

液液萃取-固相萃取气相色谱法测定火腿中有机磷农药残留量

蒋露¹, 梅文泉², 绍金良², 贺玲¹

(1. 昆明市农产品质量安全中心, 云南昆明 650118; 2. 云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 云南昆明 650223)

摘要 [目的]建立火腿中多种有机磷农药残留量同时测定的方法。[方法]火腿中有机磷农药经乙腈提取后,用乙腈-正己烷液液萃取除去脂类和色素,再经石墨碳黑固相萃取小柱净化,气相色谱-火焰光度检测器(GC-FPD)测定。[结果]16种有机磷农药在DB-17、DB-1色谱柱上均获得良好分离,在0.05~1.00 μg/mL范围内,农药残留量色谱分析的线性关系良好,满足定量分析要求,加标水平为0.08和0.20 mg/kg时,农药的平均回收率在71.96%~117.21%,变异系数为1.73%~12.84%。方法的检出限为0.0053~0.0118 mg/kg。[结论]该方法具有前处理简单、净化效果好、方法准确、灵敏度高、杂质干扰少的特点,适合火腿中有机磷农药残留量的分析。

关键词 火腿;液液萃取;固相萃取;气相色谱;有机磷农药

中图分类号 TS207.5⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)13-0092-04

Determination of Organophosphate Pesticide Residues in Ham Using Liquid-liquid Extraction / Solid-Phase Extraction with Gas Chromatography

JIANG Lu¹, MEI Wen-quan², SHAO Jin-liang² et al (1. The Agricultural-food Quality and Safety Center of Kunming, Kunming, Yunnan 650118; 2. Quality Standardizing and Testing Technology Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650223)

Abstract [Objective] A novel method for the determination of organophosphate pesticide residues in ham at the same time was established. [Method] Organophosphate pesticide residues in ham were extracted by acetonitrile, the liquid-liquid extraction using acetonitrile and n-hexane as the extraction solvent was used to remove the grease and pigment and then, the solution was purified by carbon solid phase extraction column, detected by the flame photometry detector of gas chromatograph. [Result] Experimental results showed that 16 species of organophosphate pesticides were well separated in DB-17 and DB-1. Within the scope of 0.05 to 1.00 μg/mL, pesticide residues chromatography analysis of the linear relationship was good to meet quantitative analysis requirements. The average recoveries of organic phosphorus pesticides were 71.96% - 117.21%, spiked at 0.08 and 0.20 mg/kg level. The relative standard deviations for all the compounds were 1.73% - 12.84%. The detection limit of the method varied between 0.0053 - 0.0118 mg/kg. [Conclusion] The method is simple, precise, sensitive, and has a good separation effect, it can be applied to the routine analysis for organophosphate pesticide residues in ham.

Key words Ham; Liquid-liquid extraction; Solid-phase extraction; Gas chromatography; Organophosphate pesticide

火腿即腌制或熏制的猪肉,味美且营养丰富,历来被看作是席上佳肴、馈赠珍品,深受国人喜爱,每年消费数万吨。然而,一些不法厂商为了避免蚊虫叮咬和生蛆等问题,在制作过程中添加了剧毒农药,给火腿质量安全带来了极大隐患,严重威胁着消费者的身体健康。因此,建立一种快速、准确地测量火腿中农药残留量的分析方法对有效解决其质量安全问题具有重要意义。目前,检测有机磷农药的方法主要有分光光度法^[1]、传感器法^[2]、流动注射法^[3]、气相色谱法^[4-5]、液相色谱法^[6]、气质联用法^[7]、液质联用法^[8]等,但对于火腿中有机磷农药残留量的报道还较少。其中部分方法^[9]需要用到气质联用仪、凝胶渗透色谱等大型、高精密度仪器,成本较昂贵;一些方法又只能测试较少种类的农药或者操作方法较为繁琐^[10-12]。笔者基于火腿基质复杂、农药残留萃取困难的特点,采用乙腈-正己烷液液萃取联合石墨碳黑固相萃取小柱净化,除去样品中油脂等杂质,利用气相色谱-火焰光度检测(GC-FPD)较准确地分析了敌敌畏等16种有机磷农药残留量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及主要试剂。火腿样品购于云南昆明市某超市。敌敌畏、甲胺磷、乙酰甲胺磷、甲拌磷、氧化乐果、二嗪

农、甲基异柳磷、乐果、甲基对硫磷、毒死蜱、对硫磷、丙溴磷、水胺硫磷、三唑磷、伏杀硫磷和亚胺硫磷16种标准溶液购于天津环境监测中心,浓度均为1 000 μg/mL。乙腈、正己烷、丙酮(重蒸)、氯化钠,均为分析纯。

1.1.2 主要仪器。Agilent 6890N气相色谱仪,带有双火焰光度检测器(FPD)、双塔自动进样器、双毛细管进样口;固相萃取柱,艾杰尔石墨碳黑柱,容积6 mL,填充物500 mg;瑞士Kinematica PT 1600E高速匀浆机;RE-52AA真空旋转蒸发仪;Ae 100电子天平,精确至0.000 1 g;DHG-9203A电热鼓风干燥箱;PHLIP HR2838搅拌机;分液漏斗、三角瓶、圆底烧瓶、移液管等玻璃仪器。

1.2 样品前处理

1.2.1 提取。称取捣碎均匀试样5.00 g于100 mL具塞锥形瓶中,加入10 mL蒸馏水浸泡10 min,再加入50 mL乙腈,以2 500 r/min的速度匀浆提取1 min,过滤,滤液收集至装有3~4 g氯化钠的100 mL具塞量筒里,剧烈振摇1 min,静置,待乙腈和水分层后,取上层乙腈溶液25 mL至125 mL分液漏斗中。

1.2.2 液液萃取。在分液漏斗中加入25 mL正己烷,振摇、静置30 min后,收集下层乙腈提取液,然后再加入15 mL乙腈至分液漏斗中同样萃取,合并2次提取液,置40℃水浴上真空浓缩至3 mL左右,待进一步净化。

1.2.3 固相萃取柱净化。用10 mL乙腈活化石墨碳黑固相萃取小柱,加入样液,用10 mL玻璃离心管承接样液,用7 mL

作者简介 蒋露(1984—),女,云南大理人,农艺师,硕士,从事农产品检测及监管工作。

收稿日期 2017-04-19

乙腈溶液洗脱,收集滤液,置 40 °C 水浴上真空浓缩至近干,再置平缓氮气流下吹干,用移液管准确加入 2.5 mL 丙酮,混匀后倒入 2 mL 自动进样器样品瓶中,供气相色谱测定。

1.3 色谱条件 色谱柱:DB-1 石英毛细管柱(30 m × 0.15 mm × 1 μm),DB-17 石英毛细管柱(30 m × 0.15 mm × 1 μm);载气:氮气(纯度 99.99%),流量为 10 mL/min,空气流量 100 mL/min,氢气流量 75 mL/min。柱温:150 °C(保持 2 min) $\xrightarrow{8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 250 °C(保持 8 min);进样口温度 220 °C;检测器温度 250 °C;进样方式为不分流进样;进样量为 1 μL;DB-1、DB-17 双柱定性,外标法定量。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选取 提取是农药残留分析步骤中很关键的一步,其效果直接影响着分析结果的准确性,而决定其效果的关键是提取溶剂的选择。该研究中,由于火腿中油脂含量较高,因此应选择一种对有机磷农药溶解度大,且脂溶性较差的溶剂为提取剂^[13]。该试验选用乙腈作为提取剂,萃取出的杂质少,便于净化处理。另因火腿含水量很低,若直接在样品中加乙腈提取,匀浆过程中肉组织大部分未被破碎,农药提取效果不理想。因此,该试验采用先在样品中加入 10 mL 蒸馏水浸泡 10 min,然后再加入乙腈,经高速匀浆提取样品中残留的农药。

2.2 净化条件的选择

2.2.1 液液萃取。该试验研究了动物油脂和 16 种有机磷农药在乙腈和正己烷中的分布。结果表明(表 1),95.3% 的油脂溶解于正己烷中,4.7% 溶解在乙腈相里;16 种有机磷农药在两相中呈一定比例分配。由此可以得出:在乙腈-正己烷中,极性较强的有机磷农药大部分溶解于乙腈相,脂肪和其他极性较弱的杂质大部分溶解于正己烷相,基本能达到目

标检测物与杂质分离的目的,可作为净化火腿的萃取方式之一。少量残留在正己烷相中的二嗪农、毒死蜱、甲基异柳磷、丙溴磷也可通过二次提取增加其回收率,确保方法的准确度。但经样品检验,少量残留在乙腈相里的油脂使色谱图基线不平稳(图 1a),仍需进一步净化。

表 1 16 种有机磷农药在正己烷-乙腈相中的 p 值测定结果

Table 1 The p values of 16 organophosphorus pesticides in two phase of acetonitrile and n-Hexane

序号 Serial No.	农药 Pesticides	正己烷-乙腈相 p 值 p values in acetonitrile and n-Hexane
1	敌敌畏	0
2	甲胺磷	0
3	乙酰甲胺磷	0
4	甲拌磷	0
5	氧化乐果	0
6	二嗪农	0.196 2
7	乐果	0
8	甲基对硫磷	0
9	毒死蜱	0.204 0
10	对硫磷	0
11	甲基异柳磷	0.076 2
12	水胺硫磷	0
13	丙溴磷	0.196 0
14	三唑磷	0
15	伏杀硫磷	0
16	亚胺硫磷	0

注:p 值为溶质存在于非极性相中的份数
Note:p value is the number of solute in the nonpolar phase

2.2.2 液液萃取联合固相萃取小柱净化。采用乙腈-正己烷液液萃取除去火腿中大部分油脂等杂质,联合石墨化碳黑小柱除去残留的油脂,得到较干净的样品,减少了基质对色谱柱的损伤,样品色谱图基线平缓(图 1b)。

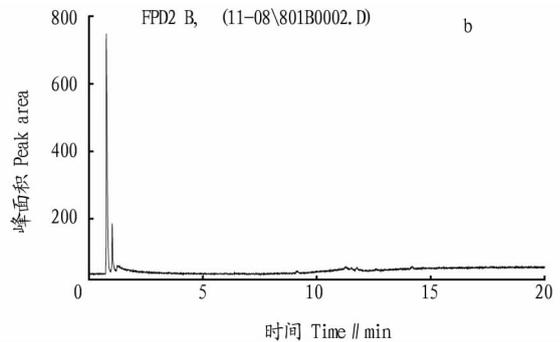
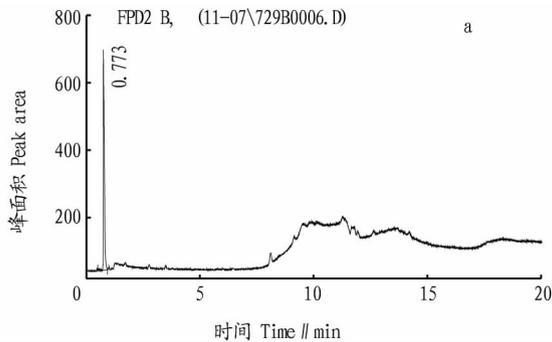


图 1 液液萃取(a)、液液萃取联合固相萃取柱净化(b)火腿样品的气相色谱

Fig. 1 The chromatograms of liquid-liquid extraction (a) and liquid-liquid extraction combined SPE purification (b)

2.2.3 固相萃取小柱净化洗脱体积的选择。该试验选择了用 5、7、9、13 mL 乙腈洗脱过柱,然后测定不同洗脱体积的回收率,结果见表 2。

由表 2 可知,5 mL 乙腈对甲拌磷和毒死蜱洗脱效果不理想,其回收率低于 70%,而经 13 mL 乙腈洗脱后,16 种农药的回收率均较低,这可能说明其洗脱体积过大,部分杂质也同时被洗出,影响了分析的准确度;7 mL 和 9 mL 洗脱效果相

当,16 种农药回收率均在 70% ~ 120%。结合试剂成本,选择 7 mL 乙腈作为固相萃取最佳洗脱条件。

2.3 线性范围及检出限^[14] 用火腿基质配制标准溶液,按“1.3”色谱条件进样测试。结果表明,在 0.05 ~ 1.0 μg/mL 范围内,峰面积值与有机磷农药浓度呈良好的线性关系。按 3 倍信噪比测得检出限,结果见表 3。

表2 不同 SPE 净化洗脱体积的加标回收率

Table 2 Selection of elution volume of SPE purification

%

农药 Pesticides	洗脱体积 Elution volume and recovery rate (n=3)			
	5 mL	7 mL	9 mL	13 mL
敌敌畏 Dichlorvos	90.10	86.55	92.55	60.00
甲胺磷 Methamidophos	87.80	93.60	94.45	59.10
乙酰甲胺磷 Acephate	88.65	93.50	94.45	58.50
甲拌磷 Phorate	64.15	78.50	78.85	54.00
氧化乐果 Omethoate	88.75	96.95	97.58	57.80
二嗪磷 Diazinon	89.65	94.05	94.60	56.40
乐果 Dimethoate	99.40	106.55	112.20	66.35
甲基对硫磷 Parathion-methyl	79.30	94.15	86.45	52.80
毒死蜱 Chlorpyrifos	51.50	77.05	77.45	55.30
对硫磷 Parathion-ethyl	77.30	83.65	78.35	50.45
甲基异柳磷 Isufenphos-methyl	99.60	106.40	101.70	61.90
水胺硫磷 Isocarbofos	99.85	107.45	102.30	64.20
丙溴磷 Profenofos	89.95	100.00	95.00	57.00
三唑磷 Triazophos	101.90	108.40	106.50	70.45
伏杀硫磷 Phosalone	94.72	106.18	102.30	60.22
亚胺硫磷 Phosmet	101.70	115.35	113.10	61.52

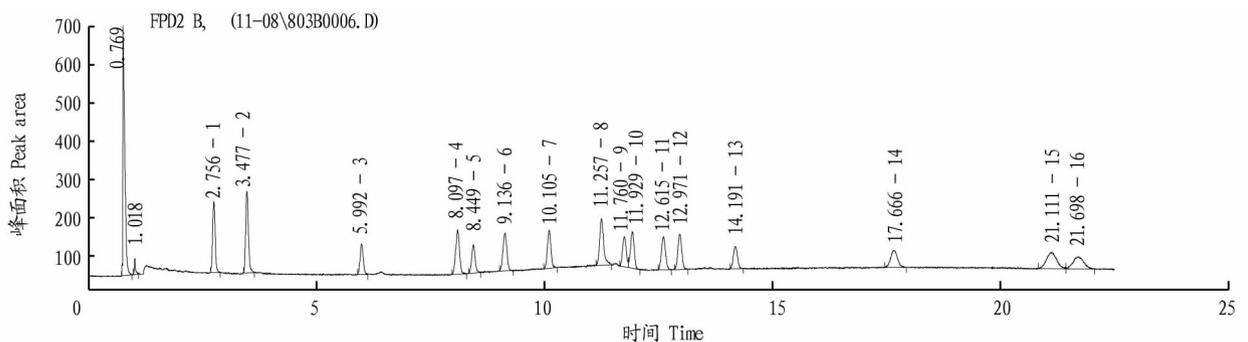
表3 标准曲线和检出限

Table 3 Standard curve and detection limit

农药 Pesticides	保留时间 Retention time //min	检出限 Detection limit //mg/kg	线性回归方程 Equation of linear regression	相关系数 Correlation coefficient
敌敌畏 Dichlorvos	2.756	0.006 5	$Y = 3\ 898.3X - 3.95$	0.999 08
甲胺磷 Methamidophos	3.477	0.005 3	$Y = 4\ 657X - 96.22$	0.999 75
乙酰甲胺磷 Acephate	5.992	0.010 6	$Y = 3\ 100.3X - 47.13$	0.999 48
甲拌磷 Phorate	8.097	0.009 8	$Y = 3\ 148.3X - 8.06$	0.999 67
氧化乐果 Omethoate	8.449	0.011 8	$Y = 1\ 893.3X - 131.98$	0.999 26
二嗪磷 Diazinon	9.136	0.009 7	$Y = 2\ 845.37X - 4.89$	0.999 16
乐果 Dimethoate	10.105	0.008 5	$Y = 3\ 113.4X - 38.76$	0.999 71
甲基对硫磷 Parathion-methyl	11.257	0.009 4	$Y = 3\ 631.5X - 15.84$	0.998 93
毒死蜱 Chlorpyrifos	11.760	0.010 2	$Y = 2\ 437.8X - 13.65$	0.998 93
对硫磷 Parathion-ethyl	11.929	0.011 6	$Y = 2\ 930.7X - 24.7$	0.999 09
甲基异柳磷 Isufenphos-methyl	12.615	0.093 1	$Y = 2\ 483.7X + 4.96$	0.999 14
水胺硫磷 Isocarbofos	12.971	0.011 0	$Y = 2\ 599.7X - 11.81$	0.999 43
丙溴磷 Profenofos	14.191	0.010 9	$Y = 1\ 991.96X - 4.56$	0.999 16
三唑磷 Triazophos	17.666	0.010 8	$Y = 2\ 164.2X + 4.81$	0.999 08
伏杀硫磷 Phosalone	21.111	0.098 9	$Y = 1\ 935.3X - 27.15$	0.999 15
亚胺硫磷 Phosmet	21.698	0.068 6	$Y = 2\ 035.9X - 61.08$	0.999 47

2.4 方法的回收率和精密度^[15-16] 将未检出有机磷农药的火腿样品切碎混匀,称样后,向其中准确加入水平为0.08、0.20 mg/kg 的16种有机磷混标溶液,按“1.2”“1.3”节所述

的提取、净化和检测条件进行加标回收试验。结果表明:有机磷混标在 GC- FPD 图谱上可完全分开(图2)。结合 DB-1、DB-17 双柱定性,基质标准溶液消除基质效应,可准



注:1. 敌敌畏;2. 甲胺磷;3. 乙酰甲胺磷;4. 甲拌磷;5. 氧化乐果;6. 二嗪农;7. 乐果;8. 甲基对硫磷;9. 毒死蜱;10. 对硫磷;11. 甲基异柳磷;12. 水胺硫磷;13. 丙溴磷;14. 三唑磷;15. 伏杀硫磷;16. 亚胺硫磷

Note:1. Dichlorvos;2. Methamidophos;3. Acephate;4. Phorate;5. Omethoate;6. Diazinon;7. Dimethoate;8. Parathion-methyl;9. Chlorpyrifos;10. Parathion-ethyl;11. Isufenphos-methyl;12. Isocarbofos;13. Profenofos;14. Triazophos;15. Phosalone;16. Phosmet

图2 加标0.20 mg/kg 的火腿样品色谱

Fig.2 The chromatogram of ham at spiked level of 0.20 mg/kg

确分析此 16 种有机磷农药。

每组加标水平同做 3 个平行,计算加标回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表 4。由表 4 可知,16 种有机磷 2 个添加水平的回收率在 71.96% ~ 117.21%,RSD 在 1.73% ~ 12.84%,均能满足日常检测需求。

表 4 方法加标回收率及精密度

Fig. 4 The recovery and precision of this method

农药 Pesticides	添加水平 Adding level mg/kg	回收率 Recovery %	RSD ($n=3$) %
敌敌畏 Dichlorvos	0.08	90.42	6.56
	0.20	90.50	5.77
甲胺磷 Methamidophos	0.08	86.67	5.98
	0.20	80.33	6.36
乙酰甲胺磷 Acephate	0.08	82.75	6.80
	0.20	81.50	3.42
甲拌磷 Phorate	0.08	92.29	5.03
	0.20	85.67	4.72
氧化乐果 Omethoate	0.08	99.17	11.21
	0.20	87.33	1.73
二嗪磷 Diazinon	0.08	96.79	2.99
	0.20	91.50	5.21
乐果 Dimethoate	0.08	93.50	10.90
	0.20	92.17	5.35
甲基对硫磷 Parathion-methyl	0.08	115.42	3.80
	0.20	108.33	5.25
毒死蜱 Chlorpyrifos	0.08	71.96	6.80
	0.20	73.17	10.90
对硫磷 Parathion-ethyl	0.08	102.63	5.09
	0.20	98.33	3.46
甲基异柳磷 Isufenphos-methyl	0.08	117.21	10.18
	0.20	101.33	9.67
水胺硫磷 Isocarbophos	0.08	110.38	6.25
	0.20	100.83	7.09
丙溴磷 Profenofos	0.08	101.92	11.69
	0.20	86.67	6.43
三唑磷 Triazophos	0.08	115.42	12.84
	0.20	104.17	5.96
伏杀硫磷 Phosalone	0.08	92.29	8.73
	0.20	86.00	8.58
亚胺硫磷 Phosmet	0.08	86.46	9.21
	0.20	72.58	5.11

3 讨论

在样品净化处理过程中,使极性较强的农药分配于乙腈

相,脂肪和其他极性较弱的杂质分配于正己烷相,从而达到目标检测物与杂质的基本分离,联合石墨化碳黑小柱萃取,进一步去除了残留在乙腈相中的少量油脂,取得了良好的净化效果。火腿基质配制标准溶液消除基质效应,液液二次萃取可提高部分分配至正己烷相中的二嗪农、毒死蜱、甲基异柳磷、丙溴磷等农药的回收率,低温真空浓缩可减少甲拌磷等易挥发农药的损失,16 种农药的加标回收率均能达到国标方法的要求。

综上所述,该方法具有操作简便、成本低廉、测定结果准确可靠、灵敏度高等特点,适用于火腿中有机磷农药残留检测实际工作的需要。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量的快速检测:GB/T5009.199—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [2] 黄行九,王连超,孙宇峰,等. 固相微萃取/二氧化锡气体传感器联用技术对果蔬中有机磷农药残留的快速检测[J]. 分析化学,2005,23(3):363-365.
- [3] 饶志明,王建宁,李隆弟,等. 流动注射化学发光测定甲基对硫磷[J]. 分析化学,2001,29(4):373-377.
- [4] 万益群,谢明勇. 毛细管气相色谱法测定中药中有机磷农药残留量[J]. 分析科学学报,2005,21(3):286-288.
- [5] 顾明松,罗毅. 毛细管气相色谱法测定七种热不稳定有机磷农药[J]. 环境化学,1995,14(3):226-229.
- [6] 李永新,孙成均,赵剑虹,等. 高效液相色谱法同时测定蔬菜水果中的 12 种农药残留[J]. 色谱,2006,24(3):251-255.
- [7] 万益群,李艳霞. 气相色谱-质谱法同时测定中药中有机磷和有机氮农药残留量[J]. 分析测试学报,2005,24(3):90-94.
- [8] 刘庆斌,张睿,王海涛,等. 高效液相色谱串联质谱法对茄子中 11 种有机磷农药残留的检测[J]. 分析测试学报,2010,29(1):73-76.
- [9] 盛华栋,廖上富,鲁燕骅. 凝胶渗透色谱技术(GPC)分离检测火腿肉中敌敌畏的残留方法研究[J]. 浙江农业科学,2008,1(3):374-376.
- [10] 张从兰,张泽英. 火腿中敌敌畏的气相色谱检测[J]. 现代农业科学,2009,16(10):10-12.
- [11] 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(6):1015
- [12] 中华人民共和国卫生部. 食品中有机磷农药残留量的测定:GB/T 5009.20—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [13] 张艳. 农药残留分析中不同提取溶剂的评价[J]. 甘肃农业科技,2006(9):28-29.
- [14] 滕小沛,吴巧珍,沈小婉. 气相色谱法同时测定肉、鱼类 4 种有机磷农药残留量[J]. 中国公共卫生,1993,9(3):116-117.
- [15] 张卫锋,洪振涛,李嘉静. 气相色谱法测定咸鱼中的敌百虫和敌敌畏[J]. 中国兽药杂志,2007,41(6):14-16.
- [16] 王耀,刘少彬,谢翠美,等. 加速溶剂萃取凝胶渗透色谱/固相萃取进样气相色谱质谱法测定咸鱼中有机磷农药残留[J]. 分析化学,2011,39(1):67-71.

(上接第 62 页)

- [8] 王淑军,刘佩楼,徐世鹏,等. 临沂市武河湿地的设计及其水质净化效果分析[J]. 中国给水排水,2011,27(22):61-64.
- [9] 徐中义,陈敬安,张阳,等. 阿哈水库沉积物重金属形态分布及生态风险评价[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2014,39(3):71-76.
- [10] 范拴喜,甘卓亭,李美娟,等. 土壤重金属污染评价方法进展[J]. 中国农学通报,2010,26(17):310-315.
- [11] 周志勇,邱继彩. 汴河沉积物重金属(Cu,Zn,Cd)的污染评价[J]. 环境保护科学,2013,39(3):95-98.
- [12] 徐勇,马绍赛,陈聚法,等. 大沽河湿地表层沉积物重金属分布特征及

污染评价[J]. 农业环境科学学报,2012,31(6):1209-1216.

- [13] HAKANSON L. An ecological risk index for aquatic pollution control: A sedimentological approach[J]. Water Res,1980,14(8):975-1001.
- [14] 孙敏华,姜翠玲,张鹏,等. 太湖流域梁塘河沉积物重金属生态风险评价[J]. 环境工程,2015,33(8):118-122.
- [15] 焦永杰,霍宁,董菁,等. 大沽排污河口地区沉积物中重金属污染及其潜在生物毒性风险评价[J]. 城市环境与城市生态,2014,27(3):39-42.
- [16] 王世和. 人工湿地污水处理理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2007:184.