

菠菜中阿维菌素液相色谱法探讨

刘小丽

(鹤壁市农产品检验检测中心, 河南 鹤壁 458030)

摘要: 本文讨论了用液相色谱法检测菠菜中阿维菌素时的一些问题, 这些问题对试验结果的回收率、稳定性、检出限、精密度会产生影响。针对优化过程, 对上述问题展开方法与结果研讨, 方法改进后, 提高了检测方法的准确性和精密度。

关键词: 菠菜;阿维菌素;液相色谱法

GB23200.19—2016《食品安全国家标准 水果和蔬菜中阿维菌素残留量的测定 液相色谱法》, 前处理复杂, 分析时间长, 且该方法在实际检测过程中出现一些问题, 如回收率低、检出限低、精密度差等问题, 本文分析了造成这些问题的原因, 并提出了有效解决办法。

1 材料与方

1.1 仪器

电子分析天平、振荡器、旋转蒸发器、氮吹仪、涡旋混合器、固相萃取柱 SPE C18、安捷伦 1260 高效液相色谱仪配紫外检测器。

1.2 试剂

丙酮(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、乙酸乙酯(色谱纯)

1.3 标准品

标准溶液由农业部环境保护科研监测所提供, 质量浓度均为 100 μ g/mL 阿维菌素标准溶液。阿维菌素标准工作液用甲醇稀释至 10.0 μ g/mL。

1.4 仪器工作条件

色谱柱: 安捷伦 ODS-C18 反相柱, 4.6 mm \times 125 mm; 流动相: 甲醇: 水 = (90+10,V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 245 nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

2 结果与分析

2.1 前处理条件优化

称取试样 20g 丙酮提取，浓缩后残渣太多；布氏漏斗抽滤，每个样品需要清洗布氏漏斗，增加清洗工作量且易样品交叉污染；蔬菜、水果含水量比较高，40 °C 水浴旋转蒸发至约 2 mL，浓缩到后面基本都是水。

1) 样品称样量及提取溶剂、提取方法的选择

采取了称取试样 20.0 g 和 10.0g，分别选择了乙腈、乙酸乙酯和丙酮三种提取溶剂。回收率与称样量没有直接关系，三种提取溶剂回收率分别为 56.9%、89.2%、93.8%，因此可选择称取试样 10.0g，丙酮作为提取剂。

参考有关阿维菌素的提取方法相关文献报道，分别采用了离心、高速匀浆、超声三种提取方式。根据实验结果最后选择选择了超声提取 30 min 后，于 4500r/min 条件下离心 5 min,待净化。

浓缩方法参考相关资料，分别比较了旋转蒸发和氮吹。根据实验结果，两种浓缩方法回收率分别为 79.4%、95.7%，氮吹回收率相对较高。

2) 净化过程中没有具体说明如何完全将浓缩提取液转入 SPE C18 柱。如果不润洗，回收率很低。本方法采取了用 6mL 丙酮/乙腈分 3 次润洗转入 SPE C18 柱，再用 5ml 的水淋洗，去掉淋洗液。最后用 5 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液，用氮气吹至近干。

2.2 样品制备和标样的添加

菠菜先切碎,再匀浆处理。在空白的菠菜中添加阿维菌素标准溶液,分别添加质量浓度至 0.005、0.01、0.1 mg/kg,每个浓度重复 6 次,待其平衡 1 小时后,进行样品的提取。

2.3 样品的提取、净化

准确称取菠菜样品 10.0g,加入 10 mL 丙酮溶液超声提取 30 min,4500 r/min 条件下离心 5 min。取 4 mL 上清液于 45°C 条件下氮吹浓缩至 2mL，用 6mL 色谱甲醇分 3 次润洗转入 SPE C18 柱，再用 5ml 的水淋洗，去掉淋洗液。最后用 5 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液，用氮气吹至近干。准确加入 1.0 mL 甲醇溶解残渣，涡旋振荡 1 min 后静置 30 min,吸取上清液过 0.22μm 滤膜过滤,于进样小瓶中保存,供液相色谱测定。

2.4 标准曲线

配制校准曲线：选择 10.0μg/mL 阿维菌素标准工作液，用甲醇做溶剂，分别配制 0.005、0.01、0.05、0.10 、0.20ug/ml 5 个浓度水平的标准工作溶液，配制完成后上机测定峰面积和保留时间。以峰面积为纵坐标，以进样浓度为横坐标，绘制标准曲线。标准曲线的相关系数为 0.9995 以上，符合《实验室质量控制规范

食品理化检测》(GB/T 27404-2008)标准要求。为加标色谱图农药残留量回收率判定提供了较好的依据。

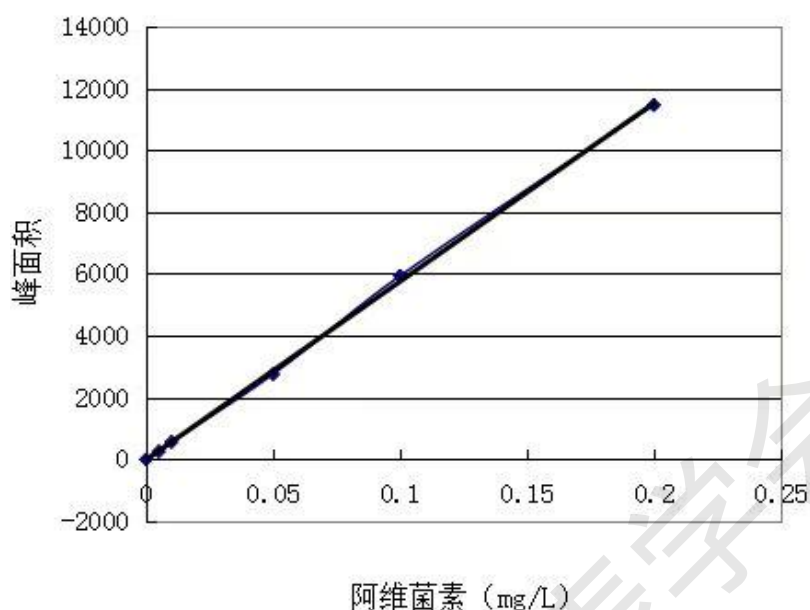


图1 阿维菌素标准曲线

2.5 方法的准确性、精密度和检出限

根据本试验检测方法结果表明,阿维菌素的保留时间为 5.32 min,峰形对称性良好。以外标法定量,阿维菌素峰面积(y)与质量-体积浓度(x)呈良好线性相关,线性回归方程为 $y = 57663x - 14.334$,相关系数(R^2)为 0.9995。

检出限指用某一方法可定性检测到样品中残留物的最小浓度,该水平信噪比一般为 3,阿维菌素检出限为 0.002 ng/ μ L,灵敏度高。

定量限指可以对基质中目标残留物进行准确定量测定的最低水平,在该水平下得到的回收率和精密度应满足分析的要求,添加标准溶液质量浓度得到的信噪比一般为 10,本试验添加回收率条件下,显示阿维菌素峰形及重现性较好且无杂质干扰,阿维菌素在菠菜中的定量限为 0.005 mg/kg,低于阿维菌素在菠菜中的最大残留限量。

阿维菌素在菠菜中的平均回收率为 93.8%~97.2%,相对标准偏差为 5.5%~8.0%,添加浓度包含定量限,最大残留限量值,添加浓度能覆盖本残留试验中所有样品最高残留量,且不同添加浓度均符合回收率要求,用回收率试验的相对标准偏差衡量检测方法的精密度,不同添加浓度对相对标准偏差均符合要求。

上述试验结果见表。

表 1 0.01mg/kg 添加量称样量、提取、浓缩方法的结果比较

方法	样品量 (g)	提取方法 及时间	浓缩方法	浓缩方法	测定值 w/(mg•kg-1)	回收率 /%
GB 232 00.19-2016	20	丙酮, 振荡 0.5 h 提取	40 °C水 浴旋转蒸发	不润洗旋蒸瓶	0.00473	47.3%
			40 °C水 浴旋转蒸发	润洗旋蒸瓶	0.00642	64.2%
方法 1	10	丙酮, 匀浆 2min 提取	40 °C水 浴旋转蒸发	不润洗旋蒸瓶	0.00554	55.4%
			45 °C氮吹	润洗旋蒸瓶	0.00742	74.2%
			45 °C氮吹	不润洗旋蒸瓶	0.00621	62.1%
方法 2	10	丙酮, 超声 30 min, 离心 5 min 提取	40 °C水 浴旋转蒸发	润洗旋蒸瓶	0.00794	79.4%
			40 °C水 浴旋转蒸发	不润洗旋蒸瓶	0.00715	71.5%
			45 °C氮吹	润洗旋蒸瓶	0.00957	95.7%
				不润洗旋蒸瓶	0.00884	88.4%

3 影响准确度与精密度的原因及解决方法

3.1 色谱柱

当色谱柱污染后, 峰面积会随着测定次数的增加而增加, 影响测定结果的 RSD 值。实验过程中要确保色谱柱的干净程度, 特别在进行比对时, 要用干净的色谱柱。

3.2 基质效应

同一种农药在不同蔬菜中有不同程度的基质效应, 为了准确定量, 理论上每种基质都需要制作对应的基质匹配标准曲线。为减少工作方法的工作量, 在不影响结果准确性的前提下, 选择一种有代表性的基质作为通用基质。

3.3 为保证数据准确, 在操作过程中还要注意以下几方面

1) 准确移取 4mL 上清液前, 用该液润洗三次移液管, 保证吸取刻度准确。

2) 氮吹时气流大了容易把液体吹出造成损失, 气流太小氮吹时间延长, 都会影响回收率。氮吹近干要求小烧杯内壁有潮湿的一层, 吹干后回收率小。氮吹过程中要用干净滤纸擦去针头上的水珠, 防止水珠落入瓶中氮吹不准确, 影响结果。

3) SPE C18 柱使用前用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化, 净化时小柱不能干, 当溶剂液面到达柱吸附层表面时, 立即倒入净化溶液。小柱干了不容易洗脱, 影响回收率。

4 结论

本方法称取试样 10 g, 采用超声提取, 净化浓缩处理后, 采用高效液相色谱法测定阿维菌素的检出限为 0.002 ng/ μ L, 定量限为 0.005 mg/kg。样品添加质量浓度 0.005、0.01、0.1 mg/kg, 每个浓度重复 6 次, 添加回收率为 92.5%~96.7%, 相对标准偏差小于 7.2%。此方法实验步骤操作简单, 灵敏度高, 经添加回收率实验表明得出的回收率、重复性均满足农药残留分析的要求, 适用于水果、蔬菜中阿维菌素的批量检测。

参考文献:

- [1] 廉慧锋, 宋洁, 张文娟, & 宋欢. 食品中阿维菌素类药物残留检测方法研究进展. 山西农业科学, 2011, 039(008), 918-921.
- [2] 罗晓琴. 阿维菌素类药物残留检测方法的研究进展. 现代农业科技 2009. (15), 2, 14-18.
- [3] 凌芬娜. 关于食品中阿维菌素类药物残留检测方法研究进展[J]. 中国科技博览, 2014(33):1-9
- [4] 冯瑜, 盛旋, 郑屏, 等. 阿维菌素类药物残留检测方法研究进展[J]. 安徽化工, 2008, 34(1):44-48.
- [5] 熊巍, 陶晓秋, 张海燕. 环境和食品中阿维菌素类药物残留量检测方法研究进展[J]. 中国农学通报, 2021, 37(30):10-19.
- [6] 何继红. 阿维菌素类药物多残留分析方法的研究. 中国农业大学, 2005.
- [7] 文豪, 周绪正, 李冰, 等. 阿维菌素类药物残留检测的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(11):3-10.