

【化学测定方法】

农药中毒快速分类确证检测方法的研究

卫海燕, 邵华

(山东省职业卫生与职业病防治研究院, 济南 250062)

[摘要] 目的: 建立农药中毒现场快速分类检测方法。方法: 利用微色谱法检测技术, 检测分类未知农药类型。结果: 用于农药中毒分析, 可以快速得到可靠结果。结论: 本法操作简便、高效、重现性好, 且试剂用量少, 是批量农药样品定性检测和突发农药中毒事件现场快速筛选的一种新方法。

[关键词] 农药中毒; 微色谱柱检测仪; 现场快速筛选

[中图分类号] R595.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-8685(2011)02-0316-03

A new method of micro- chromatography to rapid detect in pesticide poisoning analysis

WEI Hai-yan, SHAO Hua

(Shandong Institution of Prevention and Occupational Health and Occupational Disease, Jinan 250062, China)

[Abstract] **Objective** To establish a new approach for fast detection of unknown toxic matters in pesticide poisoning. **Methods** Based on the principle of thin-layer chromatography, fixing the sorbent in the thin heating wire, using micro-column detector to rapidly detect pesticides qualitatively and quantitatively. **Results** The method can make qualitative and quantitative analysis of unknown pesticides, and the minimum detection limit is 10 μg. **Conclusion** The method is simple, efficient, reproducible and reagent consumption, and it can be used to detect bulk carbamate pesticides samples, and it is a new method of rapid pesticide poisoning filtering.

[Key words] Pesticide poisoning; Micro-column; Rapidly filtering

农药中毒是中毒和意外死亡的主要病因之一, 是目前我国突发公共卫生多发事件之一, 其中以急性生活性中毒为多, 由于农药种类繁多, 各类农药的理化性质和毒性亦不相同, 近年来更风行将不同类别的农药混配使用, 使农药中毒的临床表现更为复杂, 给农药中毒的准确诊断和正确治疗造成很大的障碍。中毒事件发生后, 毒物的确认是第一关键的环节, 确认了毒物, 才能正确的使用解毒剂, 挽救患者的生命, 并及时采取措施控制事件的进一步发生和扩散。因此在短时间内快速筛选确证农药类型显得尤为重要, 它为正确实施急救、现场取证提供重要资料。

目前对毒物分析的测定方法很多, 有气相色谱法^[1]、分光光度法等, 但由于其存在着设备昂贵、样品前处理复杂, 且要求熟练的专业技术人员, 分析费时等问题, 不适合农药中毒的现场快速筛选。本实验是在薄层色谱原理和毛细管效应的基础上, 建立一种新的检测仪—微色谱柱检测仪, 以其超强的分离和定性能力, 快速准确的分类几类农药, 非常适用于现场的快速筛选。

按化学结构将农药分为四大类: 有机磷类, 氨基甲酸酯类, 拟除虫菊酯类, 有机氯类, 有机氯类自 1983 年禁产之后, 目

前使用很少。故本实验主要以前三类为主, 选择国内常用, 易引起中毒的农药作为检测对象, 研究它们的快速分类方法, 构建农药中毒快速检测平台。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

20 cm × 0.3 mm 细加热丝、固定器、点样用毛细管、小型喷雾器、吸管。

农药标准: 对硫磷、甲拌磷、氧化乐果、甲基对硫磷、毒死蜱、甲胺磷、速灭威、仲丁威、灭多威、甲萘威、异丙威、克百威、溴氰菊酯、氯氰菊酯、杀灭菊酯、氟氯菊酯标准样, 由农业部环境检测总站提供; 使用前将各标准液稀释至使用浓度; 硅胶 GF254; 丙酮、正己烷、(正己烷: 丙酮 = 4: 1); 无水乙醇; 氯锌碘; 碘化钾; 碘均为分析纯。2% 碘化硫代乙酰胆碱溶液; pH 7.7 磷酸盐缓冲液; 0.04% 2,6-二氯靛酚水溶液; 小麦粉; 氯解磷定。

1.2 实验原理

1.2.1 微色谱法的原理 利用毛细管效应, 基于薄层色谱的原理, 将硅胶吸附于细加热丝上, 液体在硅胶上扩散的原理, 制备微色谱柱检测仪, 见图 1。

1.2.2 酶抑制剂法 在 pH 7-8 的溶液中, 植物脂酶可水解碘化硫代乙酰胆碱, 生成硫代胆碱, 硫代胆碱具有还原性, 能使蓝色的 2,6-二氯靛酚褪色。当样品中有一定量的有机磷

[基金项目] 山东省济南市科技计划专项 (200906053)

[作者简介] 卫海燕 (1979-), 女, 硕士, 主要从事职业卫生检测评价研究。

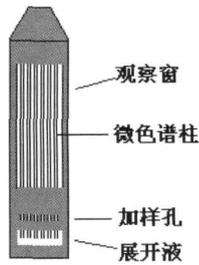


图 1 微色谱柱快速检测仪示意图

或氨基甲酸酯类农药存在时,植物脂酶活性受抑制,不能使 2,6-二氯靛酚褪色,从而检测两类农药的存在。而胆碱酯酶复活剂(氯解磷定)能使被有机磷农药抑制的胆碱酯酶恢复活性,而对氨基甲酸酯类农药引起的胆碱酯酶抑制无复活作用。

1.2.3 GIBBS法^[2,3] 在碱性环境中,氨基甲酸酯类农药与 2,6-二氯靛氧亚胺反应呈蓝绿色反应。

1.2.4 氯锌碘反应^[2,3] 在一定条件下,氯锌碘与拟除虫菊酯类农药反应呈橙红色反应。

1.3 试剂配制

植物脂酶液:称取小麦粉 10 g 加入 40 ml 蒸馏水,先振荡 30 min,然后在 4℃,3000 r/min 条件下离心 10 min,上清液过滤即得植物脂酶液。

pH 7.71 磷酸盐缓冲液: A 液: 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液:称取磷酸氢二钠 2.3876 g 加水定容至 100 ml; B 液: 1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液:称取磷酸二氢钾 0.9078 g 加水定容至 100 ml; 取 A 液 90 ml, B 液 10 ml 混合,即得 pH 7.71 磷酸盐缓冲液。

氯锌碘试剂: 15 g 氯锌碘溶于 10 ml 水中, 2 g 碘化钾与 0.5 g 碘共溶于 5 ml 水中,然后两液相混,避光保存。

1.4 微色谱柱检测仪的制备

将 20 cm × 0.3 mm 细加热丝用固定器固定,分别在 0.5 cm、2 cm 处做标记。同时将硅胶 GF254 用蒸馏水按 1:3 比例调成糊状均匀铺于 20 cm × 0.3 mm 细加热丝上,阴干。

1.5 试验方法

第一根细加热丝:在 2 cm 标记处用毛细管将一种有机磷类农药标准液点在细加热丝上,用吸管吸取一定量的正己烷 + 丙酮 (4:1) 展开剂在 0.5 cm 标记处点液,同时保持吸管不离开细加热丝,以保证细加热丝上展开剂的组成不变。用小型喷雾器将植物脂酶液均匀地喷于细加热丝上,放置 3 min 后再喷 2% 碘化硫代乙酰胆碱溶液,放置 2 min 喷以 0.04% 2,6-二氯靛酚水溶液,若细加热丝上呈蓝色说明有有机磷类农药。再喷以氯解磷定溶液,若蓝色褪去说明有有机磷农药。

第二根细加热丝:在 2 cm 标记处用毛细管将一种氨基甲酸酯类农药标准液点在细加热丝上,用吸管吸取一定量的正己烷 + 丙酮 (4:1) 展开剂在 0.5 cm 标记处点液,同时保持吸管不离开细加热丝,以保证细加热丝上展开剂的组成不变。用小型喷雾器将植物脂酶液均匀地喷于细加热丝上,放置 3 min 后再喷 2% 碘化硫代乙酰胆碱溶液,放置 2 min 喷以 0.04% 2,6-二氯靛酚水溶液,若细加热丝上呈蓝色说明有氨基甲酸酯类农药。再喷以氯解磷定溶液,若蓝色不褪去说明有氨基甲酸酯类农药。

第三根细加热丝:在 2 cm 标记处用毛细管将一种氨基甲酸酯类农药标准液点在细加热丝上,用吸管吸取一定量的正己烷 + 丙酮 (4:1) 展开剂在 0.5 cm 标记处点液,同时保持吸管不离开细加热丝,以保证细加热丝上展开剂的组成不变。用小型喷雾器将 5 g/L 2,6-二氯靛氧亚胺丙酮溶液均匀地喷于细加热丝上,然后再喷 50 g/L 氢氧化钠溶液。细加热丝上有氨基甲酸酯类农药处都会呈蓝绿色变化。

第四根细加热丝:在 2 cm 标记处用毛细管将一种拟除虫菊酯类农药标准液点在细加热丝上,用吸管吸取一定量的正己烷 + 丙酮 (4:1) 展开剂在 0.5 cm 标记处点液,同时保持吸管不离开细加热丝,以保证细加热丝上展开剂的组成不变。用小型喷雾器将氯锌碘试剂喷于细加热丝上,细加热丝上有拟除虫菊酯类农药处都会呈橙红色变化。

2 结果与讨论

2.1 微色谱柱检测体系

微色谱柱法是以薄层色谱法的原理为基础,通过多次试验确定本实验选择硅胶做吸附剂,展开剂为正己烷 + 丙酮 (4:1) 效果最好。

2.2 显色体系

多数显色反应在室温下即可很快进行,但有些显色反应需在较高温度下才能较快完成。时间对显色反应的影响需从以下两方面综合考虑。一方面要保证足够的时间使显色反应进行完全,对反应速率较小的显色反应,需显色时间长些。另一方面测定工作必须在有色配合物的稳定时间内完成^[4]。本实验在 16℃ 时,30 s 即可完成显色,12 h 颜色无变化,较为稳定。

2.3 最低检出限

由于本实验以定性为主,主要以化学显色为确证依据,以快速分类为目的,按本方法有机磷类农药的最低检出限为 10 μg~100 μg,氨基甲酸酯类农药的最低检出限为 10 μg,拟除虫菊酯类农药的最低检出限为 50 μg。

2.4 方法的准确度、精密度的评价

本研究通过加标回收试验来评价方法的准确度和精确度。选择已知不含有待测组分(取三份平行样品按本方法测定)的水样作为代表性样品,进行加标回收试验,结果见表 1 表 2 表 3。数据显示:添加水平为 0.05 mg/ml 的有机磷农药,阳性率为 66.7%;添加水平为 0.05 mg/ml 的氨基甲酸酯类农药阳性率可达 100%;添加水平为 0.05 mg/ml 的拟除虫菊酯类农药阳性率为 75%;添加水平为 0.50 mg/ml 的有机磷农药、氨基甲酸酯类农药、拟除虫菊酯类农药阳性率均达到 100%。

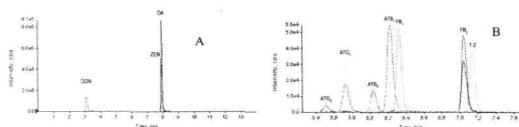
表 1 水样中有机磷农药的加标回收试验

名称	加标 0.05 mg/ml	加标 0.50 mg/ml
对硫磷	+	+
甲拌磷	+	+
氧化乐果	-	+
甲基对硫磷	+	+
毒死蜱	+	+
甲胺磷	-	+

(下转第 320 页)

述 7 种真菌毒素, 回收率实验结果均良好。表明本文所述方法适用于上述样品中多成分真菌毒素残留的检测, 可以用于中药材中真菌毒素残留的筛查。

2.7 色谱图



混合标准品溶液的质谱图 (A: 负离子模式, B: 正离子模式)

3 讨论

3.1 分析方法的选择

目前食品标准中主要针对粮谷类样品进行真菌毒素的检验, 收载的检验方法有薄层色谱法 (TLC)、酶联吸附免疫法 (ELISA) 和高效液相色谱法 (HPLC)^[5]。TLC 法灵敏度、特异性较差, 提取过程中需要大量有机溶剂, 易污染环境、对人体有较大危害。ELISA 法测定结果受试剂盒差异、实验温度、仪器灵敏度等条件影响较大, 重复性差, 假阳性率高。HPLC 法多为采用免疫亲和柱针对单一真菌毒素进行的单成分检验, 专属性较强, 假阳性率较低。

与食品相比, 中药材基质成分比较复杂, 在日常检验过程中部分中药材不可避免地会出现假阳性情况, 选用液相色谱-串联质谱法进行检测, 不仅可以彻底排除假阳性的情况, 同时进行多成分的检测不仅大大降低了检测成本, 而且节省了检测时间。

3.2 检测成分的选择

本实验对黄曲霉毒素、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素、伏马毒素、赭曲霉毒素及展青霉素均进行了研究, 结果发

现伏马毒素、赭曲霉毒素及展青霉素的回收率偏低, 不适合采用本文所述方法进行检测, 需要进行进一步的研究。

3.3 分析条件的优化

通过对不同填料的色谱柱进行比较, 结果采用 BEH C18 柱所得色谱峰保留时间适中, 峰形较好。

另外, 实验中同时采用正负离子模式进行数据采集, 结果发现黄曲霉毒素、T-2 毒素采用正离子模式, 呕吐毒素和玉米赤霉烯酮采用负离子模式所得色谱峰响应较好。

3.4 样品处理方法的选择

分别采用 (1) 在农药残留分析领域已有广泛应用的 QuEChERS^[6,7] 方法, (2) C18 小柱净化法, (3) 本文所述方法进行实验, 结果方法 (1) 所得回收率偏低, 方法 (2)、(3) 结果较为满意, 相比较而言, 方法 (3) 操作更为简便, 且分析时间较短。通过对方法 (3) 中的提取溶剂, 提取方式, 净化过程等的优化, 最终建立了本文所述的样品处理方法, 该方法适合于中药材中真菌毒素多成分残留的筛查检验。

[参考文献]

- [1] 张艺兵. 农产品中真菌毒素的检测分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006
- [2] GB2715-2005 食品中真菌毒素限量 [S].
- [3] GB2761-2005 食品中真菌毒素限量 [S].
- [4] 中华人民共和国药典 2010 年版 [S].
- [5] 胡娜, 徐玲. 真菌毒素检测方法研究进展 [J]. 食品科学, 2007, 28 (8): 563
- [6] 洪萍, 徐陆妹, 楼冰冰, 等. QuEChERS 方法及其在农药残留分析中的应用进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18 (4): 756
- [7] S Lehotay. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues [J]. Pesticide Protocols, 2006, 19 (III): 239

(收稿日期: 2010-11-23)

(上接第 317 页)

表 2 水样中氨基甲酸酯类农药的加标回收试验

名称	加标 0.05 mg/ml	加标 0.50 mg/ml
速灭威	+	+
仲丁威	+	+
灭多威	+	+
甲萘威	+	+
异丙威	+	+
克百威	+	+

表 3 水样中拟除虫菊酯类农药的加标回收试验

名称	加标 0.05 mg/ml	加标 0.50 mg/ml
溴氰菊酯	+	+
氯氰菊酯	+	+
杀灭菊酯	+	+
氟氯菊酯	±	+

3 结论

本实验是在薄层色谱原理基础上, 通过将吸着剂固定于

细加热丝上, 利用毛细管效应以达到快速分离筛选的目的。此法可以对常见的三类农药有机磷农药、氨基甲酸酯类农药、拟除虫菊酯类农药作出快速的分类定性分析, 且最低检出量可达到 10 μg 而且操作灵敏度高、准确性好、快速、省时, 是批量样品定性检测和突发农药中毒事件现场快速筛选的一种新方法。

[参考文献]

- [1] 徐陆妹, 楼冰冰. 蔬菜中有机磷与氨基甲酸酯类农药的检测方法研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17 (5): 852-853
- [2] 宁工红, 宁琳琪. 常见毒物急性中毒的简易检验与急救 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000
- [3] 李焕德, 许树梧. 急性中毒毒物检测与诊疗 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1999
- [4] 张镭, 韩国才. 薄层色谱-光度法测定亚胺硫磷中 O,O-二甲基-S-(邻苯二甲酰亚胺基甲基)二硫代磷酸酯 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19 (7): 1522-1523

(收稿日期: 2010-11-26)