

气相色谱法检测山羊组织中溴氰菊酯的残留

谭滇湘, 曾振灵, 陈杖榴, 孙永学

(华南农业大学 兽医学院, 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 溴氰菊酯是牛、羊体表常用驱虫药, 为了探索动物组织中溴氰菊酯的残留检测方法, 本试验选用 GC-ECD 检测法配合 SE-52 弹性石英毛细管柱检测溴氰菊酯。以高纯氮气为载气; 流速 15 psi; 进样口温度 280 °C; 检测器温度 300 °C; 补充气为氮气 30 mL/min; 升温程序 80 °C 保持 1 min, 再以 10 °C/min 升高到 280 °C 保持 20 min。采用乙醚—石油醚 (1:1, 体积比) 提取液提取山羊组织中的溴氰菊酯, 用 5 g 硅胶填充固相萃取柱净化提取液, 以乙醚—石油醚 (1:2, 体积比) 20 mL 洗脱药物, 氮气流吹干浓缩样品, 气相色谱检测药物浓度。结果表明, 山羊组织中溴氰菊酯在 1~200 ng/g 线性范围内, 本方法回收率为 98.18%, 检测限为 1 ng/g。该方法可用于山羊组织样品中溴氰菊酯残留的提取和测定。

关键词: 溴氰菊酯; 气相色谱法; 山羊; 组织残留

中图分类号: S859.79

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0103-05

Determination of deltamethrin residues in goat tissues by GC-ECD

TAN Dian-xiang, ZENG Zhen-ling, CHEN Zhang-liu, SUN Yong-xue

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Deltamethrin is widely used to control ectoparasites on cattle and sheep. A method utilizing gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD) plus a SE-52 flexible fused silica capillary column for determination of deltamethrin in animal tissues was established. The main running conditions of GC-ECD were as follows: highly pure N₂ as carrier gas with the flow/pressure being 15 psi, injector temperature 280 °C, detector temperature 300 °C, the column temperature was kept at 80 °C for 1 min, then raised to 280 °C for 20 min at a rate of 10 °C per min. The deltamethrin in goat tissues was extracted with diethyl ether-petroleum ether (1:1, V/V), the extract was cleaned with 5 g silica partition column and eluted with 20 mL diethyl ether-petroleum ether (1:2, V/V). The recovery of deltamethrin in goat tissue was 98.18% between the linear range of 1~200 ng/g and the detection limit was 1 ng/g. This method of GC is suitable for the extraction and determination of deltamethrin in the goat tissues.

Key words: deltamethrin; gas chromatography; goat; tissue residues

拟除虫菊酯是近 20 年来以天然除虫菊酯的化学结构为基础开发出来的一类仿生广谱杀虫药物。最早应用于防治家庭、畜舍、仓储等害虫的一类天然除虫菊素, 是除虫菊花中的有效成分。到了 20 世纪 40 年代后期, 各国科学家开始模拟合成拟除虫菊酯仿生杀虫剂, 它们在化学结构上与天然菊素有较大

大改变, 生物活性和杀虫活性有了很大的改善和提高, 使拟除虫菊酯杀虫剂在农业生产上得到广泛应用^[1, 2]。但是, 随着各国对拟除虫菊酯杀虫剂毒理学的研究不断深入, 发现了拟除虫菊酯类杀虫剂有许多潜在毒性作用, 主要表现在神经毒性和致突变方面^[3~6]。随着拟除虫菊酯杀虫剂在农牧业中的广泛

收稿日期: 2004-04-20

作者简介: 谭滇湘(1971-)男, 硕士。通讯作者: 曾振灵(1963-), 教授, 博士; E-mail:

ztleng@scau.edu.cn

基金项目: 农业部兽药残留检测方法标准制订专项资金资助项目

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

应用,它们不可避免地在食品动物体内残留,对人类健康造成威胁.因此,探索拟除虫菊酯在食品动物组织中残留检测方法的研究显得十分重要⁷⁻⁹.国外对拟除虫菊酯杀虫剂在食品动物组织中的残留做了大量研究,有些国家对拟除虫菊酯杀虫剂在动物组织中的残留限量制定了严格的标准¹⁰⁻¹⁶.我国自20世纪70年代初开始研究除虫菊酯以来,已合成了胺菊酯、甲醇菊酯、戊菊酯、氰戊菊酯、氯菊酯、氯氰菊酯、高效氯氰菊酯等拟除虫菊酯类杀虫剂,使拟除虫菊酯杀虫剂得到了广泛推广应用²,但国内对拟除虫菊酯杀虫剂在食品动物组织中的残留的研究报道很少.本研究以畜禽养殖中应用最普遍的拟除虫菊酯类杀虫剂——溴氰菊酯(*deltamethrin*)来探索在山羊组织中残留的气相色谱检测方法.

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

溴氰菊酯标准品:质量分数为99.7%,批号GBW(E)060138,农业部农药检定所.

提取液:石油醚(色谱纯)500 mL与500 mL乙醚(分析纯)混匀.

乙腈饱和石油醚溶液:500 mL石油醚中加入乙腈(色谱纯)至饱和即可.

洗脱液:500 mL石油醚中加入乙醚250 mL.

弗罗里硅土:使用前,650 °C活化4 h,冷却至室温,每100 g弗罗里硅土加入5 mL蒸馏水脱活,密闭保存.

硅胶:100~200目,批号991020,上海五四化学试剂厂.使用前,180 °C活化4 h,冷却至室温,每100 g硅胶加入5 mL蒸馏水脱活,密闭保存.

无水硫酸钠:分析纯,批号20011101,广州化学试剂厂,使用前650 °C烘烤4 h,冷却后密闭保存.

1.2 仪器设备

气相色谱仪(GC):美国,Perkin-Elmer公司.配备电子捕获检测器(ECD).

1.3 试验准备

溴氰菊酯标准溶液:准确称取溴氰菊酯标准品0.010 27 g,置于100 mL容量瓶中,以石油醚(色谱纯)溶解并定容至刻度,即成100 μg/mL的溴氰菊酯标准贮备液.使用前再用石油醚配成各系列标准浓度.

固相萃取柱准备:Florisil柱.取层析柱(30 cm × 1 cm)1支,首先在柱底加2 g无水硫酸钠,然后称取5 g氟罗里硅土于1个小烧杯中,加入10 mL石油醚(正己烷)搅拌均匀后加入柱内,最上面再加1层无

水硫酸钠(1 g),用20 mL石油醚(正己烷)预洗层析柱.

硅胶柱:取层析柱(30 cm × 1 cm)1支,首先在柱底加2 g无水硫酸钠,然后称取5 g硅胶于1个小烧杯中,加入10 mL石油醚(正己烷)搅拌均匀后加入柱内,最上面再加一层无水硫酸钠(1 g),用20 mL石油醚(正己烷)预洗层析柱.

1.4 试验方法

1.4.1 组织样品预处理 山羊组织样品匀浆于室温解冻,准确称取5 g组织匀浆置于30 mL塑料离心管中,精确加入乙醚-石油醚(1:1,体积比)提取液10 mL,混匀,振荡25 min,6 000 r/min离心5 min,吸取上层有机相到25 mL玻璃管中,重复提取1次,合并的上层有机相于45 °C氮气流吹干.残留物用10 mL乙腈溶液溶解,漩涡混合,然后加入4 mL乙腈饱和石油醚,充分混合,静置片刻,吸除上层的石油醚,重复操作2次.下层的乙腈相用45 °C氮气流吹干.5 mL石油醚溶解,过5 g硅胶固相萃取柱,再用5 mL石油醚清洗玻璃管,洗液一并过柱.用洗脱液乙醚-石油醚(1:2,体积比)20 mL洗脱药物,收集洗脱液,于45 °C水浴氮气吹干.测定前用1 mL色谱纯石油醚溶解,溶解物注入2 mL自动进样瓶中,由自动进样器进行测定,每次进样量为1 μL.

1.4.2 气相色谱条件和工作指标 检测器:ECD;检测器温度:300 °C;程序升温:初始温度180 °C保持1 min,20 °C/min升至280 °C,保持20 min;进样口温度:280 °C;色谱柱:SE-52弹性石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);载气:高纯氮气;流速:15 psi;最低检测限:1 ng/g.

1.4.3 标准曲线和线性范围 在7支30 mL螺口塑料离心管中各加入5 g山羊空白组织匀浆,再依次加入100 μL溴氰菊酯标准液系列,漩涡混匀,使得各样品中溴氰菊酯质量分数为1~200 ng/g,第1管中加入100 μL石油醚作空白对照.按“1.4.1”方法进行样品处理及测定,将测得的溴氰菊酯的色谱峰高(*H*)与相对应的药物浓度(*C*)作直线回归,求得标准曲线方程和相关系数,共作4次重复.

1.4.4 回收率测定 在线性范围内,将一定量溴氰菊酯标准液加入山羊空白组织匀浆,混匀,制得质量分数为1、50、200 ng/g,按“1.4.1”方法处理,自动进样作GC-ECD分析,再将同质量浓度的标准液自动进样作GC-ECD检测法分析,计算各对应质量浓度的回收率.每一样品重复6次.

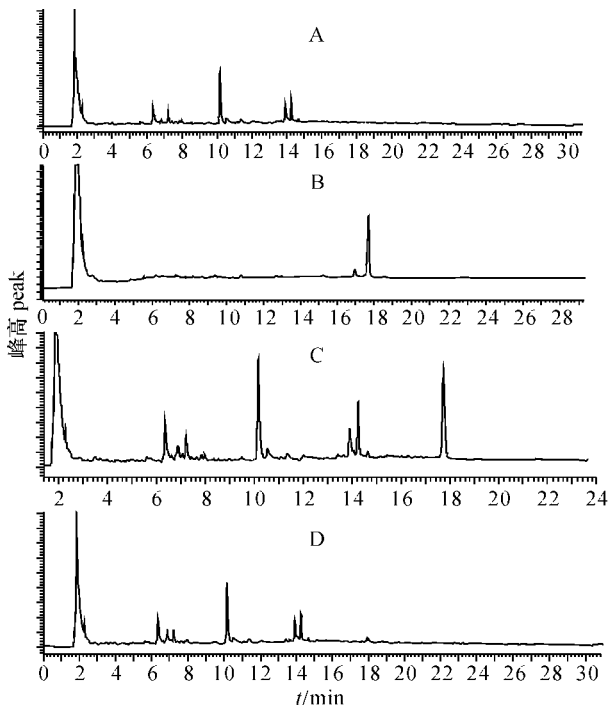
1.4.5 变异系数测定 分别取50、2 500、10⁴ ng/mL 3个质量浓度的溴氰菊酯标准液100 μL于5 g山羊

空白组织匀浆中制成质量分数为 1、50、200 ng/g 的样品, 按“1.4.1”方法处理, 求得溴氰菊酯的色谱峰高。每批内(日内)作 6 个重复, 共作 4 个批次(日间), 分别计算批内和批间色谱峰高平均值、标准差及变异系数。

2 结果

2.1 组织样品中溴氰菊酯提取与检测

采用本试验样品处理方法结合选定的色谱条件能将溴氰菊酯与组织中其他组分分开, 溴氰菊酯的色谱峰保留时间为 17.68 min, 且峰形较好。(图 1, 肌肉; 图 2, 脂肪)。



A. 空白山羊肌肉组织; B. 溴氰菊酯标准品; C. 加入溴氰菊酯标准品的肌肉组织; D. 山羊药浴后的肌肉组织

A. blank muscle tissue of goat; B. standard deltamethrin; C. deltamethrin added to blank muscle tissue of goat; D. muscle tissue of goat after dipping

图 1 山羊肌肉组织的 GC-ECD 分析色谱图

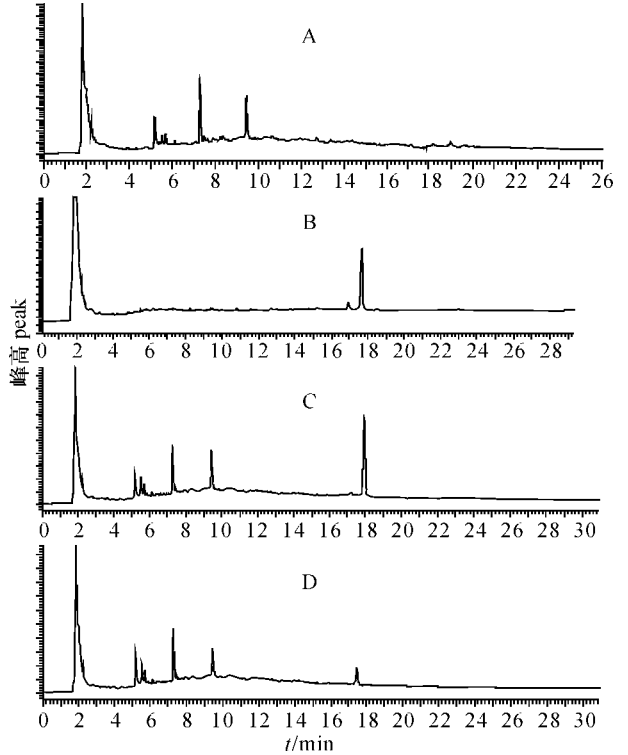
Fig. 1 Gas chromatograms of deltamethrin in muscle tissue of goat

2.2 标准曲线

组织中溴氰菊酯气相色谱-ECD 分析标准曲线回归方程与相关系数如表 1, 在 1~200 ng/g 的线性范围内, 肌肉组织的相关性为 0.998 8~0.999 7; 肝脏为 0.997 8~0.999 7; 肾脏为 0.998 5~0.999 6; 脂肪为 0.997 8~0.999 7。

2.3 组织样品回收率

1、50、200 ng/g 3 个质量分数的溴氰菊酯的回收率如表 2 所示($\bar{x} \pm S.E., n=6$)。



A. 空白山羊脂肪; B. 溴氰菊酯标准品; C. 加入溴氰菊酯标准品的脂肪组织; D. 山羊药浴后的脂肪组织

A. blank fat tissue of goat; B. standard deltamethrin; C. deltamethrin added to blank fat tissue; D. fat tissue of goat after dipping bath

图 2 山羊脂肪组织 GC-ECD 分析色谱图

Fig. 2 Gas chromatograms of deltamethrin in fat tissue of goat

表 1 山羊组织中溴氰菊酯气相色谱-ECD 分析标准曲线回归方程与相关系数¹⁾

Tab. 1 Regression equations correlation coefficients of deltamethrin standard curves in goat tissues determined by GC-ECD

组织	批次	标准曲线回归方程 ²⁾	相关系数
tissues	batch	regression equations	correlation coefficients
肌肉 muscle	1	$C=0.00295H+0.067$	0.9997
	2	$C=0.00323H+0.050$	0.9996
	3	$C=0.00305H+0.094$	0.9988
	4	$C=0.00330H+0.018$	0.9993
肝脏 liver	1	$C=0.00326H-0.043$	0.9978
	2	$C=0.00303H+0.069$	0.9995
	3	$C=0.00296H+0.078$	0.9993
	4	$C=0.00306H+0.016$	0.9997
肾脏 kidney	1	$C=0.00309H+0.025$	0.9995
	2	$C=0.00298H+0.093$	0.9986
	3	$C=0.00335H-0.011$	0.9985
	4	$C=0.00334H-0.019$	0.9996
脂肪 fat	1	$C=0.00353H-0.032$	0.9989
	2	$C=0.00338H+0.027$	0.9997
	3	$C=0.00361H-0.040$	0.9978
	4	$C=0.00323H+0.045$	0.9997

1) 各组织各批次 n 均为 6, 线性范围均为 1~200 ng/g; 2)

H: 溴氰菊酯色谱峰高; C: 组织中溴氰菊酯质量分数

2.4 变异系数

表3.

不同组织中溴氰菊酯的批内、批间变异系数见

表2 山羊组织中不同质量分数溴氰菊酯的回收率

Tab. 2 Recovery of the various concentrations of deltamethrin added to goat tissues ($\bar{x} \pm SE$ $n=6$)

w(溴氰菊酯 deltamethrin)/ ($\text{ng}^\circ \text{g}^{-1}$)	回收率 recovery / %			
	肌肉 muscle	肝脏 liver	肾脏 kidney	脂肪 fat
1	100.14 \pm 1.95	107.34 \pm 2.03	96.03 \pm 2.64	89.60 \pm 1.44
50	101.52 \pm 2.63	103.78 \pm 2.52	100.41 \pm 1.54	104.96 \pm 2.35
200	95.93 \pm 2.75	97.55 \pm 3.42	96.94 \pm 4.15	89.02 \pm 1.71

表3 组织样品中不同质量分数溴氰菊酯的批内、批间变异系数

Tab. 3 Coefficient of variation of the various concentrations deltamethrin added to goat tissues

组织 tissues	w(溴氰菊酯 deltamethrin) / ($\text{ng}^\circ \text{g}^{-1}$)	批内变异系数 CV within run / %				批间变异系数 CV between run / %
		1	2	3	4	
肌肉 muscle	1	2.11	1.22	2.08	2.89	2.22
	50	3.43	4.23	1.38	1.24	2.05
	200	5.22	3.63	4.11	2.56	2.54
肝脏 liver	1	2.60	3.75	4.09	4.95	4.64
	50	2.20	6.41	3.61	4.00	1.97
	200	5.22	7.39	6.60	5.11	1.55
肾脏 kidney	1	6.54	6.46	4.25	2.51	5.37
	50	3.27	1.54	2.48	3.63	2.23
	200	5.13	3.63	8.53	0.95	2.20
脂肪 fat	1	2.37	4.26	3.52	2.81	4.52
	50	3.71	1.86	2.21	2.70	3.12
	200	3.34	6.35	2.77	2.62	2.77

3 讨论与结论

气相色谱(GC-ECD)检测方法对含有O、N、S、卤素原子等电负性大的有机化合物有特别高的响应值,最小检测浓度(质量分数)可达 0.01×10^{-9} ,而对饱和烃类化合物几乎无响应,拟除虫菊酯类杀虫剂分子结构中大多数含有卤素原子,能在ECD中产生较高响应。以往气相色谱多以填充柱为主,现在许多发达国家用毛细管柱代替填充柱已经逐步成为事实^[17]。毛细管柱从分辨率、灵敏度、分析速度以及色谱柱的相对惰性几个方面看,都比填充柱优越。总之,气相色谱检测法具有分离效率高,选择性、灵敏度高,分离速度快,直接进样样品量少,分析成本低的特点,适合于拟除虫菊酯类杀虫剂痕量分析。

GC-ECD检测法对拟除虫菊酯有很高灵敏度,但山羊组织成分复杂,组织中的大量蛋白、脂类成分容易干扰样品中拟除虫菊酯的检测^[7],因此药物的提取和净化是非常重要的步骤。目前常用的样品处理方法由提取和净化两方面组成,国外对拟除虫菊酯

类杀虫剂在动物组织中的研究报道很多,但方法差别很大,本试验探索了山羊组织中溴氰菊酯的提取与净化,用丙酮、乙腈、正己烷、正己烷-丙酮等溶剂提取^[11,14],肌肉、肝脏组织样品有较大的组织杂质干扰,而用乙醚-石油醚(1:1,体积比)为提取液提取使杂质明显减少;在净化方面,氟罗里硅土^[12,15]对山羊组织中杂质吸附较差,样品检测干扰较大,用硅胶^[16]净化样品较干净。试验证明采用提取液乙醚-石油醚(1:1,体积比)20 mL(2次)、固相萃取柱选用硅胶5 g装柱、洗脱液乙醚-石油醚(1:2,体积比)20 mL,这一组合组织中的杂质干扰最小,有利于组织样品中溴氰菊酯的检测。

本方法提取山羊组织中的溴氰菊酯GC-ECD检测,在线性范围(1~200 ng/g)内药物浓度与色谱峰高相关性好,回收率高(89.02%~107.34%),变异系数在允许范围。此方法可用于山羊组织样品中溴氰菊酯的提取和测定。

参考文献:

[1] 冯坚. 具有光学活性的拟除虫菊酯杀虫剂开发概况

- [J] . 农药, 2000, 39(2): 1—6.
- [2] 覃松, 阮尚全, 王碧. 菊酯类杀虫剂的研究和开发 [J] . 内江师范学院学报, 2001, 16(4): 13—18.
- [3] 石年, 李涛, 刘毓谷. 我国对拟除虫菊酯类农药神经毒理学研究概况 [J] . 卫生毒理学杂志, 1999, 23(4): 278—280.
- [4] 牛玉杰, 石年, 严红, 等. 拟除虫菊酯对大鼠神经细胞凋亡的诱发作用 [J] . 卫生毒理学杂志, 1998, 12(4): 210—214.
- [5] 梁丽燕, 陈润涛, 唐小江, 等. 溴氰菊酯毒性和致突变性的研究 [J] . 中国职业医学, 2000, 27(2): 31—33.
- [6] LEES GEORGE. Effect of pyrethroid molecules on rat nerves *in vitro*; Potential to reverse temperature-sensitive conduction block of demyelinated peripheral axons [J] . Brit J Pharmacol, 1998, 123(3): 487—496.
- [7] ARGAUER R A, ELLER K I, PFEIL R M, et al. Determining ten synthetic pyrethroids in lettuce and ground meat by using ion-trap mass spectrometry and electron-capture gas chromatography [J] . J Agric Food Chem, 1997, 45(1): 180—184.
- [8] PAVAN F A, DALLAGO. Determination of deltamethrin in cattle dipping baths by high-performance liquid chromatography [J] . J Agric Food Chem, 1999, 47: 174—176.
- [9] COLUME A, CARDENAS S. Multiresidue screening of pesticides in fruits using an automatic solid-phase extraction system [J] . J Agric Food Chem, 2001, 49: 1 109—1 116.
- [10] 庄无忌. 各国食品和饲料中农药兽药残留限量大全 [M] . 北京: 中国对外经济贸易出版社, 1995. 745—961.
- [11] DANIELSON T J, GOLSTEYN L R, ELDER J L. Pharmacokinetics of intravenous fenvalerate in cattle treated topically with a low dose of piperonyl butoxide [J] . J Pestic Sci, 1997, 49: 313—318.
- [12] PANG G F, ZHONG Y. Multiresidue gas-chromatographic method for determining synthetic pyrethroid pesticides in agricultural products [J] . J AOAC International, 1999, 82: 186—196.
- [13] BOYER A C, LEE P W, POTTER J C. Characterization of fenvalerate residues in dairy cattle and poultry [J] . J Agric Food Chem, 1992, 40: 914—918.
- [14] OEHLER D D. Gas-liquid chromatographic determination of permethrin in bovine tissues [J] . J Assoc Off Anal Chem, 1979, 62(6): 1 309—1 311.
- [15] MARI-MESTRES G N, COOPER J M, MESTRES J M, et al. Effects of a supplemented deltamethrin and piperonyl butoxide diet on levels of residues in products of animal origin. 2. feeding study in poultry [J] . J Agric Food Chem, 1995, 43(4): 1 039—1 043.
- [16] SALEH M A, IBRAHIM N A, SOLIMAN N Z, et al. Persistence and distribution of cypermethrin, deltamethrin, and fenvalerate in laying chickens [J] . J Agric Food Chem, 1986, 34(5): 895—898.
- [17] 冯秀琼. 农药残留分析技术进展概况 [J] . 农药, 1998, 37(2): 8—10.

【责任编辑 柴焰】

·简讯·

华南农业大学“禽流感灭活疫苗的研制与推广”项目 荣获 2004 年度广东省科学技术奖一等奖

华南农业大学辛朝安教授及其团队经过近 20 年的研究, 分离到 H5N1、H9N2、H5N2、H5N4、H3N2、H3N8、H7N3 等亚型的禽流感病毒, 并进行病毒的纯化、鉴定及生物学特性测定, 其中 H7N3、H3N8 等毒株是国内首次分离到; 针对威胁我国养禽业最严重的 H9N2、H5N1 亚型 AIV 筛选出免疫原性强、对流行毒株有 100% 保护率的疫苗种毒; 对种毒的最佳培养条件、收获条件、灭活方法与疫苗的乳化工艺进行了优化; 研制出安全性好、实验室试验免疫保护率达 100%、免疫保护期达 6 个月的禽流感 H5N1、H9N2 单价疫苗及 H5N1+H9N2 二联疫苗, 并于 2003 年获得了国家二类新兽药证书; 对疫苗的产业化生产工艺进行优化, 建设了 GMP 生产车间、组织疫苗的生产并在全国推广应用; 制定了禽流感灭活疫苗的质量标准、生产规程与使用规程。

禽流感灭活油乳剂疫苗的推广和应用, 对控制禽流感的发生与流行发挥了重大作用。对保障我国养禽业的健康发展, 维护广大养殖者的经济利益; 对维持市场的繁荣与稳定, 保障城乡人民的生活水平, 乃至人民的身体健康与社会稳定都发挥了十分重要的作用, 具有显著的社会效益。

本项目荣获 2004 年广东省科学技术奖科技进步类一等奖。

华南农业大学科技处 全锋供稿