

盐析辅助均相液液萃取-高效液相色谱法 测定蔬菜水果中对苯基苯酚残留

王明栋, 孙珊珊, 郑文静, 赵慧男, 薛霞, 胡梅, 刘艳明*, 张艳侠*, 王骏

(山东省食品药品检验研究院, 山东省食品药品安全检测工程技术研究中心, 山东济南 250101)

摘要: 建立了盐析辅助均相液液萃取结合高效液相色谱法测定蔬菜水果中对苯基苯酚残留的检测方法。试样经乙腈提取, 用氯化钠盐析分层, 以五氟苯基柱为色谱分离柱, 甲醇-水为流动相梯度洗脱, 二极管阵列/荧光双检测器, 外标法定量。对提取溶剂、提取盐体系、净化、浓缩方法和稳定性等前处理的关键因素都进行了优化, 并考察了不同色谱柱和流动相条件对分离效果的影响。结果表明, 对苯基苯酚在 0.05~100.00 $\mu\text{g/mL}$ (二极管阵列检测器) 和 0.01~5.00 $\mu\text{g/mL}$ (荧光检测器) 范围内线性关系良好, 相关系数 (R^2) 均大于 0.999, 紫外和荧光条件下检出限分别为 0.03 mg/kg 和 0.01 mg/kg, 定量限分别为 0.10 mg/kg 和 0.02 mg/kg。在 3 个空白添加浓度水平 (LOQ、2LOQ 和 10LOQ), 平均回收率分别为 82.28%~110.7% 和 85.83%~109.8%, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 2.60%~5.72% 和 2.66%~5.26%。该方法简便快捷、准确性和重现性较好, 二极管阵列/荧光双串联检测可相互定性, 特异性较好, 适用于蔬菜水果中对苯基苯酚残留的测定。

关键词: 盐析辅助均相液液萃取; 对苯基苯酚; 高效液相色谱; 水果; 蔬菜

文章编号: 1673-9078(2023)04-333-340

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0372

Determination of *p*-Phenylphenol Residues in Vegetables and Fruits Based on Salting-out Homogeneous Liquid-liquid Extraction and High Performance Liquid Chromatography

WANG Mingdong, SUN Shanshan, ZHENG Wenjing, ZHAO Huinan, XUE Xia, HU Mei, LIU Yanming*, ZHANG Yanxia*, WANG Jun

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Safety Inspection of Food and Drug, Ji'nan 250101, China)

Abstract: An analytical method was established to detect *p*-phenylphenol residues in vegetables and fruits by salting-out homogeneous liquid-liquid extraction (SHLLE) and high performance liquid chromatography (HPLC). Samples were extracted with acetonitrile and separated from sample solutions by salting out with sodium chloride. Separation was performed on a reversed phase C_{18} -PPF column using methanol-water as the mobile phase for gradient elution, and the analyte was detected using a diode array/fluorescence dual detector and quantified by an external standard method. Key pre-treatment factors such as extraction solvent, extraction salt system, purification,

引文格式:

王明栋, 孙珊珊, 郑文静, 等. 盐析辅助均相液液萃取-高效液相色谱法测定蔬菜水果中对苯基苯酚残留[J]. 现代食品科技, 2023, 39(4): 333-340.

WANG Mingdong, SUN Shanshan, ZHENG Wenjing, et al. Determination of *p*-phenylphenol residues in vegetables and fruits based on salting-out homogeneous liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 333-340.

收稿日期: 2022-04-02

基金项目: 院自拟科研课题项目 (SDIFDC-KY-4-2022005)

作者简介: 王明栋 (1992-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品安全分析, E-mail: wmd7585018@163.com

通讯作者: 刘艳明 (1981-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全分析与研究, E-mail: msymlu@163.com; 共同通讯作者: 张艳侠 (1986-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全分析与风险预警, E-mail: zyx5560@126.com

concentration method and stability, and the influence of different chromatographic columns and mobile phase conditions on the separation effect were investigated and optimized. The results showed a strong linear relationship for *p*-phenylphenol between 0.05 and 100.00 $\mu\text{g/mL}$ (diode array detector) and 0.01 and 5.00 $\mu\text{g/mL}$ (fluorescence detector), with correlation coefficients (R^2) all greater than 0.999. Limits of detection (LOD) of 0.03 mg/kg and 0.01 mg/kg were obtained for the diode array detector under ultraviolet and fluorescent conditions, respectively, with the limits of quantification (LOQ) reaching 0.10 mg/kg and 0.02 mg/kg. Average recoveries of 82.28%~110.7% and 85.83%~109.8% with relative standard deviations (RSD) of 2.60%~5.72% and 2.66%~5.26% were obtained under the three blank concentrations (LOQ, 2LOQ, and 10LOQ), respectively. This method is simple and fast, with good accuracy and reproducibility. Diode array/fluorescence dual detection is mutually qualitative, has good specificity, and is suitable for the determination of *p*-phenylphenol residues in vegetables and fruits.

Key words: salting-out homogeneous liquid-liquid extraction; *p*-phenylphenol; high performance liquid chromatography; fruit; vegetable

对苯基苯酚 (*P*-Phenylphenol, 4-PP), 又名 4-苯基苯酚, 同邻苯基苯酚 (*O*-Phenylphenol, 2-PP) 和间苯基苯酚 (*M*-Phenylphenol, 3-PP) 为同分异构体 (图 1), 为重要的有机化工原料和中间体, 应用于防腐杀菌剂、农药、涂料等领域。对苯基苯酚为高毒物质, 对眼睛、皮肤和粘膜有刺激性影响, 其腹腔小鼠半数致死量 (LD_{50}) 为 150 mg/kg。此外, 对苯基苯酚对肝肾、神经等系统具有一定的生物毒性, 给人们的身体带来巨大的危害^[1-3]。农业行业标准 NY/T 392-2013《绿色食品食品添加剂使用准则》规定不应当使用对苯基苯酚。GB 2763-2021^[4]和日本肯定列表对苯基苯酚却未做规定。对苯基苯酚有杀菌作用, 常被用于果蔬的防霉和杀菌, 在收获后的柑桔上喷雾使用可使腐烂降至最低限度, 保持新鲜和较好的成色。有文献^[5]报道在柑橘中检出对苯基苯酚高达 14.7 mg/kg, 可见蔬菜水果中存在非法添加对苯基苯酚的问题。目前蔬菜水果中对苯基苯酚的检测尚无方法标准, 该项目处于无监管的状态, 存在较高的食品安全隐患。

文献报道主要集中于对果蔬中邻苯基苯酚的检测^[6-9], 对苯基苯酚残留量检测仅有少量报道。已有对苯基苯酚残留量的检测方法有高效液相色谱-紫外检测法^[10,11]、高效液相色谱-串联质谱法^[12]、气相色谱法^[13,14]。高效液相色谱法因普及率高、定量准确、兼容性好等特点应用最为广泛, 是有紫外吸收或荧光化合物的常用检测手段, 但现有文献采用单一紫外检测器来检测, 定性不足且灵敏度低。此外, 已报道对苯基苯酚分离均为常规反相 C_{18} 色谱柱, 对其异构体的分离未见报道, 由于同分异构体的结构性质十分相似, 常规反相 C_{18} 色谱柱无法将其分离开来, 容易存在假阳性的问题。已报道的蔬菜水果中对苯基苯酚的前处理方法主要为乙醚或乙酸乙酯等溶剂提取, 经萃取或固相萃取净化, 存在前处理方法复杂、效率低、不环保等问题。农药残留常见前处理技术包括液液萃取法、固相萃取法、盐析辅助均相液液萃取 (Salting-Out

Homogeneous Liquid-Liquid Extraction, SHLLE)、QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) 方法^[15-20]等。其中, SHLLE 是一种操作简便、高效、萃取效率高且环境友好的前处理技术, 基本原理是利用有机萃取剂和试样溶液形成均匀混合溶液, 再通过添加盐析剂将萃取剂和试样溶液分层, 目标分析物质被提取并富集到有机相。将 SHLLE 技术用于蔬菜水果中对苯基苯酚的检测还未见报道。

本研究采用盐析辅助均相液液萃取结合高效液相色谱法测定蔬菜水果中对苯基苯酚残留。以乙腈为提取溶剂, 盐析辅助均相液液萃取净化的前处理方法, 以五氟苯基柱 (Pentafluorophenyl, PFP) 为色谱分离柱实现对苯基苯酚同异构体的高效分离, 利用二极管阵列 (PDA) 和荧光 (FLD) 检测器串联检测, 克服了单一检测器定性单一的缺陷, 降低了假阳性率。本方法快速高效、灵敏度高、选择性好, 准确度高, 适用于蔬菜水果中对苯基苯酚残留的定性、定量检测, 为保障农产品质量安全提供新的技术参考。

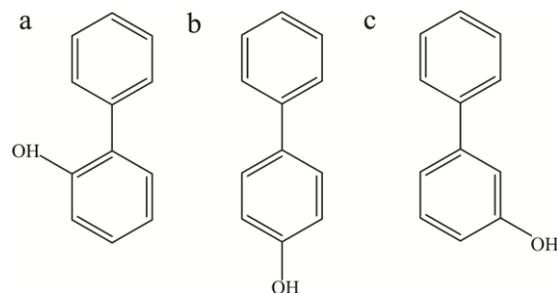


图 1 对苯基苯酚和其同分异构体的化学结构式

Fig.1 The chemical structures of *p*-phenyl phenol and isomers

注: a: 邻苯基苯酚; b: 对苯基苯酚; c: 间苯基苯酚。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

对苯基苯酚标准品、邻苯基苯酚标准品、间苯基苯酚标准品, 纯度 $\geq 99\%$, 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司; XBridge C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 3.5 μm)、

Atlantis T₃ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 美国 Waters 公司; Inertsil ODS-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 岛津公司; ACE Excel 3 C₁₈-PFP (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm), 菲罗门仪器公司; 甲醇、乙腈、正己烷、乙酸乙酯(色谱纯), 纯度>99.9%, 德国 Merck 公司。氯化钠、乙酸铵、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸、硫酸镁、乙酸钠、柠檬酸氢二钠、柠檬酸钠, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 乙二胺-N-丙基硅烷吸附剂 (Primary Secondary Amine, PSA)、十八烷基键合硅胶吸附剂(C₁₈)、石墨化碳黑吸附剂(Graphitized carbon black, GCB), 均购于美国 WATERS 公司。实验用水果、蔬菜样品均为市售。

1.2 仪器与设备

Waters e2695 高效液相色谱仪 (配备 Waters 2998 PDA 检测器, Waters 2475 FLD 检测器), 美国 Waters 公司; AB204-S 型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; SB-800DTD 型超声波清洗器, 中国宁波新芝生物科技股份有限公司; 3-18K 型冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; Milli-Q 超纯水制备器, 美国 MILLIPORE 公司; 涡旋混合器, 德国 IKA 公司。

1.3 标准溶液的配制

分别准确称取 10 mg (精确至 0.01 mg) 对苯基苯酚、邻苯基苯酚、间苯基苯酚标准品于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解, 并定容至刻度, 配制得到 1 mg/mL 的标准物质储备液, 冷藏 (4~8 °C) 保存。移取适量储备液, 用甲醇逐级稀释, 得到需要的工作溶液。移取适量的对苯基苯酚、邻苯基苯酚和间苯基苯酚标准储备液, 用甲醇稀释, 得到需要的混合标准工作溶液, 冷藏 (4~8 °C) 保存。

1.4 样品前处理

称取均质后的样品 10 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈, 涡旋混匀 1 min, 超声提取 10 min, 加入 2 g 氯化钠, 涡旋混匀 1 min, 以 8 000 r/min 离心 3 min, 取上层清液过 0.22 μm 的有机相微孔滤膜, 待测。

1.5 仪器条件

色谱柱: ACE Excel 3 C₁₈-PFP (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相: 甲醇(B)和水(A); 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样体积: 10 μL; PDA 检测波长 258 nm, FLD 激发波长 258 nm, 发射波长 350 nm; 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient program for mobile phase

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0	0.8	60	40
10.0	0.8	30	70
22.0	0.8	25	75
22.1	0.8	60	40
25.0	0.8	60	40

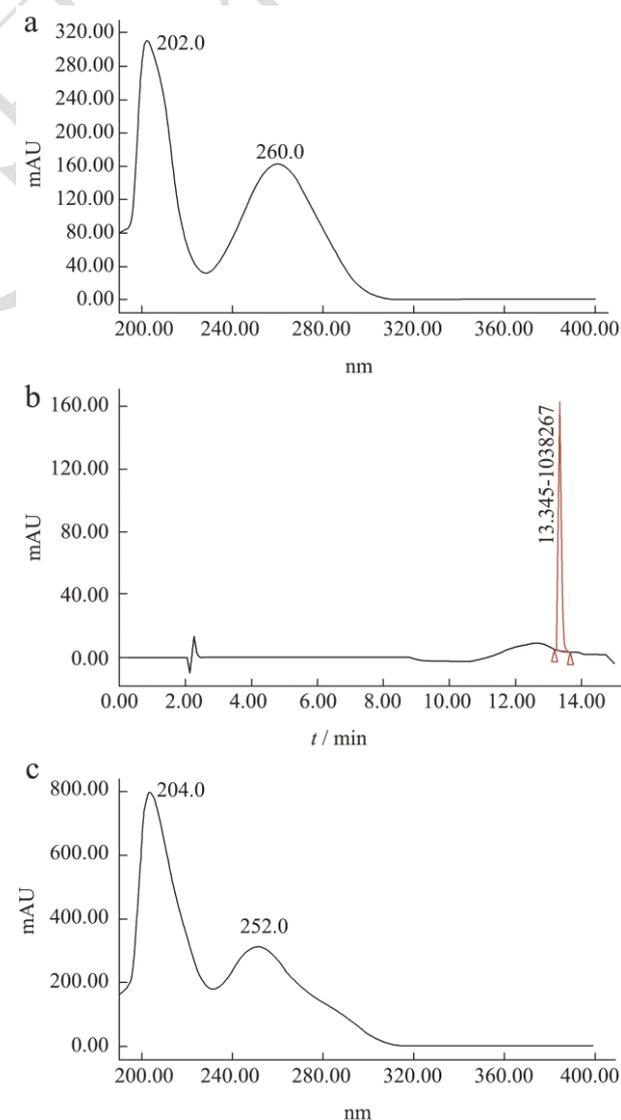
1.6 数据分析

通过与 Waters e2695 高效液相色谱仪配套的 Empower 色谱处理软件, 完成数据的采集与处理, 并采用 Origin 2018 进行绘图及数据分析。

2 结果与讨论

2.1 仪器条件优化

2.1.1 色谱柱的选择



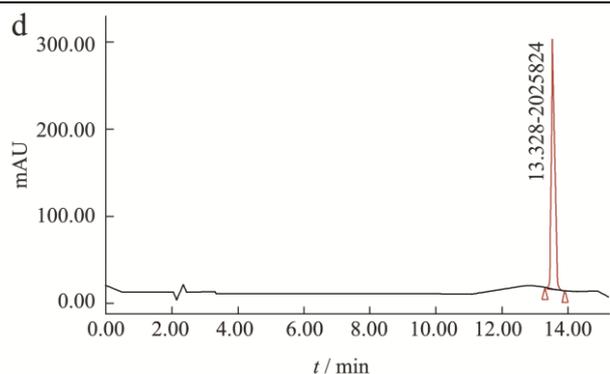


图2 Atlantis T₃色谱柱分离效果比较

Fig.2 Comparison of separation effect on common Atlantis T₃ column (10 µg/mL)

注: a、b: 对苯基苯酚; c、d: 三种同分异构体混标。

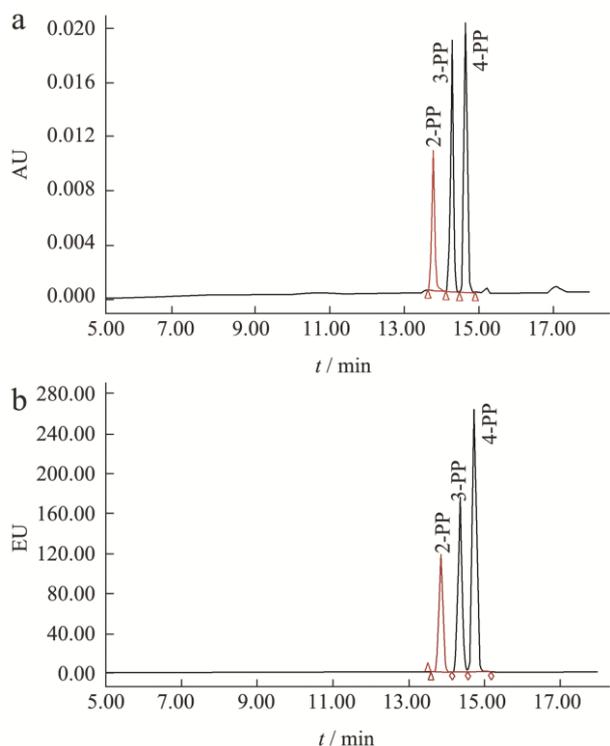


图3 对苯基苯酚与邻苯基苯酚、间苯基苯酚的分离效果谱图

Fig.3 The separation chromatogram of *P*-phenyl phenol, *O*-phenyl phenol and *M*-phenyl phenol

注: a: PDA 检测器谱图; b: FLD 检测器谱图。

分别比较 X-Brige C₁₈ (4.6 mm×150 mm)、Atlantis T₃ (4.6 mm×250 mm)、Inertsil ODS-C₁₈ (4.6 mm×250 mm) 柱和 C₁₈-PFP (4.6 mm×150 mm) 四种不同色谱柱对对苯基苯酚及其同分异构体的保留行为和分离能力。结果表明,对苯基苯酚在四种色谱柱上能有效保留,但在相同的色谱条件下 Atlantis T₃ 和 ODS-C₁₈ 出峰时间较晚,导致分析时间延长,在 Atlantis T₃、ODS-C₁₈ 和 X-Brige C₁₈ 色谱柱上无法实现苯基苯酚与其同分异构体-邻苯基苯酚、间苯基苯酚的分离(如图 2)。C₁₈-PFP 能将三种同分异构体较好的分离和保

留,分离情况如图 3。C₁₈-PFP 是在 C₁₈ 硅胶基质上键合五氟苯基硅烷键合相,保留了主要 C₁₈ 链的疏水性、稳定性和低流失特性,同时由于五氟苯基的存在,可与化合物之间产生 π - π 共轭、偶极-偶极、氢键等作用^[21],具有较高的几何和立体形状选择性,对极性及含苯环化合物有较优的分离效果。本研究选择 C₁₈-PFP 作为分离色谱柱。

2.1.2 检测波长的选择

对苯基苯酚具有紫外和荧光性,可通过 PDA 和 FLD 检测器进行分析检测。经液相色谱分离后,经 PDA 检测器全波长扫描发现对苯基苯酚在 258 nm 波长处有最大吸收,且干扰少,因此选择 258 nm 作为 PDA 检测器的检测波长及 FLD 检测器的激发波长。通过对发射波长进行全扫描,发现在 350 nm 处吸收强度最大,确定 350 nm 为对苯基苯酚的 FLD 检测器发射波长。实验发现,相同浓度下对苯基苯酚的荧光信号响应比紫外高 150 多倍,提高了检测的灵敏度。利用双检测器串联检测可相互印证,提高测定的定性能力,降低假阳性率,满足不同实验室检测的需求。

2.1.3 流动相的选择

对相同条件下甲醇-水、甲醇-乙酸铵 (20 mmol/L) 缓冲液、甲醇-磷酸水 (0.1%) 和甲醇-磷酸缓冲盐 (20 mmol/L, pH 值 8) 四种流动相体系进行考察,结果发现在 C₁₈-PFP 色谱柱上,这几种流动相的分离效果无大的差别,选择更简便、对色谱柱和仪器相对安全的甲醇-水体系为流动相,优化的梯度洗脱条件较好地实现与其同分异构体及共流出干扰物的分离。

2.2 前处理条件优化

2.2.1 提取溶剂的选择

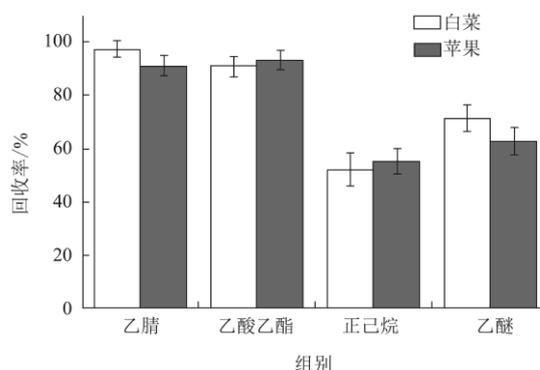


图4 不同提取试剂对对苯基苯酚的回收率影响

Fig.4 Effects of different extraction solvents on the recovery of *P*-phenylphenol

影响 SHLLE 萃取效率的关键因素之一是有有机萃取剂,常用萃取剂为乙腈、丙酮和甲醇等有机试剂。对苯基苯酚水溶性差,易溶于醇、酮、醚等有机溶剂,

本实验以白菜和苹果样品为例,分别以乙腈、正己烷、乙酸乙酯、乙醚为提取剂,进行提取回收率试验。实验结果发现(图4),正己烷和乙醚对对苯基苯酚提取效率差,回收率在50%~70%之间,乙醚提取液在目标物保留时间附近有干扰。极性范围宽的提取剂乙腈和乙酸乙酯对目标物提取效果较好,提取效率均在90%以上,乙腈提取效率最好且共提取干扰少,考虑后续盐析操作及绿色环保因素,本方法选择乙腈作为提取试剂。

2.2.2 提取盐体系的选择

比较常用的几种提取盐体系:氯化钠盐析辅助均相液液萃取体系(5 g 氯化钠-乙腈), QuEChERS-AOAC 提取体系(6 g 无水硫酸镁、1.5 g 乙酸钠-乙腈)、QuEChERS-EN 提取体系(4 g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、0.5 g 柠檬酸氢二钠、1 g 柠檬酸钠-乙腈)。结果表明, QuEChERS 经典的两种提取体系提取回收率分别为88.68%和87.79%,差别不大,氯化钠-乙腈体系提取回收率为91.43%,提取效率较好。分析原因可能是对苯基苯酚分子性较离子性强,提取效率受溶液pH影响小。氯化钠的加入增加了水相的离子强度,降低目标物在水中的溶解度,增大目标物在有机相中的分配系数,目标物被富集到有机相,提高了提取效率。最终选择氯化钠-乙腈的盐析辅助均相液液萃取提取体系。

2.2.3 净化方式的选择

蔬菜、水果等食品的基质复杂,干扰杂质多,因此在仪器分析前需要对果蔬样品进行必要的净化处理,降低基质带来的干扰以及对仪器的损害,提升方法的灵敏度和准确度。本实验选择韭菜和橙子为实际样品为例,比较不净化、分散固相萃取净化包1(50 mg PSA, 50 mg C18, 10 mg GCB, 150 mg MgSO₄)和分散固相萃取净化包2(150 mg PSA, 150 mg C18, 900 mg MgSO₄)对不同水果蔬菜样品中对苯基苯酚的净化效果。结果表明,三种净化方式无明显差别,蔬菜水果基质经盐析辅助均相液液萃取,起到一定程度的除杂效果,目标峰处于干扰少,无需进一步净化,即盐析辅助均相液液萃取提取后不净化。

2.2.4 浓缩过程的考察

对于痕量物质的测定,浓缩是增加目标物质灵敏度以及置换溶剂的常见手段。分别以对苯基苯酚的标准溶液、试剂加标溶液和空白样品加标溶液为例,考察氮吹浓缩对目标物回收率的影响。图5表明,经40℃氮吹浓缩后,对苯基苯酚标准溶液的响应值降低15%,试剂加标的回收率降低10%以上,样品加标的回收率降低接近35%。浓缩温度降低至30℃后目标

物仍有损失。兼顾方法的灵敏度与准确性,本实验无需浓缩。

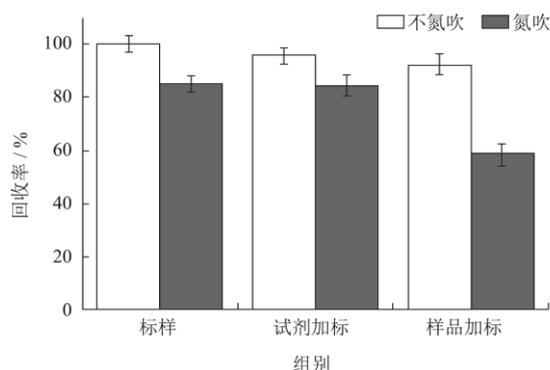


图5 氮吹对不同样品中目标物回收率的影响

Fig.5 Effect of the nitrogen blowing on the recoveries of the *P*-phenylphenol in different samples

2.2.5 目标物稳定性考察

甲醇配制的1.00 mg/mL对苯基苯酚标准储备液分别置于常温(25℃)和冷藏条件(4~8℃)储存半年,测定其稳定性结果见图6,对苯基苯酚在常温条件保存两周后稳定降低。冷藏时溶液中含量相对稳定,未发生明显变化,半年后其响应值略有所上升(5%以内),考虑因甲醇部分挥发导致溶质浓度偏高。因此建议标准溶液于冷藏(4~8℃)储存。

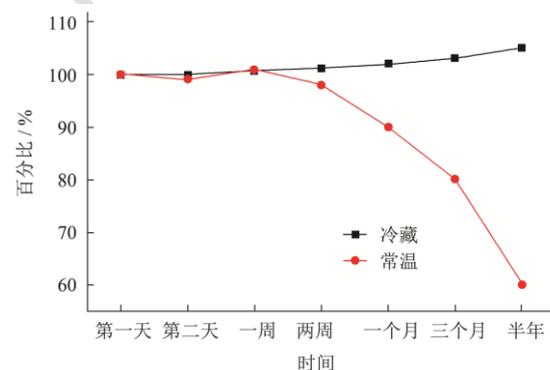


图6 对苯基苯酚标物的稳定性考察

Fig.6 Stability investigation of *p*-phenylphenol standard

2.3 方法学考察

2.3.1 检出限和线性范围

在优化好的色谱条件下对质量浓度为0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、50.00、100.00 μg/mL的标准溶液进行测定,以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度(X, μg/mL)为横坐标,根据质量浓度与色谱峰面积响应绘制标准曲线和计算回归方程及其相关系数。结果表明:高效液相色谱PDA和FLD两种检测器的线性方程、及相关系数(R²)及检出限、定量限见表2,这两种检测器在各自的线性范围内线性良好,R²>0.999。采用空白基质加标的方法,以信噪比

$S/N=10$ 得到目标物的定量限 (LOQ) 为 0.10 mg/kg 和 0.02 mg/kg, 以信噪比 $S/N=3$ 得到目标物的检出限 (LOD) 为 0.03 mg/kg 和 0.01 mg/kg。相同浓度的对苯基苯酚, 其荧光信号响应比紫外高 150 多倍, 使用 FLD 检测器的灵敏度更高, 检出限更低。将本研究方法

本方法适用的线性范围比文献中报道的更广, 检测灵敏度更高, 检测基质也更为广泛, 适用于多种果蔬基质中对苯基苯酚的测定, 并且在共同的线性范围内, PDA 和 FLD 检测器均可定性定量, 相互佐证, 提高了方法定性定量的准确性。

表 2 紫外和荧光检测器的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear equations, correlation coefficients (R^2), LODs and LOQs of the *P*-phenylphenol

检测器	线性范围	线性方程	相关系数 R^2	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
PDA	0.05~100.00 $\mu\text{g/mL}$	$Y=7.60e+004X+695.80$	0.999 97	0.03	0.10
FLD	0.01~5.00 $\mu\text{g/mL}$	$Y=1.19e+007X+76 631.80$	0.999 91	0.01	0.02

表 3 本方法与文献报道的方法中适用基质、检测器、线性范围、检出限和定量限的比较

Table 3 comparison of the suitable sample, detector, linear range, LODs and LOQs in this method and literatures

文献	方法	基质	检测器	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
[11]	HPLC	柑橘	PDA	1.2~4	1.00	/
[14]	GC-MS	水果	质谱	0.2~4	0.10	/
[10]	HPLC	果蔬	PDA	0.5~100	0.05	/
[5]	HPLC	柑橘、黄瓜、白菜、西红柿	PDA	0.5~100	/	0.05
[12]	HPLC-MS	水果	质谱	0.05~1.2	0.02	/
本方法	HPLC	果蔬	PDA/FLD	PDA: 0.05~100 FLD: 0.01~5	PDA: 0.03 FLD: 0.01	PDA: 0.1 FLD: 0.02

2.3.2 方法回收率和精密度

表 4 样品中对苯基苯酚的加标回收率和精密度 (紫外检测器)

Table 4 Recovery and RSD of *P*-phenylphenol in samples (PDA)

检测器	基质	添加量/(mg/kg)	加标回收率/%	RSD/%
PDA 检测器	苹果	0.1	109.3	3.20
		0.2	85.87	5.72
		1.0	93.01	2.20
	梨	0.1	107.0	3.92
		0.2	92.83	3.57
		1.0	92.50	3.11
	柑橘	0.1	106.3	3.19
		0.2	88.83	2.61
		1.0	90.50	3.18
白菜	0.1	82.28	2.60	
	0.2	92.16	3.72	
	1.0	93.52	4.10	
韭菜	0.1	110.7	3.99	
	0.2	83.50	4.33	
	1.0	88.00	4.37	

选取空白水果基质 (苹果、梨、柑橘) 和蔬菜基质 (白菜、韭菜), 分别添加 3 个浓度水平 (LOQ、2LOQ 和 10LOQ) 的对苯基苯酚标准溶液, 平行测定 6 次, 考察在 PDA 和 FLD 检测器两种测定条件下方法的加标回收率和精密度, 结果见表 4 和 5。PDA 检

测中对苯基苯酚的加标回收率为 82.28%~110.7%, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.60%~5.72%; FLD 检测中对苯基苯酚的加标回收率为 85.83%~109.8%, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.66%~5.26%, 结果表明方法的回收率和精密度均满足要求。

表 5 样品中对苯基苯酚的加标回收率和精密度 (荧光检测器)

Table 5 Recovery and RSD of *P*-phenylphenol in samples (FLD)

检测器	基质	添加量/(mg/kg)	加标回收率/%	RSD/%
PDA 检测器	苹果	0.02	106.7	3.91
		0.04	88.25	3.51
		0.2	93.15	2.97
	梨	0.02	109.8	5.26
		0.04	95.17	4.28
		0.20	96.00	3.55
FLD 检测器	柑橘	0.02	108.2	3.58
		0.04	85.83	3.86
		0.20	91.50	3.15
	白菜	0.02	107.7	5.22
		0.04	94.65	3.33
		0.20	92.59	3.45
韭菜	0.02	108.5	2.66	
	0.04	90.00	2.90	
		0.20	92.83	3.15

2.3.3 方法特异性

在相同的前处理和仪器条件下,通过空白样品、空白样品加标和对苯基苯酚标准溶液考察方法的特异性,得到的色谱图(图7)表明,对苯基苯酚出峰位置没有明显共流出干扰。因对苯基苯酚存在邻苯基苯酚和间苯基苯酚两种异构体,在色谱无法分离的情况下容易存在假阳性的问题。本实验考察了两种异构体对对苯基苯酚的干扰情况,结果发现在本方法建立的色谱条件下,PDA方法和FLD方法均可实现三种同分异构体的有效分离,分离色谱图见图3。此外为了更好的识别干扰,通过建立PDA和FLD两种检测器串联方法,提高了方法的定性能力。综上,本方法抗干扰能力强、特异性好,可有效避免复杂样品中假阳性问题。

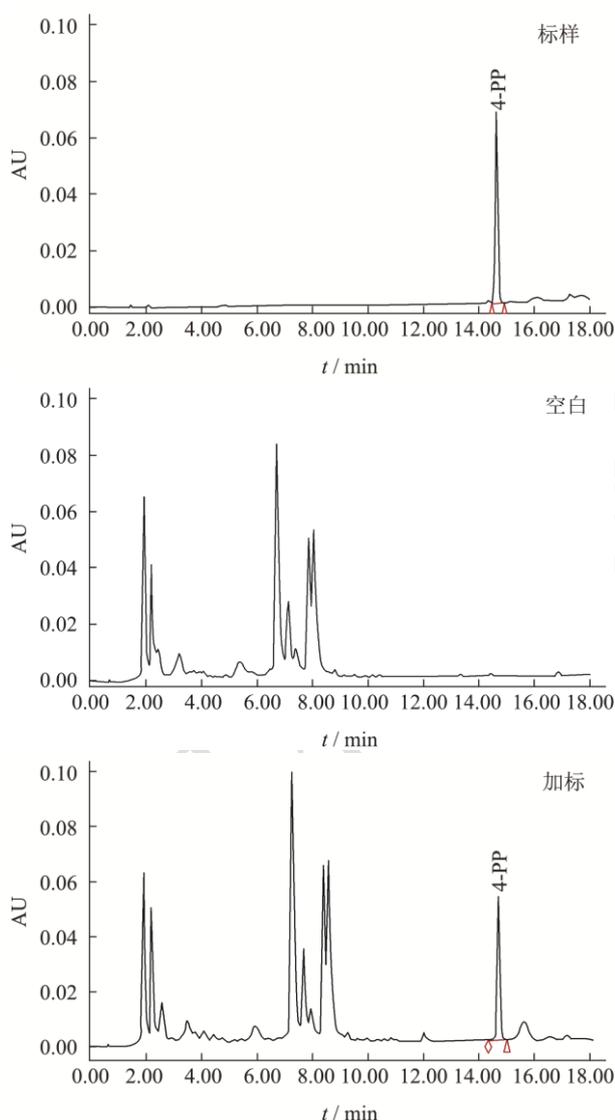


图7 对苯基苯酚标准溶液色谱图(1.0 g/mL)、空白苹果色谱图和苹果样品加标色谱图(1.0 mg/kg)

Fig.7 Chromatograms of *P*-phenylphenol standard solution (10 μ g/mL), blank apple sample and the spiked apple samples (16 mg/kg)

2.4 实际样品检测

应用本实验建立的方法对市售的柑橘、苹果、梨、白菜、菠菜、韭菜等50批次水果蔬菜样品进行测定,未发现对苯基苯酚阳性样品。

3 结论

本文基于盐析辅助均相液液萃取前处理方法,建立了高效液相色谱PDA/FLD双检测器串联对果蔬中对苯基苯酚的检测分析方法,并对提取溶剂、提取盐体系、净化、浓缩方式、稳定性等关键因素进行了考察与评价。PDA和FLD两种检测器在各自线性范围内 $R^2 > 0.999$,检出限分别为0.03 mg/kg和0.01 mg/kg,定量限分别为0.10 mg/kg和0.02 mg/kg,回收率为82.28%~110.7%和85.83%~109.8%,RSD为2.60%~5.72%和2.66%~5.26%。在样品中对苯基苯酚残留量较低时,可选择FLD检测器,实现更低浓度的检测;残留量较高时,则可以选择PDA检测器;两种检测器串联或单独使用,可满足不同实验室需求,提高了方法定性定量的准确性。该方法前处理简便、准确度好,灵敏度高,特异性强,可满足大批量样品的快速测定。本方法的建立可为果蔬中对苯基苯酚的测定提供一种新选择,为果蔬中对苯基苯酚检测标准的制定提供技术参考,同时为检验机构日常检测及风险监管提供技术保障。

参考文献

- [1] 聂继云,李静,李海飞,等.我国水果防腐保鲜剂的使用及其检测方法[J].植物保护,2007,33(6):26-30.
- [2] J P Groten, W Butler, V J Feron, et al. An analysis of the possibility for health implication of joint actions and interactions between food additives [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2000, 31(1): 77-91.
- [3] Edwin J Routledge, Joanne Parker, Jenny Odum, et al. Some alkyl hydroxybenzoate preservatives (parabens) are estrogenic [J]. Toxicol, 1998, 153: 12-19.
- [4] GB 2763-2021,食品中农药最大残留限量[S].
- [5] 向露,周启明,王雅,等.程序变波长-高效液相色谱法同时测定果蔬中9种防腐剂[J].食品工业科技,2013,34(20):70-74.
- [6] 林海丹,邹志飞,秦燕,等.分散固相萃取-高效液相色谱法快速测定果蔬中的6种保鲜剂残留量[J].色谱,2013,31(2): 170-173.
- [7] Bahruddin Saad, Noor Hana Haniff, Muhammad Idris Saleh, et al. Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with

- fluorescence detection [J]. Food Chemistry, 2004, 84(2): 313-317.
- [8] 艾尔肯 依不拉音,李明,李兴,等.乌鲁木齐市场水果、蔬菜中防腐剂联苯、邻苯基苯酚和噻苯咪唑的残留分析[J].食品与发酵工业,2007,33(2):129-132.
- [9] 艾尔肯 依不拉音,张辽生,李兴.蒸汽萃取-高效液相色谱紫外/荧光法同时测定果蔬中噻苯咪唑、邻苯基苯酚、联苯及抑霉唑残留[J].福建分析测试,2011,20(5):1-6.
- [10] 杨涛,李明,艾尔肯 依不拉音,等.高效液相色谱法同时测定果蔬中 10 种防腐杀菌剂[J].理化检验-化学分册,2010,46(10):1189-1192.
- [11] 奉夏平,曾宪远,付丽敏,等.高效液相色谱法测定柑橘中 6 种防腐保鲜剂的残留[J].现代食品科技,2013,29(8):2025-2029.
- [12] 奉夏平,宁焕焱,黄飞,等.高效液相色谱-串联质谱法同时测定 5 种鲜水果保鲜剂的残留量[J].分析测试学报,2013,32(12):1482-1486.
- [13] Bravo R, Caltabiano L M, Fernandez C, et al. Quantification of phenolic metabolites of environmental chemicals in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification [J]. Journal of Chromatography B, 2005, 820(1-2): 229-236.
- [14] 奉夏平,李彩均,唐丽娜,等.气相色谱-质谱法对鲜水果中 5 种保鲜剂残留量的同时测定[J].分析测试学报,2013,32(8): 1007-1011.
- [15] Tuan-Kiet Ly, Tuan-Dat Ho, Philippe Behra, et al. Determination of 400 pesticide residues in green tea leaves by UPLC-MS/MS and GC-MS/MS combined with QuEChERS extraction and mixed-mode SPE clean-up method [J]. Food Chemistry, 2020, 326(1-2): 126928.
- [16] Herbert Musarurwa, Luke Chimuka, Vusumzi Emmanuel Pakade, et al. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2019, 84: 103314.
- [17] Perestrelo, Rosa, Silva. QuEChERS-fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1070(6): 1-28.
- [18] Yosef Alemayehu, Teshome Tolcha, Negussie Megersa. Salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with HPLC for quantitative extraction of trace multiclass pesticide residues from environmental waters [J]. American Journal of Analytical Chemistry, 2017, 8(7): 433-448.
- [19] Laura Carbonell-Rozas, Romina Canales, Francisco J Lara, et al. A natural deep eutectic solvent as a novel dispersive solvent in dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet for the determination of pesticide residues [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(25): 6413-6424.
- [20] Negussie Bezuayehu Tadesse, Dube Simiso, Nindi Mathew Muzi, et al. Multiclass pesticide residue analysis in fruit and vegetable samples by combining acetone-based salting-out assisted extraction with dispersive liquid-liquid microextraction [J]. Journal of Chemistry, 2021, 3: 1-12.
- [21] Carmen T Santasania, David S Bell. Mechanisms of interaction responsible for alternative selectivity of fluorinated stationary phases [J]. LCGC Europe, 2016, 29(2): 86-92.