

· 研究论文 ·

顶空气相色谱法测定小麦中熏蒸剂氰及其代谢物氰化氢的残留量

李保同^{*1,2,3}, 曾鑫年², 任永林³, J M DESMARCHELIER³

(1. 江西农业大学农学院, 南昌 330045; 2. 华南农业大学农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642; 3. CSIRO 昆虫研究所, 堪培拉 ACT 2601, 澳大利亚)

摘要: 采用溶剂顶空毛细管气相色谱-氮磷检测器(NPD)建立了熏蒸剂氰(C_2N_2)及其代谢物氰化氢(HCN)在小麦中残留的分析方法。在气相与液相体积比(β)为4时,采用GS-Q大孔毛细管色谱柱和进样60 μ L顶空气体,可提高 C_2N_2 和HCN的分离效果和灵敏度。以质量分数为50%的磷酸作溶剂,在25 $^{\circ}$ C下平衡4 h, C_2N_2 和HCN在液相与气相间的分配系数(k)分别为0.44和48.82。平衡温度和基质对 C_2N_2 和HCN挥发的影响存在差异,而盐化效应的影响较小。用50%的磷酸提取熏蒸过的小麦72 h,释放至顶空的 C_2N_2 和HCN的量最大,用添加标准品的小麦作标准可评价熏蒸小麦中 C_2N_2 和HCN的残留量。 C_2N_2 和HCN标准曲线的线性范围分别在质量浓度为1.0~500 μ g/L和1.2~500 μ g/L之间,相关系数(R^2)分别为0.999 7和0.999 8,相对标准偏差分别为4.6%和7.4%,检出限(LOD)分别为0.032和0.145 mg/kg,定量限(LOQ)分别为0.107和0.483 mg/kg。方法操作简单、灵敏度高、干扰少,适用于小麦中 C_2N_2 和HCN残留量的检测。

关键词: 氰(C_2N_2); 氰化氢(HCN); 熏蒸剂; 顶空分析; 气相色谱

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2011.06.10

中图分类号: TS210.753

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2011)06-0613-08

Determination of fumigant residues of cyanogen and its metabolite hydrogen cyanide in wheat by headspace gas chromatography

LI Bao-tong^{*1,2,3}, ZENG Xin-nian², REN Yong-lin³, J M DESMARCHELIER³

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology of the Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3. CSIRO Entomology, GPO Box 1700, Canberra ACT 2601, Australia)

Abstract: A method for the determination of fumigant residues of cyanogen (C_2N_2) and hydrogen cyanide (HCN) in wheat using headspace (HS) capillary gas chromatography (HS-GC) with nitrogen-phosphorus detection (NPD) was developed. The separation efficiency and sensitivity for C_2N_2 and HCN were improved by using a GS-Q megabore capillary column and by injection of 60 μ L of HS gas with a splitting ratio of 4. Optimum HS conditions were found to be incubation at 25 $^{\circ}$ C for 4 hours in

收稿日期: 2011-08-13; 修回日期: 2011-10-11.

作者简介: * 李保同(1966-), 男, 江西崇仁人, 通讯作者(Author for correspondence), 博士, 教授, 主要从事农药残留分析研究, 电话: 0791-3828047, E-mail: libt66@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960081); 澳大利亚联邦科学与工业组织(CSIRO)资助项目.

the presence of 50% phosphoric acid as an acidifying reagent. The distribution coefficient (k) was 0.44 and 48.82 for C_2N_2 and HCN, respectively. C_2N_2 showed a different vaporization behaviour to HCN with respect to temperature and matrix effect. The salting-out effect was relatively small for C_2N_2 and HCN. Optimum release into the headspace of C_2N_2 and HCN in aged wheat after solvent extraction with 50% phosphoric acid for 72 hour were obtained. C_2N_2 and HCN residues in aged wheat were estimated by using fortified wheat as standards. The calibration graph was linear over 1.2 – 500 $\mu\text{g/L}$ of C_2N_2 and 1.0 – 500 $\mu\text{g/L}$ of HCN with correlation coefficients (R^2) of 0.999 7 and 0.999 8, respectively. The limits of detection (LOD) of C_2N_2 and HCN were 0.032 mg/kg (RSD 4.6%) and 0.145 mg/kg (RSD 7.4%), the limits of quantitation (LOQ) of C_2N_2 and HCN were 0.107 mg/kg and 0.483 mg/kg, respectively. This method was also proved to be convenient in operation, high in sensitivity and effective in purification, and applicable for determination of C_2N_2 and HCN residues in aged wheat.

Key words: cyanogen (C_2N_2); hydrogen cyanide (HCN); fumigant; headspace analysis; gas chromatography

熏蒸消毒是防治储粮害虫最有效的手段。过去常用的熏蒸剂溴甲烷由于被确定为 I 级臭氧耗竭物质,根据蒙特利尔议定书,各方已于 2005 年停止该药剂的生产和使用^[1];另一种熏蒸剂磷化氢,由于长期在高温和密闭不严等条件下使用,在许多国家已导致昆虫产生了抗药性^[2-4]。氰(C_2N_2)相对分子质量为 52,沸点为 $-21.17\text{ }^\circ\text{C}$,在标准状况下是无色、易燃、带苦杏仁气味的有毒气体^[5],其物理常数介于溴甲烷和硫酰氟之间,因此,澳大利亚联邦科学与工业组织(CSIRO)和堪培拉大学已联合将其开发为新熏蒸剂^[6]。Hooper 等^[7]已证明 C_2N_2 对谷蠹 *Rhyzopertha dominica*、谷象 *Sitophilus granarius*、米象 *Sitophilus oryzae*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、杂拟谷盗 *Tribolium confusum*、粉斑螟 *Ephestia cautella* 等多种害虫有良好的防治效果,具有替代溴甲烷和磷化氢防治储粮害虫的潜力。粮食中残留的熏蒸剂对人体有一定的毒害作用,需对其含量进行严格控制。目前,有关 C_2N_2 在粮食中的残留分析方法尚未见报道。本文以溶剂顶空气相色谱法测定了小麦中 C_2N_2 及其代谢物氰化氢(HCN)的残留量,精密度好,操作简单。

1 材料与方 法

1.1 仪器装置

MT-150 气相色谱仪(带 TCD 和附 40-001 型 GOW-MAC 气体密度电平,参照气体四氟乙烷 > 99.9%,GOW-MAC 设备公司),DELL 计算机数据处理机;GDX 102 不锈钢柱(1 m × 5 mm,Parapak Q 100/200 mesh, Alltech Associates, Cat. No. 2707);

汽化室温度及柱温 $105\text{ }^\circ\text{C}$;载气(氮气)流速 150 mL/min。SRI 310C 气相色谱仪(带 NPD 检测器,J and W Scientific, AT. No. 115: 3432, 10 m × 0.53 mm (*i. d.*);GS-Q 型毛细管柱);汽化室、检测器温度 $150\text{ }^\circ\text{C}$,柱温 $98\text{ }^\circ\text{C}$;色谱柱氮气流速 120 mL/min,氢气流速 80 mL/min;3390A Integrator 数据处理仪,记录仪走速 10 mm/min。200、500 μL 和 5、10、50 mL 气密性注射器(SGE, Melbourne, 澳大利亚),100、1 000 mL 三角瓶(磨口塞顶部带有聚乙烯橡胶塞),250 mL 铃形管(盖顶部带有供取样的聚乙烯橡胶垫),100 mL 广口圆瓶及 250 mL 平底圆瓶(均带有 Tuf-Bond 圆盘式隔垫的塑料盖)。

1.2 试剂及供试材料

氰化钾(KCN):分析纯,澳大利亚 Sigma Aldrich 公司产品;硫酸铜(CuSO_4)、98% 硫酸(H_2SO_4)、98% 磷盐(H_3PO_4)和 36.46% 盐酸(HCl):分析纯,均为澳大利亚 Unplex 公司产品。其余试剂均为分析纯。供试小麦(含水量 11.8%),由澳大利亚新南威尔士农业生产者协会提供。

1.3 C_2N_2 和 HCN 气体的制备与分析

1.3.1 C_2N_2 在 1 000 mL 烧杯中加入去离子水 500 mL 和 CuSO_4 晶体 50 g,加热至 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 。将 250 mL 铃形管插入烧杯内,旋紧顶部带隔垫的聚乙烯塑料盖,用 60 mL 注射器从顶盖隔垫处插入铃形管内,慢慢抽除顶空空气。用注射器将 8 mL 饱和 KCN 溶液从盖部隔垫处注入铃形管内。待顶空气体降至室温时(大约 30 min),用气密性注射器取顶空气体 300 μL 注入带气体密度电平的色谱内,测

定气体 C_2N_2 的纯度。每处理进样 3 次,以平均值计算结果。得 C_2N_2 的纯度在 93% 左右,主要杂质为空气(氮气、氧气和二氧化碳)。

1.3.2 HCN 在 2 000 mL 的密闭聚乙烯塑料袋内加入 KCN 2.0 g,旋紧顶部带隔垫的聚乙烯塑料盖,用 60 mL 注射器从盖部隔垫处插入塑料袋内,慢慢抽除顶空空气,用注射器将 2 mL 20% 的 H_2SO_4 溶液从盖部隔垫处注入密闭袋内。待顶空气体降至室温时(大约 10 min),按 1.2.1 节方法测定气体 HCN 的纯度。得 HCN 的纯度在 99% 左右,主要杂质为空气(氮气、氧气和二氧化碳)。

1.4 实验方法

1.4.1 C_2N_2 或 HCN 标准曲线的绘制 用 500 μ L 气密性注射器取一定量标定气体 C_2N_2 或 HCN,注入装有 3~5 粒玻璃珠(直径 3 mm 左右)的 250 mL 密闭圆瓶内,分别配制成 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、5 mg/L 的 C_2N_2 和 HCN 标准气体,备用。用 100 μ L 进样器取标准气体 C_2N_2 或 HCN 60 μ L,按浓度由低到高顺序注入色谱仪内,测定各处理的峰面积。每个浓度进样 3 次,取其平均值(下同),用 Excel 软件绘制标准曲线。

1.4.2 熏蒸小麦的制备 在 1 000 mL 三角瓶(实际体积 1 333.5 ml 左右)内,加入约 950 g 小麦(装载度约 85%),盖紧磨口塞后,用 50 mL 气密性注射器从磨口塞中央隔垫处加入标样 C_2N_2 或 HCN 66.7 mg(即质量浓度为 50 mg/L),上下翻转三角瓶 3~4 次,置于室温(25 \pm 2) $^{\circ}C$ 的通风橱内熏蒸 48 h 后,将小麦倒入 35 cm \times 50 cm 的瓷盘内,刮平并通风 16 d,备用。

1.4.3 提取溶剂的优化 在 250 mL 平底圆瓶内,分别加入 50 mL 酸溶液(质量分数均为 10% 的 H_3PO_4 、 H_2SO_4 和 HCl)或盐 + H_3PO_4 溶液,拧紧中央带隔垫的螺旋盖,用进样器加入标样 C_2N_2 或 HCN 0.10 mg。将试瓶置于室温(25 \pm 2) $^{\circ}C$ 的通风橱内静置 72 h,定时测定溶剂顶空 C_2N_2 或 HCN 的浓度。

1.4.4 提取温度的优化 在 250 mL 平底圆瓶内,加入 50 mL 50% 的 H_3PO_4 溶液,拧紧中央带隔垫的螺旋盖,用进样器加入标样 C_2N_2 或 HCN 0.10 mg。将试瓶置于加热箱内,分别在 20、25、30、40、50、60 和 70 $^{\circ}C$ 条件下平衡 30 min,定时测定溶剂顶空 C_2N_2 或 HCN 的浓度。

1.4.5 气相与液相体积比的优化 在 250 mL 平底圆瓶内,分别加入 50% 的 H_3PO_4 溶液 10、20、50、

100 和 150 mL [β 值(V_G/V_L) 分别为 24、11.5、4、1.5 和 0.667],拧紧螺旋盖,用进样器加入标样 C_2N_2 或 HCN 0.10 mg,于通风橱内室温(25 \pm 2) $^{\circ}C$ 下平衡 30 min,测定各处理顶空 C_2N_2 或 HCN 的浓度和分配系数 $k(C_L/C_G)$ 值。

1.4.6 C_2N_2 与 HCN 在添加标样样品中的稳定性 称取空白小麦 20 g 于 100 mL 三角瓶内,分别加入 10%、30% 和 50% 的 H_3PO_4 溶液 20 mL,盖紧磨口塞后,加入标样 C_2N_2 或 HCN 0.10 mg,于通风橱内室温(25 \pm 2) $^{\circ}C$ 下平衡 96 h,定时测定溶剂顶空 C_2N_2 或 HCN 的浓度。

1.4.7 熏蒸样品提取时间的优化 称取用 C_2N_2 或 HCN 熏蒸过的小麦 20 g 于 100 mL 三角瓶内,加入 50% 的 H_3PO_4 溶液 20 mL,盖紧磨口塞,并轻轻摇动试瓶,使溶液充分浸渍谷物后,于通风橱内室温(25 \pm 2) $^{\circ}C$ 下平衡 96 h,定时测定溶剂顶空 C_2N_2 或 HCN 的浓度。以 1.4.6 节中用 50% 的 H_3PO_4 溶液提取的添加标样样品处理为标准,计算熏蒸样品中 C_2N_2 或 HCN 的残留量(R)。即:

$$R(\text{mg/kg}) = (m_{\text{spike}} \times S_{\text{aged}}) / (M_{\text{spike}} \times S_{\text{spike}})$$

式中: m_{spike} —添加标样样本中加入的 C_2N_2 或 HCN 质量, μ g; S_{aged} —熏蒸样本顶空 HCN 或 C_2N_2 的峰面积; S_{spike} —添加标样样本顶空 HCN 或 C_2N_2 的峰面积; M_{spike} —添加标样样品与熏蒸样品质量, g。

1.4.8 方法的检出限 称取空白小麦 20 g,置于 100 mL 三角瓶内,加入 50% 的 H_3PO_4 溶液 20 mL,盖紧磨口塞后,用进样器加入标样 C_2N_2 或 HCN 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 mg(即添加水平分别为 0.5、1、2.5、5、10 mg/kg),于通风橱内室温(25 \pm 2) $^{\circ}C$ 下平衡 72 h,测定溶剂顶空 C_2N_2 或 HCN 的浓度。

1.4.9 实际样品测定 分别称取用 C_2N_2 熏蒸后通风 0、7 和 16 d 的小麦 20 g,按 1.4.7 节中的条件和方法,试瓶在通风橱内平衡 72 h 后测定溶剂顶空 C_2N_2 或 HCN 的浓度。平行测定 3 次,计算样品中 C_2N_2 及其代谢物 HCN 的平均残留量。

2 结果与分析

2.1 方法的灵敏度及线性范围

在本研究条件下, C_2N_2 和 HCN 在 GS-Q 毛细管柱下能完全分离,保留时间分别约为 0.43 min 和 0.95 min(见图 1),仪器的最小检出量均为 6.0×10^{-4} μ g。 C_2N_2 和 HCN 在 0.01~5 mg/L 质量浓度

范围内的标准曲线方程分别为 $Y = 576\ 623x + 1\ 535.4$ 和 $Y = 777\ 829x + 5\ 173.1$, 相关系数 (R^2) 分别为 0.999 7 和 0.999 8。表明在该范围内, 仪器响应值与 C_2N_2 和 HCN 的质量浓度呈良好线性关系。

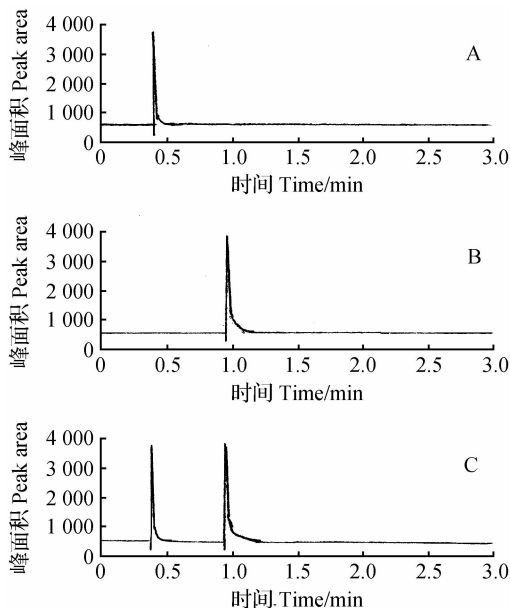


图 1 C_2N_2 和 HCN 的气相色谱图

Fig. 1 Gas Chromatogram of C_2N_2 and HCN

A. 0.1 mg/L C_2N_2 标准工作气体 (0.43 min); B. 0.1 mg/L HCN 标准工作气体 (0.95 min); C. 0.1 mg/L C_2N_2 和 0.1 mg/L HCN 混合气体。

A. Standard chromatogram of C_2N_2 at 0.1 mg/L (0.43 min);
B. Standard chromatogram of HCN at 0.1 mg/L (0.95 min);
C. Standard chromatogram of C_2N_2 at 0.1 mg/L (0.43 min) and HCN at 0.1 mg/L (0.95 min)。

2.2 提取溶剂的优化

2.2.1 酸溶液 C_2N_2 和 HCN 在 10% H_3PO_4 、10% H_2SO_4 和 10% HCl 溶液顶空的质量较稳定。从顶空分别加入 C_2N_2 和 HCN 后暴露 4 h, C_2N_2 和 HCN 在顶空与酸溶液间建立了平衡, 其主要部分被分配在溶液中。其中, C_2N_2 在 10% H_3PO_4 、10% H_2SO_4 和 10% HCl 溶液与顶空的分配系数 $k(C_L/C_G)$ 分别为 0.53、7.06 和 10.15, 而 HCN 在 3 种酸溶液与顶空的分配系数 k 分别为 74.83、76.98 和 80.54。由于 H_2SO_4 和 HCl 为发烟酸, 而 C_2N_2 和 HCN 在 H_3PO_4 溶液与顶空的 k 值又较小, 所以 H_3PO_4 是提取 HCN 和 C_2N_2 的理想溶剂。

2.2.2 H_3PO_4 浓度 C_2N_2 和 HCN 在 0.01%、0.1%、1%、10%、30% 和 50% H_3PO_4 溶液顶空的分配及稳定性实验结果表明, C_2N_2 和 HCN 在 H_3PO_4 溶液顶空的分配与 H_3PO_4 浓度成正相关。 C_2N_2 在

H_3PO_4 溶液顶空较稳定, 暴露 4 h 在 0.01% ~ 50% H_3PO_4 溶液与顶空的 k 值为 1.05 ~ 0.44。HCN 易溶于 H_3PO_4 溶液, 暴露 4 h 在 0.01% ~ 50% H_3PO_4 溶液与顶空的 k 值为 103.58 ~ 64.76。因此, 50% 的 H_3PO_4 溶液是提取 C_2N_2 和 HCN 的理想浓度。

2.2.3 盐 + H_3PO_4 溶液 已知无机盐可促进溶液中挥发性物质的蒸发, 在 H_3PO_4 溶液中添加 $MgCl_2$ 可提高溶剂顶空 HCN 的浓度。与 50% H_3PO_4 溶液相比, 含有 15% $MgCl_2$ 的 50% H_3PO_4 溶液可使顶空 HCN 的含量提高 14%, 而对顶空 C_2N_2 的浓度提高不明显。添加 $MgCl_2$ 仅仅出现微量的盐化效果, 可能是由于作为酸化剂的 50% H_3PO_4 溶液已发生了足够的盐化效应所致。

2.3 提取温度的优化

提取温度对 C_2N_2 和 HCN 在溶液顶空分配系数的影响见图 2。结果显示, 提高温度可显著降低 k 值。然而, 由于在密闭系统内的气压随着温度的上升而增大, 使顶空内的气体变得极不稳定, 测定时易出现较大的标准差。从灵敏度和误差角度考虑, 则采用 25 ~ 30 °C 的室温较为适宜。

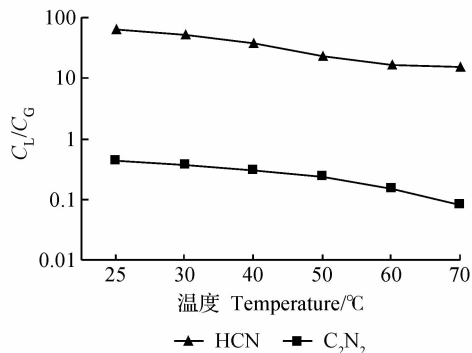


图 2 提取温度对 HCN 和 C_2N_2 分配系数的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on distribution coefficient of HCN and C_2N_2

2.4 气相与液相体积比的优化

气相与液相体积比 (简称相比, β) 对 C_2N_2 和 HCN 在顶空与 H_3PO_4 溶剂间 k 值的影响见图 3。结果表明, 在一定体积内 k 值随着 β 值的增大而上升, 而溶剂顶空 C_2N_2 和 HCN 的浓度则随之降低。由此可见, 在气相中的浓度不仅与液相中的最初浓度有关, 还与提取溶剂的体积相关。降低顶空体积可提高顶空气体的浓度, 但若顶空体积过小, 多次取样会干扰顶空气体的稳定性。因此, 在用溶剂提取分析粮食中 C_2N_2 和 HCN 残留量时采用 $\beta = 4$ 左右

比较适宜。

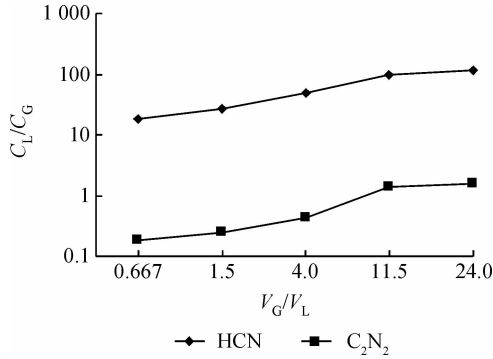


图3 气相与液相体积比对 C_2N_2 和 HCN 分配的影响

Fig. 3 Effect of phase volume ratio on distribution coefficient of C_2N_2 and HCN

2.5 HCN 和 C_2N_2 在添加样品中的稳定性

2.5.1 HCN HCN 在添加样品基质顶空的分配见图 4A。结果显示,HCN 在 H_3PO_4 加小麦基质的顶空较稳定,暴露 6 h 后 HCN 在气相与 H_3PO_4 加小麦基质间建立了平衡。HCN 在顶空中的分配随着酸浓度的提高而上升,与 10% 的 H_3PO_4 溶液比较,50% 的 H_3PO_4 溶液的顶空 HCN 浓度可提高 12%。

2.5.2 C_2N_2 C_2N_2 及其代谢物 HCN 在添加样品基质顶空的分配见图 4B 和图 4C。结果显示, C_2N_2 在 50% H_3PO_4 溶液的顶空中较稳定,暴露 24 h 后 C_2N_2 在顶空与 H_3PO_4 加小麦基质间达到平衡,同时降解产生少量的 HCN。 C_2N_2 在 50% 以下 H_3PO_4 加小麦基质的顶空中不稳定,在顶空的分配随着暴露时间的延长而大幅度降低。从图 4C 可以看出,暴露 32 h 后, C_2N_2 代谢为 HCN 的比例增加,在低于 50% H_3PO_4 加小麦基质的顶空中 C_2N_2 消解较快,而检出的 HCN 浓度较低。

2.6 熏蒸样品中 HCN 和 C_2N_2 提取时间的优化

2.6.1 HCN 不同提取时间下添加标样样品和熏蒸样品顶空 HCN 的峰面积见图 5A。暴露 10 h 后,HCN 在 50% H_3PO_4 加添加标样样品基质的顶空达到平衡,然后随着提取时间的延长而逐渐下降。在 50% H_3PO_4 加熏蒸样品基质的顶空,HCN 在 72 h 内随着提取时间的延长而上升,随后逐渐下降。用添加标样样品作标准,提取不同时间熏蒸样品中 HCN 的残留量结果见图 5B,从中可以看出,在 72 h 内,HCN 在小麦中的残留量随着提取时间的延长而上升,随后逐渐下降。因此,用 50% H_3PO_4 溶液提取小麦样品中 HCN 残留的适宜时间为 72 h,提取时间不足或过长均将致使测定结果偏低。

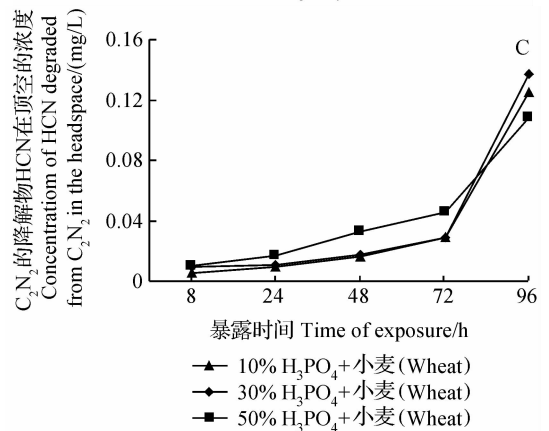
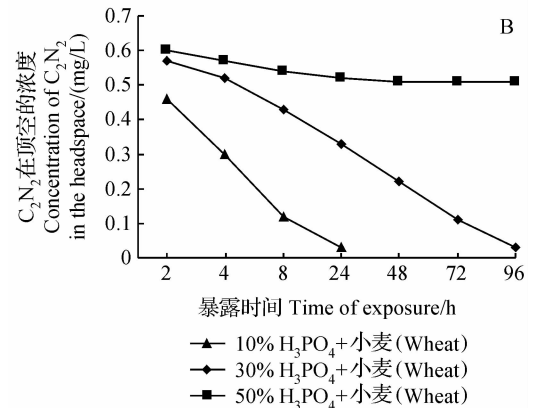
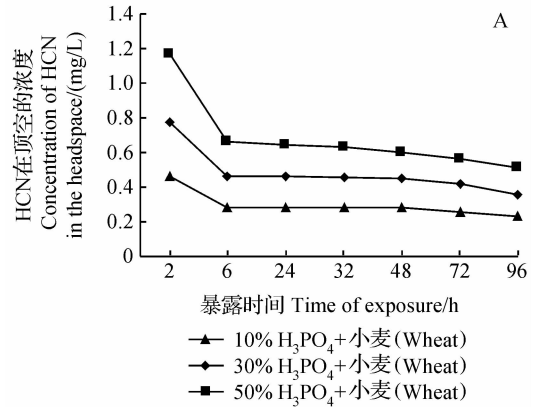


图4 HCN 和 C_2N_2 在添加标样样品顶空的稳定性

Fig. 4 Stability of HCN and C_2N_2 in the headspace of spiking samples

A. 添加 HCN 水平为 5 mg/kg 的样品; B. 添加 C_2N_2 水平为 5 mg/kg 的样品; C. 添加 C_2N_2 水平为 5 mg/kg 的样品。
A. Spiking sample of HCN at 5 mg/kg; B. Spiking sample of C_2N_2 at 5 mg/kg; C. Spiking sample of C_2N_2 at 5 mg/kg.

2.6.2 C_2N_2 不同提取时间下 C_2N_2 在添加标样样品和熏蒸样品顶空的峰面积见图 6A。暴露 24 h 后, C_2N_2 在 50% H_3PO_4 加添加标样样品基质的顶空达到平衡,然后随着提取时间的延长而逐渐下降。在 50% H_3PO_4 加熏蒸样品的顶空, C_2N_2 在 24 h 内急剧上升后再缓慢上升,72 h 时达到平衡,而后逐

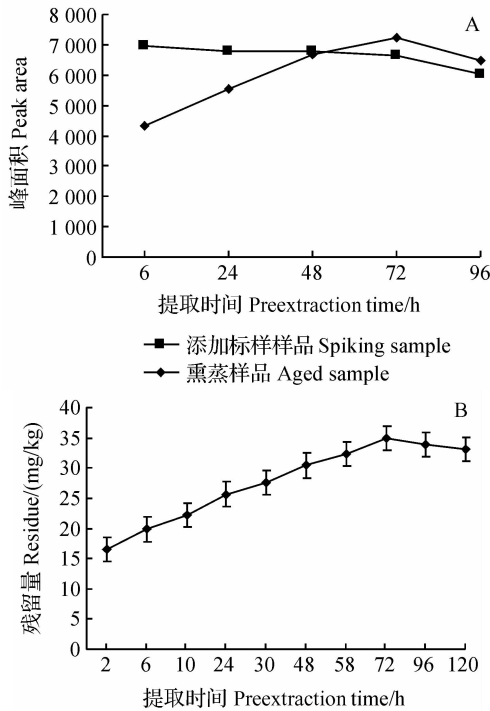


图 5 提取时间对 HCN 峰面积及残留量的影响

Fig. 5 Effect of preextraction time on peak area and residue of HCN

A. 提取时间与 HCN 峰面积的关系; B. 提取时间与 HCN 残留量的关系 (标准差为 3 次重复计算结果)。

A. Effect of preextraction time on peak area of HCN; B. Effect of preextraction time on residue of HCN (error bars indicate the SD , $n = 3$).

渐下降。用添加标样样品作标准,提取不同时间下熏蒸 48 h 未通风样品中 C_2N_2 的残留量见图 6B。可以看出,在 72 h 内, C_2N_2 的残留量随着提取时间的延长而上升,随后逐渐下降。由于 C_2N_2 在小麦中易降解为 HCN,在分析 C_2N_2 的同时提取的 HCN 的顶空峰面积见图 6A,以 HCN 添加标样样品作标准,提取不同时间计算得到的熏蒸样品中 HCN 的残留量见图 6B,其结果与 2.6.1 节 HCN 的测定结果相类似。同时还发现,50% H_3PO_4 溶液提取 C_2N_2 和 HCN 所用的时间和提取效果趋于一致。

2.7 方法的检出限

在添加标样样品中, C_2N_2 在添加水平为 0.5 ~ 10 mg/kg 范围内的线性方程为 $Y = 530\ 859x + 1\ 497.8$, 相关系数(R^2)为 0.9984,在添加 0.5 mg/kg 时的相对标准偏差为 4.6% ($n = 6$); HCN 在添加水平为 0.5 ~ 10 mg/kg 范围内的线性方程为 $Y = 739\ 685x + 5\ 088.2$, R^2 为 0.9991,在 0.5 mg/kg 时的相对标准偏差为 7.4% ($n = 6$)。以色列峰信噪比

为 3 时的浓度确定小麦中 C_2N_2 和 HCN 的检出限 (LOD) 分别为 0.032 mg/kg 和 0.145 mg/kg, 以色列峰信噪比为 10 时的浓度确定小麦中 C_2N_2 和 HCN 的定量限 (LOQ) 分别为 0.107 mg/kg 和 0.483 mg/kg。目前,国内外尚未制定 C_2N_2 在食品中的最大残留限量 (MRL) 标准,参照我国食品中 HCN 的 MRL 标准为 5 mg/kg^[8], 则该方法可满足 C_2N_2 和 HCN 在粮食中残留分析的要求。

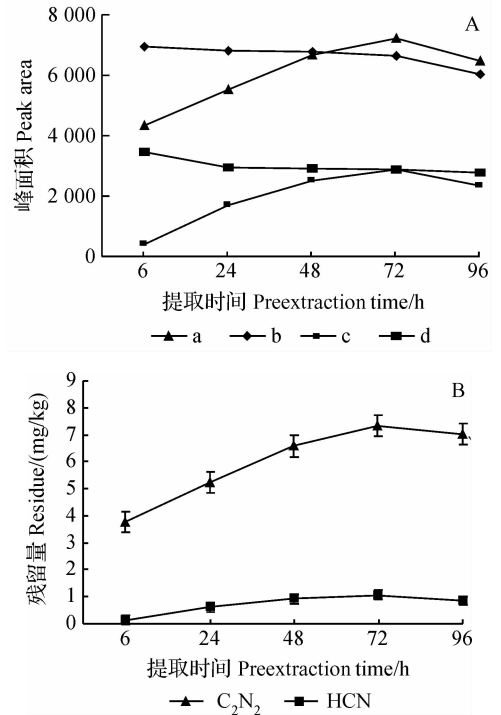


图 6 提取时间对 C_2N_2 及其降解产物 HCN 峰面积和残留量的影响

Fig. 6 Effect of preextraction time on peak area and residues of C_2N_2 and HCN degraded from C_2N_2

A. 提取时间与 C_2N_2 及其降解产物 HCN 峰面积的关系: a. C_2N_2 峰面积 (添加标样 C_2N_2 的样品); b. C_2N_2 峰面积 (用 C_2N_2 熏蒸的样品); c. HCN 峰面积 (添加标样 HCN 的样品); d. HCN 峰面积 (用 C_2N_2 熏蒸的样品); B. 提取时间与 C_2N_2 及其降解产物 HCN 残留量的关系 (标准差为 3 次重复计算结果)。

A. Effect of preextraction time on peak area of C_2N_2 and HCN degraded from C_2N_2 : a. Peak area of C_2N_2 (Spiking sample with C_2N_2); b. Peak area of C_2N_2 (Aged sample with C_2N_2); c. Peak area of HCN (Spiking sample with HCN); d. Peak area of HCN (Aged sample with C_2N_2); B. Effect of preextraction time on residue of C_2N_2 and HCN degraded from C_2N_2 (error bars indicate the SD , $n = 3$).

2.8 实际样品测定

经 50 mg/L 的 C_2N_2 熏蒸 48 h 后,未通风的小麦

中 C_2N_2 及 HCN 的平均残留量分别为 7.33 mg/kg 和 1.06 mg/kg, 通风 7 d 时 C_2N_2 和 HCN 的平均残留量分别为 0.25 mg/kg 和 0.56 mg/kg, 通风 16 d 时 C_2N_2 和 HCN 均为未检出。因此, 用 50 mg/L 的 C_2N_2 熏蒸小麦 48 h 后, 通风 7 d, 对膳食摄入安全。

3 小结与讨论

本研究建立了采用 NPD 检测器, 溶剂顶空气相色谱法测定小麦中 C_2N_2 和 HCN 残留量的分析方法。在给定的色谱条件下, C_2N_2 和 HCN 可较好地分离。 C_2N_2 和 HCN 的检出限分别为 0.032 mg/kg 和 0.145 mg/kg, 方法精密度高, 操作简便, 适用于小麦中 C_2N_2 和 HCN 残留量的检测。同时, 还讨论了不同提取基质、温度和气-液相体积比对 C_2N_2 和 HCN 在密闭系统顶空的分配与稳定性, 以及提取时间对提取效果的影响。

有关 C_2N_2 的制备方法很多, 如金属氰化物、氰化氢和卤化氰的热降解反应、由烃与含氮材料或氨基氰钙与二硫化碳在高温下反应、草酸与乙二醛衍生物反应等^[5], 但这些反应均需在高温或生物发酵等条件下进行, 操作繁琐, 收集 C_2N_2 的难度大。本研究以 KCN 和饱和 $CuSO_4$ 溶液为试剂, 在 95 °C 下进行反应得到 C_2N_2 , 其反应式为: $2CuSO_4 + 4KCN \rightarrow Cu(CN)_2 + 2K_2SO_4 + C_2N_2 \uparrow$, 利用铃形管顶空收集产物 C_2N_2 , 纯度 93% 左右, 主要杂质为溶解在硫酸铜溶液中和顶空未抽除干净的空气(氮气、氧气和二氧化碳)。该制备方法所有仪器设备简单, 操作方便。另外, 对于 HCN 的制备, 一般使用圆瓶, 由于瓶内空气难以抽除干净, 所得 HCN 的纯度通常很低(46% 左右)。本研究以 KCN 与 20% 的 H_2SO_4 溶液为试剂, 在抽除空气的密闭聚乙烯塑料袋内反应, 能够得到纯度为 99% 左右的 HCN, 主要杂质为未抽除干净的空气(氮气、氧气和二氧化碳), 其反应式为: $H_2SO_4 + 2KCN \rightarrow K_2SO_4 + 2HCN \uparrow$ 。

Yasuo 等^[9]曾报道使用 GS-Q 毛细管色谱柱替代 Porapak QS 填充柱, 可显著改善 HCN 的分离效果。GS-Q 色谱柱是一种极性气-固管状大孔毛细管柱, 被广泛用于检测极性挥发性物质。这种毛细管柱具有较高的分辨率、灵敏性和稳定性, 在顶空色谱分析中未遇到如 Porapak QS 填充柱类的退化问题。本试验采用 GS-Q 毛细管色谱柱在分析气相中 C_2N_2 和 HCN 时, 也未观察到任何杂质的干扰, 并可在极短的时间(1 min)内将 C_2N_2 和 HCN 分开。

要获得理想的分析重现性, 选择顶空瓶密封隔

膜、磨口瓶涂加适量的凡士林和选用合适的注射器相当重要。选用 Tuf-Bond 圆盘式隔膜可防止对 C_2N_2 和 HCN 的吸附和气体的泄漏。使用磨口塞时涂加适量的凡士林可预防气体泄漏, 但涂入量过多易造成对气体的吸附。就顶空气体取样和色谱进样而言, 不能使用重现性低的普通气密性注射器或缺少承受压力的注射器, 用采用装有细针头且隔膜无大孔的 SGE 注射器可获得理想的重现性。

根据顶空理论, 在密闭系统中存在 $C_L^0 V_L = C_L V_L + C_G V_G$ 平衡。 C_L^0 为平衡前的液相浓度, C_L 和 C_G 分别为平衡后的液相和气相浓度, V_L 和 V_G 分别为液相和气相体积。设分配系数(k)和相比(β)分别为 C_L/C_G 和 V_G/V_L , 则前式可变为 $C_G = C_L^0 / (k + \beta)$ 。因此, 与 C_G 相关的灵敏度就决定于 C_L^0 、 k 和 β ; 而 k 在稀释分析浓度、恒定温度和相同基质条件下是常数。结果证实, 在不考虑 β 和 C_L^0 时, C_2N_2 和 HCN 在确定的基质如酸溶液中的 k 值是常数。在 25 °C 时, C_2N_2 和 HCN 在有机溶剂和盐溶液顶空不稳定, 大部分分配至溶液中, 而在 50% 的 H_3PO_4 溶液中 C_2N_2 和 HCN 的 k 值分别为 0.44 和 48.82 左右。尽管 C_2N_2 和 HCN 在酸溶液中能达到平衡, 但其在气相中的浓度仍相对较低, 因此, 需要采用较灵敏的气相色谱进行检测。

目前, 尚无有关 C_2N_2 和 HCN 的顶空动力学资料可供借鉴。在顶空分析中, 通常在样品溶液中添加过量的盐以提供可重现的基质条件, 提高气相中挥发物质的浓度, 达到改善仪器灵敏度的目的^[10-13]。与其他挥发性物质比较, C_2N_2 和 HCN 在盐加酸溶液中并未显示出明显的盐化效应, 可能是由于作为酸化剂的磷酸溶液已发生了足够的盐化效应所致, 这与前人的研究结果^[9]相一致。Desmarchelier 等^[14-15]报道, 在较高的提取温度下可以提高熏蒸小麦中熏蒸剂 CH_3Br 、 PH_3 和 COS 的提取效率, 但熏蒸剂在酸化的丙酮加小麦的顶空并不稳定。尽管在常温条件下进行溶剂提取需要 24 ~ 48 h 甚至更长时间, 但溶剂顶空法依然是溶剂提取分析粮食中多种熏蒸剂残留时的最理想方法^[14]。本研究结果表明, 在不同温度下 C_2N_2 和 HCN 在顶空中的分布不同, 提高温度可明显提高顶空中 C_2N_2 和 HCN 的浓度(图 2), 但随着温度的上升, 顶空体系变得更不稳定, 使测定结果重现性差。因此, 提高温度进行溶剂提取的方法并不适用于粮食中熏蒸剂 C_2N_2 和 HCN 的残留分析。

Desmarchelier 等^[14]对添加标样粮食中 CH_3Br 、

PH₃ 和 COS 等经过一定时间平衡后,溶剂顶空中的熏蒸剂再缓慢下降进行了分析,把这种现象归于基质中粮食的吸附和粮食中酶、微生物等活性的影响。在本研究中也发现了类似的现象,即 C₂N₂ 和 HCN 在 50% 的 H₃PO₄ 溶液加小麦的顶空在 24 h 内达到平衡,至 72 h 后缓慢下降(图 4),而 C₂N₂ 在 50% 以下 H₃PO₄ 溶液加小麦的顶空未达到平衡(图 4),其机理有待进一步研究。在用 50% 的 H₃PO₄ 溶液提取熏蒸小麦的研究中发现,在 72 h 内释放至顶空的 C₂N₂ 和 HCN 浓度不断上升,而后缓慢下降(图 5、图 6),这种现象可能也与小麦对熏蒸剂的吸附和小麦中酶、微生物等活性有关。

在溶剂顶空技术中,评价添加标样的回收率是一项十分复杂、耗时的工作。在检测基质中的残留量用添加标样进行评价,即如果小麦中添加标样浓度为 x mg/kg,顶空的峰高为 P_x ,熏蒸小麦残留的峰高为 P_y ,浓度则为 $[x(P_y/P_x) \text{ mg/kg}]^{14-16}$ 。在这种情况下,就意味着添加标样的回收率是 100%。

参考文献:

- [1] BELL C H. Fumigation in the 21st century[J]. *Crop Protection*, 2000,19(5):563-569.
- [2] PRICE L A, MILLS K A. The toxicity of phosphine to the immature stages of resistant and susceptible strains of some common stored product beetles, and implications for their control [J]. *J Stored Prod Res*, 1998,24(1):51-59.
- [3] MERVYN B. Inheritance of phosphine resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. *J Econ Entomol*, 1999,92(1):17-20.
- [4] SUN Dong(孙冬). 熏蒸剂磷化氢的研究进展[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2007,35(22):6854-6855,6873.
- [5] BROTHERTON T K, LYNN J W. The synthesis and chemistry of cyanogen[J]. *Chemical Review*, 1959,(59):841-883
- [6] CSIRO, The University of Canberra. Cyanogen fumigants and

methods of fumigation using cyanogen; International Patent Application PCT/AU95/00409 [P]. 1995.

- [7] HOOPER J L, DESMARCHELIER J M, REN Y L, et al. Toxicity of cyanogen to insects of stored grain[J]. *Pest Manag Sci*, 2003, 59(3):353-357.
- [8] GB 2763-2005, Maximum residue limits for pesticides in food (食品中农药最大残留限量) [S]. Beijing (北京): Standard Press of China(中国标准出版社), 2005.
- [9] YASUO S, NORIKO T, HIKOTO O. Determination of blood cyanide by headspace gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and using a megabore capillary column[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1993, 276:247-259.
- [10] QU Jin-wen(瞿进文), XU Hai-nie(徐海聂), ZHANG Zhong-ya(张中亚). 粮食中熏蒸剂硫酰氟残留量的顶空气相色谱测定[J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2000,19(3):76-78.
- [11] WANG Yong-hua(王永华), LI Li-ren(李立人). 顶空气相色谱法测定土壤或底泥中挥发性苯系物[J]. *Environmental Monitoring in China*(中国环境监测), 2011,27(1):17-20.
- [12] LU Bing-wen(鲁炳闻), HAN Chun-mei(韩春媚), ZHOU You-ya(周友亚), et al. 土壤中苯系物的顶空气相色谱-质谱联用测定方法研究[J]. *J Agro-Environ Sci* (农业环境科学学报), 2010,29(4):812-816.
- [13] WANG Yong-chun(王永春). 顶空气相色谱法测定食品中溴甲烷的含量[J]. *Analytic Instrument*(分析仪器), 2010,22(6):34-36.
- [14] DESMARCHELIER J M, YONGLIN R. Analysis of fumigant residues—a critical review[J]. *J AOAC Int*, 1999,82(6):1261-1280.
- [15] YONGLIN R, SYLVIA E A. Ultrasound treatment acceleration of solvent extraction for fumigant residues from wheat[J]. *J AOAC Int*, 2001,84(5):1551-1554.
- [16] YONGLIN R, DESMARCHELIER C J, PHILLIP W, et al. Natural levels of dimethyl sulfide in rough rice and its products [J]. *J Agric Food Chem*, 2001,49:705-709.

(责任编辑:金淑惠)