

云南小粒速溶咖啡中百菌清提取净化方法研究

刘丹丹¹, 孙晓帅¹, 王志洪², 乔琴¹, 何飞飞^{1*}

(1. 云南大学农学院, 云南昆明 650091; 2. 云南三标农林科技有限公司, 云南昆明 650302)

摘要 [目的]探讨云南小粒速溶咖啡中百菌清的最佳提取净化方法。[方法]分别采用石油醚-丙酮萃取法、固相吸附法及二氯甲烷-丙酮萃取法这3种不同的方法提取净化云南小粒速溶咖啡中的百菌清,并利用高效液相色谱进行加标回收测定,根据回收率的大小和净化方式的繁简,确定最适宜的百菌清测定方法。[结果]3种不同方法提取净化百菌清的加标回收率分别为85.3%、111.4%和118.7%。[结论]通过回收率及净化方式的比较可知,可利用固相吸附法对云南小粒速溶咖啡中的百菌清进行提取纯化。

关键词 速溶咖啡; 百菌清; 提取净化; 方法优化

中图分类号 S571.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)32-0092-02

Study on Extraction and Purification Method of Chlorothalonil in Yunnan Small Grain Instant Coffee

LIU Dan-dan¹, SUN Xiao-shuai¹, WANG Zhi-hong², HE Fei-fei^{1*} et al (1. School of Agriculture, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091; 2. Yunnan Three Standard of Agriculture and Forestry Science and Technology Co. Ltd., Kunming, Yunnan 650302)

Abstract [Objective] The aim was to explore the optimal extraction and purification method for chlorothalonil in Yunnan small grain instant coffee. [Method] Three different extraction and purification methods (aether petrolei-acetone extraction, solid-phase adsorption and dichloromethane-acetone extraction) were performed to extract chlorothalonil in instant coffee. Then all of the extractions were tested using high performance liquid chromatography (HPLC). The most suitable method was determined according to the percentages of recovery measurement. [Result] The results obtained by three different extraction and purification methods showed that the recovery percentages were 85.3%, 111.4% and 118.7%, respectively. [Conclusions] By comparing recovery rate and purification methods, solid-phase adsorption method was the best one for testing chlorothalonil in Yunnan small grain instant coffee.

Key words Instant coffee; Chlorothalonil; Extraction and purification; Method optimization

云南咖啡属阿拉伯原种的变异种,经过长期的栽培驯化,现被称为“云南小粒种咖啡”。由于云南光照时间长,昼夜温差大,有利于咖啡养分的积累,因此,云南小粒咖啡的营养成分高于国内外其他咖啡品种,形成了自己的特色。随着云南咖啡产业的快速发展,速溶咖啡占据了很大市场。在咖啡的生产栽培过程中会使用大量的杀菌剂及杀虫剂,在咖啡豆的加工中也会出现污染。速溶咖啡属于直接饮用的食品,农药残留等成了安全问题中的最大隐患。

农药残留主要是由直接施药引起的,也可以是吸收环境中的农药或通过食物链富集造成。农药的理化性质、作物类型、施药方法、环境因子都是影响残留的因素。在同一区域内施用多种农药,存在农药的同系物、异构体、降解产物或代谢产物的影响^[1],农作物通过根茎吸收、传导等途径,使农药进入其组织内部,从而加大了检测的难度。因此,发展各种新的分析方法,特别是多种类农药残留量的同时分析方法具有重要的意义。目前,对于咖啡的农药残留检测均局限于对咖啡豆的检测^[2],鲜有关于对速溶咖啡检测的报道。农业部NY/T 289—1995在标准中只是规定了六六六、滴滴涕2种农药的残留量及测定方法^[3]。

百菌清是非内吸性广谱杀菌剂,该农药残留的测定方法在黄瓜、茶叶及咖啡豆中均有报道^[3-4],检测方法多为气相

色谱法、高效液相色谱-质谱联用法、毛细管电泳法等^[5-6]。其中,质谱联用方法灵敏度高,但是价格昂贵,运行成本较高。因此,建立快速、高效、易推广的检测方法具有一定的现实意义。笔者通过加标回收使用3种不同的方法对速溶咖啡中的百菌清进行提纯净化,通过比较探讨该农药最适宜的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料 原料:云南产小粒速溶咖啡。主要仪器:高效液相色谱仪(Waters,e2695-2489),超声波振荡仪器,旋转蒸发器。主要试剂:百菌清标准品(99.5%),购自国家标准物质中心;甲醇、二氯甲烷、石油醚、丙酮、乙酸乙酯、柠檬酸氢二钠、乙腈、氯化钠、无水硫酸钠、N-丙基乙二胺键合固相吸附剂,均为色谱纯,购自阿拉丁试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制。在50 mL容量瓶中,精密称取百菌清标准品20 mg,加入40 mL二氯甲烷,放入超声浴中溶解15 min,冷却至室温,用二氯甲烷稀释至刻度,混匀,贮于冰箱中。

1.2.2 色谱条件。检测器:紫外检测器;检测波长:240 nm;色谱柱:Gemini 5 μm , 250 mm $\times$ 4.6 mm;流动相:甲醇-水(75%:25%);流速:1.0 mL/min;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;进样量10 μL 。

1.2.3 样品前处理及测定。该试验采用浓度为1.0 mg/L百菌清对云南小粒速溶咖啡进行处理,采用3种不同的方法提取净化百菌清,并进行高效液相色谱法测定。

1.2.3.1 石油醚-丙酮萃取法(处理①)。称取1 g速溶咖啡,用37 μm (相当于400目)筛选,置于100 mL具塞三角瓶中。加入石油醚-丙酮(4:1)混合溶剂30 mL,超声提取15 min,过滤后取滤液净化。吸取试样提取液2 mL,注入已

基金项目 云南省建立农科教相结合新型农业社会化服务体系试点云咖啡产品单元子项目“咖啡产品质量标准研究和检测平台”(2014NG004)。

作者简介 刘丹丹(1985-),女,山东兖州人,讲师,博士,从事园艺作物农药残留检测研究。*通讯作者,副教授,博士,从事咖啡质量检测研究。

收稿日期 2016-09-12

淋洗过的层析柱中,用石油醚-乙酸乙酯(95:5)混合溶剂100 mL洗脱。收集洗脱液于蒸馏瓶中,于旋转蒸发仪上浓缩近干,用少量石油醚多次溶解残渣于刻度离心管中,定容至1.0 mL,在色谱条件下进行分析。

1.2.3.2 固相吸附法(处理②)。称取1 g速溶咖啡于50 mL具盖离心管中,精确至0.1 mg,加入10 mL水,振荡,直至样品被水充分浸润,静止10 min。移取10 mL乙腈和1 mL混合内标工作液到离心管中,于旋涡混合振荡仪上以2 000 r/min速度振荡1 min,分别加入4 g无水硫酸镁、1 g氯化钠、1 g柠檬酸钠、0.5 g柠檬酸氢二钠和5 mL甲苯,立即于旋涡混合振荡仪上以2 000 r/min速度振荡2 min,以防止无水硫酸镁遇水反应造成局部过热并结块,然后以4 000 r/min离心10 min。移取5 mL样品提取液上层清液于10 mL离心管中,加入500 mg无水硫酸镁和150 mg N-丙基乙二胺键合固相吸附剂,于旋涡混合振荡仪上以2 000 r/min速度振荡2 min,以6 000 r/min离心2 min,上机测定。

1.2.3.3 二氯甲烷-丙酮萃取法(处理③)。称取1 g速溶咖啡,用37 μm(相当于400目)筛选,置于100 mL具塞三角瓶中。加入30 mL二氯甲烷与丙酮混合液(9:1),在超声浴中萃取15 min。提取液过装有无水硫酸钠的漏斗,用20 mL二氯甲烷洗涤比色管3次,用100 mL蒸馏瓶收集滤液。30℃水浴在旋转蒸发器上蒸发至近5 mL,过弗罗里硅土预柱,用20 mL二氯甲烷分3次洗蒸馏瓶。再用60 mL二氯甲烷分4次洗涤预柱,收集全部预柱流出液于200 mL蒸发皿中。置于通风橱内,水浴30℃挥发至近干,用二氯甲烷移于5 mL比色管内,定容,过0.45 μm有机相滤膜,仪器自动进样检测。

1.2.4 结果计算。试样中百菌清的质量分数按下式计算:

$$W=(A_1/A_2)\times m_1/m_2\times V_1/V_2$$

式中,W为试样中百菌清的质量分数(mg/kg); A_1 为被测定试样各组分的峰值(峰高或面积); A_2 为百菌清标准的峰值; m_1 为百菌清标准溶液的质量(ng); m_2 为被测定试样的取样量(g); V_1 为被测定试样的稀释体积(mL); V_2 为被测定试样的进样体积(μL)。

2 结果与分析

百菌清经3种不同的方法提取、净化后用高效液相色谱法测定,通过对回收率的测定进行比较,选出百菌清高效液相色谱法测定最适宜的方法。

百菌清标准品的出峰时间为3.749 min,如图1所示。用1.0 mg/L百菌清处理速溶咖啡后,经高效液相色谱测定其含量,如图2所示,处理①所测误差较大,处理②、③结果准确。根据回收率的计算,处理①、②、③的平均回收率分别为85.3%、111.4%、118.7%。

3种提取纯化的方法操作复杂,均需经多次纯化才能得到合格净化液,耗时长。其中,处理①为普遍采用的测定方法,但是回收率较低;处理②与处理③的测定方法准确,精密度较高。因此,后2种均可作为测定百草清的方法,比传统检测法更能满足目前的要求。但是,值得注意的是处理③比

处理②更为繁琐,操作过程中误差较大,因此,建立使用固相吸附法对速溶咖啡中百菌清的提取纯化进行萃取。

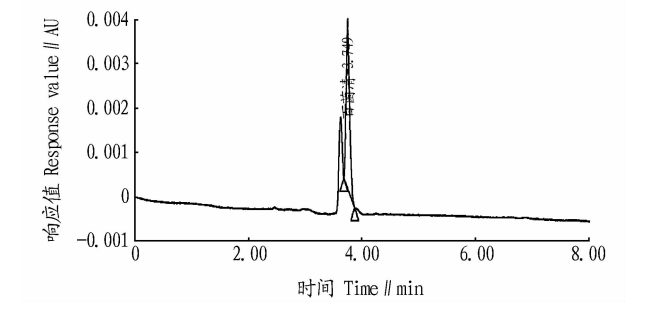


图1 百菌清标准品的色谱
Fig.1 Chromatography of chlorothalonil standards

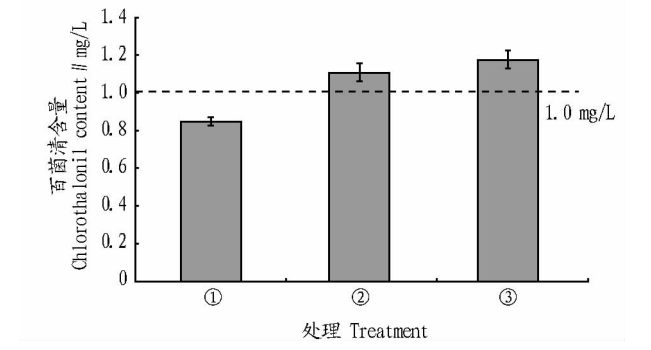


图2 不同处理方法测定速溶咖啡粉中百菌清的含量
Fig.2 Chlorothalonil content in instant coffee powder determined by different processing methods

3 结论与讨论

据有关数据统计,我国咖啡消费者的数量越来越大,安全问题逐渐成为关注的焦点。咖啡中的农业残留主要是在种植过程中使用或从环境中摄入的,常用的杀虫及杀菌剂有六六六、滴滴涕、乐果、百菌清、多菌灵、甲基托布津等^[3]。这些农药的种类繁多,性质各异,在食品中的残留量极低,传统的分析方法难以保证其检测精度。目前,测定农药残留主要采用离子-气象色谱-质谱联用的方法^[7],但是测定费用较高并且针对性较差。随着现代检测技术的进步,开发高效准确的农药残留检测方法,以及制定严格的农药限量标准尤其重要。该研究采用3种不同的方法萃取净化速溶咖啡中百菌清,并通过高效液相色谱检测技术对其加标回收率进行了测定,研究了这几种方法对样品中农药多残留检测的稳定性和适用性,最终确定采用固相吸附法提取纯化速溶咖啡中的百菌清效果最好。

参考文献

[1] 裴志国. 吡虫啉在小麦大田中的残留规律及底物固相分散法在农药残留分析中的应用[D]. 天津:南开大学,2003.

[2] 刘春华,乐渊,阳辛风,等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定生咖啡豆中多菌灵等农药残留[J]. 广东农业科学,2012,39(24): 108-110.

[3] 李维锐,张洪波,李文伟. 小粒种咖啡病虫害防治技术规程:NY/T 1698-2009[S]. 北京:中国农业出版社,2009.

[4] 石键,沈在忠. 黄瓜中百菌清残留量的测定:GB/T 5009.105-2003[S]. 北京:中国标准出版社,2004.

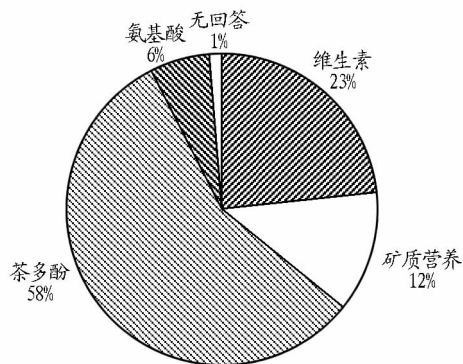


图 10 消费者对茶叶主要养分的认识

Fig. 10 The consumers' recognition of main nutrients in tea

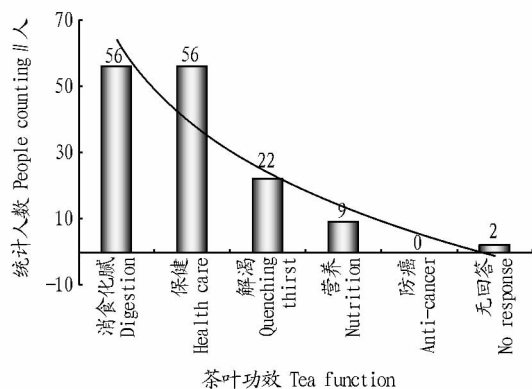


图 11 消费者对茶叶功效的认识

Fig. 11 The consumers' recognition of the tea function

3 结论与讨论

该次调查结果显示,人们在喝茶习惯上具有饮茶泡茶器具随意、不讲究;泡茶方式不科学,存在边浸边喝的不良习惯;饮茶选择时间不科学,应大力倡导饭后 30 min 饮茶的好习惯;消费者在茶叶特性认识上,主要关注茶叶的风味和香气,对色泽关注度较低;在茶叶的营养成分认识上仍然有相当多的消费者对茶多酚缺乏了解;在茶叶的医学保健认识上,偏重于消食化腻,而对防癌的功效认识极其不足。这些说明,青岛市民的茶叶消费观念仍然处于尝味阶段,对茶叶的营养和保健功效认识较差,在一定程度上阻碍着茶叶消费的提高,今后应增强对茶叶的全面介绍和宣传,使更多的消费者能够了解茶叶的功效。

我国的饮茶文化历史悠久,在漫长的利用过程中,不同时期对茶叶功效认识上出现不同特点,如从最初的医疗作用转变为注重风味品质^[16-17]。另外,在喝茶的手法、技艺、道

具等方面研究较深,形成具有我国特点的茶文化^[18]。这些经验总结促进人们对茶叶认识的同时,也产生了一些不良影响,形成一些不科学的认识。随着现代医学的发展,对茶叶功效认识的增强,应及时地改变现有传统饮茶观念,在日常生活中,尽量去除一些经验性和缺乏科学依据的错误认识,在注重原有茶文化的同时,逐步转变观念,提高健康饮茶的认识度,形成风味与健康并重的共识,让茶叶这一传统饮品在未来人们生活中发挥更大的作用。

该次调查从营养健康的角度对日常饮茶习惯进行了分析,指出还有相当比例的人群对科学健康饮茶知识缺乏了解,在日常饮茶习惯上存在一些不良的习惯,这些基础数据的获得,为今后人们科学合理地饮茶提供了可参考依据,将促使我国茶叶消费从品味阶段逐渐向健康饮用转变。

参考文献

- [1] 章传政,朱世桂,黎星辉,等. 试论茶文化的起源:和“原始茶道”论者商榷[J]. 南京农业大学学报(社会科学版),2006,6(2):80-84.
- [2] 陈文华. 论中国的茶艺及其在中国茶文化史上的地位:兼谈中日茶文化的不同发展方向[J]. 中国农史,2005,24(3):3-11.
- [3] 陈俏巧. 中国古代茶具的历史时代信息[D]. 上海:华东师范大学,2005.
- [4] 张庆,陈祥贵,李晓霞,等. 茶的保健作用研究进展[J]. 中国食物与营养,2005(9):38-41.
- [5] 冯婧,侯彩云. 常温冲泡绿茶有效物质浸出规律的研究[J]. 食品科技,2005(11):93-96.
- [6] 梁慧玲,黄丽莲,张蕾,等. 三种茶具保温性能及泡茶效果的差异研究[J]. 广东茶业,2009(21):46-49.
- [7] 刘淑娟,钟兴刚,李维,等. 绿茶三种冲泡方法及其特色的研究[J]. 茶叶通讯,2010,37(2):42-45,49.
- [8] 胡凤仁. 中国茶的精神养生及其实证研究[D]. 福州:福建农林大学,2012.
- [9] 赵保路. 天然抗氧化剂茶多酚的健康作用及其机理[J]. 生物物理学报,2012,28(5):426-437.
- [10] 蓝雪铭,刘志彬,倪莉. 乌龙茶保健功效的研究进展[J]. 中国食品学报,2014,14(2):201-207.
- [11] 王淑慧,龙立梅,宋沙沙,等. 3 种名优绿茶的特征滋味成分研究及种类判别[J]. 食品科学,2016,37(2):128-131.
- [12] 王广铭,孙慕芳,刘会玲. 冲泡时间对信阳毛尖茶汤中化学成分的影响[J]. 安徽农业科学,2008,36(31):13704-13705,13712.
- [13] 杨维平,吴洁荣,高茜娣,等. 浸泡方式对茶叶茶多酚溶出量的影响[J]. 安徽农业科学,2010,38(21):11174-11175,11179.
- [14] 马梦君,胡文卿,傅丽亚,等. 温度和质量浓度对茶多酚水溶液稳定性的影响[J]. 食品科学,2014,35(11):11-16.
- [15] 何郁菲,曹冰冰,梁敏敏,等. 花香绿茶加工过程中的香气变化研究[J]. 中国茶叶加工,2016(2):51-56.
- [16] 陈宗懋. 20 世纪茶与健康研究的主要进展[J]. 中国茶叶,2001,23(4):8-10.
- [17] 李刚,王磊,肖兴基,等. 有机茶与常规茶中主要口感与功能成分的测定与比较[J]. 安徽农业科学,2015,43(27):251-253.
- [18] 龚永新,黄敬亮,张耀武. 中国茶文化发展的历史回顾与思考[J]. 农业考古,2015(2):12-16.

(上接第 93 页)

- [5] 王涛,贺红武,薛思佳. 新颖除草剂研究进展[J]. 化学世界,2002,43(11):608-611.
- [6] 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.
- [7] 邱建伟. 茶叶和咖啡中农药多残留的检测方法研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2007.