

论著

ASE - SPE 萃取液相色谱分析干香菇中多菌灵残留量

吴刚^{1,2} 虞慧芳³ 俞春燕¹ 朱晓雨¹ 叶庆富²

(1. 浙江出入境检验检疫局,浙江省食品安全重点实验室,浙江 杭州 310012;2. 浙江大学原子核农业科学研究所,浙江 杭州 310029;3. 浙江省农业科学院蔬菜研究所,浙江 杭州 310021)

摘要:目的 建立一种新型快速测定干香菇中多菌灵残留量的方法。方法 用加速溶剂萃取(ASE) LC-SCX小柱净化,以甲醇+乙酸铵(45+55,体积分数)为流动相,配备 Xterra-C₁₈柱、紫外检测器(280 nm)的高效液相色谱仪对待测组分进行分离和测定。结果 干香菇样品中多菌灵添加回收率在 76%~105%之间,相对标准偏差(RSD, n=6)小于 10%,多菌灵在样品中的最低检出浓度为 0.01 mg/kg。结论 该方法定量准确、快捷,操作简便,灵敏度高,满足多菌灵残留分析要求。

关键词:色谱法;高压液相;香菇属;农药;农药残留量

Determination of Carbendazim Residues in Dried Thin Mushroom by High Performance Liquid Chromatography with ASE-SPE

WU Gang, YU Hui-fang, YU Chun-yan, ZHU Xiao-yu, YE Qing-fu

(Zhejiang Exit-Entry Inspection & Quarantine Bureau, Zhejiang Province Key Food Safety Laboratory, Zhejiang Hangzhou 310012, China)

Abstract: Objective A new fast analytical method for carbendazim residues in dried thin mushroom was developed. **Method** Carbendazim residues were extracted with the accelerated solvent extract, cleaned up by LC-SCX column and determined by HPLC. The separation and determination conditions of HPLC were Xterra-C₁₈ column, methanol-acetic acid ammonium (45/55, V/V) as mobile phase, and UV detection at 280 nm. **Results** The fortified recoveries of carbendazim in the negative dried thin mushroom samples were from 76% to 105%. The relative standard deviation was less than 10%, and the limit of detection was 0.01 mg/kg. **Conclusion** The method is fast, accurate, simple, convenient, and sensitive. It can meet the needs of determination of carbendazim residues.

Key word: Chromatography, High Pressure Liquid; Lentinula; Pesticides; Pesticide Residues

多菌灵[carbendazim, N-(2-苯并咪唑基)氨基甲酸甲酯],是一种苯并咪唑类高效低毒广谱内吸性杀菌剂,其作用机理是通过干扰菌体细胞纺锤体的形成干扰细胞分裂,对植物具有良好的保护和治疗作用,主要用于防治由子囊菌、半知菌和担子菌引起的大田作物、蔬菜、果树及经济作物上的多种病害^[1]。多菌灵的化学性质稳定,能通过作物叶片和种子渗入植物体内,耐雨水冲洗,残效期长,可通过食道引起中毒,而且其他多种苯并吡唑类和托布津类杀菌剂均可通过在作物体内转化为多菌灵的形式起作用,因此多菌灵在农作物中的残留量是影响产品质量的主要指标之一^[2]。目前,日本制定的肯定列表制度,对香菇、蘑菇设定的限量为 0.1 mg/kg,无疑增加了农产品对日出口风险。近年来,多菌灵在多种新鲜农产品上的残留分析方法有许多报导,如

荧光分析法、红外光谱法、气相色谱法、薄层扫描法、可见光比色分析及紫外光谱法等。其中,薄层扫描法灵敏度较低,比色法及荧光法操作较繁琐且易受干扰,而气相色谱法需要对样品进行衍生化处理,易造成多菌灵损失^[3]。Muccio 等人采用液相色谱分析多菌灵残留的方法,前处理较为繁杂,检测周期长^[4-6]。对于基质成分较为复杂的干样,如干香菇等样品中多菌灵的残留分析方法尚未见报道,本文试图建立一种新型的检测干样品中多菌灵残留量的方法,采用现代化的新型仪器加速溶剂萃取仪(ASE)萃取样品中的多菌灵残留,然后通过固相萃取净化样品,从而大大减轻了劳动强度,提高了工作效率,加速了样品的检测速度,适合在农产品安全监测和进出口食品检验中推广应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 ASE 加速溶剂萃取仪(ASE200,

基金项目:浙江省重点科技攻关项目资助(2005C23068)

作者简介:吴刚 男 博士生



DIONEX 公司)、固相萃取仪(SUPELCO 公司)、Agilent 1100 型液相色谱仪(配二极管阵列紫外检测器)、色谱柱 Xterra-C₁₈, 5 μm, 4.6 mm(i. d.) ×25 cm(Waters 公司)、LC-SCX 小柱(SUPELCO 公司)、样品粉碎机、涡旋仪、旋转蒸发仪等及常规玻璃器皿。

1.1.2 试剂 多菌灵标准品(含量 99.0%, 购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)、甲醇(HPLC 级)、丙酮(HPLC 级)、二氯甲烷(HPLC 级)、硅藻土、碳酸氢钠、NH₄Ac、无水硫酸钠(650 灼烧 4 h, 冷却至室温, 置干燥器中备用)、盐酸、氨水(均为分析纯)、蒸馏水、2% 氯化甲醇(体积分数)。

1.2 分析方法

1.2.1 提取 称取 5.0 g 粉碎均匀的干香菇试样(精确到 0.1), 加入 2.0 g 碳酸氢钠, 然后加入适量硅藻土拌匀, 置于 ASE 试样管中, 盖上盖子, 放入 ASE 加速溶剂萃取仪的试样管卡口处, 提取。ASE 运行程序如下: 温度 100 °C, 压强 2000 psi, 预热 0 min, 加热 5 min, 用二氯甲烷 + 丙酮(50 + 50, 体积分数)混合溶剂静态萃取 5 min, 60% 溶剂快速冲洗试样, 60 s 氮气吹扫收集全部提取液。提取完成后, 将提取液过无水硫酸钠层, 收集于平底烧瓶中, 35 °C 水浴中减压浓缩近干, 然后用 N₂ 吹干。

1.2.2 净化 参照文献[6], 将 LC-SCX 小柱依次用 5 ml 甲醇、5 ml 水活化, 然后用 5 ml 0.1 mol/L 的盐酸溶液分 2 次将浓缩的试样残渣转入小柱, 用 5 ml 水淋洗弃去, 再用 5 ml 甲醇淋洗弃去, 然后加入 2.5 ml 2% 氯化甲醇淋洗弃去, 最后用 5 ml 2% 氯化甲醇洗脱收集, 将收集的洗脱液用 N₂ 吹干, 用甲醇定容为 1 ml。

1.2.3 液相色谱检测条件 多菌灵在 208 nm 和 280 nm 处有较大吸收, 为了避免杂质干扰, 选择紫外检测器波长 280 nm。色谱柱采用 Xterra-C₁₈, 5 μm, 4.6 mm(i. d.) ×25 cm, 柱温为 40 °C。流动相为甲醇 + 5 mmol/L 的 NH₄Ac 溶液(45 + 55); 流速: 1 ml/min; 进样量: 20 μl。

2 结果与讨论

2.1 方法线性关系的确定 用甲醇配制 0.1、1.0、3.0、5.0、10.0 μg/ml 系列浓度的多菌灵标准溶液, 在所选定的色谱条件下进样, 每个浓度至少重复 3 次, 得到峰面积的平均值, 对进样浓度与检测器峰面积绘制校正曲线(见图 1), 峰面积与质量浓度成正比, 线性方程为 $y = 53.613x - 12.98$, 相关系数 r 为 0.995 1。

2.2 方法的检测灵敏度 在上述试样处理方法及色谱条件下, 多菌灵的保留时间为 7.227 min, 最小

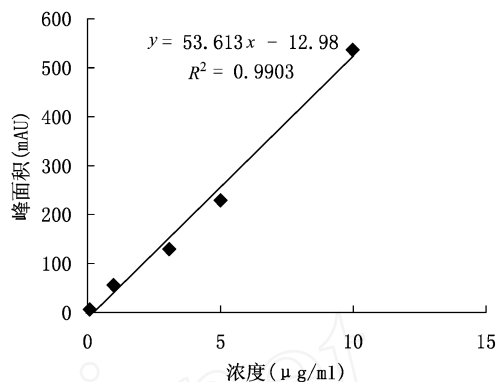


图 1 多菌灵校正曲线图

检出量为 0.9 ng, 最低检出浓度为 0.01 mg/kg。我国规定的多菌灵 MRL 值为 0.5 mg/kg, 日本肯定列表制度规定干香菇中多菌灵的 MRL 值为 0.1 mg/kg, 显然该方法能满足检测的灵敏度要求。

多菌灵的 U.V 光谱图、HPLC 标准图谱及阴性样品与添加样品的色谱图如图 2~5 所示, 从图可以看出, 多菌灵有特征光谱图, 经过 LC-SCX 柱净化的样品, 液相色谱分离度较好, 可直接用于阳性样品的定性、定量分析, 不需使用价格昂贵的液质联用仪亦可得到准确的结果。

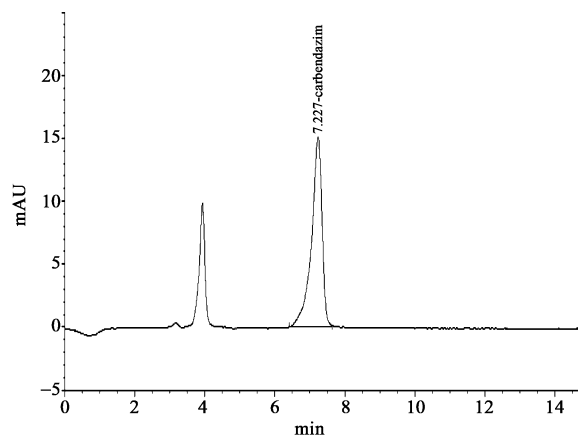


图 2 多菌灵标准色谱图

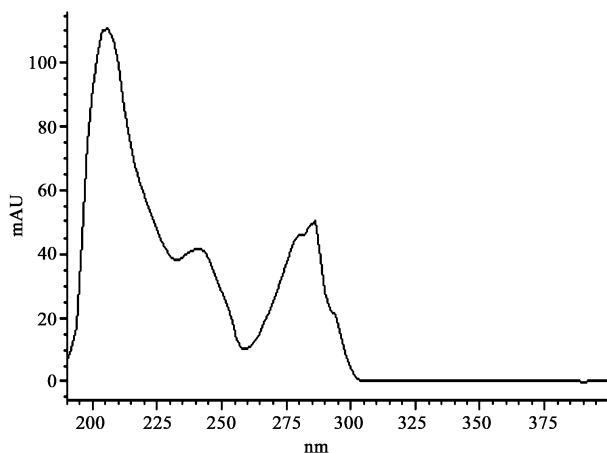


图 3 多菌灵标准紫外光谱图

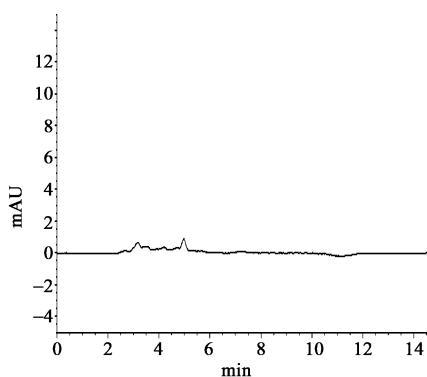


图 4 干香菇阴性样品色谱图

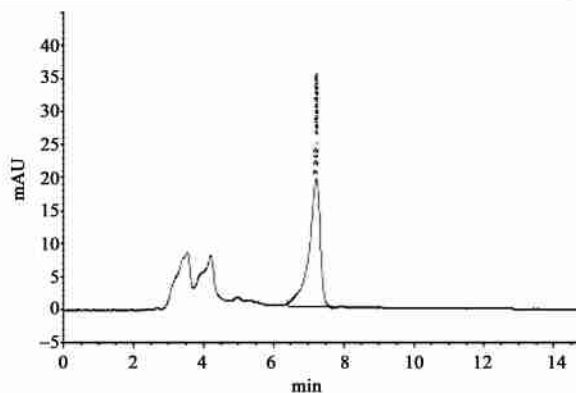


图 5 干香菇空白样品添加多菌灵色谱图

2.3 添加回收率和精密度试验 称取 5.0 g 粉碎均匀的干香菇阴性试样(精确到 0.1),分别添加 0.1、0.5、5.0 mg/kg 的多菌灵标准溶液,按照上述的提取、净化与色谱条件,测定干香菇样品中的多菌灵含量,每个浓度重复 6 次,测定结果和相对标准偏差详见表 1,多菌灵在干香菇样品中的添加回收率在 76%~105%之间,RSD 小于 10%,结果表明该方法满足残留分析要求。

3 结论

多菌灵的溶解性受 pH 值变化的影响较大,碱性条件下,多菌灵水溶性降低,易被有机溶剂萃取。酸性条件下,水溶性增强,易从有机溶剂中反萃取。本文利用多菌灵在碱性条件下以分子状态存在,易溶于有机溶剂这一特性,在试样中加入适量的碳酸氢钠,用 ASE 直接提取,经过 LC-SCX 阳离子固相萃取小柱净化,采用 0.1 mol/L 的盐酸溶液将浓缩的试样残渣转入小柱,先用 5 ml 水洗脱,弃去,再用 5 ml 甲醇洗脱,弃去,可以使得大部分杂质被洗脱掉,

表 1 多菌灵在干香菇样品中的添加回收率

添加浓度 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%) (n=6)		
0.1	0.086	0.082	86.0	82.0	90.7	8.9
	0.090	0.087	90.0	87.0		
	0.105	0.094	105.0	94.0		
0.5	0.450	0.380	90.0	76.0	85.0	7.7
	0.390	0.460	78.0	92.0		
	0.430	0.440	86.0	88.0		
5.0	4.450	4.620	89.0	92.4	88.3	7.2
	4.190	3.900	83.8	78.0		
	4.750	4.690	95.0	91.8		

而多菌灵则被 LC-SCX 阳离子固相萃取小柱吸附。加入适量 2% 氯化甲醇淋调节 pH 值到碱性,最后用 5 ml 2% 氯化甲醇洗脱收集,可达到理想的净化效果。采用甲醇与乙酸铵作为流动相,多菌灵的色谱峰形较为理想,样品基质对多菌灵不产生干扰,且多菌灵有较为特殊的光谱图,有利于阳性样品的确证,从而使得定性定量结果更准确可靠。多菌灵的检测线性范围为 0.1~10 μg/ml,添加回收率在 76%~105% 之间,最低检出量 0.9 ng,样品的最低检测浓度为 0.01 mg/kg,该方法定量准确、快捷,操作简便,灵敏度高,满足农药残留分析要求。

参考文献

- [1] 王振荣,李布青. 农药商品大全[M]. 北京:中国商业出版社, 1996:351-352.
- [2] 吴丽明,黄伯俊. 多菌灵对小鼠精子形态及雄鼠生育力的影响[J]. 职业医学,1992,19(1):11-12.
- [3] 桂文君,黄雅丽,吴慧明,等. 多菌灵在柑桔及土壤中的 HPLC 残留分析方法[J]. 现代农药,2004,3(3):25-27.
- [4] MUCCIO A DI, COMONI I, VENTRICLIA M, et al. Simplified clean-up for the determination of benzimidazole fungicides by high-performance liquid chromatography with UV detection[J]. Journal of Chromatography A, 1995,697:145-152.
- [5] ANNA S. Investigation into contamination of processed fruit products by carbendazim, methyl thiophanate and thiabendazole [J]. Food Chemistry, 1995,52: 57-61.
- [6] FERNANDEZ M, RODRIGUEZ R, PICO Y, et al. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of postharvest fungicides in citrus fruits[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 912: 301-310.

[收稿日期:2007-03-22]