

高效液相色谱法测定葡萄酒中多菌灵的残留量

淑英¹,王华^{1,2*}

(1.西北农林科技大学葡萄酒学院,陕西 杨凌 712100 2.西北农林科技大学食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

摘要: 利用高效液相色谱法测定葡萄酒中多菌灵残留量,样品以乙酸乙酯提取,二氯甲烷萃取净化,以 ODS-C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)进行分析,流动相(V_{乙酸乙酯}:V_{乙酸铵}=55:45)流速为 1 mL/min 时,多菌灵保留时间为 7.016 min,回收率为 87.8%~107.5%,最低检出限为 2×10⁻⁵ mg/kg。

关键词: 葡萄酒; HPLC; 多菌灵; 残留

中图分类号:TS262.6;Q657.72;TS261.7 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2006)02-0094-03

Measurement of the Residual Carbendazim in Grape Wine by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

SHU Ying¹ and WANG Hua^{1,2}

(1. Enology College; 2. Food Science & Engineering College of Northwest Agriculture & Forestry Science & Technology University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: The residual carbendazim in grape wine was measured by HPLC and the process was as follows: samples extracted by ethyl acetate, then extractive purification of the solution by methylene chloride, then the solution analyzed by ODS-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase (V_{ethyl acetate}:V_{ammonium acetate}=55:45), flow velocity as 1 mL/min, retention time of carbendazim as 7.016 min, recovery rate as 87.8%~107.5%, and the minimum detection limit as 2×10⁻⁵ mg/kg (Tran. by YUE Yang)

Key words: grape wine; HPLC; carbendazim; residue

农药残留是指一部分农药由于具有很强的化学稳定性,施用后不易分解,仍有部分或大部分残留在土壤、作物以及其他环境中。这些含有残留农药的食品被人或其他高等动物长期进食后,就会使农药在体内积累,引起慢性中毒,这就是农药的残留毒性,亦称残毒^[1]。由于农药种类和使用量的不断增加,有些农药又不易分解,使农作物(如蔬菜、瓜果、茶叶等)及畜禽、水产等动植物体受到不同程度的污染,通过食物链最终进入人体,给人体健康带来潜在的危害,因此,农药残留问题越来越引起人们的重视和关注。

葡萄酒是新鲜葡萄或葡萄汁经过发酵后生产的饮料。由于葡萄酒中含有许多营养物质如氨基酸、矿物质(包括微量元素)和人体必需的维生素等,以及β-谷甾醇、多酚等成分,使它成为不仅是营养丰富的饮料,而且适当饮用还能防止各种疾病,增强人体健康^[2]。然而在

葡萄的病虫害防治过程中,经常喷施杀虫剂、杀菌剂和除草剂等农药。因此,研究葡萄酒中的农药残留是势在必行的^[3]。

多菌灵(Carbendazim, MBC),化学名称为N-(2-苯并咪唑基)氨基甲酸酯,是一种广谱、内吸附性杀菌剂,可作为杀菌剂、种衣剂、防腐保鲜剂等广泛使用于蔬菜和水果中^[4,5]。但它的残效期比较长,有一定的毒性,根据刘乾开等报道,最后一次施药离小麦收获前20 d,水稻为30 d^[6]。目前,在国外已有关于多菌灵在葡萄酒中残留量的研究,Sylvaine D等^[7]报道了利用HPLC-荧光检测器测定葡萄酒中多菌灵的农药残留,还有有关在蔬菜、水果和蜂蜜等^[8-11]中多菌灵的残留量。在国内,也有有关多菌灵在花生、白菜、油菜籽的残留量的报道,但是有关多菌灵在葡萄酒中的研究还较少,葛宝坤等研究了多菌灵作为防霉剂在葡萄酒中的残留量^[12-13]。本文通过利用

收稿日期:2005-12-12

作者简介:淑英,女,新疆伊犁人,硕士研究生。

* 通讯作者:王华。

高效液相色谱法对葡萄酒中多菌灵的残留量进行测定,确定了利用高效液相色谱(HPLC)-UV法测定葡萄酒中多菌灵残留量的方法,以期对葡萄生产者在葡萄的田间管理和相关质检部门检测葡萄酒中多菌灵的残留量提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

葡萄酒:市售。

1.2 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-10ATvP 型;上海申生 Senco®系列旋转蒸发仪,Millipore-Q 型超纯水制备装置;脱气机:Autoscience 系列;SHIMADZU Auw220D 型 0.1%分析天平,自制氮吹仪。

1.3 试剂

乙酸乙酯、甲醇(色谱纯)、丙酮、二氯甲烷、无水硫酸钠、盐酸、氢氧化钠、乙酸铵(除单独说明外,均为分析纯级)、去离子水。

标准品:多菌灵(Carbendazim)由国家标准物质中心提供,纯度≥99.1%。

1.4 实验方法

1.4.1 试剂处理

乙酸铵溶液经 0.45 μm 超滤,超声波脱气后使用;甲醇(色谱纯)超声振荡脱气后备用。

1.4.2 试验条件

色谱柱:Shim-pack-ODS-C18 (4.6 mm×250 mm 5 μm);检测器:紫外检测器;流动相:甲醇:乙酸铵(0.5%)=55:45(v/v);检测波长 280 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL;柱温:30℃。

1.4.3 标准曲线

准确称取标样多菌灵 0.05 g,加甲醇定容至 50 mL,配制成 1 mg/mL 的标准储备液,并分别配制成浓度为 0.2 μg/mL,0.5 μg/mL,1.0 μg/mL,2.0 μg/mL,5.0 μg/mL 和 10.00 μg/mL 的标准溶液。根据标准溶液绘制标准曲线,见图 1。

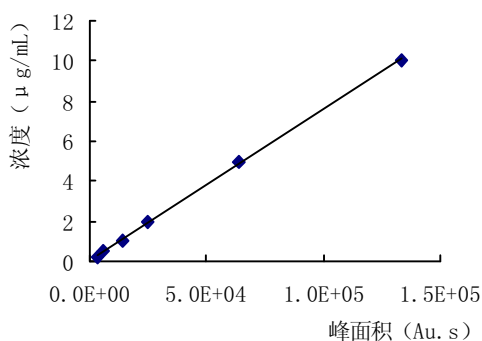


图 1 多菌灵标准曲线

1.4.4 样品处理

准确量取 50 mL 葡萄酒,转入 500 mL 分液漏斗

中,分别添加 100 mL 和 50 mL 乙酸乙酯,振荡 3 min 后,添加 1.0 mol/L NaOH 溶液 2 mL,振荡 5 min,静置分层,合并乙酸乙酯相,并将乙酸乙酯提取液转入另一分液漏斗中。分别用 50 mL,25 mL 盐酸溶液提取乙酸乙酯提取液中的多菌灵残留,合并水相。用 NaOH 溶液调节水溶液的酸度,使 pH9.0,用 100 mL 二氯甲烷分两次从水相中提取多菌灵,二氯甲烷提取液过无水硫酸钠柱,并用少量二氯甲烷洗涤无水硫酸钠柱,合并流出液。将流出液在旋转蒸发仪上浓缩至 5 mL,并用氮气吹干。用 10 mL 甲醇定容,经 0.45 μm 超滤膜过滤后,液相色谱待测^[14-16]。

2 结果分析

2.1 提取溶剂选择

多菌灵是一种两性化合物,在中性和偏碱性水溶液中溶解度低,微溶于丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂,能溶于无机酸和乙酸等有机酸,碱性条件下可增加多菌灵在有机溶剂中的溶解度^[17]。实验结果表明,以甲醇为提取剂时,提取物中含有较多杂质,影响提取效果;以丙酮为提取剂时,则在提取过程中容易产生乳化现象,不易分层,对提取液中多菌灵的提取产生一定的影响,从而影响提取效率;而以乙酸乙酯为提取剂,则含有较少的杂质,且提取效果较佳,见图 2。如图 2 中 B,C,D 所示,经比较可得出利用乙酸乙酯为提取液提取多菌灵的效果最佳。

2.2 多菌灵标样测定结果

分别测定标样的 6 个不同质量浓度的溶液,以多菌灵浓度 Y 对峰面积 X 作回归分析,线性方程为:Y=8×10⁻⁵X+0.0256,r=0.999。其标准曲线和标样色谱图见表 1 和图 2。

表 1 多菌灵不同浓度与峰面积 (μg/mL)

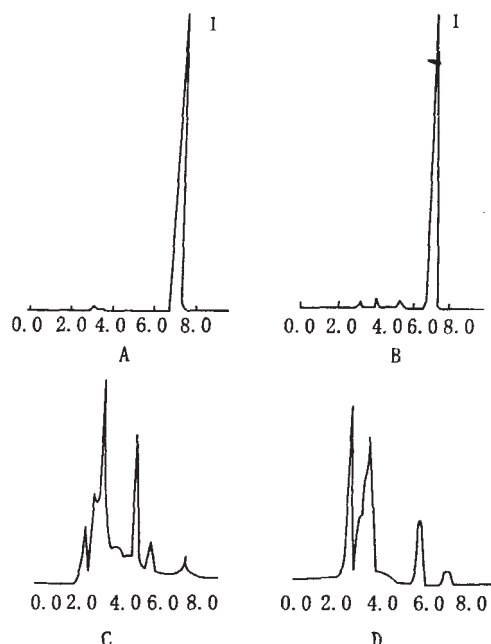
浓度	峰面积(Au. s)	浓度	峰面积(Au. s)
0.2	3579	2	24778
0.5	5954	5	63410
1	14415	10	133032

2.3 葡萄酒中多菌灵残留量的测定

如图 2 所示,多菌灵在该色谱条件下,保留时间为 7.016 min。由此可看出,多菌灵与共存的其他物质分离良好。

2.4 流动相的组成

流动相的组成对葡萄酒组分的色谱分离有一定的影响。采用甲醇-乙酸铵溶液作为流动相,其流速为 1.0 mL/min,试验了流动相组成(甲醇与水的体积比分别为 70:30,60:40,55:45,50:50,40:60)对分离效果的影响。试验结果表明,在流动相中增加甲醇的比例,保留时间缩短,当甲醇与水的体积比为 55:45 时,出峰时间、峰形、灵敏度较为适宜。本试验选择流动相中甲醇与水的体积比为 55:45。



注:1代表多菌灵色谱峰;A代表标样色谱图;B代表处理样品色谱图;C代表丙酮提取样品色谱图;D代表甲醇提取样品色谱图。

图2 提取液提取多菌灵的效果

2.5 流动相的酸碱度

流动相的酸碱度影响被分析物的分离效果。考虑到所使用的色谱柱的pH范围及多菌灵的特性,故利用乙酸铵调节流动相的酸碱度。本实验比较了在甲醇与不同比例乙酸铵水溶液(0.2%、0.5%、0.6%)组成的流动相的效果,实验结果表明,以甲醇和0.5%乙酸铵溶液为流动相时,色谱效果较好。为减小碱性条件对色谱柱寿命的影响,本实验选择甲醇和0.5%乙酸铵溶液为流动相。

2.6 流动相的流速

以流动相的流速分别以0.8 mL/min、1.0 mL/min和1.2 mL/min进行试验,试验结果表明,当流速为0.8 mL/min时,色谱峰宽,出现拖尾现象,并且速度较慢;当流速为1.2 mL/min时,色谱峰分离效果不好;当流速为1.0 mL/min时,色谱峰可以完全分开,分离效果较好。因此,本试验选择流动相的流速为1.0 mL/min。

2.7 方法的回收率和检出限

按照上述分析条件,在葡萄酒样品中分别添加3个浓度水平的多菌灵标样,每个浓度作3个平行试验,平均回收率达87.8%~107.5%,结果见表2。表明本方法的准确度和精密性均符合农药残留分析的要求。

表2 市售葡萄酒中多菌灵添加回收率

添加浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	添加后平均浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
2	2.15	107.5
5	4.73	94.6
10	8.78	87.8

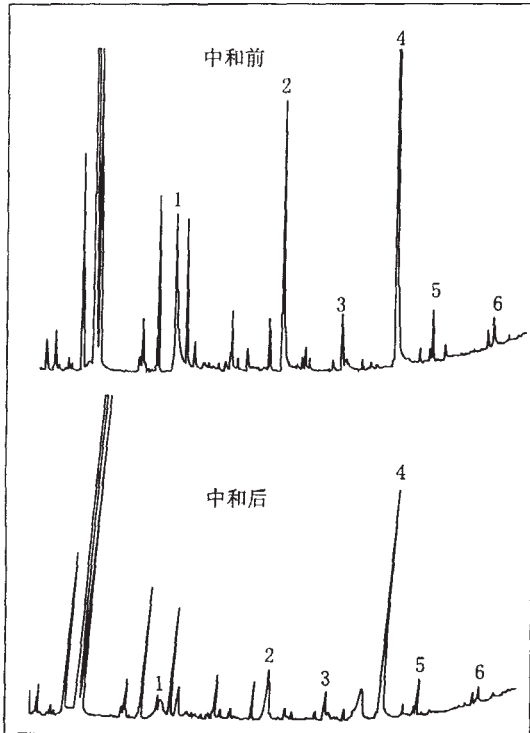
3 结论

本试验利用乙酸乙酯提取葡萄酒中多菌灵残留,通过调节提取剂的酸碱度,利用二氯甲烷进行萃取净化,利用反相高效液相色谱进行定性定量分析,样品前处理简单,能够有效去除杂质的干扰,建立了葡萄酒中多菌灵残留量的测定方法:以ODSC18柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)进行分析,流动相($V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{乙酸铵}}=55:45$),流速为1 mL/min时,多菌灵保留时间为7.016 min,回收率为87.8%~107.5%。该方法简便,可以对葡萄酒中多菌灵残留进行快速、准确有效的分析。

参考文献:

- [1] 唐初痴.农药化学[M].天津:南开大学出版社,1998.
- [2] 李华.葡萄酒工艺学[M].西安:陕西人民出版社,2005.5-9.
- [3] T.Hy ty l inen.Determination of pesticide residues in red wines with microporous membrane liquid-liquid extraction and gas chromatography[J].Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2002,(372):732-736.
- [4] 林郁.农药应用大全[M].北京:农业出版社,1989.
- [5] 冯坚.英汉农药名称对照[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [6] 刘乾开 刘国念主编.新编农药使用手册(第二版)[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [7] Sylvaine D.Regis-Rolle, Gérard M.Bauville High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Carbendazim Residues in Crops[J]. Grain, and Wines with Fluorescent Detection pesticide science 1993,(37):273-282.
- [8] Di Muccio, Alfonso; Girolimetti, Silvana; et al, Selective clean-up applicable to aqueous acetone extracts for the determination of carbendazim and thiabendazole in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography with UV detection[J]. Journal of Chromatography A. 1999 (833): 61-65.
- [9] Veneziano, Attilio, et al Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy[J]. Food Chemistry. 2004 (87):383-386.
- [10] Konstantinos P.Prousalis¹, Dimitris A.Polygenis¹, Alexandra Syrokou¹, Fotini N.Lamari¹ et al Determination of carbendazim, thiabendazole, and o-phenylphenol residues in lemons by HPLC following sample clean-up by ion-pairing. 2004 (379): 458-463.
- [11] Bernal, J.L.; del Nozal, M.J.; Toribio, L. et al. High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples[J]. Journal of Chromatography A. 1997 (787):129-136.
- [12] 葛宝坤, 高建会, 左国华. 高效液相色谱法测定葡萄酒中6种防腐剂的残留量[J]. 色谱, 2003, 21(3):296.
- [13] 葛宝坤, 高建会, 王伟, 等. 液相色谱法快速测定葡萄酒中多种防腐剂的残留量[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 160-163.
- [14] Cristina Blasco, Mónica Fernández, Yolanda Picó.

(下转第98页)



注:1-乙酸 2-丁酸 3-戊酸 4-己酸 5-庚酸 6-辛酸

图1 滴定至终点时酒样中存在的酸类组分

后仍剩有几十甚至上百个 mg/L 的量存在,这对测总酸来说是不容忽视的。

表1 部分酒样中酸类成分的中和率分析结果 (%)

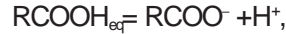
样品	酸类成分					
	乙酸	丁酸	戊酸	己酸	庚酸	辛酸
A	94.6	83.2	73.4	72.2	83.1	70.7
B	95.0	80.4	62.2	85.0	82.6	72.1
C	95.7	83.1	65.4	87.5	76.3	78.0
D	96.0	87.3	75.3	84.2	81.2	82.6
平均值	95.3	83.5	69.1	82.2	80.1	75.8

3 结果与讨论

3.1 我们重点对浓香型酒样作了分析研究,浓香型酒中乙酸、乳酸、丁酸、己酸占据总酸的95%。由于乳酸是3碳酸,分子中含有羟基,酸性强于乙酸,它的中和率应高于乙酸;丁酸含量低,酸性强于己酸,中和率的高低对总酸的测定结果影响不明显;己酸在浓香型酒中含量最高,占据总酸的比例大,其酸性弱,中和程度的高低直接

影响总酸测定的系统误差大小,这与酒中的己酸乙酯含量高直接有关。

3.2 研究时,我们一直期待每种酸的中和率都有一个符合实际的定值出现,根据酸碱平衡理论,溶液中的酸始终存在如下关系:



$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{RCOO}^-]}{[\text{RCOOH}]_{\text{eq}}}$$

$$[\text{RCOOH}] - [\text{RCOOH}]_{\text{eq}} = [\text{RCOO}^-];$$

根据以上推出: $[\text{RCOOH}]_{\text{eq}} / [\text{RCOOH}]$ (剩余率) = $[\text{H}^+] / ([\text{H}^+] + K)^2$, 可见当溶液中的 $[\text{H}^+]$ 确定时,该种酸的剩余率也就确定了,当然中和率也就确定了。这里仅以单体酸的中和反应为理论基础建立理想化模型,实际情况是各种酯的大量存在影响对应酸的平衡,因此,在分析样品时发现各种酸的中和率波动性较大,见表1。

3.3 白酒是一种特殊的溶胶分散体系,白酒中总酸的测定理论是建立在无机溶液的酸碱理论上的,建立时受到当时的分析手段和技术条件的限制,没有论证这种反应的进行程度。因白酒香型不同,发酵期长短不同,酸的组分、种类、含量也不同,清香型酒中以乙酸和乳酸为主体酸,其中和反应程度较彻底,而酱香、浓香型酒中高碳酸含量高,中和程度低。即使是同一酒样,在高度和降度时也因酸的稀释程度不同,其中和程度也有差别。

3.4 目前的毛细管色谱技术无法测出乳酸的含量,有文章报道,利用毛细管色谱结合化学滴定法测定乳酸,将白酒中有机酸经毛细管全分析后,各种酸折算成乙酸相加,与化学法测得的总酸之差即为乳酸的含量(按乙酸计)。就我们研究的情况来看,这种方法对清香型酒是可行的,对于其他香型酒就要深入探讨其可行性了。

3.5 由于总酸测定时的不完全反应,到滴定终点时,继续加碱液皂化测总酯时剩余的酸必然消耗一定的碱,这一部分碱液也计算到总酯的消耗上,这势必对测定总酯的结果有影响,我们建议滴定终点的颜色应改为深红色,保持时间更长些,能最大限度地保证达到中和彻底。

参考文献:

- [1] 武汉大学.分析化学[M].北京:高等教育出版社,
- [2] 庄名扬.中国白酒溶胶特性及其应用原理与方法[J].酿酒, 2002(1):22-26.

(上接第96页)

Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*. 2002, (461):109-116.

[15] J.L.Bernal, M.J.del Nozal, L.Toribio, J.J.Jiménez, J.Atiienza High-performance liquid chromatographic determination

of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples [J]. *Journal of Chromatography A*. 1997, (787):129-136.

[16] 王明月,袁宏球,王秀兰.高效液相色谱法测定多菌灵农药中的有效成分含量[J]. *热带农业科学*, 2004, 24(1):23-26.

[17] GB 10501-2000, 多菌灵原药[S]