

QuEChERS-高效液相色谱法检测红葡萄酒中 多菌灵和甲霜灵杀菌剂残留*

李培培, 陈敏, 王军

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京, 100083)

摘 要 建立了以 QuEChERS 作为前处理方法, 采用高效液相色谱 (HPLC) 检测红葡萄酒中多菌灵和甲霜灵的有效方法。结合考虑 2 种农药的性质, 对 QuEChERS 的提取盐和净化试剂进行优化, 最终选用 NaCl 与 NaAc 为提取盐, PSA 作为吸附净化剂。多菌灵和甲霜灵均在 0.2 ~ 5.0 mg/L 范围内具有良好的线性相关性, 线性系数在 0.999 以上。多菌灵和甲霜灵的加标回收率为 85.3% ~ 98.34%, 相对标准偏差 (RSD) 值为 3.61% ~ 10.22%。QuEChERS 方法与其他常规前处理方法相比, 通用性强、操作简便、成本低、提取效率高, 可以作为检测红葡萄酒中该类农药残留的有效前处理方法。

关键词 红葡萄酒; 多菌灵; 甲霜灵; QuEChERS; 高效液相色谱法 (HPLC)

葡萄酒中富含多种营养及保健成分, 具有延缓衰老、美容养颜和预防心脑血管疾病等多种功效, 随着人们对健康、高水平生活的重视和追求, 葡萄酒的需求量越来越大。然而葡萄在种植过程中容易感染病害, 防治病害的常用农药主要有苯并咪唑类和酰胺类等^[1], 不恰当的使用农药, 容易造成葡萄产品中这类农药超标。

农药残留检测的前处理方法主要有液液萃取法^[2-3]、固相萃取小柱法^[4-10]等, 液液萃取法需要使用多种溶剂反复萃取才能达到样品分析要求, 操作复杂、费时、溶剂用量大。固相萃取小柱法则操作较复杂, 需要配套装置, 成本较高。QuEChERS 前处理方法使用乙腈提取后加入净化剂净化即可, 所用试剂盐包廉价易得, 操作简便、所需溶剂少、提取效率高。样品前处理后常用的分析农药残留的仪器有色谱^[7-10]、气质联用^[11-12]和液质联用等^[13-16]。已有文献报道使用 QuEChERS 前处理方法同时检测多种农药残留^[17-19], 柳茵^[20]的报道中表明, 用此方法可以同时检测多菌灵和甲霜灵残留, 色谱-质谱联用方法具有良好的选择性和灵敏度, 但这类仪器昂贵, 使用成本高, 应用受到一定限制。色谱仪应用较普遍, 操作简便且成本低, 本文选用防止葡萄病害的多菌灵

和甲霜灵分别作为苯并咪唑类和酰胺类农药的典型代表, 通过优化条件, 建立 QuEChERS 前处理方法, 再采用高效液相色谱 (HPLC) 分析方法, 为检测红葡萄酒中不同种类的农药残留提供了一种简单有效的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

多菌灵 (纯度 99.5%), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲霜灵 (纯度 99.5%), 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; 乙腈、甲醇 (色谱纯), 北京百灵威科技有限公司; C₁₈、PSA (乙二胺-N-丙基硅烷) 填料 (40 ~ 60 μm), 天津博纳艾杰尔有限公司; 无水 MgSO₄、NaCl、无水乙酸钠 (NaAc)、水合柠檬酸氢二钠 (Na₂HCit · 1.5H₂O)、二水柠檬酸三钠 (Na₃Cit · 2H₂O)、乙酸铵 (CH₃COONH₄), 皆为分析纯。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 配有低压四元泵、手动进样器、柱温箱、G1315C 二极管阵列检测器, 美国 Agilent 公司; QL-861 旋涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 飞鸽 TDL-5-A 离心机, 上海安科公司; Milli-Q 超纯水机, 美国 Millipore 公司。

1.3 标准溶液的配制

分别准确称取多菌灵和甲霜灵 10.0 mg (精确到 0.1 mg), 用甲醇溶解并定容至 100.0 mL, 配置成单标标准母液, 于 -20 ℃ 贮存备用。分别取 20, 50, 100, 200, 500 μL 2 种单标标准母液用甲醇稀释, 配置

第一作者: 硕士研究生 (王军副教授为通讯作者, E-mail: chwj75@163.com)。

* “十二五”国家科技支撑计划《食品加工过程质量安全在线监测与控制技术集成示范》(2012BAD29B04-1)

收稿日期: 2014-09-19, 改回日期: 2014-10-21

成 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L 的标准工作液。

1.4 样品前处理

量取红葡萄酒 10.0 mL 于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中, 加入 10.0 mL 乙腈, 涡旋 1 min, 加入 4 g 无水 MgSO_4 、1 g NaCl 、1 g 无水 NaAc , 迅速振荡溶解钠盐后涡旋 1 min, 以 3 000 r/min 离心 5 min。取静置后的上清液 2 mL 置于 5 mL 离心管中, 5 mL 离心管中事先装入 300 mg 无水 MgSO_4 和 100 mg PSA, 涡旋 1 min, 在 3 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 滤膜后待测定。

1.5 色谱条件

色谱柱: Phenomenex HYPERSIL ODS- C_{18} (250 mm \times 4.60 mm, 5 μm); 流动相: 充分利用四元泵, 准备三个流动相, A: 超纯水、B: 乙腈、C: 50 mmol/L 的乙酸铵水溶液, 其中 $V_A: V_B: V_C = 45: 45: 10$ 用于多菌灵的检测, $V_A: V_B = 50: 50$ 用于甲霜灵的检测。流速: 1 mL/min; 检测波长: 286 nm (多菌灵) 和 194 nm (甲霜灵); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 10 μL 。

2 结果与分析

2.1 QuEChERS 的优化

虽然 QuEChERS 各个方法所用试剂及用量之间存在差异, 但其原理相同, 即首先加入乙腈, 通过涡旋使水相与乙腈充分接触, 以达到农药充分转移的目的, 然后加入无水 MgSO_4 和提取盐, 其中无水 MgSO_4 起到吸水作用, 提取盐是为了提高离子强度或创造合适的萃取环境。之后加入 PSA、 C_{18} 或 GCB (石墨化碳黑) 等吸附剂除去干扰物起到净化作用。

2.1.1 吸附净化剂的选择

QuEChERS 的吸附净化剂主要有 3 种, 分别是 C_{18} 、PSA、GCB, 其主要作用见表 1。

表 1 主要的净化剂及其作用

Table 1 main purification reagents and their function

| 净化剂 | 作用 |
|-----------------|---|
| C_{18} | 吸附基质中的脂肪和脂类等非极性干扰物 ^[15] |
| PSA | 吸附基质中的碳水化合物、脂肪酸、有机酸、酚类和少量的色素 ^[15] (属于极性吸附) |
| GCB | 强烈吸附基质中的甾醇类、色素和非极性干扰物 ^[19] |

红葡萄酒的主要成分有水、乙醇、有机酸、糖类、酚类物质和芳香物质。从表 2 可以看出, GCB 强烈吸附非极性干扰物, 对非极性的农药也会有吸附, 多

菌灵属于非极性农药。根据红葡萄酒的成分和 3 种吸附净化剂的作用以及农药的性质, 初步选定 C_{18} 和 PSA 作为吸附剂。

以加标 0.5 mg/L 多菌灵和 1.0 mg/L 甲霜灵的红葡萄酒为样品, 分别采用 PSA + C_{18} (a 组) 和 PSA (b 组) 为吸附剂, 其他实验条件相同作对比, 结果如图 1 所示。

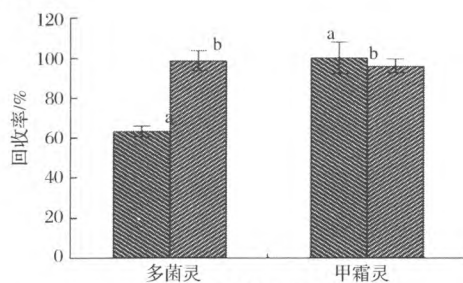


图 1 不同净化剂对 2 种农药回收率的影响

Fig. 1 Effect of different purification reagents on the recovery of two pesticides

从图 1 可以看出, 对于多菌灵来说, a 组的回收率明显低于 b 组, 这是因为多菌灵是非极性农药, 而 C_{18} 对非极性物质有较好的吸附作用; 对于甲霜灵 a 和 b 两组的差异不大, 因此只选择 PSA 作为吸附净化剂。

2.1.2 提取盐的选择

QuEChERS 提取盐主要有 NaCl 、无水 NaAc 、 $\text{Na}_2\text{HCit} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_3\text{Cit} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。其中 NaCl 的作用是溶于样品水溶液中提高离子强度, 使水与乙腈充分分离; 无水 NaAc 缓冲盐可以使萃取环境处于一个弱碱性环境, $\text{Na}_2\text{HCit} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_3\text{Cit} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 缓冲盐组合使用可以使萃取环境的 pH 保持在 5.5 左右, 保护在这个 pH 范围稳定的目标化合物^[21]。

以加标 0.5 mg/L 多菌灵和 1.0 mg/L 甲霜灵的红葡萄酒为样品, 分别采用 NaCl (A 组)、 $\text{NaCl} + \text{NaAc}$ (B 组) 和 $\text{NaCl} + \text{Na}_3\text{Cit} \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HCit} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (C 组) 为提取盐, 其他实验条件相同做对比, 实验结果见图 2。

从图 2 可以看出, 对于多菌灵来说, A 组的回收率低于 B 和 C 组, 这可能是由于多菌灵在较高的 pH 条件下 (5.5 以上) 容易转移到有机溶剂中^[4], A 组只加入 NaCl , 萃取环境 pH 是红葡萄酒自身的 pH, 通过实验验证在 2.7 ~ 3.8 之间。而后两组的回收率相差不大; 对于甲霜灵来说, B 组回收率比 A、C 组稍高, 综合考虑, 选择 $\text{NaCl} + \text{NaAc}$ 为提取盐。

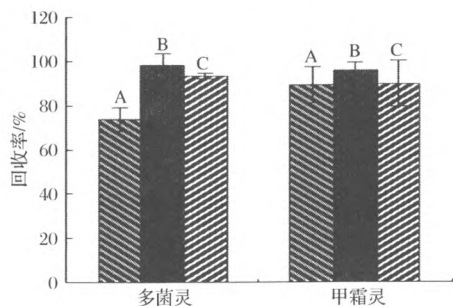


图2 不同提取盐对2种农药回收率的影响
Fig. 2 Effect of different extraction salts on the recovery of two pesticides

2.2 线性范围和检出限、定量限

用甲醇稀释标准母液,配制成0.2,0.5,1.0,2.0,5.0 mg/L的标准工作液进行HPLC分析,多菌灵和甲霜灵标准工作液的色谱图如图3。分别以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准工作曲线,多菌灵标准工作曲线方程为 $y = 39.280x - 0.359$,相关系数为 $r = 0.999\ 95$;甲霜灵的标准工作曲线方程为 $y = 90.011x + 1.204$,相关系数 $r = 0.999\ 53$,多菌灵和甲霜灵在0.2~5.0 mg/L范围内线性良好。

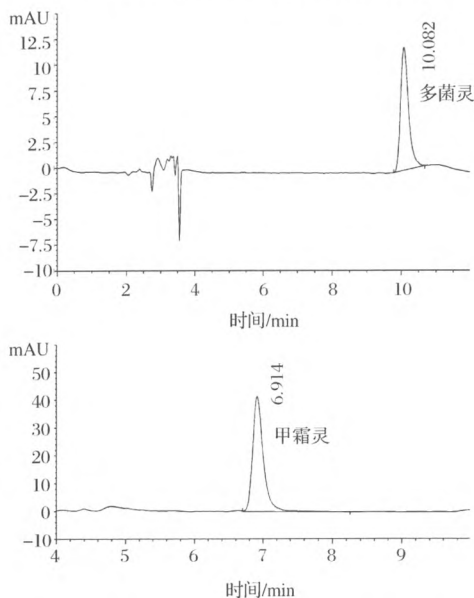


图3 多菌灵和甲霜灵标准工作液色谱图
Fig. 3 Chromatograms of carbendazim and metalaxyl standard solution

以3倍信噪比计算检出限(LOD),10倍信噪比计算定量限(LOQ),结果如表2所示。

2.3 方法的回收率和精密度

在空白阴性红葡萄酒中加多菌灵和甲霜灵混标

表2 多菌灵和甲霜灵的检出限和定量限
Table 2 The limit of detection and the limit of quantitation of carbendazim and metalaxyl

| 农药名称 | 检出限/(mg·L ⁻¹) | 定量限/(mg·L ⁻¹) |
|------|---------------------------|---------------------------|
| 多菌灵 | 0.017 | 0.056 |
| 甲霜灵 | 0.054 | 0.180 |

进行加标回收率实验,加标浓度分为低、中、高三个级别,分别为最大残留量MRL(多菌灵为0.5 mg/L,甲霜灵为1.0 mg/L)的0.5,1.0,3.0倍,即多菌灵加标浓度为0.25 mg/L,0.5 mg/L,1.5 mg/L;甲霜灵加标浓度为0.5 mg/L,1.0 mg/L,3.0 mg/L,个浓度做5次平行实验评价方法精密度。按照优化后的QuEChERS方法进行样品前处理,按照1.4所示色谱条件进样,加标多菌灵和甲霜灵的样品色谱图如图4。加标回收率和相对标准偏差RSD如表3。

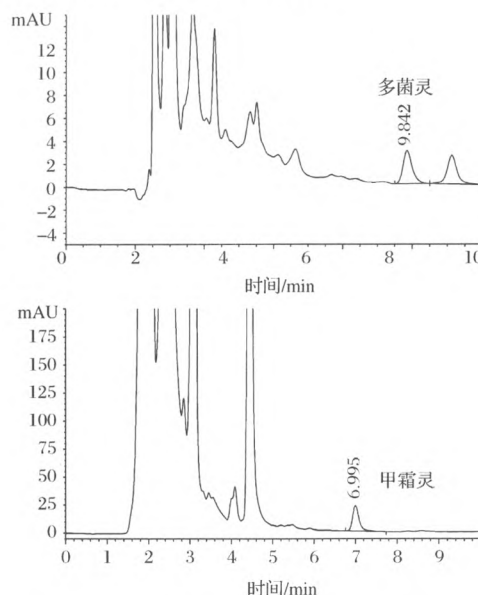


图4 加标多菌灵和甲霜灵的样品色谱图
Fig. 4 Chromatograms of the sample spiked with carbendazim and metalaxyl

表3 多菌灵、甲霜灵的最大残留限量(MRL)、回收率和RSD值(n=5)

Table 3 the MRL, recovery and RSD of carbendazim and metalaxyl(n=5)

| 农药名称 | 回收率/% | | | RSD/% | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | 低 | 中 | 高 | 低 | 中 | 高 |
| 多菌灵 | 88.32 | 98.34 | 85.3 | 7.32 | 10.22 | 6.23 |
| 甲霜灵 | 91.05 | 95.82 | 87.46 | 8.53 | 3.61 | 6.56 |

从表3可以得出,该方法中多菌灵和甲霜灵的回收率为85.3%~98.34%,说明方法的准确度良好,

相对标准偏差 RSD 值为 3.61% ~ 10.22%, 符合分析要求。

2.4 实际样品的检测

欧盟规定葡萄酒中多菌灵的最大残留量(MRL)为 0.5 mg/L, 甲霜灵的最大残留量(MRL)为 1.0 mg/L。实验选取国内 2 个品牌 3 种红葡萄酒及法国两个品牌红葡萄酒, 分别按照上述前处理和样品分析方法进行检测, 这 5 种红葡萄酒均未检出多菌灵和甲霜灵残留, 这也说明这些葡萄酒中农药残留控制较好。该方法的检出限值和定量限值都低于红葡萄酒中的限量要求, 该方法适合测定红葡萄酒中的多菌灵、甲霜灵农残。

3 结论

综合考虑多菌灵和甲霜灵(分别属于苯并咪唑类和酰胺类农药)的性质, 对 QuEChERS 的提取盐和净化试剂进行合理的优化, 最终选用 NaCl + NaAc 为提取盐, 选用 PSA 作为净化剂。QuEChERS 方法通用性强、所需提取溶剂少、提取效率高、廉价且操作简便。通过加标回收率实验, 2 种农药的回收率为 85.3% ~ 98.34%, 说明方法的准确度良好, 相对标准偏差 RSD 值 3.61% ~ 10.22%, 符合分析要求, 适合分析红葡萄酒中多菌灵和甲霜灵残留。研究结果也可作为检测葡萄酒中其他苯并咪唑类和酰胺类农药残留提供参考方法。

参考文献

- [1] 马志强, 毕秋燕, 王文桥, 等. 葡萄霜霉病对多种杀菌剂的敏感性[C]/中国植物保护学会第十一次全国会员代表大会暨 2013 年学术年会. 青岛: 中国植物保护学会, 2013: 391 - 394.
- [2] 刘一军, 赖克强, 戴月, 等. 分散液液微萃取 - 气质联用检测葡萄酒中的有机氯农药残留[J]. 光谱实验室, 2013, 30(1): 228 - 233.
- [3] 王春利, 李天宝, 刘炜, 等. 液液萃取 - 气相色谱 - 质谱联用快速检测葡萄酒中 14 种农药残留[J]. 酿酒科技, 2012(8): 112 - 115.
- [4] GB/T 23380 - 2009. 水果、蔬菜中多菌灵残留的测定 - 高效液相色谱法[S].
- [5] 何书海, 李腾崖, 陈菲. 高效液相色谱法对环境样品中甲基托布津与甲霜灵残留的测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(2): 161 - 164.
- [6] 吴凤琪, 沈金灿, 吴卫东, 等. 固相萃取 - 气相色谱串联质谱法测定葡萄酒中 75 种农药残留量[J]. 食品科技, 2014, 39(5): 268 - 274.
- [7] 庄丽丽. 固相萃取 - 气相色谱法测定葡萄酒中 16 种有机磷农药残留[J]. 农药, 2012, 21(5): 11 - 16.
- [8] 蒋宏, 王鹏, 朱龙仙. 葡萄酒中 17 种残留农药的固相萃取 - 气相色谱/负化学离子源质谱测定方法研究[J]. 酿酒科技, 2012(5): 98 - 101.
- [9] 陈晶, 苏建峰, 张光军, 等. 固相萃取气相色谱 - 质谱法测定葡萄酒中 118 种农药残留[J]. 理化检验, 2011, 47: 449 - 452.
- [10] 何书海, 李腾崖, 陈菲. 高效液相色谱法对环境样品中甲基托布津与甲霜灵残留的测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(2): 161 - 164.
- [11] 王亚钦. 气相色谱质谱联用测定葡萄酒中农药多残留[D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
- [12] 王华, 彭小燕, 李继兰. 加速溶剂萃取结合 GC-MS 测定葡萄酒中甲霜灵的残留[J]. 食品工业, 2009(1): 71 - 74.
- [13] 王岑, 吴广枫. 高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定葡萄酒中 69 种农药多残留[J]. 食品科学, 2011, 32(增刊): 165 - 171.
- [14] 陈达伟, 吕冰, 丁颖, 等. 超高效液相色谱 - 同位素稀释高分辨率质谱法测定红葡萄酒中 18 种农药残留[J]. 色谱, 2014, 32(5): 485 - 492.
- [15] 陈雪薇. 液相色谱 - 串联质谱法检测葡萄酒中农药多残留[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [16] AB SCIEX 亚太应用支持中心. AB SCIEX 公司检测葡萄酒中多菌灵和甲霜灵的整体解决方案[J]. 食品安全导刊, 2013(10): 34 - 35.
- [17] 陈楠楠, 高红波, 钟其顶, 等. 分散固相萃取 GC-MS 法快速测定葡萄酒和葡萄中 22 种农药残留[J]. 酿酒科技, 2012(7): 119 - 123.
- [18] 任晓燕, 谢勇, 唐宗贵, 等. 基质固相分散气相色谱 - 质谱联用 - 检测葡萄酒中 9 种有机磷农药残留[J]. 农产品加工, 2010(4): 66 - 68.
- [19] 陈士恒, 章晴, 史晓梅, 等. DSPE-GC-MS 快速测定葡萄酒中 52 中农药残留[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(1): 14 - 22.
- [20] 柳茵, 张亚莲, 丁涛, 等. 高效液相色谱 - 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱用于葡萄酒中 111 种农药残留的定性筛查与定量分析[J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 489 - 498.
- [21] Lehotay S J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce [J]. Journal of AOAC International, 2007, 90(2): 485 - 192.

Determination of carbendazim and metalaxyl pesticides in red wine by QuEChERS-high performance liquid chromatography

LI Pei-pei, CHEN Min, WANG Jun

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT A method was developed for the determination of benzimidazole and amides pesticides in red wine by QuEChERS-high performance liquid chromatography (QuEChERS-HPLC). In this article, extraction salts and purification reagents of QuEChERS were optimized reasonably, according to the nature of benzimidazole and amides pesticides. After comparison, NaCl and NaAc were chosen as extraction salt and PSA as purification reagent finally. The calibration curve of carbendazim and metalaxyl showed good linearity at the range 0.2 ~ 0.5 mg/L, with the correlation coefficient more than 0.999. Recoveries at three spiked concentration levels ranged from 85.3% to 98.34%, with the relative standard deviation (RSD) at the range from 3.61% to 10.22%. The method provides higher universality and extraction efficiency due to its simple pre-treatment and less extraction solvent compared with other conventional method. So it is a good method to analyze the residues of benzimidazole and amides pesticides in red wine.

Key words red wine; carbendazim and metalaxyl pesticides; QuEChERS; high performance liquid chromatography