

气相色谱法检测牛奶中五氯苯酚残留量

李小桥^{1†}, 官琼^{2‡}, 王林¹, 赵宁¹, 丁焕中¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 福建华龙集团饲料有限公司, 福建 福州 350003)

摘要:建立了气相色谱-电子捕获检测器测定牛奶中五氯苯酚残留量的检测方法. 样品经丙酮提取, 乙酸酐衍生化, 衍生物采用气相色谱-电子捕获检测器进行检测. 结果表明, 五氯苯酚衍生物响应信号与其质量浓度在 5.00 ~ 500.00 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 r^2 为 0.999; 在 5、10 和 50 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下, 牛奶中待测物平均回收率分别为 77.6%、87.2% 和 86.3%, 相对标准偏差(RSD)小于 9.6%; 检测限为 2 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 5 $\mu\text{g/kg}$. 方法适合于牛奶中五氯苯酚残留检测.

关键词:气相色谱-电子捕获检测器(GC-ECD); 牛奶; 五氯苯酚; 衍生化
中图分类号:S852.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-411X(2012)02-0253-03

Determination of Pentachlorophenol in Milk with GC

LI Xiao-qiao^{1†}, GUAN Qiong^{2‡}, WANG Lin¹, ZHAO Ning¹, DING Huan-zhong¹
(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Fujian Hualong Group Feed CO. LTD, Fuzhou 350003, China)

Abstract: A method was established for determining residue of pentachlorophenol in milk with gas chromatography (GC)-electron capture detector (ECD). The sample was extracted with acetone and derived with acetic anhydride. The derivative was determined by gas chromatography with electron capture detector. Good accuracy, precision and sensitivity were obtained with the method. The calibration curves of the derivative of pentachlorophenol were linear between the peak areas and the concentrations in the range of 5.00 – 500.00 $\mu\text{g/L}$ with correlation coefficients (r^2) of 0.999. The average recoveries of pentachlorophenol were 77.6%, 87.2% and 86.3% respectively at three spiked concentration of levels of 5, 10 and 50 $\mu\text{g/kg}$, with relative standard deviations (RSDs) less than 9.6%. The limit of detection (LOD) for the derivative of pentachlorophenol was 2 $\mu\text{g/kg}$ and the limit of quantitation (LOQ) was found to be 5 $\mu\text{g/kg}$. The study revealed that the method was suitable for the determination of pentachlorophenol in milk.

Key words: gas chromatography-electron capture detector; milk; pentachlorophenol; derivativing

五氯苯酚 (Pentachlorophenol, PCP) 是一种有机氯农药, 常用于木材防腐、杀真菌、杀虫等. 我国湖北、湖南、四川等南方 10 多个省市长期流行日本血吸虫病, 上世纪 80 年代采用其钠盐-五氯苯酚钠 (Sodium pentachlorophenol, PCP-Na) 消灭血吸虫中间宿主钉螺^[1-2], 取得明显效果. 由于五氯苯酚化学性质稳定、残留期长, 不仅具有生物蓄积作用, 且具有致畸、致癌、致突变等^[3-4]毒副作用, 因此, 世界各发达国家均将其列为对环境不利的化学品, 并严格限

制其使用. 目前国内外对动物源性食品中五氯苯酚残留的检测方法研究较少, 而对土壤、水体、木材、皮革、纺织品、蜂蜜和尿等^[5-9]的研究相对较多, 鉴于农业部 235 公告对五氯苯酚在动物源性食品中残留限量相关规定, 本试验对五氯苯酚及其钠盐在牛奶中残留检测进行研究. 目前, 五氯苯酚残留分析方法主要有气相色谱法, 气/质联用法, 高效液相色谱法和液/质联用法等^[8-11]. 气相色谱法和气/质联用法灵敏度和选择性高, 应用较普遍; 液/质联用法虽然简便,

收稿日期:2011-03-01
作者简介:李小桥(1986—),男,硕士研究生,现在重庆动物疾病预防控制中心工作;官琼(1975—),女,中级畜牧师;†:对本文贡献相同;通信作者:丁焕中(1969—),男,副教授,博士,E-mail:hzding@scau.edu.cn
基金项目:2009年农业行业标准制定项目

灵敏度较高,无需衍生化等繁琐的前处理步骤,但其耗材比较昂贵,不能较广泛使用;高效液相色谱法灵敏度不及气相色谱。因此,本试验使用丙酮提取牛奶中五氯苯酚并用乙酸酐衍生为五氯苯酚乙酸酯(Pentachlorophenol acetate, PCP-OAc),利用气相色谱-电子捕获检测器建立了牛奶中五氯苯酚残留量检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

GC-2010 气相色谱,配有电子捕获检测器(日本岛津公司);恒温水浴锅(BuCHI)圆周振荡摇床(德国 IKA 公司);高速离心机(Thermo 公司);漩涡振荡器(德国 IKA 公司)。

五氯苯酚标准液为 100 $\mu\text{g/mL}$,购自中国广州分析测试中心广东省测试分析研究所(4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存);丙酮、正己烷和甲醇(色谱纯),乙酸酐和碳酸钾(分析纯),试验用水为去离子水。

1.2 标准工作液配制

取 1 mL 100 $\mu\text{g/mL}$ 的五氯苯酚标准液于 10 mL 容量瓶,用甲醇定容至 10 mL,配成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。标准工作液临用时再逐级稀释。

1.3 样品处理

称取(1.00 $\pm$ 0.05) g 牛奶于 15 mL 塑料离心管,加入 3 mL 丙酮,超声提取 10 min,振荡 5 min 后,6 000 r/min 离心 5 min,上清液装入另一 15 mL 离心管,提取 2 次,合并上清液,上清液加入 3 mL 0.1 mol/L 的碳酸钾溶液,再加入 100 μL 乙酸酐,涡旋 2 min,最后加入 2.5 mL 正己烷萃取衍生物,萃取 2 次,萃取液经 N_2 吹干,正己烷定容至 1 mL,取 1 μL 上机检测。

1.4 气相色谱条件

毛细色谱管柱:RTX-5 (30 m $\times$ 0.32 mm i. d. $\times$ 0.1 μm);柱温:程序升温,起始柱温 70 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 230 $^{\circ}\text{C}$,保持 3 min,再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$;载气为高纯氮气,柱流速 1.5 mL/min;不分流进样,进样量 1 μL ;进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;总流量:50 mL/min;尾吹气:3 mL/min;检测器:电子捕获检测器 ECD,300 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 提取条件优化

五氯苯酚极性较强,易溶于乙腈、甲醇、丙酮等常见有机溶剂,其钠盐易溶于水。使用气相色谱法测定生物样品中五氯苯酚时,通常采用硫酸磺化,正己烷或石油醚萃取,碱性溶液反萃取,乙酸酐衍生化等繁琐的前处理步骤^[11-12]。本试验使用丙酮来提取牛

奶中的五氯苯酚,不仅能得到较高的回收率,且处理过程比较便捷,无需硫酸磺化和萃取等提取步骤。另外,使用超声提取能使牛奶中目标物更好地分散到提取溶剂中,提高回收率。

2.2 衍生化条件优化

2.2.1 衍生化试剂的选择 由于五氯苯酚具有强极性、沸点(310 $^{\circ}\text{C}$)高等特点,直接进样分析对色谱柱及仪器系统要求很高,故通常在分析前,五氯苯酚应转化为非极性的衍生物^[13]。常用的衍生剂有五氟苯甲酰氯、重氮甲烷及乙酸酐,五氟苯甲酰氯最灵敏,但会产生较高的本底值,需用碱溶液进行净化,重氮甲烷致癌,且有爆炸的危险。所以本试验选用价格便宜、灵敏度较高且本底较低的乙酸酐为衍生化试剂。

2.2.2 衍生化 pH 条件确定 根据文献报道,当 $\text{pH} \geq 11.5$ 时,乙酸酐的水解快于乙酰化反应;当 $\text{pH} < 6$ 时,酚离子尚未形成,此两者均降低了乙酰化产率,乙酸酐乙酰化反应最佳 pH 为 9 ~ 11 之间^[11-13]。由于反应有酸生成,因此本试验使用 0.1 mol/L 碳酸钾溶液作为敷酸剂即可满足衍生条件。

2.2.3 衍生试剂用量、衍生化温度和时间的优化 取 100 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 五氯苯酚标准液 6 份,分别加入 0、20、50、100、200、300 μL 乙酸酐,按 1.3 条件处理,衍生产物上机检测。结果表明,衍生试剂为 100 μL 时乙酰化反应趋于完全(图 1)。

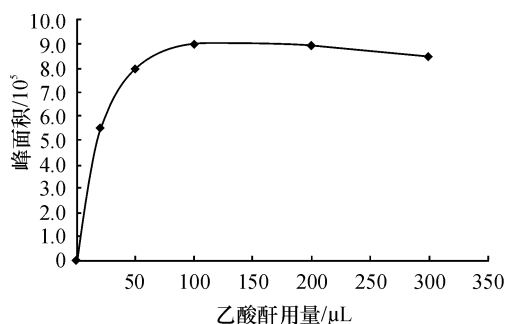


图1 PCP-OAc 峰面积与乙酸酐用量的关系

Fig. 1 The relation between peak area of PCP-OAc and dosage of acetic anhydride

相同试样在 25、60 $^{\circ}\text{C}$ 不同衍生化温度及 5、20 min 不同衍生化时间条件下进行了试验测定。结果表明:在不同温度和衍生时间下,乙酰化反应都能快速、较彻底地完成,且衍生产物峰面积变化很小,因此本试验可忽略衍生温度和时间的影响。

2.3 线性范围和检出限

用标准工作液配制成 5.00 ~ 500.00 $\mu\text{g/L}$ 一系列质量浓度的标准溶液,按 1.3 条件处理后进样,外标法定量。以峰面积(x)对质量浓度(y , $\mu\text{g/L}$)作标准曲线,根据 3 倍信噪比计算方法的检出限,10 倍信噪比计算方法的定量下限。

结果表明,五氯苯酚在 $5.00 \sim 500.00 \mu\text{g/L}$ 范围内的衍生产物线性方程为 $y = 0.001x - 1.283$, 相关系数 $r^2 = 0.999$, 线性关系良好(图2);并且推断出本方法的检测限为 $2 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$.

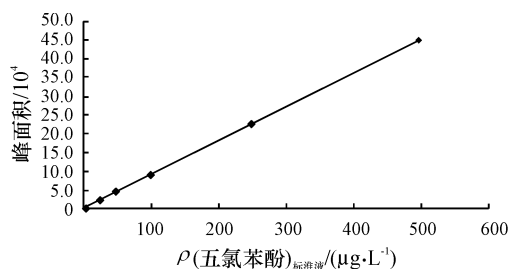


图2 五氯苯酚标准曲线

Fig.2 Standard curve of Pentachlorophend

2.4 准确度和精密度

在阴性牛奶中加入由 $10 \mu\text{g/mL}$ 的标准工作液逐级稀释为 0.05 、 0.10 、 $0.50 \mu\text{g/mL}$ 的工作液各 $100 \mu\text{L}$ (添加水平相当于 5 、 10 、 $50 \mu\text{g/kg}$), 按提取、衍生和检测步骤, 对每个加标水平做 5 个平行试验, 重复 5 次, 计算平均回收率和相对标准偏差(RSD), 分别考察方法的准确度和精密度.

试验结果得出五氯苯酚在 5 、 10 、 $50 \mu\text{g/kg}$ 加标水平下的平均回收率分别为 77.6% 、 87.2% 和 86.3% , RSD 小于 9.6% , 说明本方法准确可靠. 其中阴性牛奶加标回收样品和阴性牛奶样品图谱见图3、图4.

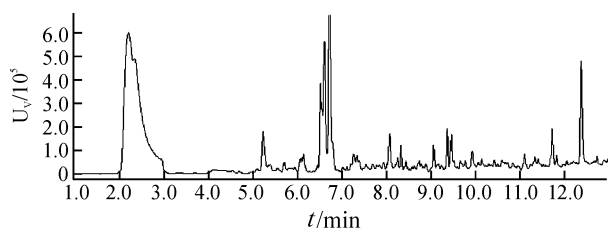


图3 空白牛奶样品气相色谱图

Fig.3 GC chromatogram of negative milk sample

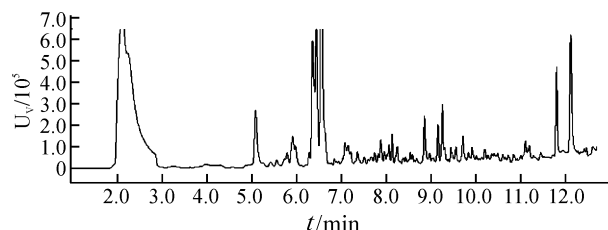


图4 空白牛奶加标回收样品气相色谱图(添加水平为 $50 \mu\text{g/kg}$)

Fig.4 GC chromatogram of negative milk at spiked standard solution of $50 \mu\text{g/kg}$

2.5 实际样品分析

按本方法检测购于某超市的 20 份牛奶样品, 每份样品做 3 个平行试验, 结果取平均值, 经测定, 所有样品均未检出.

3 结论

本文建立了牛奶中的五氯苯酚气相检测方法. 利用丙酮提取样品, 乙酸酐衍生化, 运用气相色谱-电子捕获检测器检测样品. 五氯苯酚在 5 、 10 、 $50 \mu\text{g/kg}$ 3 个加标水平下的回收率分别为 77.2% 、 87.2% 和 86.3% , 相对标准偏差小于 9.6% , 检出限为 $2 \mu\text{g/kg}$, 定量下限为 $5 \mu\text{g/kg}$, 表明该方法灵敏度高、稳定可行, 且分析过程简单快速. 该方法有望成为动物源性食品牛奶中五氯苯酚农药残留的常规分析方法之一.

参考文献:

- [1] 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): 65-167.
- [2] 胡滨, 陈一资, 胡惠民. 动物性食品中五氯酚钠残留及对入畜毒害的研究[J]. 肉品卫生, 2005(2): 27-29.
- [3] 宋瑞霞, 阮鸿洁, 刘征涛. 五氯酚钠致突变性研究[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(3): 337-339.
- [4] 刘静, 周小红, 施汉昌. 五氯酚对生物膜活细胞含量及分布的影响研究[J]. 环境科学, 2011, 32(2): 483-487.
- [5] 黄志强, 涅洪勇, 彭三和. 气相色谱法快速测定皮革中五氯酚及五氯酚钠[J]. 中国皮革, 1991, 19(12): 1463.
- [6] 阮勇, 钱徽君. HPLC-ESI/MS 测定纺织品中痕量五氯酚[J]. 印染, 2008, 23(3): 40-42.
- [7] BECKER R, BUGÉ H G, WIN T. Determination of pentachlorophenol (PCP) in waste wood - method comparison by a collaborative trial [J]. Chemosphere, 2002, 47: 1001-1006.
- [8] MOL H G, SUNARTO S, STEIJGER O M. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N (tertbutyldimethylhyrfluoracetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection [J]. Chromatography: A, 2000, 879(1): 97-112.
- [9] ZHOU Ying, JIANG Qing-wu, PENG Qian, et al. Development of a solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of pentachlorophenol in human plasma using experimental design [J]. Chemosphere, 2007, 70(2): 256-262.
- [10] 金米聪, 陈晓红, 陈衡平, 等. 高效液相色谱-电喷雾电离质谱联用法测定水中痕量五氯酚研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3): 280-286.
- [11] 费志良, 葛家春, 吴光红, 等. 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[J]. 南京师范大学报, 2004, 27(3): 70-72.
- [12] 蒋红进, 周美玲, 王丽君. 气相色谱法测定鱼体中残留五氯酚及其盐类[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(10): 2432-2436.
- [13] 范苓, 夏豪刚. 气相色谱/质谱法测定水中五氯酚[J]. 环境监测管理与技术, 2001, 13(1): 33-34.