

引用格式:

雷鸣, 丁丹, 蒋金凤, 李冰玉, 谭迪, 邓思涵. 固相萃取-高效液相色谱测定水稻中的洛克沙肿[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(4): 482-486.

LEI M, DING D, JIANG J F, LI B Y, TAN D, DENG S H. Solid-phase extraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of roxarsone in *Oryza sativa*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(4): 482-486.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



固相萃取-高效液相色谱测定水稻中的洛克沙肿

雷鸣, 丁丹, 蒋金凤, 李冰玉, 谭迪, 邓思涵

(湖南农业大学资源环境学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:通过对超声提取法中提取剂、固相萃取中淋洗液和洗脱剂、高效液相色谱中流动相的筛选, 建立固相萃取-高效液相色谱定量检测水稻中洛克沙肿的方法。所建方法为: 样品先经 0.05 mol/L NaOH+20 g/L K₂HPO₄ 超声提取; 再利用活化后的固相萃取小柱, 依次采用 1.5 mL 0.05 mol/L 乙酸钠-甲醇溶液(pH=7)和 1.5 mL 甲醇淋洗及体积分数为 13%的甲酸-甲醇溶液洗脱, 最后利用以含 0.3%甲酸的 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液和甲醇(体积比 80:20)为流动相的高效液相色谱进行定量分析; 该方法在洛克沙肿质量浓度为 0.01~10.00 mg/mL 时线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 检测限和定量限分别为 20、67 ng/kg; 洛克沙肿在水稻根、茎、叶、壳、米中的加标回收率分别为 80.0%~87.2%、74.0%~80.6%、80.0%~83.7%、81.0%~90.0%和 83.2%~92.7%, 相对标准偏差分别为 2.2%~5.9%、2.4%~4.6%、2.0%~2.6%、3.6%~5.7%和 3.2%~5.5%。

关键词: 水稻; 洛克沙肿; 固相萃取; 高效液相色谱; 提取剂; 淋洗液; 洗脱剂; 流动相

中图分类号: X835; O657.7⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2021)04-0482-05

Solid-phase extraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of roxarsone in *Oryza sativa*

LEI Ming, DING Dan, JIANG Jinfeng, LI Bingyu, TAN Di, DENG Sihan

(College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: To develop a method for quantitative determination of roxarsone(ROX) in *Oryza sativa*, a group of conditions including extractant, leachate, eluant and mobile phase were tested. The results showed that the condition with extractant, 0.05 mol/L NaOH-20 g/L K₂HPO₄, included the activated solid phase extraction column, with the leachate 1.5 mL 0.05 mol/L CH₃COONa-CH₃OH(pH=7) and 1.5 mL CH₃OH, and with the eluant 13% HCOOH-CH₃OH(V/V) solution, and the method of 0.05 mol/L K₂HPO₄ solution containing 0.3% HCOOH and CH₃OH(the volume ratio was 80:20) as mobile phase was justified an optimal pipeline for the quantitative analysis of high performance liquid chromatography. With the concentration of ROX 0.01-10.00 mg/mL, the linear relationship of the method was optimal($r>0.999$). The limits of detection and limits of quantification were 20, 67 ng/kg, respectively. The recoveries of ROX in roots, stems, leaves, hulls and rice of *Oryza sativa* were 80.0%-87.2%, 74.0%-80.6%, 80.0%-83.7%, 81.0%-90.0% and 83.2%-92.7%, and the relative standard deviations were 2.2%-5.9%, 2.4%-4.6%, 2%-2.6%, 3.6%-5.7% and 3.2%-5.5%, respectively.

Keywords: *Oryza sativa*; roxarsone; solid phase extraction; high performance liquid chromatography; extractant; leachate; eluent; mobile phase

收稿日期: 2020-02-20

修回日期: 2020-06-08

基金项目: 湖南农业大学“双一流”建设项目(SYL201802021)

作者简介: 雷鸣(1975—), 男, 湖南临武人, 博士, 教授, 主要从事重金属污染治理研究, leiming8297@163.com

洛克沙肿(3-硝基-4-羟基-苯胂酸, ROX)是近年来世界各国使用最广泛的饲料添加剂之一。饲料中的 ROX 一部分被畜禽吸收后促进生长, 提高饲料利用效率, 抑制寄生虫感染, 改善肉类色素沉着等^[1]; 另一部分随粪便进入农田环境, 农田土壤中的 ROX 含量也随之增加, 从而导致水稻富集大量 ROX, 并经食物链对人体造成潜在危害^[2-3]。研究^[3-4]表明, 在家禽粪便中, 70%~75%的砷呈水溶态, 降解率与水量呈正相关关系, 在高温、高湿情况下, 大多数 ROX 转化成砷酸盐。为有效评价 ROX 在水稻中的迁移转化, 亟需构建水稻中 ROX 含量的检测方法。

目前, ROX 含量的检测方法有离子色谱-电感耦合等离子体质谱法(IC-ICP-MS)^[4]、液相色谱-氯化物反应-原子荧光光谱法(LC-HG-AFS)^[5-6]、高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)^[7]、高效液相色谱-电喷雾-质谱联用法(HPLC-UV-ESI-MS)^[8]、高效液相色谱法(HPLC)^[9-12]、固相萃取-高效液相色谱法^[13-15]、高效液相色谱质谱联用法(HPLC-MS/MS)^[16-18]、毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法(CE-ICP-MS)^[19]等。这些方法都是基于检测饲料及其添加剂、有机肥、家禽产品中 ROX 的含量而建立的, 但关于水稻中 ROX 含量的检测方法还少有报道。本研究中, 在水稻样品中外源添加 ROX 标准液, 通过超声提取法中提取剂、固相萃取中淋洗液和洗脱剂、HPLC 中流动相的筛选, 建立固相萃取净化结合 HPLC 检测的分析方法来定量检测水稻中的洛克沙肿含量, 旨在为水稻中 ROX 含量的检测分析提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

供试水稻品种为‘中嘉早 17 号’。ROX 标准品为阿达玛斯试剂(上海)有限公司的产品; 甲醇为色谱纯, 德国默克股份公司的产品; 甲酸、磷酸氢二钾、氢氧化钾、硫酸铜、乙酸钠均为分析纯, 国药集团化学试剂公司的产品; PSA(N-丙基乙二胺)填料为天津博纳艾杰尔科技公司的产品; 试验用水为超纯水。

高效液相色谱仪(DAD 检测器、Agilent1200 色谱工作站)为美国安捷伦公司的产品; 氮吹仪(JTN100-2)为杭州聚同电子有限公司的产品; 固相萃取装置为武汉恒信世纪科技有限公司的产品。

1.2 标准溶液的配制

准确称取 ROX 标准品 100 mg 于烧杯中, 用超纯水溶解后定容至 100 mL, 配制成 1000 mg/L 的标准储备液, 于 4 °C 冰箱保存, 备用。上机前将上述储备液用超纯水稀释至所需质量浓度, 配置成标准工作液, 质量浓度分别为 0.00、0.01、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00 mg/L。

1.3 高效液相色谱流动相的选择及色谱条件

参照文献^[13-16]的方法, 设计 4 种高效液相色谱流动相, 分别为含 0.1%甲酸的 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液和甲醇(体积比 95 : 5)、0.68 g/L 磷酸二氢钾溶液和甲醇(体积比 98 : 2)、含 10 mmol/L 庚烷磺酸钠的柠檬酸离子对试剂和 50%甲醇(体积比 98 : 2)、含 0.2%甲酸的 0.05 mol/L 磷酸二氢钾和甲醇(体积比 90 : 10), 分别记为 T1、T2、T3、T4。色谱柱为 Kromasil 100-5-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 检测波长 262 nm; 柱温 30 °C。

1.4 水稻中 ROX 含量的检测

1.4.1 水稻负载 ROX

水稻种子用砻谷机分出糙米和谷壳, 并用粉碎机粉碎后备用。另取一份水稻种子培养, 水稻生长至三叶期时转移至营养液中再培养 3 周后用于试验。新鲜水稻样品按根、茎、叶分开后, 用陶瓷剪刀剪碎, 备用。准确称取(0.500 0±0.000 5) g 不同部位(根、茎、叶、壳、米)的水稻样品, 放入 50 mL 离心管中, 加入 1 mL 不同质量浓度的 ROX 标准溶液后充分涡旋混匀, 制成 ROX 质量浓度分别为 1.00、5.00、10.00 mg/L 的水稻-ROX 混合液。

1.4.2 提取剂的筛选及样品的提取

参照文献^[10, 14-15]的方法, 选用 20 g/L K₂HPO₄、体积分数 50%甲醇水溶液、0.05 mol/L NaOH+20 g/L K₂HPO₄ 共 3 种提取剂, 分别记为 E1、E2、E3。准确称取 0.500 0 g 水稻-ROX 混合液样品, 加入 10 mL 提取剂, 于 40 °C 超声提取 30 min, 以 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清液; 残渣再加入 10 mL 提取剂, 重复上述步骤 2 次; 合并上清液加入 2 mL 100 g/L CuSO₄ 溶液来沉淀植物中的蛋白质, 以 5000 r/min 离心 15 min, 取上清液 3 mL, 待过柱。

1.4.3 淋洗液和洗脱剂的筛选及样品的净化

参照文献[9, 13, 15]的方法, 选用纯甲醇(A), 0.05 mol/L 磷酸氢二钾溶液和甲醇(体积比 9 : 1)、50 mL/L 氨水和纯甲醇各 1 mL(B), 0.05 mol/L 乙酸钠-甲醇溶液(pH=7)和纯甲醇各 1.5 mL(C)共 3 种淋洗液。选择不同体积分数(8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%)的甲酸-甲醇溶液为洗脱剂。依次用 1 mL 甲醇、1 mL 超纯水活化固相萃取小柱后加入 3 mL 提取液, 再依次加 3 mL 淋洗液淋洗, 然后用 3 mL 洗脱剂以 1.0 mL/min 的流速洗脱 ROX, 并收集洗脱液于 40 °C 下氮吹至近干, 加入超纯水定容至 1 mL 过 0.45 μm 微孔滤膜, 待 HPLC 检测。

1.4.4 HPLC 检测

根据 1.3 的结果选择最优流动相和其他色谱条件进行 HPLC 检测。每个质量浓度重复测定 5 次。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱流动相的选择结果

如图 1 所示, 流动相为 T1、T2、T4 时, 均能较好的出峰, 而流动相为 T3 时, 未见出峰, 可见磷酸盐能更好地帮助样品出峰; T1、T4 的峰形比 T2 的稳定, 且周围无杂质峰干扰, 表示增加流动相中甲酸比例, 能提高响应值; T4 的出峰时间比 T1 的早, 意味着增加流动相中的甲醇比例能缩短 ROX 的保留时间。在选取的 4 种流动相中, T4 的峰形稳定, 响应值高, 由于出峰时间稍晚, 对 T4 流动相改进。综合对比不同柱温、流速、波长的影响, 发

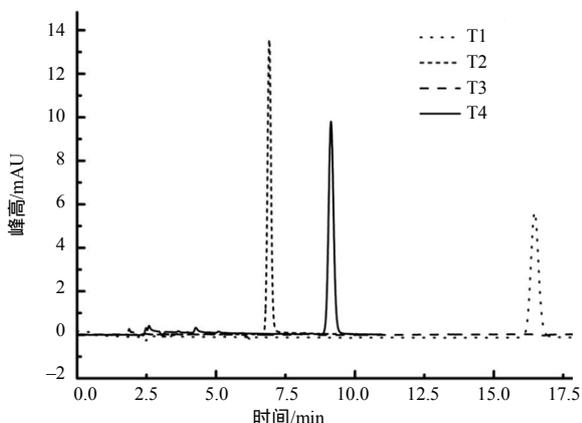


图 1 不同 HPLC 流动相的 5.00 mg/L ROX 标准溶液色谱
Fig.1 The chromatograms of 5.00 mg/L roxarsone standard solution with different mobile phase

现其响应值并没有很大差异, 最终采用流动相为含 0.3%甲酸的 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液和甲醇(体积比 80 : 20)。

2.2 提取剂筛选的结果

3 种提取剂对水稻中 ROX 的提取率各不相同。其中, E1 的回收率为(48.3±3.4)%, 相对偏差为 1.8%; E2 的回收率为(74.2±1.8)%, 相对偏差为 2.4%; E3 的回收率最高, 为(88.7±1.6)%, 相对偏差为 1.8%; 因此, 最终选择 E3 作为提取 ROX 的提取剂。

2.3 固相萃取条件优化的结果

2.3.1 淋洗液

如图 2 所示, 3 种淋洗液对 ROX 回收率的影响各异, 综合比较 3 种淋洗液, 发现选择淋洗液 C 时回收率最高, 且基线平稳。基于此, 本研究中, 选择 0.05 mol/L 乙酸钠-甲醇溶液(pH=7)和纯甲醇各 1.5 mL 作为淋洗液。

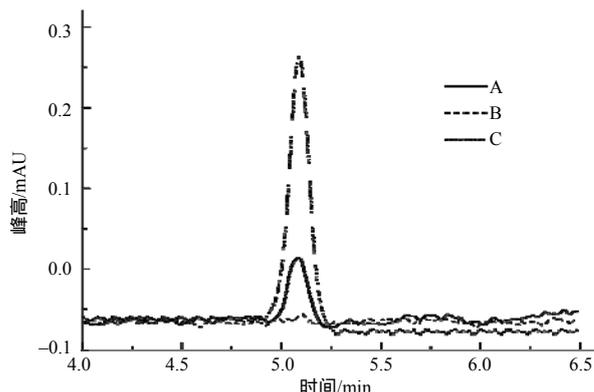


图 2 使用不同淋洗剂的水稻中 ROX 色谱
Fig.2 The chromatograms of roxarsone in *Oryza sativa* with different leachate

2.3.2 洗脱剂

如图 3 所示, 甲酸体积分数为 8%~13%时, ROX

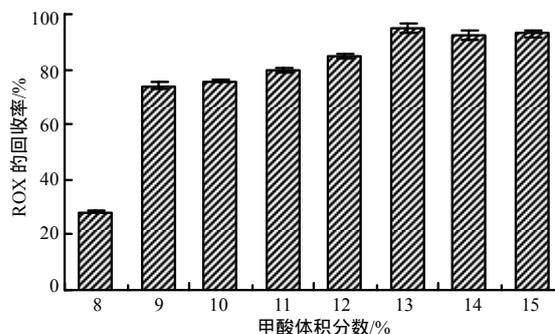


图 3 不同甲酸体积分数条件下水稻中 ROX 的回收率
Fig.3 The recovery of roxarsone in *Oryza sativa* under the different volume fractions methanoic acid condition

的回收率逐渐提高,随后逐渐下降;当甲酸体积分数为13%时,ROX的回收率最高,超过90%,符合分析要求。故本研究中,选择体积分数为13%的甲酸-甲醇溶液作为洗脱剂。

2.4 供试方法的线性关系与定量下限

以ROX质量浓度(x)为横坐标,与之对应的色谱峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线。ROX质量浓度为0.01~10.00 mg/L时,目标物具有良好的线性关系,线性方程为 $y=22.775x+0.6413$ 。线性相关系数大于0.999。ROX的检出限和定量限分别为20、67 ng/kg。

2.5 供试方法的准确度与精密度

如表1所示,随着ROX添加量的增加,ROX的回收率也随之增加;水稻的根、茎、叶、壳、米中ROX的回收率分别为80.0%~87.2%、74.0%~80.6%、80.0%~83.7%、81.0%~90.0%和83.2%~92.7%,对应的相对标准偏差分别为2.2%~5.9%,2.4%~4.6%,2.0%~2.6%,3.2%~5.5%和3.6%~5.7%。

表1 ROX在水稻中的加标回收率及相对标准偏差
Table 1 The mean recovery and relative standard deviations of ROX in *Oryza sativa*

样品	添加量/ (mg·L ⁻¹)	回收量/ (mg·L ⁻¹)	回收率/%	相对标准 偏差/%
根	1.00	0.80±0.02	80.0±1.8	2.2
	5.00	4.26±0.26	85.2±5.2	5.9
	10.00	8.72±0.35	87.2±3.5	4.0
茎	1.00	0.74±0.04	74.0±3.4	4.6
	5.00	3.96±0.09	79.2±1.9	2.4
	10.00	8.06±0.31	80.6±3.1	3.8
叶	1.00	0.80±0.02	80.0±1.6	2.0
	5.00	4.09±0.11	81.8±2.1	2.6
	10.00	8.37±0.19	83.7±1.9	2.3
壳	1.00	0.81±0.03	81.0±3.1	3.4
	5.00	4.08±0.15	81.6±2.9	3.2
	10.00	9.00±0.55	90.0±5.5	5.5
米	1.00	0.85±0.05	85.0±4.9	5.7
	5.00	4.16±0.18	83.2±3.6	3.6
	10.00	9.27±0.42	92.7±4.2	4.5

3 结论与讨论

本研究中,建立了以0.05 mol/L NaOH+20 g/L K₂HPO₄为提取剂的超声提取;以0.05 mol/L 乙酸钠-甲醇溶液(pH=7)和纯甲醇为淋洗液,以体积分

数为13%的甲酸-甲醇溶液为洗脱剂的固相萃取小柱净化;以含0.3%甲酸的0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液和甲醇(体积比80:20)为流动相的HPLC定量测定水稻根、茎、叶、壳、米中ROX含量的方法。该方法在ROX质量浓度为0.01~10.00 mg/mL时的线性关系良好,相关系数大于0.999;检测限和定量限分别为20、67 ng/kg,检出限明显低于奚功芳等^[11]利用HPLC检测土壤中ROX的检出限(0.12 mg/kg)。ROX在水稻根、茎、叶、壳、米中的加标回收率分别为80.0%~87.2%、74.0%~80.6%、80.0%~83.7%、81.0%~90.0%和83.2%~92.7%;对应的相对标准偏差分别为2.2%~5.9%,2.4%~4.6%,2.0%~2.6%,3.6%~5.7%,3.2%~5.5%,明显低于张莉等^[13]利用固相萃取-高效液相色谱法检测水中ROX的(5.1%~13.0%)。可见,本研究的方法精密度高、线性范围宽、检出限低,可用于水稻中ROX的定量分析。

参考文献:

- [1] LI B Y, WEI D N, LI Z Q, et al. Mechanistic insights into the enhanced removal of roxarsone and its metabolites by a sludge-based, biochar supported zerovalent iron nanocomposite: adsorption and redox transformation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 389: 122091.
- [2] HUANG K, PENG H Y, GAO F, et al. Biotransformation of arsenic-containing roxarsone by an aerobic soil bacterium *Enterobacter sp.* CZ-1[J]. Environmental Pollution, 2019, 247: 482-487.
- [3] YAO L X, HUANG L X, BAI C H, et al. Effect of roxarsone metabolites in chicken manure on soil biological property[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 171: 493-501.
- [4] JACKSON B P, BERTSCH P M. Determination of arsenic speciation in poultry wastes by IC-ICP-MS[J]. Environmental Science & Technology, 2001, 35(24): 4868-4873.
- [5] 黄连喜, 何兆桓, 曾芳, 等. 液相色谱-氢化物发生-原子荧光联用同时测定洛克沙肿及其代谢物[J]. 分析化学, 2010, 38(9): 1321-1324.
HUANG L X, HE Z H, ZENG F, et al. Simultaneous analysis of roxarsone and its metabolites by liquid chromatography-hydrodride generation-atomic fluorescence spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(9): 1321-1324.
- [6] HUANG L X, YAO L X, HE Z H, et al. Roxarsone and its metabolites in chicken manure significantly enhance

- the uptake of As species by vegetables[J]. *Chemosphere*, 2014, 100: 57–62.
- [7] LIU Q Q, PENG H Y, LU X F, et al. Enzyme-assisted extraction and liquid chromatography mass spectrometry for the determination of arsenic species in chicken meat [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 888: 1–9.
- [8] STOLZ J F, PERERA E, KILONZO B, et al. Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid(roxarsone) and release of inorganic arsenic by *Clostridium* species[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(3): 818–823.
- [9] 文一, 姚瑞华, 孙宏亮, 等. 高效液相色谱法测定地下水中洛克沙肿[J]. *环境监测管理与技术*, 2016, 28(1): 58–59.
- WEN Y, YAO R H, SUN H L, et al. Determination of roxarsone in groundwater with high performance liquid chromatography[J]. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2016, 28(1): 58–59.
- [10] 奚功芳, 周守标, 姚春霞. 高效液相色谱法测定有机肥中洛克沙肿[J]. *分析科学学报*, 2015, 31(1): 127–130.
- XI G F, ZHOU S B, YAO C X. Determination of roxarsone in animal manure by high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Analytical Science*, 2015, 31(1): 127–130.
- [11] 奚功芳, 姚春霞, 周守标, 等. 土壤中洛克沙肿的检测方法[J]. *环境化学*, 2014, 33(5): 863–864.
- XI G F, YAO C X, ZHOU S B, et al. Determination of roxarsone in soil[J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(5): 863–864.
- [12] 白亚楠, 郑增忍, 邹明, 等. 高效液相色谱法检测鸡粪便中洛克沙肿[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(12): 79–82.
- BAI Y N, ZHENG Z R, ZOU M, et al. Determination of roxarsone in chicken feces [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2010, 31(12): 79–82.
- [13] 张莉, 张永涛, 李晓亚, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定水中洛克沙肿[J]. *分析实验室*, 2014, 33(5): 524–527.
- ZHANG L, ZHANG Y T, LI X Y, et al. Determination of roxarsone in water by solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2014, 33(5): 524–527.
- [14] 肖亚兵, 韦玮, 高健会, 等. 固相萃取/高效液相色谱法对饲料中阿散酸、硝苯砷酸和洛克沙肿的同时测定[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(9): 964–967.
- XIAO Y B, WEI W, GAO J H, et al. Simultaneous determination of arsenilic, nitarsone and roxarsone in animal feed by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2008, 27(9): 964–967.
- [15] 王金荣, 张丽英, 马永喜. 饲料中洛克沙肿的固相萃取-高效液相色谱法检测技术研究[J]. *饲料工业*, 2005, 26(14): 38–41.
- WANG J R, ZHANG L Y, MA Y X. Determination of roxarsone in animal feed by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Feed Industry*, 2005, 26(14): 38–41.
- [16] 陈福华, 隆雪明, 易建希. 饲料中阿散酸和洛克沙肿测定方法的研究[J]. *湖南饲料*, 2013(4): 22–25.
- CHEN F H, LONG X M, YI J X. Method for the determination of arsenilic and roxarsone in feed[J]. *Hunan Feed*, 2013(4): 22–25.
- [17] 王莹, 田亚平, 陈洋, 等. 高效液相质谱联用法测定鸡肉中洛克沙肿[J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(4): 58–60.
- WANG Y, TIAN Y P, CHEN Y, et al. Determination of roxarsone in chicken muscles by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(4): 58–60.
- [18] GARBARINO J R, BEDNAR A J, RUTHERFORD D W, et al. Environmental fate of roxarsone in poultry litter. I. degradation of roxarsone during composting[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(8): 1509–1514.
- [19] 陈玉红, 米健秋, 徐陆正, 等. 毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法联用(CE-ICP/MS)测定八种砷的化合物[J]. *环境化学*, 2011, 30(7): 1374–1377.
- CHEN Y H, MI J Q, XU L Z, et al. Determination of eight arsenic compounds by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry(CE-ICP/MS)[J]. *Environmental Chemistry*, 2011, 30(7): 1374–1377.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳正