

苹果中多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的高效液相色谱法分析

廖 涛¹, 杨玉平¹, 程 薇¹, 熊光权¹, 金士威², 方 玲²,
耿胜荣¹, 李 新¹, 林若泰¹, 李露¹, 杨 洁³

1. 湖北省农业科技创新中心, 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北 武汉 430064;
2. 武汉工程大学化工与制药学院, 绿色化工过程省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074;
3. 农业部食品质量监督检验测试中心, 湖北 武汉 430064)

摘 要: 建立了同时检测苹果中多菌灵、噻菌灵和甲基托布津残留量的高效液相色谱 (HPLC) 分析方法. 样品经乙酸乙酯提取, 旋转蒸发仪浓缩, 氮气吹干甲醇定容后, 采用配有二极管阵列检测器 (DAD) 的 HPLC 测定, 外标法定量. 在添加不同浓度的标准品时, 多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的添加回收率分别为 87.7% ~ 118.7%、72.8% ~ 80.3%、64.0% ~ 66.8%. 方法对多菌灵、噻菌灵和甲基托布津 3 种农药的检出限较低, 分别为 0.134、0.230 和 0.250 mg/L, 可以满足苹果汁中多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的残留限量检测要求. 检测果皮样品中的农药残留量, 多菌灵的残留量为 7.24×10^{-2} mg/kg, 噻菌灵和甲基托布津未检出, 低于国标中规定的残留限量标准.

关键词: 苹果汁; 多菌灵; 噻菌灵; 甲基托布津; 高效液相色谱; 液液萃取

中图分类号: TS255.7

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2010)04-0257-05

我国是世界第一水果生产大国, 苹果栽培面积和产量均居于世界首位. 在我国水果生产中, 农药发挥了巨大作用, 多菌灵、噻菌灵和甲基托布津是苯并咪唑类农药的重要种类, 是苹果生产和产后加工中最常用的农药. 这类物质对热、酸、碱和光都很稳定, 在自然环境中降解较慢, 对人、畜有一定的毒副作用^[1-2]. 研究表明, 多菌灵可对老鼠的繁殖系统产生影响, 并导致肾脏产生氧化损伤效应^[3-4], 噻菌灵能和其它食品添加剂相互作用诱导雄鼠肝脏内 CYP1A2 mRNA 的表达以及 GST 活力的改变^[5], 甲基托布津可以和人体血清白蛋白相互作用, 诱导人体淋巴细胞 DNA 损伤, 也是可疑致癌物之一^[6-7]. 近年来, 随着人们追求安全无毒、绿色食品和农产品国际贸易快速发展的同时, 水果中农药残留问题日益突出, 亟待解决.

目前应用于农药检测的前处理方法很多, 其中常用的有液液萃取法、固相萃取法、固相微萃取法和

分散液相萃取法^[8-10]等. 苯并咪唑类农药仪器分析应用较多的检测方法是高效液相色谱法^[11-13], 并且主要集中在多菌灵和噻菌灵的同时检测分析, 而同时测定农产品中多菌灵、噻菌灵和甲基托布津 3 种苯并咪唑类农药的方法仅在外国文献中有部分报道^[14]. 由于液液萃取法具有萃取效率高、操作方便等优点, 而多菌灵在高温条件下易降解, 因此本试验采用液液萃取结合高效液相色谱法来对苹果样品中的多菌灵、噻菌灵和甲基托布津进行提取分析, 旨在建立一种操作简单, 易于推广应用, 并可满足苹果样品中多菌灵、噻菌灵和甲基托布津残留量同时测定的分析方法.

1 试验部分

1.1 主要仪器与试剂

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 (美国,

收稿日期: 2010-07-09; 修订日期: 2010-09-13.

基金项目: 武汉市晨光计划项目 (200950431167); 湖北省农业科技创新项目 (2008056).

作者简介: 廖涛 (1979-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全. Email: liaotaocer@hotmail.com

通讯作者: 熊光权, 研究员. Tel: 027-87389305, Email: xionguangquan@163.com

Agilent 公司); PHB-4 型便携式 pH 计(上海精科); 液液萃取装置; 旋转蒸发仪(上海亚荣); 氮吹仪(HSC-24A); Millipore 溶剂过滤器系美国 Waters 公司产品。

多菌灵、噻菌灵和甲基托布津标准品(美国, Sigma 公司)储备液: 分别称取多菌灵、噻菌灵和甲基托布津各 2.00mg, 用农残级甲醇溶解并定容到 10 mL, 配成浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液, 置于 -20°C 的冰箱储存。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent phenomenex C18 柱(250 \times 4.60 mm, 5 μm); 色谱柱温度为室温; 进样量为 10 μL ; DAD 选择 280 nm 作为检测波长。当样品谱图和标准品谱图色谱峰保留时间一致时, 作为定性依据, 色谱峰面积作为定量依据。

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理

将苹果洗净, 果皮和果肉分离, 并分别用高速组织捣碎机匀浆, 储存在 -20°C 冰箱中待用。

1.3.2 样品前处理方法

取 10 g 苹果汁于 250 mL 的平底烧瓶中, 向其中加入多菌灵、噻菌灵和甲基托布津各 150 μL , 然后加入 30 mL(100 g/L) 的氯化钠溶液, 用 2 mol/L 盐酸调 pH 为 1~2, 再加入 50 mL 的乙酸乙酯(乙腈)在恒温振荡提取器上振荡提取 1 h, 真空抽滤, 用 30 mL 的乙酸乙酯(乙腈)洗涤滤渣和烧瓶, 过滤后合并滤液, 分层后收集乙酸乙酯相(乙腈), 并分别用 10 mL 的乙酸乙酯(乙腈)洗涤水相 2 次, 合并乙酸乙酯相(乙腈)。水相再调 pH 为 7.5 左右, 然后用 50 mL 的乙酸乙酯(乙腈)反萃取, 分层后收集乙酸乙酯相(乙腈), 并分别用 10 mL 的乙酸乙酯(乙腈)洗涤水相 2 次, 合并乙酸乙酯相(乙腈), 2 次的乙酸乙酯相(乙腈)分别过无水硫酸钠柱后, 然后合并乙酸乙酯相, 旋转蒸发至近干, 用乙酸乙酯(乙腈)洗涤烧瓶壁, 氮气吹干后, 用甲醇定容到 1.5 mL 经过 0.45 μm 有机相滤膜过滤后, 供液相色谱测定。

2 结果与讨论

2.1 样品提取溶剂的选择

为了获得具有最好提取效率的溶剂, 本试验比较了乙酸乙酯和乙腈 2 种溶剂的提取效果, 结果如表 1 所示。从表 1 可以看出, 样品用乙酸乙酯提取

时, 样品的回收率较高, 重现性较好; 乙腈的提取效果较差, 而且乙腈的沸点较高, 氮吹时间较长, 损失大, 导致乙腈提取的重现性较差。综合考虑试验提取效果、提取时间和试验成本, 本试验选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

表 1 不同提取溶剂的回收率结果

Table 1 Recovery of three fungicides from apple samples by different solvents

添加量 /(mg/kg)	平均回收率 \pm SD/%	
	乙酸乙酯	乙腈
多菌灵 0.30	90.3 \pm 6.7	111.7 \pm 50.4
噻菌灵 0.30	77.2 \pm 7.3	67.0 \pm 31.4
甲基托布津 0.30	66.8 \pm 6.0	21.3 \pm 36.9

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 检测波长的选择

为了获得多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的最佳检测效应, 扫描了 180~780 nm 处的吸收光谱图, 结果表明在 280 nm 处, 杂峰较少、基线稳定、谱图清晰。因此, 本实验选用 280 nm 作为检测波长。

2.2.2 流动相的选择

本试验研究了不同流动相及比例对 3 种农药的分离效果: 甲醇与水的体积比为 70:30、流速为 0.8 mL/min 时, 3 种农药的谱图相互重叠; 乙腈与水的体积比为 70:30、流速为 0.8 mL/min 时, 3 种农药的谱图还是不能分开; 甲醇与 0.6% 氨水的体积比为 50:50、流速为 0.8 mL/min 时, 3 种农药虽然能分开, 但是保留时间较长, 而且氨水的 pH 在 10 以上, 对色谱柱的寿命有影响; 甲醇与磷酸盐缓冲液(pH 6.8, 0.02 mol/L)的体积比为 50:50、流速为 0.8 mL/min 时, 出峰时间和峰型较理想。多菌灵、噻菌灵和甲基托布津混合标准品的色谱峰见图 1。

从图 1 中可以看出多菌灵、噻菌灵和甲基托布津标准品的保留时间分别为 10.923、15.347 和 18.213 min, 而果汁空白谱图中没有检测到多菌灵、噻菌灵和甲基托布津, 从而说明检测到的 3 种农药全部来自添加进去的混合标准品, 而且流动相为甲醇: 磷酸盐缓冲液(pH 6.8, 0.02 mol/L, 体积比: 50:50, 流速: 0.8 mL/min)时, 3 种物质能完全分开, 而且峰型较尖锐, 响应值高。

2.3 标准曲线

分别取多菌灵、噻菌灵和甲基托布津标准品储备液各 2.5、15、25、35、50、60、75、90、100 μL 加入到

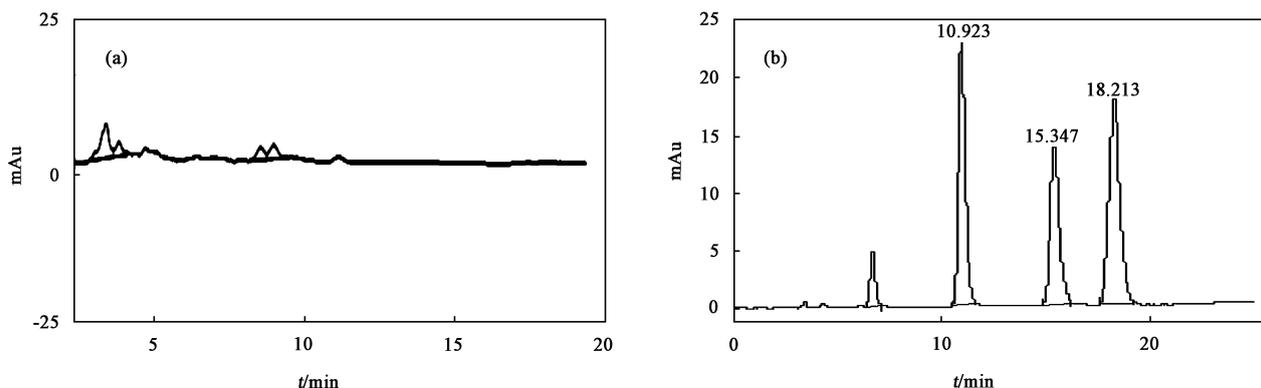


图1 果汁空白(a)和多菌灵、噻菌灵、甲基托布津混合标准品(b)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank samples (a) and standard samples (b) from apple juice

试剂瓶中,定容至1mL,配制而成的3种农药标准品混合溶液的浓度分别为:0.4、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0、12.0、15.0、18.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,进样量分别为10 μL ,按上述色谱条件进行测定,得出不同浓度所对应的色谱峰面积,计算3种农药混合溶液的标准曲线.由表2所示,3种农药的含量(x)与峰面积(y)有良好的线性关系.

表2 多菌灵、噻菌灵和甲基托布津标准曲线的线性关系和检出限

Table 2 Linearity and LOD of carbendazim, thiabendazole and methyl thiophanate

分析物	标准曲线方程	R^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
多菌灵	$y = 4.9984x + 11.093$	0.999 6	0.134
噻菌灵	$y = 4.1781x + 2.3863$	0.999 7	0.230
甲基托布津	$y = 2.5227x + 10.703$	0.999 9	0.250

从表2可以看出多菌灵、噻菌灵和甲基托布津3种农药的线性相关性较好, R^2 均大于0.999,按照信噪比即 $S/N = 3$ 得到该方法对多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的仪器检测限分别为0.134、0.230和0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可以满足目前国内对苹果汁样品的最高残留限量(MRL)标准0.5 mg/kg的检测要

求^[15].

2.4 回收率及精密度试验

在10.0 g苹果汁样品中分别添加不同体积200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多菌灵、噻菌灵和甲基托布津标准品储备液,制得不同浓度的阳性添加样品,该添加水平满足国内对苹果汁样品的最高残留限量(MRL)0.5 mg/kg的要求.样品振荡混匀后,按照1.3.2的方法进行样品的提取和浓缩,每个添加量做3个平行.通过外标法定量,得到相应的平均回收率及相对标准偏差,测定结果见表3.

从表3的测定结果可以看出,多菌灵、噻菌灵和甲基托布津在不同添加量时的回收率都比较高,相对标准偏差值比较低,而且重现性也比较理想.多菌灵的加标回收率为87.7%~118.7%,噻菌灵的加标回收率为72.8%~80.3%,甲基托布津的添加回收率为64.0%~66.8%.

2.5 样品分析

从湖北省农科院社区市场上购买苹果样品,取果皮榨汁后待用.然后取80 g苹果皮样品利用上述优化的前处理方法进行提取浓缩,用农残级甲醇定容到1.5 mL,通过优化的分析检测方法测定苹果皮样品中的多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的残留情况,共做3组平行.图2是苹果皮样品的色谱图,通过与

表3 苹果汁中多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的添加回收率测定结果

Table 3 Recoveries of carbendazim, thiabendazole and methyl thiophanate at different concentrations

添加量/(mg/kg)	平均回收率 \pm SD/(%, $n = 3$)		
	多菌灵	噻菌灵	甲基托布津
多菌灵、噻菌灵 0.10, 甲基托布津 0.30	118.7 \pm 8.2	72.8 \pm 13.3	64.2 \pm 3.4
多菌灵、噻菌灵、甲基托布津均为 0.20	87.7 \pm 4.8	80.3 \pm 6.8	64.0 \pm 0.9
多菌灵、噻菌灵、甲基托布津均为 0.30	90.3 \pm 6.7	77.2 \pm 7.3	66.8 \pm 6.0

多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的标准色谱峰保留时间对比,确定多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的存在情况,3组平行中均检测到多菌灵,但是未检测到噻菌灵和甲基托布津。

多菌灵和甲基托布津在苹果皮样品中的残留量如表 4 所示。

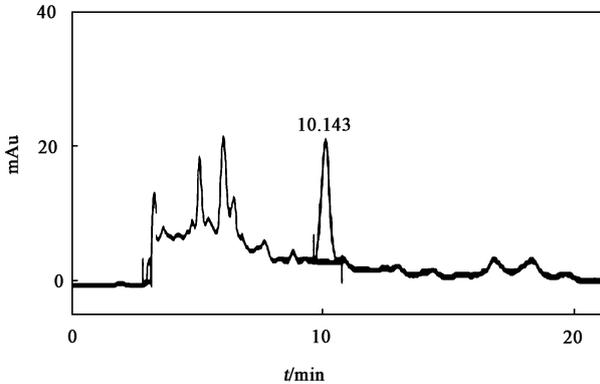


图 2 苹果皮样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of carbendazim, thiabendazole and methyl thiophanate in apple peel

表 4 苹果皮中多菌灵、噻菌灵和甲基托布津含量的测定结果

Table 4 Concentrations of carbendazim, thiabendazole and thiophanate methyl in apple peel

农药类型	平均残留量/(mg/kg)
多菌灵	7.24×10^{-2}
噻菌灵	—
甲基托布津	—

从表 4 可以看出苹果皮样品中多菌灵的质量浓度为 7.24×10^{-2} mg/kg, 低于国家规定的苹果样品中 0.5 mg/kg 的残留限量标准. 从而说明液液萃取前处理方法和高效液相色谱检测技术可有效的检测苹果中的苯并咪唑类农药的残留情况。

参考文献:

[1] Sitarek K. Embryolethal and teratogenic effects of carbendazim in rats[J]. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 2001, 21 (5) : 335 - 340.
 [2] Singh S B, Foster G D, Khan S U. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using microwave - assisted extraction [J]. J Chromatogr A, 2007, 1148: 152 - 157.

[3] Yu G C, Liu Y Z, Xie L, *et al.* Involvement of Sertoli cells in spermatogenic failure induced by carbendazim [J]. Environ Toxicol Phar, 2009, 27: 287 - 292.
 [4] Catalgol B, Catalgol S, Alpertunga B. Effects of benomyl and carbendazim on lipid peroxidation and antioxidant system in kidney of rats following acute exposure[J]. Toxicol Lett, 2007, 172S: S62 - S63.
 [5] Stierum R, Schoen E, van Ommen B, *et al.* Hepatic effects of mixtures of butylated hydroxytoluene, curcumin, propyl gallate and thiabendazole on clinical and hepatic biochemical parameters in male Sprague - Dawley rats[J]. Toxicol Lett, 2007, 172S: S201 - 202.
 [6] Li J H, Liu X Y, Ren C L, *et al.* In vitro study on the interaction between thiophanate methyl and human serum albumin [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009, 94: 158 - 163.
 [7] Saquib Q, Al - Khedhairi A A, Al - Arifi S, *et al.* Assessment of methyl thiophanate - Cu (II) induced DNA damage in human lymphocytes[J]. Toxicology in Vitro, 2009, 23: 848 - 854.
 [8] 吴玉琼, 胡芳弟, 封士兰, 等. 高效液相色谱法测定香连丸及组方药材中 5 种活性组分的含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2009, 15(4): 220 - 225.
 [9] 刘美华, 邱彬, 陈国南, 等. 超声辅助离子液体分散液相微萃取 - 高效液相色谱法测定废水中雌激素的研究[J]. 分析测试技术与仪器, 2009, 15(3): 151 - 153.
 [10] 牟婉君, 刘国平, 熊小玲. 反相高效液相色谱同时测定铍与钼的方法研究[J]. 分析测试技术与仪器, 2009, 15(1): 26 - 29.
 [11] 饶钦雄, 曲明清, 赵晓燕, 等. HPLC 法测定常见蔬菜水果中多菌灵、噻菌灵和苯菌灵残留量[J]. 上海农业学报, 2009, 25(4): 85 - 88.
 [12] 刘晓松, 高欣, 童张法. 固相萃取 - HPLC 法测定浓缩梨汁中噻菌灵、多菌灵的残留量[J]. 分析测试技术与仪器, 2006, 12(3): 131 - 134.
 [13] Wu Q H, Li Y P, Wang C, *et al.* Dispersive liquid - liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography - fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 638(2): 139 - 145.
 [14] Veneziano A, Vacca G, Arana S, *et al.* Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate - methyl in banana (Musa acuminata) samples imported to Italy [J]. Food Chem, 2004, 87: 383 - 386.
 [15] 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,2002:169-170.

Determination of Carbendazim, Thiabendazole and Methyl Thiophanate in Apple by High Performance Liquid Chromatography

LIAO Tao¹, YANG Yu-ping¹, CHENG Wei¹, XIONG Guang-quan¹,
JIN Shi-wei², FANG Ling², GENG Sheng-rong¹, LI Xin¹, LIN Ruo-tai¹, LI Lu¹, YANG Jie³

(1. Hubei Innovation Center of Agricultural Science and Technology, Institute for Farm Products Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;

2. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology,

Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan 430074, China;

3. Food Quality Inspection and Testing Center of Agricultural Ministry of China, Wuhan 430064, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic (HPLC) method has been developed to determine the residues of carbendazim, thiabendazole and thiophanate methyl in apple. Samples were extracted with ethyl acetate, concentrated in a rotary evaporator, purged by nitrogen, added methanol to a constant volume and determined by HPLC with a diode array detector (DAD). The average spiked recoveries of carbendazim, thiabendazole and thiophanate methyl ranged from 87.7% to 118.7%, 72.8% to 80.3% and 64.0% to 66.8% at different concentrations, and the detection limits of carbendazim, thiabendazole and methyl thiophanate in apple samples were 0.134 mg/L, 0.230 mg/L, and 0.250 mg/L, respectively. The results showed the method is suitable for the determination of carbendazim, thiabendazole and methyl thiophanate in apple, and the residue of carbendazim in apple peel was 7.24×10^{-2} mg/kg, thiabendazole and methyl thiophanate were not detected. These concentrations were lower than the national residual limit standards for carbendazim, thiabendazole and methyl thiophanate in apple.

Key words: apple; carbendazim; thiabendazole; thiophanate methyl; HPLC; liquid-liquid extraction

Classifying number: TS255.7

