

超高效液相色谱串联质谱法测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸的含量

史晓磊 (上海德诺产品检测有限公司, 上海 200436)

摘要 [目的]采用超高效液相色谱串联质谱法建立豆芽中 4-氯苯氧乙酸的定性定量分析方法。[方法]样品经 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液提取, Oasis HLB 固相萃取小柱净化, C₁₈ 色谱柱分离, 乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 采用电喷雾离子源多反应监测模式下液相色谱串联质谱法检测, 基质曲线外标法定量。[结果]在最佳检测条件下, 4-氯苯氧乙酸在 20~500 μg/L 线性关系良好, 相关系数为 0.998 1, 检出限(S/N=3)为 20 μg/kg。在加标水平为 20、60、100 μg/kg 时的平均加标回收率分别为 87.62%、102.10% 和 100.00%, 其相对标准偏差(RSD)分别为 3.48%、4.92% 和 6.59%。[结论]该方法具有灵敏度高、准确度和稳定性良好、操作简便等特点, 能够满足残留分析的要求。

关键词 超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS); 固相萃取(SPE); 豆芽; 4-氯苯氧乙酸
中图分类号 TS207 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)24-080-02

Determination of 4-Chlorophenoxyacetic Acid in Bean Sprout by UPLC-MS/MS

SHI Xiao-lei (Shanghai DtsChina Co., Ltd., Shanghai 200436)

Abstract [Objective] To establish a qualitative and quantitative analysis method for 4-chlorophenoxyacetic acid in bean sprout by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). [Method] The sample was extracted with 0.01 mol/L sodium hydroxide solution, and cleaned up with Oasis HLB. The separations were performed on a C₁₈ column, with a mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile and detected by positive-ion electrospray ionization mode and multi-reaction monitoring (MRM) mode. [Result] Under the optimal test condition, 4-chlorophenoxyacetic acid showed good linear relationship within the range of 20-500 μg/L, with correlation coefficient of 0.998 1. The limit of detection(S/N=3) was 20.0 μg/kg. The average recovery rates at three spiked levels of 20, 60, 100 μg/kg were 87.62%, 102.10% and 100.00%, respectively. The relative standard deviations (RSD) were 3.48%, 4.92% and 6.59%, respectively. [Conclusion] This method had the characteristics of high sensitivity and accuracy, which can meet the requirement of retention analysis.

Key words UPLC-MS/MS; Solid phase extraction; Bean sprout; 4-Chlorophenoxyacetic acid

4-氯苯氧乙酸, 又称对氯苯氧乙酸钠, 作为一种植物生长调节剂, 能有效地提高豆芽产量和质量。很多不法商贩为了利益, 违法国家规定, 在生产豆芽时继续添加 4-氯苯氧乙酸。目前, 关于豆芽中 4-氯苯氧乙酸的含量分析, 大多采用高效液相色谱法^[1-8], 该方法灵敏度高、分离效果好、定量准确, 已被证明是一种成熟的分析方法。然而采用液相色谱进行分析时, 被测物与干扰物在色谱柱中具有相同保留时间的现象时有发生, 对易污染的样品易造成假阳性。近 2 年也有研究采用离子色谱法^[9]、液相色谱串联质谱法进行测定^[10-12]。笔者利用目前国际上最为先进和普遍采用的残留检测技术(LC/MS/MS)和固相萃取(SPE)样品净化前处理技术, 建立了豆芽中 4-氯苯氧乙酸残留量的液相色谱-质谱/质谱(LC/MS/MS)检测方法和阳性确证方法。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 超高效液相色谱-质谱/质谱仪配有电喷雾离子源(UPLC-MS/MS-ESI)(美国 Waters 公司); Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm i. d. × 100 mm, 1.7 μm)和 Oasis HLB 固相萃取小柱(60 mg, 3 mL)均购自美国 Waters 公司; 电子分析天平(精度为 0.0001 g, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司); 电子分析天平(精度为 0.01 g, 德国 Sartorius ME 公司); 高速匀浆机(德国 IKA T18, 3 500~24 000 r/min); 涡旋振荡器(美国 talboys 230V, 500~2 500 r/min); 固相萃取仪(安谱公司); 冷冻离心机和超纯水仪(美国 Thermo Fisher 公司)。4-氯苯氧乙酸标准品购于

Dr. Ehrenstorfer(德国); 甲醇(德国 Merck KGaA 公司)、乙腈(Sigma 公司)、甲酸(Sigma 公司)均为 HPLC 纯; 磷酸(H₃PO₄)、氢氧化钠(NaOH)为分析纯(中国医药上海化学试剂公司); pH 试纸(中国医药上海化学试剂公司); 试验用水为超纯水。

1.2 样品前处理

1.2.1 样品提取。称量待测样品 5 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液, 高速匀浆 2 min 提取, 然后在 8 000 r/min 下离心 5 min, 将上清液转移至 25 mL 容量瓶中。残渣中再加入 10 mL 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液, 按上述方法重复提取一次, 合并 2 次提取溶液, 用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液定容至刻度, 混匀。准确移取 10.0 mL 提取液, 用 50% 磷酸溶液调节提取液 pH 为 2.5 ± 0.2, 待净化用。

1.2.2 样品净化。将全部样品提取液通过已活化(3 mL 甲醇、3 mL 水)的 Oasis HLB 固相萃取小柱, 上样后再用 3 mL 磷酸水溶液淋洗, 淋洗后在固相萃取装置上真空抽干水分 10 min, 经 4 mL 甲醇洗脱, 收集至 10 mL 玻璃试管中, 40 °C 氮气吹干, 加入 1.0 mL 30% 甲醇水溶液, 充分旋涡溶解, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 待 LC-MS/MS 分析。

1.3 仪器条件

1.3.1 色谱条件。流动相的组成和梯度见表 1。

1.3.2 质谱条件。采用 1.0 mg/L 4-氯苯乙酸标准溶液在负离子模式下进行母离子全扫描, 确定其分子离子, 并对仪器电离电压、锥孔电压、离子源温、碰撞能量等参数进行优化。

离子化模式: 电喷雾电离(负离子模式); 质谱扫描方式: 多反应监测(MRM); 离子源温度: 150 °C; 毛细管电压: 1.5 kV; 脱溶

作者简介 史晓磊(1988-), 男, 黑龙江黑河人, 助理工程师, 硕士, 从事质谱分析研究。

收稿日期 2016-07-04

剂温度:400 ℃;脱溶剂气流:800 L/h;碰撞气:氩气。4-氯苯氧乙酸的质谱参数:母离子(m/z)185.1,子离子(m/z)126.9^{*}、110.9,锥孔电压-18、-18V,碰撞能量-16、-16V。

表 1 流动相的组成和梯度

Table 1 Composition and gradient of flow phase

时间 Time min	流速 Flow rate $\mu\text{L}/\text{min}$	0.1% 甲酸水 0.1% Formic acid water//%	乙腈 Acetonitrile %
0.0	300	80	20
1.5	300	80	20
3.0	300	10	90
5.0	300	10	90
5.1	300	80	20
6.0	300	80	20

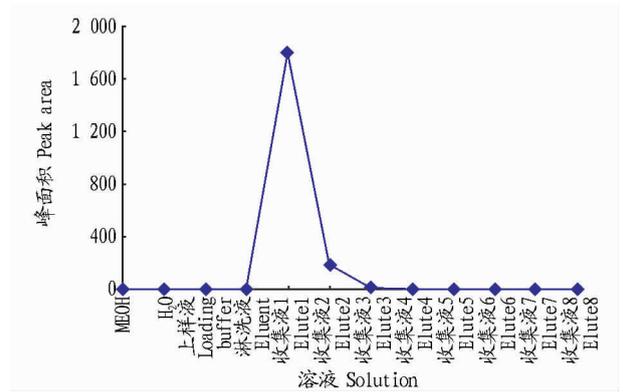


图 1 Oasis HLB 固相萃取小柱洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of solid phase extraction of Oasis HLB

2 结果与分析

2.1 样品的净化 根据豆芽基质的特点,采用 Oasis HLB 固相萃取柱净化,并对其净化条件进行试验,以达到 Oasis HLB 固相萃取柱对 4-氯苯氧乙酸分离的最佳净化效果。向空白豆芽基质中加入一定浓度的 4-氯苯氧乙酸标准工作溶液,并按优化后的方法通过 Oasis HLB 固相萃取小柱,收集活化时所用的甲醇、水以及样品流出液、淋洗液和洗脱液于不同试管中,分别检测各流出液中 4-氯苯氧乙酸的含量和回收率,以确定 Oasis HLB 固相萃取小柱对 4-氯苯氧乙酸净化的洗脱液最佳收集体积。由图 1 可知,4-氯苯氧乙酸在 Oasis HLB 固相萃取小柱上在 20 mL 前完全流出。因此,选择 4 mL 洗脱液可最大程度地除去豆芽基质的干扰,同时保证 4-氯苯氧乙酸的回收率符合检测要求。

2.2 色谱条件的优化 色谱柱的选择:为了有利于色谱峰的分离及峰形的改善,分别比较 2 种色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱和 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱对 4-氯苯氧乙酸分离程度和响应值的影响。经试验证明,使用 C₁₈ 色谱柱分离效果更好,4-氯苯氧乙酸响应值更高。

流动相的选择:在流动相中加入酸性物质或者缓冲盐,可以增强待测物在色谱柱上的保留效果,并提高分离度,有效改善峰形,比较 4-氯苯氧乙酸在 3 种流动相乙腈-甲酸铵、乙腈-0.1% 甲酸水和乙腈-乙酸铵中的分离效果,发现使用乙腈-0.1% 甲酸水溶液做流动相时能更好地将待测组分与豆芽基质最大限度地分开。

4-氯苯氧乙酸标准品和豆芽中添加 4-氯苯氧乙酸标样的提取离子色谱见图 2。

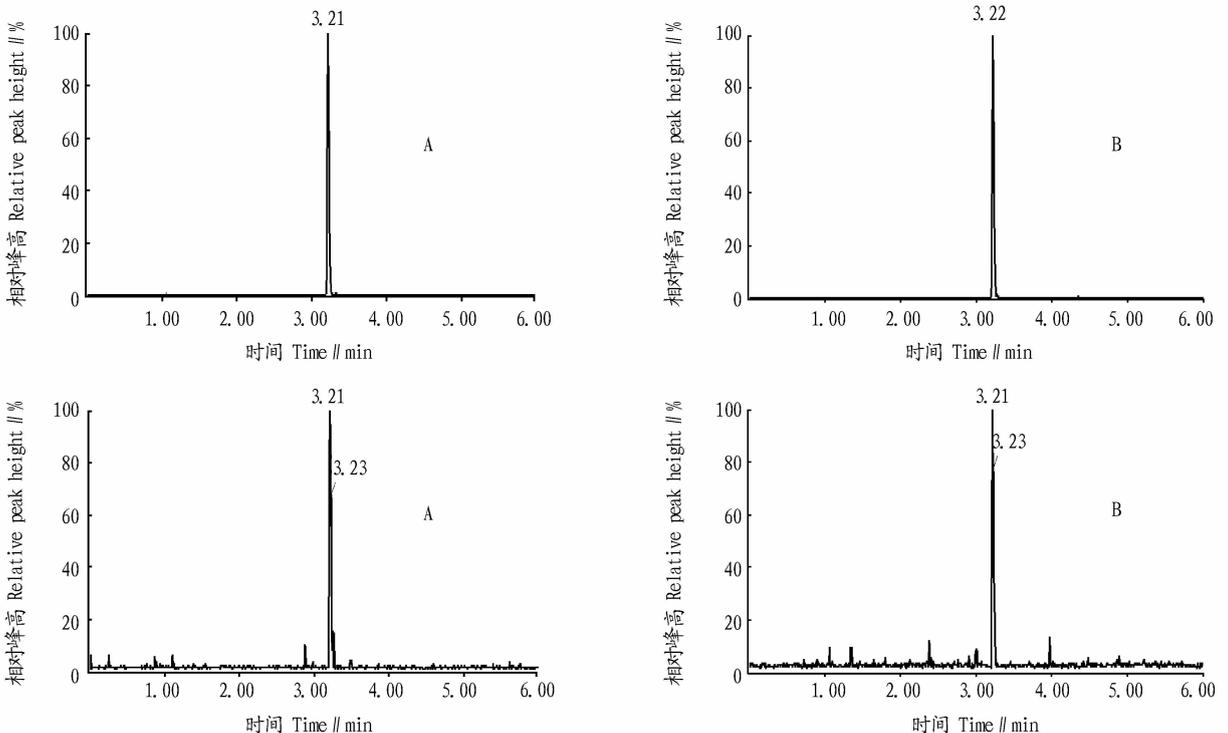


图 2 4-氯苯氧乙酸标准品(A)和样品加标(B)提取离子色谱图

Fig.2 Extraction ion chromatograms of 4-chlorophenoxyacetic acid standard substances (A), blank bean sprouts sample (B) and fortified sample with 4-chlorophenoxyacetic acid (C)

0.05,达到显著水平。

由回归方程并结合响应面分析,得到超声提取胡麻胶的最佳工艺参数:超声功率 280 W,提取温度 56 ℃,提取时间 57 min,在此条件下,胡麻胶的理论提取率为 14.62%。

2.6 验证试验 为验证响应面分析法所得结果的可靠性,采用上述优化条件进行 5 次平行试验。在实际提取过程中,将试验条件调整为提取功率 280 W,提取温度 55 ℃,提取时间 55 min,进行验证试验,得到胡麻胶的平均提取率为 16.71%,与理论值较为接近,表明该数学模型对优化超声提取胡麻胶的工艺是可行的。

3 结论

该研究采用响应面法对超声提取胡麻胶的工艺进行优

(上接第 81 页)

2.3 4-氯苯氧乙酸的检出限和线性范围 用空白豆芽样品作为基质溶液逐级稀释标准工作溶液,以验证方法的灵敏度,以信噪比(S/N)为 3:1 时的浓度确定为检出限(LOD),并配制一系列浓度的标准工作溶液,采用上述色谱条件进行测定,以定量离子的峰面积 Y 为纵坐标,浓度 $X(\mu\text{g/L})$ 为横坐标进行线性回归分析,重复 6 次,取平均值。结果表明,该方法 4-氯苯氧乙酸的最低检出限为 20 $\mu\text{g/kg}$,4-氯苯氧乙酸标准溶液浓度在 20~500 $\mu\text{g/L}$ 与响应值线性关系良好,回归方程为 $Y=6.63566x+85.559$,相关系数 $r=0.9981$ 。

2.4 方法的准确度和精密度 在不含 4-氯苯氧乙酸的豆芽样品中加入标准工作溶液,配制 20、60、100 $\mu\text{g/kg}$ 3 个水平的加标样品,按优化后的提取方法和色谱条件进行添加回收率试验,结果见表 3。由表 3 可知,在加标水平为 20、60、100 $\mu\text{g/kg}$ 时平均回收率分别为 87.62%、102.10% 和 100.00%,其 RSD 分别为 3.48%、4.92% 和 6.59%。表明该研究采用的提取、净化、检测方法具有较高的准确度和较好的重复性,均可满足 4-氯苯氧乙酸在豆芽中残留分析的要求。

表 3 豆芽中 4-氯苯氧乙酸标样添加回收率

Table 3 Average recovery rate of 4-chlorophenoxyacetic acid in bean sprouts

添加水平 Spiked level $\mu\text{g/kg}$	试验号 Test code	检测值 Detected valu $\mu\text{g/kg}$	回收率 Recovery rate %	平均回收率 Average recovery rate //%	相对标准偏差 RSD %
20	1	18.23	91.13	87.62	3.48
	2	18.26	91.32		
	3	17.22	86.10		
	4	16.90	84.52		
	5	17.59	87.93		
	6	16.94	84.71		
60	1	63.68	106.13	102.10	4.92
	2	57.74	96.24		
	3	62.78	104.64		
	4	60.82	101.36		
	5	57.74	96.24		
	6	64.78	107.96		
100	1	91.50	91.50	100.00	6.59
	2	101.73	101.73		
	3	102.45	102.45		
	4	92.19	92.19		
	5	106.85	106.85		
	6	105.26	105.26		

化,结果表明,超声提取胡麻胶的最佳工艺参数:超声功率 280 W,提取温度 56 ℃,提取时间 57 min,在此条件下,胡麻胶的理论提取率为 14.62%。经验证试验表明,该工艺切实可行,可为胡麻胶的高效提取提供理论依据,也为其他植物胶的提取提供参考。

参考文献

- [1] 罗彤彤,唐燕祥,单齐梅,等. 胡麻胶提取新工艺的研究[J]. 矿冶,2003,12(4):92-95.
- [2] 黄慧福,赵从从. 影响胡麻胶黏度因素的研究[J]. 食品科技,2012,37(12):264-267.
- [3] 施树,赵国华. 胡麻籽功能成分的研究与应用进展[J]. 中国食品添加剂,2007(6):117-119.
- [4] 林建原,季丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J]. 中国食品学报,2013,13(2):83-90.

2.5 样品分析 应用该方法对市面上购买的 20 组豆芽样品进行检测,结果其中 2 组含有 4-氯苯氧乙酸,残留量分别为 40.97 和 29.36 $\mu\text{g/kg}$ 。在实验室内分别培育 10 组不含目标化合物的黄豆芽、绿豆芽样品,采用该方法进行检测,未发现 4-氯苯氧乙酸残留,证明该方法在实践中具有可操作性。

3 结论

该研究采用氢氧化钠溶液提取,经 Oasis HLB 固相萃取柱净化,液相色谱串联质谱法测定,最终建立了固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸残留量的方法。经验证该方法能够有效地检测 4-氯苯氧乙酸在豆芽样品中的残留,并具有灵敏度高、准确度和稳定性良好、操作简捷等特点,满足豆芽样品中 4-氯苯氧乙酸残留分析的要求,同时为 4-氯苯氧乙酸在其他植物源食品中的残留分析提供参考。

参考文献

- [1] 北京市海淀区产品质量监督检验所(国家食品质量监督检验中心). 豆芽中 4-氯苯氧乙酸 6-苄基腺嘌呤 2,4-滴 赤霉素 福美双的测定,DB11/T 379—2006[S]. 北京:北京市质量技术监督局,2006.
- [2] 吉林农业大学. 豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠的测定 高效液相色谱法:DBS22/009—2013[S]. 吉林省卫生厅,2013.
- [3] 张玉娟,张志强,刘静. 豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠检测现状综述[J]. 科技风,2014(15):177,195.
- [4] 夏慧,陆自强,杨益众. 高效液相色谱法测定豆芽中 2,4-二氯苯氧乙酸残留[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2011,32(4):86-89.
- [5] WONG Y S. Gas liquid chromatography determination of 4-chlorophenoxyacetic acid residues in mung bean sprouts[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1982,65(5):1118-1121.
- [6] 劳水兵,刘丽辉,周其峰. 2-甲基-4-氯苯氧乙酸钠在甘蔗茎和土壤中的残留检测方法[J]. 广东农业科学,2014(1):137-140.
- [7] 黄卫平. 高效液相色谱法测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠残留量[J]. 检验技术,2002,36(1):44-45.
- [8] 李小平,蒋经纬,范建中,等. 固相萃取 HPLC 法测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(3):267-268.
- [9] 颜金良,颜勇卿,王立,等. 离子色谱法快速测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸残留量[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(10):1207-1208.
- [10] GE L, PEH C Y C, YONG J W H, et al. Analyses of gibberellins by capillary electrophoresis-mass spectrometry combined with solid-phase extraction[J]. Chromatogr A, 2007,1159(1/2):242-249.
- [11] 张亚莲,柳茜,王岁楼,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定豆芽中 8 种药物残留[J]. 分析测试学报,2015,34(2):164-170.
- [12] 谢寒冰,周明莹,赵海峰,等. 高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法同时检测豆芽中的 3 种外源植物激素残留[J]. 色谱,2014,32(5):493-498.