

# 分散固相萃取-高效液相色谱法测定水果中 三氯生及三氯卡班

王 丽, 邵金良, 刘兴勇, 林 涛, 陈心连, 魏茂琼, 汪禄祥\*

(云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 昆明 650223)

**摘 要:** **目的** 建立分散固相萃取-高效液相色谱法测定水果中三氯生及三氯卡班残留的新方法。**方法** 样品采用乙腈溶液涡旋超声提取后, 加入十八烷基键合硅胶吸附剂(C<sub>18</sub>)作为分散固相萃取净化剂进行净化(200 mg), 用高效液相色谱法在 278 nm 处测定, 采用 PICKERING C<sub>8</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm i.d., 5 μm), 以甲醇:水(78:22, V:V)的溶液为流动相等度洗脱, 流速 1.2 mL/min。**结果** 在最优检测条件下, 各目标化合物的加标回收率为 72.9%~104.4%, 相对标准偏差在 2.1%~9.1%之间。三氯生及三氯卡班的检出限分别为 0.05 和 0.02 mg/kg, 定量限分别为 0.15 和 0.06 mg/kg。**结论** 该方法分析快速、简便, 适用于水果中三氯生及三氯卡班的测定。**关键词:** 分散固相萃取; 高效液相色谱法; 三氯生; 三氯卡班

## Determination of triclosan and triclocarban in fruit by dispersive solid-phase extraction and high performance liquid chromatography

WANG Li, SHAO Jin-Liang, LIU Xing-Yong, LIN Tao, CHEN Xin-Lian, Wei Mao-Qiong, WANG Lu-Xiang\*

(Institute of Agriculture Quality Standards & Testing Technique, Yunnan Academy of Agricultural Science, Yunnan 650223, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a method for determination of triclosan and triclocarban in fruit by dispersive solid-phase extraction (DSPE) combined with high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The analytes were supersonic extracted from the fruit samples by acetonitrile, and purified by dispersion solid phase extraction using C<sub>18</sub> sorbent (200 mg), then analyzed by high performance liquid chromatography with 278 nm detector. The chromatographic separation was performed on a PICKERING C<sub>8</sub> column (4.6 mm×250 mm i.d., 5 μm), using a gradient elution program of methanol-H<sub>2</sub>O (78:22=V:V) as a mobile phase with a flow rate at 1.2 mL/min and the detector setting at 278 nm. **Results** Under optimization condition, the recoveries were in the range of 72.9%~104.4%, and the relative standard deviations (RSD) were 2.1%~9.1%. The limit of detection was 0.05 and 0.02 mg/kg, and the limit of quantification was 0.15 and 0.06 mg/kg for triclosan and triclocarban. **Conclusion** This method was quick and easy, and applicable to determination of triclosan and triclocarban in fruit.

**KEY WORDS:** dispersive solid-phase extraction; high performance liquid chromatography; triclosan; triclocarban

基金项目: 云南省科技惠民专项(农业)重点项目(2014RA054)

**Fund:** Supported by Yunnan Benefit S & T Program (2014RA054)

\*通讯作者: 汪禄祥, 研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全。E-mail: wangluxiang@sina.com

\*Corresponding author: WANG Lu-Xiang, Researcher, Institute of Agriculture Quality Standards & Testing Technique, Yunnan Academy of Agricultural Science, No. 9, Xueyun Road, Wuhua District, Kunming 650223, China. E-mail: wangluxiang@sina.com

## 1 引言

三氯生及三氯卡班是一类广谱、高效的抗菌物质,在农业生产、食品加工及日化添加等领域被广泛应用。由于具有高亲脂性、结构与二恶英类似以及应用广泛等特性,近年来有关三氯生类物质的安全性报道逐渐增多。有研究证实,此类物质会影响人体正常内分泌及生殖等多系统的功能,甚至导致癌症和发育异常等问题的出现<sup>[1,2]</sup>。因此,三氯生类化学污染物的残留情况也应该是我们关注的重点之一。

目前,关于三氯生及三氯卡班检测方法的研究多集中在化妆品<sup>[3,4]</sup>、洗涤用品<sup>[5,6]</sup>、纺织品<sup>[7]</sup>和水样等环境基质<sup>[8-10]</sup>中,食品中的检测报道相对较少。郑柯文等<sup>[11]</sup>建立了鱼肉样品中三氯生及其甲基代谢产物的检测方法,采集的市售草鱼样品中均有不同含量的三氯生检出。王志元等<sup>[12]</sup>研究建立用固相萃取手段提取、净化水果中的三氯生,评估了三氯生在水果和果汁中的风险,对不同种类水果进行抽检和调查,结果显示三氯生检出率达10%~20%。因此,三氯生类物质在食品领域的残留污染情况也应得到重视。

食品中三氯生及三氯卡班样品前处理多采用固相萃取技术<sup>[12]</sup>,步骤相对繁琐费时,溶剂使用量大,而分散固相萃取法是直接将固相萃取吸附剂分散在样品的萃取液中,并能有效去除样品中各种杂质干扰,此方法快速稳定。检测方法主要为液相色谱、气相色谱、气相色谱-质谱及液相色谱-串联质谱法,液相色谱法是常用的检测方法。目前采用分散固相萃取-高效液相色谱法测定三氯生类物质尚未见报道。因此,本文以葡萄、苹果和梨为研究对象,样品前处理采用分散固相萃取法净化,对提取剂、萃取净化剂的种类、用量及色谱检测条件进行优化,首次建立C<sub>18</sub>分散固相萃取-高效液相色谱法同时测定水果中三氯生及三氯卡班的快速检测方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

葡萄、苹果和梨(来自昆明市农贸市场)。

### 2.2 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters Alliance e2695,美国Waters公司);二极管阵列检测器(2998,美国Waters公司);高速离心机(TGL-10B-6D,上海安亭科学仪

器厂);涡旋混匀器(QL-861,海门市其林贝尔仪器有限公司);超声波清洗仪(KQ-500DB,昆山市超声仪器有限公司)。

三氯生、三氯卡班(纯度99.0%,Sigma公司);乙腈、甲醇(色谱级,德国merck公司);十八烷基键合硅胶吸附剂(C<sub>18</sub>)、N-丙基乙二胺吸附剂(PSA)(瓦里安公司)。

### 2.3 试验方法

#### 2.3.1 标准溶液配制

分别准确称取10 mg三氯生和三氯卡班标准物质,用甲醇溶解并分别定容至10 mL容量瓶中,配制成1000 mg/L的标准储备溶液,使用棕色瓶装,避光低温保存。准确移取一定体积的标准溶液并用甲醇进行逐级稀释,配制成质量浓度分别为4.00、2.00、1.00、0.50、0.20、0.10 mg/L和2.00、1.00、0.50、0.25、0.10、0.05 mg/L的三氯生及三氯卡班的系列标准工作溶液。

#### 2.3.2 液相色谱条件

色谱柱: PICKERING C<sub>8</sub> (4.6 mm×250 mm i.d., 5 μm);柱温: 30.0 °C;进样体积: 10.0 μL;流速: 1.20 mL/min;流动相: 甲醇:水(78:22, V:V);等度洗脱,检测波长: 278 nm。

#### 2.3.3 样品处理

称取均匀样品10.0 g(精确至0.01 g)于50 mL离心管中,加入10 mL乙腈和4.0 g无水硫酸镁,剧烈振摇混匀,高速涡旋2 min后,超声提取10 min,以5000 r/min离心5 min,准确直接移取离心上清液2 mL于10 mL离心管中并加入200 mg C<sub>18</sub>进行净化,涡旋2 min后,以5000 r/min离心5 min,离心上清液过0.22 μm有机相滤膜,待上机测定。

## 3 结果与分析

### 3.1 提取和净化条件优化

#### 3.1.1 提取溶剂的选择

三氯生和三氯卡班均为脂溶性化合物,辛醇水分配系数(logK<sub>ow</sub>)分别为4.8、4.9<sup>[6]</sup>,兼顾2种物质的化学性质及反相液相色谱的特点,本实验选取甲醇和乙腈为提取溶剂,比较2种有机溶剂对目标化合物的提取效果。针对空白样品加标,乙腈提取目标化合物的回收率明显高于甲醇,因此,本实验选择乙腈为提取溶剂。

### 3.1.2 净化条件的选择

本实验比较十八烷基键合硅胶吸附剂( $C_{18}$ )和 N-丙基乙二胺吸附剂(PSA) 2 种分散固相萃取吸附剂对目标化合物净化回收效果的影响。 $C_{18}$  是一种广谱性的净化吸附剂, 能有效去除提取溶液中的脂肪、甾醇、维生素等干扰物; PSA 吸附剂的结构中含有 2 个氨基, 因其能够形成氢键或者产生离子交换作用, 因此, 能有效去除样品溶液中的有机酸、脂肪酸、糖及其他复杂的成分<sup>[13]</sup>。从实验结果看出, 经  $C_{18}$  和 PSA 净化后干扰物质杂峰明显减少, 而采用  $C_{18}$  净化后目标物回收率相对更高, 具体见图 1, 因此, 本实验选择  $C_{18}$  作为分散固相萃取吸附剂。同时对  $C_{18}$  用量进行优化, 最终确定  $C_{18}$  分散固相萃取净化剂的用量为 200 mg。

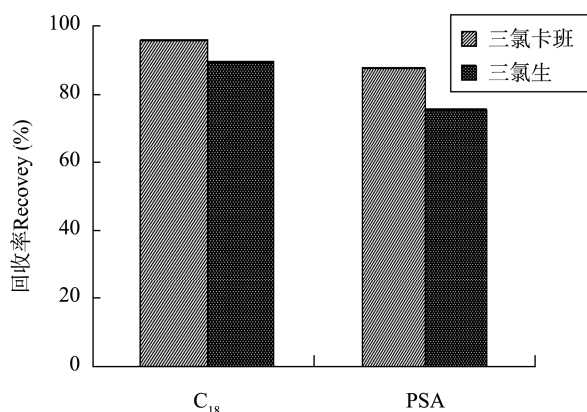


图 1 不同吸附剂对三氯卡班和三氯生标回收率的影响  
Fig. 1 Effect of different dispersive sorbents on the recoveries of triclocarban and triclosan

## 3.2 色谱条件的优化

### 3.2.1 流动相和流速的优化

相关文献报道<sup>[5]</sup>, 单独以甲醇与水或乙腈与水作为流动相时, 优化流动相按不同比例混合, 采用等度或梯度洗脱条件下, 三氯生与三氯卡班均不能很好地实现基线分离效果。通常分离三氯生和三氯卡班的流动相会选择四氢呋喃和乙酸铵等缓冲溶液。本实验对比了以甲醇、乙腈与多组不同 pH 值水溶液作为流动相时目标物的分离情况, 最终从分离效果和环保经济的角度考虑, 确定选择甲醇-水(V:V=78:22)作为本实验流动相, 等度洗脱, 此时三氯卡班和三氯生

有很好的色谱分离效果。

对 0.80、1.00 和 1.20 mL/min 3 个流速条件下目标物的保留时间和峰形进行对比。结果显示: 增大流速有利于缩短出峰时间和改善峰形效果。当流速为 0.80 mL/min 时, 目标物的峰形变宽且保留时间较长; 流速为 1.20 mL/min, 目标物的分离效果好, 峰形对称性好并且尖而窄, 出峰时间适宜。因此, 本实验选择 1.20 mL/min 为测定流速。

### 3.2.2 检测波长的优化

本实验通过二极管阵列检测器扫描标准溶液, 得到各目标物的最大紫外吸收光谱, 实验表明, 三氯生的最大吸收峰为 278 nm, 三氯卡班的最大吸收峰为 263 nm。相同浓度条件下三氯卡班响应明显高于三氯生, 综合考虑为保证灵敏度, 确定最佳检测波长为 278 nm。

### 3.2.3 分析色谱柱的选择

比较 Waters  $C_{18}$  柱(4.6 mm×250 mm i.d., 5  $\mu$ m)、Waters BondPak  $NH_2$  柱(4.6 mm×250 mm i.d., 5  $\mu$ m)和 PICKERING  $C_8$  柱(4.6 mm×250 mm i.d., 5  $\mu$ m)3 种色谱柱对目标物的分离效果, Waters  $C_{18}$  柱(图 2-A)和 Waters  $NH_2$  柱(图 2-B)很难实现 2 种目标化合物的完全基线分离, 而 PICKERING  $C_8$  柱对目标化合物分离效果很好, 如图 2-C。因此, 选用 PICKERING  $C_8$  柱为本实验的分析柱。

## 3.3 方法的线性范围与检出限

在空白样品内加入标准溶液, 在确定的最佳检测条件下, 以目标化合物的峰面积对浓度进行回归分析计算。结果表明, 三氯生与三氯卡班分别在 0.1~4.0、0.05~2.0 mg/kg 浓度范围内线性关系良好, 三氯生的线性回归方程为  $Y=1.0013X+0.0505$ ,  $r^2=0.995$ , 三氯卡班的线性回归方程为  $Y=0.9039X+0.0841$ ,  $r^2=0.997$ 。以目标物色谱峰 3 倍信噪比(S/N)确定方法检出限(LOD)和 10 倍信噪比确定方法定量限(LOQ), 得到三氯生及三氯卡班的检出限分别为 0.05 和 0.02 mg/kg, 定量限分别为 0.15 和 0.06 mg/kg。图 3 是在 0.05~1.00 mg/L 浓度范围内的标准溶液色谱图。

## 3.4 方法的回收率与精密度

以葡萄、苹果和梨样品为试验对象, 在低、中、高 3 个添加浓度水平下考察本方法的回收率和精密度, 按照本方法优化好的条件进行提取和测定, 样品

空白和加标色谱图见图4~5。0.2、0.5和1.0 mg/kg 3个添加水平下目标化合物的平均回收率为72.9%~104.4%(每个添加浓度平行测定6次),相对标准偏差(RSD)在2.1%~9.1%之间,结果见表1。该方法显示出较好的回收率与精密度。

#### 4 结论

本文建立了分散固相萃取-高效液相色谱法测定水果中三氯生及三氯卡班残留量的新方法。实验表明,

该方法采用分散固相萃取法,相较于其他样品前处理方法更加快速、简单。本方法使用PICKERING C<sub>8</sub>柱进行目标化合物分离,在只选择甲醇和水作为流动相,不使用四氢呋喃和乙酸铵等缓冲溶液的条件下,即可实现三氯生与三氯卡班很好的色谱分离效果,且峰形很好。本方法的回收率及精密度均满足测定要求,可用于水果样品中三氯生与三氯卡班的快速检测。对于该方法在其他类型不同复杂基质样品中的利用有待进一步研究。

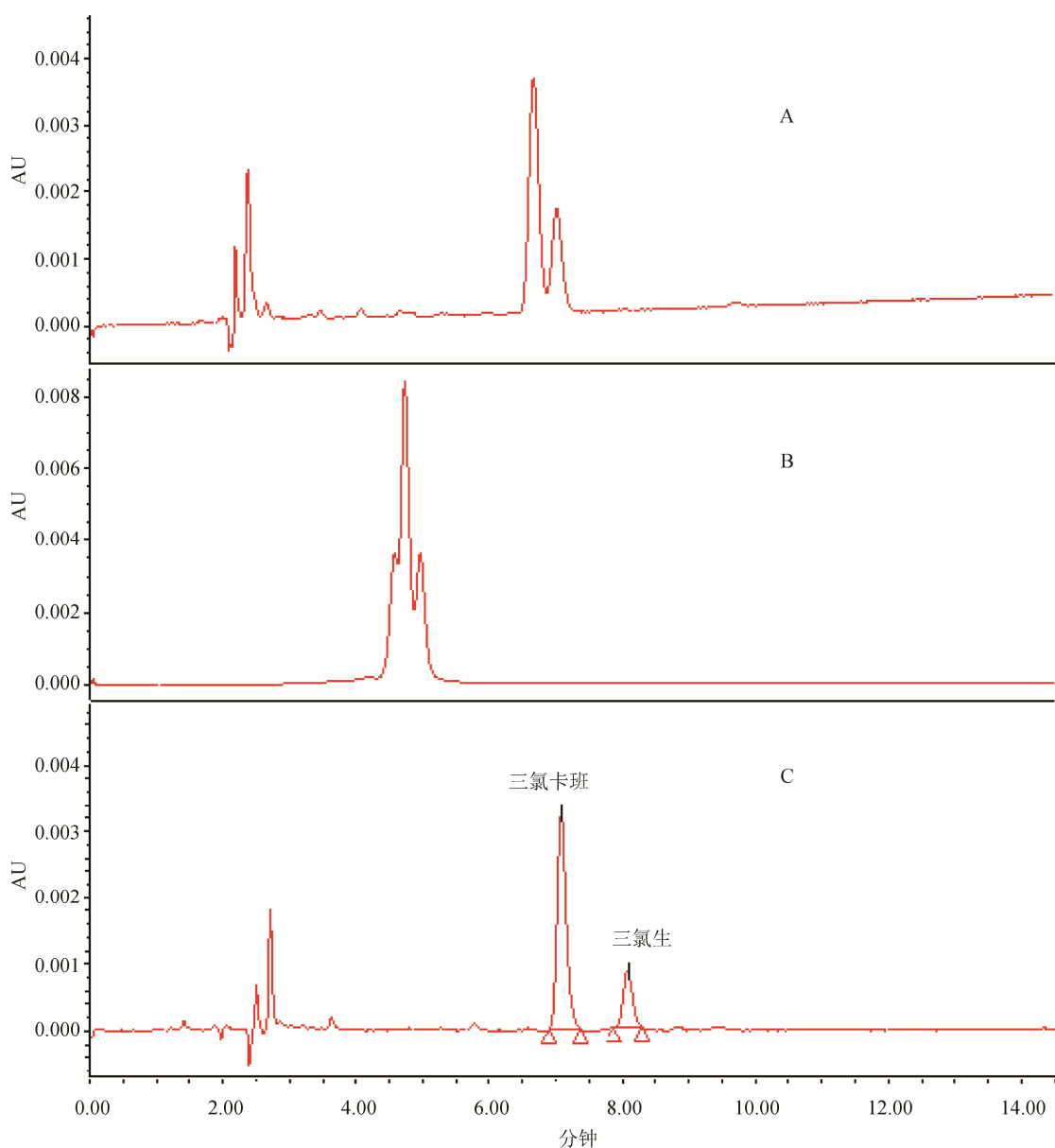


图2 三氯卡班和三氯生的色谱图(1.0 mg/L)  
Fig. 2 Chromatogram of triclocarban and triclosan

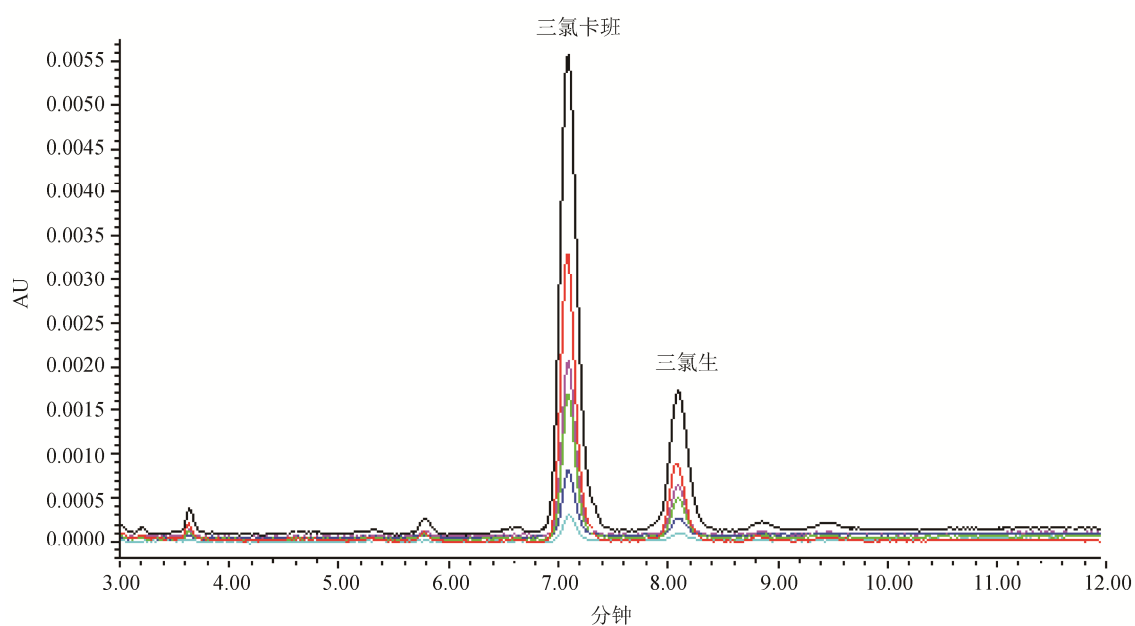


图 3 标准溶液色谱图

Fig. 3 Chromatogram of standard solution

表 1 水果中三氯卡班和三氯生的平均回收率和相对标准偏差( $n=6$ )Table 1 Average recoveries and relative standard deviation of triclocarban and triclosan in fruit ( $n=6$ )

样品	添加量/(mg/kg)	三氯卡班		三氯生	
		平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
		/%	/%	/%	/%
葡萄	0.2	85.1	5.7	81.3	8.1
	0.5	98.0	3.7	88.8	5.1
	1.0	95.4	5.9	91.1	2.4
苹果	0.2	72.9	7.2	87.0	9.1
	0.5	89.2	4.9	104.4	3.0
	1.0	87.0	2.7	89.6	4.7
梨	0.2	78.5	4.4	91.0	6.3
	0.5	82.4	2.8	80.6	5.8
	1.0	102.8	5.9	92.4	2.1

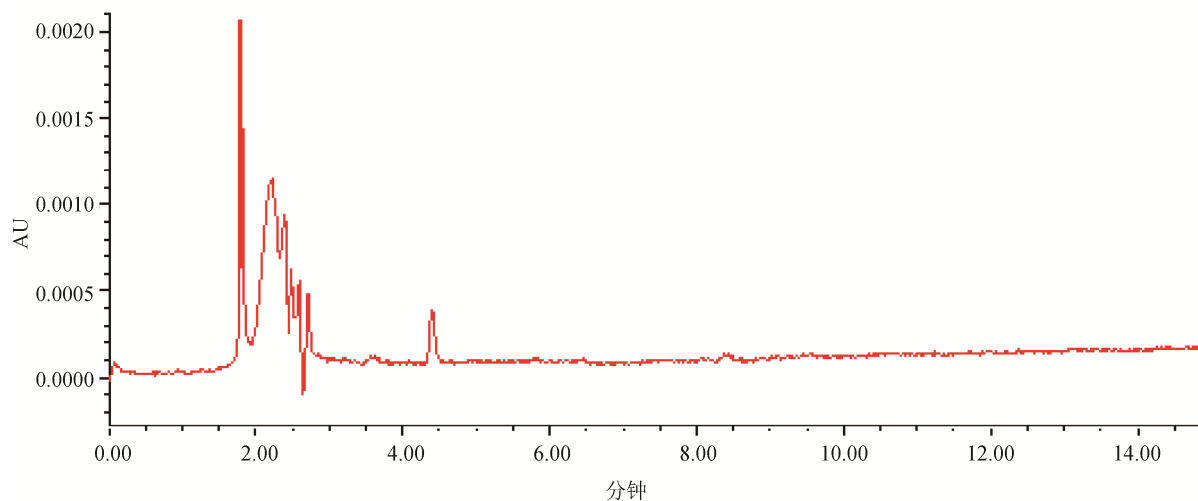


图 4 葡萄空白色谱图

Fig. 4 Chromatogram of grape blank

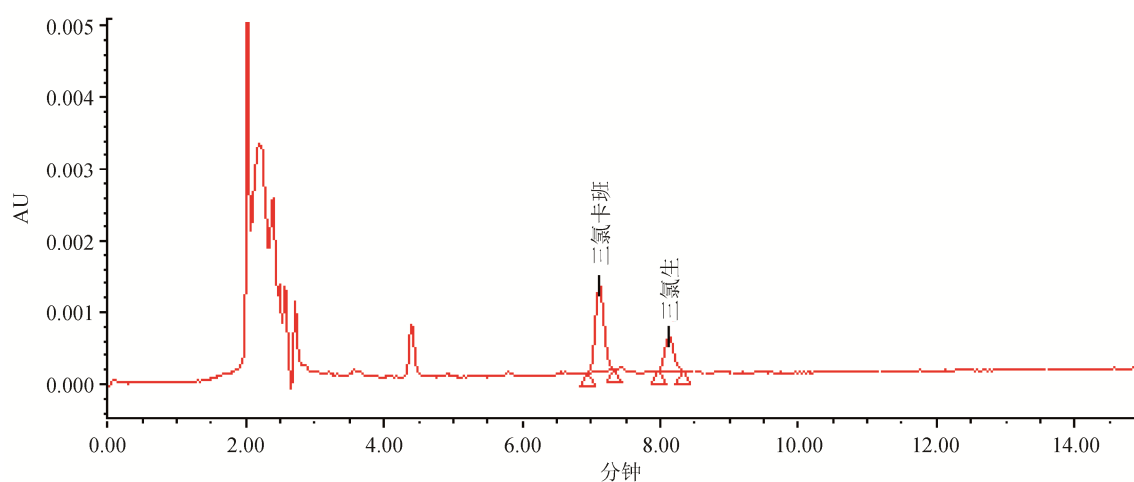


图 5 葡萄加标色谱图(0.2 mg/kg)

Fig. 5 Chromatograms of grape sample spiked at 0.2 mg/kg of each plant growth regulators

## 参考文献

- [1] Zhao RS, Yuan JP, Li HF, *et al.* Nonequilibrium hollow-fiber liquid-phase micro-extraction with in situ derivatization for the measurement of triclosan in aqueous samples by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387: 2911–2915.
- [2] 李林朋, 马慧敏, 胡俊杰, 等. 三氯生和三氯卡班对人体肝细胞 DNA 损伤的研究[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(12): 2897–2901.

胞 DNA 损伤的研究[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(12): 2897–2901.

Li LP, Ma HM, Hu JJ, *et al.* The genotoxicity of triclosan and triclorcarban in human hepatocyte L02 cell [J]. *Ecol Environ Sci*, 2010, 19(12): 2897–2901.

- [3] 赵孔祥, 苏毅, 陈旭艳, 等. 高效液相色谱法测定化妆品中 10 种限用物质[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(6): 701–704.

Zhao KX, Su Y, Chen XY, *et al.* Determination of 10 kinds of

- restricted substances in cosmetics by high performance liquid chromatography with photodiode array detector [J]. *J Instru Anal*, 2011, 30(6): 701–704.
- [4] 周博宇, 芦春梅, 丁旭, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水性化妆品中的三氯生[J]. *分析试验室*, 2013, 32(12): 84–87.  
Zhou BY, Lu CM, Ding X, *et al.* Determination of triclosan in aqueous cosmetic by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2013, 32(12): 84–87.
- [5] 刘超. 反相高效液相色谱法测定化妆品或洗涤用品中对氯二甲苯酚、三氯卡班和三氯生[J]. *色谱*, 2004, 22(6): 659.  
Liu C. Determination of dichlorophen, triclocarban and triclosan in cosmetics or daily chemical products by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2004, 22(6): 659.
- [6] 刘湘军, 赵妍, 赵珊, 等. 超高效液相色谱-联质谱法同时测定日化产品中的三氯生与三氯卡班[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(1): 64–68.  
Liu XJ, Zhao Y, Zhao S, *et al.* Simultaneous determination of triclosan and triclocarban in daily chemical products by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Instru Anal*, 2013, 32(1): 64–68.
- [7] 王成云, 谢堂堂, 杨左军, 等. 超高效液相色谱法测定纺织品中三氯生的含量[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(12): 1231–1234.  
Wang CY, Xie TT, Yang ZJ, *et al.* Determination of triclosan in textiles by ultra performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2010, 29(12): 1231–1234.
- [8] 刁春鹏, 赵汝松, 时军波, 等. 原位衍生分散液相微萃取—气相色谱/质谱快速检测饮用水中的痕量三氯生[J]. *分析化学*, 2009, 37(1): 131–135.  
Diao CP, Zhao RS, Shi JB, *et al.* Determination of trace triclosan in drinking water sample using dispersive liquid phase microextraction with in situ derivatization by gas chromatography /mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37(1): 131–135.
- [9] 伍筱琳, 刘仁沿, 姚子伟, 等. 气相色谱—质谱联用测定环境样品中三氯生[J]. *分析试验室*, 2009, 28(1): 26–29.  
Wu XL, Liu RY, Yao ZW, *et al.* Determination of triclosan in environmental samples using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Anals Lab*, 2009, 28(1): 26–29.
- [10] 姚思睿, 魏然, 杨柳明, 等. 气相色谱-质谱联用同时测定沉积物中三氯生和甲基三氯生[J]. *实验技术与管理*, 2015, 32(1): 79–81.  
Yao SR, Wei R, Yang LM, *et al.* Simultaneous determination of triclosan and methyl- triclosan in sediments by gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Exper Technol Manage*, 2015, 32(1): 79–81.
- [11] 郑柯文, 李寒, 王昭, 等. 气相色谱/质谱法同时检测鱼肉样品中三氯生及其甲基代谢产物[J]. *上海大学学报*, 2013, 19(4): 354–357.  
Zhen KW, Li H, Wang Z, *et al.* Simultaneous analysis of triclosan and methyl-triclosan in fish samples by gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Shanghai Univ*, 2013, 19(4): 354–357.
- [12] 王志元, 张思群, 席静, 等. 水果及果汁中二恶英类似物三氯新残留量的超高效液相色谱-串联质谱检测方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(6): 1325–1327.  
Wang ZY, Zhang SQ, Xi J, *et al.* Study of determination about the residue of triclosan dioxin analogs in fruit and juices by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(6): 1325–1327.
- [13] 王丽, 金芬, 李敏洁, 等. 分散固相萃取-气相色谱-串联质谱法测定蔬菜中多环芳烃及卤代多环芳烃[J]. *分析化学*, 2013, 41(6): 869–875.  
Wang L, Jin F, Li MJ, *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2013, 41(6): 869–875.

(责任编辑: 李振飞)

## 作者简介



王 丽, 研究实习生, 主要研究方向为农产品质量安全与分析检测。

E-mail: wangli5170@126.com

汪禄祥, 研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全。

E-mail: wangluxiang@sina.com