

# 固相萃取- HPLC 法测定浓缩梨汁中 噻菌灵、多菌灵的残留量

刘晓松<sup>1,2</sup>, 高欣<sup>3</sup>, 童张法<sup>2</sup>, 刘军义<sup>1</sup>

(1. 广西出入境检验检疫局技术中心, 广西南宁 530021;

2. 广西大学 化学化工学院, 广西南宁 530004; 3. 北京出入境检验检疫局技术中心, 北京 100026)

**摘要:** 研究了一种可同时测定浓缩梨汁中噻菌灵和多菌灵残留量的固相萃取-高效液相色谱分析方法. 浓缩梨汁样品与水按一定比例稀释后, 经过调 pH、离心、过滤, 用混合相固相萃取小柱 (Mixed mode SPE) 进行提取、净化, 用配有二级管阵列检测器 (DAD) 的液相色谱仪检测, 外标法定量. 使用噻菌灵和多菌灵对照品进行添加回收率测定, 结果显示本方法对噻菌灵的最低检出限为 0.020 mg/kg, 回收率为 80.5% ~ 84.3%; 对多菌灵的最低检出限为 0.020 mg/kg, 回收率为 83.2% ~ 92.5%; 测定的相对标准偏差均不大于 5%. 本方法简单、快速、准确, 能满足常规噻菌灵和多菌灵残留量检测的需要.

**关键词:** 固相萃取; 浓缩梨汁; 噻菌灵; 多菌灵; 残留量

**中图分类号:** O657.32

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1006-3757(2006)03-0131-05

噻菌灵 (Thiabendazole) 和多菌灵 (Carbendazim) 均属苯并咪唑类杀菌剂, 是高效、低毒和广谱的内吸性杀菌剂, 并具有预防和治疗作用. 这类杀菌剂广泛应用于水果等多种作物生长期和储存期真菌性病害的防治, 若使用不当, 会在水果及由水果制成的果汁中残留. 我国及国际上各国对水果及果汁中噻菌灵和多菌灵的残留量都十分重视, 分别制定了各自的残留限量标准<sup>[1]</sup>, 最低残留限量达 0.05 mg/kg.

在国外, 噻菌灵和多菌灵残留量测定采用的是 FDA 的分析方法<sup>[2,3]</sup>, 主要是通过连续的液-液分配步骤来实现样品的萃取与净化以制备供试品, 随着时间的推移, 原有的检验方法已不适应形势发展的需要. 目前我国尚未制定噻菌灵和多菌灵残留量同时测定的国家标准, 行业标准有 1993 年发布的 (SN0220-93 出口水果中多菌灵残留量检验方法)<sup>[4]</sup> 和 1996 年发布的 (SN0606-1996 出口乳及乳制品中噻菌灵残留量检验方法-荧光分光光度法)<sup>[5]</sup> 2 项, 采用的是连续的液-液分配步骤来制备供试品, 操作

过程繁琐, 检验周期长, 仅样品的前处理就需要一天半到二天的时间. 目前国内尚无浓缩梨汁中噻菌灵和多菌灵残留量的检验标准, 对其残留量同时进行检测的文献报道也很少, 随着固相萃取技术 (SPE) 的发展和广泛应用, 通过样品预处理小柱处理<sup>[6,7]</sup> 即可实现样品的分离、净化, 既节约成本又免除繁重复杂的劳动, 样品的前处理只需 3 ~ 4 h, 能达到快速、简单、准确的目的.

本研究旨在建立一种操作步骤较为简单, 并可满足浓缩梨汁中噻菌灵和多菌灵残留量同时测定的分析方法.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱系统 (配四元泵、DAD、自动进样器及色谱数据处理工作站) 购自美国 Agilent 公司; 固相萃取装置购自美国 SUPELCO 公司; AE 240 型分析天平 (精度 0.000 01 g) 及 Delta-320 型酸度计购自上海梅特勒-托利多公司;

收稿日期: 2006-03-14; 修订日期: 2006-05-11.

基金项目: 国家质检总局制标项目 (No: B105 - 2003)

作者简介: 刘晓松 (1965 - ), 男, 高级工程师, 在读博士生, 主要从事进出口商品中农药、兽药残留检验及检测方法研究.

LG10-2.4A 型离心机购自北京医用离心机厂; Oasis MCX 混合相固相萃取小柱(150 mg, 6 mL)和 Millipore 溶剂过滤器系美国 Waters 公司产品。

噻菌灵、多菌灵对照品由中国检验检疫科学研究院陆桥公司供给(含量均不低于 99.0%)。

水为超纯水,甲醇、乙腈:色谱纯。其余试剂除非特别说明,均为分析纯。

氨水(0.15 mol/L)-甲醇溶液(7+3):混合 30 mL 甲醇、2 mL 7.5 mol/L 氨水,以水定容至 100 mL。

氨水(0.3 mol/L)-甲醇溶液:4 mL 7.5 mol/L 氨水溶于 100 mL 甲醇中。

## 1.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> 柱, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相为 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 + 乙腈(72+28, 体积比), 用前经 0.45 mm 滤膜过滤, 并超声脱气; 流速为 1.0 mL/min; 色谱柱温度为室温; 进样量为 20 μL; DAD 选择 288 nm 作为检测波长。

当样品谱图和对照品谱图色谱峰保留时间一致时, 采用 DAD 对该色谱峰进行紫外光谱特征扫描, 作为定性确证的依据, 以避免假阳性结果。

应用此色谱条件可获得良好的分离, 出峰时间和峰形对称性较理想。噻菌灵、多菌灵混合对照溶液的色谱图如图 1。

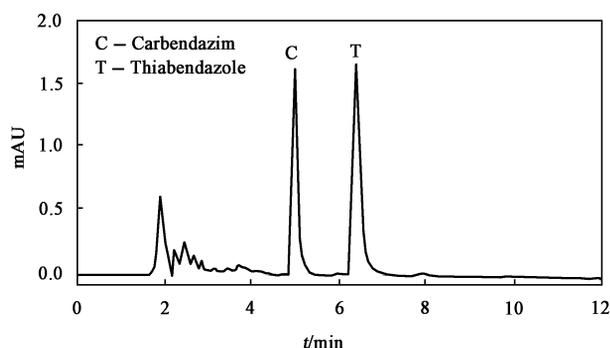


图 1 噻菌灵、多菌灵混合对照溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of a mixture of the Carbendazim and Thiabendazole standards

## 1.3 对照溶液的配制及线性范围的确定

噻菌灵、多菌灵对照品储备液: 称取噻菌灵、多菌灵对照品各 10.0 mg, 用甲醇溶解并定容到 100 mL, 浓度为 100 μg/mL (标准储备液在 -20℃ 冷冻条件下可以储存 4 个月)。

噻菌灵、多菌灵对照品工作液: 准确移取上述对照品储备液, 根据需要用流动相配制制成 5 种不同浓度的对照品工作液(所有对照品工作液均需在冷藏条件下储存, 每周配制)。对照品工作液浓度分别为: 0.010, 0.020, 0.050, 0.100, 0.200 mg/mL, 每一浓度进样 3 次, 按上述色谱条件进行分析, 得出各种浓度所对应的峰面积和峰高。其含量(X)与峰面积或峰高(Y)均有良好的线性关系, 取峰高计算。

噻菌灵回归方程:

$$Y = 376.52X + 0.0082, \quad r = 0.99980.$$

多菌灵回归方程:

$$Y = 386.52X - 0.0032, \quad r = 0.99991.$$

## 1.4 样品预处理

### 1.4.1 浓缩梨汁样品的提取

称取 10.0g 浓缩刺梨汁, 加水稀释, 用 2 mol/L NaOH 调 pH = 10, 振荡混匀并定容至 100 mL。取部分溶液, 倒入 50 mL 聚丙烯塑料离心管中以 8000 r/min 速度离心 10 min, 吸取上清液备用(如果样液中组份浓度超出线性范围, 则做适当稀释)。

### 1.4.2 浓缩梨汁样品的净化

预先将混合相固相萃取小柱(Oasis MCX, 150 mg, 6 mL)顺序用 2 mL 甲醇、3 mL 0.15 mol/L 氨水进行使用前活化。

准确吸取 10.0 mL 离心上清液上混合相固相萃取小柱, 依次用 2 mL 0.15 mol/L 氨水、2 mL 氨水(0.15 mol/L)-甲醇溶液、2 mL 0.1 mol/L HCL、3 mL 甲醇淋洗小柱, 弃去淋洗流出液, 整个淋洗过程的流速控制在 3 mL/min 以内。最后用 3 mL 氨水(0.3 mol/L)-甲醇溶液洗脱柱子, 收集洗脱液, 于 45℃ 水浴用微弱的氮气吹干。用 1.0 mL 流动相溶解残渣, 经 0.45 mm 滤膜过滤后, 供液相色谱测定用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品的提取和稀释

浓缩梨汁是呈液体粘稠物状的浓缩果汁, 样品处理时稀释比例太小则不能达到使试样分散均匀的效果, 影响其后调 pH 和上柱净化的操作, 转移过程损失大, 回收率达不到要求。因此, 经过摸索, 我们将果汁与水的稀释比例定为 1:10, 上柱净化前再固定地取一定量, 就能很好地解决问题, 且对呈液体粘稠物状的浓缩果汁都适用。

2.2 淋洗剂流速对回收率的影响

对于混合相固相萃取小柱 (Mixed-mode SPE) 净化方法,用 2 mL 噻菌灵、多菌灵标准溶液 (0.2 mg/mL) 上柱,依次洗脱,记录流出液体积和洗脱时间,考察淋洗剂流速对方法回收率的影响,结果表明:淋洗剂流速小于 3.0 mL/min 时,淋洗剂流速的变化对回收率的影响就不明显了.本方法中淋洗剂的流速控制在 3.0 mL/min 以内.

2.3 色谱条件的选择

为了获得噻菌灵、多菌灵的最佳 UV 检测响应,在 190 ~ 400 nm 范围内对噻菌灵、多菌灵进行了吸收强度扫描,结果显示噻菌灵的最大紫外吸收波长为 298.2 nm,多菌灵的最大紫外吸收波长为 286.0 nm.考虑到对二者进行同时检测,因此,我们选用 288 nm 作为检测波长.

根据噻菌灵、多菌灵化学特性,分析时采用的色谱柱一般为 C<sub>18</sub> 色谱柱.经比较 Xterra RP<sub>18</sub>、Spherisorb C<sub>18</sub>、Zorbax SB C<sub>18</sub>、Zorbax-Extend C<sub>18</sub> 色谱柱,结果发现对于浓缩刺梨汁中噻菌灵、多菌灵的测定,这些 C<sub>18</sub> 色谱柱都有较好的分离效果,但相对而言,用 Zorbax SB C<sub>18</sub> 柱和 Xterra RP<sub>18</sub> 柱得到的谱图更优、峰型更好,特别是在使用 250 mm 长柱时这一现象尤为明显,分离效果好,可满足分析精度需要.为此,在本文中选用 250 mm 的 Zorbax SB C<sub>18</sub> 色谱柱.

分析噻菌灵、多菌灵残留量时常用乙腈-磷酸盐缓冲溶液作为流动相体系.实验研究了不同比例乙腈-磷酸盐缓冲溶液 (0.02 mol/L, pH = 6.8) 体系的分离效果,结果表明在乙腈:磷酸盐缓冲溶液的比例为 28 : 72 时,出峰时间和峰形对称性均较理想.

2.4 方法的线性关系

准确吸取噻菌灵、多菌灵对照品储备液,以流动相为溶剂配制成对照品工作液系列.溶液浓度分别为:0.010、0.020、0.050、0.100、0.200 mg/mL,每一浓度进样 3 次,按上述色谱条件进行分析,得出各种浓度所对应的峰面积和峰高.其含量 (X) 与峰面积或峰高 (Y) 均有良好的线性关系,取峰高计算.

噻菌灵回归方程:

$$Y = 376.52 X + 0.0082, \quad r = 0.99980.$$

多菌灵回归方程:

$$Y = 386.52 X - 0.0032, \quad r = 0.99991.$$

2.5 添加回收率及精密度试验

在 10.0 g 浓缩梨汁样品中添加适宜浓度的混

合对照溶液 1.0 mL,制得所需的阳性添加样品,并依“1.4”和“1.5”节的方法进行样品的提取和净化.实验分别就浓缩梨汁中噻菌灵、多菌灵的最高残留限量 (MRL) 值设计了添加浓度水平,在回收率及精密度试验中选择包括测定最低检出限和最高残留限量在内的 4 个不同水平.

通过外标法定量,得到相应的平均回收率及批间相对标准偏差,测定结果见表 1、表 2.

表 1 噻菌灵回收率和方法的精密度

Table 1 Recovery of thiabendazole and precision of the method from concentrated pear juice

Spiked/ (mg/ kg)	Found/ (mg/ kg)	Recovery (n = 3)/ %	RSD (n = 10) / %
0.020	0.016	80.5	3.60
0.050	0.041	82.0	2.51
0.100	0.083	83.4	2.78
0.200	0.169	84.3	2.25

表 2 多菌灵回收率和方法的精密度

Table 2 Recovery of carbendazim and precision of the method from concentrated pear juice

Spiked/ (mg/ kg)	Found/ (mg/ kg)	Recovery (n = 3)/ %	RSD (n = 10) / %
0.020	0.019	92.5	4.14
0.050	0.043	85.8	3.22
0.100	0.083	83.2	2.72
0.200	0.178	89.0	2.01

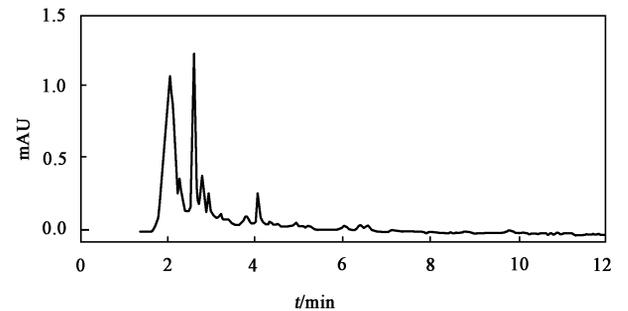


图 2 浓缩梨汁样品空白谱图

Fig. 2 Chromatogram of the blank concentrated pear juice sample

3 结论

在对浓缩梨汁中噻菌灵、多菌灵残留量的测定中,由于前处理时使用了混合相固相萃取小柱

(Mixed-mode SPE), 可以排除浓缩梨汁中大部分干扰物质的影响. 使用二级管阵列紫外检测器 (DAD), 能够达到方法检测所需要的灵敏度, 同时

汁中噻菌灵、多菌灵残留量检测的需要, 可以作为常规残留检测方法使用.

#### 参考文献:

- [ 1 ] 林维宣. 各国食品中农药兽药残留限量规定 [M]. 大连: 大连海事大学出版社, 2002.
- [ 2 ] Pesticide Analytical Manual. 1990 Vol. I. U. S. Food and Drug Administration. Rockville, MD. sec. 404.
- [ 3 ] Levine R A, Luchtefeld RG, Hopper M L, *et al.* Automated Method for Cleanup and Determination of Benomyl and Thiabendazole in Table-Ready Foods [J]. J AOAC Int, 1998, 81(6): 1 217-1 223.
- [ 4 ] SN0220-1993 出口水果中多菌灵残留量检验方法 [S]. 中国标准出版社, 1994.
- [ 5 ] SN0606-1996 出口乳及乳制品中噻菌灵残留量检验方法-荧光分光光度法 [S]. 中国标准出版社, 1997.
- [ 6 ] Ito Y, Ikai Y, Oka H, *et al.* Simultaneous determination of thiabendazole and imazalil in citrus fruit and banana using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. J Chromatogr A, 1998, 810(1-2): 81-87.
- [ 7 ] Michael S Y, Dorothy J P, Pamela C I, *et al.* Mixed-Mode Solid-Phase Extraction and Cleanup Procedures for the Liquid Chromatographic Determination of Thiabendazole and Carbendazim in Fruit Juices [J]. J AOAC Int, 2001, 84(2): 556-561.

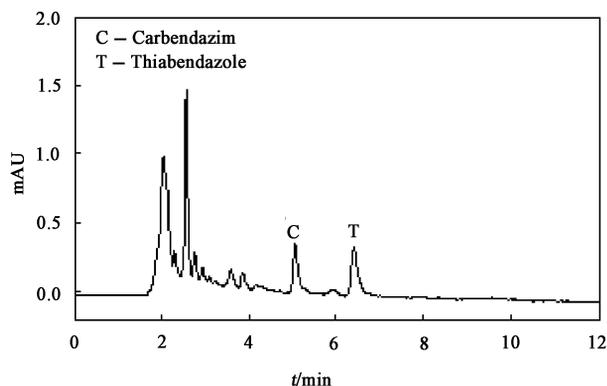


图 3 添加 0.05 mg/kg 噻菌灵、多菌灵对照品的浓缩梨汁样品谱图

Fig. 3 Chromatogram of the concentrated pear juice sample spiked 0.05 mg/kg carbendazim and thiabendazole standards

能够避免出现假阳性结果, 保证了外标法定量的准确性和重现性. 实验数据显示, 本方法对于浓缩梨汁中噻菌灵、多菌灵的测定最低检出限为 0.020 mg/kg, 与其他方法相比, 本方法具有简单、快速、准确的特点, 具有很强的实用性, 可满足进出口浓缩梨

## Simultaneous Determination of Thiabendazole and Carbendazim Residues in Concentrated Pear Juice by Solid Phase Extraction-HPLC

LIU Xiao-song<sup>1,2</sup>, GAO Xin<sup>3</sup>, TON Zhang-fa<sup>2</sup>, LIU Jun-yi<sup>1</sup>

(1. Guangxi Technology Center of Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanning 530021, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. Beijing Technology center of Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

**Abstract:** A solid phase extraction-high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the simultaneous analysis of thiabendazole and carbendazim in concentrated pear juice. The sample was previously diluted with distilled water. After centrifuging, filtering and adjusting the pH, the sample was extracted and cleaned up with Mixed-mode SPE, and determined the quantities of thiabendazole and carbendazim residues by HPLC with DAD using external standard method. The detection limit was 0.020 mg/kg for both. The recovery was 80.5% ~ 84.3% for thiabendazole and 83.2%

~ 92.5 % for carbendazim, and the relative standard deviation (RSDs) was all no more than 5 %. The method is simple, fast and sufficient for routine analysis.

**Key words:** solid phase extraction; concentrated pear juice; thiabendazole; carbendazim; residues

**Classifying number:** O657.32

动 态

## 仪器信息网 [www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn) 全面改版

为使网站功能更科学、内容更丰富,在广泛征询本网用户意见的基础上,科学仪器最大的门户网站 - 仪器信息网([www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn))近期做了全面改版。本次改版后,网站功能大大增强、信息量也大有增加,"网上仪器展"展出的仪器超过了 7 000 台,展出的耗材配件超过了 8 000 种,分析方法及资料超过 2 万篇。另外,还新增了以下栏目:

"新品发布":专门展出近两年在中国市场正式上市的仪器新品。

"促销仪器":及时发布厂家正在促销或优惠打折的仪器产品信息。

"热点应用":针对社会上的热点问题,如欧盟的 ROHS 指令、日本肯定列表制度、松花江污染、假药检测等及时开设专栏,并把与该热点相关的仪器、资料、分析方法、法规标准等汇集于此,方便用户跟踪浏览。

"资料中心":仪器综述文章、分析方法、仪器样本、维修手册、分析测试标准等实用资料的集散地。近期对资料的分类进行了细化和调整。

"仪器论坛":数十个仪器及其应用专业讨论区,最近围绕热点又开出了多个专题讨论区。

"市场研究":多篇仪器市场分析研究报告、大量的统计数据是掌握国内外仪器市场的得力助手。目前分为:有奖调查、行业前瞻、调查报告 3 个子栏目。

"培训中心":这是最新开出的栏目,包括 4 个子栏目:培训信息、仪器厂商培训、免费讲座、网上书店。

"媒体中心":包括 3 个子栏目:期刊、会议、展览。

"VIP 中心":该栏目旨在为本网用户提供个性化服务。只要两分钟时间注册成为本网的免费 VIP 会员,就可以享受本网提供的多项增值服务,如收藏资料、查阅信息、发表或下载文章、提交简历、网上应聘等。

欢迎访问仪器信息网:[www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn)

客服热线:010-51654077 客服邮件:[vip@instrument.com.cn](mailto:vip@instrument.com.cn)

(仪器信息网 [www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn) 供稿)

2006 - 6 - 20