血（尿）中甲拌磷、二嗪农测定
操作规程

编制人：潘兴富

编制单位：中国疾病预防控制中心

职业卫生与中毒控制所

编制日期：2015-11-30

血(尿)中甲拌磷、二嗪农测定方法

1　范围

本规范适用于急性中毒人员全血中甲拌磷、二嗪农有机磷农药气相色谱质谱联用仪定性定量检测。

2　规范性引用文件

黄宝勇，潘灿平，张微等. 应用分析保护剂补偿基质效应与气相色谱-质谱快速检测果蔬中农药多残留. 分析测试学报，2006（03）：11-16

C. Sanchez-Brunete，B. Albero，G. Martin等. Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. Anal Sci，2005，21（11）：1291-1296

潘兴富，杜会方，闫慧芳等. 古洛糖酸内酯在5种有机磷农药检测中的应用研究. 卫生研究，2010（02）：221-223

张艳, 农药残留分析中不同提取溶剂的评价[J]. 甘肃农业科技,2006, (9): 28-29.

林畅，贺高红，李祥村等. 冷冻解冻法破除液体石蜡W/O乳状液. 化工学报，2006，57（4）：824-831

GBZ/T 210.5-2008《职业卫生标准制定指南》第5部分：生物材料中化学物质测定方法

3　全血中甲拌磷、二嗪农残留 GC/MS 测定方法

3.1　原理

采用液液萃取的方法，用二氯甲烷将全血中的甲拌磷、二嗪农提取后，氮吹浓缩，再复溶，液体供气相色谱质谱联用仪采用SIM模式进行检测，结合标准品的离子碎片和保留时间进行定性分析。

3.2　仪器

3.2.1　氮气浓缩仪；

3.2.2　涡旋振荡器，可调节转速，3000～4000rpm；

3.2.3　离心机，转速可满足 3000rpm；

3.2.4　电冰箱，-20℃；

3.2.5　15ml 具塞螺口试管

3.2.6　Angilent 6890-5973 气相色谱-质谱联用仪，含 EPC 控制的 Deans Swith 反吹系统模块）；

仪器操作参考条件：

色谱条件：

色　谱　柱：DB-35MS，30m×0.25mm×0.25μm；

柱　　温：保持0.5min；进样量：1.0μl；色谱程序：80℃保持0.50min，以30℃/min升温至200℃，保持1.00min，以20℃/min升温至240℃，保持4.00min后开启反吹模式。

气化室温度：280℃；

分流　模式：脉冲不分流进样，脉冲压力：45psi，

后　运　行：300℃，流量：0ml/min；保持10.00min。

载　　气：高纯氦气，流速1.5ml/min；

质谱条件

电离　电压：　70eV；

溶剂　延迟：　5min；

离子源温度：　230℃；

四极杆温度：　150℃；

扫描　模式：　SIM(选择离子方式)。

表1. SIM扫描模式定量定性离子

化合物名称	定量离子m/z	定性离子m/z
甲拌磷	260	231、260
二嗪农	304	179、304

3.3　试剂

3.3.1　甲醇，农残级；

3.3.2　二氯甲烷，农残级；

3.3.3　甲拌磷，99.5%；

3.3.4　二嗪农，99.5%；

3.3.5　古洛糖酸内酯，99.5%

3.3.6　保护剂：2.0mg/ml 的古洛糖酸内酯甲醇溶液；

3.3.7　标准溶液：

取甲拌磷标准品约50mg，放入50ml的容量瓶中，准确称量，用甲醇溶解，定容至刻度，配制成浓度为1000μg/ml甲拌磷标准溶液。

取二嗪农标准品约20mg，放入50ml的容量瓶中，准确称量，用甲醇溶解，定容至刻度，配制成浓度为400μg/ml的二嗪农标准溶液。

4℃冰箱密封避光保存。或使用购买的标准溶液。

3.4　样品的采集、运输和保存

取静脉全血5ml，-20℃低温保存，供检测。使用安全方便的取样容器和取样工具，其材质不影响测定；在样品的采集、运输和保存过程中，应注意冷藏密封，并尽快送达实验室，以防样品污染，保证待测物稳定，不变质、不损失。

3.5　分析步骤

3.5.1　样品处理

取全血样品或加标样品2.0ml于15ml具塞螺口试管中（冷冻的样品需放置至室温），加入6ml二氯甲烷，在涡旋振荡器涡旋振荡5min（涡旋震荡过程中会发生乳化现象，仍要继续震荡涡旋），转速以涡旋上液面不接触到试管帽为准。

将试管放入-20℃以下的冰箱中冷冻20-30min，取出放置完全融化后，用高速离心机以3000rpm离心15min，使血液和提取溶液以及沉淀的蛋白完全分离。用一次性塑料吸管将上层液体移入废液缸内，将中间固体层轻轻挤压到管壁上，然后将下层提取液全部转移至另一支洁净的普通玻璃试管中。

将存有提取液的试管在浓缩仪上吹至近干后，用200μl保护剂溶液重新溶解，放在涡旋振荡仪上最大转速涡旋振荡2min，移入含有250μl内插管的进样小瓶中，气相色谱-质谱联用仪检测。

样品空白和质控样品处理方法同样品。

3.5.2 标准（工作）曲线的配制和回归方程的计算

取甲拌磷和二嗪农标准溶液各0.5ml于10ml容量瓶中，配制成二嗪农、甲拌磷浓度分别为20μg/ml、50μg/ml的混合标准溶液；取该标准溶液1.0ml于10ml容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成二嗪农、甲拌磷浓度分别为2.0μg/ml、5.0μg/ml标准储备溶液；取标准储备溶液1.0ml于10ml容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成二嗪农、甲拌磷浓度分别为200μg/L、500μg/L标准应用溶液。

标准曲线的绘制：用保护剂溶液稀释标准应用溶液至表2.所列浓度的标准系列。

标准系列	1	2	3	4	5
甲拌磷（μg/L）	10	20	50	100	500
二嗪农（μg/L）	4	8	20	40	200

参照仪器操作条件，将气相色谱质谱仪调节至最佳测定状态，分别进样1.0μl，测定各标准系列。以测得的定量离子的峰高或峰面积对相应的待测物浓度(μg/ml)绘制标准曲线。

3.5.3 样品的测定

按照前处理方法对样品、空白样品及质控样进行处理，进行气相色谱质谱仪选择离子模式测定，测得峰高或峰面积值后，由标准曲线得相应的待测物的浓度(μg/ml)。

3.6 计算

3.6.1 测定结果按下式计算样品中甲拌磷、二嗪农的浓度

$$C = \frac{c}{n} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

C：全血中甲拌磷或二嗪农的浓度；

c：测定溶液中甲拌磷或二嗪农的浓度；

n：为样品前处理的浓缩倍数，本方法为10，根据样品实际浓缩倍数选择。

3.7 质量控制

3.7.1 采用样品加标的方法进行质量控制，加标回收率在80%以上即可。

3.8 注意事项

3.8.1　方法的主要参数见表 3.

表 3.　各待测物的线性方程、相关系数、检出限和定量下限

化合物名称	仪器检出限（μg/L）	仪器定量限（μg/L）	方法检出限（μg/L）	方法定量限（μg/L）
甲拌磷	0.80	3.00	0.08	0.30
二嗪农	0.40	2.00	0.04	0.20

3.8.2　最好采集中毒发生后 12 小时以内的静脉全血。

3.8.3　该方法的检出限相对较低，灵敏度较高，实际工作中可以根据实际情况判断全血中可疑化合物的浓度范围，对样品前处理步骤进行调整或省略，在牺牲一定灵敏度的前提下，节省更多的时间。

技术报告

1. 材料

1.1. 试剂 甲醇、二氯甲烷（农残级）；农药标准品（甲拌磷、二嗪农）（99.5%）；保护剂古洛糖酸内酯（99.5%；西格玛公司）；

1.2 仪器及设备 Angilent 6890-5973 气相色谱-质谱联用仪（含反吹系统模块）；DB-35MS（30m×0.25mm×0.25μm）色谱柱；氮气浓缩仪；涡旋振荡器（3000～4000rpm）；超声仪；离心机（3000rpm）；电冰箱；

1.3 其他耗材 普通试管（10mm×120mm）；瓶口分液器（1～5ml）； 1ml 无机移液枪及枪头；螺口试管（15mm×110mm；含聚四氟乙烯隔垫）；Angilent 进样小瓶（内含 250μl 内插管）；100μl、250μl 和 1ml 有机移液枪及枪头；容量瓶。

2. 方法

2.1 配制混合标准系列 将各待测物标准溶液配置成混合标准溶液。标准曲线范围：二嗪农为 4～80μg/L；甲拌磷为 10～200μg/L。将放置至室温的混合标准储备液，用 2.0mg/ml 的古洛糖酸内酯甲醇溶液作为稀释溶液。

2.2 样本前处理

取样品 2.0ml 于 15ml 具塞螺口试管中，加入 6ml 二氯甲烷，以 1000r/min 涡旋振荡 5min，将试管放入-20℃以下的冰箱中冷冻 30min，取出放置完全融化后，以 3000rpm 离心 15min，将下层提取液全部转移至洁净的普通玻璃试管中，氮吹浓缩至近干后，用 200μl 的古洛糖酸内酯甲醇溶液（2.0mg/ml）重新溶解，涡旋振荡 2min（2000rpm），以 2000rpm 离心 5min，移入含有 250μl 内插管的进样小瓶中，供测定。

2.3 仪器方法

气相色谱条件 色谱柱：DB-35MS（30m×0.25mm×0.25μm）；载气：高纯氦气，流速 1.5ml/min；进样口：280℃；分流模式：脉冲不分流进样，脉冲压力：45psi，保持 0.5min；进样量：1.0μl；色谱程序：80℃保持 0.50min，以 30℃/min 升温至 200℃，保持 1.00min，以 20℃/min 升温至 240℃，保持 4.00min，以 20℃/min 升温至 300℃，保持 2.00min 后开启反吹模式。后运行：300℃，流量：0ml/min；保持 10.00min，共运行 26.50min。

质谱条件 电离电压：70eV；溶剂延迟：7min；离子源温度：230℃；四极

杆温度：150℃；扫描模式：SIM(选择离子方式)，分组分段扫描。

表 1. 各待测物 SIM 扫描模式定量定性离子选择

化合物名称	保留时间（min）	定量离子 m/z	定性离子 m/z
甲拌磷	8.01	260	231、260
二嗪农	8.42	304	179、304

3. 结果

3.1 方法标准图谱 对标准溶液中 15 中农药进行全扫描模式检测，检测结果见图 3。

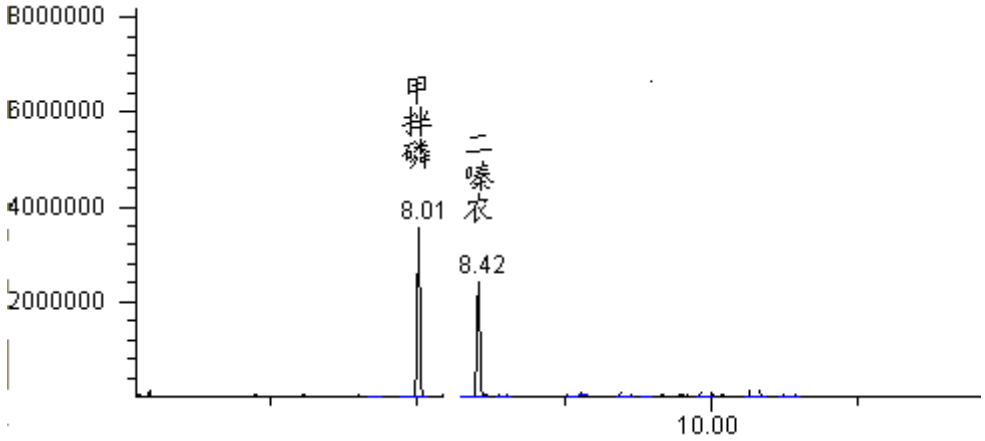

图 3、甲拌磷、二嗪农标准溶液 SCAN 模式扫描图谱

3.2 方法线性范围和检出限 测定标准系列，确定线性方程和相关系数，以 3 倍的信噪比确定仪器检出限；根据加标系列中化合物的响应值，以 10 倍的信噪比或实际测量结果确定仪器定量下限。根据浓缩系数（10 倍）计算方法的检出限和定量下限。结果见表 2。

表 2. 各待测物的线性方程、相关系数、检出限和定量下限

化合物名称	线性方程	相关系数 (r^2)	仪器检出限（μg/L）	仪器定量限（μg/L）	方法检出限（μg/L）	方法定量限（μg/L）
甲拌磷	Y=383X－281	1.000	0.80	3.00	0.08	0.30
二嗪农	Y=461X－343	1.000	0.40	2.00	0.04	0.20

3.3 准确度和精密度

3.3.1 准确度和批内精密度 采用加标方法对方法的准确度精密度进行评价，结果见表 3、4、5。

表 3. 低浓度加标样品检测结果的均值、回收率及相对标准偏差

化合物	加标量（μg/L）	加标样品测定值（μg/L）						均数（μg/L）	回收率（%）	相对标准偏差（%）
		1	2	3	4	5	6			
甲拌磷	20	17.30	15.88	19.83	19.13	17.05	14.88	17.35	86.75	11
二嗪农	8	4.50	5.09	4.43	4.81	4.15	4.50	4.58	57.25	7

表 3 显示，低浓度加标样品检测结果的平均回收率在 57.3%～86.8%，相对标准偏差在 7%-11%之间。

表 4. 中等浓度加标样品检测结果的均值、回收率及相对标准偏差

化合物	加标量（μg/L）	加标样品测定值（μg/L）						均数（μg/L）	回收率（%）	相对标准偏差（%）
		1	2	3	4	5	6			
甲拌磷	50	38.8	38.7	45.0	42.1	43.0	46.4	42.3	84.6	7
二嗪农	20	13.3	16.0	15.2	14.2	14.2	15.7	14.8	73.8	7

表 4 显示，中等浓度加标样品各待测物平均加标回收率在 73.8%-84.6%之间，相对标准偏差均为 7%。

表 5. 高浓度加标样品检测结果的均值、回收率及相对标准偏差

化合物	加标量（μg/L）	加标样品测定值（μg/L）						均数（μg/L）	回收率（%）	相对标准偏差（%）
		1	2	3	4	5	6			
甲拌磷	100	81.2	85.5	78.6	91.2	83.0	94.4	85.6	85.6	6
二嗪农	40	34.2	35.4	32.6	35.2	35.5	38.8	35.3	88.3	5

表 5 显示，高浓度加标样品各待测物平均加标回收率在 85%以上，相对标准偏差波动范围在 5%-6%之间。

3.3.2 批间精密度

表 6 显示，该浓度批间加标样品回收率变异系数波动范围在 11%-26%。表 7 显示，该浓度批间加标样品回收率变异系数波动范围在 8%-18%。表 8 显示，该浓度批

间加标样品回收率变异系数波动范围在 6%-22%。

表 6. 低浓度加标样品批间精密度检测结果

化合物	不同时间加标样品检测结果（μg/L）						均数（μg/L）	相对标准偏差（%）
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天		
甲拌磷	17.4	14.1	18.1	20.2	18.1	15.8	17.3	12
二嗪农	4.6	5.2	6.9	8.2	6.9	6.2	6.3	21

表 7. 中等浓度加标样样品批间精密度检测结果

化合物	不同时间加标样品检测结果（μg/L）						均数（μg/L）	相对标准偏差（%）
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天		
甲拌磷	42.3	34.7	46.8	45.7	44.5	43.5	42.9	10
二嗪农	14.8	13.4	18.6	19.0	17.9	17.2	16.8	15

表 8. 高浓度加标样品批间精密度检测结果

化合物	不同时间加标样品检测结果（μg/L）						均数（μg/L）	相对标准偏差（%）
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天		
甲拌磷	85.6	66.6	93.7	81.5	81.3	79.9	81.4	10
二嗪农	35.3	30.4	35.6	35.0	34.0	36.1	34.4	6

4. 保护剂的使用

在进行农药残留检测分析时，经常会发现有些待分析物出现较低的响应值或是峰型很差，拖尾严重，积分结果偏差较大的现象[7,8]。这是因为测定复杂基质样品时，样品基质成分可以和玻璃衬管等系统上的活性位点竞争结合，减弱活性位点与分析物之间的相互作用，从而干扰了外标定量的准确性。目前常用的保护剂主要有 2,3-丁二醇、古洛糖酸内酯、乙基丙三醇、橄榄油[9]等。这些化合物在结构上都有一个共同的特点，即结构中含有大量的活性基团（－OH），能够竞争性结合系统中存在的活性位点，从而减少目标化合物的吸附，提高灵敏度。Anastassiades 等[10]对分析保护剂用于补偿基质效应进行了研究，认为古洛糖酸内酯(Gulonic acid γ - lactone)具有良好的补偿作用。根据前期实验结果，本次实验确定将保护剂的浓度确定为 2.0mg/ml[11]。

5. 样品前处理方法的优化

血液样品中农药含量低，需要检测的种类多，样品基质成分复杂，干扰物质多，如血红蛋白，胆固醇，花生四烯酸，棕榈酸等，因此样品的前处理是农药分析的关键步骤。

目前较常用的样品前处理方法的固相萃取[12,13]，由于检测样品采集体积受限、待测物的极性分布范围较宽、干扰因素较多、吸附容量和穿透体积不易控制、成本较高等因素，本次实验不适合使用固相萃取的前处理方法。液液提取方法是比较经典的样品前处理方法。本次实验根据实际情况和研究目的对液液提取方法进行系统优化，根据农药的极性来选择提取剂，参考相关文献[14]和反复实验结果比较，认为二氯甲烷的提取效果较好，能够兼顾所有的待测化合物。

血液样品中的农药以游离态或结合态两种形式存在，结合态的待测物很难被提取出来，采用超声辅助，有利于将结合态的农药变为游离态高提取效率。另外，在采用有机溶剂提取血液样品时，会发生蛋白质沉淀现象，将待测物包裹其中，有机溶剂无法达到提取效果。采用超声辅助提取可以明显提高回收率[15]。

在采用液液提取时，会发生严重的乳化现象，涡旋振荡提取回收率普遍较低，回收溶剂的体积是加入量的 1/2 左右。为了避免乳化现象的产生，常在萃取前加一定量的氯化钠溶液，可以达到破乳的目的[16]，但会引入其他物质，本实验采用冷冻破乳的方法[17]，同样可以达到预期效果。

在添加保护剂、采用超声提取、冷冻破乳离心分离、氮吹浓缩的前提下、对二氯甲烷用量进一步优化，分别用3ml、4ml、5ml、6ml二氯甲烷提取加标牛全血（加标后浓度为50μg/ml），比较回收率，结果如下：

表 9. 不同体积的提取溶剂对各待测物回收效果的影响比较

化合物名称	提取溶剂体积对应的平均回收率（%）			
	3ml	4ml	5ml	6ml
甲拌磷	53	46	90	90
二嗪农	42	39	82	95

从该表可以看出随着提取溶剂体积的增加，回收效率也随之增加，在溶剂使用量达到 6ml 时，检测回收率就基本满足实验要求。

6. 结论

该方法采用 GC-MS 脉冲不分流进样模式、氮吹浓缩和保护剂等方法，有效提高了检测方法的灵敏度，操作简单，运行成本较低。

参考文献：

[1] Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and

Prevention. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals[R]. Atlanta,Georgia: July 2005.

[2] Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals[R]. Atlanta,Georgia: July 2009.

[3] 杨艳玉，范三红，薛平等. 固相萃取—气相色谱法检测菠菜中的54种有机磷. 农产品加工(学刊)，2008（12）：11-15

[4] 吴永江，朱炜，程翼宇. 气相色谱-质谱联用检测中药材中16种残留农药. 中国药学杂志，2006（19）：1497-1501

[5] 侯云龙. 大容积进样固相萃取GC/MS法检验水中的微量甲拌磷. 广东公安科技，2006（02）：192-195

[6] 王赛妮，李蕴成. 我国农药使用现状、影响及对策. 现代预防医学，2007（20）：3853-3855

[7] 黄宝勇，潘灿平，张微等. 应用分析保护剂补偿基质效应与气相色谱-质谱快速检测果蔬中农药多残留. 分析测试学报，2006（03）：11-16

[8] 黄宝勇，潘灿平，王一茹等. 气质联机分析蔬菜中农药多残留及基质效应的补偿. 高等学校化学学报，2006（02）：227-232

[9] C. Sanchez-Brunete，B. Albero，G. Martin等. Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. Anal Sci，2005，21（11）：1291-1296

[10] M. Anastassiades，K. Mastovska，S. J. Lehotay. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. J Chromatogr A，2003，1015（1-2）：163-184

[11]潘兴富，杜会方，闫慧芳等. 古洛糖酸内酯在5种有机磷农药检测中的应用研究. 卫生研究，2010（02）：221-223

[12] 钟锋，杨晓云，李小玺等. 农药残留检测的技术研究进展. 世界农药，2008，30（6）：41-44

[13] 卜伟，陈军. 农药残留分析样品前处理新方法. 环境科学与管理，2007，32（4）：150-151

[14] 张艳. 农药残留分析中不同提取溶剂的评价[J]. 甘肃农业科技, 2006, (9): 28-29.

[15]黄璐，杨敏，乔明等. 超声辅助提取—顶空固相微萃取检测甘草和黄芪中有机氯农药残留量. 湖北中医学院学报，2009，11（4）：37-39

[16] 林畅，贺高红，李祥村等. 冷冻解冻法破除液体石蜡W/O乳状液. 化工学报，2006，57（4）：824-831

[17] 陈树兵，俞雪钧，樊苑牧等. 冷冻去脂-固相萃取-气相色谱法快速测定水产品中硫丹、硫丹硫酸酯和溴氰菊酯残留量. 分析试验室，2008（04）：80-83

[18]李继文，李薇，王川. 采用二维气相色谱及毛细管色谱柱分析汽油中苯和甲苯的含量. 色谱，2009，27（3）：346-350