



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112098564 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(21) 申请号 202011104994.3

G01N 30/74 (2006.01)

(22) 申请日 2020.10.15

G01N 30/32 (2006.01)

(71) 申请人 江苏新河农用化工有限公司

G01N 30/34 (2006.01)

地址 221400 江苏省徐州市新沂经济开发区经九路55号

G01N 30/89 (2006.01)

(72) 发明人 王海波 杜杰 孙丽 王冠辉  
王晴

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

代理人 巩克栋

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/16 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)

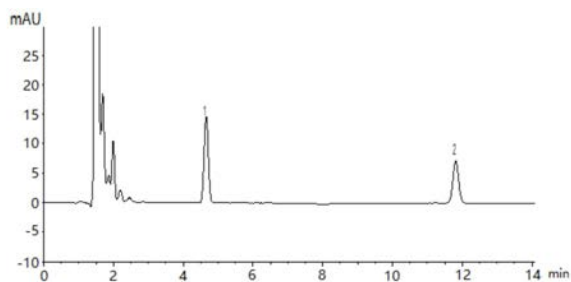
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,所述检测方法包括以下步骤:将六氯苯和十氯联苯标样配制成的标准工作溶液与百菌清试样配制成的待测样品溶液以水和乙腈为流动相采用C18反相色谱柱进行HPLC检测,根据检测结果经过计算得到待测样品中六氯苯和十氯联苯的含量。本发明提供的方法能够一次同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯,分离效果好、灵敏度高、准确度与精密度高。



1. 一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述检测方法包括以下步骤:将六氯苯和十氯联苯标样配制成的标准工作溶液与百菌清试样配制成的待测样品溶液以水和乙腈为流动相采用C18反相色谱柱进行HPLC检测,根据检测结果经过计算得到待测样品中六氯苯和十氯联苯的含量。

2. 根据权利要求1所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述标准工作溶液的制备方法包括以下步骤:将六氯苯和十氯联苯标样置于容量瓶中,加入溶剂震荡溶解并定容,得到标准储备溶液;将标准储备溶液稀释,得到标准工作溶液;

优选地,所述标准储备溶液中六氯苯与十氯联苯的质量比为1:0.8-1:1.2;

优选地,所述溶剂包括丙酮。

3. 根据权利要求2所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述标准储备溶液的浓度为0.15-0.25mg/mL;

优选地,所述将标准储备溶液稀释的稀释倍数为500-2000。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述待测样品溶液的制备方法包括以下步骤:将百菌清试样用溶剂稀释,在超声下震荡溶解,冷却得到所述待测样品溶液;

优选地,所述溶剂包括丙酮。

5. 根据权利要求4所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述超声的频率为35-40kHz;

优选地,所述超声的时间为6-10min;

优选地,所述冷却至温度为20-30°C;

优选地,所述百菌清试样用丙酮稀释的稀释倍数为8-12;

优选地,所述待测样品溶液的浓度为9-15mg/mL。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述C18反相色谱柱的规格为150×4.6mm,填料粒径为5μm;

优选地,所述C18反相色谱柱的柱温为30-40°C。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述HPLC检测中,检测波长为212-220nm。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述HPLC检测中,柱流速为0.8-1.2mL/min;

优选地,所述HPLC检测中,进样量为10-20μL。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述流动相中水与乙腈的初始体积比为(7-9):(91-93)。

10. 根据权利要求1-6中任一项所述的同時检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其特征在于,所述HPLC检测采用梯度洗脱,所述梯度洗脱按以下程序进行:第0-5min时,流动相中水的体积占比为8%,乙腈的体积占比为92%;第5min时流动相中水的体积占比按8%/min的速度下降,乙腈的体积占比按8%/min的速度上升,至第6min时流动相为纯乙腈,持续至第12min;第12min时流动相中水的体积占比按8%/min的速度上升,乙腈的体积占比按8%/min的速度下降,至第13min时流动相中水的体积占比为8%,乙腈的体积

占比为92%，持续至第16min。

## 一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于分析化学领域,具体涉及一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,尤其涉及一种高灵敏度的同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法。

### 背景技术

[0002] 百菌清,化学名称为四氯间苯二甲腈,是一种高效、低毒的广谱、保护性杀菌剂,广泛用于果树、蔬菜上锈病、炭疽病、白粉病、霜霉病的防治。六氯苯、十氯联苯是百菌清原药生产过程中的副产杂质,由于六氯苯和十氯联苯对人体有害,在自然环境中难以降解,易于在生物体内和环境中积累。目前百菌清产品中六氯苯和十氯联苯的分析方法国内外也有报道,其中报道较多的方法是对百菌清中六氯苯或十氯联苯进行单独分析的液相色谱法,对六氯苯和十氯联苯两种杂质同时进行分析的方法主要有FAO标准中的气相色谱质谱法和GB/T 9551-2017国家标准中的液相色谱分析方法。然而报道的方法中还存在许多不足,例如气相色谱质谱法检测灵敏度高、选择性及准确度高,但因其设备昂贵,分析成本高,在国内一般企业中难以普及使用;GB/T 9551-2017液相色谱法又因其检测灵敏度、选择性不是很理想,无法满足高纯度百菌清中痕量六氯苯、十氯联苯检控需要;分别测定百菌清产品中六氯苯或十氯联苯的单独分析方法,操作麻烦,分析效率低。

[0003] CN102680437A中公开了一种六氯苯的检测方法。其完成步骤如下:先使用紫外光照射受六氯苯污染的乙醇溶液,再使用荧光光谱仪测量六氯苯乙醇溶液中的六氯苯的荧光发射光谱强度,得到六氯苯的含量;所述的紫外光的波长范围为340~380nm,所述的紫外光的波长为360nm,所述的六氯苯乙醇溶液中的六氯苯的浓度为 $10^{-14}$ ~ $10^{-7}$ M,所述的六氯苯乙醇溶液中的六氯苯的浓度优选为 $1 \times 10^{-9}$ ~ $8 \times 10^{-9}$ M。该检测方法能对痕量六氯苯进行快速、高灵敏度的有效检测;其可广泛地应用于环境、医学、食品及生物样品中对六氯苯的快速痕量探测。但采用荧光光谱法检测,对于检测时效要求较高。

[0004] CN110579557A中公开了一种同时检测水中12种单环芳烃的HPLC分析检测方法,属于高效液相色谱分析技术领域。该方法首先制备氯苯、邻二氯苯、间二氯苯、对二氯苯、六氯苯、1,2,4-三氯苯、苯、甲苯、乙苯、硝基苯、2,4-二硝基甲苯、2,6-二硝基甲苯12种单环芳烃对照品标准溶液,然后将实际水样进行萃取待用,最后采用液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-PDA)检测12种单环芳烃的含量。该方法通过对淋洗液的选择,梯度淋洗条件、检测波长、进样量等进行优化,最终建立了适当的分析方法,各物质之间均能达到较好的分离,具有重现性好、准确度高、精密度高的显著优点,为水中单环芳烃的同时在线监测奠定了良好的基础,可有效地节约检测成本和时间。但该方法无法用于同时对六氯苯和十氯联苯的检测。

[0005] 邢红等采用Waters 2998高效液相色谱仪(配备Waters Symmetry C18不锈钢色谱柱),以甲醇-四氢呋喃-水为流动相,在217nm波长下对百菌清中六氯苯,十氯联苯含量进行测定。在0.05~2.0mg/L范围内,六氯苯,十氯联苯线性关系良好,平均回收率为98.5%和

97.9%，六氯苯的相对标准偏差为3.4%。该方法能快速、准确测定百菌清中六氯苯和十氯联苯的含量。但该方法存在漏检低含量六氯苯、十氯联苯的可能。(邢红,梅宝贵,黎娜.高效液相色谱法测定百菌清中六氯苯、十氯联苯[J].农药,2015,054(002):103-104.)

[0006] 目前对于六氯苯和十氯联苯的同时检测方法存在灵敏度、选择性不高的问题,因此,如何提供一种灵敏度高、选择性好的同时检测六氯苯和十氯联苯的检测方法,成为了亟待解决的问题。

## 发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,尤其提供一种高灵敏度的同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法。本发明提供的方法分析效率高、灵敏度高选择性好、精密度高、准确性高。

[0008] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 本发明提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的高效液相色谱(HPLC)检测方法,所述检测方法包括以下步骤:将六氯苯和十氯联苯标样配制成的标准工作溶液与百菌清试样配制成的待测样品溶液以水和乙腈为流动相采用C18反相色谱柱进行HPLC检测,根据检测结果经过计算得到待测样品中六氯苯和十氯联苯的含量。

[0010] 本发明提供的方法能够一次同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的含量,提高了分析效率;采用HPLC检测方法,能够减小检测成本。

[0011] 优选地,所述标准工作溶液的制备方法包括以下步骤:将六氯苯和十氯联苯标样置于容量瓶中,用溶剂定容,得到标准储备溶液;将标准储备溶液稀释,得到标准工作溶液。

[0012] 优选地,所述标准储备溶液中六氯苯与十氯联苯的质量比为1:0.8-1:1.2,例如1:0.8、1:0.85、1:0.9、1:0.95、1:1、1:1.05、1:1.1、1:1.15或1:1.2等,但并不仅限于所列举的比例,上述各比例范围内其他未列举的比例同样适用。

[0013] 优选地,所述溶剂包括丙酮。

[0014] 上述丙酮对百菌清及其杂质六氯苯、十氯联苯具有更好的溶解性,且对样品中六氯苯、十氯联苯测定无干扰,能提高检测的准确性与灵敏性。

[0015] 优选地,所述标准储备溶液的浓度为0.15-0.25mg/mL,例如0.15mg/mL、0.16mg/mL、0.17mg/mL、0.18mg/mL、0.19mg/mL、0.2mg/mL、0.21mg/mL、0.22mg/mL、0.23mg/mL、0.24mg/mL或0.25mg/mL等,但并不仅限于所列举的数值,上述各数值范围内其他未列举的数值同样适用。

[0016] 优选地,所述将标准储备溶液稀释的稀释倍数为500-2000,例如500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900或2000等,但并不仅限于所列举的数值,上述各数值范围内其他未列举的数值同样适用。

[0017] 上述特定稀释倍数能将标准储备溶液稀释成六氯苯和十氯联苯含量接近所述待测样品溶液中六氯苯和十氯联苯含量的标准工作溶液,使得检测结果更加准确。

[0018] 优选地,所述待测样品溶液的制备方法包括以下步骤:将百菌清试样用溶剂稀释,在超声下震荡溶解,冷却得到所述待测样品溶液。

[0019] 优选地,所述溶剂包括丙酮。

[0020] 上述丙酮对百菌清以及杂质组分具有更好的溶解性,能提高检测结果的灵敏度。

[0021] 优选地,所述超声的频率为35-40kHz。

[0022] 优选地,所述超声的时间为6-10min。

[0023] 优选地,所述冷却至温度为20-30℃。

[0024] 优选地,所述百菌清试样用丙酮稀释的稀释倍数为8-12。

[0025] 其中,频率可以是35kHz、35.5kHz、36kHz、36.5kHz、37kHz、37.5kHz、38kHz、38.5kHz、39kHz、39.5kHz或40kHz等,时间可以是6min、6.5min、7min、7.5min、8min、8.5min、9min、9.5min或10min等,温度可以是20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃或30℃等,稀释倍数可以是8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5或12等,但并不仅限于所列举的数值,上述各数值范围内其他未列举的数值同样适用。

[0026] 上述特定参数的组合可以准确制备试样溶液,提高检测结果的准确性。

[0027] 优选地,所述待测样品溶液的浓度为9-15mg/mL,例如9mg/mL、10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL或15mg/mL等,但并不仅限于所列举的数值,上述各数值范围内其他未列举的数值同样适用。

[0028] 优选地,所述C18反相色谱柱的规格为150×4.6mm,填料粒径为5μm。

[0029] 优选地,所述C18反相色谱柱的柱温为30-40℃。

[0030] 优选地,所述HPLC检测中,检测波长为212-220nm。

[0031] 优选地,所述HPLC检测中,柱流速为0.8-1.2mL/min。

[0032] 优选地,所述HPLC检测中,进样量为10-20μL。

[0033] 其中,柱温可以是30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃或40℃等,检测波长可以是212nm、213nm、214nm、215nm、216nm、217nm、218nm、219nm或220nm等,流速可以是0.8mL/min、0.85mL/min、0.9mL/min、0.95mL/min、1mL/min、1.05mL/min、1.1mL/min、1.15mL/min或1.2mL/min等,进样量可以是10μL、11μL、12μL、13μL、14μL、15μL、16μL、17μL、18μL、19μL或20μL等,但并不仅限于所列举的数值,上述各数值范围内其他未列举的数值同样适用。

[0034] 优选地,所述流动相中水与乙腈的初始体积比为(7-9):(91-93),例如7:93、7.5:92.5、8:92、8.5:91.5或9:91等,但并不仅限于所列举的数值,上述各数值范围内其他未列举的数值同样适用。

[0035] 上述特定参数的流动相体积比能够将待测样品溶液中六氯苯、十氯联苯与其它干扰物质有效分离的同时并缩短分析时间,提高了检测的精密度、准确度。

[0036] 作为本发明优选的技术方案,所述HPLC检测采用梯度洗脱,所述梯度洗脱按以下程序进行:第0-5min时,流动相中水的体积占比为8%,乙腈的体积占比为92%;第5min时流动相中水的体积占比按8%/min的速度下降,乙腈的体积占比按8%/min的速度上升,至第6min时流动相为纯乙腈,持续至第12min;第12min时流动相中水的体积占比按8%/min的速度上升,乙腈的体积占比按8%/min的速度下降,至第13min时流动相中水的体积占比为8%,乙腈的体积占比为92%,持续至第16min。

[0037]

时间 (min)	水 (%)	乙腈 (%)
0	8	92
5	8	92
6	0	100

12	0	100
13	8	92
16	8	92

[0038] 采用上述梯度洗脱程序能够将待测样品溶液中六氯苯、十氯联苯与其它干扰物质有效分离的同时并缩短分析时间,提高检测的精密度、准确度和灵敏度。

[0039] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0040] 本发明通过采用梯度洗脱并优化了HPLC检测的参数,使得本发明提供的同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法具有分离效果好,精密度高,六氯苯含量的标准偏差范围达到0.21mg/kg以下,变异系数达到2.5%以下,十氯联苯含量的标准偏差范围达到0.16mg/kg以下,变异系数达到3.3%以下;准确性高,六氯苯标准品的平均回收率达到100.8%,十氯联苯标准品的平均回收率达到99.8%;灵敏度高,六氯苯的方法检出限达到0.003 $\mu$ g/ml,方法定量限达到0.006 $\mu$ g/ml,十氯联苯的方法检出限达到0.005 $\mu$ g/ml,方法定量限达到0.010 $\mu$ g/ml;并且同时对六氯苯和十氯联苯检测,提高了检测效率。

### 附图说明

[0041] 图1是实施例1中第一次标准工作溶液的HPLC图,其中1-六氯苯,2-十氯联苯;

[0042] 图2是实施例1中第一次待测样品溶液的HPLC图,其中1-六氯苯,2-十氯联苯;

[0043] 图3是实施例1中第二次待测样品溶液的HPLC图,其中1-六氯苯,2-十氯联苯;

[0044] 图4是实施例1中第二次标准工作溶液的HPLC图,其中1-六氯苯,2-十氯联苯;

[0045] 图5是六氯苯标准曲线图;

[0046] 图6是十氯联苯标准曲线图。

### 具体实施方式

[0047] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0048] 以下实施例中,液相色谱仪为Agilent 1260液相色谱仪;

[0049] 色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C18柱,规格为150 $\times$ 4.6mm,填料粒径5 $\mu$ m;

[0050] 天平购自于METTLER TOLEDO,型号为ME204/02;

[0051] 六氯苯标样购自于Dr.Ehrenstorfer Gmbh,质量分数为99.9%;

[0052] 十氯联苯标样购自于Dr.Ehrenstorfer Gmbh,质量分数为98.7%;

[0053] 百菌清样品均来自于江苏新河农用化工有限公司,型号为98.5%百菌清原药;

[0054] 其它材料和试剂,如无特殊说明均可从商业途径获得。

[0055] 标准工作溶液的制备:分别称取0.01g(精确至0.0001g)六氯苯标样和0.01g(精确至0.0001g)十氯联苯标样置于50mL容量瓶中,加丙酮振荡使之溶解,用丙酮稀释至刻度,摇匀,得到标准储备溶液;用移液管移取标准储备溶液2.0mL于50mL容量瓶中,用丙酮稀释至刻度,摇匀,得到标准中间稀释液;用移液管移取2.0mL中间稀释液于50mL容量瓶中,用丙酮稀释至刻度,摇匀,得到标准工作液,备用。

[0056] 待测样品溶液的制备:称取0.1g(精确至0.0001g)的百菌清样品,置于一具塞玻璃瓶中,用移液管加入10mL丙酮,在37kHz的超声波中震荡10min使之溶解,冷却至25 $^{\circ}$ C,摇匀

备用。

[0057] 实施例1

[0058] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中柱温为35℃,检测波长为216nm,流速为1.0mL/min,进样量为20μL,以水和乙腈为流动相,采用梯度洗脱,梯度洗脱程序如表1:

[0059] 表1梯度洗脱程序

	时间 (分钟)	流动相水(%)	流动相乙腈(%)
	0.00	8.0	92.0
	5.00	8.0	92.0
[0060]	6.00	0.0	100.0
	12.00	0.0	100.0
	13.00	8.0	92.0
[0061]	16.00	8.0	92.0

[0062] 在上述色谱操作条件下,待仪器基线稳定后,连续注入数针标准工作溶液,直至相邻两针六氯苯(十氯联苯)峰面积相对变化小于10%后,注入待测样品溶液,标准工作溶液与待测样品溶液各进样两次,按照标准工作溶液,待测样品溶液,待测样品溶液,标准工作溶液的顺序进行进样测定,得到百菌清中各杂质气相色谱图。图1-图4分别为第一次标准工作溶液、第一次待测样品溶液、第二次待测样品溶液、第二次标准工作溶液的HPLC图,其中1-六氯苯,2-十氯联苯。

[0063] 实施例2

[0064] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中除初始流动相水为7%,乙腈为93%外,其余步骤皆同实施例1。

[0065] 实施例3

[0066] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中除初始流动相水为9%,乙腈为91%外,其余步骤皆同实施例1。

[0067] 实施例4

[0068] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中除流速为1.2mL/min外,其余步骤皆同实施例1。

[0069] 实施例5

[0070] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中除流速为0.8mL/min外,其余步骤皆同实施例1。

[0071] 实施例6

[0072] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中除柱温为40℃外,其余步骤皆同实施例1。

[0073] 实施例7

[0074] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中除检测波长为220nm外,其余步骤皆同实施例1。

[0075] 实施例8

[0076] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中除检测波长为213nm外,其余步骤皆同实施例1。

[0077] 实施例9

[0078] 本实施例提供了一种同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,其中除进样量为10 $\mu$ L外,其余步骤皆同实施例1。

[0079] 检测结果统计:

[0080] 将实施例1-9中的检测结果计算后得到待测样品溶液中六氯苯与十氯联苯的含量,其中计算公式为:

$$[0081] \quad \omega_1 = \frac{A_2 \times m_1 \times \omega}{A_1 \times m_2 \times n} \times 10000$$

[0082] 式中:

[0083]  $\omega_1$ ——百菌清样品中六氯苯(十氯联苯)质量分数,以mg/kg表示;

[0084]  $A_2$ ——待测样品溶液中六氯苯(十氯联苯)峰面积的平均值;

[0085]  $m_1$ ——六氯苯(十氯联苯)标样的质量,g;

[0086]  $\omega$ ——六氯苯(十氯联苯)标样中六氯苯(十氯联苯)的质量分数,以%表示;

[0087]  $A_1$ ——标准工作溶液中六氯苯(十氯联苯)峰面积的平均值;

[0088]  $m_2$ ——百菌清样品的质量,g;

[0089]  $n$ ——稀释因子, $n=3125$ 。

[0090] 结果如表2:

[0091] 表2待测样品中六氯苯与十氯联苯的含量

组别	六氯苯			十氯联苯		
	测定结果 (mg/kg)	平均结果 (mg/kg)	标准偏差 (mg/kg)	测定结果 (mg/kg)	平均结果 (mg/kg)	标准偏差 (mg/kg)
实施例 1	14.9	14.6	0.2	10.3	10.0	0.2
实施例 2	14.6			10		
实施例 3	14.4			10.1		
实施例 4	14.8			10.2		
实施例 5	14.5			9.9		
实施例 6	14.8			9.9		
实施例 7	14.5			10.1		
实施例 8	14.8			9.8		
实施例 9	14.5			9.7		

[0093] 上表数据显示本发明提供的检测方法在一定范围内调整起始流动相比例、流速、柱温、检测波长、进样量时,对测定结果的影响程度符合要求,表明该方法耐用性良好。

[0094] 标准曲线绘制:

[0095] 制备六氯苯浓度分别为0.0125 $\mu$ g/mL、0.0218 $\mu$ g/mL、0.0623 $\mu$ g/mL、0.1247 $\mu$ g/mL、

0.3896 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.6534 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，十氯联苯浓度分别为0.0109 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.0191 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.0545 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1090 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3407 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5451 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的六氯苯和十氯联苯混合标准溶液，并按照实施例1中的色谱条件和步骤进样，测定峰面积，测定结果见表3、表4：

[0096] 表3六氯苯定量分析线性范围测定

[0097]	级别	1	2	3	4	5	6
	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.0125	0.0218	0.0623	0.1247	0.3896	0.6234
	峰面积A	2.1	7.1	20.3	40.3	125.6	201.3

[0098] 表4十氯联苯定量分析线性范围测定

[0099]	级别	1	2	3	4	5	6
	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.0109	0.0191	0.0545	0.1090	0.3407	0.5451
	峰面积A	2.6	4.6	13.2	26.4	82.4	132.6

[0100] 以标准溶液的浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制标准工作曲线，得到六氯苯回归方程为 $Y=322.9X+0.024$ ，相关系数 $R^2=1.0000$ ，线性相关图见图5，十氯联苯回归方程为 $Y=242.8X-0.025$ ，相关系数 $R^2=1.0000$ ，线性相关图见图6。

[0101] 精密度试验：

[0102] 准备3批不同六氯苯、十氯联苯含量的试样，按照上述制备样品溶液的方法及与实施例1中的色谱条件进样，测定峰面积，并根据上述标准曲线回归方程计算出试样中六氯苯、十氯联苯的含量，其结果见表5、表6：

[0103] 表5百菌清中六氯苯定量分析精密度测定结果

批号	测定次数	称样量 (mg)	六氯苯含量 (mg/kg)	平均值 (mg/kg)	标准偏差 (mg/kg)	变异系数 (%)
A	1	102.3	5.2	5.2	0.13	2.5
	2	105.0	5.3			
	3	102.1	5.1			
	4	102.2	5.0			
	5	101.3	5.3			
B	1	100.9	10.4	10.3	0.16	1.6
	2	100.2	10.5			
	3	100.6	10.2			
	4	105.4	10.1			
	5	102.3	10.2			
C	1	101.3	22.3	22.0	0.21	0.9
	2	103.2	21.8			
[0105]	3	102.3	21.8			
	4	101.5	21.9			
	5	102.2	22.0			

[0106] 表6百菌清中十氯联苯定量分析精密度测定结果

批号	测定次数	称样量 (mg)	六氯苯含量 (mg/kg)	平均值 (mg/kg)	标准偏差 (mg/kg)	变异系数 (%)
A	1	102.3	3.4	3.5	0.11	3.3
	2	105.0	3.5			
	3	102.1	3.5			
	4	102.2	3.6			
	5	101.3	3.7			
B	1	100.9	9.2	9.4	0.13	1.4
	2	100.2	9.3			
	3	100.6	9.5			
	4	105.4	9.4			
	5	102.3	9.5			
C	1	101.3	19.3	19.2	0.16	0.8
	2	103.2	19.0			
	3	102.3	19.1			
	4	101.5	19.2			
	5	102.2	18.9			

[0107] 表5、表6结果显示,检测六氯苯含量的标准偏差范围为0.13-0.21mg/kg,变异系数为0.9-2.5%;检测十氯联苯含量的标准偏差范围为0.11-0.16mg/kg,变异系数为0.8-3.3%,显示了本发明提供的检测方法精密度高。

[0109] 准确度试验:

[0110] 分别在已知六氯苯与十氯联苯含量的试样中加入不同水平的六氯苯与十氯联苯标准品,配成已知含量的样品,按照实施例1中的色谱条件和步骤进样,测定峰面积并计算其回收率,结果见表7、表8:

[0111] 表7六氯苯定量分析准确度测定结果

序号	未加标试样含量 ( $\mu\text{g}$ )	标准品加入量 ( $\mu\text{g}$ )	加标后测定值 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	0.314	0.218	0.533	100.5	100.8
2	0.322	0.623	0.962	102.7	
3	0.316	1.247	1.568	100.4	
4	0.315	3.896	4.205	99.8	

[0112] 表8十氯联苯定量分析准确度测定结果

序号	未加标试样 含量 ( $\mu\text{g}$ )	标准品加入量 ( $\mu\text{g}$ )	加标后测定值 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)
[0115] 1	0.000	0.191	0.188	98.4	99.8
2	0.000	0.545	0.547	100.4	
3	0.000	1.090	1.094	100.4	
4	0.000	3.407	3.404	99.9	

[0116] 表7、表8结果显示,加入六氯苯标准品的平均回收率为100.8%,加入十氯联苯标准品的平均回收率为99.8%,表明本发明提供的检测方法加测六氯苯、十氯联苯含量的准确度高。

[0117] 方法检出限与定量限测定:

[0118] 在空白试样中分别添加已知浓度的六氯苯、十氯联苯标准储备溶液,并按照实施例1中的色谱条件和步骤进行多次重复测定,测得峰面积,以3倍信噪比和10倍信噪比分别确定其方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ),结果见表9、表10:

[0119] 表9六氯苯定量分析方法检出限、定量限测定结果

序号	添加浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	测定次数	平均面积	变异系数%	信噪比
[0120] 1	0.003	10	1.0	5.0	3
2	0.006	10	2.1	3.0	10

[0121] 表10十氯联苯定量分析方法检出限、定量限测定结果

序号	添加浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	测定次数	平均面积	变异系数%	信噪比
[0122] 1	0.005	10	1.2	5.0	3
2	0.010	10	2.6	3.0	10

[0123] 表9、表10结果显示,百菌清试样中六氯苯的方法检出限为 $0.003\mu\text{g/ml}$ ,方法定量限为 $0.006\mu\text{g/ml}$ ,十氯联苯的方法检出限为 $0.005\mu\text{g/ml}$ ,方法定量限为 $0.010\mu\text{g/ml}$ ,说明本发明提供的检测方法具有高灵敏度。

[0124] 方法对比试验:

[0125] 分别使用实施例1中的色谱条件和步骤与FA0-2019气相色谱质谱 (GC-MSD) 分析方法对百菌清试样中不同水平的六氯苯、十氯联苯含量进行分析,分析结果见表11、表12:

[0126] 表11不同分析方法获得的六氯苯含量

批号	D	E	F	G	H
[0127] HPLC 法分析含量 (mg/kg)	2.3	5.5	10.2	15	30.1
GC-MSD 分析含量 (mg/kg)	2.4	5.7	10.4	14.8	30.5
绝对偏差 (mg/kg)	-0.1	-0.2	-0.2	+0.2	-0.4
相对偏差 (%)	-4.3	-3.6	1.9	+1.3	-1.3

[0128] 表12不同分析方法获得的十氯联苯含量

批号	D	E	F	G	H
[0129] HPLC 法分析含量 (mg/kg)	2.0	4.9	8.9	12.3	21.5
GC-MSD 分析含量 (mg/kg)	2.1	5.1	9.0	12.4	21.4
[0130] 绝对偏差 (mg/kg)	-0.1	-0.2	-0.1	0.1	+0.1
相对偏差 (%)	-4.9	4.0	1.1	0.8	0.5

[0131] 表11、表12结果显示,本发明提供的检测方法与FAO气相色谱质谱分析方法相比,六氯苯含量的相对偏差范围为1.3-4.3%,十氯联苯含量的相对偏差范围为在0.8-4.9%,显示出了高准确性。

[0132] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的同时检测百菌清中六氯苯和十氯联苯的HPLC检测方法,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

[0133] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0134] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可

能的组合方式不再另行说明。

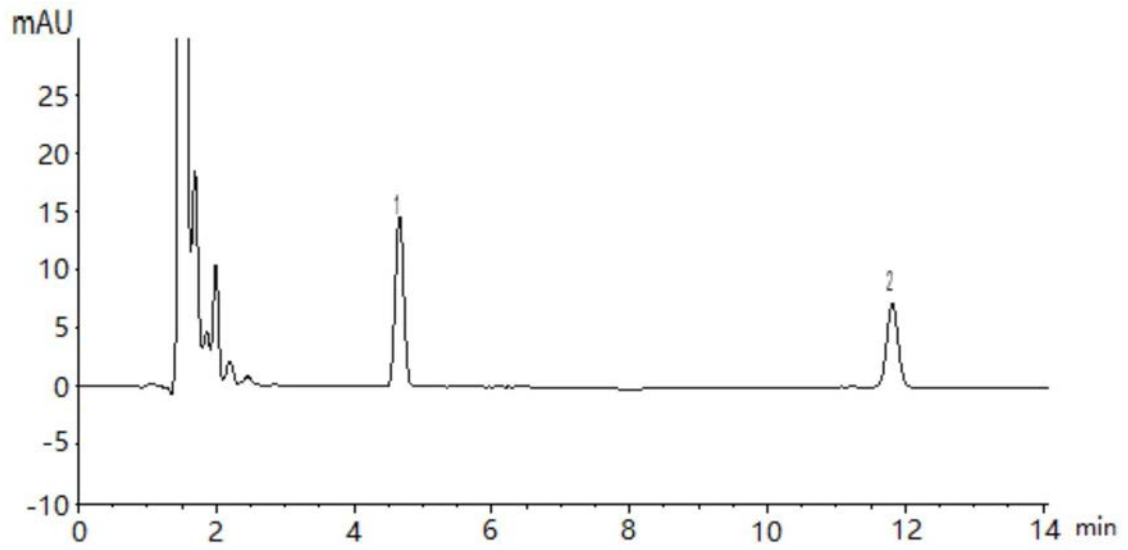


图1

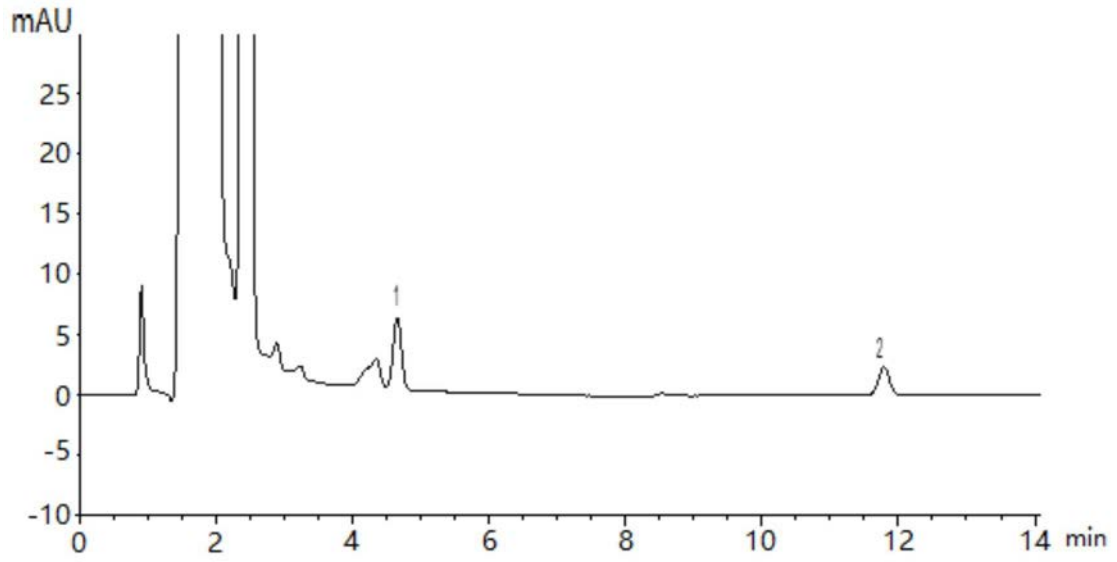


图2

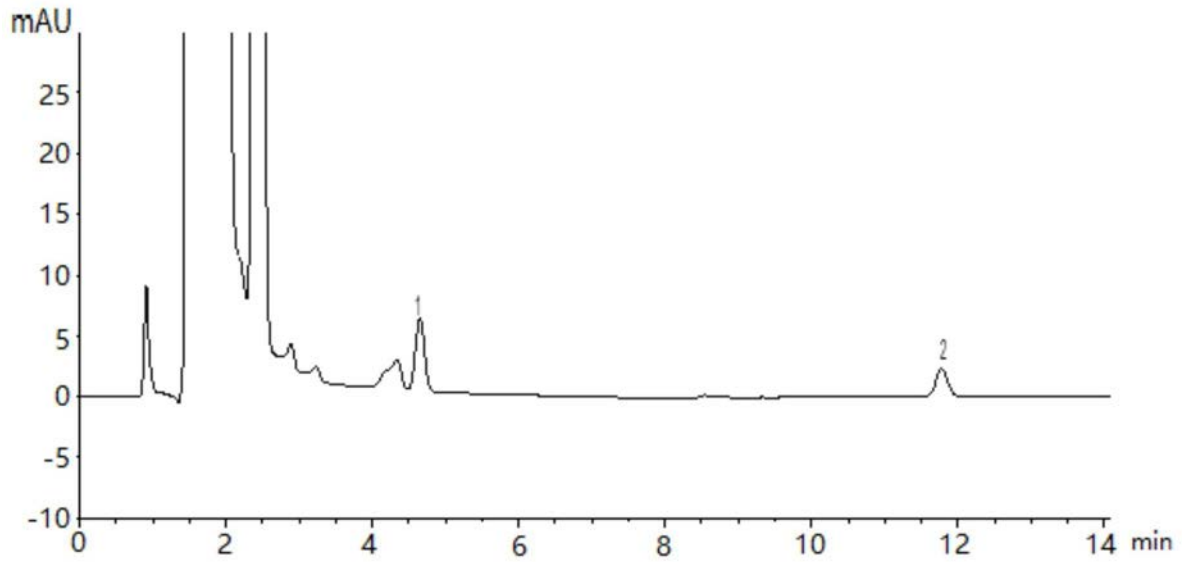


图3

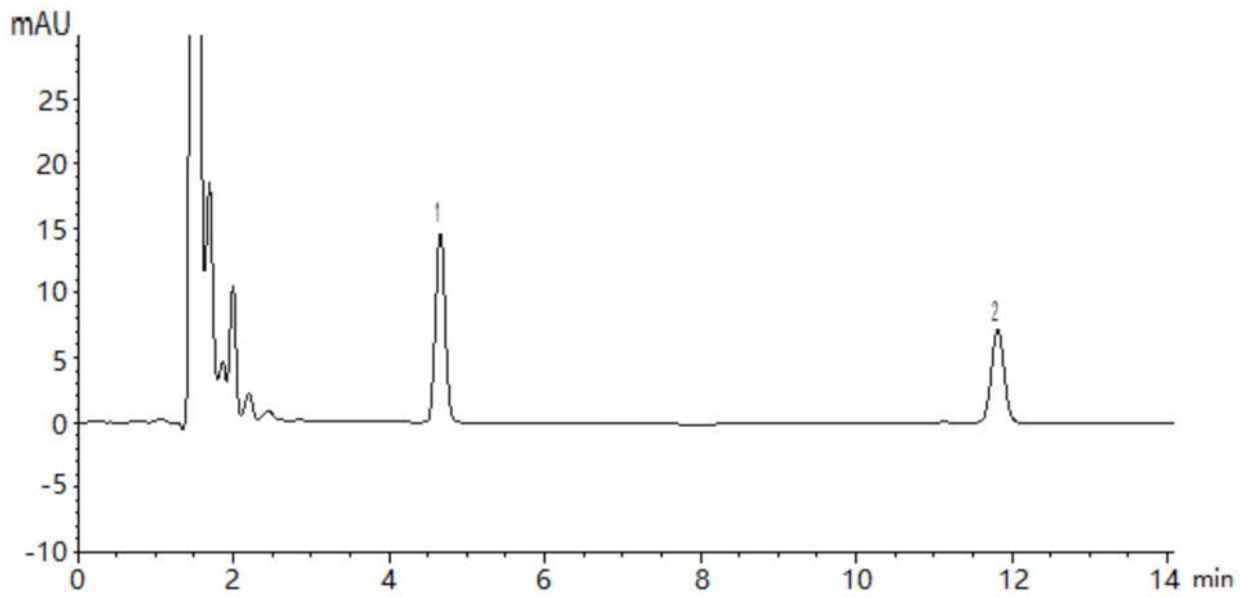


图4

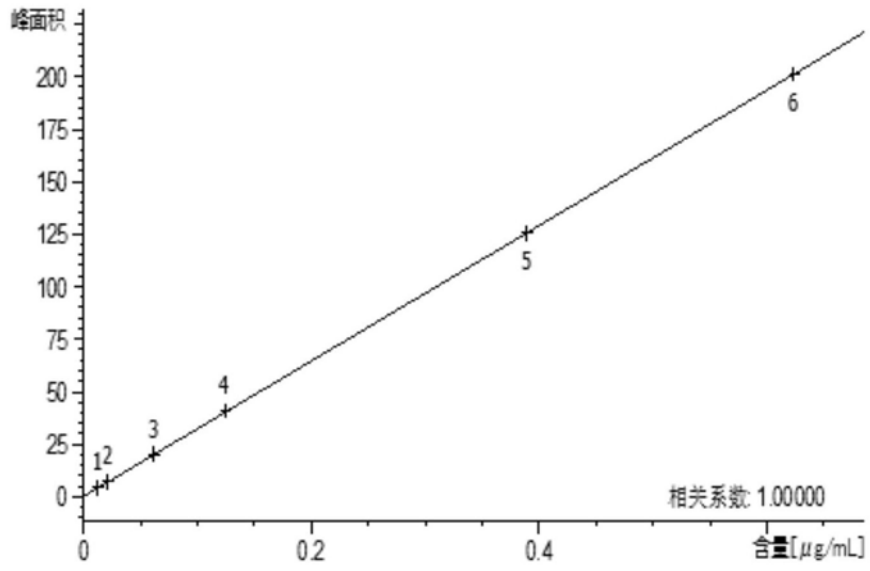


图5

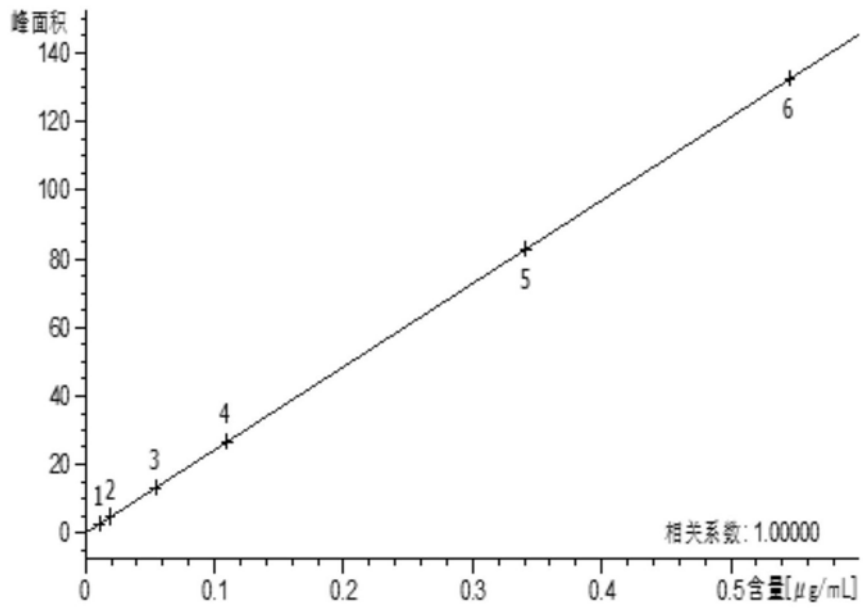


图6