

QuEChERS-超高效液相色谱法快速测定果蔬中 4种植物激素残留

胡海山*, 赵淑娥, 芦慧, 张云伟

(江西省分析测试研究所, 南昌 330029)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱法快速测定果蔬中4种植物激素残留方法。**方法** 样品经甲醇提取后, 提取液采用分散固相萃取吸附剂 C_{18} 进行吸附净化, 用乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵溶液为流动相, Waters ACQUITY UPLC[®]BEH C_{18} 色谱柱分离进行液相色谱梯度洗脱, 二极管阵列检测器 200~400 nm 检测, 外标法定量。**结果** 4种植物激素在 0.1~4.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 $r \geq 0.9997$, 其检出限为 0.006~0.032 mg/kg, 样品的加标回收率为 83.8%~98.4%, 相对标准偏差为 2.06%~3.89%。**结论** 该方法样品前处理简单, 快速高效, 重现性好, 准确度高, 适用于果蔬中4种植物激素残留的检测。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱法; 植物激素; 果蔬; 残留

Rapid determination of 4 kinds of phytohormone residues in fruits and vegetables by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography

HU Hai-Shan*, ZHAO Shu-E, LU Hui, ZHANG Yun-Wei

(Jiangxi Institute of Analysing and Testing, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for the determination of 4 kinds of phytohormone residues in fruits and vegetables by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** After the sample was extracted with methanol, the extracted liquid was adsorbed and purified by dispersed solid phase extraction adsorbent C_{18} . The mobile phase was acetonitrile-0.02 mol/L ammonium acetate solution. The sample was separated by Waters ACQUITY UPLC[®]BEH C_{18} column for gradient elution, and was detected by diode array detector at 200~400nm and quantified by external standard method. **Results** Four kinds of phytohormones had good linear relationships in the range of 0.1~4.0 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficients (r) was 0.9997. The limits of detection were 0.006~0.032 mg/kg. The average recoveries of 4 kinds of phytohormones were 83.8%~98.4%, with the relative standard deviations of 2.06%~3.89%. **Conclusion** This method is simple, rapid, efficient, reproducible and accurate, which is suitable for the detection of 4 kinds of plant hormones residues in fruits and vegetables.

KEY WORDS: QuEChERS; ultra performance liquid chromatography; phytohormone; fruit and vegetable; residue

基金项目: 江西省科学技术厅科技计划重点项目(20121BBG70057)

Fund: Supported by Science and Technology Department of Jiangxi Province(20121BBG70057)

*通讯作者: 胡海山, 高级工程师, 主要研究方向为食品营养与食品安全。E-mail: emoc98311@163.com

*Corresponding author: HU Hai-Shan, Senior Engineer, Jiangxi Institute of Analysing and Testing, No.171 East Beijing Road, Nanchang 330029, China. E-mail: emoc98311@163.com

1 引言

植物激素又称为植物生长调节剂,是在果蔬植物生长发育的时候起调节作用的化学物质,使用较低浓度的植物激素即可对植物的生长发育起到促进或抑制作用^[1]。近年来,植物激素被广泛使用,如果在果蔬植物生长过程中使用,会对果蔬食品存在残留隐患。植物激素残留的果蔬,在短期食用可能对人体影响不大,但长期食用会导致人体内分泌紊乱,影响体内的代谢平衡。其安全性受到越来越多的关注^[2]。植物生长调节剂残留对水果蔬菜质量安全的影响已经逐渐引起了重视,我国国家标准 GB 2763-2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[3]对水果、蔬菜中部分植物生长调节剂的残留限量进行了规定。目前,常用的植物激素种类繁多,由于化学结构差异很大,因而残留分析方法也各不相同,部分检测方法只能检测单一组分^[4],能检测较多组分的方法主要有液相色谱法^[5-8]、液相色谱-质谱联用法^[9-12]、气相色谱-质谱联用法^[13-15]等。气相色谱-质谱联用法的样品处理必须要衍生化,步骤繁琐,而且质谱联用法由于仪器较为昂贵,不利于快速筛查测定。相比较而言,液相色谱法是比较普遍且实用的检测多种植物激素的方法。液相色谱法的样品净化处理有液液萃取法^[5]、固相萃取法^[10],但测定多组分时,由于激素种类不同,化学性质差异大,回收率很难都达到要求。QuEChERS 方法具有快速、简单、成本低、回收率好、准确度高等特点,被广泛应用于水果、蔬菜植物中的有害残留检测。本文选取植物生长常用的调节剂 4-氯苯氧乙酸、2,4-二氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤、氯吡脲作为植物激素研究组分,采用 QuEChERS 方法处理净化样品,并通过超高效液相色谱法测定,建立了果蔬中 4 种植物激素的残留量的检测方法。该方法样品前处理简单方便,有较好的回收率较和重现性,能快速准确的测定植物激素残留,以期能快速检测果蔬中的农药残留提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(配二极阵列检测器,色谱柱,美国 Waters 公司); ME204 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-200TDB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TDL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂); Milli-Q Direct8 超纯水机制备仪(德国默克密理博公司)。

标准物质: 4-氯苯氧乙酸、2,4-二氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤、氯吡脲(德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 乙腈、甲醇、乙酸铵(色谱纯,美国 Sigma 公司); Cleanert C₁₈、Cleanert PestiCarb、Cleanert PSA(天津博纳艾杰尔科技有限公司);

无水硫酸镁、氯化钠(分析纯,西陇科学股份有限公司)。

2.2 超高效液相色谱的仪器条件

色谱柱 Waters ACQUITY UPLC®BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.02 mol/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱程序为: 0~2.0 min, 20%A; 2.0~5.0 min, 20~60%A; 5.0~7.5 min, 60%A; 7.5~8.0 min, 60~20%A; 流速 0.2 mL/min; 柱温 30 °C; 进样体积: 3 μL。

2.3 标准溶液的配制

分别称取 5 mg 的标准品, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇超声溶解并定容至刻度, 得到浓度为 200 μg/mL 的各激素标准储备溶液。准确吸取 4 种植物激素各标准储备液 100 μL, 用 50%甲醇稀释定容到 10 mL, 得到 4 种植物激素的混合标准使用溶液, 此使用液浓度为 2.0 μg/mL。置于 4 °C 冰箱中保存, 备用。

配制标准曲线系列混合液, 分别准确吸取浓度为 1.0 μg/mL 的镇静剂混合标准溶液 10、25、50、100、150、200 μL 于 10 mL 容量瓶中, 用 50%甲醇定容, 配制成浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μg/mL 的混合标准系列进行线性测定, 临用时现配。

2.4 样品的处理

准确称取已匀浆均匀的样品 5.0 g(准确至 0.0001 g)于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 甲醇, 超声提取 10 min, 加入 4 g 无水硫酸镁和 1 g 氯化钠的混合粉末, 迅速振摇, 涡旋振荡 1 min, 然后 4000 r/min 离心 5 min。移取 1 mL 上清提取液至装有 50 mg C₁₈ 的连盖塑料离心管中, 涡旋混合 1 min, 以 10000 r/min 离心 2 min。取上清液于 0.22 μm 滤膜过滤, 上机测定。

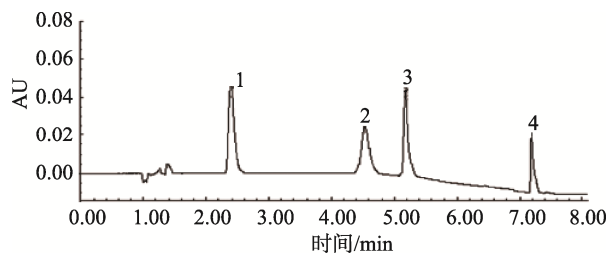
3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

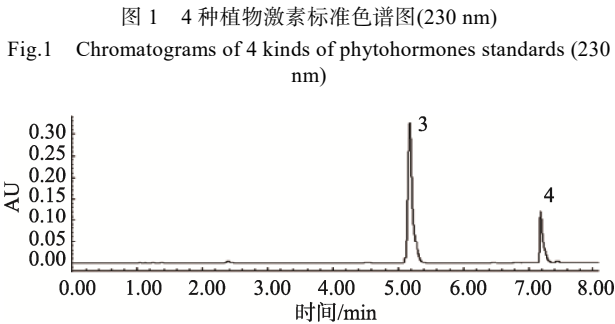
实验中比较了流动相对激素分离的影响, 直接以乙腈-水作为流动相时, 4 种植物激素的混合标准组分不能完全分离, 峰形很差, 色谱峰拖尾严重。缓冲溶液可以改善峰形, 抑制拖尾现象, 因此流动相中需要加入酸或盐。本实验采用乙腈-0.1%甲酸水溶液和乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵水溶液作为流动相比较, 发现用乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵水溶液作为流动相时不但峰型好, 而且分离效果最佳, 也能保证 4 种植物激素与样品杂质干扰有效分离。因此最终确定乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵水溶液作为流动相, 并采用梯度洗脱方式进行洗脱。

采用 200~400 nm 波长范围对 4 种激素进行检测, 发现 4-氯苯氧乙酸最大吸收波长为 227 nm, 2,4-二氯苯氧乙酸最大吸收波长为 230 nm, 6-苄基腺嘌呤最大吸收波长为 269 nm, 氯吡脲最大吸收波长为 263 nm, 为了检测灵敏度

更高, 最后确定 4-氯苯氧乙酸和 2,4-二氯苯氧乙酸选择测定波长为 230 nm(见图 1), 6-苄基腺嘌呤和氯吡脞选择测定波长为 265 nm(见图 2)。



注: 1: 4-氯苯氧乙酸; 2: 2,4-二氯苯氧乙酸; 3: 6-苄基腺嘌呤; 4: 氯吡脞。



注: 1: 4-氯苯氧乙酸; 2: 2,4-二氯苯氧乙酸; 3: 6-苄基腺嘌呤; 4: 氯吡脞。

图 2 4 种植物激素标准色谱图(265 nm)
Fig.2 Chromatograms of four phytohormones standards (265 nm)

3.2 QuEChERS 样品处理的条件选择

3.2.1 提取溶剂的选择

液相色谱测定植物激素常用的提取溶剂主要就是甲醇和乙腈, 方法不同, 提取溶剂也各有差异。在 QuEChERS 样品处理过程中, 本身就要加入无水硫酸镁粉末吸水, 和氯化钠促进分层。实验中分别采用甲醇和乙腈作为提取溶剂进行了比较, 发现二者虽然回收率相当, 但是乙腈提取了大量的果蔬色素, 不利于样品净化, 甚至干扰测定。用甲醇作为提取溶剂, 回收率高, 提取液色素较少, 在 QuEChERS 吸附净化处理过程后, 能有效去除色素类杂质。

3.2.2 QuEChERS 吸附剂的选择

目前, 在农药残留测定中常用的 QuEChERS 吸附剂就包括 C₁₈、PestiCarb 和 PSA。本实验对这 3 种吸附剂分

别进行了加标回收比较, 发现 PestiCarb 对 4 种植物激素吸附性强, 回收率很低。PSA 能去除有机酸, 色素, 金属离子和酚类等物质, 对 4-氯苯氧乙酸和 2,4-二氯苯氧乙酸这两个组分回收率影响很大。而当采用 C₁₈ 作为吸附剂时, 各激素均能得到较好的回收率。因此, 实验对 C₁₈ 添加量的不同和 4 种植物激素的回收率影响关系进一步研究比较, 对加标溶液分别添加 C₁₈ 吸附剂 50、100、200 mg 净化后测定得到的回收率比较, 发现 C₁₈ 添加量越大, 4-氯苯氧乙酸、2,4-二氯苯氧乙酸和氯吡脞这 3 个组分回收率越低, 对 6-苄基腺嘌呤的回收率影响变化不明显(见图 3)。用 50 mg C₁₈ 作为吸附剂时, 既能明显吸附样品提取液色素等杂质, 又能获得较好的回收率。

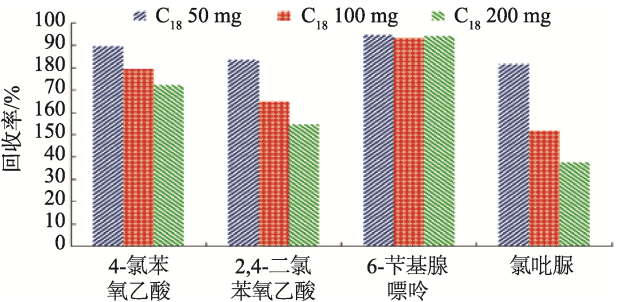


图 3 C₁₈ 不同添加量净化对 4 种植物激素的回收率比较
Fig.3 Recovery of 4 kinds of phytohormones with different purification methods of C₁₈ quantity

3.3 方法学考察

3.3.1 标准曲线及方法的检出限

取 2.3 项下的标准曲线系列混合溶液, 上机测定, 以待测组分的浓度为横坐标(X), 响应峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归分析, 以 3 倍信噪比(S/N=3)和 10 倍信噪比(S/N=10)计算样品的检出限和定量限, 4 种植物激素的线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限见表 1。由表 1 可知, 各组分的线性关系良好, 相关系数 $r \geq 0.9997$ 。

3.3.2 方法的回收率和精密度

称取空白样品, 分别加入 4 种植物激素 5、20、40 μg 的低、中、高 3 个不同水平混合标准, 按 2.4 项下的样品前处理方法处理后上机测定, 每个加标水平平行测定 5 次, 得出方法的回收率和精密度。由表 2 可知, 4 种植物激素的平均回收率为 83.8%~98.4%, 相对标准偏差为 2.06%~3.89%。本方法具有良好的精密度。

表 1 4 种植物激素的线性方程、线性范围、相关系数、检出限					
Table 1 Regression equations with correlation coefficients and limits of detection for 4 kinds of phytohormones					
激素组分	线性方程	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数 r	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
4-氯苯氧乙酸	$Y=60316X-3826$	0.1~4.0	0.9997	0.026	0.064
2,4-二氯苯氧乙酸	$Y=44126X+102$	0.1~4.0	0.9998	0.032	0.078
6-苄基腺嘌呤	$Y=124666X-15676$	0.1~4.0	0.9999	0.007	0.018
氯吡脞	$Y=143743X-3610$	0.1~4.0	0.9998	0.006	0.015

表 2 4 种植物激素的回收率和精密度(n=5)				
Table2 Recovery and precision of 4 phytohormones(n=5)				
激素组分	加标量/μg	测得值/μg	回收率/%	RSD/%
4-氯苯氧乙酸	5	4.92	98.4	3.62
	20	18.31	91.6	3.89
	40	38.71	96.8	3.27
2,4-二氯苯氧乙酸	5	4.36	87.2	3.01
	20	18.20	91.0	2.89
	40	35.71	89.3	3.38
6-苄基腺嘌呤	5	4.72	94.4	2.40
	20	18.73	93.7	2.78
	40	38.39	96.0	2.06
氯吡啶	5	4.19	83.8	3.56
	20	17.62	88.1	3.02
	40	34.39	86.0	3.44

3.3.3 稳定性实验

取高、中、低 3 个不同浓度的混合标准溶液，按 2.2 项下的实验条件，每隔 1、2、3、5、7 d 进行实验，记录 4 种植物激素的峰面积变化情况。结果发现，放在冰箱内 4℃冷藏的标准混合溶液基本很稳定，7 d 内未见明显变化，各激素组分峰面积变化 RSD≤1.03%，组分的稳定性较好。

3.4 样品测定

按本试验方法对市场销售的的 3 个脐橙、2 个草莓、5 个豆芽、3 个青菜、2 个西兰花样品进行了测定，结果显示，样品中均未检出激素残留(见图 4、图 5)，样品加标检测见图 6。

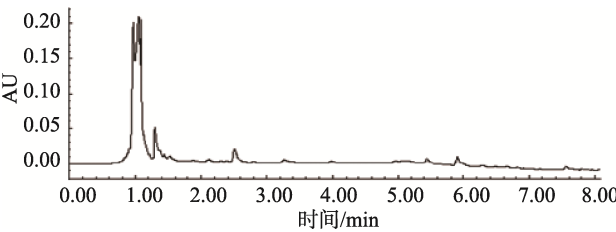


图 4 4 种植物激素样品测定色谱图(230 nm)

Fig.4 Chromatograms of 4 kinds of phytohormones in samples (230 nm)

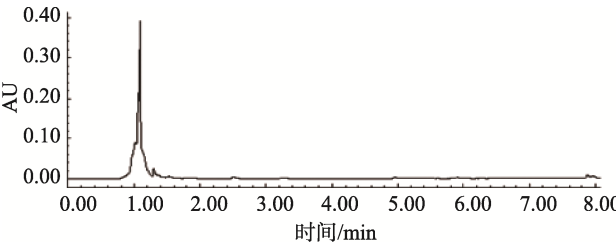
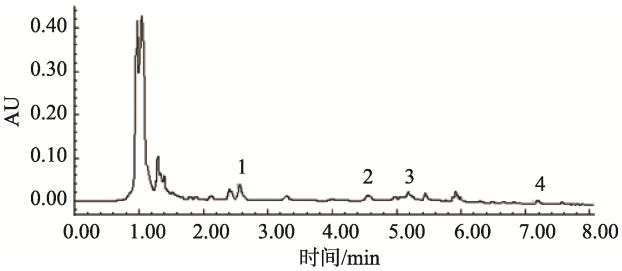


图 5 4 种植物激素样品测定色谱图(265 nm)

Fig.5 Chromatograms of 4 kinds of phytohormones in samples (265 nm)



注: 1: 4-氯苯氧乙酸; 2: 2,4-二氯苯氧乙酸; 3: 6-苄基腺嘌呤; 4: 氯吡啶。

图 6 样品加标色谱图(230 nm)

Fig.6 Chromatograms of sample spiked with 4 kinds of phytohormones (230 nm)

4 结 论

本文研究了果蔬样品经甲醇提取后，采用 QuEChERS 吸附净化样品，实验比较了 C₁₈、PestiCarb 和 PSA 3 种不同吸附剂对组分回收率的影响，并且确定了一个回收率较好的 QuEChERS 样品处理方法。超高效液相色谱法同时测定果蔬中 4 种植物激素残留，灵敏度高。该方法样品前处理简单方便、快速高效，有良好的线性相关性，回收率较好，重现性好，准确度高。在植物激素残留快速检测方面有明显优势。

参考文献

[1] 王文文, 曹雪琴, 杨中, 等. 植物生长调节剂在果树中的应用现状及残留分析方法研究进展[J]. 现代农业科技, 2017, (12): 129–131.
Wang WW, Cao XQ, Yang Z, et al. Research advances on application status of plant growth regulators in fruit trees and its residue analysis [J]. Mod Agric Sci Technol, 2017, (12): 129–131.

[2] 史晓梅, 金芬, 黄玉婷, 等. 水果中常用植物生长调节剂的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 417–422, 426.
Shi XM, Jin F, Huang YT, et al. Review on advance of plant growth regulators in fruits [J]. Food Ind Sci Technol, 2012, 33(4): 417–422, 426.

[3] GB 2763-2016 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763-2016 National food safety standard-Maximum residue limits for pesticides in food [S].

[4] 赵士权, 查河霞, 赵好. 离子色谱法测定水果和蔬菜中 2,4-二氯苯氧乙酸的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2016, 52(12): 1435–1438.
Zhao SQ, Zha HX, Zhao H. IC determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables [J]. Phys Test Chem Anal B, 2016, 52(12): 1435–1438.

[5] 王杏, 周小倩, 刘超, 等. 高效液相色谱法同时测定果蔬中 6 种植物激素的残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(20): 5376–5380.
Wang X, Zhou XQ, Liu C, et al. Determination of 6 kinds of plant hormones residues in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography [J]. J food Saf Qual, 2018, 9(20): 5376–5380.

[6] Klinsunthorn N, Petsom A, Nhujak T. Determination of steroids adulterated in liquid herbal medicines using QuEChERS sample preparation and high performance liquid chromatography [J]. J Pharm

- Biom Anal, 2011, 55(5): 1175–1178.
- [7] 朱群英, 朱玉玲, 索莉莉, 等. 在线固相萃取-高效液相色谱法同时测定豆芽中 11 种植物生长剂和杀菌剂[J]. 分析科学学报, 2018, 34(4): 507–512.
- Zhu QY, Zhu YL, Suo LL, *et al.* Simultaneous determination of eleven plant growth regulators and fungicides in bean sprouts by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. J Anal Sci, 2018, 34(4): 507–512.
- [8] 朱松, 袁晓晴, 戴军, 等. QuEChERS/HPLC/DAD 法同时检测果蔬中多种植物激素残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(4): 513–518.
- Zhu S, Yuan XQ, Dai J, *et al.* Simultaneous determination of different phytohormones residues in fruits and vegetables by QuEChERS/DAD/HPLC [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(4): 513–518.
- [9] 马桂娟, 汤丽华, 朱捷, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定豆芽中 4 种药物残留[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(10): 138–142.
- Ma GJ, Tang LH, Zhu J, *et al.* Determination of four drug residues in bean sprouts by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2018, 39(10): 138–142.
- [10] 张婧雯, 郭春海, 葛世辉, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时测定豆芽中 6-苄基腺嘌呤、赤霉素和 4-氯苯氧乙酸的残留量[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5): 441–444.
- Zhang JW, Guo CH, Ge SH, *et al.* Simultaneous determination of 6-benzylaminopurine, gibberellin and 4-chlorophenoxyacetic acid in bean sprouts by solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 26(5): 441–444.
- [11] 郭虹, 任武洁, 魏玉霞, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中 7 种植物生长调节剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(6): 660–663, 666.
- Guo H, Rren WJ, Wei YX, *et al.* Determination of 7 kinds of plant growth regulators in vegetables by dispersive solid phase extraction ultra performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2018, 28(6): 660–663, 666.
- [12] 周纯洁, 赵博, 吴丹, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜中 6 种植物生长调节剂[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 94–98, 10.
- Zhou CJ, Zhao B, Wu D, *et al.* Determination of six plant growth regulators in vegetables by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Ind Sci Technol, 2016, 37(10): 94–98, 10.
- [13] 薛荣旋, 黄诚, 刘国平, 等. QuEChERS 结合气相色谱-串联质谱法测定水果中 5 种植物生长调节剂[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(5): 561–566.
- Xue RX, Huang C, Liu GP, *et al.* Determination of five plant growth regulators in fruits by QuEChERS with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2017, 29(5): 561–566.
- [14] 刘印平, 王丽英, 路杨, 等. 河北省市售豆芽菜中 6 种植物生长调节剂残留调查分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 3827–3833.
- Liu YP, Wang LY, Lu Y, *et al.* Analysis of the residues of 6 kinds of plant growth regulators in bean sprouts in Hebei province [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(10): 3827–3833.
- [15] 吴平谷, 谭莹, 张晶, 等. 分级净化结合气相色谱-质谱联用法测定豆芽中 10 种植物生长调节剂[J]. 分析化学, 2014, 42(6): 866–871.
- Wu PG, Tan Y, Zhang J, *et al.* Determination of 10 plant growth regulators in bean sprouts by sequential cleaning-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2014, 42(6): 866–871.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



胡海山, 高级工程师, 主要研究方向为食品营养与食品安全。

E-mail: emoc98311@163.com