

实验技术与方法

气相色谱-火焰光度检测器法检测果蔬样品中
3种二硫代氨基甲酸盐类农药残留

张晶,蔡增轩,张京顺,谭莹,倪竹南,徐美佳

(浙江省疾病预防控制中心,浙江 杭州 310051)

摘要:目的 建立检测福美铁、丙森锌、代森锰农药残留的气相色谱-火焰光度检测器(硫滤光片)[GC-FPD(S)]测定方法,提高该类农药的检测专一性。方法 用带有强螯合作用的碱性缓冲溶液将不溶于水的二硫代氨基甲酸重金属盐转化为可溶于水的钠盐,在离子对甲基化的作用下将二硫代氨基甲酸钠盐转化为可供GC-FPD(S)测定的含硫酯类物质,优化样品前处理技术和色谱检测条件,并进行方法学论证。结果 衍生后的二硫代氨基甲酸盐类农药在一定范围内,其浓度的平方与GC-FPD(S)的响应峰高呈良好的线性关系。福美铁、丙森锌、代森锰的最低检出浓度分别为0.1、0.5、0.5 mg/kg,平均回收率为75.3%~94.6%,相对标准偏差最大为14.1%。结论 该方法操作简便、定量准确可靠,各项指标均符合农药残留检测的要求。

关键词:二硫代氨基甲酸盐类;气相色谱-火焰光度检测器(硫滤光片);蔬菜;水果;农药残留;福美铁;丙森锌;代森锰;检测

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)02-0132-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.02.007

Determination of three dithiocarbamate pesticides residues in fruit and vegetable samples by gas chromatography-flame photometric detector

ZHANG Jing, CAI Zengxuan, ZHANG Jingshun, TAN Ying, NI Zhunan, XU Meijia

(Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310051, China)

Abstract: Objective A gas chromatography-flame photometric detector (sulfur filter) [GC-FPD (S)] method for the residues determination of ferbam, propineb and maneb in fruit and vegetable samples was established. The method could improve the specificities of detection for dithiocarbamates. **Methods** By alkaline buffer with strong chelating agents, insoluble heavy metal salts were converted into water-soluble sodium salts. With ion pair methylation, dithiocarbamates could be converted into esters which could be used for GC-FPD (S). Methodological verification was carried out based on optimized sample pretreatment and chromatographic conditions. **Results** The square of dithiocarbamates concentration exhibited a good linear relationship in certain range. The detection limits of fenbam, propineb and maneb were 0.1, 0.5, and 0.5 mg/kg respectively. Furthermore, the average recoveries were 75.3%-94.6%, and the maximum relative standard deviations was 14.1%. **Conclusion** This method was simple, accurate and reliable for residues determination of dithiocarbamates pesticides in fruit and vegetable samples. All indexes meet the requirements of pesticide residue detection.

Key words: Dithiocarbamates; gas chromatography-flame photometric detector(sulfur filter); vegetable; fruit; pesticide residues; ferbam; propineb; maneb; test

二硫代氨基甲酸盐类(dithiocarbamates, DTCs)杀菌剂在农业生产中的应用十分广泛。根据DTCs化学结构式的不同,可将其分为三类:二甲基二硫代氨基甲酸盐类(福美类, DMDs)、乙撑双二硫代氨基甲酸盐类(代森类, EBDs)和丙撑二硫代氨基甲酸盐类(丙森类, PBDs)。研究^[1-2]表明, DTCs杀菌剂

的代谢产物乙撑硫脲(ETU)和丙撑硫脲(PTU)具有致癌、诱导有机体突变和致畸的作用,因此应该对其残留量进行监测。

DTCs杀菌剂难溶于多数溶剂(福美类稍好),样品中的原体提取困难,增加了其残留检测的困难性。目前关于DTCs杀菌剂原体的残留分析方法不多,最常用的是顶空气相色谱测定酸性环境下DTCs释放的二硫化碳(CS₂)总量^[3]。常用的标准方法有SN 0139—92《出口粮谷中二硫代氨基甲酸酯残留量检验方法》^[4]、SN 0157—92《出口水果中二硫代氨

收稿日期:2018-12-05

基金项目:浙江省科技厅公益技术应用研究(2017C37045)

作者简介:张晶 女 副主任技师 研究方向为食品理化分析

E-mail: jzhang@cdc.zj.cn

基甲酸酯残留量检验方法》^[5]、SN/T 1541—2005《出口茶叶中二硫代氨基甲酸酯总残留量检验方法》^[6]等,这些方法灵敏度较高,但选择性差,且易出现假阳性。另外SN/T 0711—2011《出口茶叶中二硫代氨基甲酸酯(盐)类农药残留量的检测方法液相色谱-质谱/质谱法》^[7]标准方法采用衍生反应,利用液相色谱-质谱/质谱联用技术可以对该类化合物残留进行分类检测,但该方法实验室要求及运行成本较高。

本试验选取福美铁、丙森锌和代森锰作为三类化合物的代表,并建立了气相色谱检测三种农药残留的方法。在离子对存在的情况下,使DTCs金属螯合盐进行甲基化反应^[8-9],把DTCs转化为可供气相色谱检测的不同酯类化合物,利用其含硫的特点,用火焰光度检测器的硫滤光片对其进行分析,该方法可对DTCs的三类化合物分别进行残留测定,其最低检出浓度可以满足GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[10]要求,方法适用,实验室运行成本低,便于基层推广。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

气相色谱仪(Agilent 6890 N,带火焰光度检测器硫滤光片)、多功能涡旋振荡器、离心机、旋转蒸发仪(或氮吹仪)、Milli-Q超纯水制备系统。

福美铁(C13640000,纯度98%)、代森锰(14750000,纯度95%)、丙森锌(14371000,纯度65.3%)均购自德国Dr. Ehrenstorfer GMBH,各标准品配制时需进行纯度换算。*L*-半胱氨酸盐酸盐、乙二胺四乙酸二钠($\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$)、NaOH、四丁基硫酸氢铵、碘甲烷均为分析纯,三氯甲烷、正己烷、乙腈均为色谱纯,超纯水。缓冲溶液:称取2.5 g *L*-半胱氨酸盐酸盐、46.73 g $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ 、9.0 g NaOH溶解于500 ml超纯水中,溶液pH值为9.5~9.6(溶液I)。离子对溶液:称取13.9 g四丁基硫酸氢铵溶于100 ml超纯水中,溶液浓度0.41 mol/L。甲基化溶液:配制三氯甲烷、正己烷体积比为3:1的混合溶液300 ml,加入1 ml碘甲烷溶液(碘甲烷浓度0.05 mol/L),混匀后棕色瓶保存(溶液II)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

混合标准储备液:准确称取福美铁、代森锰和丙森锌标准品5.10、26.32、38.28 mg于50 ml容量瓶中,溶液I溶解并定容,准确量取三种单标溶液各10.0 ml,溶液I定容至50 ml容量瓶,制得浓度分别为20、100、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合标准储备液,4 $^{\circ}\text{C}$

冰箱保存。

标准工作溶液:分别准确量取混合标准储备液0.05、0.1、0.2、0.4、1.0 ml于50 ml离心管中,一次性加入25 ml溶液I,振荡提取后无需离心转移,2.0 ml乙腈定容,最终理论进样浓度福美铁分别为0.5、1.0、2.0、4.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$;丙森锌和代森锰分别为2.5、5.0、10.0、20.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.2.2 样品前处理

取一定量(1 kg左右)新鲜蔬菜或水果样品(本试验以草莓作为供试样品),初步切碎混匀(样品无需洗涤,不要切的太碎,以免果蔬组织液流失),粉碎机粉碎混匀。

1.2.3 提取及衍生

称取制备好的样品10.00 g于50 ml离心管中,加入15 ml溶液I,盖紧瓶盖,涡旋振荡提取15 min,10 000 r/min离心3 min(离心半径1.5 cm),上清液转移至另一50 ml离心管,在样品管中再加入10 ml溶液I,重复以上步骤进行二次提取,合并上清液,在上清液中加入5.0 ml四丁基硫酸氢铵溶液,再加入15 ml溶液II,涡旋振荡15 min,10 000 r/min离心2 min(离心半径1.5 cm),弃去上层液,下层溶液于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发(或氮吹)至溶液挥发近干,1.0 ml乙腈定容,15 000 r/min离心2 min(离心半径0.5 cm),上清液进气相色谱检验。

1.2.4 仪器条件

色谱柱:DB-1701(30 m \times 0.32 mm,0.25 μm);进样口温度250 $^{\circ}\text{C}$;柱温程序:起始温度100 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min,以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升至250 $^{\circ}\text{C}$,保持5 min;检测器:火焰光度检测器(硫滤光片);检测器温度250 $^{\circ}\text{C}$;载气流速2.0 ml/min;氢气流量50 ml/min;空气流量60 ml/min;尾吹30 ml/min。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

DTCs杀菌剂多为金属螯合盐,在大多数有机溶剂中的溶解性都不好,尤其是代森类和丙森类,样品中原体的提取非常困难,本方法采用有强螯合作用的 $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ 碱性缓冲液对样品进行提取,先将难溶的二硫代氨基甲酸酯重金属盐转化为可溶于水的钠盐,利用碘甲烷引入甲基,在离子对存在的情况下,目标物甲基化反应,转化成的含硫酯类物质可被有机溶剂进行有效提取,并为气相色谱-火焰光度检测器(硫滤光片)的检测提供了可能。

2.2 前处理技术的优化

高效液相色谱检测DTCs的分析方法中^[11-12],

样品衍生处理时需多次调整 pH 值,本方法经过多次试验证明:25 ml 的碱性缓冲提取溶液 I 在提取样品后,加入 5 ml 的酸性离子对溶液,可使目标物的离子化环境呈中性,能确保离子化反应的顺利进行,试验结果稳定可靠。有机溶剂提取衍生产物时,二氯甲烷易产生乳化现象,三氯甲烷比重大于二氯甲烷,更利于有机相和无机相的分层,可以有效避免乳化现象的产生;且三氯甲烷的水溶性小于二氯甲烷,在液液分配时,三氯甲烷的损失要远小

于二氯甲烷。取浓度分别为 20、100、100 $\mu\text{g/ml}$ 福美铁、代森锰、丙森锌混合标准溶液 1 ml,除不称取样品外,按照 1.2.3 处理,以 15 ml 溶液 II 第一次提取的峰面积作为 100% 提取率处理,其他提取溶剂以此为标准,比较不同溶剂对 DTCs 杀菌剂的提取效率,重复三次,取平均值,结果见表 1。本试验用三氯甲烷替代二氯甲烷,不但避免产生乳化现象,且只需一次提取,在保证提取效率的同时,节省了溶剂用量,且更加省时省力。

表 1 不同溶剂的提取效率比较 ($n=3$)

Table 1 Comparison of extraction efficiency of different solvents

提取溶剂	提取次数	溶剂用量/ml	收集有机相体积/ml	乳化现象	农药种类	提取效率/%
溶液 II	第一次	15	≥ 14.5	不易乳化	福美铁	100.0
					代森锰	100.0
					丙森锌	100.0
	第二次	10	≥ 9.5	不易乳化	福美铁	未检出
					代森锰	未检出
					丙森锌	未检出
二氯甲烷取代溶液 II 中的三氯甲烷	第一次	15	≤ 13.0	易乳化	福美铁	89.4
					代森锰	76.7
					丙森锌	71.9
	第二次	10	≤ 8.5	易乳化	福美铁	7.2
					代森锰	13.9
					丙森锌	19.3

2.3 分析条件的选择

目前,国内外有关 DTCs 杀菌剂的残留分析方法大多采用顶空-气相色谱法,即测定 DTCs 杀菌剂经过酸解后释放出来的 CS_2 的量。该方法灵敏度高,但选择性差,测定的是所有 DTCs 产生 CS_2 的总量,且含硫的食品样品易出现假阳性。本试验在 DTCs 杀菌剂的含量分析中,采用甲基化反应,DMDs、PBDs 和 EBDs 三类 DTCs 杀菌剂能够产生不同的含硫衍生物,从而能被气相色谱-火焰光度检测器进行分别检测,大大提高了色谱分析对该类农药的检测专一性。三种农药标准品的气相色谱见图 1。

2.4 线性关系及检出限

分别以福美铁、丙森锌和代森锰标准工作溶液最终理论进样浓度的平方为横坐标 (x),以各浓度相应的峰高为纵坐标 (y) 绘制标准曲线,线性回归方程及相关系数见表 2。结果表明:三种农药在一定的浓度范围内(福美铁:1~20 $\mu\text{g/ml}$;丙森锌、代森锰 5~100 $\mu\text{g/ml}$),其浓度的平方与响应峰高具有较好的线性关系。因火焰光度检测器硫滤光片的响应值与目标物浓度不呈简单的线性关系,不宜采用信噪比计算检出限,该试验以最低添加浓度作为目标物的检出限,即福美铁、丙森锌、代森锰的最低检出浓度分别 0.1、0.5、0.5 mg/kg 。

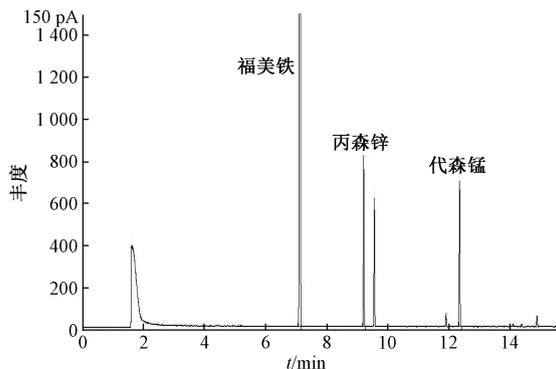


图 1 三种农药标准品的气相色谱图

Figure 1 Standard chromatogram of DTCs

表 2 农药的线性回归方程及线性相关系数

Table 2 Linear regression equation and correlation coefficient

农药名称	出峰时间 /min	线性回归方程	相关系数 r^2
福美铁	7.100	$y = 8.2277x - 5.1472$	0.999 6
丙森锌	9.200	$y = 0.6805x - 56.365$	0.998 1
代森锰	12.362	$y = 1.4928x - 79.821$	0.998 3

2.5 准确度和精密度

根据建立的方法,称取草莓和香菜阴性样品各 10.00 g,分别加入混合标准储备液 0.05、0.25、0.50 ml 进行三个水平的加标回收试验,每个添加水平三个平行样品,结果见表 3。由此可知,福美铁添加水平为 0.1、0.5、1.0 mg/kg 时,平均回收率为

表3 草莓和香菜样品的方法回收率($n=3$)
Table 3 Recoveries of DTCs pesticides in strawberry and coriander

农药名称	加标量/(mg/kg)	草莓			香菜		
		平均检出浓度/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%	平均检出浓度/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
福美铁	0.1	0.08	82.8	11.7	0.08	78.4	8.9
	0.5	0.44	88.8	9.0	0.45	90.3	6.9
	1.0	0.95	94.6	4.9	0.88	87.7	9.1
丙森锌	0.5	0.38	75.3	13.8	0.41	81.4	11.2
	2.5	2.22	88.9	5.5	1.93	77.3	7.8
	5.0	3.98	79.6	7.8	4.28	85.5	4.8
代森锰	0.5	0.42	84.6	14.1	0.43	86.6	10.1
	2.5	2.24	89.6	6.5	1.98	79.3	8.2
	5.0	4.59	91.7	7.1	4.61	92.2	4.7

78.4%~94.6%;丙森锌和代森锰添加水平为0.5、2.5、5.0 mg/kg时,平均回收率分别为75.3%~88.9%和79.3~92.2%。其变异系数相对标准偏差(RSD)最大为14.1%,均符合农药残留的检测要求。

2.6 结果计算

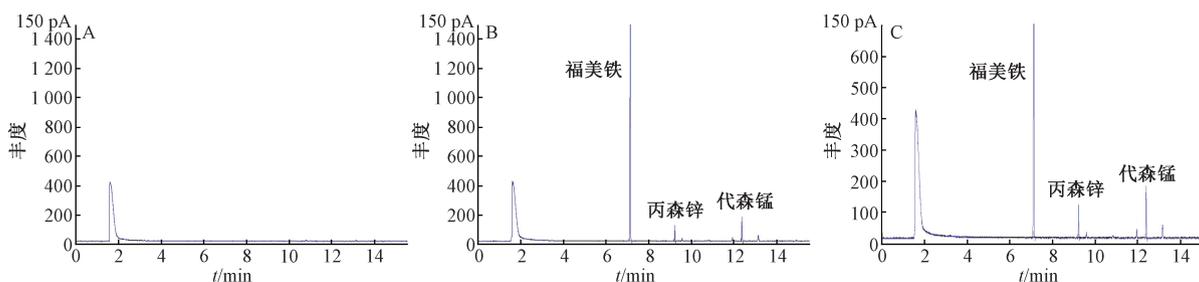
从气相色谱-火焰光度检测器本身看,硫滤光片的响应和化合物的浓度并不呈简单的线性关系,而是其峰高与激发态硫浓度的平方呈正比,因此在计算农药残留含量的时候要注意最后的计算结果需要开平方,单点校正时更需特别注意。

从化合物的结构看,DTCs的灵敏度不但与衍生

物的结构有关,应该还与DTCs结合金属的价态有关,如一个铁离子可以有效结合三个阴离子,而锌和锰则只能结合两个阴离子,因此福美铁的灵敏度要高于丙森锌和代森锰。气相色谱-火焰光度检测器对DMDs、PBDs和EBDs三类物质具有选择性,而不是对某个具体的化合物具有选择性,计算结果应该进行校正。

2.7 实际样品检测

福美铁、丙森锌和代森锰在草莓和香菜样品中的气相色谱-火焰光度检测器色谱图见图2,各农药峰型尖锐、对称,分离度良好,且无杂质干扰。



注:A:草莓阴性样品;B:草莓加标样品;C:香菜加标样品

图2 草莓阴性样品及草莓、香菜加标样品气相色谱图

Figure 2 Chromatograms of negative strawberry and positive of strawberry and coriander

3 小结

本方法采用衍生反应,把目标物转化为适合气相色谱-火焰光度检测器(硫滤光片)检测的甲酯类物质,提高了检测专一性,优化的样品前处理技术可以省时省力,并节约成本,其方法学验证结果符合农药残留检测的各项要求,最低检出限可以满足农药最大残留限量的要求。

参考文献

[1] VETTORAZZI G, ALMEIDA W F, BURIN G J, et al. International safety assessment of pesticides: dithiocarbamate pesticides, ETU and PTU-a review and update [J]. Teratog

Carcinog Mutagen, 1995-1996, 15(6): 313-337.

- [2] 杨桂强. EBDs 杀菌剂及代谢物 ETU 的毒理学研究进展[J]. 现代农药, 2005, 4(1): 6-9.
- [3] ZISIS V E, EMMANOUIL N P, EUPHENMIA P M. Microwave-assisted extraction (MAE) -acid hydrolysis of dithiocarbamates for trace analysis in tobacco and peaches [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(8): 2220-2226.
- [4] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. 出口粮谷中二硫代氨基甲酸酯类残留量检验方法: SN 0139—92[S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.
- [5] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. 出口水果中二硫代氨基甲酸酯类残留量检验方法: SN 0157—92[S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口茶叶中二硫代氨基甲酸酯类总残留量检验方法: SN/T 1541—2005[S].

- 北京:中国标准出版社,2005.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口茶叶中二硫代氨基甲酸酯(盐)类农药残留量的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法:SN/T 0711—2011[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [8] KAWAMOTO T, YANO M, MAKIHATA N. Development of a high-sensitivity quantitative analytical method for determining polycarbamate by gas chromatography-mass spectrometry incorporating temperature-programmable inlet on-column injection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1074(1/2):155-161.
- [9] 孟凡立,崔兆丰,王志坤,等. 高效液相色谱法检测福美双在蔬菜及土壤中的残留[J]. *东北农业大学学报*, 2016, 41(6):28-31.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,中华人民共和国农业部,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量:GB 2763—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [11] 马婧玮,潘灿平,张玲,等. 二硫代氨基甲酸盐类(DTCs)杀菌剂残留分析方法综述[J]. *农药学报*, 2010, 12(1):22-30.
- [12] 贺东霞. 柱前衍生-HPLC法测定香菇中二硫代氨基甲酸盐类农药残留量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(23):3354-3357.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定食用猪油中氯酚类物质

莫迎,蒋湘,刘展华,张倩勉,蒋定之,范兴

(广西-东盟食品药品安全检验检测中心,广西南宁 530001)

摘要:目的 应用超高效液相色谱-串联质谱技术,建立同时测定食用猪油中2,4,5-三氯苯酚、2,4,5-三氯苯氧乙酸和五氯酚3种物质的方法。方法 样品用80%乙腈提取,固相萃取(SPE)和正己烷净化萃取后,以Atlantis® T3(2.1 mm×150 mm,3 μm)为分析柱,乙腈-5.0 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相,以电喷雾离子源在负离子多反应监测模式下进行测定,基质匹配外标法定量。结果 2,4,5-三氯苯酚、2,4,5-三氯苯氧乙酸和五氯酚在2.0~100.0 μg/L范围内线性关系良好,相关系数(*r*)均大于0.999,方法检出限分别为0.09、1.59、0.90 μg/kg,定量限分别为0.29、5.28、3.00 μg/kg,回收率为71.9%~109.5%,相对标准偏差为0.2%~9.2%(*n*=6)。结论 该方法简便、准确、灵敏度高,适用于食用猪油中2,4,5-三氯苯酚、2,4,5-三氯苯氧乙酸、五氯酚3种物质的高通量检测。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法;猪油;氯酚类物质

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)02-0136-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.02.008

Determination of chlorophenols in edible lard by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MO Ying, JIANG Xiang, LIU Zhanhua, ZHANG Qianmian, JIANG Dingzhi, FAN Xing
(Guangxi-ASEAN Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, Guangxi Nanning 530001, China)

Abstract: Objective A ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UPLC-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of 2, 4, 5-trichlorophenol, 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid and pentachlorophenol in edible lard. **Methods** The edible lard samples were extracted by 80% acetonitrile, then purified with solid phase extraction (SPE) and hexane, and loaded on a Atlantis® T3 column (2.1 mm × 150 mm, 3 μm). Acetonitrile-5.0 mmol/L ammonium acetate solution was used as the mobile phase for gradient elution. The compounds were detected by UPLC-MS/MS with negative electrospray ion source (ESI⁻) under multiple reaction monitoring mode. The matrix-matched external standard method was used for quantitation. **Results** 2, 4, 5-trichlorophenol, 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid and pentachlorophenol had an excellent linear relationship in the range of 2.0-100.0 μg/L with

收稿日期:2019-02-15

基金项目:广西食品药品监督管理局研究项目(桂食药办科评[2017]8号-9);食品安全地方标准制定(修订)项目(桂地标食2017003号)

作者简介:莫迎 女 副主任药师 研究方向为食品质量安全 E-mail:812381259@qq.com

通信作者:蒋湘 女 主管药师 研究方向为食品质量安全 E-mail:61513303@qq.com