

气相色谱测定青虾、草鱼肌肉中五氯苯酚及其钠盐残留总量的方法

费志良^{1,2}, 葛家春², 吴军³, 黄诚³, 吴光红²

(1. 南京师范大学地理科学学院, 210097, 江苏, 南京)

(2. 江苏省淡水水产研究所, 210017, 江苏, 南京)

(3. 南京大学生命科学院, 210093, 江苏, 南京)

[摘要] 研究了青虾、草鱼肌肉中五氯苯酚及其钠盐残留总量气相色谱检测方法。五氯苯酚及其钠盐在酸性介质中用正己烷萃取,再用碳酸钾溶液反萃取,萃取物以乙酸酐衍生,衍生物再用正己烷萃取,用气相色谱(配备微池电子捕获检测器)测定。在 0~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数 $r = 0.9999$ 。本方法最低检测限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。在加标水平为 1.0、3.0、5.0、50.0、250.0 $\mu\text{g/kg}$ 时加标回收率为 77%~98%。方法适合水产品中五氯苯酚及其钠盐残留总量的检测。

[关键词] 青虾,草鱼,五氯苯酚,五氯酚钠,残留,气相色谱

[中图分类号] Q584, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)03-0070-04

五氯苯酚(Pentachlorophenol, PCP)是一种有毒农药,常用于木材防腐、杀真菌、杀虫等^[1]。我国曾大量将五氯酚钠(Sodium Pentachlorophenate, PCP-Na)用于杀灭钉螺^[2]。PCP-Na 在酸性条件下转化为 PCP,PCP 为环境荷尔蒙,微量即对人体有毒,可导致中枢神经系统、血液、肝、肾损伤及内分泌紊乱^[1]。美国环境保护署(EPA)已经将 PCP 列为可疑致癌物质,并限制其使用^[1]。我国农业部农牧发[2002]11 号文通知,在水生动物食品生产中禁用五氯酚钠。因此建立先进可靠的检测方法,有助于杜绝五氯酚钠在水产品养殖中的非法使用。

目前国内外对动物组织中五氯苯酚及其钠盐残留的检测方法研究较少^[2,3],而对土壤^[4,5],水体^[5-8],木材^[9],皮革^[10],纺织品^[11],蜂蜜^[12],尿^[13-15]中的研究相对丰富。有分光光度法^[6,16],毛细管区带电泳法^[8],免疫学方法^[5,18],液相色谱法^[5],气相色谱法^[2,4,9,13],气质联用法^[12,17]等。本文建立了硫酸酸化,正己烷萃取, K_2CO_3 溶液反萃取,乙酸酐衍生为五氯苯乙酸酐(Pentachlorophenyl acetate, PCP-OAc),再用正己烷萃取,GC- μECD 测定的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

青虾、草鱼,取肌肉,搅碎,于低温冰箱保存。

1.1.2 药品

五氯苯酚标准品:化学纯(纯度 $\geq 99\%$) (南京防化学院实验化工厂);硫酸:优级纯(南京化学试剂一厂,使用时将浓硫酸与水按 1:1 的体积比稀释);正己烷:分析纯(上海久亿化学试剂有限公司);正己烷:色谱纯(Tedia company, USA);碳酸钾:分析纯(中国医药上海化学试剂公司);乙酸酐:分析纯(上海凌峰化学试剂有限公司);无水硫酸钠:分析纯(南京化学试剂一厂,使用前 550 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧 5 h)。

1.1.3 仪器

AE200 电子天平(METTLER);T-18 分散机(IKA 公司);气质联用仪(Agilent GC6890,5973N,配备⁶³Ni 微电子捕获检测器 μECD 和 EI 源)。

收稿日期:2004-04-28。

基金项目:江苏省科技厅社会发展基金资助项目(BS2002031)。

作者简介:费志良,1962-,南京师范大学地理科学学院博士研究生,江苏省淡水水产研究所所长、研究员,主要从事水产品加工与质量研究,E-mail:jsfish@jionline.com

通讯联系人:葛家春,1972-,硕士,江苏省淡水水产研究所副研究员,主要从事水产品质量检测,E-mail:gjc09@sina.com

万方数据

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:DB-35MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);进样口温度:250℃;检测器温度:300℃;柱温:140℃(2 min) $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 200℃(7 min) \rightarrow 230℃(5 min);载气:99.999%高纯氮气,流量1.5 mL/min,线速度38 cm/s;尾吹气:99.999%高纯氮气,流量60.0 mL/min;进样量:1 μL;进样方式:不分流进样,分流放空时间0.75 min.

1.2.2 样品前处理

准确称取1.00 g混合均匀的样品于具塞离心管中,加入8 mL 1:1的硫酸溶液,匀浆机分散均匀,80℃水浴30 min,加入10 mL正己烷(分析纯),振荡提取3 min,4 000 r/min离心5 min,吸取正己烷于另一具塞离心管中,重复加10 mL正己烷提取1次,合并正己烷.在正己烷提取液中加入4 mL 0.1 mol/L的K₂CO₃溶液,振荡3 min,4 000 r/min离心3 min,吸取K₂CO₃层于一25 mL的具塞离心管中,重复加4 mL K₂CO₃溶液萃取1次,合并K₂CO₃溶液.在此K₂CO₃溶液中加入0.2 mL乙酸酐,旋涡振荡3 min并不断放气;然后加2.5 mL正己烷(色谱纯)萃取生成的酯2次,收集于10 mL试管中,氮气吹干,准确加入1 mL正己烷(色谱纯)溶解,加入少量无水Na₂SO₄脱水,待气相色谱、质谱分析.

1.2.3 标准曲线

准确称取0.050 0 g五氯苯酚标准品,用0.1 mol/L K₂CO₃溶液溶解,定容至100 mL,浓度为500 μg/mL,4℃保存.将上述溶液稀释配制成1、2、5、10、50、100、400、500 μg/L的PCP标准溶液,各吸取1 mL处理步骤同1.2.2进行气相色谱测定,绘制“色谱峰面积/PCP浓度”标准曲线.

2 结果

2.1 色谱图

PCP具有较强的极性,其沸点高,难以气化,直接进样色谱峰拖尾严重,大峰中包含小峰,PCP衍生为低极性低沸点的PCP-OAc后,峰形尖锐、对称(图1).

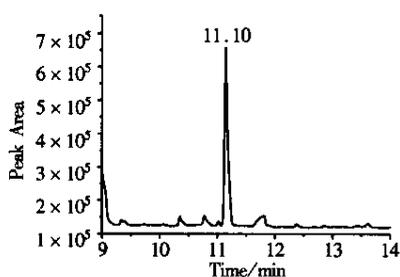


图1 样品中PCP衍生化后色谱图

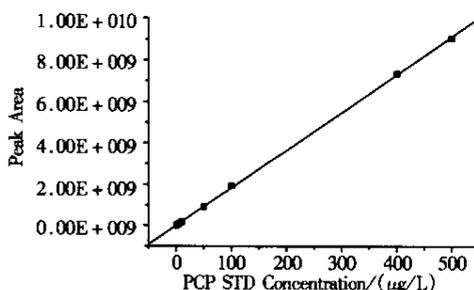


图2 PCP标准曲线

2.2 衍生化产物的定性

将1 mg/L的标样衍生后进GC/MS分析,质谱图及化学结构式如图3,经谱库检索该物质为PCP-OAc.

2.3 标准曲线

PCP标准系列衍生化工作液的峰面积见表1,标准曲线见图2.

表1 PCP浓度与峰面积关系(n=8)

| 浓度(μg/L) | 1 | 2 | 5 | 10 | 50 | 100 | 400 | 500 |
|------------------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 峰面积(×10 ⁷) | 1.799 | 3.519 | 9.02 | 17.42 | 91.52 | 193.1 | 734.2 | 904.9 |

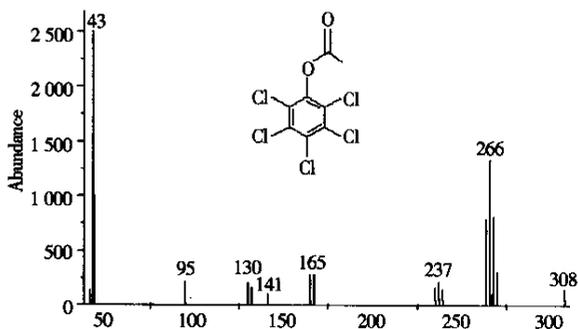


图3 PCP-OAc质谱图及分子式图

本实验PCP浓度的线性范围在0~500 μg/L,标准曲线回归方程为:

$$Y = 1.818 \times 10^7 X + 1.706 \times 10^7 \text{ (其中 } X \text{ 表示浓度, } Y \text{ 表示峰面积),}$$

相关系数 $r = 0.9999$,线性关系良好.

万方数据

2.4 加标回收率

在本底浓度约为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的虾肉中添加 5 个浓度水平的 PCP: $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (6 个平行), $3.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (6 个平行), $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (7 个平行), $50.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (12 个平行), $250.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (10 个平行), 按 1.2.2 处理后进行测定, 结果见表 2.

表 2 PCP 的加标回收率结果

| 添加浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$ | 测定值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$ | 回收率范围/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---------------------------------|--------------------------------|----------|---------|-------|
| 1.0 | 0.8 ± 0.1 | 68 ~ 92 | 78 | 10.2 |
| 3.0 | 2.3 ± 0.2 | 69 ~ 87 | 77 | 8.5 |
| 5.0 | 4.6 ± 0.3 | 85 ~ 97 | 92 | 3.5 |
| 50.0 | 48.7 ± 2.9 | 90 ~ 106 | 97 | 5.2 |
| 250.0 | 245.6 ± 22.8 | 82 ~ 111 | 98 | 9.2 |

2.5 精密度

2.5.1 实验室内重复性和重现性精密度

分别于 2002 年 12 月 1 日、12 月 8 日、12 月 15 日、12 月 22 日和 2003 年 1 月 12 日在江苏省淡水水产研究所测定同一青虾样品, 每次测定 4 至 6 个平行, 考察方法实验室内重复性和重现性精密度, 结果见表 3.

测得样品平均含量为 $1.23 \mu\text{g}/\text{kg}$, 实验室内重复性 RSD 在 3.4% ~ 10.7% 之间, 实验室内重现性 RSD 为 18.2% ;

2.5.2 实验室间重现性精密度

对同一草鱼样品加标 $10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 在江苏省淡水水产研究所、南京市水产品质量监督检验站与江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心进行若干次平行测定结果见表 4.

表 3 实验室内重复性和重现性精密度

| 日期 | 测定值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$ $\bar{X} \pm \text{SD}$ | 平行次数 (n) | 重复性 (RSD)/% |
|------------|---|-------------|----------------|
| 2002-12-01 | 1.02 ± 0.04 | 4 | 3.4 |
| 2002-12-08 | 1.52 ± 0.16 | 4 | 10.7 |
| 2002-12-15 | 1.40 ± 0.05 | 4 | 3.6 |
| 2002-12-22 | 1.15 ± 0.06 | 4 | 5.0 |
| 2003-01-12 | 1.04 ± 0.06 | 6 | 5.8 |

表 4 实验室间重现性精密度

| 实验室 | 平行(n) | 样品本底 浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$ | 加标后 浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$ |
|---------------|-------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 江苏省淡水水产研究所 | 10 | 9.6 ± 0.8 | 16.7 ± 1.1 |
| 南京市水产品质量监督检验站 | 6 | 7.3 ± 0.2 | 17.4 ± 0.8 |
| 江苏出入境检验检疫局 | 6 | 7.2 ± 0.5 | 16.1 ± 1.9 |
| 实验室间均值 | | 8.0 ± 1.4 | 16.7 ± 0.7 |
| RSD | | 16.9% | 4.2% |

三实验室所测样品均值为 $8.0 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{kg}$, 实验室间重现性 RSD 为 16.9% ; 加标后均值为 $16.7 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{kg}$, 实验室间重现性 RSD 为 4.2% .

2.6 最低检测限

按噪音的 2 倍计算最低检测限, 本方法最低检测浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$.

2.7 正己烷提取效率的研究

为研究正己烷从样品的硫酸溶液中提取 PCP 的效率, 将 4 个平行样品加硫酸溶液酸化后, 分 3 次每次加 10 mL 正己烷提取, 每次所得提取液分别测定, 结果显示前 2 次可提取出总量的 98.58% ~ 98.83% , 平均为 98.70% , 因此在常规检测中用正己烷提取 2 次即可.

3 讨论

在样品提取时采用分散机, 使样品与硫酸溶液充分混匀成浆状, 提取效果较使用旋涡混合仪好. 采用 80°C 水浴 30 min 可有效减少下一步正己烷提取时白色凝胶状物质的产生, 便于操作, 提高回收率.

常见的衍生试剂有重氮甲烷及乙酸酐, 重氮甲烷致癌, 且有爆炸的危险, 本实验选用价廉易得, 使用安全的乙酸酐作为衍生试剂. 发现乙酸酐用量大于 $100 \mu\text{L}$ 时, 衍生反应趋于完全, 本实验选择乙酸酐用量 $200 \mu\text{L}$ 可以保证衍生反应完全.

用乙酸酐进行衍生化, 若酸度过高, 酚的离子型减少, 衍生反应困难, 酸度过低, 则乙酸酐本身水解加剧, 衍生化率不高. 徐希明等^[15]考察了 pH 值对衍生反应的影响, 得出最适 pH 范围为 10.5 ~ 11.5. 本实验选用 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 的 K_2CO_3 溶液作为缓冲液调节 pH 值.

[参考文献]

- [1] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). ToxFAQs™ for Pentachloropheno[EB/OL]. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts51.html> 2004-05-25.
- [2] 张兵,郑明辉,刘帆岩,等.五氯酚在洞庭湖环境介质中的分布[J].中国环境科学,2001,21(2):165—167.
- [3] Macneil James D, Patterson John R, Fesser Adrian C, et al. Determination of Pentachlorophenol in animal Tissues: A Canadian Perspective[J]. J Assoc off Anal Chem, 1990, 73(6) 838—841.
- [4] Polese Luciana, Ribeiro Maria Lúcia. Methods for determination of hexachlorobenzene and pentachlorophenol in soil samples[J]. Talanta, 1998, 46(5) 915—920.
- [5] Oubina Anna, Puig David, Gascón Jordi, et al. Determination of pentachlorophenol in certified waste waters, soil samples and industrial effluents using ELISA and liquid solid extraction followed by liquid chromatography[J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 346(1) : 49—59.
- [6] GB 9803—88 水质五氯酚的测定 藏红花 T 分光光度法 S].
- [7] GB 8972—88 水质五氯酚的测定 气相色谱法 S].
- [8] Turnes M I, Mejuto M C, Cela R. Determination of pentachlorophenol in water samples by capillary zone electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 1996, 733(1) 395—404.
- [9] Becker Roland, Buge Hans-Cerhard, Win Tin. Determination of pentachloropheno(PCP) in waste wood——method comparison by a collaborative trial[J]. Chemosphere, 2002, 47(9) :1001—1006.
- [10] SN 0193.1—93 出口皮革及皮革制品中五氯酚残留量检测方法 乙酰化-气相色谱法 S].
- [11] GB/T 18414.2—2001 纺织品 五氯苯酚残留量的测定 第 2 部分 :气相色谱法 S].
- [12] Muiño Miguel Angel Fernández, Lozano Jesús Simal. Mass spectrometric determination of pentachlorophenol in honey[J]. Analytica Chimica Acta, 1991, 247(1) :121—123.
- [13] Bartels P, Ebeling E, Krämer B, et al. Determination of chlorophenols in urine of children and suggestion of reference values[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 1999, 365(5) :458—464.
- [14] 徐希明,王洪玮,阮永道.尿中五氯酚的毛细管气相色谱测定方法研究[J].中国卫生检验杂志,1996,6(6):322—324.
- [15] 徐希明,王洪玮,阮永道.毛细管气相色谱法测定尿中五氯酚的样品处理方法探讨[J].中华预防医学杂志,1997,31(4):237—238.
- [16] Moreno Roman C, Montero Escolar MR, Leon Gonzalez ME, et al. Pentachlorophenol preconcentration using quinolin-8-ol immobilized on controlled-pore glass and flow spectrophotometric determination[J]. Analytica Chimica Acta, 1994, 288(2) 259—264.
- [17] Ribeiro A, Neves M H, Almeida M F, et al. Direct determination of chlorophenols in landfill leachates by solidphase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 975(2) 267—274.
- [18] Wuske T, Fittkau I, Mahn J, et al. Pentachlorophenol detection at the source of emission sampling equipment and immunochemical analysis[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 359(3) 321—328.

Determination of Total Amount of Pentachlorophenol and Its Sodium Salt's Residues in Muscle Tissues of *Macrobrachium nipponensis* and *Ctenopharyngodon idellus* by Gas Chromatography

Fei Zhiliang^{1, 2}, Ge Jiachun², Wu Jun³, Huang Cheng³, Wu Guanghong²

(1. School of Geographical Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Freshwater Fishery Research Institute of Jiangsu Province, 210017, Nanjing, China)

(3. School of Life Science, Nanjing University, 210093, Nanjing, China)

Abstract Residues of pentachlorophenol and its sodium salt in aquatic products were determined by gas chromatography. The target compounds were first extracted with n-hexane in an acidic medium, and then back extracted with potassium carbonate solution. The extract was derivatized with acetic anhydride, and the derivative was extracted with n-hexane. The micro-cell electron capture detector was used for the determination. The linear relation was good in the range of 0 ~ 500 μg/L with a correlation coefficient of 0.999 9. The detection limit was 0.5 μg/kg. The recovery was 77% ~ 98% when the fortification level was 1.0, 3.0, 5.0, 50.0 and 250.0 μg/kg. The method is suitable for the determination of pentachlorophenol and its sodium salt in aquatic products.

Key words : *Macrobrachium nipponensis*, *Ctenopharyngodon idellus*, pentachlorophenol, sodium pentachlorophenate, residue, gas chromatography

[责任编辑 孙德泉]