近红外光谱结合膜富集技术测定大米中毒死蜱农药残留

严寒[1]，郭平[2]，骆鹏杰[3]，文建萍[4]，范苑[4]，纪炜达[4]，吴瑞梅[4]，樊十全[4]

（1.江西省农业科学院农产品质量安全与标准研究所，江西南昌 330200）（2.江西出入境检验检疫局技术中心，江西南昌 330002）（3.国家食品安全风险评估中心，北京 100022）（4.江西农业大学工学院，江西南昌 330045）

摘要：本文以纤维滤膜富集大米中的微量农药残留，提高近红外光谱技术的检测限。向阴性大米样本中喷洒不同浓度毒死蜱标准溶液，制备含农药残留大米样品，以乙腈为溶剂提取大米中的毒死蜱农药，用氮吹仪将提取液浓缩后，使用滤纸富集提取液中的农药，真空冷冻干燥，采集滤纸的近红外漫反射光谱。运用特征波长筛选方法优选特征变量，建立大米中毒死蜱农药残留的近红外光谱分析模型。结果表明，利用联合区间偏最小二乘法方法从全光谱区优选出子区间[3 4 5 10]，进一步用遗传算法从子区间中优选 80 个变量时，所建模型性能最好。在 0.46~11.20 mg/kg 浓度范围内，模型对预测集样本的相关系数为 0.9798，预测均方根误差为 0.604 mg/kg，将该模型预测 4 个未知农药含量的大米样本，其预测值与实际测量值具有较好的一致性。研究表明该方法能较好地快速检测大米中微量农药残留。

关键词：近红外光谱；样品预处理；特征变量筛选；农药残留；毒死蜱

文章篇号：1673-9078(2017)4-289-294 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.044

Determination of Chlorpyrifos Pesticide Residues in Rice by NIR Spectroscopy Coupled with a Membrane Enrichment Technique

YAN Han[1], GUO Ping[2], LUO Peng-jie[3], WEN Jian-ping[4], FAN Yuan[4], JI Wei-da[4], WU Rui-mei[4], FAN Shi-quan[4]

(1.Institute for Quality & Safety and Standards of Agricultural Products Research, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China) (2.Technology Center, Jiangxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanchang, 330002 China) (3.China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing, 100022, China) (4.College of Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Fiber filters were used in this study to accumulate trace pesticide residues in rice in order to improve the detection limit for near-infrared (NIR) spectroscopy. Rice samples containing pesticide residues were prepared by spraying different concentrations of chlorpyrifos standard solutions onto non-contaminated rice. Acetonitrile was used to extract the chlorpyrifos from the rice, the extracted liquid was concentrated using a nitrogen-blowing instrument, and filter papers were used to collect the pesticide from the extracted liquid. After vacuum freeze-drying, the diffuse reflectance NIR spectra of filters were recorded using an NIR spectrometer. The results indicated that a model with a good performance could be established when the subinterval [3 4 5 10] was selected from the full spectral region using synergy interval partial least square (siPLS) algorithm, and 80 optimal variables were selected from the subinterval using a genetic algorithm (GA). Within the concentration range of 0.46~11.20 mg/kg, the correlation coefficient of the model for the samples in the prediction set (Rp) was 0.9798 with a root mean square error of prediction (RMSEP) of 0.604 mg/kg. The contents of chlorpyrifos pesticide in four rice samples were predicted by this model, and the prediction values were consistent with the measured values. The results show that this method can detect trace pesticide residues in rice effectively and quickly.

Key words: near-infrared spectroscopy; sample pretreatment; characteristic variable selection; pesticide residues; chlorpyrifos pesticide

收稿日期：2016-05-16

基金项目："十二五"国家科技支撑计划项目（2012BAK17B02）资助

作者简介：严寒（1978-），女，副研究员，主要从事农产品质量安全及标准制定

通讯作者：樊十全（1958-），男，副教授，主要从事农产品质量安全快速无损检测技术和装备研究

大米是我国的主要粮食之一，而我国的国情是人口多耕地面积少，农药则成为防治水稻病虫草害、提高单位面积产量的有效手段。农药残留检测已由色谱、质谱等常规检测方法发展到生物传感器和酶抑制法等快速检测方法[1,2]，以常见大型仪器为代表的检测方法准确可靠、拓展性强，但样品前处理复杂，检测耗时长，设备昂贵；生物传感器法、酶抑制法容易出现假阳性结果，难以实现农产品中农药残留的快速监测。

近红外光谱技术因具有快速、低成本、便于实时检测等优点，已广泛用于工业、食品和农产品等质量检测中[3~6]。而由于红外光谱仪器本身的限制，采用红外光谱技术则较难检测农产品中微量级（ppm 级）农药残留。近年来，国内外学者采用有机溶剂提取农产品中农药残留，利用纤维膜富集提取液中的农药，将纤维膜作为载体来提高近红外光谱的灵敏度。Acharya 等[7]分别采用丙酮和水清洗水果表面农药，将清洗液滴在玻璃纤维上，采集富集了农药的纤维膜的近红外光谱，建立模型的 *RMSECV* 值在 0.03~0.06 mg/kg。Sanchez 等[8]采用乙酸乙酯提取胡椒中的农药成分，利用近红外光谱结合膜富集法检测胡椒中的农药残留，建立了不同农残污染的偏最小二乘判别模型。Chen 等[9]利用近红外光谱结合膜富集法分析商用农药有效成分。陈贵平等[10]采用近红外光谱结合膜富集法测量饮料中的微量塑化剂（DEHP），所建模型的预测均方根误差为 0.2324 mg/L。沈飞等[11]采用硅胶来富集痕量辛硫磷农药，采集富有农药的硅胶的近红外光谱，实现痕量农药的定量检测。朱向荣等[12]采用特征变量筛选方法从稻米的近红外光谱中优选特征变量，建立稻米中重金属镉含量分析模型。

毒死蜱是一种高效广谱有机磷杀虫剂，是替代高毒有机磷农药之一，常用于农业害虫的防治。毒死蜱在稻米中的最大残留量为 0.5 mg/kg，而红外光谱技术的最低检测浓度为 1%。为提高红外光谱技术的检测限，本文尝试采用玻璃纤维膜富集大米提取液中的微量农药残留，通过分析富集有农药的纤维膜的近红外光谱，建立大米中微量农药残留的快速分析方法。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

QualitySpec Pro 可见近红外光谱仪（Analytical Spectral Devices，Inc.，美国），配有漫反射附件；三重四极杆气相色谱串联质谱仪（Agilent GC 7000，美国安捷伦科技有限公司）；Vortex-Qilinbeier 5 漩涡混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；YF-111 型高速粉碎机（江西瑞安永力制药机械有限公司）；氮吹浓缩仪（N-EVAP-112，Organomation Associates Inc.）。

毒死蜱标准品（纯度≥99.5%，德国 Dr. Ehrenstorfer 公司）；乙酸乙酯、乙腈（色谱纯，德国 Merck 公司）；PSA、C18 吸附剂（40 μm~60 μm，Agela Technologies），无水硫酸镁、氯化钠均为分析纯；阴性大米样本由江西出入境检验检疫技术中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 含农残大米样品制备

准确称取一定量的毒死蜱标准品，用乙酸乙酯溶解，配制浓度为 100 mg/L 的标准储备液。将标准溶液稀释成不同浓度梯度的毒死蜱溶液，将其喷洒在大米中，混合均匀，晾干，共配制 64 个样本，每个样本重 100 g。将大米粉碎后过 80 目筛，放于自封袋中保存。

1.2.2 色谱质谱仪器条件

（1）色谱条件

色谱柱：HP-5MS 30 m×0.25 mm×0.25 μm 的石英毛细管柱；进样口温度：250 ℃；升温程序：初始温度为 50 ℃，保持 2 min，以 50 ℃/min 升至 150 ℃，再以 5 ℃/min 升至 200 ℃，最后以 16 ℃/min 升至 280 ℃，保持 7 min；载气：氦气（纯度≥99.999%）；载气流速：1.2 mL/min；进样量：1 μL；进样方式：不分流进样。

（2）质谱条件

离子源：EI 源；离子源温度：230 ℃；四极杆温度：150 ℃；碰撞气：氮气（纯度≥99.999%）；采集模式：多反应监测模式（MRM）；MRM 参数信息见表 1。

表 1 毒死蜱的母离子、子离子和碰撞能量

Table 1 Parent ions, daughter ions, and collision energy of chlorpyrifos

名称	母离子(*m/z*)	子离子(*m/z*)	碰撞能量/V
毒死蜱	314*	257.80*	15
		165.90	35

注：标“*”的离子为定量离子对。

（3）标准曲线制作

用乙腈将标准储备液分别配制成 1 mg/L、4 mg/L、8 mg/L、10 mg/L 和 12 mg/L 的系列标准液，建立各组分离子的峰面积（y）与质量浓度（x）之间的线性方程，得到的标准曲线为 y=3724.321x+19.734（相关系数 R^2=0.9921）。

试验用大米采用气相色谱串联质谱方法检测其是否含有毒死蜱农药残留，图 1a 是未喷洒农药的大米谱图，图 1b 为含有毒死蜱农药的大米谱图。从图可知，用于制备含农残样本的大米未含有毒死蜱农药。

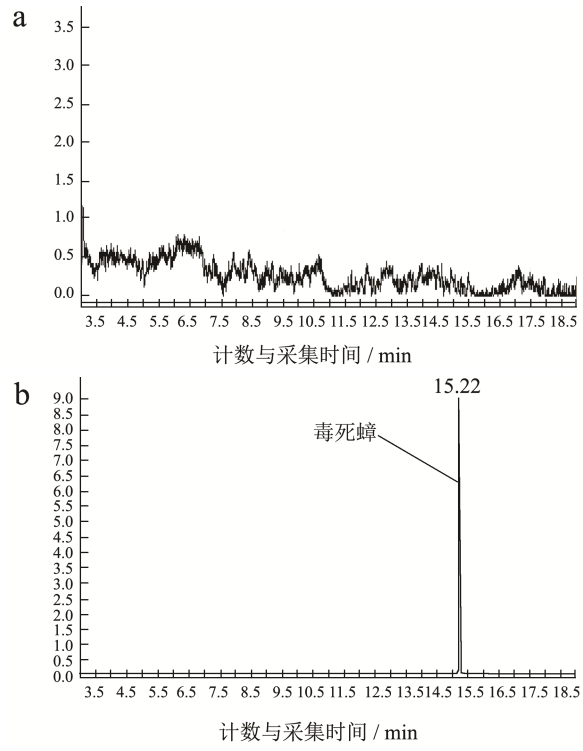


图 1 原始大米（a）和添加浓度为 0.1 mg/L 毒死蜱农药的大米（b）质谱图

Fig.1 Chromatograms of untreated rice (a) and rice after the addition of 0.1 mg/L chlorpyrifos pesticide (b)

1.3 大米提取液玻璃纤维膜富集与近红外光谱采集

称取 5 g 大米放于离心管中，依次加入 10 mL 水、10 mL 乙腈、5 g 氯化钠，涡旋混合 1 min，以 4200 转/分离心 5 min，将上清液用氮吹仪吹干，乙腈挥发完全后，向离心管中加入 0.5 mL 乙腈，溶解离心管中的粉末后，将溶解液滴在直径为 47 mm 的玻璃纤维膜上（0.5 mL 液体正好能湿透此纤维膜），置于冷冻干燥器内干燥 50 min 后，采集纤维膜的近红外光谱。

采用漫反射方式采集样本的近红外光谱，采集参数如下：波长范围为 350~1800 nm，采样间隔 1 nm，扫描 32 次求平均，以空气为参比。采集过程中，纤维膜旋转一周，采集得到其原始光谱。

1.4 数据分析方法

采用联合区间偏最小二乘法（synergy interval PLS，siPLS)和遗传算法(genetic algorithm，GA）优选特征变量，利用交互验证法（cross-validation）优化模型参数。所有数据分析基于 Matlab V 7.8.0 平台完成。

2 结果与讨论

2.1 富集大米提取液的纤维膜的近红外光谱

图 2a 为富集含农残大米提取液的纤维膜的近红外谱图。光谱在 1170~1220 nm 和 1440~1490 nm 波段范围内有强吸收峰，1170~1220 nm 波段是 C-H、N-H 和 O-H 基团的三倍频信息，1440~1490 nm 波段是 C-H、N-H 和 O-H 基团的二倍频信息[13]。数据分析前，预处理原始光谱，以消除仪器、环境等噪音信息的影响，预处理后的光谱见图 2b。

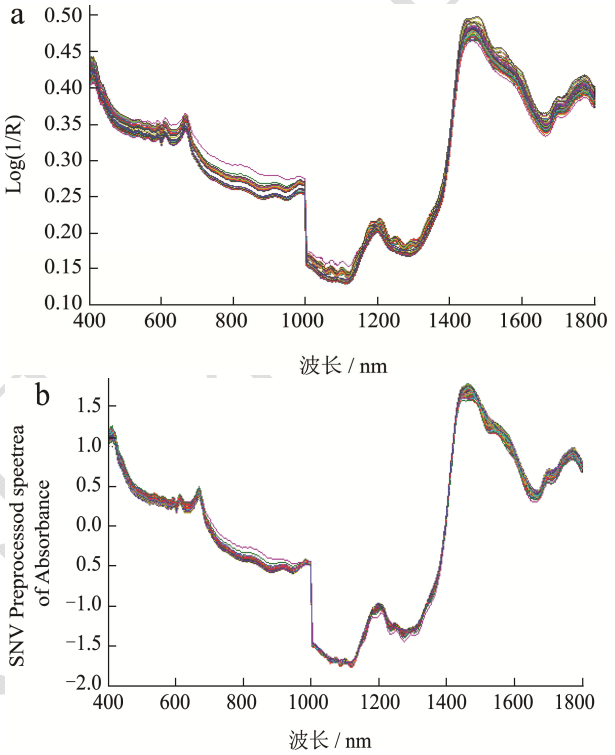


图 2 大米的近红外原始光谱（a）及 SNV 预处理光谱（b）

Fig.2 NIR original spectra (a) and SNV preprocessed spectra (b) of fiber paper containing chlorpyrifos pesticides

2.2 siPLS 方法筛选特征光谱区间

表 2 样本校正集和预测集化学测量结果

Table 2 Reference measurements and sample numbers in the calibration and prediction sets

样本集	数量	范围 /(mg/kg)	均值 /(mg/kg)	标准方差 /(mg/kg)
校正集	43	0.44~11.20	4.230	3.100
预测集	21	0.46~10.63	4.110	3.020

表 2 是所有样本中毒死蜱化学测定结果，从其中选 43 个作为校正集用于建立校正模型，余下作为预测集，用于验证模型性能。

siPLS是一种有效的波长筛选方法[14]，能有效提取待测物的特征信息，排除无关信息和噪声信息对模型性能影响。子区间数的划分直接决定了优选结果，将

光谱区分别等分成11~25个子区间，联合其中的2、3、4个建立PLS模型，优选结果见表3。对比表中各种不同划分结果，当划分14个子区间，联合子区间3、4、5、10，使用前10个主成分所建模型性能最好。各子区间对应的光谱范围为：558~661、612~765、766~861和1286~1388 nm。毒死蜱的分子式为$C_9H_{11}C_{l3}NO_3PS$，在766~861波长范围内包含了C-H、N-H和O-H基团的三倍频信息，在1286~1388 nm范围内包含了C-H、N-H的一阶倍频信息，另外还优选出2个可见光区间：558~661、612~765。利用4个区间波数变量建立PLS模型，在校正集中，所建校正模型的相关系数为0.973，交互验证均方根误差（RMSECV）为0.708 mg/kg；用预测集样本预测模型的相关系数为0.974，预测均方根误差（RMSEP）为0.668 mg/kg。

表 3 由 siPLS 筛选特征光谱区间结果

Table 3 Results of characteristic spectral regions selected by siPLS

区间数	主成分数	优选子区间	校正集		预测集	
			相关系数	*RMSECV*/(mg/kg)	相关系数	*RMSEP*/(mg/kg)
11	10	[2 3 7 8]	0.972	0.723	0.953	0.896
12	9	[2 7 8]	0.968	0.769	0.928	1.110
13	9	[2 7 11 12]	0.974	0.699	0.927	1.250
14	10	[3 4 5 10]	0.973	0.708	0.974	0.668
15	10	[3 4 5 10]	0.980	0.618	0.964	0.801
16	13	[5 6 10]	0.975	0.686	0.952	0.899
17	9	[3 5 6 11]	0.983	0.566	0.960	0.833
18	12	[3 6 10 12]	0.978	0.642	0.967	0.756
19	10	[4 6 7 12]	0.984	0.548	0.955	0.881
20	15	[4 6 7 13]	0.985	0.545	0.941	1.010
21	9	[6 7 13]	0.980	0.614	0.972	0.704
22	9	[4 8 14]	0.978	0.615	0.925	1.130
23	10	[7 8 15]	0.980	0.619	0.916	1.210
24	13	[7 8 9 15]	0.986	0.509	0.950	0.926
25	10	[8 9 10 16]	0.984	0.540	0.950	0.966

2.3 GA 方法优选特征变量

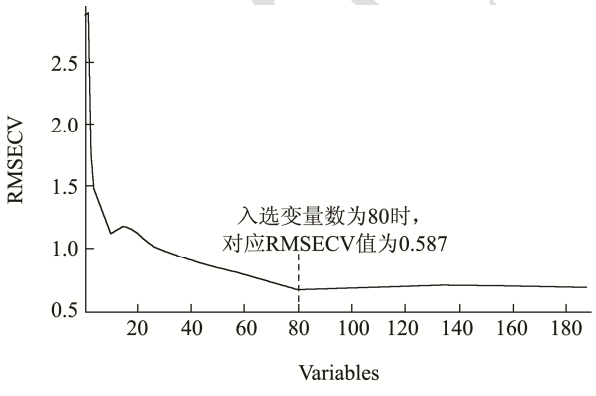
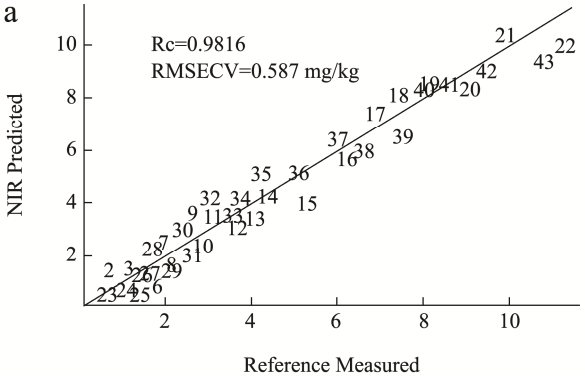


图 3 由 RMSECV 构造适应度函数时入选的变量数

Fig.3 *RMSECV* as a function of the number of variables included

优选的 4 个光谱区间还包含了与毒死蜱无关的信息。吴瑞梅等[15]研究表明，遗传算法能优选出与待测组分最相关的特征信息，提高模型精度。在[3 4 5 10]区间组合内，进一步采用 GA 方法优选特征变量，参数设置如下：初始群体为 100，变异概率为 0.01，交叉概率为 0.5，以校正集中的 *RMSECV* 值构造适应度函数。图 3 是由 GA 方法选取变量数构建模型的 *RMSECV* 图。由图可看出，当优选出中 80 个变量建立模型的 *RMSECV* 最小。因此，由此 80 个变量建立 PLS 模型，对于校正集样本，模型的相关系数为 0.9816、RMSECV 为 0.587 mg/kg，用预测集样本预测模型的相关系数为 0.9798、RMSEP 为 0.604 mg/kg。图 4 是校正集和预测集样本对模型的预测值与化学值之间的散点图。



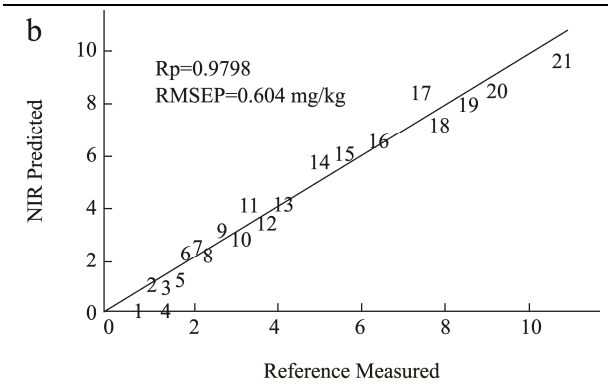


图 4 校正集（a）和预测集（b）的近红外预测值和参考测量值

Fig.4 Reference measurement versus NIR prediction in the calibration set (a) and prediction set (b)

2.4 模型性能比较与讨论

表 4 不同模型结果比较

Table 4 Comparison of results from different models

模型	主成分数	变量数	校正集		预测集	
			R_c	*RMSECV* /(mg/kg)	R_p	*RMSEP* /(mg/kg)
PLS	4	1451	0.87	1.56	0.82	1.74
siPLS	10	415	0.97	0.71	0.97	0.67
siPLS-GA	10	80	0.98	0.59	0.98	0.60

表 4 是采用不同变量筛选方法所建模型性能比较。从表可知，全光谱区所建模型性能最差，这是因为全光谱区将毒死蜱和一些其它无关信息和噪音信息参与建模，削弱了模型的精度和稳定性。而采用 GA 进一步从 siPLS 优选的特征变量所建模型性能最好，这是因为由 siPLS 可有效筛选出与毒死蜱相关的光谱区间信息，能避免一些无关信息和噪音信息的影响，从而使模型精度得到大副度提高；而由遗传算法在 siPLS 筛选的几个子区间上进一步优选与毒死蜱最相关的特征信息建立模型，避免了相邻变量间的线性相关性，模型的预测能力得到提高，同时所建模型的变量数减少了 81%，模型更简洁。

2.5 预测模型的有效性评价

表 5 大米中毒死蜱的 NIR 预测值与实际测量值

Table 5 Comparison of measured values and predicted values of chlorpyrifos content in rice

样本(n)	真实值 /(mg/kg)	预测值 /(mg/kg)	百分偏差 /%	预测回收率 /%
1	0.540	0.543	-0.796	100.796
2	1.250	1.157	7.448	92.552
3	3.530	3.286	6.926	93.074
4	6.310	6.021	4.582	95.418

为检验大米中毒死蜱农药的近红外光谱检测方法的有效性，选择 4 个含有毒死蜱农药残留的大米样本，采集其近红外光谱，同时测量其化学值，采用所建立的 siPLS-GA 模型对样本毒死蜱残留量进行预测，并与化学方法结果进行比较，见表 5 所示。从表可看出，模型预测结果与实际测量值基本一致，模型的预测回收率为 92.552.16~100.796%，其预测值与实际测定值的百分偏差的绝对值为 0.796~7.448%，说明该方法能初步快速筛查大米中的农药残留。

3 结论

采用有机溶剂提取大米中毒死蜱农药，利用纤维膜富集微量毒死蜱农药，建立了大米中微量农药残留的近红外光谱快速分析方法。运用特征波长筛选方法优选特征变量建立 PLS 模型，在检测浓度为 0.46~11.20 mg/kg 范围内，所建模型对 21 个样本的 RMSEP 为 0.604 mg/kg，预测相关系数为 0.9798。研究表明，采用膜富集浓缩的提取液，能有效降低近红外光谱技术的最低检测浓度，单个样本检测时间（约 1.1 h）远低于经典化学方法的，检测成本大大降低。说明近红外光谱技术结合纤维膜富集方法可作为大米中微量农药残留快速检测的一种有效分析方法。

参考文献

[1] 苏祖芳,周杨平,丁海红.大米诊断[M].上海:上海科技出版社,2007
SU Zu-fang, ZHOU Yang-ping, DING Hai-hong. Rice diagnosis [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2007

[2] Zhang A, Zhou L, Zhang P P, et al. Bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the determination of organophosphorus pesticides in water samples by high performance liquid chromatography [J]. Analytical Letter, 2012, 45(14): 1971-1979

[3] Belmonte V N, Retamal M, Mezcua M, et al. A sensitive and selective method for the determination of selected pesticides in fruit by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1264(22): 110-116

[4] Balabin R M, Lomakina E I, Safieva R A. Neural network (ANN) approach to biodiesel analysis: Analysis of biodiesel density, kinematic viscosity, methanol and water contents using near infrared (NIR) spectroscopy [J]. Fuel, 2011, 90(5): 2007-2015

[5] 刘嘉,赵秋爽,李明奇,等.近红外光谱快速检测巧克力中掺

假淀粉[J]. 现代食品科技,2015,31(3):260-265
LIU Jia, ZHAO Qiu-shuang, LI Ming-qi, et al. Rapid detection od adulterate starch in chocolate by near infrared spectroscoy [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(3): 260-265

[6] 吴建虎,黄钧.可见/近红外光谱技术无损检测新鲜鸡蛋蛋白质含量的研究[J].现代食品科技,2015,31(5):285-290
WU Jian-hu, HUANG Jun. Nondestructive detection of protein content in fresh eggs by visible/near infrared reflectance spectroscopy [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(5): 285-290

[7] Acharya U K, Subedi P P, Walsh K B. Evaluation of a dry extract system involving NIR spectroscopy (DESIR) for rapid assessment of pesticide contamination of fruit surface [J]. American Journal of Analytical Chemistry, 2012, 3: 524-533

[8] Sanchez M T, Katherine F R, Guerrero J E, et al. Measurement of pesticide in peppers by near-infrared reflectance spectroscopy [J]. Pest Management Science, 2010, 66(6): 580-580

[9] Chen J Peng Y, Li Y, Wang W, et al. A method for determining organophosphorus pesticide concentration based on near infrared spectroscopy [J]. Transactions of the ASABE, 2011, 54(3): 1025-1030

[10] 陈贵平,童佩瑾,耿金培,等.近红外光谱结合膜富集技术测定饮料中微量邻苯二甲酸二异辛酯的含量[J].分析测试学报,2012,31(5):605-608
CHEN Gui-ping, TONG Pei-jin, GENG Jin-pei, et al. Dtermination of trace diisooctyphthalate in drink by NIR spectroscopy coupled with membrance enrichment technique [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2012, 31(5): 605-608

[11] 沈飞,闫战科,叶尊忠,等.近红外光谱分析技术在辛硫磷农药残留检测中的应用[J].光谱学与光谱分析,2009,29(9):2421-2424
SHEN Fei, YAN Zhan-ke, YE Zun-zhong, et al. Application of near infrared spectroscopy to detection of pesticide phoxim residues [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(9): 2421-2424

[12] 朱向荣,李高阳,苏东林,等.基于近红外光谱与组合间隔偏最小二乘法的稻米镉含量快速检测[J].食品与机械,2015,31(4):43-46
ZHU Xiang-rong, LI Gao-yang, SU Dong-lin, et al. The feasibility of rapid determination of the cadmium content in rice based on near infrared spectroscopy and synergy interval partial least squares [J]. Food & Machinery, 2015, 31(4): 43-46

[13] 严衍禄,赵龙莲,韩东海.近红外光谱分析基础与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2005
YAN Yan-lu, ZHAO Long-lian, HAN Dong-hai. The foundation and application of near infrared spectroscopy analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005

[14] Norgaard L, Saudland A, Wagner J, et al. Interval partial least-squares regression (iPLS): a comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy [J]. Applied Spectroscopy, 2000, 54(3): 413-419

[15] 吴瑞梅,赵杰文,陈全胜,等.近红外光谱技术结合特征变量筛选快速检测绿茶滋味品质[J].光谱学与光谱分析,2011,31(7):1782-1785
WU Rui-mei, ZHAO Jie-wen, CHEN quan-sheng, et al. Determination of taste quality of green tea using FT-NIR spectroscopy and variable selection methods [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(7): 1782-1785