



中华人民共和国国家标准

GB/T 18969—2003

饲料中有机磷农药残留量的测定 气相色谱法

**Determination of residues of organophosphorus
in feeds—Gas chromatographic method**

(ISO 14182:1999 Animal feeding stuffs—Determination of
residues of organophosphorus pesticides
—Gas chromatographic method, MOD)

2002-02-21 发布

2003-09-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准修改采用了 ISO 14182:1999《饲料中有机磷农药残留量的测定——气相色谱法》(英文版)。本标准根据 ISO 14182:1999 重新起草。

考虑到我国国情,本标准与 ISO 14182:1999 主要差异如下:

- 根据汉语的习惯对 ISO 14182:1999 的语气、语态、标点符号进行编辑性修改,以便我国使用。
- ISO 14182:1999 的条款 1 和 4.11 中提到的 16 种农药,因农药标准品不易获得,只对其中的五种,即谷硫磷、乐果、乙硫磷、马拉硫磷、甲基对硫磷进行了验证,经验证,本标准也适用于饲料中伏杀磷和蝇毒磷残留量的检测,另外马拉硫磷的检测限也有差异,ISO 14182:1999 为 0.01 mg/kg 而验证结果为 0.05 mg/kg。
- ISO 14182:1999 中的条款 4 的警告:一些有机溶剂可能致癌改为可能影响健康。
- ISO 14182:1999 的条款 11.1 因删除了附录 B 而无保留必要,增加了允许差,使结果表示更直观和方便。
- 用 GB/T 14699.1 饲料采样方法代替了 ISO 6419 和 ISO 6498;用 GB/T 6682 代替了 ISO 3696。
- 删除了附录 B 和参考文献以免标准过于冗长。

有关技术性差异已编入正文中,并在它们所涉及条款的页边空白处用垂直单线标识。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准由国家饲料质量监督检验中心(北京)负责起草。

本标准主要起草人:高生、赵根龙、饶正华、范理、李丽蓓、赵津京、杨曙明、苏晓鸥。

饲料中有机磷农药残留量的测定 气相色谱法

1 范围

本标准规定了利用气相色谱检测动物饲料中有机磷农药残留量的方法。

本标准适用于饲料中有机磷农药残留量的检测。用于检测配合饲料、预混合饲料及饲料原料中谷硫磷、乐果、乙硫磷、马拉硫磷、甲基对硫磷、伏杀磷、蝇毒磷等农药中一种或几种的残留量，各农药的检测限依次为 0.01 mg/kg、0.01 mg/kg、0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.01 mg/kg、0.01 mg/kg、0.02 mg/kg。

注：本方法可能等同应用于虫螨畏和杀螟松等其他有机磷农药，但未做验证。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误内容）或修订版均不适用本标准，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

GB/T 6682 分析实验用水规格和试验方法（neq ISO 3696）

GB/T 14699.1 饲料采样方法（neq ISO 6419, neq ISO 6498）

3 原理

以丙酮提取有机磷农药，滤液用水和饱和氯化钠（NaCl）溶液稀释。经二氯甲烷萃取，浓缩后用 10% 水活化硅胶层析柱净化。然后用磷选择性检测器进行气谱检测。

4 试剂与材料

仅用分析纯和适合做残留分析纯度的试剂。

通过在相同条件下做空白试验来检查试剂纯度。色谱图上应没有任何杂质峰干扰。

警告：一些有机溶剂可能影响健康，应小心使用。

4.1 水：符合 GB/T 6682 二级用水的规定。

4.2 正己烷。

4.3 丙酮。

4.4 二氯甲烷。

4.5 乙酸乙酯。

4.6 硅胶，用 10% 水（质量百分数）活化。

130 ℃ 活化粒度为 63 μm~200 μm 的硅胶 60 过夜，在干燥器中冷却至室温后，将硅胶倒入密封的玻璃容器中。加足够蒸馏水使质量百分浓度为 10%。用机械或手用力摇动 30 s，静置 30 min，其间应不时摇动。30 min 后硅胶即可用。此硅胶 6 h 之内必须使用。

4.7 洗脱溶剂：混合二氯甲烷（4.4）与正己烷（4.2）（1+1）。

4.8 惰性气体，如氮气。

4.9 无水硫酸钠。

4.10 饱和氯化钠（NaCl）溶液。

4.11 农药标准品，如下：

- 谷硫磷:O,O-二甲基-S-(4-氧代-1,2,3-苯并三氮苯-3-甲基)二硫代磷酸酯;
- 乐果:O,O-二甲基-S-(N-甲基氨基甲酸酯)二硫代磷酸酯;
- 乙硫磷:双-(O,O-二乙基二硫代磷酸酯)-甲烷;
- 马拉硫磷:O,O-二甲基-S-[1,2-双(乙氧羰基)乙基]二硫代磷酸酯;
- 甲基对硫磷:O,O-二甲基-O-(对硝基苯基)硫逐磷酸酯;
- 伏杀磷:O,O-二乙基-S-[(6-氯-2-氧苯并噻唑啉-3-基)甲基]二硫代磷酸酯;
- 蝇毒磷:O,O-二乙基-O-(3-氯-4-甲基-2-氧代-2H-1-苯并吡喃-7-基)硫逐磷酸酯。

4.12 内标:三丁基磷酸酯。

4.13 农药标准溶液

4.13.1 贮备液:浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 。

按如下方法,每种农药标准做一个贮备液,作为农药标准品(4.11)和内标(4.12)。

称一定量的农药(精确到 0.1 mg),使得标准品和内标物浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 。称量时注意各标准品的纯度。将称量物转移到 100 mL 容量瓶中,溶解于乙酸乙酯(4.5)中,并用乙酸乙酯定容至刻度。

黑暗处 4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 6 个月。

4.13.2 中间溶液:浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

分别用移液管取 1 mL 贮备液(4.13.1),加入到 100 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯(4.5)稀释到刻度。这些溶液可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗处保存 1 个月。

注:农药标准品保存适当是稳定的,研究表明,所有的纯农药标准品,在 -18 $^{\circ}\text{C}$ 时可稳定 15 年。农药的甲苯贮备液(1 mg/kg)至少可稳定 3 年。

以下推荐的方法可以保存更长时间:转移部分标准品溶液到带有螺旋口的琥珀色小瓶中,称重,然后贮存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。需要时,将小瓶从冷藏室中取出,放置到室温,称重。如果净重的累积损失量(由于蒸发)比冷冻前达 10% 或更多,则不可使用。按此方法,可使用时间超过 1 个月中间溶液(通常用 25 mL 瓶装),用后称重,重新冷冻。

4.13.3 工作液:浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

用移液管吸取 5 mL 中间溶液(4.13.2)加入到 100 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯(4.5)定容。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下,此溶液可稳定保存 1 个月(4.13.3)。

4.14 空白试样:与被测样品同类但不含检测物质的样品(4.14)。

5 仪器

使用前,用清洗剂彻底清洗所有玻璃仪器,以免杂质干扰。冲洗过程为先用水,后用丙酮,最后干燥。

忌用塑料容器,勿用油脂润滑活塞,否则杂质会混入溶剂中。

- 5.1 分液漏斗:500 mL 和 1000 mL 容量,配聚四氟乙烯旋塞和盖子。
- 5.2 吸滤瓶:500 mL 容量。
- 5.3 布式漏斗:瓷性滤芯,内径为 90 mm。
- 5.4 刻度管:10 mL 容量,配聚四氟乙烯塞子。
- 5.5 玻璃层析柱:长约 300 mm,内径为 8 mm~10 mm,内装孔径为 40 μm ~100 μm 玻璃滤片或玻璃毛。
- 5.6 旋转蒸发器:配备 100 mL 和 500 mL 的圆底烧瓶,水浴温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.7 振荡器或高速均浆机。
- 5.8 气相色谱系统。
- 5.8.1 组成:
 - a) 不分流或柱头进样系统;
 - b) 色谱柱;
 - c) 磷选择检测器;

- d) 静电计;
- e) 毫伏记录器和积分器;
- f) 数据处理软件和计算机系统。

进样口、柱箱和检测器应分别有独立加热装置。控温精度为 $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的气谱系统,可根据仪器使用特性调整参数,使之最优化。

5.8.2 条件:根据仪器使用说明,进样口和检测器温度分别为 $220\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 240\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $180\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 380\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。有机磷的分离用色谱柱及温度程序采用推荐条件。

5.8.3 进样设备:自动进样器或其他适当的进样装置。

手动进样,可用 $1\text{ }\mu\text{L}\sim 5\text{ }\mu\text{L}$ 的微量进样器,针长适用于进样(不分流或柱头)。在将溶液注入气相色谱仪前,先用纯溶剂洗进样器 10 次,然后用待测试液洗 5 次。进样后,用纯溶剂洗 5 次。

5.8.4 柱:毛细管柱应涂上无极性到中等极性范围的固定相,推荐使用如 SE-30, SE-54, OV-17 或其他等效固定相。

填充色谱柱,长 $2\text{ m}\sim 4\text{ m}$,内径 $2\text{ mm}\sim 4\text{ mm}$,内装 10% DC-200,涂于 Chromosorb WHP,粒度为 $0.15\text{ mm}\sim 0.18\text{ mm}$,或 2% QF-1 和 1.5% DC-200 的混合固定相,涂于 Chromosorb WHP,粒度为 $0.125\text{ mm}\sim 1.15\text{ mm}$,也可用有机磷农药分析时推荐使用的其他固定相替代。

色谱柱温度程序在附录 A 中有详细说明,以使农药的混合组分分离。

新的柱子安装后,应在略高于最高操作温度老化至少 48 h。

5.8.5 检测器:使用磷选择检测器(FPD 或 NPDP 型),各有机磷农药的最小检测限在 50 pg。

5.8.6 载气:纯氮、纯氦或纯氢气。

0.5 nm 的分子筛安装在载气气路上,使用前在 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ 活化 4 h $\sim$ 8 h。

每当装配新气瓶或必要时,应重新活化分子筛。

5.8.7 补充气:用氢气或空气。

5.8.8 系统的线性确证:用 $0.1\text{ ng}\sim 2\text{ ng}$ 的对硫磷检查系统线性。

准备 $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}\sim 1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的对硫磷工作液,进样量为 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。

以峰值(面积或峰高)对对硫磷质量(ng)作图,图形应是一条通过原点的直线。如果不呈线性,应确定检测器响应为线性的浓度范围。

6 取样

采样按 GB/T 14699 1.1。

对实验室而言样品应具有真正的代表性,并且在运输和贮存过程中没有损坏或改变。

7 试样制备

依照 GB/T 14699 1.1 将采集的样品缩分成实验室样品。

实验室样品为干燥或低湿度的产品,如谷类及其产物、棉籽、棉籽粕、配合饲料、干草等。将样品混合均匀后,进行研磨,使之能完全通过 1 mm 孔径的筛子,彻底混合。

将高湿度的样品如青草、青贮饲料等切成小块,彻底混合以获得均质样品,贮于冰箱内,冷冻保存。

8 步骤

8.1 概述

分析时应做空白,以作参比校正之用。试样和相同基质的空白试样均按分析步骤进行。

8.2 试样

干燥或低湿度的试样,称取 50 g ,高湿度的样品,称取 100 g (精确到 0.1 g)。放入 $1\text{ }000\text{ mL}$ 锥形瓶中。

8.3 提取

加水使试样总含水量约 100 g, 浸泡 5 min 左右。加 200 mL 丙酮。塞紧瓶塞, 在摇床上振荡提取 2 h 或在均浆机上匀浆 2 min。

用真空泵抽滤, 在布式漏斗(5.3)中用中性滤纸, 滤液接入 500 mL 的吸滤瓶(5.2)中。分两次加入 25 mL 丙酮清洗容器和滤纸上的残渣, 滤液收集到同一个滤瓶中。

将滤液转入 1000 mL 分液漏斗中。滤瓶用 100 mL 二氯甲烷清洗, 清洗液也倒入分液漏斗中, 加水 250 mL 和 50 mL 饱和氯化钠溶液振荡 2 min。

使相分离, 放出下层(二氯甲烷)到 500 mL 分液漏斗中, 再用 50 mL 二氯甲烷萃取两次, 合并二氯甲烷到同一分液漏斗中。

用 100 mL 水清洗二氯甲烷提取物两次, 弃去水相。

将 20 g 无水硫酸钠(4.9)加到滤纸上, 真空过滤二氯甲烷提取物, 滤液接入 500 mL 烧瓶中。用 10 mL 二氯甲烷冲洗分液漏斗和硫酸钠两次。

减压浓缩至 2 mL 左右。温度不超过 40 ℃。用 1 mL~2 mL 的正己烷将浓缩物转移到 10 mL 刻度管中, 在氮气下浓缩至 1 mL。

不要让溶液干了, 否则农药会由于挥发或溶解度差而损失。

8.4 柱净化

8.4.1 柱的制备

加 5 g 质量分数为 10% 的水脱活硅胶到玻璃层析柱内(5.5)。在硅胶顶部, 加 5 g 无水硫酸钠(4.9)。再用 20 mL 正己烷预洗柱子。

注: 硅石或弗罗里硅土(即 Millipore-SEP PAK)也可代替硅胶, 但需检验柱效及干扰情况。

8.4.2 净化

用 1 mL~2 mL 正己烷(4.2)将浓缩的提取物(8.3)定量转移到层析柱顶部。

用 50 mL 洗脱液(4.7)洗出有机磷农药, 收集洗脱液到 100 mL 的真空蒸发器的烧瓶中。

按 8.3 浓缩洗脱液, 用乙酸乙酯定容到 10 mL。

当使用内标法时, 在加乙酸乙酯定容到 10 mL 之前, 加 0.5 mL 磷酸三丁酯内标中间液。

用空白试液(8.1)做参比标准溶液。

8.5 气相色谱仪

在推荐使用条件下, 待气相色谱仪(5.8)稳定。先注射 1 μL~2 μL 标准工作液(4.13.3), 再注射等量的样品净化液(8.4.2)必要时需稀释。

根据保留时间, 确定各种农药的峰。

通过标准工作液中各已知浓度农药的峰值进行比较, 确定试样溶液中各农药的浓度。

如果结果相当或大于最高残留限量(MRLs), 将适量标准中间液(4.13.2)加到空白试液中, 以保证参比液的峰值在试样液峰值的 25% 以内。用乙酸乙酯(4.5)稀释到 10 mL, 进样量与试液进样量相同。

通过比较试样与相应的已知农药浓度的参比试液(8.4.2)的峰值来确定农药的浓度。

9 结果

9.1 计算

根据式(1)计算试样中各农药的残留量:

$$W = \frac{A \times m_s \times V}{A_s \times m \times V_1} \dots \dots \dots (1)$$

式中:

W——试样中各种农药的残留量, 单位为毫克每千克(mg/kg);

A——试样(8.4.2)峰值;

A_s ——工作液(4.13.3)或参比试液(8.4.2)中对应农药的峰值;

m_s ——标准品的进样质量,单位为纳克(ng);

V ——稀释后试样总体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——试样进样量,单位为微升(μ L);

m ——试样的质量,单位为克(g)。

9.2 回收率

根据 0.1 mg/kg 水平添加空白样品(4.14)中做的回收率试验,确证方法的可行性。

每种农药的回收率应在 70%~110%之间。

农药残留超过最高允许残留限量时,回收水平应与试样相近。

10 定性确证

当结果相当或大于最允许残留限量(MRLs)时,需要进行定性确证,可使用另一个极性不同的色谱柱进行确证,也可以用 GC-MS 进行确证。

11 精密度

11.1 允许差

大于 0.1 mg/kg 时两次平行测定的相对偏差不大于 10%。

小于 0.1 mg/kg 时两次平行测定的相对偏差不大于 20%。

11.2 重复性

在同一实验室,由同一操作者使用相同的设备,按相同的测试方法,并在短时间内,对同一被测对象,相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值,超过重复性限 r 值的情况不大于 5%。

11.3 再现性

在不同的实验室,由不同的操作者使用不同的设备,按相同的测试方法,对同一被测对象相互独立的进行测试获得两次独立的测试结果的绝对差值,超过再现性限 R 的情况不大于 5%。

12 检验报告

检验报告应详细说明:

——完整的样品鉴定所需的全部详细内容;

——如果知道,应写出采样方法;

——使用的检验方法;

——阐明标准中规定的条件或可选择条件,以及所有可能影响结果的环境条件;

——获得的结果;如果做了重复性检验,报告中应含有获得的两次结果。

附录 A

(资料性附录)

用气相色谱法测定有机磷农药的操作条件实例

示例 1:

柱:石英玻璃毛细管 OV-1,长 25 m,内径 0.25 mm,膜厚 0.25 μm 。

柱温:初温 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 130 $^{\circ}\text{C}$,然后再以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min。

进样器:250 $^{\circ}\text{C}$,不分流延迟 45 s,或柱头进样。

检测器:选择 N、P 检测器 P 型,280 $^{\circ}\text{C}$,或质谱检测器。

示例 2:

柱:石英玻璃毛细管 SE-54,长 25 m,内径 0.25 mm,膜厚 0.25 μm 。

柱温:初温 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 0.5 min,以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 130 $^{\circ}\text{C}$,然后再以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min。

进样器:250 $^{\circ}\text{C}$,不分流延迟 45 s,或柱头进样。

检测器:选择 N、P 检测器 P 型,280 $^{\circ}\text{C}$,或质谱检测器。

示例 3:

柱:石英玻璃毛细管 OV-17,长 30 m,内径 0.25 mm,膜厚 0.25 μm 。

柱温:初温 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 0.5 min,以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 160 $^{\circ}\text{C}$,然后再以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$,保持 4 min。

进样器:250 $^{\circ}\text{C}$,不分流延迟 45 s,或柱头进样。

检测器:选择 N、P 检测器 P 型,285 $^{\circ}\text{C}$,或质谱检测器。
