

# 固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定蔬菜中阿维菌素的残留量

张元\*, 谷岩, 贾宏新

(辽宁省食品检验检测院, 沈阳 110015)

**摘要: 目的** 建立固相萃取—高效液相色谱法-紫外检测法测定蔬菜中阿维菌素残留量的方法。**方法** 选取本地区市售的 6 种蔬菜样品, 经乙酸乙酯提取, 经固相萃取柱净化后用甲醇定容。在  $C_{18}$  色谱柱上进行分离, 以甲醇-水(9: 1, 体积比)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 245 nm。**结果** 在 0.05 ~ 1.00  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内, 方法线性关系良好,  $r^2$  值为 0.9999, 定量限为 0.01 mg/kg。平均回收率为 94.0% ~ 98.0%, 相对标准偏差不超过 6%( $n=6$ )。**结论** 本方法前处理过程简便高效, 样品检出限低, 灵敏度较高, 适用于蔬菜中阿维菌素残留量的检测。

**关键词:** 蔬菜; 阿维菌素; 固相萃取; 高效液相色谱-紫外检测法

## Determination of avermectin residue in vegetables by solid-phase extraction with ultraviolet detection coupled to high performance liquid chromatography

ZHANG Yuan\*, GU Yan, JIA Hong-Xin

(Liaoning Food Inspection and Testing Institute, Shenyang 110015, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of avermectin residue in vegetables using solid-phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). **Methods** Six kinds of samples collected from supermarket were extracted with ethylacetate, then the further cleanup was performed on a solid phase extraction cartridge and then fixed volume by methanol. The analysis was carried out by  $C_{18}$  reverse phase column, with the flow rate of the mobile phase (methanol-water,  $V/V=9:1$ ) 1.0 mL/min, the detection wavelength 245nm and the column temperature 40 °C. **Results** In the concentration range of 0.05-1.00  $\mu\text{g/mL}$ , the liner relationship of the method was good( $r^2=0.9999$ ) and the quantification limit was 0.01 mg/kg. The average recovery rate was 94.0%-98.0%, and the relative standard deviation (RSD) was less than 6%( $n=6$ ). **Conclusion** This method has simple pretreatment, good stability and reliability, good qualitative and quantitative analysis ability, which is suitable for detecting avermectin residue in vegetables.

**KEY WORDS:** vegetables; avermectin; solid-phase extraction; high performance liquid chromatography with ultraviolet detection

\*通讯作者: 张元, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: yuan3660@sina.com

\*Corresponding author: ZHANG Yuan, Deputy Chief Technician, Liaoning Food Inspection and Testing Institute, No.58, Changqing Road, Shenhe District, Shenyang 110015, China. E-mail: yuan3660@sina.com

## 1 引言

阿维菌素(ivermectin),又名除虫菌素、爱福丁、7051 杀虫素,是从土壤微生物中分离的天然产物,属于大环内酯双糖类化合物。阿维菌素是一种高毒杀虫剂,对螨类和昆虫具有胃毒和触杀作用,是当前农业害虫综合防治中的理想生物农药<sup>[1]</sup>。阿维菌素对于哺乳动物的繁殖能力存在潜在毒性,各国都建立了阿维菌素最高残留限量:加拿大规定阿维菌素在果类蔬菜等产品中最大残留量为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 欧盟规定在果蔬产品、谷物中阿维菌素最大残留量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 美国规定在柑橘中阿维菌素最大残留量为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[2-5]</sup>。我国制定了阿维菌素在绝大部分蔬菜水果中的最大残留限量是 10~50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[6]</sup>。近年来,随着阿维菌素在我国的广泛使用,为保证人们的蔬菜食用安全,需要建立快速、准确检测其在农产品中的残留的方法。

目前关于阿维菌素的测定方法有高效液相色谱荧光检测法(high performance liquid chromatography fluorescence detection, HPLC-FLD)<sup>[7-10]</sup>、高效液相色谱紫外检测法(high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, HPLC-UV)<sup>[11,12]</sup>和液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)<sup>[13-16]</sup>等, 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》<sup>[17]</sup>采用的是液相色谱法。其中高效液相色谱荧光检测法需要使用衍生剂,衍生化反应重现性较差,且实验过程中产生酸雾,对操作者及环境危害较大;液相色谱-质谱法准确、灵敏度高,但仪器昂贵,实验成本较高,不适合普遍推广。由于目前国内大多数食品检测机构和食品生产企业只配备高效液相色谱-紫外检测器,因此进一步探索高效液相色谱-紫外检测法测定阿维菌素的残留量更具有普遍适用性,及广阔的推广前景。国家标准虽然采用了液相色谱紫外检测法,但样品前处理过程较繁琐,提取过程中需要用到大量有机溶剂。

本研究建立了高效液相色谱-紫外检测法测定蔬菜中的阿维菌素,与国标相比,本方法在样品前处理过程中采用乙酸乙酯替代丙酮,降低了化学试剂对操作者和环境的伤害,试样提取步骤只需要用到离心机,操作更加简便快捷,适用于大批量蔬菜样品中阿维菌素残留量的检测,利于在基层食品安全监管领域进行推广,对测定蔬菜中阿维菌素的残留量具有一定的意义。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

有机白菜、卷心菜、番茄、胡萝卜、菠菜、菜豆(购

自于超市);阿维菌素标准品(纯度 95.6%, 中国农业部环境科学研究院);乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Thermo-Fisher 公司);氯化钠、乙酸乙酯(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);本实验用水均为超纯水(18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ),自制。

### 2.2 仪器

GM200 型粉碎机(德国 Retsch 公司);alliance2695 高效液相色谱仪,配备二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);TechMate C<sub>18</sub>-ST 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 北京 TechMate Technology 公司);DT512H 型超声波清洗器(德国 Bandelin 公司);Heraeus 高速离心机(美国 Thermo-Fisher 公司);AL204 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);Integral 15 型超纯水机(美国 Millipore 公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 样品提取与净化

##### (1)提取

蔬菜样品采用四分法取样,经粉碎机绞碎混合均匀后备用。称取 10.00 g 样品于 50 mL 具塞塑料离心管中,加入 3~4 g 氯化钠和 20 mL 乙酸乙酯,超声波提取 30 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液于浓缩瓶中,再用 10 mL 乙酸乙酯提取,合并提取液。在 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴下浓缩至 2~3 mL。

##### (2)净化

将固相萃取(solid-phase extraction,SPE)C<sub>18</sub> 柱依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化,将上述的浓缩提取液完全转入 SPE C<sub>18</sub> 柱,再用 3 mL 水、2 mL 40%(体积分数)乙腈淋洗,去掉淋洗液。最后用 5.00 mL 甲醇洗脱并挤干,收集洗脱液,用氮气吹至尽干。准确加入 1.0 mL 甲醇溶解残渣,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,滤液供高效液相色谱仪分析。外标法定量。

#### 2.3.2 色谱条件

色谱柱为 HPLC C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相 A 为甲醇,流动相 B 为水, A:B=9:1(V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 245 nm, 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 2.3.3 标准曲线的制备

准确称取阿维菌素标准品 0.005 g, 用甲醇溶解,转移至 50 mL 容量瓶中,并用甲醇定容至刻度线,得到 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备溶液。准确移取阿维菌素标准储备液 1.0 mL, 于 10 mL 容量瓶中,以甲醇稀释至刻度线,得到浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的阿维菌素标准中间液。分别吸取阿维菌素标准中间液 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mL, 于 10 mL 容量瓶中,以甲醇定容至刻度线,得到的阿维菌素标准使用溶液浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。注入液相色谱仪,按照 2.3.2 中的色谱条件进行测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),以浓度为横坐标(X),绘制标准曲线方程,计算相关系数( $r^2$ )。

### 3 结果与分析

#### 3.1 提取溶剂的优化

本研究通过分析阿维菌素的理化性质,并比较了农药残留检测中样品前处理通常用的甲醇、乙腈、丙酮及乙酸乙酯等溶剂的提取效果。实验发现,甲醇、乙腈、丙酮和乙酸乙酯对阿维菌素都有一定的提取效率。但由于甲醇提取物基质复杂,样品中水分和干扰物不容易净化干净,乙腈与水互溶,虽然在提取过程中加入了氯化钠进行盐析,使乙腈和水层分开,但乙腈中仍存在一些水分,影响 C<sub>18</sub> 柱的净化效果,而乙酸乙酯极性较大,提取能力更强,乙酸乙酯毒性较低,对操作者和环境的伤害较弱,因此,本研究选用乙酸乙酯作为提取溶剂。

#### 3.2 标准曲线及定量限

阿维菌素的标准溶液色谱图见图 1,可知阿维菌素峰的分度良好,峰形对称,空白无干扰。阿维菌素线性方程为  $Y = -1.27e^3X + 4.15e^5 (r^2 = 0.9999)$ 。结果表明阿维菌素在 0.05 ~ 1.00 μg/mL 范围内线性关系良好。准确称取阴性样品 10.05 g,向其中加入 1.0 μg/mL 标准工作液 0.1 mL,对样品进行处理,上机测定。得到目标物阿维菌素信噪比(S/N)为 15.60,得出本方法定量限 0.01 mg/kg,符合国标定量限要求。

#### 3.3 精密度和回收率

称取阴性样品 10 g(精确至 0.01 g)共 18 份,6 份为一

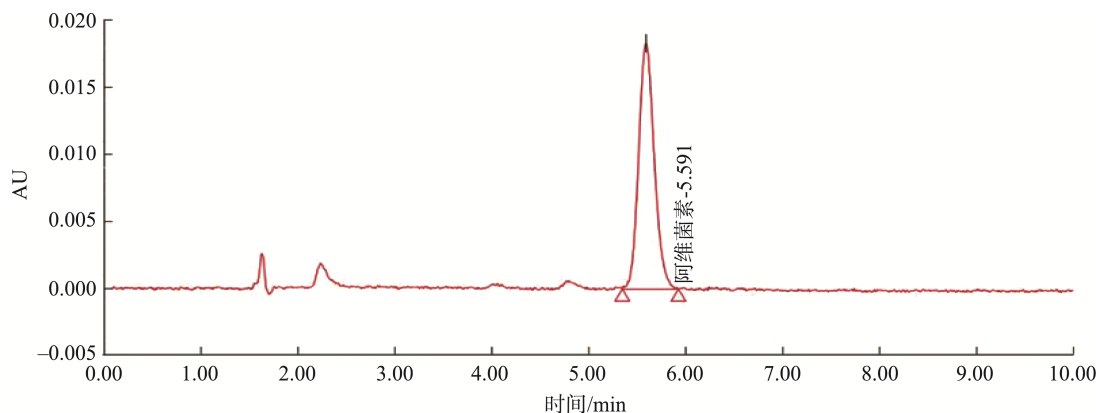


图 1 阿维菌素标准品的色谱图

Fig.1 Chromatogram of avermectin standard solution

表 2 实际样品的测定结果(n=6)

Table 2 Determination results of actual samples(n=6)

样品	测定值/(mg/kg)	加标量/(mg/kg)	测得总量/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
卷心菜	0.0179	0.05	0.0662	96.6	3.0
大白菜	0	0.05	0.0475	95.0	4.2
番茄	0.0131	0.05	0.0628	99.4	4.4
胡萝卜	0	0.05	0.0503	100.6	4.5
菠菜	0.0164	0.05	0.0649	97.0	4.1
菜豆	0.0175	0.05	0.0654	95.8	3.9

组,分别加入 1.0 μg/mL 阿维菌素标准溶液 0.1、0.2、1.0 mL,其余操作同 2.3.1,进行含量测定。方法的回收率与相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)见表 1。如表 1 所示,阿维菌素在样品中 3 个水平的添加回收率测定结果在 94.0% ~ 98.0%,回收率满足实验室质量控制规范食品理化检验的要求。测定结果的相对标准偏差 RSD 为 3.7% ~ 6.0%,表明方法具有良好的重复性。

表 1 方法回收率与相对标准偏差(n=6)

Table 1 Recovery rates and RSDs of the method(n=6)

加标量/μg	平均回收率/%	RSD/%
0.1	98.0	4.1
0.2	98.0	6.0
1.0	94.0	3.7

#### 3.4 实际样品分析

对本地市场随机抽取的 6 种实际样品,按照本文建立的检测方法进行检测,得到实际样品中阿维菌素的含量,每种样品称取 10.00 g,进行加标回收实验,结果见表 2。由表 2 可知,所选 6 种蔬菜样品中阿维菌素含量范围 0 ~ 0.0179 mg/kg,符合国标的要求,说明这几种样品均具有较高的食用安全性。6 种样品中阿维菌素的回收率为 95.0% ~ 100.6%,RSD 为 3.0% ~ 4.5%,回收率和精密度均满足实验要求。

## 4 结论与讨论

本研究采用固相萃取—高效液相色谱法-紫外检测法测定蔬菜中阿维菌素的残留量。方法具有检出限低、操作简便快捷、方法灵敏度较高、利于推广等优点,为蔬菜食品中阿维菌素的监管提供了依据,对控制蔬菜中阿维菌素的摄入和暴露量,保障食品安全具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 李卫平. 阿维菌素的研究进展[J]. 中国药业, 2012, 21(19): 108–110.  
Li WP. Research progress of avermectin [J]. China Pharm, 2012, 21(19): 108–110.
- [2] 加拿大确定部分蔬菜中啉霉胺和阿维菌素的最大残留限量[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(5): 525.  
Canadian species identified in some vegetables maximum residue limits for amines and avermectins [J]. Chin J Food Hyg, 2018, 30(5): 525.
- [3] 谢显传, 张少华, 王东生, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定果蔬产品阿维菌素及其有毒代谢物的残留量[J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2254–2260.  
Xie XC, Zhang SH, Wang DS, *et al.* Determination of abamectin and its toxicological metabolite in vegetables and fruits by HPLC with pre-column fluorescent derivatization [J]. Sci Agric Sin, 2005, 38(11): 2254–2260.
- [4] 廖海玉, 杨仁斌, 徐浩然, 等. 20.8%阿维菌素-四螨嗪悬浮剂在柑橘和土壤中的残留动态[J]. 农药, 2010, 49(4): 268–272.  
Liao HY, Yang RB, Xu HR, *et al.* Residue dynamic of avermectin-clofentezine 20.8% SC in citrus and soil [J]. Agrochemicals, 2010, 49(4): 268–272.
- [5] 何红梅, 赵华, 张春荣, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水稻基质中阿维菌素残留量[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 140–144.  
He HM, Zhao H, Zhang CR, *et al.* Determination of abamectin residue in paddy rice by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(1): 140–144.
- [6] GB 2763-2014 食品安全国家标准食品中农药残留最大限量[S].  
GB 2763-2014 National food safety standard-Maximum pesticide residues in food [S].
- [7] 房艳, 高俊海, 肖进进. 在线柱前衍生-高效液相色谱-荧光检测法测定牛奶中乙酰氨基阿维菌素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5636–5641.  
Fang Y, Gao JH, Xiao JJ. Determination of eprinomectin residue in bovine milk by online pre-column derivatization-high performance liquid chromatography-fluorescence detection method [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(17): 5636–5641.
- [8] 胡晓楠, 郭文丽, 王云, 等. 高效液相色谱-荧光法同时检测水产中阿维菌素和伊维菌素[J]. 现代食品, 2019, (12): 164–166.  
Hu XN, Guo WL, Wang Y, *et al.* Simultaneous determination of abamectin and ivermectin in aquatic products by high performance liquid chromatography with fluorescence [J]. Mod Food, 2019, (12): 164–166.
- [9] 罗成玉, 查玉兵, 任俊华, 等. 液相色谱荧光检测法测定植物性食品中阿维菌素类药物[J]. 分析仪器, 2012, (3): 31–35.

Luo CY, Zha YB, Ren JH, *et al.* Determination of avermectins residues in plant derived food by HPLC [J]. Anal Instrum, 2012, (3): 31–35.

- [10] 赵莉, 谢显传, 占绣萍. 高效液相色谱-荧光法同时检测蔬菜中阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和伊维菌素的多残留量[J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3467–3472.  
Zhao L, Xie XC, Zhan XP. Multi-residues determination of abamectin, emamectin benzoate and ivermectin in vegetables by HPLC-FD [J]. Sci Agric Sin, 2010, 43(16): 3467–3472.
- [11] 张慧霞, 胡德禹, 卢平, 等. 高效液相色谱法测定大白菜中阿维菌素的残留[J]. 农药, 2010, 49(3): 204–205.  
Zhang HX, Hu DY, Lu P, *et al.* Determination of abamectin residue in cabbage by HPLC [J]. Agrochemicals, 2010, 49(3): 204–205.
- [12] 腾瑞菊, 王欢, 王雪梅, 等. 超声辅助分散液液微萃取-高效液相色谱法快速测定水中6种农药[J]. 分析化学, 2017, 45(2): 275–281.  
Teng RJ, Wang H, Wang XM, *et al.* Rapid determination of six pesticides in water samples using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2017, 45(2): 275–281.
- [13] Simon JH, Benjamin PYL, Rainer S, *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food [J]. Trac Trends Anal Chem, 2014, (59): 59–72.
- [14] 赵肖华, 曹赵云, 牟仁祥, 等. 液相色谱-串联质谱法测定蔬菜、水果中5种阿维菌素类药物残留量[J]. 分析测试学报, 2012, (10): 56–61.  
Zhao XH, Cao ZY, Mu RX, *et al.* Determination of 5 avermectin residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2012, (10): 56–61.
- [15] 刘永涛, 余琳雪, 王楦月, 等. 改良的 QuEChERS 结合高效液相色谱-串联质谱同时测定水产品中7种阿维菌素类药物残留[J]. 色谱, 2017, 35(12): 1276–1285.  
Liu YT, Yu LX, Wang ZY, *et al.* Simultaneous determination of seven avermectin residues in aquatic products by modified QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2017, 35(12): 1276–1285.
- [16] Campillo N, Vinas P, Ferez-Melgarejo G, *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization ion-trap tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr, 2013, (1282): 20–26.
- [17] 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[S].  
GB 23200.19-2016 National food safety standard-Determination of abamectin residue in fruits and vegetables- Liquid chromatography [S].

(责任编辑: 李磅礴)

### 作者简介



张元, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: yuan3660@sina.com