3.0 mL/min, 经气相色谱测定各对应的峰面积。

2.3.5 色谱柱

在其他色谱条件不变的情况下, 分别使用 HP-5 色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm); HP-5 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 经气相色谱测定各对应的峰面积。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

3.1.1 进样口温度选择

保持其他色谱条件不变, 比较 150~280 °C 之间不同的进样口温度对 0.06 μg/mL 敌百虫测定造成的影响, 结果如图 1 所示, 由图可以看出, 随着温度的升高, 敌百虫的峰面积不断地下降, 表明随着温度的升高, 敌百虫分解越多, 并且不呈简单的线性关系, 在 180 °C 之前, 敌百虫的分解受温度升高影响较小, 分解程度较低, 180 °C 之后, 受温度升高影响较大, 分解程度较大。实际检测过程中, 分析对象多为样品基质复杂的样品, 进样口温度决定了样品能否有效气化^[15], 因此在满足敌百虫分解较少的基础上, 应根据实际需要尽可能提高进样口温度。由于进样口温度为 150 °C 时, 敌百虫峰面积最大, 分解最少, 所以进样口最适温度为 150 °C。

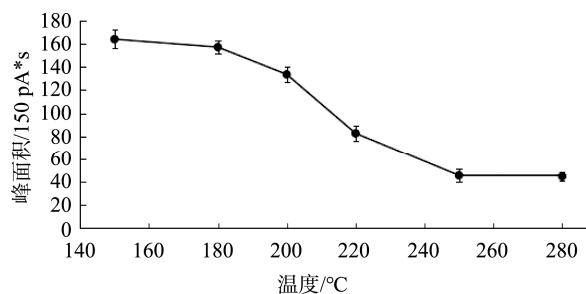


图 1 进样口温度对敌百虫测定的影响($n=3$)

Fig.1 Influence of the temperature of the sample inlet on the determination of trichlorfon($n=3$)

3.1.2 色谱柱流量选择

设置不同色谱柱流量时, 敌百虫峰面积情况如表 1 所示, 由表可知, 色谱柱流量越大, 敌百虫峰面积越大, 原因是在不分流模式下, 当衬管体积一样时, 更大的色谱柱流量意味着样品在高温的进样口中的停留时间越短, 减少了敌百虫在进样口中受热分解的可能性。因此, 应使用 3.0 mL/min 的色谱柱流量。

3.1.3 色谱柱类型

通过对 HP-5 色谱柱的 0.25 mm、0.32 mm 2 种内径对比实验, 结果发现在其他色谱条件一致时, 色谱柱的内径对敌百虫的峰形及峰面积的影响无显著区别。但使用内径为 0.32 mm 的色谱柱, 相较内径为 0.25 mm 的色谱柱可设置更大的色谱柱流量, 在不分流进样模式下, 更大的色谱柱流量意味着样品在衬管中的停留时间越短, 通过减少样品在温度较高的进样口的停留时间, 从而可减少敌百虫的

分解。因此, 应选择 0.32 mm 内径的色谱柱。

3.2 标准曲线

3.2.1 溶剂标准曲线

将基质标准曲线与溶剂标准曲线分别进样后, 溶剂标样的色谱图见图 2, 可以看出, 溶剂标样中同时检测出敌百虫与敌敌畏, 由于敌百虫有受热分解产生敌敌畏的特性, 并且配制标准曲线过程中未加入敌敌畏标准品, 因此, 所检测出的敌敌畏应为敌百虫在受热分解后的产物。在不同浓度的敌百虫标准点中, 敌百虫与敌敌畏的峰面积占比并不一样, 由表 2 的数据可知, 在溶剂标样中, 浓度越小的敌百虫标准点, 敌百虫的峰面积占比越小, 而在一般的农药残留检测中, 敌百虫多是痕量分析, 浓度一般较低, 因此, 使用溶剂标准曲线无法对敌百虫准确定量。

表 1 设置不同色谱柱流量时敌百虫峰面积情况

Table 1 Peak area of trichlorfon with different column flow

浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.0 mL/min 敌百虫峰面积(150 pA)	2.0mL/min 敌百虫峰面积(150 pA)	3.0 mL/min 敌百虫峰面积(150 pA)
0.06	166.8 ^a	185.7 ^a	190.5 ^b
0.10	266.2 ^a	292.4 ^b	341.9 ^c
0.20	500.4 ^a	549.7 ^b	626.7 ^c
0.50	1260.1 ^a	1386.1 ^b	1499.6 ^c
1.00	2544.2 ^a	2774.2 ^b	3135.9 ^c
2.00	5013.7 ^a	5514.8 ^b	6046.4 ^c

注: 同行不同小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上有显著性差异, 相同字母表示差异不显著。

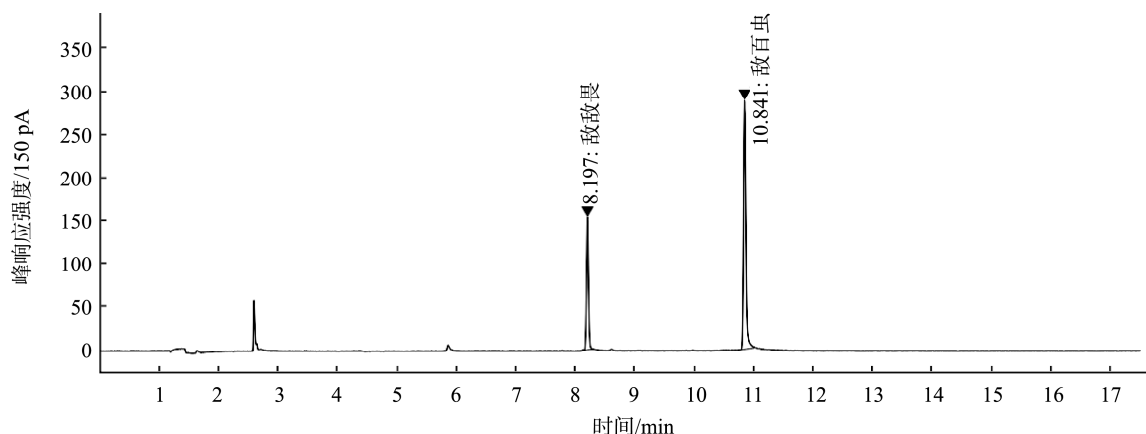


图 2 敌百虫溶剂标样气相色谱图(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Fig.2 Gas chromatogram of trichlorfon solvent standard sample(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

表 2 敌百虫不同浓度的溶剂标样中敌百虫与敌敌畏峰面积情况

Table 2 Peak area of Trichlorfon and dichlorvos in different concentrations of trichlorfon

浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	敌敌畏峰面积(150 pA)	敌百虫峰面积(150 pA)	敌敌畏峰面积百分比/%	敌百虫峰面积百分比/%
0.06	52.1	31.8	62.0	38.0
0.1	40.0	42.7	48.4	51.6
0.2	84.2	111.2	43.1	56.9
0.5	178.0	317.6	35.9	64.1
1.0	324.4	919.6	26.1	73.9
2.0	499.0	2551.5	16.4	83.6

3.2.2 基质标准曲线

基质标样的色谱图及标准曲线见图 3, 图 4, 可以发现基质标样中敌百虫未出现分解产生敌敌畏的现象, 敌百虫线性回归方程为: $Y=2757.16X+11.46$, $r=0.99998$, 方法的检出限为 0.01 mg/kg。敌百虫在溶剂标准曲线中易分解产生敌敌畏, 而在基质标曲中不产生分解的原因在于敌百虫易受基质效应的影响^[16], Emey 等^[17]提出基质效应的产生原因是由于样品基质参与到农药由热进样口向色谱柱的传输过程, 气相色谱中的进样口、柱头与色谱柱等位置会产生活性位点, 当热不稳定的农药通过时, 农药可能会与活性位点反应导致农药分解, 而当存在样品基质时, 样品基质中的杂质分子可与目标分析物竞争活性位点, 从而减少农药的分解机率; 纯溶剂无法为待测农药提供足够的保护, 因此溶剂标准点响应值降低。敌百虫在溶剂标准品中由于缺少样品基质的保护,

使得敌百虫与色谱系统中的衬管、柱头、色谱柱等产生的大量活性位点接触并发生热分解, 而基质标准品中因样品基质的保护, 减少了敌百虫的热分解以及与活性位点反应的机会, 使得大部分的敌百虫得以保留, 从而有较好的定量的准确性。因此, 应使用基质标准曲线定量降低基质效应的影响。

3.3 回收率和精密度

各取 10.0 g 青瓜样品于离心管中, 取标准曲线浓度点中低中高 3 种浓度进行加标实验, 每种浓度 3 个样品, 按本实验样品处理方法处理分析, 采用外标法定量, 计算回收率和相对标准偏差, 结果见表 3。实验结果表明, 在 0.06~2.0 mg/kg 的加标浓度范围下, 回收率在 90.2%~99.8%之间, 表明经优化之后的气相色谱分析方法具有良好的准确性。

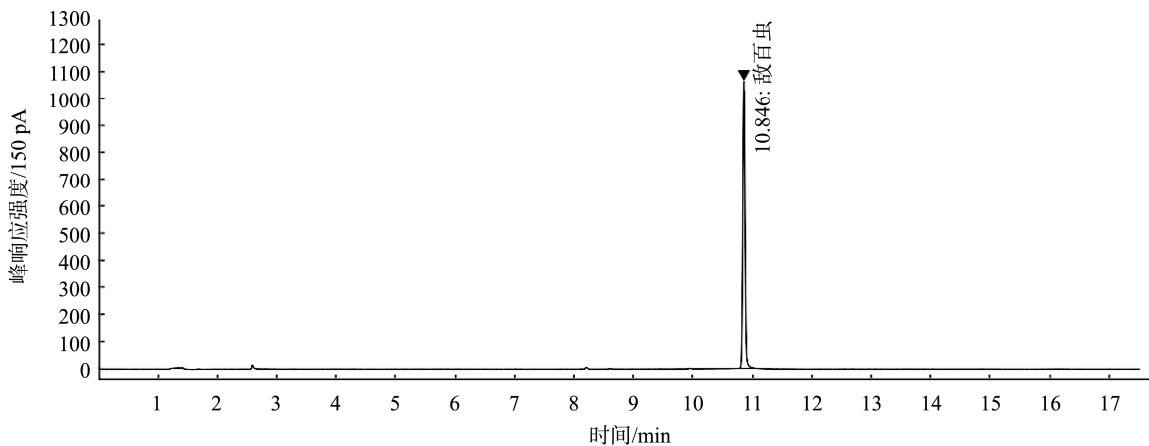


图 3 敌百虫基质标样气相色谱图(1 µg/mL)

Fig.3 Gas chromatogram of trichlorfon matrix standard sample(1 µg/mL)

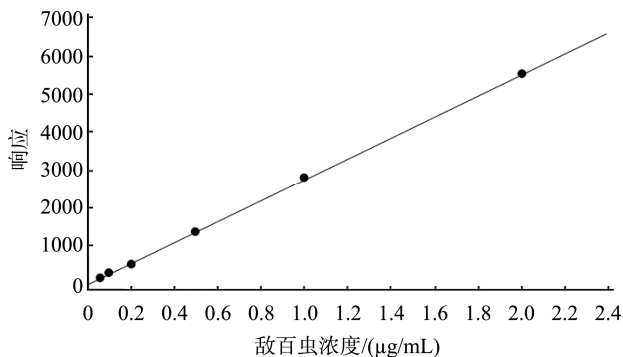


图 4 敌百虫基质标准曲线

Fig.4 Standard curve of trichlorfon substrate

mg/kg, 其余样品均无检出敌百虫。

表 3 敌百虫回收率及精密度($n=3$)

Table 3 Recoveries and precisions of trichlorfon($n=3$)

加标量/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
	95.7		
0.06	96.8	94.2	3.8
	90.2		
	91.6		
0.5	96.3	95.9	4.3
	99.8		
	98.1		
2.0	95.4	96.2	1.7
	95.2		

3.4 实际样品检测

采用本实验方法, 对 30 批次市售蔬菜样品的敌百虫进行测定, 其中有 1 批次小白菜检出敌百虫, 含量为 0.08

4 结 论

目前气相色谱法测定敌百虫方法灵敏度较低, 敌百虫在检测时易误判为假阴性, 在进行多农药残留测定时甚至会因为分解产生敌敌畏而影响对敌敌畏的测定^[14]。本研究通过优化气相色谱条件以及消除基质效应, 提高了方法灵敏度, 降低了敌百虫的分解。实验结果表明, 当敌百虫在气相色谱中分析条件为进样口温度 150 °C, 使用 0.32 mm 内径的色谱柱, 柱流量设置在 3.0 mL/min, 并且用基质标准曲线定量以消除基质效应的影响时, 可极大地降低敌百虫在气相色谱系统中的分解, 得到准确的结果。

参考文献

- [1] 张为农. 敌百虫因应用广泛而常盛不衰[J]. 农药市场信息, 2009, (17): 26.
Zhang WN. Trichlorfon thrives because of its wide application [J]. Pestic Market News, 2009, (17): 26.
- [2] 黄冬梅, 蔡友琼, 于慧娟, 等. 液相色谱-串联质谱法测定南美白对虾中敌百虫、敌敌畏残留量[J]. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(3): 50-54.
Huang DM, Cai YL, Yu HJ, *et al.* Determination of trichlorfon and dichlorvos residues in *Penaeus vannamei* by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin Fishery Qual Stand, 2012, 2(3): 50-54.
- [3] 陈达炜, 吕冰, 李荷丽, 等. 腌制食品中敌敌畏和敌百虫检测的前处理方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(3): 244-249.
Cheng DW, Lv B, Li HL, *et al.* Study on the pretreatment method for detection of dichlorvos and trichlorfons in pickled food [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26(3): 244-249.
- [4] 王海燕, 夏勇. 超高效液相色谱-串联质谱同时测定水中的敌百虫和敌敌畏[J]. 中国环境监测, 2014, 30(6): 153-158.
Wang HY, Xia Y. Simultaneous determination of Trichlorfon and dichlorvos in water by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Environ Monit Chin, 2014, 30(6): 153-158.
- [5] 熊锋, 黄洁雯, 苏龙, 等. 敌百虫在胡萝卜田样品中的残留分析方法及消解动态[J]. 农药, 2018, 57(3): 204-206, 221.
Xiong F, Huang JW, Su L, *et al.* Residue analysis and digestion dynamics of trichlorfon in carrot field samples [J]. Agrochemicals, 2018, 57(3): 204-206, 221.
- [6] 唐龙, 户宜, 刘晓亮, 等. 敌百虫亚急性染毒对雄性小鼠的生殖毒性作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 33(12): 1587-1590.
Tang L, Hu Y, Liu XL, *et al.* Reproductive toxicity of subacute exposure to trichlorfon in male mice [J]. J Shanghai Jiao Tong Univ (Med Sci), 2013, 33(12): 1587-1590.
- [7] 刘学忠, 李丹, 袁燕, 等. 敌百虫对大鼠大脑皮质神经细胞的形态学损伤[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(3): 457-462.
Liu XZ, Li D, Yuan Y, *et al.* Morphological damage of neurons in cerebral cortex of rats by trichlorfon [J]. Chin J Vet Sci, 2012, 32(3): 457-462.
- [8] 李勃. 低剂量敌百虫胁迫对中国林蛙的肝细胞毒性与分子响应[D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
Li B. Hepatotoxicity and molecular response of *Rana chensinensis* to low dose trichlorfon stress [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2017.
- [9] NY/T 761-2008 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定[S].
NY/T 761-2008 Pesticide multiresidue screen methods for determination of organophosphorus pesticides, organochlorine pesticides, pyrethroid pesticides and carbamate pesticides in vegetables and fruits [S].
- [10] GB/T 20769-2008 水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定[S].
GB/T 20769-2008 Determination of 450 pesticides and related chemicals residues in fruits and vegetables—LC-MS-MS method [S].
- [11] 牛鹏飞, 仇农学, 郭玉蓉, 等. 固相萃取结合高效液相色谱同时检测浓缩苹果汁中 6 种农药残留[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(4): 843-847.
Niu PF, Qiu NX, Guo YR, *et al.* Simultaneous determination of six pesticide residues in concentrated apple juice by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2010, 26(4): 843-847.
- [12] 吕艳荣, 苏立强, 楚善明, 等. 敌百虫分子印迹聚合物的制备及应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16): 4393-4396.
Lv YR, Su LQ, Chu SM, *et al.* Preparation and application of molecularly imprinted polymer of trichlorfon [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(16): 4393-4396.
- [13] 范俊. 液质联用法测定水中敌百虫的含量[J]. 化工中间体, 2015, 11(11): 78-79.
Fan J. Determination of trichlorfon in water by LC-MS [J]. Mod Chem Res, 2015, 11(11): 78-79.
- [14] 马妍, 李薇, 程家丽. 气相色谱法测定蔬菜中敌百虫及其降解产物敌敌畏农药残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(14): 1676-1679.
Ma Y, Li W, Cheng JL. Determination of Trichlorfon and its degradation product dichlorvos pesticide residues in vegetables by gas chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2018, 28(14): 1676-1679.
- [15] 李科, 张盈盈, 张媛. 气相色谱技术在环境分析中的应用和发展[J]. 石化技术, 2016, 23(5): 56-57.
Li K, Zhang YY, Zhang Y. Application and development of gas chromatography in environmental analysis [J]. Petrochem Ind Technol, 2016, 23(5): 56-57.
- [16] 陈韵贤, 吴春梅, 梁志刚. 30 种有机磷农药残留在 5 种蔬菜中的基质效应比较[J]. 现代农业科技, 2015, (13): 146-148, 150.
Chen YX, Wu CM, Liang ZG. Matrix effects of 30 organophosphorus pesticide residues in 5 vegetables [J]. Mod Agric Sci Technol, 2015, (13): 146-148, 150.
- [17] Erney DR, Gillespie AM, Gilvydis DM, *et al.* Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection [J]. J Chromatogr A, 1993, 638(1): 57-63.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



黄航星, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 2416112664@qq.com