

高效液相色谱法测定小麦和大米中辛硫磷残留的快速前处理方法

刘飞翔, 王小梅, 吴文睿*, 方颂平, 蒲顺昌

(亳州学院生物与食品工程系, 亳州 236800)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)快速检测小麦和大米中辛硫磷残留的快速前处理方法。**方法** 采用单因素实验方法考察了提取溶剂乙腈-水的比例和漩涡振荡提取时间。以 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为分离色谱柱, 以乙腈-水(80:20, V:V)为流动相, 采用等度洗脱方式, 紫外检测波长为 280 nm。**结果** 最佳前处理条件为:乙腈-水的比例为 1:2 (V:V), 小麦和大米的振荡时间均为 8 min。小麦和大米中的辛硫磷在 0.02~5.0 mg/L 浓度范围内, 线性关系良好, 线性回归方程为 $Y=2.45 \times 10^4 X-5.88 \times 10^2$ ($r^2=0.9996$), 方法最低检出限为 0.002 mg/kg, 小麦的辛硫磷加标回收率为 80.4%~87.0%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.1%~1.8%; 大米的辛硫磷加标回收率为 80.4%~85.6%, RSD 为 1.3%~1.9%。**结论** 该方法具有处理快速省时, 操作简单, 结果准确等优点, 可满足对小麦和大米进行多批次快速检测的要求。

关键词: 辛硫磷; 前处理技术; 残留; 小麦; 大米

Rapid pretreatment for the determination of phoxim residues in wheat and rice by high performance liquid chromatography

LIU Fei-Xiang, WANG Xiao-Mei, WU Wen-Rui*, FANG Song-Ping, PU Shun-Chang

(School of Biological and Food Engineering, Bozhou College, Bozhou 236800, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid pretreatment method for the determination of phoxim residues in wheat and rice by high performance liquid chromatography. **Methods** The ratio of acetonitrile to water and the extraction time by eddy oscillation were investigated by single factor experiment. The chromatographic column was C₁₈ column (250 mm 4.6 mm, 5 m), the mobile phase was acetonitrile-water (80:20, V:V), and the UV detection wavelength was 280 nm. **Results** The optimum pretreatment conditions were as follows: the ratio of acetonitrile to water was 1:2 (V:V). The oscillation time of wheat and rice was 8 min. Phoxim residues in wheat and rice had good linear relationships in the range of 0.02-5.0 mg/L, the linear regression equation was $Y=2.45 \times 10^4 X-5.88 \times 10^2$ ($r^2=0.9996$), the minimum limit detection was 0.002 mg/kg, the recovery rates of phoxim in wheat were 80.4%-87.0%, with relative standard deviation (RSD) of 1.1%-1.8%, and the recovery rates of phoxim in rice were

基金项目: 安徽省校企合作实践教育基地项目(2017sxzx44)、安徽省大学生创新创业计划项目(2018129260015)

Fund: Supported by Anhui Practical Education Base for School-Enterprise Cooperation (2017sxzx44), and Anhui College Students Innovation and Entrepreneurship Plan (2018129260015)

***通讯作者:** 吴文睿, 高级工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。E-mail: 13355682105@163.com

***Corresponding author:** WU Wen-Rui, Senior Engineer, School of Biological and Food Engineering, Bozhou College, Bozhou 236800, China. E-mail: 13355682105@163.com

80.4%-85.6%, with RSD of 1.3%-1.9%. **Conclusion** This method has the advantages of fast processing, time saving, simple operation and accurate results, which can meet the requirements of rapid multi-batch detection of wheat and rice.

KEY WORDS: phoxim; pretreatment technology; residues; wheat; rice

1 引言

食品安全问题一直是近些年来人们高度关注的话题,人们也越来越倾向绿色有机食品,绿色食品的一个关键指标就是农药残留量。辛硫磷是一种高效低毒有机磷杀虫剂,因此成为世界上生产和销售最大的杀虫剂之一,也是取代目前我国大量生产和销售的呋喃丹、甲胺磷、对硫磷等高毒杀虫剂的骨干品种,从而被广泛用于农业和养殖业领域^[1,2]。但由于用户使用浓度偏高,或在农产品加工时导致辛硫磷富集浓缩,例如小麦面筋的制作会使小麦中的辛硫磷主要富集在小麦面筋中,从而导致产品辛硫磷残留的超标。目前我国农产品深加工企业越来越多,其在农产品原料的采购、加工过程以及最终成品出厂都需要对农药残留进行检测,因此开发出实时、快速、精确而且成本较低的辛硫磷检测技术具有重要的意义。

食品中辛硫磷的残留检测既需要快速有效的样品前处理技术,又需要高灵敏度的精密检测技术,二者相辅相成,缺一不可。目前植物性食品中辛硫磷农药残留量测定的国家标准,采用气相色谱法(gas chromatography, GC)对辛硫磷进行测定^[3]。但辛硫磷在高温下易分解,因此采用 GC 检测时,会造成部分辛硫磷的损失^[4-6]。质谱法具有检出限较低,重复性好灵敏度高的优势,并在辛硫磷的检测中取得了很好效果^[7-10],但质谱仪器价格昂贵,对于一些中小企业的大批量的检测不适用;目前在文献报道中,采用高效液相色谱检测较多,且针对不同样品分别采用了固相萃取、基质固相分散萃取、凝胶净化等前处理技术,以达到净化样品的目的,但其前处理过程均较复杂耗时,且个体差异、繁琐的手工操作容易引起误差,重要的是有机溶剂的大量使用会对人体和环境造成很大的危害^[11-16]。本研究拟简化高效液相色谱检测辛硫磷前处理过程中的步骤和减少有机溶剂的使用量,以期食品中辛硫磷残留快速检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 试剂及配制

乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);无水硫酸镁(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);辛硫磷标准品(色谱纯,美国 Sigma-adrich 公司);水为超纯水。

无水硫酸镁使用前 160 °C 烘干 24 h,并于干燥器中冷

却至室温。

辛硫磷标准品配制:准确称取辛硫磷标准品 100 mg,用乙腈溶液定容至 100 mL,配制成 1000 mg/L 的辛硫磷标准品母液,移至棕色瓶,置于冰箱保存待用。

2.2 仪器与设备

Waters e2695 高效液相色谱仪(配备 2998PDA 型检测器,美国 Waters 公司);MixMax 漩涡混合仪(美国 Abson 公司);3-18K 离心机(德国 Sigma 公司)。

2.3 样品前处理

把大米和小麦放进粉碎机粉碎过后过 20 目筛,混匀,用封口袋装好备用^[3]。用天平精确分别称取两份 5.00 g 粉碎好的小麦或大米于 50 mL 离心管中,并编号 1, 2。向 2 试管中加入 0.05 mg/kg 的辛硫磷标准品,再向两试管中依次加入 15 mL 乙腈水溶液(2:1、1:1、1:2, V:V),在漩涡振荡器上以 2000 r/min 振荡(时间为 2、4、6、8、10 min),再加入 4.0 g 无水硫酸镁,充分混匀后放入离心机中以 5000 r/min(大米 10000 r/min)离心 5 min。离心后,用注射器吸取上层乙腈层,过 0.45 μm 的滤膜过滤,供色谱分析用。

2.4 样品测定

流动相:乙腈-水(8:2, V:V),等度洗脱,采用 C₁₈ 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 30 °C,检测波长为 280 nm,流速 1 mL/min,进样量 10 μL,采用外标法定量。

2.5 回收率的测定

向小麦和大米空白样品添加 3 个浓度的辛硫磷标准品,进行加标回收率实验。小麦和大米中的添加量分别为 0.05、0.50 和 5.00 mg/kg,每个浓度设置 3 个平行。按照之前优化后的前处理方法制定样品,并进行测定,计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂乙腈与水比例的确定

本实验采用文献报道较多的乙腈作为提取溶剂,为了省去浓缩步骤,采用乙腈和水的混合液进行提取,后经加入无水硫酸镁,离心,乙腈与水分层,以达到较少乙腈溶剂提取辛硫磷的目的。如图 1 所示,随着乙腈比例的逐渐降低,小麦和大米的辛硫磷加标回收率逐渐增加,在乙腈与水比例为 1:2 时,小麦和大米的辛硫磷加标回收率分别为 73%和 78%。由于本实验目的是为了简化前处理步骤,

节省前处理时间, 未对乙腈层进行浓缩处理, 所以当乙腈与水的比例越大时, 提取的辛硫磷相对浓度就越小, 使方法的最低检出限偏高, 从而对低含量的辛硫磷样品检测值偏低, 且误差较大。但当乙腈与水比例较低时, 形成的乙腈层不易吸出, 且易混有固体基质。综合以上因素, 乙腈与水的比例采用 1:2(V:V)。

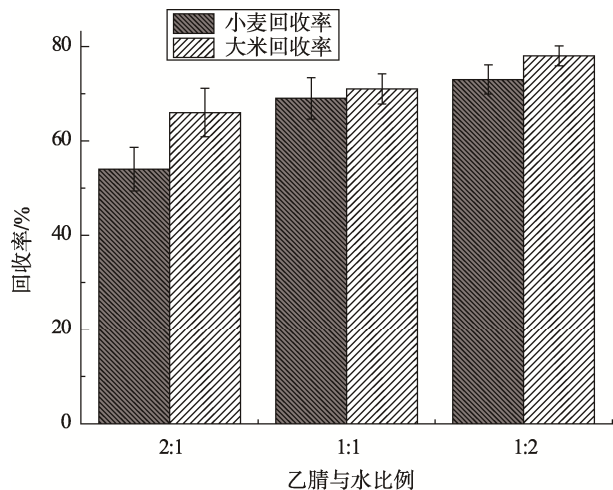


图 1 提取溶剂乙腈与水比例对方法回收率的影响(n=5)
Fig.1 Effect of the ratio of acetonitrile to water on the recovery of the method (n=5)

3.2 振荡提取时间的确定

对于样品基质较复杂的样品, 可在提取的过程中加入超声、漩涡振荡等物理方法, 大大提高提取效率, 缩短提取时间^[17]。本实验采用漩涡振荡仪进行振荡处理, 加速辛硫磷的提取。如图 2 所示, 随着振荡时间的增加, 小麦和大米的辛硫磷回收率显著增加, 说明振荡处理可加速辛硫磷的提取。当小麦和大米的振荡时间分别达到 8 min 和

8 min 左右时, 回收率不再随振荡时间增加而增加。

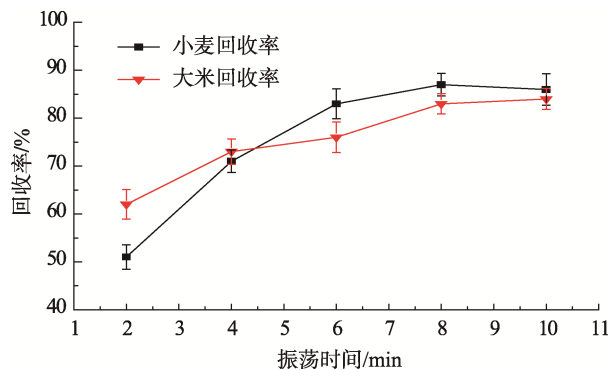


图 2 振荡时间对方法回收率的影响(n=5)
Fig. 2 The effect of oscillation time on method recovery (n=5)

3.3 标准曲线与最小检出量

将辛硫磷的标准母溶液用 80%的乙腈溶液稀释成 0.05、0.20、0.50、1.00、5.00 mg/L 5 个标准浓度, 制作标准曲线。结果显示: 在 0.02~5.0 mg/L 浓度范围内, 线性关系良好, 线性回归方程为 $Y=2.45 \times 10^4 X - 5.88 \times 10^2$, 相关系数 r^2 为 0.9996, 方法最低检出限为 0.002 mg/kg。辛硫磷标准溶液色谱图见图 3。

3.4 方法的回收率和精密度

向未施过辛硫磷的小麦和大米样品添加 3 个浓度的辛硫磷标准品, 进行加标回收率实验。小麦和大米中的添加量分别为 0.05、0.50 和 5.00 mg/kg, 每个浓度设置 3 个平行。按照之前优化后的前处理方法制定样品, 并进行测定, 计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。表 1 显示, 小麦的加标回收率为 80.4%~88.7%, RSD 为 1.1%~1.8%; 大米的加标回收率为 79.1%~87.8%, RSD 为 1.3%~1.9%。小麦和大米的空白色谱图和加标色谱图见图 4~7。

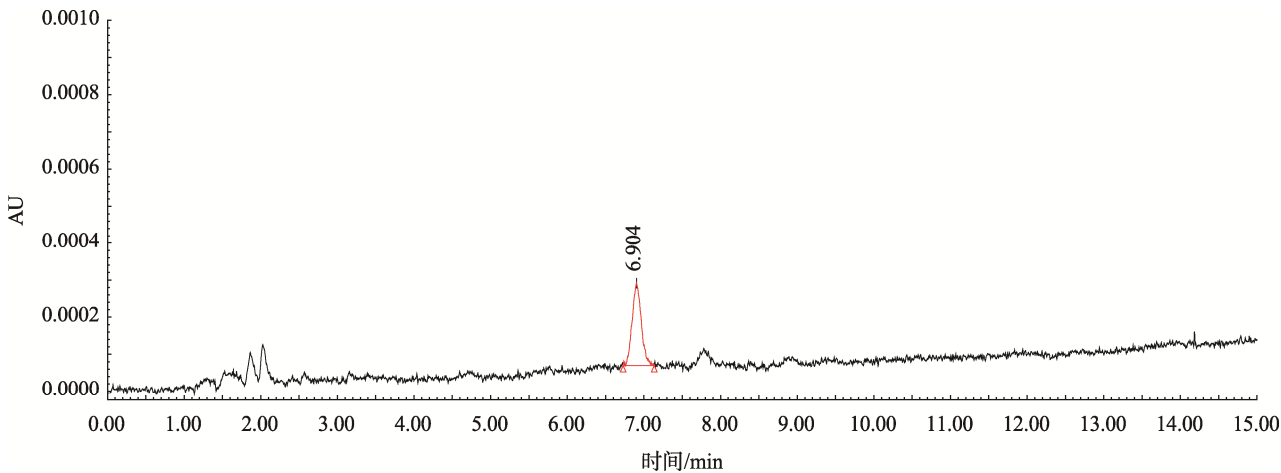


图 3 辛硫磷标准品色谱图
Fig. 3 Chromatogram of phoxim standard

表 1 小麦和大米的辛硫磷加标回收率和精密度结果
Table 1 Recovery and precision of Phoxim in wheat and rice

样品	添加浓度/(mg/kg)	回收率/%					平均	相对标准偏差 RSD/%
		1	2	3	4	5		
小麦	0.05	86.1	88.7	88.2	87.7	84.4	87.0	1.8
	0.5	83.9	81.1	82.3	84.5	82.6	82.9	1.5
	5.0	80.4	81.6	80.3	79.0	80.9	80.4	1.1
大米	0.05	82.4	80.6	85.3	81.8	82.2	82.5	1.9
	0.5	84.2	85.5	84.0	87.8	86.4	85.6	1.7
	5.0	82.1	80.0	79.1	80.8	80.0	80.4	1.3

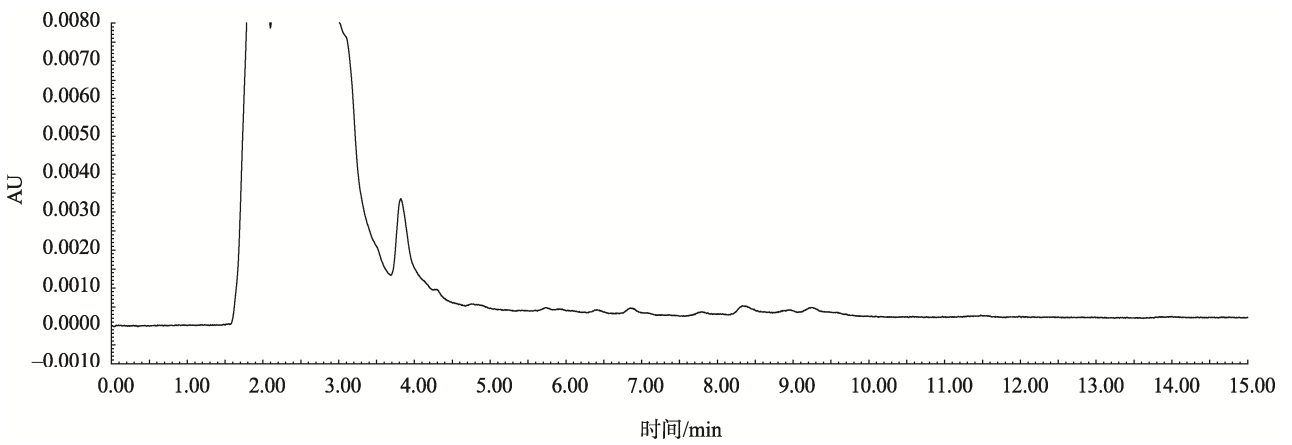


图 4 小麦空白色谱图
Fig. 4 Chromatogram of blank wheat

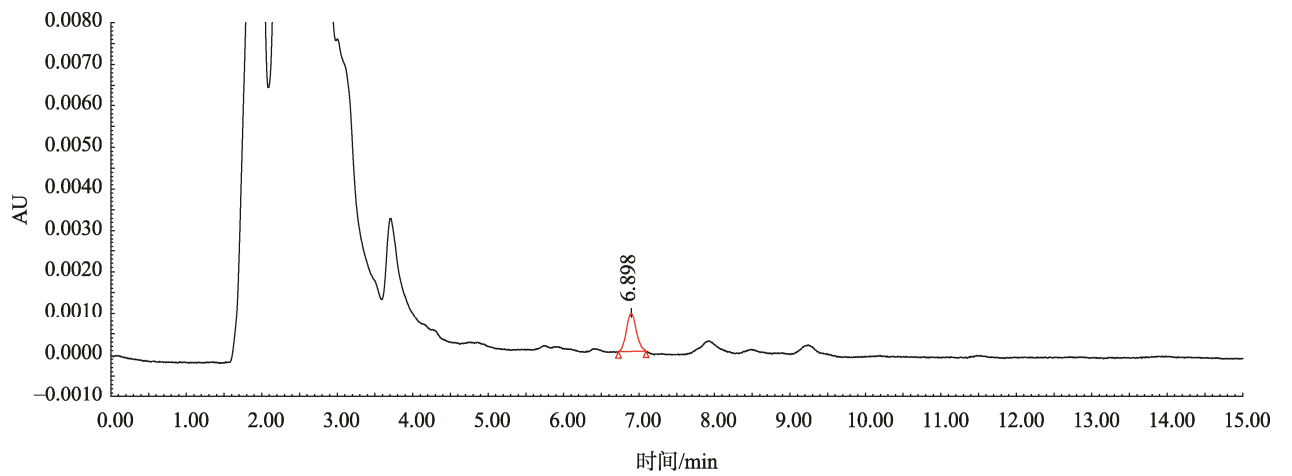


图 5 小麦添加 0.05 mg/kg 辛硫磷色谱图
Fig. 5 Chromatogram of wheat spiked phoxim at the level of 0.05 mg/kg

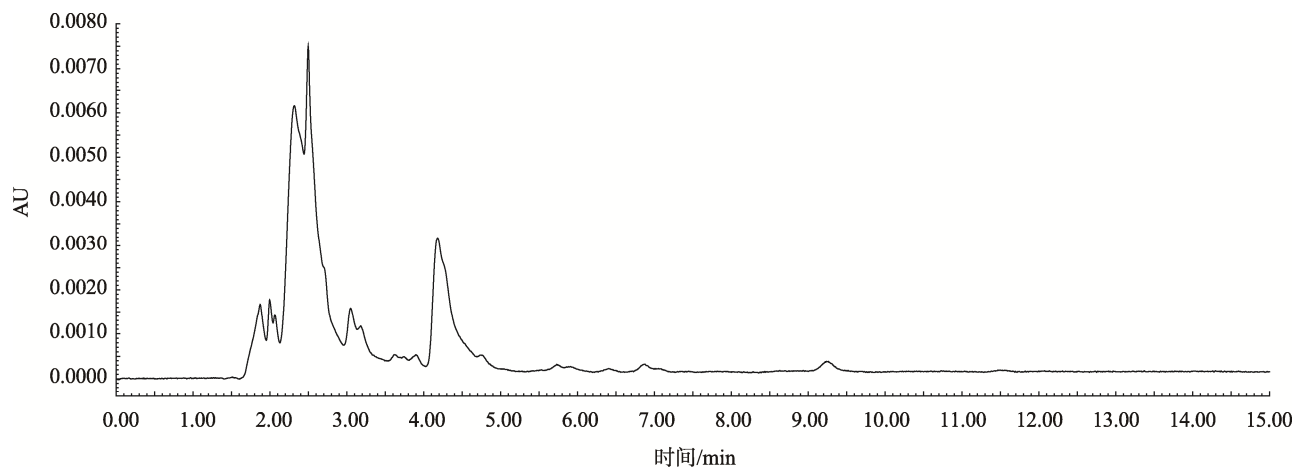


图 6 大米空白色谱图

Fig. 6 Chromatogram of blank rice

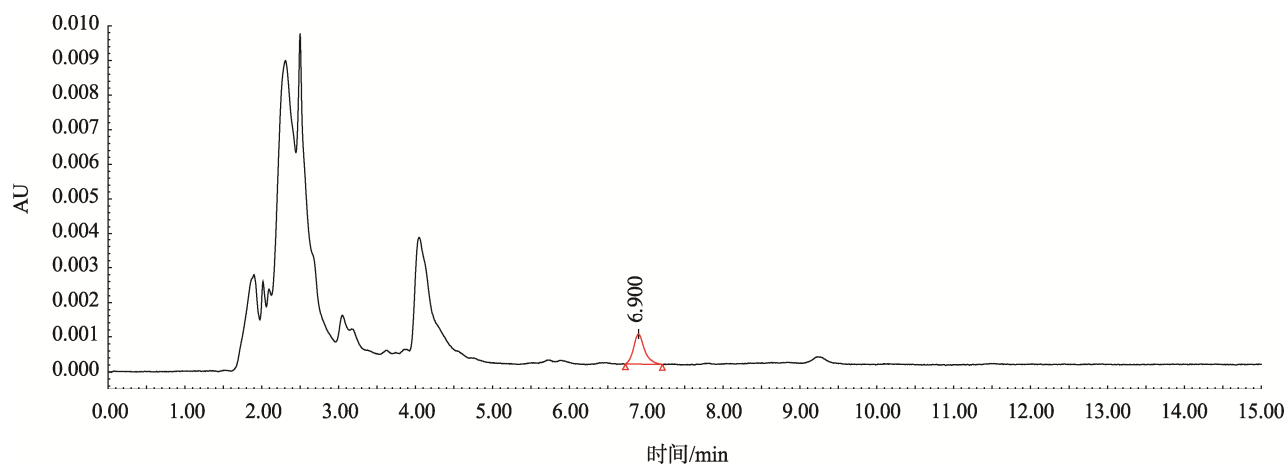


图 7 大米添加 0.05 mg/kg 辛硫磷色谱图

Fig. 7 Chromatogram of rice spiked phoxim at the level of 0.05 mg/kg

4 结 论

本研究建立了高效液相快速检测小麦和大米中辛硫磷残留的快速前处理方法, 确定了提取溶剂乙腈—水的比例为(1:2, V:V), 小麦和大米的振荡时间都为 8 min。在 0.02~5.0 mg/L 浓度范围内, 线性关系良好, 方法最低检出限为 0.002 mg/kg, 小麦的辛硫磷加标回收率为 80.4%~87.0%, RSD 为 1.1%~1.8%; 大米的辛硫磷加标回收率为 80.4%~85.6%, RSD 为 1.3%~1.9%。该方法具有处理快速省时, 操作简单, 重现性好, 结果准确等优点, 方法回收率可满足对小麦和大米进行多批次快速检测的要求。

参考文献

- [1] 宋雅琪. 巨大芽孢杆菌降解辛硫磷(水产用)的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
Song YQ. Study on degradation of phoxim by *Bacillus megacephala* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.

- [2] 吴艳霞. 茄子中辛硫磷残留量的测定[J]. 农业开发与装备, 2014, (5): 64.
Wu YX. Determination of phoxim residues in eggplant [J]. Agric Dev Equip, 2014, (5): 64
- [3] 中华人民共和国卫生部. 植物性食品中辛硫磷农药残留的测定[M]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Determination of phoxim pesticide residues in plant foods [M]. Beijing: China Standard Press, 2004.
- [4] 周剑平, 朱瑾. 气质联用法测定无公害食品中的辛硫磷[J]. 宿州学院学报, 2015, (7): 103~105.
Zhou JP, Zhu J. Determination of phoxim in pollution-free food by GC-MS [J]. J Suzhou Univ, 2015, (7): 103~105.
- [5] 胡明锋, 师迎春, 刘新刚, 等. 气相色谱快速检测双孢菇及其培养基质中的辛硫磷残留[J]. 环境化学, 2014, (3): 522~523.
Hu MF, Shi YC, Liu XG, et al. Rapid determination of phoxim residues in agaricus bisporus and its culture media by gas chromatography [J]. Environ Chem, 2014, (3): 522~523.
- [6] 彭媛芳, 陈玲, 尹伶灵. 气相色谱法测定动物性食品中辛硫磷残留量

- [J]. 山东农业科学, 2012, (4): 114–117.
- Peng YF, Chen L, Yin LL. Determination of phoxim residues in animal derived food by GC [J]. Shandong Agric Sci, 2012, (4): 114–117.
- [7] 任传博, 吴蒙蒙, 王倩, 等. 水产品中辛硫磷、倍硫磷和蝇毒磷的超高效液相色谱-串联质谱法检测[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(5): 39–44.
- Ren CB, Wu MM, Wang Q, *et al.* Determination of phoxim, fenthion and mycophosphate in aquatic products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Fish Qual Standard, 2017, 7(5): 39–44.
- [8] 高迎春, 彭媛芳, 陈玲, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定动物性食品中辛硫磷残留量的研究[J]. 中国兽药杂志, 2012, (5): 20–24.
- Gao YC, Peng YF, Chen L, *et al.* Determination of phoxim residues in animal derived food by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Veter Drug, 2012, (5): 20–24.
- [9] 任飞, 张跃文, 董金龙. 高效液相色谱串联质谱法测定饮用水中辛硫磷和灭多威的农药残留[J]. 光谱实验室, 2011, (3): 1435–1437.
- Ren F, Zhang YW, Dong JL. Determination of residual phoxim and methomyl in the drinking water by HPLC-MS [J]. Spectrosc Lab, 2011, (3): 1435–1437.
- [10] 李爱军, 牟峻, 王明泰, 等. 液相色谱-串联质谱法测定粮谷中敌百虫、辛硫磷残留量[J]. 农药, 2010, (8): 599–601.
- Li AJ, Mou J, Wang MT, *et al.* Determination of trichlorfon and phoxim residues in cereals by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Agrochemicals, 2010, (8): 599–601.
- [11] 王运儒, 秦玉燕, 农耀京, 等. 高效液相色谱法测定马铃薯和土壤中的辛硫磷残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 421–427.
- Wang YR, Qin YY, Nong YJ, *et al.* Determination of phoxim residues in potatoes and soil by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(2): 421–427.
- [12] 付艳梅, 杜锋, 翟硕莉. 高效液相色谱法测定水果蔬菜中辛硫磷残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, (12): 5072–5076.
- Fu YM, Du F, Zhai SL. Determination of phoxim residues in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, (12): 5072–5076.
- [13] 杨燕强, 张鑫鑫, 赵发宝. 高效液相色谱法测定饲料中辛硫磷残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2012, (7): 839–840.
- Yang YQ, Zhang XX, Zhao FB. Determination of phoxim residue in feed by high performance liquid chromatography [J]. Phys Test Chem Anal, 2012, (7): 839–840.
- [14] 石旺荣, 邱朝坤, 刘荣飞, 等. 鲫鱼组织中辛硫磷残留量测定的基质固相分散-高效液相色谱法[J]. 食品科技, 2011, (11): 297–300.
- Shi WR, Qiu CK, Liu RF, *et al.* Matrix solid phase dispersion-High performance liquid chromatography for the determination of Phoxim Residues in crucian carp tissues [J]. Food Sci Technol, 2011, (11): 297–300.
- [15] 周宏霞, 韩喜东, 于军强, 等. 凝胶色谱净化-高效液相色谱法测定辣椒中的辛硫磷残留量[J]. 食品工业科技, 2010, (7): 355–357.
- Zhou HX, Han XD, Yu JQ, *et al.* Determination of phoxim residues in capsicum by gel chromatography with high performance liquid chromatography [J]. Food Ind Technol, 2010, (7): 355–357.
- [16] 周宏琛, 王勇, 闫秋成, 等. 高效液相色谱法测定大蒜中辛硫磷残留[J]. 食品科学, 2006, (6): 192–194.
- Zhou HC, Wang Y, Yan QC, *et al.* Determination of phoxim residues in garlic by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2006, (6): 192–194.
- [17] 丁宗博, 魏亦山, 孙亚萍. 涡流快速提取气相色谱法测定花生中辛硫磷残留量[J]. 光谱实验室, 2008, 25(6): 1261–1264.
- Ding ZB, Wei YS, Sun YP. Rapid eddy current extraction gas chromatography for the determination of Phoxim residues in peanuts [J]. Spectrum Lab, 2008, 25(6): 1261–1264.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘飞翔, 硕士, 助教, 主要研究方向为食品检测与分析。
E-mail: 84693363@qq.com



吴文睿, 高级工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。
E-mail: 13355682105@163.com