

# 菠菜中阿维菌素液相色谱法探讨

刘小丽, 张艳丽, 王丽娟, 王风英, 张斌

(鹤壁市产品质量检验检测中心, 河南鹤壁市 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 材料与方法

### 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 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 $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

## 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  $^{\circ}\text{C}$  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) 样品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

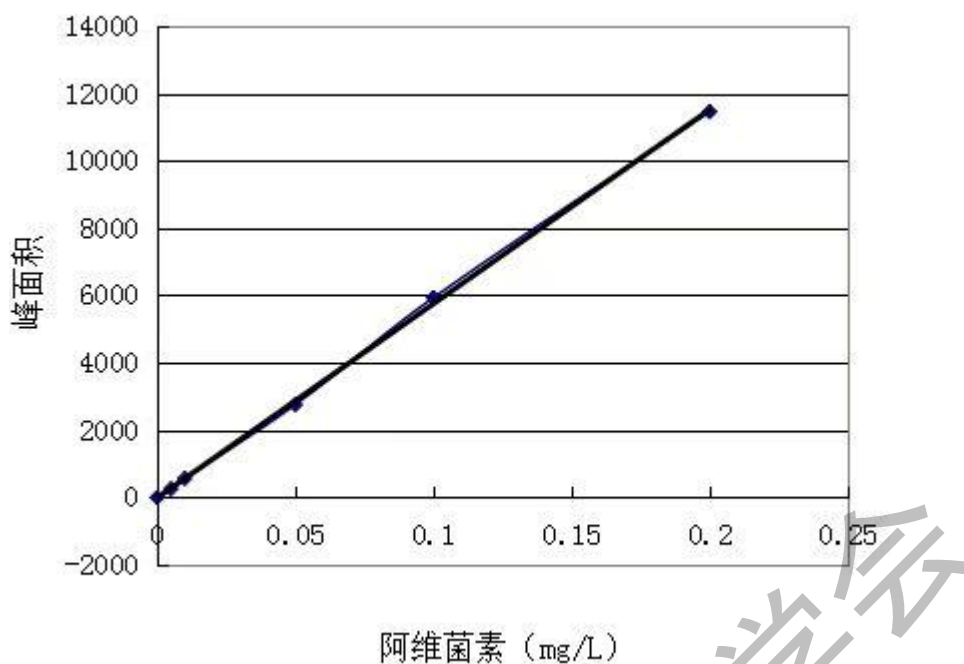
菠菜先切碎, 再匀浆处理。在空白的菠菜中添加阿维菌素标准溶液, 分别添加质量浓度至 0.005、0.01、0.1 mg/kg, 每个浓度重复 6 次, 待其平衡 1 小时后, 进行样品的提取。

## 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 0.22 $\mu$ m 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 10.0 $\mu$ g/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、0.20 $\mu$ g/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：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<sup>2</sup>)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/μL,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： 0.01mg/kg 添加量称样量、提取、浓缩方法的结果比

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 00.19-2 016	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	润洗旋蒸瓶	0.00642	64.2%
方法 1	10	丙酮, 匀浆 2min 提取	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%
			40 °C水浴旋	润洗旋蒸瓶	0.00794	79.4%
方法 2	10	丙酮, 超声 30 min, 离心	转蒸发	不润洗旋蒸瓶	0.00715	71.5%
		5 min 提取	45°C氮吹	润洗旋蒸瓶	0.00957	95.7%
			45°C氮吹	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潮的一层, 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/ $\mu$ 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] GB 23200.19—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》
- [2] GB/T 27404-2008 《实验室质量控制规范 食品理化检测》
- [3] 廉慧锋, 宋洁, 张文娟, & 宋欢. (2011). 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, 039(008), 918-921.
- [4] 罗晓琴. (2009). 阿维菌素类药物残留检测方法的研究进展. 现代农业科技(15), 2.
- [5] 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.
- [6] 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):4.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.