

## 凝胶渗透色谱-气相色谱法测定蔬菜中抑菌灵残留

高小丽<sup>1</sup>, 曹淑瑞<sup>2\*</sup>, 陈宇<sup>2</sup>, 李贤良<sup>2</sup>, 郝存显<sup>2</sup>, 郑小玲<sup>2</sup>, 张雷<sup>2</sup>, 王国民<sup>2</sup>

(1. 重庆化工职业学院, 重庆 401228; 2. 重庆出入境检验检疫局, 重庆 400020)

**摘要** [目的] 建立凝胶渗透色谱(GPC)-气相色谱法测定蔬菜中抑菌灵残留量的方法。[方法] 样品用环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)提取, GPC 净化, 气相色谱-电子捕获检测器(GC-ECD)检测。[结果] 抑菌灵在 0.01~1.00 mg/L 时线性关系良好( $R^2=0.9993$ ), 方法检测限( $S/N=3$ )为 0.32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 0.01、0.02、0.04 mg/kg 添加水平下, 加标回收率为 74.7%~95.7%, 相对标准偏差( $n=6$ )为 0.5%~3.5%。[结论] 该方法适用于蔬菜中抑菌灵残留量的测定。

**关键词** 凝胶渗透色谱-气相色谱法; 抑菌灵; 蔬菜; 残留

**中图分类号** TS207.5+3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)17-0079-03

## Determination of Dichlofluanid Residue in Vegetables by Gel Permeation Chromatography and Gas Chromatography

GAO Xiao-li<sup>1</sup>, CAO Shu-ru<sup>2\*</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup> et al (1. Chongqing Chemical Industry Vocational College, Chongqing 400020; 2. Chongqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing 400020)

**Abstract** [Objective] A method for determination of dichlofluanid residue in vegetables by gel permeation chromatography and gas chromatography was developed. [Method] Samples were extracted with cyclohexane-ethyl acetate (1:1, V/V), and then detected by GC-ECD after being cleaned up with GPC. [Result] It turned out that dichlofluanid showed a good linearity over the range of 0.01-1.00 mg/L with correlation coefficient of 0.9993. The limit of detection (LOD) was 0.32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The recoveries of the dichlofluanid were in the range of 74.7%-95.7% with the spiked levels of 0.01, 0.02 and 0.04 mg/kg, and the relative standard deviations (RSDs) were in the range of 0.5%-3.5%. [Conclusion] The method is suitable for detecting dichlofluanid residue in many kinds of vegetables.

**Key words** Gel permeation chromatography-gas chromatography; Dichlofluanid; Vegetable; Residue

抑菌灵(dichlofluanid, 又名苯氟磺胺)是一种广谱保护性杀菌剂, 白色粉末, 不溶于水, 在甲醇中溶解度为 15 g/L, 二甲苯中溶解度为 70 g/L, 剂型为可湿性粉剂及粉剂, 适用于防治多种蔬菜作物灰霉病、白粉病、霜霉病及真菌性等病害, 用作喷雾时, 具有杀灭红蜘蛛的作用。该试剂具有一定毒性, 雄大鼠口服半数致死量(LD)为 2 500 mg/kg, 人体日容许摄入量为 0.3 mg/kg, 应在蔬菜收获前 7~14 d 停止用药。目前, 许多发达国家已对抑菌灵进行了严格限制, 例如日本对谷物中抑菌灵的残留限量为 0.1 mg/kg<sup>[1]</sup>。截至目前, 我国尚未对抑菌灵残留量进行限量规定。抑菌灵残留量的检测多采用气相色谱法(GC)<sup>[2-3]</sup>、气相色谱质谱法(GC-MS)<sup>[4-9]</sup>, 前处理方法主要采用固相萃取<sup>[10]</sup>。该研究通过凝胶渗透色谱(GPC)净化, 能够有效除去色素<sup>[11-13]</sup>, 且采用灵敏度高的气相色谱-电子捕获检测器(GC-ECD)<sup>[14-15]</sup>进行测定, 建立了一种简便、准确度高、覆盖基质范围广的抑菌灵残留检测方法。

## 1 材料与方

**1.1 材料** Agilent 7890A 气相色谱仪, 配有电子捕获检测器, 美国 Agilent 公司; 凝胶渗透色谱仪, 美国 Lab Tech 公司; 凝胶净化柱(20 mm $\times$ 300 mm), 填料为 S-X3; 3-30K 台式高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; 4011 Digital 旋转蒸发仪, 德国 Heidolph 公司; 移液器: 0.1、0.2、1.0、5.0、10.0 mL, 德国 Eppendorf 公司; BS224S 型天平, 德国 Sartorius 公司; 涡旋振

荡混合器, 江苏康健医疗用品有限公司; 匀质仪, 荷兰 Philips 公司。

抑菌灵标准品(纯度为 99.6%), 美国 Sigma 公司; 环己烷、乙酸乙酯、正己烷、丙酮、乙腈(色谱纯), 美国 Tedia 公司; 氯化钠、无水硫酸镁(分析纯)。

## 1.2 方法

**1.2.1 标准溶液的配制。**准确称取适量的抑菌灵标准物质, 正己烷溶解, 配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备溶液, 正己烷逐级稀释成 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/L 的标准工作溶液。

**1.2.2 色谱条件。**色谱柱: DB-1701 石英毛细管柱(30.00 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ); 载气为高纯  $\text{N}_2$ ; 柱流速 1.2 mL/min; 进样口温度 250  $^\circ\text{C}$ ; 进样方式为不分流进样, 恒流; 柱温程序: 初始温度 150  $^\circ\text{C}$ (保持 1 min), 以 30  $^\circ\text{C}/\text{min}$  升至 280  $^\circ\text{C}$ (保持 20 min); 进样量为 2.0  $\mu\text{L}$ ; 检测器温度 300  $^\circ\text{C}$ 。

**1.2.3 样品前处理。**称取 10.0 g 蔬菜匀浆于 50 mL 离心管中, 加 20 mL 的环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)溶液, 水平振荡 10 min, 加 3.5 g 氯化钠和 3.5 g 无水硫酸镁, 涡旋混匀, 5 000 r/min 离心 3 min, 取 10 mL 有机相, 过 0.4  $\mu\text{m}$  滤膜, 取 5.0 mL 过 GPC 柱净化, 以环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)为淋洗液, 淋洗速度为 5.0 mL/min, 弃去 45 mL 流出液后, 收集 55 mL 淋洗液。转入旋转蒸发瓶, 在低于 40  $^\circ\text{C}$  的水浴中浓缩至近干, 用正己烷溶解残余物, 并定容至 2.0 mL, 涡旋混匀。经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 供 GC-ECD 测定。

## 2 结果与分析

**2.1 提取溶剂的选择** 分别采用乙腈、正己烷、正己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)、丙酮-乙酸乙酯(1:1, V/V)、环己烷-乙

**基金项目** 重庆市青年科技人才培养计划项目(cstc2014kjrc-qncr00002); 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(20161K296); 重庆市应用开发重点项目(cstc201yykfb0165)。

**作者简介** 高小丽(1979—), 女, 重庆人, 讲师, 硕士, 从事分析化学研究。\*通讯作者, 高级工程师, 从事食品分析和纳米材料研究。

**收稿日期** 2017-04-12

酸乙酯(1:1, V/V)提取样品中的抑菌灵,进行回收率试验,以选取合适的提取溶剂。结果如图1所示,乙腈和正己烷的提取回收率相对偏低,丙酮-乙酸乙酯(1:1, V/V)以及环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)的提取回收率相对于正己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)较高,考虑到丙酮提取杂质较多,且采用丙酮-乙酸乙酯(1:1, V/V)提取需先将提取液浓缩,用环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)定容之后,再经GPC净化,故该研究采用环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)作为提取溶剂。

**2.2 GPC 收集时间段的选择** 取 1.00 mg/L 的标准工作溶液 0.1 mL, 用环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)定容至 10.0 mL, 涡旋混匀, 取 5.0 mL 过 GPC, 对 0~7、7~9、9~19、19~23 min 的淋洗液进行收集, 将各个时间段的淋洗液在低于 40 °C 的水浴中旋转浓缩至近干, 用正己烷定容至 2.0 mL,

涡旋混匀。经 0.22 μm 滤膜过滤后, 供 GC-ECD 测定。由图 2 可知, 应对 9~19 min 的淋洗液进行收集。

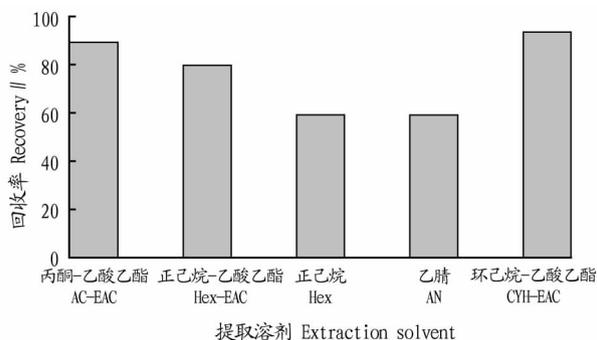
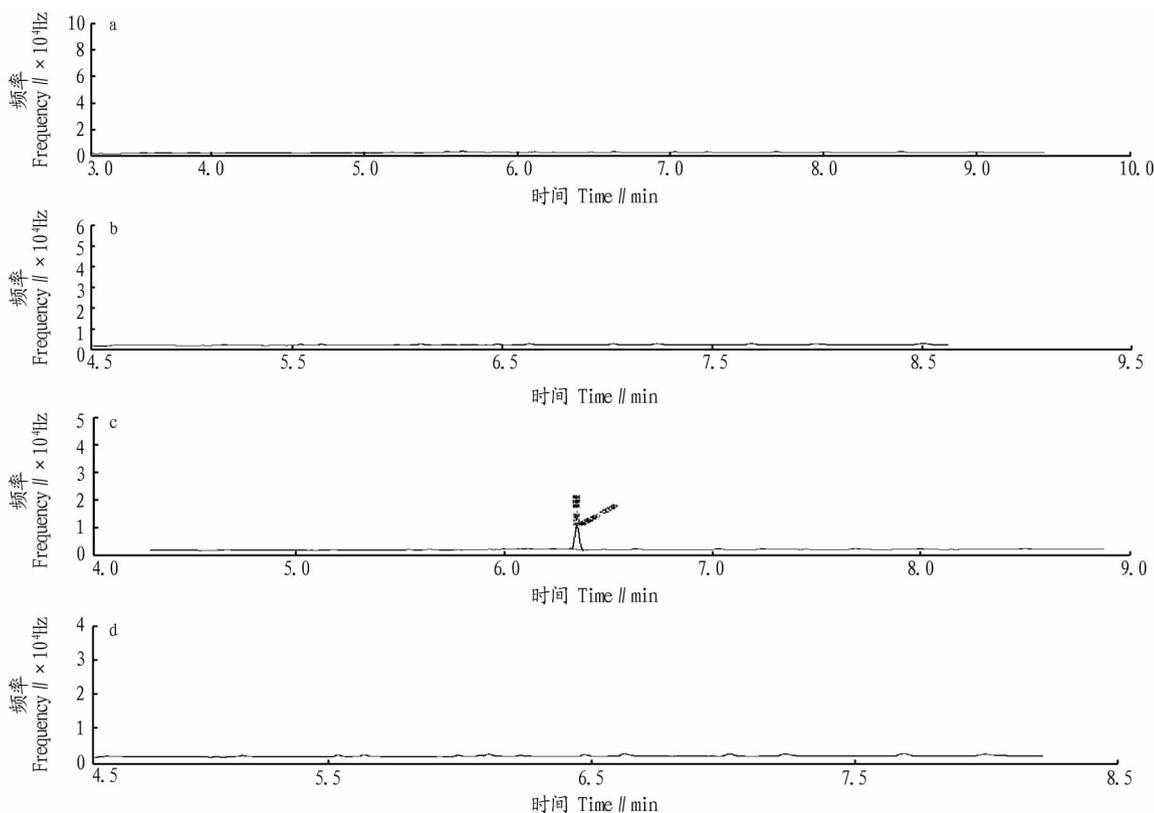


图1 不同提取溶剂对回收率的影响

Fig.1 Effect of different extraction solvents on recovery



注:a、b、c、d 依次为 0~7、7~9、9~19、19~23 min 时间段的淋洗液

Note:a, b, c, d are 0-7, 7-9, 9-19, 19-23 min leachate

图2 GPC 不同收集时间段的气相色谱

Fig.2 Spectrum in different collected time periods of GPC

**2.3 不同净化方法的选择** 结合抑菌灵和被测样品基质的性质, 以白菜为基质, 考察了基质分散固相萃取、氨基柱固相萃取以及 GPC 3 种净化方式。虽然固相萃取小柱能够净化基质中的杂质, 但其回收率过低, 在基质分散固相萃取净化中对石墨化碳黑 (GCB)、乙二胺-N-丙基硅烷 (PSA) 进行了考察, 使用 GCB 净化时才能够有效去除色素, 但是回收率仅能达到 64.2%; 石墨化碳氨基复合柱萃取的回收率仅为 40.6%, GPC 不仅能够净化基质的杂质, 而且其回收率 (87.5%) 能够满足要求。

**2.4 线性范围及检测限** 对 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/L 系列质量浓度的抑菌灵标准溶液进行测定, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X, mg/L) 绘制标准曲线, 得到线性方程  $Y = 1\,272.1X - 15\,145$ ,  $R^2 = 0.999\,3$ , 表明在 0.01~1.00 mg/L 有良好的线性关系。以  $S/N = 3$  计算, 方法检测限为 0.32 μg/kg。

**2.5 准确度和精密度** 方法的准确度以回收率表示, 精密度用相对标准偏差表示。分别对甘蓝 (叶菜类)、西红柿 (茄果类)、白萝卜 (根茎类)、黄瓜 (瓜类)、豆芽 (豆类) 等以

0.01、0.02、0.04 mg/kg 添加浓度水平分别进行添加回收,每个水平重复 6 次,外标法定量,试验结果见表 1。

表 1 不同蔬菜中抑菌灵的加标回收率和相对标准偏差 ( $n=6$ )

Table 1 Recoveries and RSDs of dichlofluanid in vegetables ( $n=6$ )

基质 Matrix	添加水平 Spiked level mg/kg	实际测定浓度 Actual concentration mg/L	回收率 Recovery %	RSD %
甘蓝	0.01	19.6	78.4	5.7
Wild	0.02	42.7	85.4	6.4
cabbage	0.04	82.7	82.7	2.3
西红柿	0.01	18.7	74.7	5.0
Tomato	0.02	47.0	93.9	3.2
	0.04	94.1	94.1	1.0
白萝卜	0.01	22.3	89.1	2.3
Ternip	0.02	47.6	95.2	1.2
	0.04	95.7	95.7	0.5
黄瓜	0.01	20.0	79.9	4.7
Cucumber	0.02	45.3	90.6	3.1
	0.04	86.2	86.2	3.5
豆芽	0.01	18.8	75.0	2.8
Bean	0.02	41.6	83.1	1.4
sprouts	0.04	82.8	82.8	1.9

### 3 结论

该试验建立了凝胶渗透色谱-气相色谱法测定蔬菜中抑菌灵残留量的方法,并优化了试验条件,确定了提取溶剂、淋洗液的收集时间段等参数。该方法具有简单、准确度高、重现性好、基质适用范围广等优点。目前我国还未对蔬菜中的抑菌灵进行限量规定,该方法为蔬菜中抑菌灵的检测提供了技术支持,特别适合于在食品检测实验室推广应用。

(上接第 78 页)

和高压灭菌后新菜肴在 4℃ 下保藏 6 d 时,香味变淡,但比原菜肴明显,苦瓜和汤汁颜色变暗并起黏,食品不再适合保藏食用,表明保质期为 5 d。可见通过热烫和高压灭菌处理,抑制了优势菌假单胞菌、乳酸菌的生长,对维护多味苦瓜凉菜的卫生质量及延长保质期起到了关键性控制作用。

### 3 结论

由该试验数据可知,多味苦瓜起始带菌量为  $2.7 \times 10^5$  CFU/g,其中 87% 来自豆瓣酱,7% 来自葱,5% 来自苦瓜等。4℃ 的保质期为 3 d,腐败优势菌菌相构成成为假单胞菌占 60.6%,乳酸菌 29.8%。

热烫和高压灭菌处理后,菜肴成品带菌量  $6.7 \times 10^2$  CFU/g,减菌率达到 99.8%。其中苦瓜的减菌率高达 97.5%,葱的减菌率高达 99.7%,豆瓣酱的减菌率高达 99.9%。4℃ 的保质期增至 5 d,表明热烫和高压灭菌对降低起始菌数和延长保质期产生了积极影响。

原配方和改进配方两者菌群结构并未改变,腐败优势菌都是假单胞菌和乳酸菌。对于强化凉菜类食品卫生安全管理,可以从优势菌的生长控制方面进行更深入的研究。对多味苦瓜主要原料和调味品采用热烫和高压灭菌处理的技术可否推广应用于其他同类食品的加工,有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] SHAO D L. Determination of dichlofluanid residue in soybean by capillary columns gas chromatography[J]. Agricultural science & technology, 2010, 11(3):7-8,64.
- [2] CABRAS P, TUBEROSO C, MELIS M, et al. Multiresidue method for pesticide determination in wine by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of agriculture and food chemistry, 1992, 40(5):817-819.
- [3] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. 出口谷粮中抑菌灵残留量检测方法:SN 0491—1995[S]. 北京:中国标准出版社,1995.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局. 进出口食品中百菌清、苯氟磺胺、甲抑菌灵、克菌灵、灭菌丹、敌菌丹和四溴菊酯残留量检测方法 气相色谱-质谱法:SN/T 2320—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [5] ALBERO B, SÁNCHEZ - BRUNETE C, TADEO J L. Analysis of pesticide in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of agriculture and food chemistry, 2004, 52(19):5828-5835.
- [6] SÁENZ B C, SANZ A J, PLAZA M M, et al. Evaluation of the decay of malathion, dichlofluanid and fenitrothion pesticides in apple samples, using gas chromatography[J]. Food chemistry, 1995, 52(3):305-309.
- [7] 刘瑜, 蒋施, 徐宜宏, 等. 气相色谱-串联质谱法测定葱、姜、蒜中 120 种农药残留量[J]. 化学通报, 2012, 75(12):1132-1139.
- [8] 周长民, 徐宜宏, 张侃, 等. 气相色谱-三重四级杆串联质谱法测定圆葱中 134 种农药的多残留[J]. 福建分析测试, 2014, 23(4):5-15.
- [9] 刘小勤, 佟玲, 孟文婷, 等. 气相色谱-三重四级杆串联质谱法测定白芍中 99 种农药残留[J]. 色谱, 2015, 33(8):869-877.
- [10] 王玉健, 黄惠玲, 卓海华, 等. 固相萃取技术在农药残留分析中的应用[J]. 检验检疫学刊, 2009, 19(2):74-76.
- [11] 李伟, 许华, 常宇文. 凝胶渗透色谱净化-气相色谱法测定蔬菜中百菌清残留[J]. 现代仪器, 2006, 12(6):68-70.
- [12] 杨慧琴, 郭德华, 李波, 等. 在线凝胶色谱串联气相色谱-质谱对食品中七种杀菌剂残留量的测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(S1):141-142.
- [13] 缪琪. 凝胶渗透色谱法在果蔬农残分析中的应用[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2007.
- [14] 张潜, 高玲, 赖发伟, 等. 电子捕获检测器-气相色谱法测定饮用水中多种有机磷残留[J]. 现代预防医学, 2007, 34(14):2714-2717.
- [15] 赵杰, 梁永明. 电子捕获检测器测定粮食中三唑酮残留量[J]. 粮食与食品工业, 2009, 16(6):51-52.

### 参考文献

- [1] 王叶子, 席艳君, 刘金祥. 2008-2010 年东莞市长安镇餐饮服务单位凉菜卫生监测分析[J]. 预防医学情报杂志, 2013, 29(11):968-971.
- [2] Food and Drug Administration. FDA trend analysis report on the occurrence of foodborne illness risk factors in selected institutional foodservice, restaurant, and retail food store facility types (1998-2008) [EB/OL]. [2011-09-29]. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodborneIllnessandRiskFactorReduction/RetailFoodRiskFactorStudies/ucm223293.htm>.
- [3] US Food and Drug Administration. Reducing foodborne illness risk factors in food service and retail establishments (2006) [EB/OL]. [2011-09-29]. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodborneIllnessandRiskFactorReduction/ucm106205.htm>.
- [4] HARRINGTON R E. The role of employees in the spread of foodborne disease: Food industry views of the problem and coping strategies [J]. Dairy Food Environ Sanitat, 1992, 12:62-63.
- [5] 蒋云升. 烹饪卫生与安全学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2012.
- [6] SAGOO S K, LITTLE C L, WARD L, et al. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis [J]. J Food Prot, 2003, 66(3):403-409.
- [7] 蒋云升. 烹饪微生物[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2007:328-329.
- [8] 吕静. 大肠杆菌:“草根”何以变“超级” [J]. 中国新闻周刊, 2011(23):68-70.
- [9] 蒋云升, 陈剑. 扇面三拼卫生研究[J]. 中国烹饪研究, 1997(3):28-32.
- [10] 汤海. 1993-1998 年罗湖区食物中毒情况分析及其干预措施[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(10):921-923.
- [11] DONG J, XU W, ZHU J J, et al. Analysis and control of bacterial flora in composed india vegetable salad [J]. Journal of food engineering and technology, 2013, 2(1):69-76.