

· 试验研究 ·

# 苹果幼果中多菌灵的超声辅助碱液降解技术研究

牛鹏飞, 李蕊蕊, 郭玉蓉

(陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119)

**摘要:**为解决苹果幼果农药残留超标的难题,采用超声辅助碱液降解技术对苹果幼果多菌灵残留进行降解研究。结果表明:超声辅助碱液降解技术可快速有效降解苹果幼果中多菌灵残留,最佳降解参数为:超声时间 1 min、超声功率 192 W、超声温度 60℃、碱液浓度 0.1%,多菌灵降解率可达 70.58%,而降解技术对苹果幼果多酚含量几乎没有影响。超声辅助碱液可有效降解苹果幼果中的多菌灵,方法具有易操作简便、时间短、降解率高等优点。

**关键词:**苹果幼果;多菌灵;降解;超声

苹果是世界上种植最广、产量最多的果品<sup>[1]</sup>。在中国,每年因疏果产生约 160 万 t 苹果幼果<sup>[2]</sup>。目前大量苹果幼果未被有效利用,多数被直接弃置于果园中。科学研究表明:苹果幼果中含有大量的苹果多酚,其含量可达成熟果的 10 倍<sup>[3]</sup>,幼果在果园的弃置有可能加重果树的“自毒作用”<sup>[4,5]</sup>。以苹果幼果提取幼果多酚既可防止田间苹果生产污染,减轻土壤自毒作用又可开发多酚资源以及提高果农收入。因此,以苹果幼果为原料提取苹果多酚,成为植物提取物行业的热门。然而,幼果多酚出口创汇并未实现,其主要原因是苹果幼果的农药残留超标问题,尤其以多菌灵超标最为突出。2012 年 1 月,美国 FDA 对市售橙汁产品进行检查,发现进口橙汁及其产品中多菌灵残留含量较高,最高达 0.06 mg·kg<sup>-1</sup>,而美国国产橙汁大多数产品多菌灵超标,仅有 35.7% 合格<sup>[6]</sup>。多菌灵目前已成为我国产量最大的内吸杀菌剂品种,广泛应用于果树、蔬菜等多种农作物真菌病害的防治<sup>[7]</sup>。多菌灵残效期较长,对大鼠的生殖系统以及肝脏都有一定毒性<sup>[8-11]</sup>。因此研究掌握并去除苹果幼果的多菌灵残留成为幼果资源利用的前提。

多菌灵的降解方法多种多样,主要包括三大类:物理法、化学法和生物法<sup>[12]</sup>。如谢云霞等<sup>[13]</sup>采用 60Co $\gamma$  射线照射降解多菌灵;朱玲凤等<sup>[14]</sup>采用臭氧水对柑橘多菌灵降解技术进行研究;而目前研究最多的方法当属生物法,具体包括微生物降解法和生物酶降解法<sup>[15]</sup>。然而,酶法降解或

者微生物降解都存在着降解活性不稳定、降解成本高、降解时间长等问题;辐照降解又受设备使用不便、不安全等因素的限制,推广难度大。臭氧水存在着溶解度受限以及设备投资高等问题难以克服。因此,开发一种简单、有效、快速的农残降解方法成为保障行业产品质量安全的重要共识。笔者从“大多数农药在碱性环境下易分解”的共性弱点<sup>[16]</sup>入手,结合超声波辅助技术<sup>[17-19]</sup>,研究苹果幼果中多菌灵的超声辅助碱液降解技术,以期开发出一种简单、有效、快速地降解苹果幼果中多菌灵的方法,为苹果幼果的开发利用扫清障碍。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

苹果幼果,采自中国苹果主产区礼泉县;多菌灵标准品,购自北京陆桥技术股份有限公司;PSA 和 C18 均购自德国 CNW 科技公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

高效液相色谱系统:P680 型泵(在线脱气机、梯度混合器及 20  $\mu$ L 定量环)和 UVD 170U 型紫外检测器,美国 DIONEX 公司;DiamondsILTM 型 C18 色谱分析柱(250 mm  $\times$  4.6 mm ID, 5.0  $\mu$ m),DIKMA 有限公司;AT-330 型柱温箱,天津奥特塞恩斯仪器有限公司;PHS-3C 型精密 pH 计,上海精密科学仪器有限公司;SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂;KQ-250DB 型数控超声波发生器,昆山市超声仪器

收稿日期:2017-03-08 修回日期:2017-04-20

基金项目:农业部现代苹果产业技术体系建设专项(CARS-28)。

第一作者简介:牛鹏飞(1982-),男,陕西户县人,实验师,在读博士,研究方向:苹果副产物综合利用。E-mail: niupf0406@163.com。

通信作者:郭玉蓉。

有限公司。

### 1.3 多菌灵检测色谱条件

流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样体积:  $20 \mu\text{L}$ ; 检测波长:  $282 \text{ nm}$ ; 柱温:  $30^\circ\text{C}$ ; 流动相: A:  $0.1\%$  的三氟乙酸水溶液, B:  $100\%$  乙腈; A : B =  $90 : 10$ 。

### 1.4 多菌灵测定样品前处理方法

苹果幼果经弱碱液超声处理后, 取出并用自来水漂洗、擦干、去皮。收集果皮、粉碎。称取  $3 \text{ g}$  果皮样品(精确至  $0.01 \text{ g}$ )于  $10 \text{ mL}$  聚乙烯具塞离心管中, 采用李雪等<sup>[20]</sup>文献方法继续进行前处理。

### 1.5 标准曲线的建立方法

准确配制  $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的多菌灵标准母液, 再依次配制成  $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1.0$ 、 $2.0$ 、 $4.0$ 、 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6 个质量浓度的标准液, 每个进  $20 \mu\text{L}$ , 用峰面积(纵坐标)与浓度(横坐标)进行线性回归。

### 1.6 碱液浓度对多菌灵标品降解能力的影响

分别设碱液浓度为  $0.01\%$ 、 $0.05\%$ 、 $0.1\%$ 、 $0.5\%$ 、 $1.0\%$  和  $5\%$  的 6 个处理; 每次取不同浓度碱溶液  $10 \text{ mL}$ , 加入  $28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的多菌灵标准溶液  $1 \text{ mL}$ , 用超声温度  $30^\circ\text{C}$ 、超声时间  $10 \text{ min}$ 、超声功率  $320 \text{ W}$  进行处理, 处理完后及时加入  $10\% \text{ HCl } 1 \text{ mL}$ , 混匀, 过  $0.45 \mu\text{m}$  有机滤膜, 分别取  $1 \text{ mL}$  作为待测样, 以评价碱液浓度对多菌灵标准品降解的影响, 每个处理重复三次。

### 1.7 超声温度对多菌灵标品降解能力的影响

分别设超声温度为  $25$ 、 $30$ 、 $35$ 、 $40$ 、 $45$ 、 $50$ 、 $55$ 、 $60$ 、 $65$ 、 $70$  和  $75^\circ\text{C}$  的 11 个处理, 每次取碱浓度为  $0.1\%$  的溶液  $10 \text{ mL}$ , 加入  $28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的多菌灵标准溶液  $1 \text{ mL}$ , 温度用 11 个处理, 超声时间  $10 \text{ min}$ 、超声功率  $320 \text{ W}$ , 超声完后及时加入  $10\% \text{ HCl } 1 \text{ mL}$ , 混匀, 过  $0.45 \mu\text{m}$  有机滤膜, 分别取  $1 \text{ mL}$  作为待测样, 以评价超声温度对多菌灵标准品降解的影响, 每个处理重复三次。

### 1.8 超声时间对多菌灵标品降解能力的影响

分别设超声时间为  $1$ 、 $3$ 、 $5$ 、 $7$ 、 $9$ 、 $11$ 、 $13$ 、 $15$ 、 $17$ 、 $19 \text{ min}$  的 10 个处理, 每次取碱浓度为  $0.1\%$  的溶液  $10 \text{ mL}$ , 加入  $28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的多菌灵标准溶液  $1 \text{ mL}$ , 温度  $40^\circ\text{C}$ 、功率  $320 \text{ W}$ , 超声完后及时加入  $10\% \text{ HCl } 1 \text{ mL}$ , 混匀, 过  $0.45 \mu\text{m}$  有机滤膜, 分别取  $1 \text{ mL}$  作为待测样, 以评价超声时间对多菌灵标准品降解的影响, 每个处理重复三次。

### 1.9 超声功率对多菌灵标品降解能力的影响

分别设超声功率为  $128 \text{ W}$ 、 $160 \text{ W}$ 、 $192 \text{ W}$ 、 $256 \text{ W}$  和  $320 \text{ W}$  的 5 个处理; 每次取  $0.1\%$  的碱溶液  $10 \text{ mL}$ , 加入  $28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的多菌灵标准溶液  $1 \text{ mL}$ , 用超声温度  $40^\circ\text{C}$ 、超声时间  $5 \text{ min}$ , 处理完

后及时加入  $10\% \text{ HCl } 1 \text{ mL}$ , 混匀, 过  $0.45 \mu\text{m}$  有机滤膜, 分别取  $1 \text{ mL}$  作为待测样, 以评价超声功率对多菌灵标准品降解的影响, 每个处理重复三次。

### 1.10 幼果多菌灵降解的正交试验设计

综合以上单因素试验结果, 每处理批次取苹果幼果  $30 \pm 0.2 \text{ g}$ , 加入  $500 \text{ mL}$  弱碱溶液, 按照表 1 正交试验方案进行试验, 以多菌灵的降解率为考察指标, 确定超声辅助碱液处理对苹果幼果中多菌灵降解的最佳处理组合, 所有处理均重复三次。

表 1 正交试验方案设计

处理号	功率/ W	时间/ min	温度/ $^\circ\text{C}$	碱液浓度/ %
1	160	1	40	0.05
2	160	5	50	0.1
3	160	9	60	0.15
4	192	1	50	0.15
5	192	5	60	0.05
6	192	9	40	0.1
7	224	1	60	0.1
8	224	5	40	0.15
9	224	9	50	0.05

### 1.11 多酚含量的测定

采用邓刚等<sup>[21]</sup>文献报道的福林酚法对超声碱液降解处理的幼果和未处理的苹果幼果分别进行总多酚含量测定, 以评价超声碱液降解多菌灵处理对苹果幼果中活性物质(总多酚)的影响。

### 1.12 数据统计分析

利用浙江大学开发的 dps7.50 版软件对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳检测波长的确立与分析

为确定多菌灵的最佳检测波长, 本试验采用紫外可见分光光度计对该农药进行全波长扫描, 结果发现多菌灵在  $282 \text{ nm}$  处具有较强的特征吸收值, 因此采用  $282 \text{ nm}$  检测多菌灵。该波长与李雪等<sup>[20]</sup>报道的方法一致。

### 2.2 标准品及样品的分离与分析

将适当浓度的多菌灵标品及加标的苹果幼果样品分别按 1.3 的色谱条件进样分析, 分离效果分别如图 1 和图 2 所示:

多菌灵标准品图谱和加标样品图谱分别为图 1 和图 2。从图 1 中可以看出, 在  $282 \text{ nm}$  下, 多菌灵组分被有效检出。从图 2 可以看出: 1.4 的样品前处理方法可有效除去样品中的干扰物, 同时多菌灵可以与样品中的干扰峰达到基线分离。

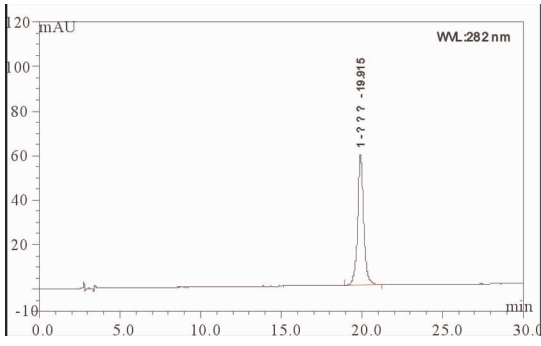


图1 多菌灵标准品色谱图

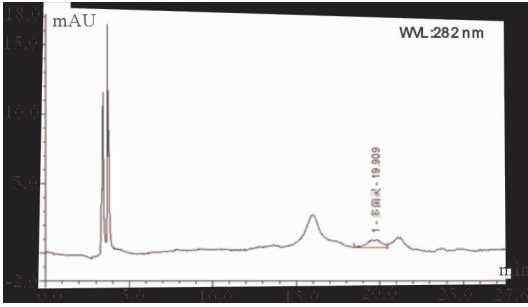


图2 添加多菌灵标准品的样品色谱图

### 2.3 标准曲线的建立以及系统稳定性测试结果分析

按 1.5 的方法建立多菌灵的标准曲线,其结果如下: $y=0.4406x-0.0029$ ( $y$  为各组分峰面积/ $\text{mAU} \cdot \text{min}$ ,  $x$  为各组分对应浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );线性范围( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ): $0 \sim 8.0000$ ;相关系数  $R^2=0.9994$ 。

### 2.4 碱液浓度对多菌灵降解的影响

按 1.6 的方法进行实验,结果如图 3 所示。

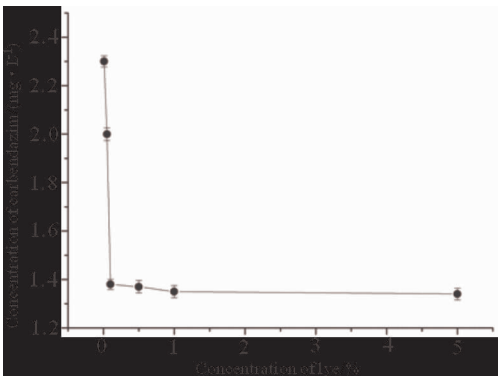


图3 碱液浓度对于多菌灵超声降解的影响

从图 3 可以看出:随着碱液浓度的增加,多菌灵的残余浓度逐渐降低;在碱液浓度为 0.1% 时,多菌灵的残余浓度约为  $1.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;随后,随着碱液浓度的增大,多菌灵的残余浓度几乎不再下降,可见 0.1% 的碱液浓度为多菌灵降解的最佳浓度。

### 2.5 超声温度对多菌灵降解的影响

按 1.7 的方法进行实验,结果如图 4 所示。

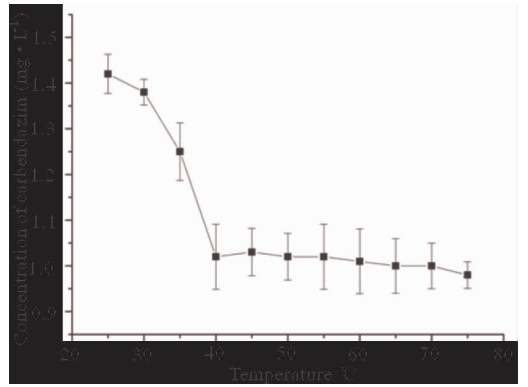


图4 超声温度对多菌灵降解的影响

从图 4 可以看出:随着温度的上升,多菌灵的残余浓度逐渐降低;在温度为  $40^\circ\text{C}$  时,多菌灵的残余浓度约为  $1.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;随后,随着碱液浓度的增大,多菌灵的残余浓度几乎不变。因此,  $40^\circ\text{C}$  碱液处理为多菌灵降解的最佳温度。

### 2.6 超声时间对多菌灵降解的测定结果

按照 1.8 的方法进行实验,结果如图 5 所示。

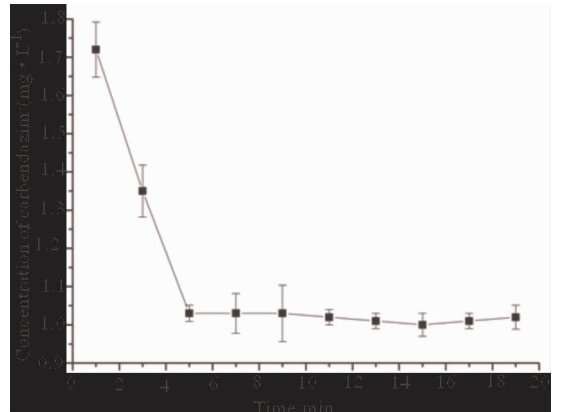


图5 超声时间对多菌灵降解的影响

从图 5 可以看出:随着时间的延长,多菌灵的残余浓度逐渐降低;在时间为 5 min 时,多菌灵的残余浓度约为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;随后,随着时间的延长,多菌灵的残余浓度几乎不变。因此, 5 min 为多菌灵降解的最佳时间。

### 2.7 超声功率对多菌灵降解的测定结果

按照 1.9 的方法进行实验,结果如图 6 所示。

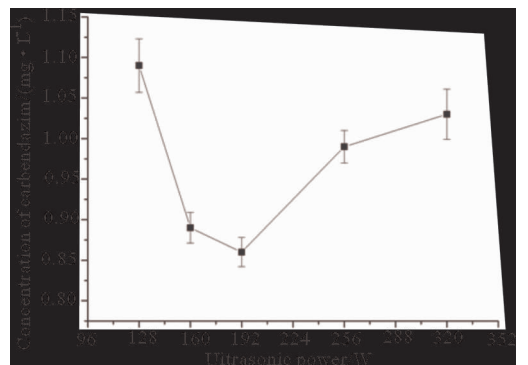


图6 超声功率对多菌灵降解的影响

从图 6 可以看出:前期,随着超声功率的增

大,多菌灵的残余浓度逐渐降低;在功率为 192 W 时,多菌灵的残余浓度约为  $0.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;随后,随着功率的增大,多菌灵的残余浓度不降反升。导致这种结果的原因可能是:声强是影响超声波降解有机物的一个重要因素,它是用单位面积的功率来衡量,随着功率的增大声强也增大<sup>[22,23]</sup>。大量研究表明:降解速度随声强的增加存在一个最大值,当超过这个最大值时,降解的速度随着声强的增大而减小,原因可能是,在较大声强作用下,在负声压相位内空化气泡增长过大,以致在随之而来的正声压相内来不及被压缩至崩溃;在较大声强作用下,有大量空化泡被激活,它们对超声波产生较强的散射衰减,导致降解率呈下降趋

势<sup>[24~26]</sup>。因此,多菌灵降解的最佳超声功率为 192 W。

2.8 正交试验结果

按表 1 进行正交试验,每处理重复三次,试验结果如表 2 所示。

正交试验极差分析结果如表 3 和表 4 所示。

从表 3 可以看出:对多菌灵降解影响排列从大到小的因素依次为:时间>温度>功率>碱液浓度。

从表 4 可以看出:正交试验处理的最佳水平组合为 A2B1C3D2,即:功率 192 W,时间 1 min,温度 60℃,碱液浓度 0.1%。

正交试验方差分析结果如表 5 所示。

表 2 正交试验结果

处理号	功率/W	时间/min	温度/℃	碱液浓度/%	降解率/%
1	160	1	40	0.05	61.39±1.50
2	160	5	50	0.1	56.73±1.39
3	160	9	60	0.15	58.55±1.43
4	192	1	50	0.15	66.08±1.61
5	192	5	60	0.05	65.15±1.59
6	192	9	40	0.1	58.64±1.43
7	224	1	60	0.1	69.20±1.69
8	224	5	40	0.15	53.61±1.31
9	224	9	50	0.05	55.18±1.35

表 3 正交试验极差分析

因子/极值	极大值	极差 R	调整 R
A 功率	63.29	4.40	3.97
B 时间	65.56	8.10	7.30
C 温度	64.30	6.42	5.78
D 碱液浓度	61.52	2.11	1.90

表 4 正交试验水平分析

因子/均值	水平 1	水平 2	水平 3
A 功率	58.89	63.29	59.33
B 时间	65.56	58.50	57.46
C 温度	57.88	59.33	64.30
D 碱液浓度	60.57	61.52	59.41

表 5 正交试验方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p-值
功率	70.5584	2	35.2792	8.0406	0.0099
时间	233.0704	2	116.5352	26.5598	0.0002
温度	136.139	2	68.0695	15.5139	0.0012
碱液浓度	13.3772	2	6.6886	1.5244	0.2691
误差	39.489	9	4.3877		

从表 5 可以看出:各因素影响大小依次为:时间>温度>功率>碱液浓度,与方差分析结果一

致;p-值显著性表明,功率、时间及温度因素对多菌灵降解均有极显著性影响( $p < 0.01$ ),而碱

液浓度对多菌灵的影响则不显著。

结合极差和方差试验结果分析,苹果幼果中多菌灵降解的最佳水平组合为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即:功率 192 W,时间 1 min,温度 60℃,碱液浓度 0.1%。经实验验证,在该处理条件下,苹果幼果

中的多菌灵的降解率可达 70.58%。

### 2.9 超声处理对幼果多酚含量的影响

苹果幼果超声处理和未经超声处理的多酚测定结果如表 6 所示。

表 6 超声处理与未处理的苹果幼果多酚含量比较

超声处理	未超声处理	RSD/%
0.458、0.464、0.459	0.461、0.463、0.460	0.3978

从表 6 可以看出:超声碱液处理对苹果幼果中的总多酚含量几乎没有影响。

## 3 结论

利用超声辅助碱液降解技术可以成功降解苹果幼果中 70% 以上的多菌灵,从而为苹果幼果资源的利用扫除障碍;同时该技术与其它农残降解技术相比,具有成本低、操作简单、时间短、降解率高等优点。

### 参 考 文 献:

[1] 孙平平,王文辉.世界苹果、葡萄和梨产量、市场及贸易情况(2015 年 12 月)[J],中国果树,2016,(03):94-100.

[2] Lijun Sun, Yurong Guo, Chengcheng Fu, et al. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples[J]. Food Chemistry, 2013, (136):1 022-1 029.

[3] Hu-Zhe Z, Young- II K, Shin-Kyo Chung. A profile of phycochemical and antioxidant changes during fruit growth for the utilisation of unripe apples[J]. Food Chemistry. 2012,131:106-110.

[4] 张江红.酚类物质对苹果的化感作用及重茬障碍影响机理的研究[D].泰安:山东农业大学博士学位论文,2005:9-11.

[5] 祁国振,毛志泉,胡秀娜,等.苹果根际自毒物质降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[J],微生物学通报,2016,43(02):330-342.

[6] 武丽辉.美国驳回了巴西 BCEA 关于橙汁中检出多菌灵事件的请求[J].农业科学与管理,2012,33(04):18.

[7] 张海英.土壤中多菌灵污染及修复技术研究现状[J].科技创新导报,2016,(21):60-61.

[8] 于功昌.多菌灵对雄性大鼠生殖毒性作用的研究[D].济南:山东省医学科学院,2009:10-18.

[9] 于功昌,王筱芬,刘衍忠,等.苯并咪唑对大鼠生精功能和睾酮活力的影响[J].环境与健康杂志,

2008,(08):711-713.

[10] Dikic D, Landeka I, Knezevic F, et al. Carbendazim impends hepatic necrosis when combined with imazalil or cypermethrin[J]. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2012, 110(05):433-440.

[11] Amina F, Hala E, Reda E, et al. Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice [J]. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2011, 92 (02): 122-130.

[12] 郭佳婧,李高阳,刘咏红.化学氧化剂降解果蔬农残研究进展[J],食品与机械,2014,30(03):249-252.

[13] 谢云霞,廖涛,熊光权,等.<sup>60</sup>Coγ射线辐照降解多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的研究[J],湖北农业科学,2014,53(21):5 234-5 237.

[14] 朱玲凤,李高阳,张菊花,等.高浓度臭氧水对柑橘多菌灵的降解及其精油品质的影响[J],食品与机械,2014,30(03):49-53.

[15] 张迹,纪俊宾,于晗,等.多菌灵微生物降解研究进展[J],生物技术世界,2016,(03):13-14.

[16] 裴亮,张体彬,赵楠,等.有机磷农药降解方法及应用研究新进展[J],2011,29(增刊):273-277.

[17] 朱进,朱昌平,王斌,等.超声降解有机磷农药的研究进展与比较分析[J],声学技术,2013,32(06):481-485.

[18] 雷磊,王欣,殷晓梅. TiO<sub>2</sub>—超声协同降解水中乙酰甲胺磷的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(01): 39-43.

[19] Slimane M, Oualid H, Yacine R, et al. Effects of ultrasound frequency and acoustic amplitude on the size of sonochemically active bubbles-Theoretical study [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 20(03):815-819.

[20] 李雪,李梅,陈春丽,等.多菌灵在新疆葡萄中的最终残留分析[J].湖北农业科学,2015,54(04):957-959.

(下转第 11 页)