

液相色谱法快速测定葡萄酒中多种防霉剂的残留量

葛宝坤 高健会 王伟 刘 赵 婷 左国华

(天津出入境检验检疫局,天津 300456)

摘要:为建立同时测定葡萄酒中多种防霉剂(多菌灵、噻菌灵、苯菌灵、敌菌灵、腐霉利、联苯)的快速检测方法,采用固相萃取前处理、紫外荧光双检测器技术,高效液相色谱法测定葡萄酒中6种防霉剂的残留量。葡萄酒中6种防霉剂3个水平的添加回收率($n=7$)分别为多菌灵78%~97%、苯菌灵78%~109%、敌菌灵79%~103%、腐霉利84%~100%、联苯78%~101%、噻菌灵78%~96%;6种防霉剂的相对标准偏差(RSD)分别为多菌灵2.3%~5.2%、苯菌灵1.7%~8.1%、敌菌灵1.0%~8.2%、腐霉利3.1%~5.3%、联苯3.9%~6.1%、噻菌灵4.5%~8.1%;6种防霉剂工作曲线的相关系数 r 值均大于0.994,样品中6种防霉剂的最低检出浓度($s/n=3$)分别为多菌灵10 $\mu\text{g/L}$ 、苯菌灵50 $\mu\text{g/L}$ 、敌菌灵50 $\mu\text{g/L}$ 、腐霉利50 $\mu\text{g/L}$ 、联苯5 $\mu\text{g/L}$ 、噻菌灵2 $\mu\text{g/L}$ 。该方法适合葡萄酒中防霉剂残留量的检测。

关键词:食品添加剂;色谱法;食品污染;葡萄酒

Rapid determination of antifungal residues in grape wine by HPLC

GE Bao-kun, GAO Jian-hui, WANG Wei, LIU Yang, ZHAO Ting, ZUO Guo-hua

(Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300456, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of 6 antifungal residues in grape wines by SPE-HPLC was developed. A double channel detector was used. Carbendazine, benomyl, anilazine, procymidone and diphenyl were detected by UV spectrophotometry (254 nm). Carbendazine and thiabendazole were detected by fluorometry (EX 300 nm, EM 350 nm). Recovery experiment of each antifungal was done by adding 3 levels of its standard. The correlation coefficients of the standard working solution curves of these 6 anti-fungals were more than 0.994. The recoveries were 78%~97%, 78%~109%, 79%~103%, 84%~100%, 78%~101%, and 78%~96%; the relative standard deviations (RSD) were 2.3%~5.2%, 1.7%~8.1%, 1.0%~8.2%, 3.1%~5.3%, 3.9%~6.1% and 4.5~8.1%; and the detection limits were 10 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$ and 2 $\mu\text{g/L}$ respectively for carbendazine, benomyl, anilazine, procymidone, diphenyl and thiabendazole. The results show that the method is suitable for measurement of the 6 antifungal residues in grape wine.

Key Words: Food Additives; Chromatography; Food Contamination; Wine

防霉剂能够抑制霉菌的生长繁殖,防止葡萄在生长、存储、运输过程中腐烂变质^[1~3]。防霉剂对动物和人体具有一定的毒性,主要是侵害人体的肝脏、神经系统和骨髓^[4],联苯防霉剂对实验动物有明显的致膀胱癌作用^[5]。测定防霉剂有UV、LC、GC、GC/MS法^[1,6,8,9]、微量化学法^[2]、高速溶媒提取液相色谱法^[7]。本文介绍采用紫外、荧光双检测器高效液相色谱法,同时测定葡萄酒中6种防霉剂残留。该方法较之上述方法具有操作简便、快速、灵敏的特点。

作者简介:葛宝坤 男 副主任医师

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

WATERS 高效液相色谱仪(HPLC),配有紫外(UVD)、荧光(HLD)双检测器,双通道数据处理系统;PHENOMENEX 固相萃取(SPE)仪,COLOPARMER 超声仪,MILLIQ plus 纯水器。进口色谱纯甲醇;标准品为CHEM SERVICE提供;Waters Separk C₁₈固相萃取柱(250 mg)。

防霉剂标准品的配制 精确称取一定量的多菌灵(carbendazine),加入少量的甲醇和2滴稀盐酸(1:10),用甲醇定容,其余标准品均直接用甲醇溶解

定容,配成单标储备液,再分别取一定量的标准储备液稀释成苯菌灵(benomyl) 80 μg/ml、敌菌灵(anilazine) 150 μg/ml、腐霉利(procymidone) 200 μg/ml、联苯(diphenyl) 30 μg/ml、噻菌灵(thiabendazole) 10 μg/ml、多菌灵 50 μg/ml 的混合标准应用液。

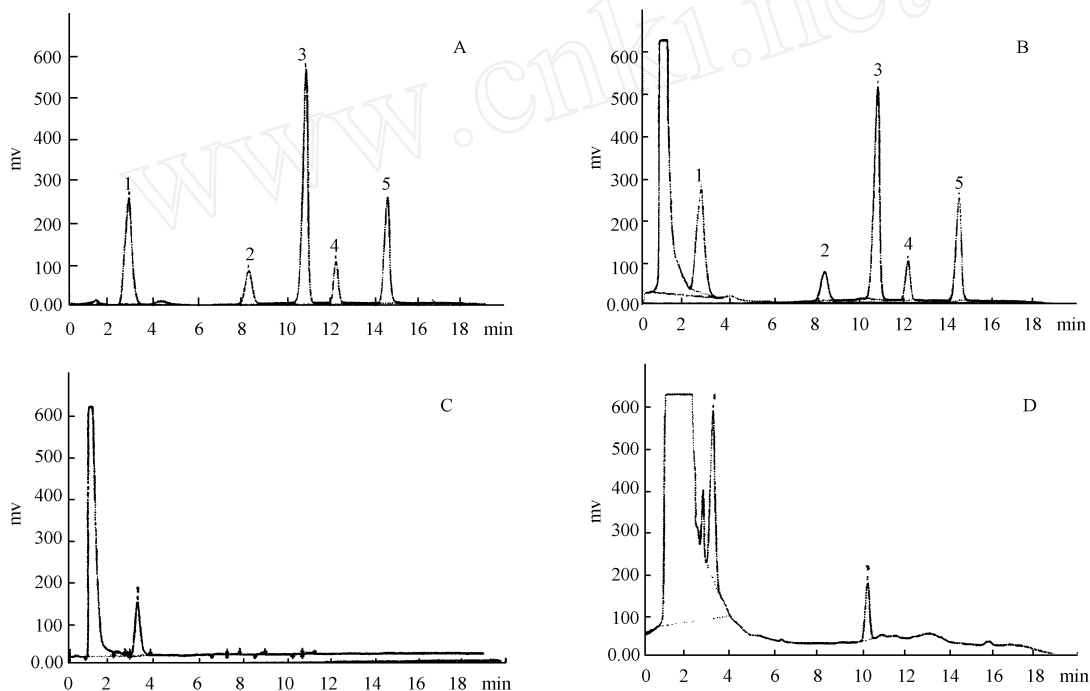
SPE小柱的活化 先用 10 ml 甲醇以每秒 2 滴的速度流过小柱,再用 10 ml 纯水淋洗。

1.2 色谱条件

Waters μBondpark C₁₈ 3.9 mm ×150 mm 不锈钢柱,流动相:甲醇+0.05 mol/L 氨水,梯度洗脱:0~

10 min,甲醇从 40% 匀速增至 60%,流速 1.0 ml/min;10~15 min 甲醇由 60% 匀速减至 40%,流速 1.5 ml/min;15~20 min 甲醇 40% 恒组分,流速 1.5 ml/min。AUFS = 0.02,柱温 35 ;UV = 254 nm;FL: E_x = 300 nm, E_m = 350 nm。根据色谱保留时间定性,以峰面积定量。双通道的紫外检测器检测多菌灵、苯菌灵、敌菌灵、腐霉利、联苯,荧光检测器同时检测多菌灵和噻菌灵。优化条件下的标准色谱图、试样加标色谱图、试样色谱图见图 1 和图 2。

1.3 试样液的制备



(A) 为标准液(1~20 μg/ml), (B) 为试样加标准液(0.2~4.0 mg/L), (C) 为阳性干白葡萄酒, (D) 为阳性红葡萄酒原液。1:多菌灵, 2:苯菌灵, 3:敌菌灵, 4:腐霉利, 5:联苯。

图 1 液相色谱 - 紫外检测色谱图

准确吸取 5.0 ml 的混匀酒样,2 min 内匀速注入已活化的 SPE 小柱,先用 5% 甲醇水 10 ml 淋洗,再用 2 ml 甲醇洗脱,收集洗脱液,洗脱液直接经 0.45 μm 滤膜过滤,即为测试样液。

1.4 加标试样液的制备

准确吸取 5.0ml 的混匀葡萄酒样,加入一定体积的混合标准应用液,充分混匀,按照 1.3 试样液制备程序操作,制得加标试样液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的优化 采用正交实验进行条件优化后,紫外检测器最大吸收波长 254 nm,荧光检测器 E_x = 300 nm, E_m = 350 nm。

2.1.2 流动相的优化 据文献报道,HPLC 测定防腐剂常用的流动相有甲醇+0.05 mol/L 氨水(),

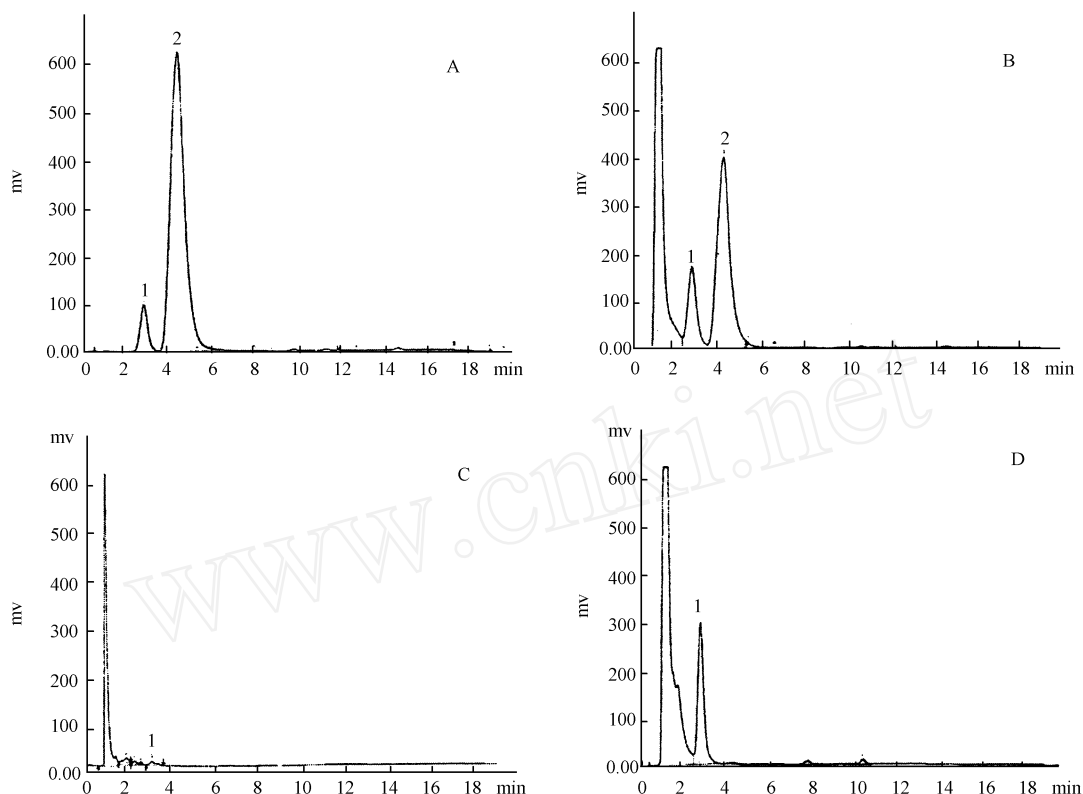
25% 乙晴+0.05 mol/L 醋酸铵(pH=4) 缓冲液(), 甲醇+0.02 mol/L 磷酸盐(pH=7.1) 缓冲液(), 实验表明 3 种流动相的组成对 6 种防腐剂的分离效果是 > > 。

2.2 校正工作曲线、线性范围和检出限 取空白葡萄酒试样若干份,分别加入不同体积的标准应用液,混匀,按照 1.3 试样处理方法处理,经测定 6 种防腐剂工作曲线回归方程、相关系数、线性范围、最低检出限浓度见表 1。

2.3 回收率和精密度 分别在干白、干红、葡萄酒原液中加入一定量的混合标准应用液,按照实验方法操作,其回收率为 78%~109%,相对标准偏差为 1.0%~8.2%,见表 2。

2.4 影响因素

2.4.1 酒精度对 SPE 萃取效率的影响 研究结果表明,在 8%~13% 葡萄酒酒精度范围内,SPE 的萃



(A) 为标准液(1~20 µg/ml), (B) 为试样加标准液(0.2~4.0 mg/L), (C) 为阳性干白葡萄酒, (D) 为阳性红葡萄酒原液。1:多菌灵, 2:噻菌灵。

图2 液相色谱-荧光检测色谱图

表1 6种防腐剂的回归方程、相关系数、线性范围、最低检出限浓度

测定组分	最小检出量(µg)	最低检出浓度(µg/L)	回归曲线方程	相关系数
Carbendazine	0.4	10	- 2.427481E+00 + 1.472873E- 05 * R	0.999
Thiabendazole	0.1	2	1.056378E+00 + 1.176342E- 06 * R	0.999
Benomyl	2.0	50	6.956917E- 01 + 4.654522E- 05 * R	0.994
Anilazine	2.0	50	- 2.463498E- 00 + 8.442235E- 06 * R	0.995
Procymidone	2.0	50	- 2.588390E- 01 + 5.126953E- 05 * R	0.997
Diphenyl	0.2	5	- 8.392395E- 01 + 2.140957E- 05 * R	0.998

表2 添加回收试验

(n = 7)

	干白葡萄酒			干红葡萄酒			葡萄酒原液		
	添加量 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)	添加量 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)	添加量 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
Carbendazine	0.30	78	5.1	0.30	79	5.2	0.30	80	5.2
	1.20	92	3.7	1.20	91	3.6	1.20	91	3.5
	5.60	97	2.3	5.60	96	2.4	5.60	96	2.3
Thiabendazole	0.05	80	7.8	0.05	78	8.1	0.05	79	8.0
	0.20	91	5.4	0.20	90	5.5	0.20	91	5.4
	0.80	96	4.5	0.80	95	4.6	0.80	95	4.6
Benomyl	0.40	79	8.0	0.40	78	7.9	0.40	79	8.1
	1.60	88	2.5	1.60	88	2.5	1.60	89	2.4
	6.40	108	1.7	6.40	109	1.8	6.40	108	1.7
Anilazine	0.60	80	8.1	0.60	79	8.2	0.60	78	7.9
	2.40	84	1.2	2.40	85	1.2	2.40	84	1.3
	9.60	102	1.0	9.60	103	1.0	9.60	103	1.1
Procymidone	1.00	84	5.3	1.00	85	5.3	1.00	84	5.4
	4.00	95	4.2	4.00	94	4.4	4.00	94	4.2
	16.00	100	3.3	16.00	102	3.2	16.00	100	3.1
Diphenyl	0.20	79	6.1	0.20	78	6.1	0.20	79	6.0
	0.80	88	4.9	0.80	89	5.1	0.80	89	5.0
	3.20	99	4.0	3.20	101	3.9	3.20	100	4.0

微波对茶叶中霉菌的灭菌效果研究

朱金国 张运北 文国华 何文斌 黄志强 袁智能
(湖南出入境检验检疫局,湖南 长沙 410007)

摘要:为解决茶叶中霉菌的污染问题,研究了不同微波条件对茶叶中霉菌的杀灭效果,以达到在茶叶加工中综合利用微波实行加热制作和杀除霉菌的双重目的。试验结果表明:微波对茶叶中霉菌的处理效果随茶叶水分含量的增加而增强,同时与茶叶的处理物料量、容器介质及水分扩散条件有关。使用 800 W 功率的微波炉,处理 135 s,可将 250 g 茶叶中的霉菌完全杀灭。处理 120 s,可将鲜茶料和发酵茶料中的霉菌完全杀灭。轻度的微波作用对茶叶中霉菌生长有激活效应,微波加热超过 150 s,会对茶叶本身的品质造成损害。在茶叶的初制加工过程中,进行微波处理,可有效地控制茶叶中的霉菌,同时实现对茶叶料的热烘干。

关键词:微波;茶叶;真菌类;灭菌

Study on sterilizing effect of microwave on tea moulds

ZHU Jin-guo, ZHANG Yun-bei, WEN Guo-hua, HE Wen-bin, Huang Zhi-qiang, Yuan Zhi-neng
(Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hunan Changsha 410007, China)

Abstract: Moulds have been a long-standing hazardous problem in food industry because it produces harmful mycotoxins. How to control moulds in the processing of tea has been a difficult technical problem for a long time. This work studied the mould-preventing effect of microwave treatment on tea products and their controlling conditions. It was shown that the microwave sterilizing treatment grew more effective with the increased moisture of the tea. And the effect is also related to the quantity of tea treated, the material of

取效率不受影响。

2.4.2 pH 值对 SPE 萃取效率影响 研究表明,葡萄酒的 pH 值不影响 SPE 的萃取效率。

2.4.3 操作温度对测定的影响 在标准和试样测试过程中,应保持操作时的温度基本恒定,一般在室温下操作即可保证有足够的灵敏度,处理后的试样也应尽快分析。

2.4.4 天然色素的影响 在红葡萄酒中,存在葡萄酒红天然色素,在 SPE 柱上它和待测防霉剂具有相似的吸附和解吸附性质,但在本法色谱条件下,其保留时间小于 2 min,早于最先出峰的多菌灵($R_t = 2.99$ min),所以该色素成分不干扰 6 种防霉剂的测定。

参考文献

[1] 沈小婉. 色谱法在食品分析中的应用 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1992, 162.

- [2] 黄志强, 熊芳. 微量化学气相色谱快速测定葡萄酒中霉菌利残留量 [J]. 色谱, 1993, 11 (4): 246-247.
- [3] 张学俊, 吴仁安. 葡萄酒中酚类高效液相色谱分析 [J]. 分析化学, 1998, 26 (12): 1523-1523.
- [4] 金锋, 译. 工业生产中的有害物质手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1986, 193.
- [5] 凌关庭, 王亦云, 唐述潮. 食品添加剂手册 (上册) [M]. 北京: 化学工业出版社, 1989, 300.
- [6] 邵俊杰. 食品理化检验 [Z]. 湖北商检局情报资料中心, 1992, (3): 3-4.
- [7] 柿本幸子. 高速溶媒提取液相色谱法测定水果中杀菌剂 [J]. 食品卫生学杂志 (日), 1997, 38 (5): 358-362.
- [8] 金恒亮. 高压液相色谱法 [M]. 北京: 原子能出版社, 1987, 71.
- [9] S Navarro, A Barba, G Navarro, et al. Multiresidue method for the rapid determination in grape, must and wine of fungicides frequently used on vineyards [J]. J Chromatogr A, 2000, 882: 221.

[收稿日期: 2004-12-26]

中图分类号: R15; Q378.3; TS254.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2005)02-0160-04

作者简介: 朱金国 男 高级工程师

微波对茶叶中霉菌的灭菌效果研究——朱金国 张运北 文国华等

— 163 —