

# 高效液相色谱-串联质谱法测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠

卢高超\*, 王小娟, 李红光, 穆登峰, 刘永健  
(陕西科仪阳光检测技术服务有限公司, 咸阳 712000)

**摘要:** **目的** 建立豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠的液相色谱-串联质谱测定方法。**方法** 豆芽样品均质后以 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液提取, 提取液经酸化后再用乙酸乙酯萃取, 收集经离心分层的有机相, 浓缩后用甲醇溶解进行测定分析。以甲醇和 0.1%甲酸(FA)水溶液为流动相, 采用 Hypersil GOLD aQ (100 mm × 2.1 mm, 3 μm) 色谱柱分离, 电喷雾电离负离子条件下以选择反应监测模式(SRM)检测。**结果** 该方法检出限 0.005 mg/kg, 在 1~100 ng/mL 范围内具有良好线性, 相关系数为 0.9998。回收率为 79.1%~104.7%, 相对标准偏差低于 5%(n=6)。**结论** 该方法前处理简单快速, 定性准确, 灵敏度好, 适用于豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠的残留检测。**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 加热电喷雾电离; 豆芽; 4-氯苯氧乙酸钠

## Determination of sodium parachlorophenoxy in bean sprouts by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LU Gao-Chao\*, WANG Xiao-Juan, LI Hong-Guang, MU Deng-Feng, LIU Yong-Jian  
(Shaanxi Keyi Sunshine Test Technology Services Co., Ltd., Xianyang 712000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of sodium parachlorophenoxy (4-CPANa) in bean sprouts by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The soybean sample was extracted with 0.01 mol/L sodium hydroxide solution, and the extracting solution was recovered by diethyl ether in acidic condition. After centrifugation, the organic phase was concentrated completely and re-dissolved with methanol. The sample was separated by a Hypersil GOLD aQ column (100 mm × 2.1 mm, 3 μm) with methanol and 0.1% FA aqueous as mobile phase. The remnant was detected by MS/MS using H-ESI technology (negative ion mode) and SRM detection mode. **Results** The detection limit was 0.005 μg/kg and the linear range was 1~100 ng/mL with correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.9998. The average recoveries were between 79.1%~104.7% with relative standard deviation (RSD) less than 5% (n=6). **Conclusion** This analytical method is sample, rapid, accurate, and sensitive, and can be used for the rapid detection of sodium parachlorophenoxy in bean sprouts. **KEY WORDS:** high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; heating-electrospray ionization; bean sprouts; sodium parachlorophenoxy

\*通讯作者: 卢高超, 主要研究方向为食品检验分析和色谱质谱方法开发。E-mail: lugaochao0526@126.com

\*Corresponding author: LU Gao-Chao, Technical Centre of Shaanxi Keyi Sunshine Test Technology Services Co., Ltd., No. 111, Century West Road, Xianyang 712000, China. E-mail: lugaochao0526@126.com

## 1 引言

4-氯苯氧乙酸钠 (sodium parachlorophenoxy) 是一种人工合成的植物生长调节剂<sup>[1]</sup>, 可以促进植物体内的生物合成和生物转移、促进双子叶植物下胚轴粗大、减少根部萌发、加速细胞分裂, 因此被不法生产者广泛用于豆芽生产中<sup>[2]</sup>。但是, 由于其对人体有一定积累毒性, 长期食用会有致癌、致畸的潜在危害<sup>[3,4]</sup>。随着国内外“毒豆芽”事件的屡次曝光, 食品安全问题已经不容忽视。目前, 我国已经注销了包括 4-氯苯氧乙酸钠在内的 33 种产品的食品添加剂生产许可申请<sup>[5]</sup>, 然而, 至今尚未建立针对豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠的检测的国家标准方法。在已经出台的研究报告和地方标准中, 豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠多采用高效液相色谱-紫外检测器法<sup>[6-10]</sup>、薄层层析色谱法<sup>[11]</sup>、气相色谱法<sup>[12]</sup>和离子色谱法<sup>[13]</sup>测定, 这些方法前处理操作过程麻烦, 方法灵敏度较低, 不利于大批量样品的高通量筛查检测。另外由于豆芽基质复杂, 分离效果较差导致在紫外检测器上信号干扰严重<sup>[6,9,10]</sup>; 液相色谱单纯配备紫外检测器在定性上的局限性也无法克服样品中的假阳性问题<sup>[8-10]</sup>。

液相色谱-串联质谱法由于速度快、灵敏度高、定性准确、高通量等优点成为了农药、兽药残留以及违法添加剂的首选方法<sup>[13-15]</sup>。目前, 随着人们对于安全健康饮食需求的提升, 国家对于食品中非法添加物的筛查力度逐渐加大。基于豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠检测面临的诸多问题和技术发展的需要, 本文采用三重四极杆液相色谱-质谱联用技术, 在保证良好的灵敏度和重现性的同时实现高选择性, 并能有效去除样品中的假阳性干扰。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂与仪器

甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 Merck 公司); 氢氧化钠(分析纯, 天津科密欧试剂有限公司); 4-氯苯氧乙酸钠标准品(99.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

液相色谱仪质谱联用仪(Thermo Scientific Accela 600-TSQ Quantum Access Max, 美国热电公司); Milli-Q 纯水制备系统(美国 Merck-Millipore 公司); IKA RV-20 旋转蒸发器(德国 IKA 公司); XSE105 DU

分析天平(美国 Mettler-Toledo 公司)。

### 2.2 样品制备

称取 5.0 g (精确至 0.01 g) 绞碎匀浆的豆芽样品于 50 mL PE 离心管中, 加入 15 mL 氢氧化钠溶液(0.01 mol/L), 涡旋混匀后超声提取 15 min, 以 10000 r/min 离心 10 min, 上清液转移至 50 mL 比色管, 重复上述提取 2 次, 合并提取液并定容至刻度, 摇匀后准确移取 10.0 mL 于 50 mL PE 离心管中, 用 1 mL HCl(1:1, V:V)溶液调 pH 为酸性, 再以 15 mL 乙酸乙酯分涡旋萃取 1 min, 4000 r/min 离心 3 min, 转移有机层, 水相再用 15 mL 乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机层并用旋转蒸发器于 40 °C 浓缩至近干, 分 2 次加入 2.0 mL 甲醇振摇溶解瓶壁残留目标物并转移至 5.0 mL 比色管中, 定容后混匀, 用一次性注射器吸取 1.0 mL 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 供 LC-MS/MS 测定分析。

### 2.3 色谱及质谱条件

#### 2.3.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil GOLD aQ(100 mm×2.1 mm, 3 μm); 流速: 300 μL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL; 流动相 A: 0.1%甲酸水; 流动相 B: 乙腈, 梯度表如表 1。

表 1 4-氯苯氧乙酸的液相洗脱条件  
Table 1 Gradient elution procedures of sodium parachlorophenoxy

时间(min)	A (%)	B (%)	流速 (μL/min)
0.0	90	10	300
1.0	90	10	300
3.5	10	90	300
6.0	10	90	300
6.5	90	10	300
7.0	90	10	300

#### 2.3.2 质谱条件

电离源: 加热电喷雾离子源(H-ESI 源), 质谱扫描方式: 负离子模式(negative ion mode); 检测方式: 多反应监测模式(MRM); 质谱参数优化值如表 2。

表 2 4-氯苯氧乙酸的质谱优化条件  
Table 2 MS optimized parameters of sodium  
parachlorophenoxy

质谱参数	优化值
喷雾电压/V	3000
气化温度/°C	250
鞘气压力/arb	42
辅助气压力/arb	9
离子传输管温度/°C	350
碰撞气(Ar)压力/mTorr	1.5

### 3 结果与分析

#### 3.1 质谱条件优化

4-氯苯氧乙酸钠的定性检测以其分子态 4-氯苯氧乙酸计, 结合 4-氯苯氧乙酸的分子结构特点, 选择

在负离子模式下进行一级质谱扫描, 确定 4-氯苯氧乙酸母离子为: 184.871[M-1]; 通过喷雾电压、鞘气压力、辅助气压力、离子传输管温度等参数(表 2)的优化对质谱信号进行调谐, 确定最佳透镜电压(RF)并以此参数作二级质谱扫描, 确定 4-氯苯氧乙酸两个子离子和碰撞能量(CE)如表 3 所示。

#### 3.2 色谱条件优化

豆芽类样品蛋白含量较高, 基质较为复杂; 另外待分析的 4-氯苯氧乙酸属于中等极性化合物, 在 C<sub>18</sub> 柱中存在轻微的拖尾现象。为了便于对色谱分离及峰形的改善, 本研究主要尝试了 Hypersil GOLD aQ 柱和 Intersil ODS-3 柱进行分离试验, 发现 Hypersil GOLD aQ(100 mm×2.1 mm, 3 μm)柱采用 0.1%甲酸-水和乙腈为流动相, 采用梯度洗脱方法, 流速 300 μL/min, 可以较好地分离样品中的 4-氯苯氧乙酸, 单个样品分析时间仅为 6 min, 明显优于普通 HPLC 方法<sup>[6,8-10]</sup>。图 1~2 为样品与标准品的质谱-色谱对照图。

表 3 4-氯苯氧乙酸的质谱参数  
Table 3 MS parameters of sodium parachlorophenoxy

被测物质名称	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)	透镜电压 RF(V)	碰撞能 CE(eV)
4-氯苯氧乙酸	184.871/126.892	184.871/126.892	16	24
		184.871/141.000	16	33

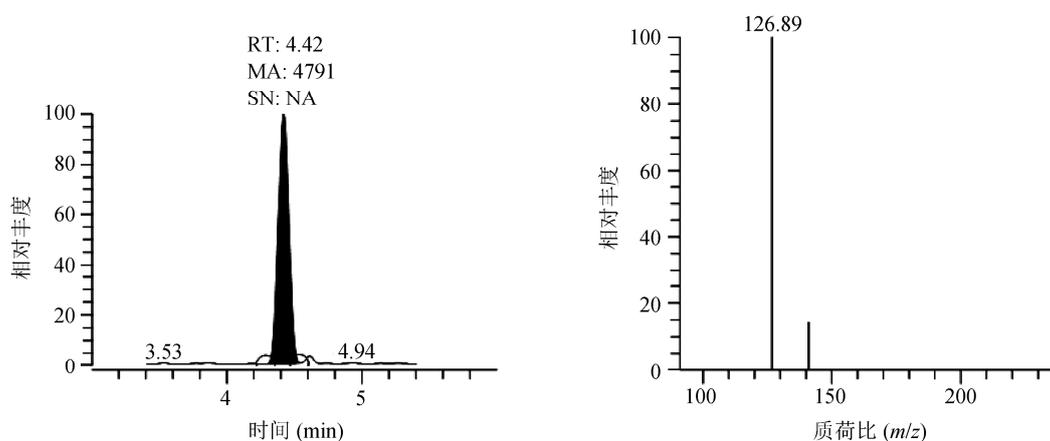


图 1 豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠样品 LC-MS/MS 谱图

Fig. 1 LC-MS/MS chromatogram of sodium parachlorophenoxy sample in bean sprout

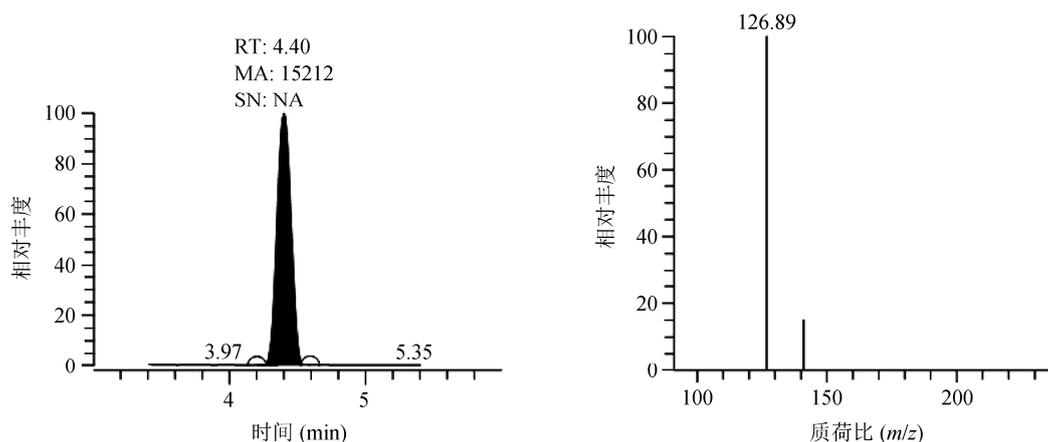


图2 4-氯苯氧乙酸钠的标准品 LC-MS/MS 谱图

Fig. 2 LC-MS/MS chromatogram of sodium parachlorophenoxy standard sample

### 3.3 工作曲线的配制和提取方法的改进

#### 3.3.1 工作曲线的配制

准确移取 10 mg/L 的 4-氯苯氧乙酸标准溶液, 以空白基质提取液逐级稀释并配置成 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 ng/mL 的标准溶液系列溶液, 上机检测。以峰面积(Y)对浓度(X, ng/mL)进行线性回归, 得到线性回归方程为:  $Y=1798.04X-2090.35$ , 线性相关系数:  $r^2=0.9998$ , 线性范围: 1~100 ng/mL。进空白样进行方法检出限测定, 以基线噪音值的 3 倍( $S/N=3$ )计算得计算本方法的最低检出浓度为: 0.005 mg/kg。

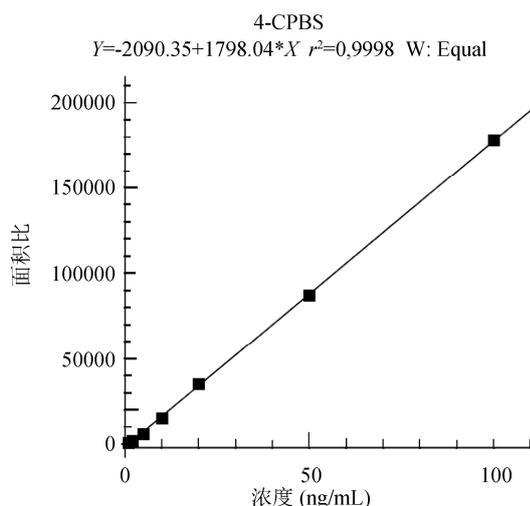


图3 4-氯苯氧乙酸的标准工作曲线

Fig. 3 Calibration curve of parachlorophenoxy

#### 3.3.2 提取方法的改进

4-氯苯氧乙酸钠在水溶液中溶解度较好, 在酸性条件下以其分子态 4-氯苯氧乙酸的形式存在。本文中先用稀碱溶液将样品中的 4-氯苯氧乙酸钠完全提取至水相中, 再将水相酸化后用有机溶剂反萃, 这样既可保证待测组分基本提取完全, 又能有效去除蛋白、脂肪酸、色素等杂质<sup>[2]</sup>。在现有的文献资料中, 4-氯苯氧乙酸一般以乙醚作提取试剂, 但乙醚属易制毒试剂、易燃易爆、挥发度大、不利于实验室大批量检测操作<sup>[8-10]</sup>。本文使用廉价易得的乙酸乙酯作溶剂, 既降低了操作的危险性, 在旋蒸浓缩后部分回收溶剂还可以重复利用, 又减少了实验室废液的排放。

本实验曾按文献方法<sup>[10]</sup>做方法对照: 以乙醚为提取试剂, 使用分液漏斗经行液-液萃取。结果在液-液萃取过程中由于乳化严重, 该步骤耗费很长时间, 采用静置分层、盐析等手段均未得到明显改善。本文所述方法采用离心管进行涡旋操作萃取, 减少了实验人员工作量; 提取液采用离心的方式实现快速分层, 大大缩短了前处理时间, 操作可行性好, 回收率较高(见表 4)。

### 3.4 方法精密度及回收率

分别准确称取 5.0 g 空白黄豆芽和绿豆芽样品各 18 份, 每 6 份一组分别添加 0.015、0.030、0.15 mg/kg 的 4-氯苯氧乙酸标准溶液。按 2.2 中样品制备方法处理, 所得待测液进行测定, 结果如表 5 所示。

由表 5 中数据可以看出, 本方法回收率在

79.1%~104.7% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 在 3.1%~4.8% 之间,  $RSD < 5\%$ , 说明该方法的准确度和精密度均可以满足 4-氯苯氧乙酸钠的检测要求。另外, 在同等加标水平下, 绿豆芽样品的回收率略高于黄豆芽, 这是由于黄豆芽中蛋白质、淀粉含量均较高, 酸化后提取时析出大量沉淀导致目标物提取不充分造成。

### 3.5 随机取样检测结果

随机抽取某批日常抽检样品 14 份, 按本文法进行检测, 两个工作日内即可得到检测结果(表 6 所示)。本批样品中大部分样品中均未检出 4-氯苯氧乙酸钠。数据表明该方法回收率较为稳定, 准确度高, 适合于做大量抽检样品的筛查工作。

表 4 4-氯苯氧乙酸钠的前处理比较

Table 4 Comparison of pre-treatment of sodium parachlorophenoxy ( $n=6$ )

方法	加标浓度 mg/kg	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
本文方法	0.100	92.6~101.3	4.3
文献方法 <sup>[10]</sup>	0.100	71.6~83.9	6.1

表 5 空白样品加标回收测定结果

Table 5 Recoveries and relative standard deviation of negative sample spiked

样品	加标浓度 mg/kg	回收率 %	相对标准偏差 %
绿豆芽	0.015	79.1~83.8	3.1
	0.030	82.6~94.7	3.7
	0.150	89.3~103.2	3.9
黄豆芽	0.015	80.8~85.1	4.2
	0.030	81.9~96.6	4.4
	0.150	95.0~104.7	4.8

表 6 随机抽检样品测定结果

Table 6 Detection results of random inspection samples

样品编号	测定值 mg/kg	加标浓度 mg/kg	回收率 %
空白	未检出	0.030	100.1
SP157851	未检出	0.030	92.6
SP157853	未检出	0.030	92.6
SP157865	未检出	0.030	89.0
SP157866	未检出	0.030	88.3
SP157899	0.038	0.005	95.2
SP157902	未检出	0.005	83.5
SP157903	未检出	0.005	89.9
SP157916	0.178	0.005	85.4
SP157928	0.116	0.005	83.9
SP157929	未检出	0.005	87.6
SP157030	未检出	0.150	96.2
SP158023	未检出	0.150	98.8
SP158046	未检出	0.150	103.0
SP158069	未检出	0.150	99.6

## 4 结 论

本文结合现有检测依据,建立豆芽中禁用添加剂 4-氯苯氧乙酸钠的高效液相色谱-三重四极杆质谱联用测定方法。大量实际豆芽样品检测结果表明:该方法处理简单、分析速度快、回收率高;运用串联质谱定性准确;灵敏度好,适用于豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠的残留检测。因此,本方法既能满足对市场中豆芽非法添加 4-氯苯氧乙酸钠的筛查要求,也为其他食品、农产品中 4-氯苯氧乙酸钠检测同时提供参考,对于食品安全监控具有积极的社会意义。

### 参考文献

- [1] DB 3702/T 090-2006 豆芽生产管理技术规范[S].  
DB 3702/T 090-2006 Bean sprouts production management technical specification [S].
- [2] 张玉娟, 张志强, 刘静, 等. 豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠检测现状综述[J]. 科技风, 2014, (15): 177.  
Zhang YJ, Zhang ZQ, Liu J, *et al.* Review on detection status of sodium parachlorophenoxy in bean sprouts [J]. Technol Wind, 2014, (15): 177.
- [3] 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]. 中华预防医学杂志, 2002, 36(1): 44-45.  
Huang WP. Determination of residues of sodium parachlorophenoxy in bean sprouts by HPLC method [J]. Chin J Prev Med, 2002, 36(1): 44-45.
- [4] 陈君, 安东各, 许莉, 等. 豆芽中甲硝唑、多菌灵、赤霉素、6-苄基腺嘌呤、2,4-二氯苯氧乙酸的定量检测[J]. 化学通报, 2014, 77(9): 916-918.  
Chen J, An DG, Xu L, *et al.* Simultaneous quantitative detection of metronidazole, carbendazim, gibberellic acid, 6-Benzyl-adenine, and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in bean sprout [J]. Chem Online, 2014, 77(9): 916-918.
- [5] GB2760-2014 食品添加剂使用标准[S].  
GB 2760-2014 Standards for uses of food additives [S].
- [6] 李小平, 蒋经伟, 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): 267-269.  
Li XP, Jiang JW, Fan JZ, *et al.* Determination of 4-chlorophenoxyacetic acid sodium in bean-sprout by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(3): 267-269.
- [7] Geng ZM. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid residue in orange using high performance liquid chromatography [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2007, 23(1): 67-70.
- [8] DB 22/009-2013 豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠的测定 高效液相色谱法[S].  
DB 22/009-2013 Determination of sodium parachlorophenoxy in bean sprouts by HPLC [S].
- [9] DB11/T 379-2006 豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠、6-苄基腺嘌呤、2,4-D、赤霉素、福美双的测定[S].  
DB11/T 379-2006 Determination of sodium parachlorophenoxy, 6-benzyladenine, 2,4-D, gibberellic acid and thiram residues in soybean sprout [S].
- [10] DB33/T 625.3-2007 无公害豆芽 第3部分: 6-苄基腺嘌呤残留量和 4-氯苯氧乙酸钠残留量的测定[S].  
DB33/T 625.3-2007 Determination of benzyl adenine and sodium parachlorophenoxy residual amount [S].
- [11] 丁友昌, 姜爱香, 钟鸣文. 薄层层析色谱法测定无根豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠残留量的研究[J]. 中国公共卫生, 1997, 13(02): 77.  
Ding YC, Jiang AX, Zhong MW, *et al.* Determination of sodium parachlorophenoxy in rootless sprouts by TLC [J]. Chin J Pub Health, 1997, 13(02): 77.
- [12] 匡华, 储晓刚, 侯玉霞, 等. 气相色谱法同时测定大豆中 13 种苯氧羧酸类除草剂的残留量[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(6): 503-508.  
Kuang H, Chu XG, Hou YX, *et al.* Simultaneous determination of multiple phenoxy acid herbicide residues in soybean by gas chromatography [J]. Chin J Food Hyg, 2006, 18(6): 503-508.
- [13] 颜金良, 颜勇卿, 王立, 等. 离子色谱法快速测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸钠残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(10): 1207-1208.  
Yan JL, Yan YQ, Wang L, *et al.* Rapid determination of residual amount of 4-chlorophenoxyacetic acid in bean sprouts by ion chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(10): 1207-1208.
- [14] 刘桂花, 韩满德, 唐守万, 等. 固相萃取-液质联用法测定食品中两种苯氧羧酸类除草剂含量[J]. 应用化工, 2011, 40(8): 1462-1465.  
Liu GH, Han MD, Tang SW, *et al.* Determination of two kinds of phenoxy acid herbicides in foods by solid phase extraction and high performance liquid chromatography-mass spectrum [J]. Appl Chem Ind, 2011, 40(8): 1462-1465.
- [15] Charlton AJA, Stuckey V, Sykes MD. Determination of the phenoxyacid herbicides MCPA, mecopropand 2,4-D in kidney tissue using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2009, 82: 711-715.

[16] 牛增元, 罗忻, 汤志旭, 等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法快速测定纺织品中苯氧羧酸类除草剂残留量[J]. 分析化学, 2009, 37(4): 505-510.

Niu ZY, Luo X, Tang ZX, *et al.* Rapid determination of phenoxy acid herbicide residues in textiles by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37(4): 505-510.

[17] 冯家望, 吴洁珊, 曹桂云, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定食品中对氯苯氧乙酸的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2012, 48: 1219-1222.

Feng JW, Wu JS, Cao GY, *et al.* Determination of residual

amount of 4-chlorophenoxyacetic acid in foodstuffs by HPLC-MS/MS [J]. *Physical Test Chem Anal Part B: Chem Anal*, 2012, 48: 1219-1222.

(责任编辑: 李振飞)

### 作者简介



卢高超, 主要研究方向为食品安全检测及色谱质谱方法开发应用。

E-mail: lugaochao0526@126.com

---

## “水产品加工与质量安全”专题征稿函

近年来不断发生的食品安全问题让消费者们对食品安全更加关注, 同时也使国家面临食品安全问题的严峻挑战。水产品品种繁多, 其营养齐全、风味独特, 具有低脂肪、高蛋白、生理活性物质丰富等健康功能特性而备受广大消费者青睐。中国是世界上最大的水产品生产国和出口国, 2014 年中国水产品产量 6461 万吨, 同比增长 4.7%。在预计未来 10 年水产品的产量持续增长的态势下, 水产品的加工与质量安全也会影响着整个水产业的稳健发展。

鉴于此, 本刊特别策划了“水产品加工与质量安全”专题, 由上海海洋大学王锡昌教授担任主编, 王教授现任上海海洋大学食品学院院长, 兼任中国食品科学技术学会理事, 中国水产学会水产品加工和综合利用分会副主任委员, 上海市食品学会副理事长兼秘书长等职。专题主要围绕水产品加工技术的创新、保活保鲜技术的研究、水产品加工副产物的综合利用、水产品中有害物质的分析检测、海洋生物活性物质的提取分离及活性鉴定研究、功能性保健食品和海洋药物的研制、水产品的标准与法规、水产品的安全研究和风险评估等或您认为本领域有意义的问题展开讨论, 计划在 2015 年 11 月出版。

本刊编辑部和王锡昌教授欢迎各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

### 投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

E-mail: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部