

固相萃取 - 反相高效液相色谱法测定红毛丹中抑霉唑的残留动态

高智席¹, 江忠远¹, 李新发¹, 吴艳红¹, 牟青松¹, 敖克厚¹, 邓传跃²
(1. 遵义师范学院化学系, 贵州 遵义 563002; 2. 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要: 建立固相萃取 - 反相高效液相色谱法测定红毛丹中抑霉唑的残留动态分析的方法。色谱柱为 Shim-pack VP-ODS(150mm × 4.6mm, 5 μm), 检测波长 229nm, 流动相为甲醇 - 离子对溶液(75:25, V/V), 流速 0.85mL/min, 进样量 20 μL。抑霉唑在 15.0~960.0 μg/L($r = 0.9994$)范围内与峰面积呈良好线性关系, 检出限为 5 μg/L, 抑霉唑回收率为 86.4%~104.5%, 相对标准偏差 0.84%~2.87%。同时, 还对抑霉唑由红毛丹皮向肉的迁移, 在红毛丹体上的降解动态进行分析。该方法操作简便快速, 可作为红毛丹中抑霉唑含量监测的方法。

关键词: 抑霉唑; 固相萃取; 反相高效液相色谱; 红毛丹

Residue Dynamic Analysis of Imazalil in Rambutan by RP-HPLC with Solid-Phase Extraction

GAO Zhi-xi¹, JIANG Zhong-yuan¹, LI Xin-fa¹, WU Yan-hong¹, MU Qing-song¹, AO Ke-hou¹, DENG Chuan-yue²

(1. Department of Chemistry, Zunyi Normal College, Zunyi 563002, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatographic method with solid-phase extraction was proposed for the residue dynamic analysis of imazalil in rambutan. The analyte was separated on a Shim-pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase composed of a mixture at a volume ratio of 75:25 of methanol and acidic Na₂H₂PO₄ solution approximately at pH 5 (adjusted with 85% phosphoric acid) at a flow rate of 0.85 mL/min, and detected at 229 nm. The injection amount was 20 μL. An excellent linearity of imazalil in the range of 15.0–960.0 μg/L was achieved ($r = 0.9994$). The detection limit was 5.0 μg/L. The average spike recovery rates were in the range of 86.4%–104.5% with relative standard deviation of 0.84%–2.87%. The method was fast, simple, and applicable for the determination of imazalil residue in rambutan.

Key words: imazalil; solid-phase extraction; RP-HPLC; rambutan

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0188-03

抑霉唑[烯丙基 1-(2,4-二氯苯基)-2-咪唑-1-基乙基醚]是近年来开发的一种结构新颖、作用机制独特、高效、低毒和广谱的嘧啶胺类内吸性杀菌剂, 并具有预防和治疗作用。对侵袭谷物、水果和蔬菜的病原体——交链孢菌、寄生霜霉、灰霉枝孢和霉根霉等具有良好的抑杀作用^[1]。

红毛丹是一种极具经济价值的热带水果, 外观美、营养丰富、富含碳水化合物、各种维生素和矿物质。长期食用可润肤养颜、清热解毒、增强人体免疫力。但红毛丹在我国只有海南等少数地区分布, 主要依赖东南亚进口, 储存运输的周期比较长, 保鲜能力又比较差。因此, 抑霉唑常被应用于红毛丹收获前和收获后

的生产、储存及保鲜过程中。

通常测定抑霉唑的方法有高效液相色谱法^[2-5]、气相色谱法^[6-12], 气相色谱 - 质谱联用法^[13-15]等。但关于红毛丹中抑霉唑残留动态分析的高效液相色谱测定方法未见报道。本实验拟建立固相萃取反相高效液相色谱分离, 二极管阵列检测器测定红毛丹中抑霉唑残留动态分析的方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

红毛丹(市售), 0~5℃冷藏。

收稿日期: 2011-05-30

基金项目: 贵州省遵义市科技局项目([2008]26号); 贵州省教育厅自然科学基金项目([2010]085号)

作者简介: 高智席(1969—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为仪器分析。E-mail: wyhgzx@163.com

抑霉唑标准品(含量 $\geq 99\%$) 国家标准物质标准样品信息中心;无水硫酸钠(AR, 130℃烘2h, 贮于干燥器中备用)、甲醇(分析纯)、磷酸(95%, 分析纯)、正己烷(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯)、磷酸二氢钠(99%, 分析纯);二次蒸馏水。

所有溶液使用前均由0.45 μm 孔径的滤膜过滤。离子对溶液:称4.45g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于1000mL二次蒸馏水中,滴加质量分数85%磷酸调至 $\text{pH} \approx 2.5$,摇匀,超声振荡15min,用0.45 μm 的孔径滤膜过滤,备用。

LC-2010AT型高效液相色谱仪(LCsolution色谱工作站, CBM-20A系统控制器, SPD-M20A二极管阵列检测器, SIL-20A自动进样器) 日本Shimadzu公司; SY3200超声波清洗器 上海声源超声波仪器设备有限公司; EYELAN-1型旋转蒸发仪 德国Heidoph公司; 电子天平 上海越平科学仪器有限公司; DS-1高速组织捣碎机 上海标本模型厂; THZ-82A型振荡机 江苏富华仪器有限公司; DHG-9070A型新型电热恒温鼓风干燥箱 宁波江南仪器厂; 混合阳离子固相萃取柱(PCX, HRXC, 60mg, 3mL)、24DL固相萃取装置 Visiprep公司; 微孔过滤装置。

1.2 色谱条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS(150mm \times 4.6mm, 5 μm); 流动相: 甲醇:离子对溶液=75:25(V:V)($\text{pH} \approx 2.5$); 紫外检测波长: 229nm; 流速: 0.85mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL 。

1.3 样品前处理及测定

1.3.1 标准溶液的配制

准确称取抑霉唑标准品0.0401g(精确至0.0001g),置于50mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀后即成为质量浓度802 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑霉唑的储备液。用移液管准确移取不同体积的抑霉唑标准溶液分别置于25mL容量瓶中,再用甲醇定容得一系列不同浓度的抑霉唑标准溶液,摇匀并贴上标签,保存(0~10℃),备用。

1.3.2 样品前处理

样品红毛丹在802 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑霉唑溶液中蘸浸后取出,然后在间隔不同的时间将红毛丹皮削下,将红毛丹皮和红毛丹肉分别编号并保存,样品保存在冷藏柜里(0~5℃)。不同编号的样品依次进行残留量测定。

将未经清洗的红毛丹肉与红毛丹皮经组织捣碎机捣碎,各称取其5.00g(精确到0.01g)置于带盖塑料离心管中,准确加入30mL乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V)和2g氯化钠,在涡旋混合器上涡旋1min,超声振荡20min,在10000r/min离心机上离心10min,取上清液净化。

分别用3mL甲醇,3mL水活化混合型阳离子交换固相萃取柱,准确移取3mL(具体由样品含量高低来确定)离心上清液分别上PCX固相萃取柱,过柱速度1mL/min以内。再用3mL水和3mL甲醇洗涤混合型阳离子交换固相萃取柱^[16],抽近干后用氨水甲醇溶液5mL洗脱。在40℃条件下用氮气吹干,准确加入1.00mL甲醇溶液,涡旋振荡1min,过0.45 μm 滤膜,待测定。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

利用二极管阵列检测器在线扫描配制好的抑霉唑标准溶液,可得到抑霉唑的吸收波长响应值的紫外吸收图谱,最大吸光度出现在229nm处,产品中各杂质在该波长时对该产品的测定无影响,且色谱峰形较好。因此,选择229nm作为本方法的最适检测波长。

2.2 流动相的选择

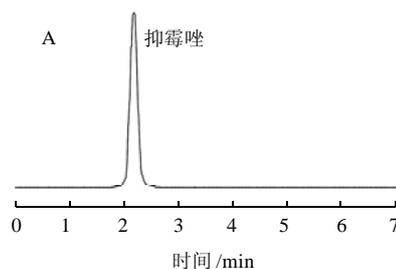
分别以乙腈:离子对溶液和甲醇:离子对水溶液体系作流动相进行比较,发现甲醇:离子对溶液作流动相时,抑霉唑与其杂质分离完全且峰形对称;再经过比较不同配比的甲醇:离子对水溶液体系^[4],发现甲醇-离子对溶液(75:25, V:V),柱效最高,保留时间适宜。

2.3 流速选择

在优化流动相和检测波长条件下,以0.30~1.30mL/min的不同流速进行测定,分析比较发现在0.85mL/min流速下的抑霉唑液相色谱峰形较好、出峰时间较早,故选择0.85mL/min为检测流速。

2.4 线性范围及检出限

按照上述色谱条件,以质量浓度为横标,峰面积为纵坐标制作抑霉唑标准曲线,经过回归,得到其线性方程为 $Y = 15.502X - 290.38$, $r = 0.9994$ 。线性范围为15~960.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。抑霉唑标准谱图见图1,标准出峰在2.1765min。用标准工作曲线的最低浓度点,按上述色谱条件测定6次,得一组低浓度标准峰面积,求出其标准偏差,以3倍标准偏差除以方法的灵敏度,即得方法的检出限为5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。抑霉唑标样色谱图和样品色谱图见图1所示。



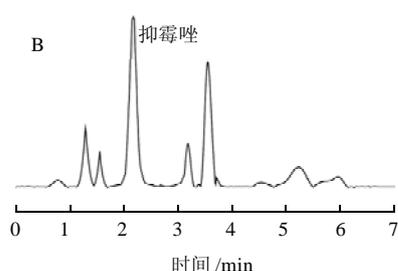
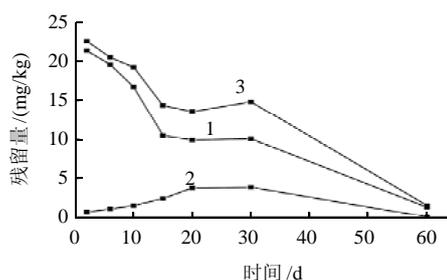


图1 标准品(A)和红毛丹肉(B)中抑霉唑的色谱图
Fig.1 Chromatogram of imazalil standard and imazalil in rambutan flesh



1. 红毛丹皮; 2. 红毛丹肉; 3. 抑霉唑总量。
图2 抑霉唑在红毛丹中的残留动态曲线
Fig.2 Residue dynamic curves of imazalil in rambutan

2.5 方法的精密度和回收率

在选定的色谱条件下进行添加回收实验, 红毛丹肉分别以 0.01、0.05、0.1 mg/kg 3 个添加水平, 红毛丹皮分别以 0.05、0.1、0.2 mg/kg 3 个添加水平, 按照样品处理方法进行提取净化, 测定抑霉唑含量, 计算回收率见表 1。红毛丹肉抑霉唑添加回收率在 86.4%~102.3%, RSD($n=3$)为 1.5%~2.87%, 红毛丹皮抑霉唑添加回收率在 88.9%~104.5%, RSD($n=3$)为 0.84%~1.46%, 方法的回收率和标准偏差达到满意结果。在选定的色谱条件下, 质量浓度 40 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品连续测定 5 次, 保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.15% 和 2.68% ($n=5$)。因此, 本方法具有很高的灵敏度与精密性, 重复性好, 回收率稳定, 可以为红毛丹样品中抑霉唑的测定提供参考方法。运用本实验建立的方法对实验所得的上百个红毛丹样品进行测定, 数据稳定可靠。

表 1 回收率及精密性($n=3$)

Table 1 Recovery rates and RSDs of imazalil in rambutan peel and flesh ($n=3$)

加入量/(mg/kg)	红毛丹肉			红毛丹皮		
	0.1	0.05	0.01	0.05	0.1	0.2
回收率/%	86.4	95.6	102.3	88.9	104.5	92.3
RSD/%	2.87	2.10	1.50	0.84	1.46	1.44

2.6 样品测定

对样品中红毛丹肉和红毛丹皮中的抑霉唑含量进行测定, 红毛丹肉中含量 2.36 mg/kg, 红毛丹皮中含量 21.34 mg/kg。

2.7 红毛丹中抑霉唑的降解曲线

从图 2 可以看出, 在 30 d 内, 在红毛丹肉中抑霉唑残留量随贮藏时间的推移, 呈增加的趋势, 而在红毛丹皮中呈下降趋势, 表明抑霉唑在不断地从红毛丹皮中转移到红毛丹肉中。第 60 天(最后一次分析), 抑霉唑残留量在红毛丹肉和红毛丹皮中明显降低。说明红毛丹中残留的抑霉唑随着贮藏时间的延长逐渐降解。

3 结论

本实验建立红毛丹中抑霉唑的固相萃取-反相高效液相色谱残留动态分析的方法。该方法简单快速, 精密性与灵敏度较高, 是一种有效检测水果采后的储存过程中抑霉唑含量的有效方法。

参考文献:

- [1] 甘伯中, 张文利, 汪建旭, 等. 塑料薄膜包装花椰菜采后病害症状、病原及防治药物筛选[J]. 甘肃农业大学学报, 1998, 33(1): 79-82.
- [2] 付新梅, 张丽静, 封顺, 等. 高效液相色谱法同时测定甜瓜样品中的抑霉唑和噻菌灵[J]. 分析化学, 2004, 32(3): 329-331.
- [3] 杨涛, 艾尔肯·不拉音, 靳智, 等. 反相高效液相色谱法同时测定果蔬中 6 种防腐杀菌剂[J]. 食品科技, 2008, 33(9): 245-247.
- [4] 郭治安, 赵景婵, 王耀, 等. 杀菌剂中抑霉唑含量的离子对高效液相色谱分析[J]. 分析化学, 2004, 32(2): 217-220.
- [5] FEMÁNDEZ M, RODRÍGUEZ R, PIEÓ Y, et al. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits[J]. J Chromatogr A, 2001, 912(2): 301-310.
- [6] NAVICKIENE S, M L RIBEIRO M L. A simplified method for the gas chromatographic determination of pyrimethanil residues in fruits[J]. J Sep Sci, 2001, 24(6): 470-472.
- [7] 潘守奇, 孙军, 董静, 等. 气相色谱法测定水果和蔬菜中异丙威、啉霉胺、抑霉唑残留量[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 516-518.
- [8] 应兴华, 徐霞, 闵捷, 等. 离心破乳-气相色谱法测定黑米中残留抑霉唑的研究[J]. 分析试验室, 2009, 28(9): 59-61.
- [9] 应兴华, 徐霞, 陈铭学, 等. 粮谷中抑霉唑残留的气相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(4): 398-402.
- [10] NAVICKIENE S, RIBEIRO M L. A simple and rapid extraction for gas chromatographic determination of thiabendazole and imazalil residues in lemons[J]. J Braz Chem Soc, 2002, 13(5): 592-596.
- [11] 赵其阳, 焦必宁, 王成秋, 等. 气相色谱法同时测定柑桔中抑霉唑、噻菌灵和啉霉胺残留[J]. 现代科学仪器, 2007(1): 77-79.
- [12] 武婷, 刘波, 李楠. 杀菌剂抑霉唑在梨子中残留动态分析[J]. 分析试验室, 2007, 26(9): 81-83.
- [13] 靳智, 杨涛, 李明, 等. 气相色谱质谱联用法同时测定果蔬中 5 种防腐杀菌剂[J]. 分析试验室, 2008, 27(增刊 2): 73-75.
- [14] NAVALQN A, PRIETO A, ARAUJO L, et al. Determination of pyrimethanil and kresoximmethyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2002, 975(2): 355-360.
- [15] CHARLTON A J, JONES A. Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2007, 1141(1): 117-122.
- [16] 吴彩梅, 白洁, 贾刚, 等. 高效液相色谱法测定鸡蛋中的三聚氰胺[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 212-218.