

Bond Elut Polymer SCX 固相萃取结合 高效液相色谱测定苹果汁中苯并咪唑抗 真菌剂

应用报告

食品安全

作者

翟振浩, 邹芸
安捷伦科技有限公司
中国上海外高桥保税区, 英伦路 412 号
上海, 200131
中国

Carol Ball
Agilent Technologies, Inc.
200 Regency Forest Drive
Cary, NC 27518
USA(美国)

摘要

本应用报告优化了固相萃取 (SPE) 结合高效液相色谱 (HPLC) 萃取并定量测定苹果汁中两种抗真菌剂(多菌灵和噻菌灵)的方法。结果表明,采用安捷伦 Bond Elut SCX (60 mg, 3 mL) 进行固相萃取,用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm) 进行 HPLC 分析,是萃取并分析这两种化合物的极好组合。方法的回收率在 92.1 到 99.4%之间,相对标准偏差 (RSD)低于 5%,检出限为 4 μg/kg。



Agilent Technologies

前言

不同目的的农药滥用已日益凸显出威胁植物、动物及人类健康的严重环境问题。抗真菌剂就是这些农药中到一类，主要用于防止真菌造成的农作物损害。抗真菌剂在全部所用农药中约占 20-25%。苯并咪唑抗真菌剂在农业上是广泛用于收获前后控制广谱病原体的系列化农药。这类物质直接撒进土壤，或喷雾在农田里，并因此释放到环境中。它们很容易通过根和叶渗入植物，也可以从农田中直接进入自然水源。大部分化合物在使用后都会在环境中长期存在，某些甚至存留数年。苯并咪唑系列中的两个主要化合物是多菌灵和噻菌灵（表 1）。多菌灵对广谱真菌病患具有预防和治疗的三重功能。它对人体、动物和植物有毒性，并于很长时间内存留在水中、废水、土壤、农作物和食品中。噻菌灵用于控制水果和蔬菜病害，如霉菌、腐烂和枯萎，还被用作除虫的兽药。

用安捷伦 Bond Elut SCX SPE 小柱从苹果汁中提取抗真菌剂。本应用报告报导了对 SN/T 1753-2006 所述方法的应用和优化，以及对结果的确证。

实验

材料和化学试剂

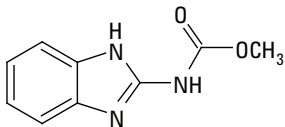
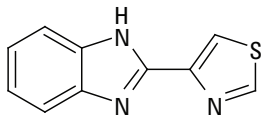
所有试剂和溶剂均为 HPLC 级或分析纯。抗真菌剂标准品购自 Sigma-Aldrich 公司（中国，上海）。苹果汁（食品级）购自当地市场。

磷酸盐缓冲液：1.38 g 磷酸二氢钠和 1.41 g 磷酸氢二钠溶于 1,000 mL 水中，调 pH 至 3.0。

用甲醇配制成储备液 (0.1 mg/mL)，冷冻保存(-20 °C)。用甲醇稀释储备液以配制成工作溶液。工作溶液应每周配制，需 4 °C 条件下保存。

固相萃取小柱为安捷伦 Bond Elut SCX 3 mL, 60 mg (部件号 5982-3236)。分析采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪，配备可变波长检测器 (VWD)。分析柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.5 μm 100 mm \times 2.1 mm 内径 (部件号 959793-902)。进行 HPLC 分析前用安捷伦 0.45 μm 滤膜 (部件号 5185-5836) 过滤样品溶液。

表 1. 本研究所用的抗真菌剂

编号	名称	pKa	Log P	结构
1	多菌灵 CAS # 10605-21-7	4.48	1.45	
2	噻菌灵 CAS # 148-78-8	4.7	2.39	

HPLC 条件

色谱柱:	ZORBAX Eclipse Plus C18 100 mm × 4.6 mm 3.5 μm (部件号 959793-902)
流速:	1.0 mL/min
进样体积:	20 μL
检测波长:	288 nm
流动相:	磷酸盐缓冲液-乙腈 (73:27)

样品制备

称量 10 g 苹果汁, 用水稀释至 100 mL, 用玻璃棒搅动混合 1 分钟。将稀释后的样品转移到 250 mL 锥形烧瓶中, 用 2 mol/L 氢氧化钠溶液将 pH 调为 10。将样品分成 2 或 3 份置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 于 4,000 rpm 离心 10 分钟。将上清液合并到一个玻璃烧杯中。

SPE 纯化

SPE 萃取步骤如图 1 所示。安捷伦 Bond Elut SCX 小柱用 3 mL 甲醇活化, 再用 3 mL 0.15 mol/L 氨水溶液靠重力流动冲洗 (流速约 1 mL/min)。

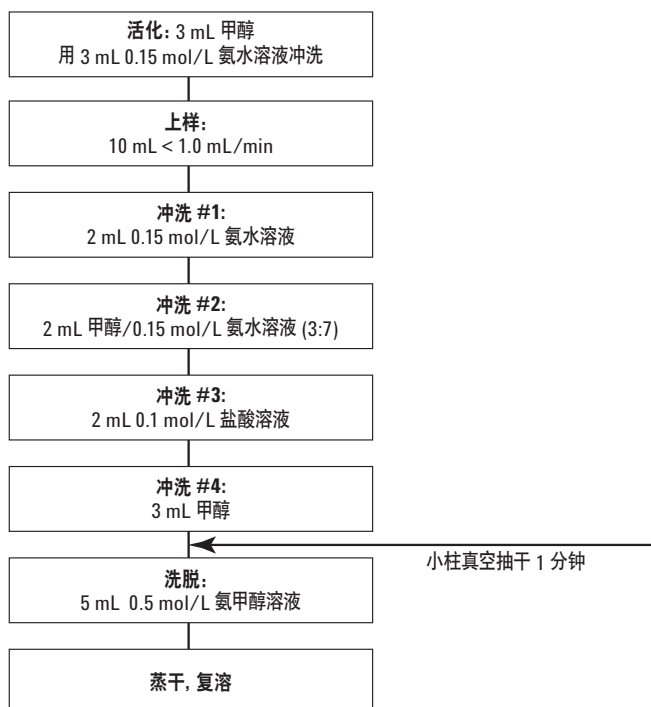


图 1. 苹果汁中抗真菌剂的 SPE 步骤

以 1 mL/min 左右的速度将 10 mL 上清液加载到 Bond Elut SCX 小柱上。待样品完全流出后, 分别用 2 mL 0.15 mol/L 氨水溶液、2 mL 甲醇/0.15 mol/L 氨水溶液(3:7)溶液、2 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液和 3 mL 甲醇冲洗小柱。所有三个冲洗步骤均靠重力流动完成。丢弃所有洗脱液。用 2.0 kPa 负压 1 分钟抽干小柱。最后用 5 mL 0.5 mol/L 氨甲醇溶液重力洗脱小柱。收集洗脱液, 并用氮气吹干。用流动相复溶残渣, 并定容至 1 mL。再用 0.45 μm 滤膜过滤并分析。

结果和讨论

线性和检出限

将储备液稀释成不同浓度, 并用 HPLC 进行分析。用峰面积和溶液浓度计算线性回归。检出限 (LOD) 为信噪比 2 到 3 的进样浓度。线性范围在 25 到 500 μg/kg 之间。线性和检出限见表 2。

表 2. 抗真菌剂的线性和检出限

化合物	回归方程	相关系数	检出限(μg/kg)
多菌灵	$Y = 75.781x - 0.4018$	0.9999	4
噻菌灵	$Y = 108.07x - 0.6984$	0.9999	4

回收率和重现性

在苹果汁中分别添加 25、50 和 100 μg/kg 三个浓度的抗真菌剂标样, 计算回收率。每个浓度重复分析 6 次。空白和添加标准 (100 μg/kg) 的色谱图见图 2 和图 3。回收率和重现性数据见表 3。

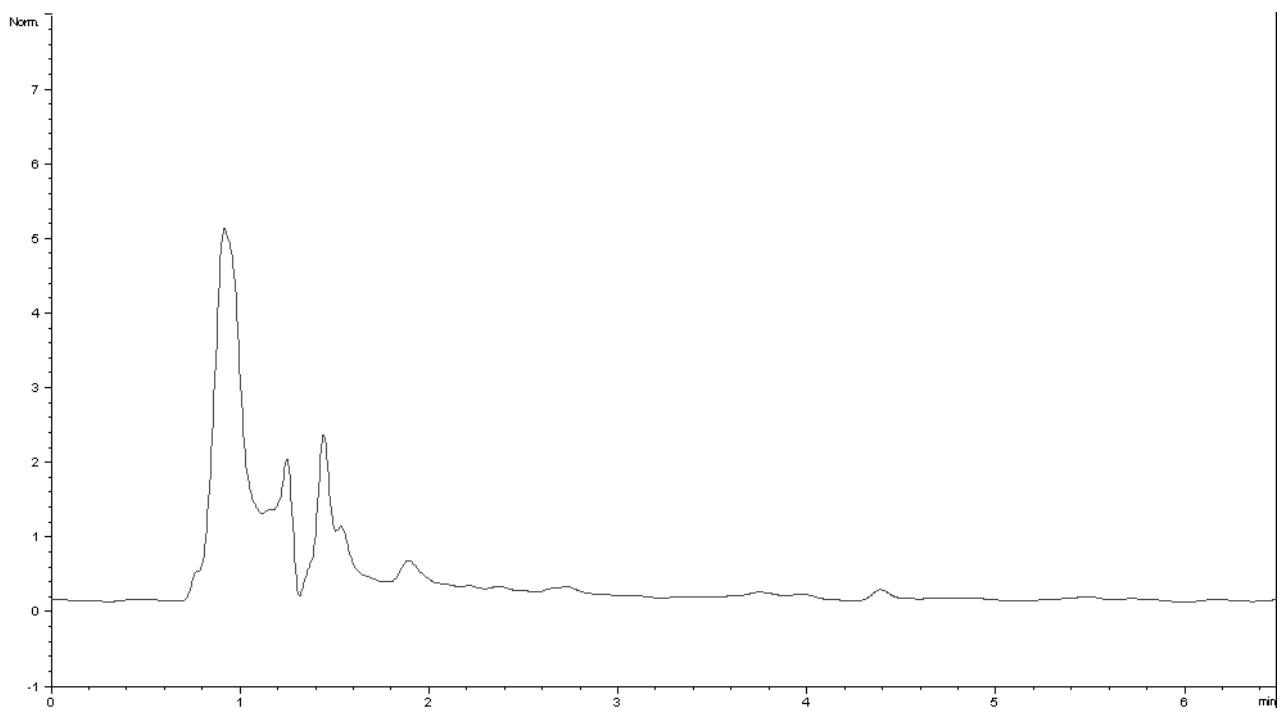


图2. 苹果汁空白的色谱图

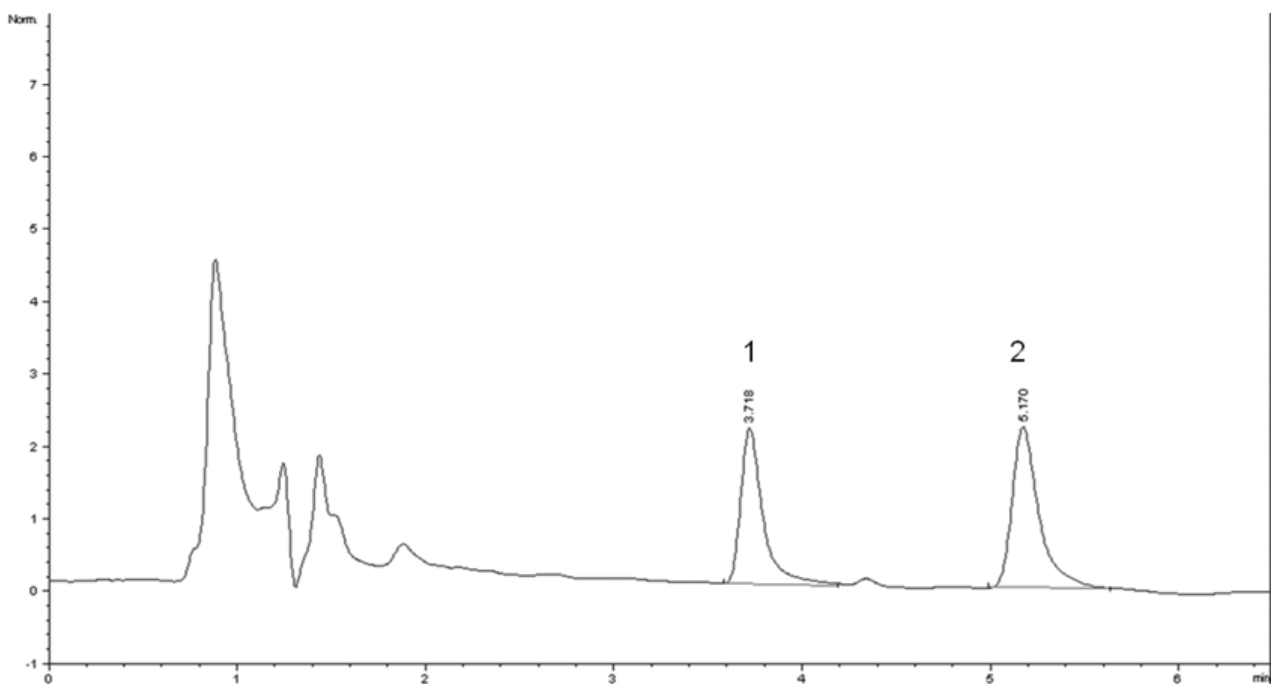


图3. 添加了100 µg/kg 标样的苹果汁样品色谱图 (1-多菌灵, 2-噻菌灵)

表3. 苹果汁中抗真菌剂 SPE 提取的回收率和相对标准偏差 (RSD)

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	% RSD (n = 6)
多菌灵	25	98.6	3.99
	50	99.4	3.24
	100	95.9	3.27
噻菌灵	25	99.0	2.38
	50	92.1	4.90
	100	93.0	3.79

结论

安捷伦 Bond Elut SCX 提供了一种简单而有效的小柱固相萃取方法，对苹果汁中的抗真菌剂进行了纯化和富集。用标准溶液测定的回收率和重现性，符合测定苹果汁中抗真菌剂残留量测定的中国国家标准。苹果汁中的杂质很少，不会干扰任何抗真菌剂的分析。

参考文献

SN/T 1753-2006, Determination of thiabendazole and carbendazim residues in concentrated fruit juice for import and export – High Performance Liquid Chromatographic method.

更多信息

如需了解 Agilent Bond Elut SPE 产品的更多信息，请访问：
www.agilent.com/chem/sampliq。

进一步了解安捷伦 HPLC 色谱柱的信息，请访问：
www.agilent.com/chem/LCcolumns。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本文中所包含的错误，以及因提供和使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本文中的信息、规格和指标如有更改，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
中国印刷
2012年4月11日
5990-3235CHCN



Agilent Technologies