

多功能针式过滤器-高效液相色谱法快速检测 豆芽中的吲哚乙酸

覃国新, 闫飞燕, 周其峰*, 李慧玲, 劳水兵, 杨玉霞, 莫仁甫, 罗丽红, 陈泳敏, 何洁, 韦宇宁, 王海军
(广西壮族自治区农业科学院农产品质量安全与检测技术研究所, 农业部甘蔗品质监督检验测试中心(南宁), 广西南宁 530007)

摘要: 基于 QuEChERS 原理, 该研究建立了多功能针式过滤器-高效液相色谱法快速检测豆芽中的吲哚乙酸。样品经 1% 乙酸乙腈和 1 g 氯化钠、2 g 硫酸镁提取, 多功能针式过滤器快速净化后, 采用 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6×250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以乙腈和 0.1% 甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温: 35 °C, 检测波长: 267 nm, 对提取净化液中吲哚乙酸含量进行高效液相色谱检测。吲哚乙酸在豆芽基质中基质效应较小, 故使用纯溶剂配制的标准曲线进行定量。结果显示, 吲哚乙酸在 0.05~10.0 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.9999。在 0.1~5.0 mg/kg 的加标水平范围内得到的平均回收率为 80.6%~105.3%, 相对标准偏差 (RSD) 是 2.3%~4.6%。检出限为 0.03 μg/kg, 定量下限为 0.1 μg/kg。该方法操作简单、准确可靠, 适用于豆芽中吲哚乙酸残留量的快速检测。

关键词: 高效液相色谱; 多功能针式过滤器; 豆芽; 吲哚乙酸

文章编号: 1673-9078(2022)01-324-328

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0565

A Multifunctional Needle Filter-HPLC Method for the Rapid Determination of Indole Acetic Acid in Bean Sprouts

QIN Guoxin, YAN Feiyan, ZHOU Qifeng*, LI Huiling, LAO Shuibing, YANG Yuxia, MO Renfu, LUO Lihong,
CHEN Yongxian, HE Jie, WEI Yuning, WANG Haijun

(Institute for Agricultural Product Quality Safety and Testing Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Quality Inspection and Test Center for Sugarcane and Its Product, China Ministry of Agriculture (Nanning), Nanning 530007, China)

Abstract: To rapidly determine indole acetic acid (IAA) in bean sprouts, a multifunctional needle filter-high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established based on the quick, easy, inexpensive, effective, robust, and safe (QuEChERS) method. Samples were subjected to extraction with 1.0% acetonitrile acetate with the addition of 1 g sodium chloride and 2 g magnesium sulfate. This was followed by rapid purification using a multifunctional needle filter. The IAA content of the purified extract was then measured by HPLC on a Zorbax SB-C₁₈ column (4.6×250 mm, 5 μm) with acetonitrile and 0.1% formic acid as the mobile phase. Gradient elution was performed under the following conditions: flow rate: 1.0 mL/min, column temperature: 35 °C, detection wave length: 267 nm. Considering the low matrix effect of IAA in the bean sprout matrix, quantification was performed using standard curves obtained with the pure solvent. IAA exhibited a

引文格式:

覃国新, 闫飞燕, 周其峰, 等. 多功能针式过滤器-高效液相色谱法快速检测豆芽中的吲哚乙酸[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 324-328, +354

QIN Guoxin, YAN Feiyan, ZHOU Qifeng, et al. A multifunctional needle filter-HPLC method for the rapid determination of indole acetic acid in bean sprouts [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 324-328, +354

收稿日期: 2021-05-27

基金项目: 广西省自然科学基金面上项目 (2020GXNSFAA159073); 科技先锋队“强农富民”“六个一”专项行动 (桂农科盟 202116); 广西农业科学院基本科研业务专项资助项目 (桂农科 2021YT139; 桂农科 2021YT138); 广西农业科学院科技发展基金项目 (桂农科 2021JM119)

作者简介: 覃国新 (1982-), 男, 工程师, 研究方向: 农产品质量安全检测研究, E-mail: qinguoxin168@163.com

通讯作者: 周其峰 (1977-), 男, 助理研究员, 研究方向: 农产品质量安全风险评估, E-mail: zhouqifeng623@163.com

good linear relationship within the range of 0.05~10.0 mg/L, with a correlation coefficient of 0.9999. Within the spike level range of 0.1~5.0 mg/kg, the average recovery rate and relative standard deviation (RSD) were in the ranges of 80.6%~105.3% and 2.3%~4.6%, respectively. The limits of detection and quantification were 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The considerable ease of operation, accuracy, and reliability of this method make it suitable for the rapid detection of residual IAA in bean sprouts.

Key words: high-performance liquid chromatography; multifunctional needle filter; bean sprouts; indole acetic acid

豆芽作为人们日常餐桌上的蔬菜之一,其营养丰富,富含维生素 C、维生素 A、氨基酸、膳食纤维等有易于人体健康的成份,深受人们的喜爱^[1]。然而,为了提高豆芽产量,有不法商贩在豆芽种植生产过程中滥用添加剂(如植物激素、化学试剂、抗生素等),致使有关“毒豆芽”的事件时有发生,使人们对食用豆芽存在一定的安全隐患。由于植物激素能参与调控植物生长和发育的全过程^[2-4],成为了不法商贩主要滥用的添加剂之一。吲哚乙酸(Indole acetic acid, IAA)作为重要的植物激素之一,对植物的生长、分化起着极其重要的调节控制作用^[5,6]。在豆芽种植过程中使用 IAA 不仅能促进豆芽生长发育缩短生产周期,而且能提高产量,但是盲目或者过量的使用该植物激素,势必会造成环境污染、残留量超标、危害人们身体健康等与“毒豆芽”事件息息相关的问题^[7,8]。然而,我国国家标准尚未规定吲哚乙酸在豆芽中的残留限量值,也未查到豆芽中吲哚乙酸残留检测的国家标准。因此,建立简单、快速、准确的方法检测豆芽中吲哚乙酸残留尤为重要。

目前,测定吲哚乙酸的方法主要有酶联免疫分析法^[9]、化学发光分析法^[10]、气相色谱法^[11]、高效液相色谱法^[12]、液相色谱-串联质谱法^[13]等。其中,酶联免疫分析方法虽然仪器操作简单且分析速度快,但容易造成假阳性,定性和定量同时存在问题;化学发光分析法背景干扰较大且检测过程操作较复杂;气相色谱法需要柱前衍生,明显增加了影响因素;液相色谱-串联质谱法同时具有高灵敏度和高选择性好的优势^[14],但面临仪器购置和运行成本高昂等问题,难以实现普及;高效液相色谱分析法因具有重现性好、灵敏度高、准确性可靠、仪器较容易普及等优点而备受关注。但由于豆芽样品本身存在一定的基质干扰,按传统固相萃取净化方法前处理,操作繁琐、费时,难于满足大批样品的快速检测需求。

QuEChERS 前处理技术是 2003 年由 Anastassiades 等开发并用于植物源性食品中农药多残留检测的样品前处理,因其具有简单、快速、有效、可靠等优点而获得广泛应用^[15,16]。近年来,水果和蔬菜中农药多残留色谱分析检测一般都选择 QuEChERS 方法进行样品前处理^[17,18],而多功能针式过滤器(F-QuEChERS)

是基于 QuEChERS 原理,在通过式固相固相萃取净化的基础上^[19],将提取溶液的净化和过滤集于一步完成而建立的色谱分析样品前处理方法,不仅具有 QuEChERS 方法的优点,而且还节省了振摇净化和离心的多个环节。将多功能针式过滤器方法代替传统固相萃取净化方法,不仅能简化繁琐的步骤,缩短样品前处理时间,而且能有效降低样品本身带来的基质效应,从而有效解决传统固相萃取净化方法操作繁琐费时的问题。本实验在前人研究的基础上,基于 F-QuEChERS 原理,建立了多功能针式过滤器-高效液相色谱(HPLC)法快速检测豆芽中的吲哚乙酸,方法操作简便,快速准确,能满足豆芽中吲哚乙酸残留快速检测的要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪配置有二级管阵列检测器,美国 Waters 公司;色谱柱 XDB-C₁₈ (4.6 mm×250, 5 μm), Agilent; DS-1 型高速组织捣碎机,上海标模仪器厂; LD5-2A 型低速离心机,北京京立离心机有限公司;多功能针式过滤器 F-QuEChERS(含 150 mg MgSO₄, 50 mg 乙二胺-N-丙基硅胶(PSA)PSA、50 mg 十八烷基键合相硅胶(C₁₈)、5 mg 石墨化碳黑(GCB)),天津阿尔塔科技有限公司。

吲哚乙酸(纯度≥99.6%, m/m),上海安谱试验科技股份有限公司;甲酸、乙酸、乙腈(色谱纯),赛默飞世尔(中国)科技有限公司。

1.2 标准溶液的配制

准确称取适量的吲哚乙酸标准品,用乙腈配制成浓度为 1000 mg/L 的标准储备溶液;准确吸取标准储备液,用乙腈稀释成浓度为 100 mg/L 的标准中间溶液;接着用乙腈逐级稀释标准中间溶液,配制得到 0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mg/L 系列的乙腈标准工作溶液。

1.3 样品的前处理

提取:取新鲜豆芽试样(购于本地市场)用组织

捣碎机捣碎并混匀后,准确称取 10.00 g,加入 10.0 mL 1%乙酸乙腈提取液,涡旋提取 2 min 后,再加入 1 g 氯化钠、2 g 无水硫酸镁后,接着涡旋提取 1 min,最后以 4000 r/min 转速离心 5 min,收集上清液待净化。

净化:取上述上清液 1.5 mL 以 2 滴/s 的速度通过多功能针式过滤器 F-QuEChERS 于进样瓶中,供高效液相色谱测定。

1.4 高效液相色谱的检测条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6×250 mm, 5 μm), Agilent; 柱温: 35 °C; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10.0 μL。流动相 A: 乙腈, 流动相 B: 0.1%甲酸溶液。梯度洗脱程序为: 0~2.0 min, 10% A; 2.0~3.0 min, 10%~40% A; 3.0~4.0 min, 40% A; 4.0~5.0 min, 40%~80% A; 5.0~6.0 min, 80% A; 6.0~7.0 min, 80%~40% A; 7.0~8.0 min, 40% A; 8.0~9.0 min, 40%~10% A; 9.0~10.0 min, 10% A; 检测波长: 267 nm。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

众所周知,农药残留检测样品前处理通常使用的提取溶剂有甲醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯等。根据目标农药的理化性质,本实验对比了甲醇、乙腈、酸化甲醇及酸化乙腈作为提取溶剂对目标物的提取效果,实验发现,甲醇和乙腈对吡啶乙酸都有较好的提取效率,但甲醇提取所得成分更复杂,提取液较难净化,检测干扰较大。而吡啶乙酸在酸性条件下提取效果更好,通过实验研究表明,1.0%的乙酸乙腈提取样品中的吡啶乙酸,其回收率达到 80%以上,均比其它几种溶剂的提取效果好。因此,实验以浓度为 1.0%的乙酸乙腈作为提取溶剂。

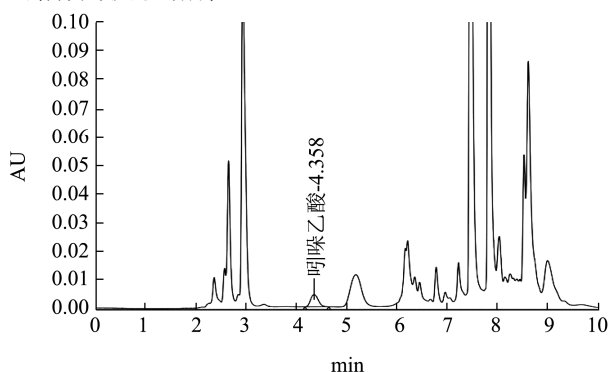


图1 吡啶乙酸在豆芽空白样品基质加标 (0.5 mg/kg) 下的色谱图

Fig.1 HPLC chromatography of spiked mixed blank (bean sprout) (0.5 mg/kg sulfoxafloflor)

2.2 色谱条件的优化

本实验分别对比了甲醇和乙腈作为高效液相色谱法的流动相时的分离效果,实验发现当采用乙腈时得到响应值较高且的峰形较好;同时,考察不同浓度甲酸水溶液 (0.01%、0.05%、0.1%、0.5%) 为流动相的响应效果,实验发现当甲酸水溶液浓度为 0.1% 时得到的峰形及响应值均最佳,且在优化的色谱条件下,待测植物激素在豆芽基质中能达到良好的基线分离 (分离色谱图如图 1 所示),因此,选择了乙腈-0.1%甲酸溶液作为分离分析的流动相进行梯度洗脱,由图可见,豆芽基质不干扰目标物的分离测定。

2.3 净化方式的选择

高效液相色谱法分析植物源性样品的农药残留,色谱分析容易受样品基质的干扰,从而影响检测的灵敏度及准确性。因此,选择合适的样品前处理净化方式极其重要。多功能针式过滤器主要是基于 QuEChERS 原理,将净化材料 (PSA、C₁₈、GCB 等) 填充于带有有机滤膜的一次性注射针管筒中,以简化样品前处理过程,具有 QuEChERS 的简单、快速、可靠、有效等特点,有效提高样品前处理的效率,适合大批量样品的分析检测。本研究采用酸化乙腈涡旋提取 2 min 后,加入适量氯化钠和无水硫酸镁,再继续涡旋提取 1 min,离心后,上清液直接经多功能针式过滤器净化以吸附蛋白质、色素等干扰物质,和传统的固相萃取净化方式相比,本方法将净化方式缩减到一步完成,明显提高了检测效率。

2.4 实际样品基质效应的考察

在实际样品的分析检测过程中,采用同一种前处理方法处理不同的样品,样品基质仍然会对同一目标物产生不同的干扰。本实验采用了基质标准曲线的斜率与纯溶剂标准曲线的斜率比值 (ME),来评价豆芽基质对吡啶乙酸色谱分析的基质效应,当 ME 越接近于 1 时,表明基质效应就越小。方法如下:取不含待测物的豆芽空白样品,经“1.3”方法进行前处理,得到样品提取净化液,接着用此净化液稀释 100 mg/L 的吡啶乙酸溶液,配成浓度为 0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mg/L 的基质标准工作容液。在优化的实验条件下进样分析,以吡啶乙酸标准物质浓度作为横坐标,相对应的峰面积作为纵坐标进行制作基质标准曲线。实验结果如表 1 所示,吡啶乙酸在豆芽提取净化液中的基质效应较小 (ME=0.98),因此,本实验选择纯溶剂配制标准溶液进行外标法定量。

表1 豆芽中吲哚乙酸的基质效应

Table 1 Matrix effects of indoleacetic acid in matrix of bean sprout

Compound	Calibration equation		Slope matrix/slope solvent
	Acetonitrile	Bean sprout	
Indole acetic acid	$Y=103210.0X-1724.3$	$Y=101255.8X+2601.0$	0.98

表2 实际样品中吲哚乙酸残留量回收率和精密度实验结果(n=6)

Table 2 Spike recovery rates for indoleacetic acid (n=6)

Sample	Compound	Spiked/(mg/kg)	Average recovery/%		RSD/%	
			F-QuEChERS	SPE	F-QuEChERS	SPE
Bean sprout	Indole acetic acid	0.1	80.6	78.5	4.6	5.2
		0.5	94.8	87.7	2.3	2.9
		5.0	105.3	98.6	1.8	3.4

2.5 方法的线性范围、检出限及定量下限

本研究在优化的实验条件下测定“1.2”节配制的系列吲哚乙酸标准工作溶液,用峰面积(Y)对质量浓度(X)绘制标准曲线,线性方程见表1,实验结果表明,吲哚乙酸在0.05~10.0 mg/L范围内具有良好的线性关系,相关系数为0.9999。以3倍信噪比所对应的吲哚乙酸浓度来确定检出限(LOD),以10倍信噪比所对应的吲哚乙酸浓度来确定定量限(LOQ),计算得吲哚乙酸在豆芽基质中的检出限(LOD)为0.03 μg/kg,定量下限(LOQ)为0.1 μg/kg。

2.6 回收率及精密度

取市售未检出吲哚乙酸的豆芽为空白样品,按“1.2”节进行前处理。按低、中、高3个浓度水平进行加标回收实验,对比多功能针式过滤器净化方法(F-QuEChERS)和固相萃取净化方法(SPE)两种前处理方式。在10 g匀浆样品中吲哚乙酸添加0.1、0.5、5.0 mg/kg 3个浓度水平的标准溶液,进行含量测定,结果如表2所示,吲哚乙酸在豆芽中2种净化方式的平均添加回收率范围分别为80.6%~105.3%和78.5%~98.6%,相对标准偏差(RSD)分别为1.8%~4.6%和2.9%~5.2%。实验结果表明,F-QuEChERS和SPE的方法回收率和精密度都能满足农药残留检测的要求,但F-QuEChERS方法操作简便、耗时短,适合大批样品的快速检测。

2.7 实际样品的检测

从农贸市场随机购买10份豆芽样品,按照本研究新建的方法对豆芽中的吲哚乙酸进行测定,10份样品均未检出吲哚乙酸残留。

3 结论

本研究基于QuEChERS前处理技术,将多功能针式过滤器用于样品前处理,将净化和过滤集于一体,报道了HPLC方法检测豆芽中吲哚乙酸残留量,以乙腈和0.1%甲酸为流动相,梯度洗脱,流速1.0 mL/min,柱温35℃,检测波长267 nm,该方法操作简洁、快速、准确、可靠。将多功能针式过滤器用于农药残留检测样品前处理,不仅能有效除去蛋白质、色素等样品基质的干扰物质,而且对实验研究中吲哚乙酸能保持较高的回收率,有效提高了检测效率,适用于批量豆芽样品中吲哚乙酸残留的快速检测。

参考文献

- [1] 熊先清,胡广林.外源锌浸种处理对绿豆芽生长和营养品质的影响[J].食品工业科技,2017,38(4): 170-174,179
XIONG Xianqing, HU Guanglin. Effect of exogenous zinc soaking on the growth and nutritional quality of mung bean sprouts [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(4): 170-174, 179
- [2] LI Mengjun, LI Na, XU Guiju, et al. Magnetic boron nitride nanosheets as a novel magnetic solid-phase extraction adsorbent for the determination of plant growth regulators in tomatoes [J]. Food Chemistry, 2021, 348: 129103
- [3] CHEN Xi, YUAN Yanan, YAN Hongyuan, et al. Selective, sensitive, and miniaturized analytical method based on molecularly imprinted graphene oxide composites for the determination of naphthalene-derived plant growth regulators in apples [J]. Food Chemistry, 2021, 349: 128982
- [4] ZHU Song, CHEN Shangwei, LI Yue. Simultaneous analysis of thirteen phytohormones in fruits and vegetables by SPE-HPLC-DAD [J]. Food Science and Biotechnology, 2020, 29(11): 1587-1595
- [5] FAN Shuhong, CHANG Yanli, LIU Guoyin, et al. Molecular functional analysis of auxin/indole-3-acetic acid proteins

- (Aux/IAAs) in plant disease resistance in cassava [J]. *Physiologia Plantarum*, 2020, 168(1): 88-97
- [6] 曾婉俐,张建铎,许力,等.超高效液相色谱法快速测定烟草中的吲哚乙酸和吲哚丙酸[J].*分子植物育种*,2019,17(6): 2030-2034
ZENG Wanli, ZHANG Jianduo, XU Li, et al. Rapid determination of indole acetic acid and indole propionic acid in tobacco by UPLC [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(6): 2030-2034
- [7] 姜蔚,兰丰,周先学,等.山东主产区水果植物生长调节剂风险监测和评估[J].*农药*,2018,57(11):829,850
JIANG Wei, LAN Feng, ZHOU Xianxue, et al. Risk monitoring and assessment of plant growth regulators residues in fruits from Shandong province [J]. *Agrochemicals*, 2018, 57(11): 829, 850
- [8] 诸力,王晨,陈红平,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定茶叶中 11 种植物生长调节剂及吡虫啉、啉虫脒的残留[J].*分析化学*,2017,45(4):529-536
ZHU Li, WANG Chen, CHEN Hongping, et al. Simultaneous determination of plant growth regulators and imidacloprid, acetamiprid in tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(4): 529-536
- [9] Eiki Watanabe, Yuriko Tsuda, Shigeyuki Watanabe, et al. Development of an enzyme immunoassay for the detection of plant growth regulator inabenfide in rice [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 424(2): 149-160
- [10] 张韶虹,郝娟,何治柯.Ru(phen)₃~(2+)-Ce(IV)化学发光体系检测吲哚乙酸的研究[J].*分析科学学报*,2005,4:387-389
ZHANG Shaohong, XI Juan, HE Zhike. Chemiluminescence determination of indoleacetic acid with Ru(phen)₃²⁺-Ce(IV) system [J]. *Journal of Analytical Science*, 2005, 4: 387-389
- [11] 张文华,谢文,侯建波,等.气相色谱-串联质谱法测定豆芽与番茄中 6 种植物生长调节剂[J].*分析测试学报*,2016,35(10): 1241-1247
ZHANG Wenhua, XIE Wen, HOU Jianbo, et al. Determination of 6 plant growth regulators in bean sprout and tomato by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2016, 35(10): 1241-1247
- [12] 肖爱华,陈发菊,贾忠奎,等.梯度洗脱高效液相色谱法测定红花玉兰中 4 种植物激素[J].*分析实验室*,2020,39(3):249-254
XIAO Aihua, CHEN Faju, JIA Zhongkui, et al. Determination of 4 plant hormones in *Magnolia wufengensis* by gradient elution high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2020, 39(3): 249-254
- [13] 康明芹,胡婷婷,张勋,等.固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定鲜人参中吲哚乙酸和吲哚丁酸[J].*化学试剂*,2016, 38(7):641-643
KANG Mingqin, HU Tingting, ZHANG Xun, et al. Determination of indole acetic acid and indole butyric acid in fresh ginseng by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS/MS) [J]. *Chemical Reagents*, 2016, 38(7): 641-643
- [14] 覃国新,劳水兵,莫仁甫,等.超高压液相色谱串联质谱法测定小油菜中3种农药残留[J].*分析实验室*,2018,37(4):378-382
QIN Guoxin, LAO Shuibing, MO Renfu, et al. Determination of abamectin, chlorantraniliprole and difenoconazole residues in rape by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2018, 37(4): 378-382
- [15] 陈汝,王金政,王贵平,等.QuEChERS-UPLC-MS/MS 法检测苹果中 5 种农药残留[J].*分析实验室*,2021,40(2):163-168
CHEN Ru, WANG Jinzheng, WANG Guiping, et al. QuEChERS-UPLC-MS/MS method for the detection of five pesticide residues in apples [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2021, 40(2): 163-168
- [16] 覃国新,劳水兵,莫仁甫,等.超高效液相色谱法测定甘蓝和橙子中的阿维菌素残留[J].*现代食品科技*,2018,34(4):227-231
QIN Guoxin, LAO Shuibing, MO Renfu, et al. Determination of abamectin residues in cabbage and orange by ultra performance liquid chromatography [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(4): 227-231
- [17] 覃国新,劳水兵,李慧玲,等.一步式提取净化/超高效液相色谱-串联质谱法测定水生蔬菜中矮壮素和灭蝇胺[J].*食品安全质量检测学报*,2020,11(11):3619-3624
QIN Guoxin, LAO Shuibing, LING Huiling, et al. Determination of chlormequat and cyromazine residues in aquatic vegetables by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with extraction and purification on one step [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(11): 3619-3624

(下转第 354 页)