

实验技术与方法

通过式固相萃取-高效液相色谱法测定小麦粉及面粉处理剂中的硫脲

丁一, 薛霞, 卢兰香, 魏莉莉, 崔玉花, 程志, 蔡睿琪, 王骏, 胡梅, 刘艳明

(山东省食品药品检验研究院, 山东省特殊医学用途配方食品质量控制工程技术研究中心, 山东省食品药品安全检测工程技术研究中心, 山东济南 250101)

摘要:目的 建立通过式固相萃取柱净化, 高效液相色谱法测定小麦粉及面粉处理剂(FTA)中硫脲的分析方法。方法 试样中的硫脲经乙腈-水溶液(8:2, V/V)提取, 通过式固相萃取柱 PRiME HLB 净化, XBridge Amide 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离, 乙腈-水为流动相梯度洗脱, 二极管阵列检测器(DAD)检测, 外标法定量。结果 该方法在 0.05~20 μg/mL 浓度范围线性关系良好, 相关系数(R^2)>0.999; 检出限(LOD, $S/N \geq 3$)为 0.15 mg/kg, 定量限(LOQ, $S/N \geq 10$)为 0.5 mg/kg; 在空白小麦粉和 FTA 中进行 3 个加标水平(LOQ、2LOQ、10LOQ)的加标回收实验, 方法的平均回收率在 95.5%~103.7% 之间, 相对标准偏差(RSD)<5.7%。结论 该方法解决了酶式 FTA 易胶化分散效果差的问题, 同时有效去除了小麦粉及 FTA 中的基质干扰, 保护了色谱柱。该方法简单、灵敏、准确, 适用于小麦粉及 FTA 中硫脲的准确定性、定量分析。

关键词:小麦粉; 面粉处理剂; 硫脲; 通过式固相萃取; 高效液相色谱法(HPLC)

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2022)04-0750-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.04.018

Determination of thiourea in wheat flour and flour treatment agents by pass-through solid phase extraction purification and high performance liquid chromatographyDING Yi, XUE Xia, LU Lanxiang, WEI Lili, CUI Yuhua, CHENG Zhi, CAI Ruiqi, WANG Jun,
HU Mei, LIU Yanming

(Shandong Research Center of Engineering and Technology for Quality Control of Food for Special Medical Purposes, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Safety Inspection of Food and Drug, Shandong Institute for Food and Drug Control, Shandong Ji'nan 250101, China)

Abstract: Objective To establish a detection method for thiourea in wheat flour and flour treatment agents(FTA) by pass-through solid phase extraction purification and high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile aqueous solution(8:2, V/V), and purified by PRiME HLB pass-through SPE column. The extract was separated on a XBridge Amide column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile and water as the mobile phase in gradient elution, and detected by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). **Results** The linear correlation coefficient (R^2) was higher than 0.9999 in the range of 0.05-20 μg/mL. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0.15 and 0.5 mg/kg, respectively. The average recoveries ranged from 95.5% to 103.7% with the relative standard deviation (RSD) less than 5.7% at three spiked levels of LOQ, 2LOQ and 10LOQ. **Conclusion** The problem of easy gelation and poor dispersion effect of FTA had been solved by the method established in this experiment, while matrix interference in wheat flour and FTA reduced effectively, which protected the chromatographic column. This simple, sensitive, accurate method is suitable for the confirmation and quantification of thiourea in wheat flour and FTA.

Key words: Wheat flour; flour treatment agents; thiourea; pass-through solid phase extraction; high performance liquid chromatography

收稿日期: 2021-12-31

基金项目: 2019年度山东省重点研发计划(医用食品)(2019YYSP020); 国家重点研发专项计划: 食品安全关键技术研发(2017YFC1601600)

作者简介: 丁一 女 工程师 研究方向为食品安全分析与风险预警 E-mail: 541503244@qq.com

通信作者: 薛霞 女 研究员 研究方向为食品安全分析及风险预警 E-mail: xuexia9549@163.com。

硫脲又称硫代尿素,可用作橡胶的硫化促进剂、金属矿物浮选剂等,也用作制造药物、树脂、染料等的原料。硫脲能够抑制造血器官和甲状腺的机能,引起中枢神经麻痹及呼吸和心脏功能降低等,甚至导致死亡^[1],对人体健康的危害不容忽视。硫脲有漂白和抗氧化作用,曾一度广泛用于食品的漂白、保鲜和防腐。此外,硫脲还被不法生产商用于面粉类食品的增筋、增白^[2]。为加强对小麦粉的安全监管,2017年11月原国家食品药品监督管理总局发布第132号公告,明确规定严禁生产企业在小麦粉中添加硫脲、过氧化苯甲酰等非食品原料。

在小麦粉生产过程中往往需要添加一些面粉处理剂(Flour treatment agents, FTA),实现面粉及其制品的品质改良。根据基质性质的不同,FTA可分为酶式处理剂(FTA1)和盐式处理剂(FTA2)^[3],其中酶式处理剂遇水易成胶状,提取难度大。现有关于硫脲检测的文献报道多见于空气、水、土壤和生物等基质的研究。现有关于硫脲检测标准仅有《BJS 201602 小麦粉中硫脲的测定》,该标准仅涵盖小麦粉中硫脲的测定,不适用于面粉处理剂。因此同时适用于小麦粉和面粉处理剂中硫脲的测定方法亟待开发。

目前报道的硫脲检测方法主要有光度法^[4-5]、化学发光法^[6]、电化学法^[7]、极谱法^[8]、离子色谱法^[9]、液相色谱法^[10-15]和质谱法^[1,16]等,其中液相色谱法是应用最广泛的方法。PRiME HLB具有较强的去除磷脂、蛋白、色素等杂质的能力,为通过性固相萃取柱,在兽药残留检测^[17-19]领域应用广泛,但在硫脲的测定中未见报道。

本研究建立了高效液相色谱法测定小麦粉及面粉处理剂中硫脲的分析方法。针对小麦粉及面粉处理剂的基质特点,对提取体系和净化方式进行了优化。优化的提取体系可以分散各种类型的面粉处理剂,提取效率高;PRiME HLB通过式固相萃取柱可以有效去除面粉处理剂中的干扰,提高方法准确性,保护仪器及色谱柱;硫脲作为极性化合物,在XBridge Amide色谱柱上保留适中,以期所建立的色谱分离条件可实现硫脲的准确定量。该方法灵敏度高,重现性好,简便快捷,检测效率高,适用于小麦粉及面粉处理剂中硫脲的测定。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

LC-2030C 3D Plus 高效液相色谱仪(日本岛津,配备二极管阵列检测器);Milli-Q超纯水制备器(美国MILLIPORE);AB204-S型电子天平(瑞士Mettler

Toledo);PRiME HLB固相萃取柱(美国Waters);PTFE微孔滤膜0.45 μm(上海安谱)。

硫脲标准品(thiourea,美国ChemService);XBridge Amide色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,美国Waters);甲醇、乙腈(色谱纯,德国默克);甲酸、醋酸铵(分析纯,国药集团)。实验所用样品均购自当地超市。

1.2 标准溶液的配制

准确称取10.00 mg(精确至0.01 mg)硫脲标准物质于10 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成浓度为1 mg/mL的标准储备液。移取标准储备液用初始流动相稀释到适当的浓度得到标准工作液。

1.3 样品前处理

称取均匀样品2.00 g(精确至0.01 g)于50 mL具塞离心管中,准确加入20 mL乙腈-水溶液(8/2,V/V),涡旋2 min,超声10 min,8 000 r/min离心5 min。准确量取5 mL上清液,加入PRiME HLB小柱中,收集流出液,经0.22 μm微孔滤膜过滤,高效液相色谱测定。

1.4 色谱条件

色谱柱:Waters® Xbridge Amide色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)和水(B)。梯度洗脱程序(A):0~9.0 min:95%保持;9.1~15.0 min:60%;15.1~20.0 min:95%保持;检测波长:247 nm;流速:1.0 mL/min。柱温:35 °C;进样量:10 μL。

2 结果

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 色谱柱的选择

硫脲属于强极性化合物,在常规反相C₁₈色谱柱上保留比较弱,实验选取Xbridge Amide(250 mm×4.6 mm,5 μm)和HILIC(250 mm×4.6 mm,5 μm)两种亲水型色谱柱对硫脲的分离效果及峰形进行比较。结果表明HILIC柱可以得到良好的峰形,但保留时间在4 min之内,不能实现硫脲与杂质的完全分离。Xbridge Amide柱由于使用了化学稳定的、三键键合式的酰胺官能团,对高极性化合物保留及分离效果好,目标物保留时间为5 min,峰形好且实现了与杂质的良好分离。因此选择Xbridge Amide柱作为本方法的色谱柱。

2.1.2 流动相的选择

应用Waters Xbridge Amide色谱柱,首先考察了甲醇-水、乙腈-水两种流动相对目标物的影响,结果发现乙腈-水的峰形更好。进一步考察了标准溶液在乙腈-水、乙腈-10 mmol/L醋酸铵溶液和乙腈-

0.1% 甲酸水溶液为流动相时的色谱峰高、峰面积及保留时间。结果表明 3 种流动相条件下的保留时间基本一致,但乙腈-水条件下硫脲响应最高,所以选择乙腈-水作为最终流动相,采用梯度洗脱。标准品(2.0 μg/mL)、小麦粉及面粉处理剂空白样品的色谱图见图 1。图 1 显示,该分析条件下小麦粉及面粉处理剂中硫脲与杂质分离较好,可满足准确定性定量要求。

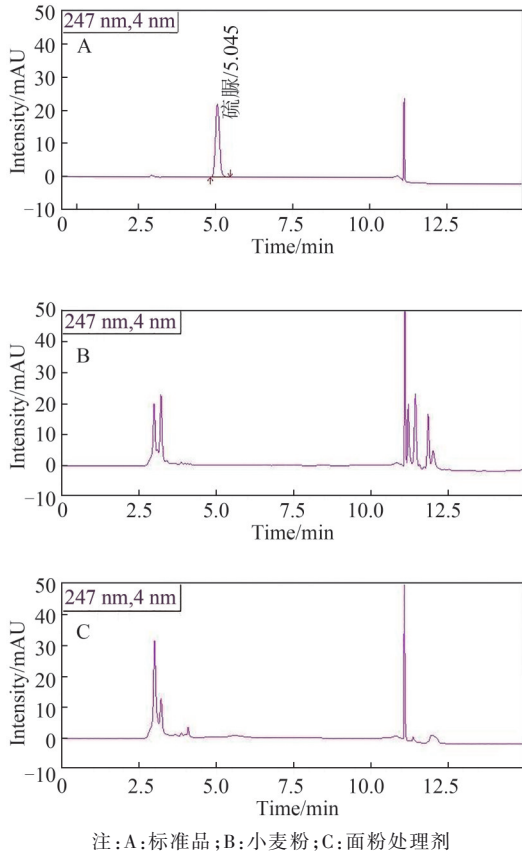


图1 Xbridge Amide柱分离硫脲标准品及样品色谱图
Figure 1 The chromatograms of thiourea in standard, wheat flour and flour treatment agents on Xbridge Amide column

2.1.3 检测波长的选择

取配制好的硫脲标准溶液(2.0 μg/mL)在确定的流动相条件下,用 LC-2030C 3D Plus 高效液相色谱仪配备的二极管阵列检测器于 190~500 nm 的波长范围内进行紫外光谱全波长扫描,扫描得光谱图见图 2。由图 2 可以看出,目标化合物的最大吸收波长为 247 nm,故选择 247 nm 为最佳波长。

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂的选择

面粉制品中的硫脲兼顾提取效率和净化效果,最佳提取溶剂为 80% 的乙醇水溶液^[1]。实验发现含 80% 有机相的水溶液可以使酶式面粉处理剂分散均匀、避免胶化,有利于实现目标物的有效提取。

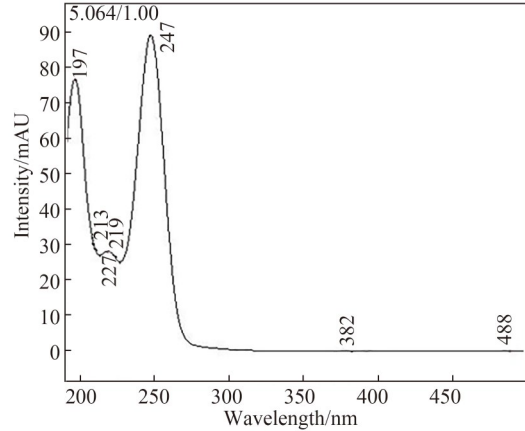


图2 硫脲紫外吸收光谱

Figure 2 The spectrograms of thiourea

硫脲提取溶剂一般为水、甲醇、乙醇、乙腈等^[1],因此本实验比较了乙醇-水溶液(8:2, V/V)、甲醇-水溶液(8:2, V/V)和乙腈-水溶液(8:2, V/V)3种提取溶剂对小麦粉及面粉处理剂提取效果的影响。

如图 3,3种提取溶剂对小麦粉中硫脲的提取效果差异不大,但 80% 乙腈水对面粉处理剂 1 的提取回收率最高,分析原因可能是乙腈有着更好地沉淀蛋白的作用,对于含各种复合酶的面粉处理剂实现了更高的提取效率。同时以 80% 乙腈水作为提取溶剂时,更有利于磷脂在 PRiME HLB 固相萃取柱上的保留,因此最终选择 80% 乙腈水溶液作为提取溶剂。

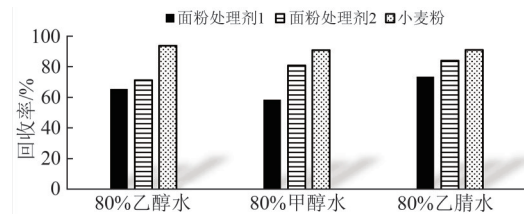


图3 提取溶剂对硫脲提取效率的影响

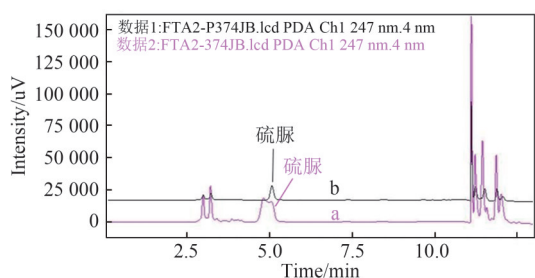
Figure 3 Average recoveries of thiourea with different extraction solvents

2.2.2 净化方式的选择

面粉处理剂中含有玉米淀粉、各种矿物盐、维生素 C、酶制剂等成分,乙腈水作为提取溶剂在保证硫脲的提取效率的同时,共提取的杂质较多。硫脲的检测波长为 247 nm,易受基质干扰的影响。如图 4a 所示,部分面粉处理剂经 80% 乙腈水提取后直接进行测定,硫脲出峰位置干扰严重,无法定性定量,因此本研究对净化方式进行了考察。硫脲极性很强,在 HLB、C₁₈ 固相萃取柱上没有保留,几乎没有回收率。准确量取 5 mL 面粉处理剂的提取溶液,直接通过 PRIME HLB 小柱,收集滤液过膜上机测定,结果见图 4b。由此可见,PRiME HLB 通过式固相萃取柱杂质去除效果好,可实现面粉处理剂中硫脲的准确

定性定量。

PRiME HLB 填料具有极强水浸润性,无需活化和平衡步骤,试剂消耗少,操作简便,环境友好。经试验发现该固相萃取柱也适用于对面粉的净化,回收率及精密度俱佳。为提高方法的适用性,保护色谱柱,面粉及面粉处理剂均采用 PRiME HLB 进行净化。



注:a:未净化(面粉处理剂);b:PRiME HLB柱净化后色谱图

图4 PRiME HLB固相萃取柱对提取液的净化效果

Figure 4 Purification effect of PRiME HLB column on extraction solution

2.3 方法学评价

2.3.1 线性范围、检出限和定量限

将1.2中所配制标准工作溶液依次进行高效液相色谱测定,以标准工作溶液峰面积(Y)为纵坐标,标准溶液质量浓度(X, $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,绘制标准曲线。结果显示,硫脲在0.05~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,线性回归方程为 $Y=102\ 632X-3\ 601.98$, $R^2=0.999$ 以上,线性关系良好。

采用空白基质中添加目标化合物的方法,以对应色谱峰响应值3倍信噪比得到目标物的检出限(Limit of detection, LOD)为0.15 mg/kg,以对应色谱峰响应值10倍信噪比得到目标物的LOQ为0.5 mg/kg。

2.3.2 回收率和精密度

选择空白小麦粉、盐式面粉处理剂和酶式面粉处理剂,分别添加0.5、1.0、5.0 mg/kg三个水平的目标化合物,每个浓度水平平行测定6次,计算回收率和精密度,结果见表1。结果表明,低、中、高三个水平下,硫脲的平均加标回收率在95.5%~103.7%之间,精密度均小于5.7%。方法准确度高,重复性好。

2.4 实际样品测定

采用本方法对市售小麦粉、复合酶式面粉处理剂及复合盐式面粉处理剂等50批次样品进行分析。样品均未检出硫脲。

3 结论

本文首次建立了同时适用于小麦粉及面粉处理剂中硫脲的高效液相色谱测定方法。样品经

表1 小麦粉及面粉处理剂中硫脲的回收率及精密度($n=6$)

Table 1 Average recoveries and RSDs of thiourea in wheat flour and flour treatment agents ($n=6$)

基质	加标量/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
小麦粉	0.5	103.7	4.2
	1.0	96.8	2.8
	5.0	96.9	4.8
盐式面粉处理剂	0.5	96.1	5.7
	1.0	95.5	2.0
	5.0	99.1	3.4
酶式面粉处理剂	0.5	96.3	5.4
	1.0	96.0	4.6
	5.0	97.7	5.2

80%乙腈-水溶液提取,通过式PRiME HLB固相萃取柱净化, XBridge Amide 色谱柱分离,适用于小麦粉及面粉处理剂中硫脲的测定。该方法操作简单,灵敏度高,重现性好,可满足小麦粉及面粉处理剂中硫脲的快速检测,为现有标准的制修订及监管部门风险监控提供技术支持。

参考文献

- [1] 黄晓兰, 罗辉泰, 吴惠勤, 等. 液相色谱-串联质谱测定面条和米粉中的硫脲[J]. 分析化学, 2009, 37(10): 1531-1534.
HUANG X L, LUO H T, WU H Q, et al. Determination of thiourea in noodle and rice flour by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(10): 1531-1534.
- [2] 汤威, 赵瑜, 杨华武, 等. 亲水作用色谱法测定食品及烟用香料中的硫脲[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(7): 1692-1693, 1696.
TANG W, ZHAO Y, YANG H W, et al. Determination of thiourea in foods and tobacco flavor fragrance by Hydrophilic interaction chromatography [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(7): 1692-1693, 1696.
- [3] 张艳侠, 尹丽丽, 薛霞, 等. 通过式固相萃取/UPLC-MS/MS测定小麦粉及其添加剂中非食用物质三聚硫氰酸三钠盐[J]. 分析测试学报, 2021, 40(5): 712-718.
ZHANG Y X, YIN L L, XUE X, et al. Detection of sodium trithiocyanurate in wheat flour and flour additives by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pass-through SPE cleanup [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2021, 40(5): 712-718.
- [4] 孙登明, 张振新, 龚永俊, 等. 萃取抑制光度法间接测定痕量硫脲[J]. 分析测试学报, 2005, 24(2): 54-56.
SUN D M, ZHANG Z X, GONG Y J, et al. Indirect determination of trace thiourea by extraction inhibition spectrophotometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2005, 24(2): 54-56.
- [5] 蔡志刚, 金俏, 王园朝. 催化动力学光度法测定果汁中痕量硫脲含量[J]. 化学研究与应用, 2013, 25(11): 1497-1501.
CAI Z G, JIN Q, WANG Y C. Catalytic kinetic spectrophotometric determination of trace Thiourea in fruit juices [J]. Chemical Research and Application, 2013, 25(11): 1497-1501.
- [6] 樊雪梅, 王书民, 苏智魁, 等. 流动注射化学发光法测定硫脲[J]. 分析实验室, 2011, 30(9): 82-84.

- FAN X M, WANG S M, SU Z K, et al. Chemiluminescence reaction of potassium permanganate-thiourea system[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2011, 30(9): 82-84.
- [7] 张君才, 陈佑宁, 王光伟. 流动注射双安培法测定硫脲[J]. 分析科学学报, 2006, 22(6): 701-703.
- ZHANG J C, CHEN Y N, WANG G W. Flow injection biamperometric analysis of thiourea [J]. Journal of Analytical Science, 2006, 22(6): 701-703.
- [8] 魏艳, 杨改霞. 铜电解液中硫脲的测定[J]. 金属材料与冶金工程, 1995, 6: 51-53.
- WEI Y, YANG G X. 铜电解液中硫脲的测定[J]. Hunan Metallurgy, 1995, 6: 51-53.
- [9] 叶明立, 卢滨乐, Nesterenko Pavel N., 等. 反相色谱和离子交换色谱测定三聚氰胺氰尿酸中三聚氰胺与硫脲的对比研究[J]. 分析仪器, 2020(6): 162-166.
- YE M L, LU Z L, NESTERENKO P N, et al. Comparative investigation on determination of melamine and thiourea in melamine-cyanuric acid complex by reversed phase liquid chromatography and ion exchange chromatography[J]. Analytical Instrumentation, 2020 (6): 162-166.
- [10] 王妍, 李志刚, 赵文涛, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定小麦粉中硫脲、曲酸、噻苯咪唑、噻二唑、四环素[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 324-330.
- WANG Y, LI Z G, ZHAO W T, et al. Simultaneous determination of thiourea, kojic acid, thiabendazole, thiadiazole and tetracycline in flour by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2021, 42(22): 324-330.
- [11] 何瑞云, 李莉, 张鑫, 等. 高效液相色谱法测定面粉及其制品中的硫脲[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2471-2476.
- HE R Y, LI L, ZHANG X, et al. Determination of thiourea in flour and flour products by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8 (7): 2471-2476.
- [12] 刘茂玲, 冯维春, 刘丽秀, 等. 反相离子对色谱法测定硫脲含量[J]. 现代化工, 2015, 35(2): 176-177, 179.
- LIU M L, FENG W C, LIU L X, et al. Determination of thiourea by reverse phase ion-pair chromatography [J]. Modern Chemical Industry, 2015, 35(2): 176-177, 179.
- [13] 曹靖丽, 王璐, 苏钟壁, 等. 高效液相色谱法测定食品添加剂中硫脲[J]. 理化检验: 化学分册, 2012, 48(4): 484-485.
- CAO J L, WANG L, SU Z B, et al. Determination of Thiourea in food additives by high performance liquid chromatography[J]. Physical Testing and Chemical Analysis: Part B: Chemical Analysis, 2012, 48(4): 484-485.
- [14] 李小亭, 王继坤, 赵志磊, 等. 高效液相色谱法测定小麦粉中硫脲的含量[J]. 食品工业科技, 2009(5): 2.
- LI X T, WANG J K, ZHAO Z L, et al. Determination of thiourea in flour by high performance liquid chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009(5): 2.
- [15] 任兴权, 王蓉, 侯莉莉, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器法测定面粉及其制品中的硫脲[J]. 食品科技, 2020, 45 (5): 6.
- REN X Q, WANG R, HOU L L, et al. Determination of Thiourea in Flour and Its Products by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector [J]. Food Science and Technology, 2020, 45(5): 6.
- [16] RAFFAELLI A, PUCCI S, LAZZARONI R, et al. Rapid determination of thiourea in waste water by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry using selected-reaction monitoring[J]. Rapid communications in mass spectrometry, 1997, 11(3): 259-264.
- [17] ZHANG Y X, XUE X, SU S F, et al. A multi-class, multi-residue method for detection of veterinary drugs in multiple meat using a pass-through cleanup SPE technique and UPLC-MS/MS analysis [J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(10): 2865-2884.
- [18] 张林田, 陆奕娜, 黄学泓, 等. 通过式净化-高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中42种兽药残留[J]. 分析科学学报, 2020, 36(1): 81-87.
- ZHANG L T, LU Y N, HUANG X H, et al. Determination of 42 kinds of veterinary drug residues in animal-derived products by passing purification-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Analytical Science, 2020, 36(1): 81-87.
- [19] 章豪, 吴银良, 张宜文, 等. PRIME HLB固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂产品中10种头孢类药物的残留量[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 7.
- ZHANG H, WU Y L, ZHANG Y W, et al. Determination of ten cephalosporin residues in bee products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with PRIME HLB solid phase extraction [J]. Food Science, 2020, 41(22): 7.