

气相色谱法测定水产品中三氯杀螨醇残留量

陈洁文, 柯常亮, 甘居利

(农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室, 广东省渔业生态环境重点实验室, 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

摘要:为拓展食品中农药残留监控范围, 本文建立了水产品中三氯杀螨醇的气相色谱测定方法。试验基质为鳗鲡、罗非鱼、对虾、玻纹巴非蛤, 取其可食用组织的均匀试样 1 g, 用正己烷超声萃取, 用浓硫酸和弗罗里硅土净化, 二氯甲烷/正己烷混合液淋洗层析柱。洗脱液收集和旋转蒸发浓缩后, 用气相色谱法测定其中的三氯杀螨醇, 外标法定量。测定仪器为 HP 6890 N 型气相色谱仪, 配 HP 7683 B 型自动进样器、HP-5 型毛细管气相色谱柱 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 和 ^{63}Ni 微电子捕获检测器。三氯杀螨醇浓度线性范围是 0.002 5~0.4 μg·mL⁻¹ ($r = 0.999\ 8$, $P < 0.001$), 方法定量检测下限为 0.01 μg·g⁻¹。用未检出三氯杀螨醇的鳗鲡等 4 种试样, 添加 3 个水平的三氯杀螨醇, 分别为 0.01、0.10、0.50 μg·g⁻¹, 每种试样每个添加量测定 6 份。结果显示, 加标回收率在 71%~111% 范围内, 批内变异系数为 3.2%~8.5% ($n=6$), 批间变异系数为 2.5%~7.1% ($n=4$)。定量限点加标试样的回收率为 73%~94%, 批内变异系数为 5.9%~7.7%, 峰高信噪比 > 10。本方法试样用量少, 前处理简便, 可操作性强, 适合测定水产品可食部分的三氯杀螨醇残留量。

关键词: 水产品; 三氯杀螨醇; 测定方法

中图分类号: X830.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)02-0416-04

Determination of Dicofol Residue in Aquatic Products by Gas Chromatography

CHEN Jie-wen, KE Chang-liang, GAN Ju-li

(Key Laboratory of Mariculture & Ecology and Quality Control, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Fishery Ecology Environment, Guangdong Province, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: A method for determining dicofol in aquatic products was established by using gas chromatography in order to widen pesticide monitoring in food. The test samples were edible tissues of eel, prawn, *Oreochromis* and *Paphia undulata*. One gram homogenized tissue sample was extracted ultrasonically in *n*-hexane, then purified with concentrated sulfuric acid, dehydrated and chromatographed through a complex column of dry sodium sulfate and Florisil adsorbent. Mixed solution of dichloromethane/*n*-hexane pass the column, and then condensed by evaporation. Finally, the dicofol in the solution was determined by gas chromatography and external standard method. The test system composes of a HP 6890 N capillary gas chromatograph-meter, a HP 7683 B auto-injector, a HP-5 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), and a ^{63}Ni micro electric capture detector. The linear range of dicofol concentration were from 0.002 5 μg·mL⁻¹ to 0.4 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$, $P<0.001$), and the detection limit of dicofol was 0.01 μg·g⁻¹. In the validating test, dicofol was respectively added into edible tissues of four kinds of aquatic products at three levels, 0.01, 0.10 and 0.50 μg·g⁻¹. The results for the whole process showed recoveries from 71% to 111%, variation coefficients from 3.2% to 8.5% in each batch ($n=6$) and from 2.5% to 7.1% among batches ($n=4$). At the level of 0.01 μg·g⁻¹, the recoveries ranged from 73% to 94%, the variation coefficients ranged from 5.9% to 7.7% in each batch ($n=6$), the ratio of signal to noise was greater than 10. This method was simple in preparation, and easy in operation. It needs only little tissue sample, and suits for detecting dicofol in edible tissue of aquatic products.

Keywords: aquatic products; dicofol residue; determination

三氯杀螨醇 (商品名 dicofol, DCF) 于 20 世纪 50 年代问世, 逐渐成为滴滴涕 (DDT) 等禁用有机氯杀虫

剂的重要替代品, 在许多国家 (包括我国) 被广泛用于杀灭果树、棉花、花卉的螨虫。DCF 虽然杀螨效果好, 对高等动物的急性口服毒性较低, 但近年来观察和研究显示: 其慢性毒性较大, 内分泌干扰作用与 DDT 相似, 对动物有明显的雌激素效应, 甚至引起恶性肿瘤, 在农业环境中存留时间较长, 可通过环境、食物等进入动物体, 并富集在动物组织内, 对动物构成慢性损

收稿日期: 2008-03-12

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2007-TS-20, 2008-TS-07)

作者简介: 陈洁文, 主要从事渔业环境及水产品质量监控研究。

E-mail: xiaoa312690297@163.com

通讯作者: 甘居利 E-mail: ganjuli@163.com

害或潜在威胁^[1-9]。

我国是农业大国,于2006年11月起实施《农产品质量安全法》,国际上对食品安全的要求越来越高。在发达国家和个别发展中国家,DCF的生产和使用被严格控制,其在粮食、蔬菜、水果、茶叶、奶类、畜禽类肉食品中的残留受到限制和严密监控。国内颁布了茶叶、部分水果、棉籽油中DCF残留限量标准和测定方法标准^[10],对蜂蜜、粮食、蔬菜、果叶中DCF测定方法已有少量报道^[11-13],尚未见肉类食品中DCF测定方法的报道。为拓展动物源性食品中农药残留监控范围,本文探讨了水产品可食部分DCF残留量的气相色谱测定方法。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

标准溶液:三氯杀螨醇浓度为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,是由中国农业环境监测科研所研制的有证标准物质溶液,在保质期内使用,临用前用正己烷逐级稀释至适当浓度。

试剂:农残级正己烷,二氯甲烷,优级纯浓硫酸,分析纯无水硫酸钠(650℃加热4h),60~100目层析用Florisil硅土(130℃加热12h)。

玻璃层析柱:柱身長20cm,内径1cm,底部带砂芯滤层和旋塞,用正己烷湿法装柱,自下而上依次装填Florisil硅土6cm、无水硫酸钠3cm,用约10mL正己烷预淋洗,弃去预淋洗液。

1.2 仪器和设备

美国Agilent 6890 N型气相色谱仪,配⁶³Ni放射源微电子捕获检测器、HP-7683B型自动进样器、HP-5型石英毛细管色谱柱(30m×0.32mm×0.25 μm);电子天平,均质机,超声振荡器,旋涡混合器,离心机,旋转蒸发浓缩器;容量瓶,移液管,离心管,鸡心瓶,气相色谱进样瓶。

1.3 试样处理

试验基质(基体)取自2007年在我国广东省某些地区采集的部分鳊鲮、罗非鱼、对虾、贝类样品。将鱼虾肌肉、贝类软组织,用均质机破碎混匀,-20℃冷冻保存。取解冻试样1g(准确至0.001g)入10mL离心管底部,加入正己烷5mL,超声振荡15min,5000r·min⁻¹离心5min,照此法重复萃取一次;合并上层澄清萃取液入50mL鸡心瓶,于45℃水浴减压旋转蒸发至干;用约3mL正己烷分3次洗涤鸡心瓶内壁,洗涤液转移至另一10mL离心管,滴加大致相等体积的浓硫酸,用玻棒搅拌净化,5000r·min⁻¹离心至硫酸

层澄清,用玻璃吸管小心吸除下层硫酸,再次加浓硫酸净化,直到硫酸层基本无色。

将层析柱内正己烷液面调整到无水硫酸钠层上方3~5mm,少量多次吸取离心管上层正己烷相入层析柱,用50mL正己烷/二氯甲烷(V:V=1:1)混合液,以1~1.5mL·min⁻¹的滴速淋洗净化柱。收集洗脱液入100mL鸡心瓶,于45℃水浴减压旋转蒸发至干。迅速用3.00mL正己烷洗涤鸡心瓶内壁,将部分洗涤液转入气相色谱进样瓶,密封,2~8℃冷藏,待GC分析。

在同等试验条件下,与试样测定的同批进行空白试验。

1.4 测定和计算

用不分流方式自动注射试样溶液或标准溶液1 μL ,进样口温度210℃,检测器温度250℃,载气和尾吹气均为纯度 $\geq 99.999\%$ 的高纯氮气,其流速分别为1.5、60mL·min⁻¹;柱箱升温程序:170℃保持1min,以20℃·min⁻¹速度升至210℃保持1min,再以10℃·min⁻¹速度升至240℃保持5min。

$$\text{含量计算公式: } M = \frac{A_{\text{样}} \times C_{\text{标}} \times V}{A_{\text{标}} \times W} \quad (1)$$

式中: $A_{\text{样}}$ 为试样溶液峰面积,赫兹秒Hz·s; $A_{\text{标}}$ 表示标准溶液峰面积,赫兹秒Hz·s; $C_{\text{标}}$ 表示标准液浓度, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,应在线性范围内; W 表示试样用量,g; V 表示最后洗涤鸡心瓶的正己烷体积,mL。测定结果应扣除空白试验测定值。

2 结果和讨论

2.1 萃取溶剂的选择

DCF能溶于大多数脂肪族和芳香族有机溶剂,本方法对正己烷、正己烷/二氯甲烷(V:V=1:1)混合液进行了比较。用已加入DCF 0.04 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的试样,分别用正己烷、混合液超声萃取5min,各平行测定4份。结果表明,平均提取率正己烷为93.8%,混合液为93.5%,无明显的统计学差异($P>0.10$)。因二氯甲烷比正己烷对人体的毒性更大,故采用正己烷作萃取溶剂。

2.2 浓硫酸净化程度

实验发现,正己烷萃取液中加入浓硫酸后,如搅拌时间过久,则乳化比较严重,基线明显抬高,杂峰较多,加标回收率大多低于70%,即使加入2%硫酸钠水溶液破乳,回收率和色谱峰仍无明显改善。经过反复多次实验,发现加入浓硫酸后上下搅拌50~60次即可,净化效果很好。至于浓硫酸净化次数,因样品量和其中动物脂肪多少而异。本方法只需1g试样,贝类

和对虾净化 1 次即可,罗非鱼需 2 次,鳊鲢则需 3 次。

在样品处理和测定过程中必须注意,DCF 在酸性条件下较稳定,在碱性条件下较易发生水解。

2.3 混合淋洗液比例

往层析柱内加入 DCF 标准液,进行了混合淋洗液的对比实验。结果表明,当混合液中正己烷/二氯甲烷为 4:1(V:V),色谱基线有所抬高,且 DCF 峰前有大峰干扰,干扰峰尾与 DCF 峰部分重叠(图 1);如用 1:1(V:V)混合液淋洗,则没有这样的情况出现,基线明显降低(见图 2 中 DCF 部分),故采用 1:1 的正己烷/二氯甲烷混合液作淋洗液。

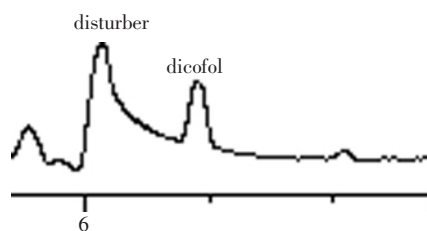


图 1 三氯杀螨醇及其干扰物

Figure 1 Dicofol and its disturber(left)

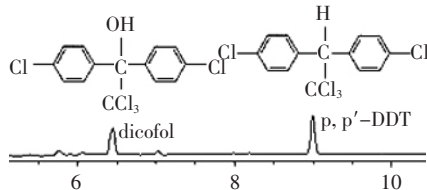


图 2 三氯杀螨醇(左)和 p,p'-DDT(右)化学结构及色谱图

Figure 2 Chemical structure and chart of dicofol(left) and p,p'-DDT(right)

2.4 气相色谱条件

DCF 是用 DDT 原药生产的,其工业产品程度不同地含有 DDT 杂质。从化学结构上看,DCF 是 p,p'-DDT 中心碳原子上的一个氢原子被羟基取代后所得到的醇。DCF 虽然与 p,p'-DDT 的化学结构、分子量相近,但比 DDT 的蒸气压略高、熔点更低^[14]。在上述气相色谱条件下,DCF 的出峰时间在 4 种六六六异构体之后,在 DDT 及其同系物 DDD 和 DDE 之前,它们均不干扰 DCF 的测定(图 2)。图 2 中 DCF 之前有 α -BHC、 γ -BHC、 β -BHC 和 δ -BHC, p,p'-DDT 之后有 op-DDE、op-DDT、op-DDD 和 pp'-DDD。

动物组织中基质较复杂,前面的净化很难彻底消除,为了进一步减轻残余基质干扰气相色谱测定,需使用如前所述的升温程序。图 3 中上部、下部分别为鳊鲢加标试样、鳊鲢试样提取液的气相色谱图。从该图可见,DCF 出峰时基线飘移幅度小,峰形尖锐,并能与干扰峰完全分离。

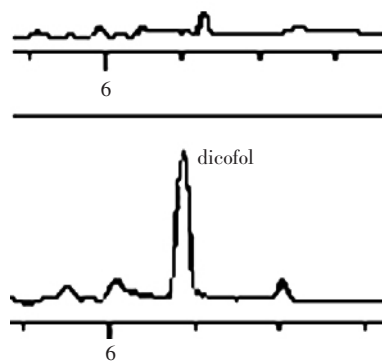


图 3 鳊鲢(上)及其加标试样(下)

Figure 3 Sample of eel(upper)and eel dicofol added

2.5 线性范围和检测限

以正己烷为溶剂,配制 DCF 标准系列,浓度分别为 0、0.002 5、0.010、0.020、0.040、0.080、0.20、0.40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,各进样 1 μL 。测定结果显示,气相色谱峰面积 A 与 DCF 浓度 C 呈线性正相关($P < 0.001$),其校准曲线方程为 $A = 15\,106 \times C + 27.1$,相关系数为 0.999 8。

在上述色谱条件下,当溶液中 DCF 浓度低至 0.001 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,峰高信噪比>3,因此 DCF 浓度检测下限为 0.001 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;根据前述含量计算公式(1),如果试样量为 1 g,最后定容体积为 3 mL,那么本方法的含量检测下限可低至 0.003 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表 1 试验结果显示,当鱼、虾、贝试样中 DCF 添加量为 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,加标回收率为 73%~94%,变异系数为 5.9%~7.7%,峰高信噪比>10,因此本方法的定量检测下限为 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。我国规定茶叶、棉籽油、部分水果中 DCF 的残留限量为 0.1~5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[10],欧盟、日本、加拿大、国际食品法典委员会规定畜禽肉类食品中 DCF 残留限量为 0.02~5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[15]。虽然目前尚未见水产品中 DCF 残留限量标准,但根据国际上类肉食品中 DCF 残留限量要求推测,本方法的含量检测下限应能满足要求。如果把最后洗涤鸡心瓶的 3 mL 正己烷转入离心管,用氮吹仪在微氮气流下吹干,再用更小体积(比如 0.50 mL)的正己烷洗涤离心管内壁,那么本方法的可检测下限仍有进一步降低的空间。

2.6 回收率和精密度

为了考察方法的准确性和再现性,分别以不含有 DCF 的鳊鲢、罗非鱼、南美白对虾、玻纹巴菲蛤为测试对象,在试样中分别添加 10、100 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 DCF,每个加标量平行测定 6 次,计算加标回收率和批内变异系数。对同一加标量 4 个不同批次的加标回收率进行统计分析,计算平均回收率和批间变异系数(详见表 1)。

表 1 三氯杀螨醇测定方法的回收率和精密度

Table 1 Recovery and precision of dicofol determination

加标量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	试样	测定值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}(n=6)$	平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	批内回收率/%	批内变异系数/%	批间变异系数/%	平均回收率/%
10	鳊	7.95/7.11/8.36/7.68/9.05/7.56	7.95	79.5	8.5	5.7	84.0
	鱼	8.78/7.31/8.35/8.61/7.47/7.93	8.08	80.8	7.5		
	虾	8.05/8.66/8.70/9.26/9.05/8.00	8.62	86.2	5.9		
	贝	9.15/9.11/8.61/7.53/9.00/9.42	8.80	88.0	7.7		
100	鳊	83.2/89.1/77.5/86.7/78.8/93.4	84.8	84.8	7.2	7.1	94.0
	鱼	88.0/101.90.3/98.5/97.6/92.1	94.6	94.6	7.3		
	虾	98.0/103/91.3/92.4/89.7/101	95.9	95.9	6.1		
	贝	102/111/99.0/94.3/100/97.4	100.6	100.6	6.2		
500	鳊	408/501/426/455/418/475	443.5	88.7	5.9	2.5	91.7
	鱼	447/468/440/495/468/434	458.7	91.7	3.2		
	虾	495/456/478/432/483/483	471.2	94.2	4.9		
	贝	432/464/480/491/471/420	459.7	91.9	6.1		

表 1 结果显示,鳊、罗非鱼、对虾、贝类试样中 DCF 添加量为 $0.010 \sim 0.500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 加标回收率为 $71\% \sim 111\%$, 重复 6 次测定的批内变异系数为 $3.2\% \sim 8.5\%$, 4 个不同批次的平均回收率为 $84\% \sim 94\%$, 批间变异系数为 $2.5\% \sim 7.1\%$ 。这表明,本方法的准确性、再现性可以满足痕量 DCF 检测的要求。

2.7 应用情况

应用本方法对 2007 年我国广东省部分地区的 31 份鳊、罗非鱼、南美白对虾、玻纹巴菲蛤样品进行测定,结果表明,本方法简便、快捷、试样用量少、易于操作,样品中 DCF 的残留量大多为未检出,最高为 $0.017 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 平均为 $0.012 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] Domagalski J. Occurrence of dicofol in the San Joaquin River, California[J]. *Bullet Environ Contam Toxicol*, 1996, 57: 84-291.
- [2] Hoekstra P F, Burnison B K, Garrison A W, et al. Estrogenic activity of dicofol with the human estrogen receptor: Isomer- and enantiomer-specific implications[J]. *Chemosphere*, 2006, 64: 174-177.
- [3] Lerche D, Plassche E, Schwegler A, et al. Selecting chemical substances for the UN-ECE POP protocol[J]. *Chemosphere*, 2002, 47: 617-630.
- [4] Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, et al. Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2004, 46: 445-453.
- [5] Qiu X H, Zhu T, Yao B, et al. Contribution of dicofol to the current DDT pollution in China[J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 4385-4390.
- [6] Safe S. Clinical correlated of environmental endocrine disruptors[J]. *Trends Endocrinol Metabol*, 2005, 16: 139-144.
- [7] Wiemeyer S N, Clark J R, Donald R, et al. Dicofol residues in eggs and carcasses of captive American kestrel[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(12): 2848-2851.
- [8] Yang X L, Wang S S, Bian Y R, et al. Dicofol application resulted in high DDTs residue in cotton fields from northern Jiangsu Province, China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 150: 92-98.
- [9] 梁 刚, 唐超智. 三氯杀螨醇的雌激素效应及其机制的研究进展[J]. 四川环境, 2004, 23(5): 54-56, 71.
LIANG Gang, TANG Chao-zhi. Estrogenic effects and acting mechanisms of dicofol[J]. *Sichuan Environment*, 2004, 23(5): 54-56, 71.
- [10] GB/T5009. 176—2003, 茶叶、水果、食用植物油中三氯杀螨醇残留量的测定[S].
GB/T5009. 176—2003, Determination of dicofol residues in tea, fruits, edible vegetable oils[S].
- [11] 陈 明, 耿志明, 王 冉. 蜂蜜中三氯杀螨醇残留量的检验方法[J]. 中国养蜂, 2005, 56(3): 7-8.
CHEN Ming, GENG Zhi-ming, WANG Ran. Testing method of dicofol residues in honey[J]. *Bee culture of China*, 2005, 56(3): 7-8.
- [12] 肖义夫, 甘 源, 赵 舰. 气相色谱法同时测定食品中六六六、滴滴涕和三氯杀螨醇残留量[J]. 现代预防医学, 2006, 33(9): 1630-1632.
XIAO Yi-fu, GAN Yuan, ZHAO Jian. Determination of 666, DDT and dicofol residue in food by gas chromatography at the same time[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2006, 33(9): 1630-1632.
- [13] 王长芳, 胡进锋, 王 俊, 等. 柑桔园中胜红蓟对三氯杀螨醇的富集[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(6): 2334-2337.
WANG Chang-fang, HU Jin-feng, WANG Jun, et al. Accumulation of dicofol in ageratum conyzoides in citrus orchards[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(6): 2334-2337.
- [14] 金如琛, 余沐雨. 农药质量快速鉴别手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 77-79, 147.
JIN Ru-chen, YU Mu-yu. Handbook on rapid identification of the quality of agricultural chemicals [M]. Beijing: Company of China Agriculture Press, 2000: 77-79, 147.
- [15] 中国食品安全资源数据库/农药药/限量信息 [EB/OL] http://www.fsr.org.cn/search/view_residua_detail.asp?subtract=yes&Common_RecordID=268791&Medication_Class=Pesticide, quote time: 2008-6-25-19:29.