

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240322015

QuEChERS-超高效液相色谱-质谱法同时测定 豆芽中 9 种氟喹诺酮类药物和植物生长调节剂

沈 洁*, 戴尽波

(梅州市食品药品监督管理局, 梅州 514071)

摘 要: **目的** 建立一种 QuEChERS-超高效液相色谱-质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)能够快速、稳定地同时测定豆芽中多种氟喹诺酮类以及生长调节剂药物残留的分析方法。**方法** 样品粉碎, 经甲酸乙腈提取, 净化包材料净化后, 通过保留时间匹配以及母离子、主要碎片离子的精确质量数进行定性分析、基质标准溶液外标定量的方法进行分析。**结果** 在优化条件下, 9 种药物保留时间在 4.9~8.8 min。质量浓度范围在 0.010~0.200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 9 种参数的线性关系良好, 其相关系数为 0.9149~0.9599, 检出限为 5~10 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 10~20 $\mu\text{g/kg}$, 空白样品的加标回收率为 64.8%~135.5%, 相对标准偏差为 1.05%~12.91%。**结论** 该方法操作简单、准确, 可快速定性定量分析豆芽中 9 种氟喹诺酮类药物和植物生长调节剂的残留, 对实现豆芽种植过程管控、日常监管、质量保障具有重要意义。

关键词: 豆芽; 氟喹诺酮; 生长调节剂; QuEChERS; 超高效液相色谱-质谱法

Simultaneous determination of 9 kinds of fluoroquinolones and plant growth regulators in bean sprouts by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry

SHEN Jie*, DAI Jin-Bo

(Meizhou Institute for Food and Drug Control, Meizhou 514071, China)

ABSTRACT: Objective To establish a QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for rapid and stable determination of residues of fluoroquinolones and growth regulators in bean sprouts. **Methods** The samples were crushed, extracted with acetonitrile-formic acid, purified using cleanup materials, and then analyzed through qualitative analysis based on retention time matching, precise mass numbers of parent ions and major fragment ions, as well as quantitative analysis using external standard calibration with matrix standard solutions. **Results** Under optimized conditions, the retention times of 9 kinds of drugs ranged from 4.9–8.8 minutes. Good linear relationships between the 9 kinds of parameters and quality concentration levels ranging from 0.010–0.200 $\mu\text{g/mL}$ were observed, with correlation coefficients ranging from 0.9149–0.9599. The limits of detection ranged from 5–10 $\mu\text{g/kg}$, while quantification limits ranged from 10–20 $\mu\text{g/kg}$. The recovery rates of blank samples spiked with

基金项目: 梅州市社会发展科技计划项目(2020B086)

Fund: Supported by the Meizhou Social Development Science and Technology Project (2020B086)

*通信作者: 沈洁, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全分析与风险监测。E-mail: 458474304@qq.com

*Corresponding author: SHEN Jie, Master, Senior Engineer, Meizhou Institute for Food and Drug Control, Meizhou 514071, China. E-mail: 458474304@qq.com

standards were between 64.8% and 135.5%, with relative standard deviations ranging from 1.05%–12.91%.

Conclusion This method is simple and accurate, and can be used for rapid qualitative and quantitative analysis of residual fluoroquinolone drugs and plant growth regulators in bean sprouts. It holds significant importance for implementing process control, daily supervision, and quality assurance in bean sprout cultivation processes.

KEY WORDS: bean sprouts; fluoroquinolones; growth regulators; QuEChERS; high performance liquid chromatography-mass spectrometry.

0 引言

豆芽,也称如意菜、芽苗菜、银芽,是各种谷类、豆类、树类的种子培育出可以食用的“芽菜”,也称“活体蔬菜”。由于其品种丰富,同时含有蛋白质、维生素、糖类以及多种矿物质^[1],其所含的多酚类物质具有抗肿瘤以及预防癫痫和抗癌功效^[2],是人们常见的餐桌蔬菜。豆芽在生产过程中,会遭到假单胞菌、酵母菌等病菌的侵染,造成豆芽胚轴下部或胚根上部腐烂,然后逐渐扩大蔓延造成整根豆芽的腐烂变质^[3-4]。一些不法商贩为牟取高额利润,在培育豆芽过程中盲目追求产量、改变外观、缩短生长周期,违法使用植物生长调节剂(plant growth regulators, PGRs)和抗生素药物^[5-7]，“毒”豆芽事件屡屡发生,问题豆芽事件愈演愈烈^[8-9],残留在食品中的杀菌剂等药物会通过食物链进入人体,摄入的超标食物不仅具有潜在的致癌性和遗传毒性^[10],还会使人体内的菌群对喹诺酮类药物产生耐药性。PGRs 被称为植物天然激素或植物内源激素^[11-12],它与植物激素具有相似生理和生物学效应,对植物生长和调控有着一定的影响,对植物的生长和发育发挥着一定的调控作用^[13],人体摄入 PGRs 短期内影响不大,但长期食用可能导致各种疾病^[14],轻者刺激黏膜、恶心、呕吐等,重者引起肢端肥大、骨质疏松、非霍奇金淋巴瘤等^[15]。有关 PGRs 残留的检测方法主要有酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法^[16]、气相色谱(gas chromatography, GC)法^[17]、气相色谱-串联质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)法^[18]、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法^[19]、液相色谱-质谱(learning content management system, LC-MS)法和高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)法^[20]。GC 和 GC-MS/MS 需要进行化学衍生,操作较为烦琐。ELISA 灵敏度较低,难以实现痕量分析。HPLC 的灵敏度较低,基质干扰影响较大,前处理复杂并且容易造成假阳性干扰。HPLC-MS/MS 具有灵敏度高、选择性好等优点,在满足复杂基质痕量残留分析的基础上,实现多残留化合物的同时分析,是 PGRs 残留分析的优选方法。

氟喹诺酮类抗生素的抗菌谱比较广,其抗菌活性很

强,尤其对革兰氏阴性杆菌的抗菌活性很高,是一类高效且价格低廉的广谱抗菌药,能抑制细菌内脱氧核糖核酸旋转酶的活性,使细胞不能正常分裂,从而达到杀菌的作用^[21-22]。氟喹诺酮类药物常见恶心、头痛以及白细胞减少,肝损伤等不良反应,人体过量食用还会产生潜在的“三致”(致癌、致畸、致突变)作用,并诱导致病菌产生耐药性^[23-25]。通过食物链在人体内积累,导致性早熟、急性中毒、癌症、肝肾衰竭、心肌肥大以及肺部淤血等疾病^[26-28]。由于氟喹诺酮类药物在养殖业中应用广泛,动物源性食品中氟喹诺酮类药物残留检测方法的研究较为深入。目前,针对豆芽中的氟喹诺酮类药物的检测方法研究也日益增多,但是检测的目标化合物较为单一,覆盖范围不够全面,容易形成检测盲区,同时国家标准中针对豆芽中的多种氟喹诺酮类药物残留的检测方法也较少。QuEChERS (Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe),是近年来国际上最新发展起来的一种用于农产品检测的快速样品前处理技术。此技术在检测目标物具有灵敏度高、快速、回收率高且可多残留检测能力,被广泛应用于食品安全、环境检测及生物检测等领域^[29]。本研究通过改良食品检测技术,研究出可以同时测定豆芽中的生长调节剂与氟喹诺酮类药物残留量的方法,使其能够促进豆芽的生产和消费环节中食品安全监管和质量控制水平的提升,以期为人们提供健康有营养的豆芽,同时也能为新一代豆芽药物检测提供技术参考及相关数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豆芽:市售,样品为超市、农贸市场、菜市场随机购买的样品,包括绿豆芽和黄豆芽各 1 份。混合标准品:恩诺沙星、环丙沙星、洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、丹诺沙星(纯度大于 97%)、4-氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤(纯度大于 99%)(阿尔塔科技有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,美国 ACS 恩科化学);乙酸、甲酸、氨水(分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司);氯化钠、无水硫酸钠、无水硫酸镁、无水氯化铵、无水氯化钙(分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司);十八烷基固相萃取填料(ODS C₁₈, 50 μm 60A)、N-丙基乙二胺吸附剂[(N-propyl ethylenediamine, PSA), 40~60 μm 60A](天津博纳艾杰尔科

技术有限公司); 氧化锆硅胶吸附剂(Z-SEP⁺, 500 mg, 美国 Supelco 公司)、多壁碳纳米管(0.5~2 μm<8 nm, 南京先丰纳米科技公司)。

1.2 仪器与设备

LCMS-8040 高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪[配电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI⁺和 ESI⁻)及 LCMS solution3.2]、AUW220 型电子分析天平(220 g/0.1 mg)、色谱柱 Shimadzu VP-ODS(C₁₈)(100 mm×2.1 mm, 5 μm)(日本岛津企业管理有限公司); Thermo ST16R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); UC-7100S 型数控超声波清洗(美瑞泰克科技有限公司); S25 旋涡混匀器(德国 IKA 集团); Milli Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 全自动氮吹浓缩仪(Autoeva-60)(睿科仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: Shimadzu VP-ODS(C₁₈)(100 mm×2.1 mm, 5 μm); 流速 0.3 mL/min; 柱温 40℃; 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水; 进样量 10 μL。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序 Table 1 Gradient programs of mobile phase		
时间/min	流动相体积分数/%	
	0.1%甲酸水溶液	乙腈
0.01	85	15
1.00	70	30
6.00	30	70
6.50	50	50
8.50	85	15
10.00	85	15

1.3.2 质谱条件

质谱条件: 电离模式: ESI⁺和 ESI⁻; 扫描模式: 多反应监测扫描(multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 3.5 kV; 雾化气: 氮气 3.0 L/min; 干燥气: 氮气 15 L/min; 碰撞气: 氩气; DL 管温度: 250℃; 加热模块温度: 400℃。分别对 9 种标准物质的定性离子和定量离子进行质谱扫描, 扫描方式: 4-氟苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤采用负离子模式扫描; 恩诺沙星、环丙沙星、氟罗沙星、洛美沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星采用正离子模式扫描。

1.3.3 标准品溶液的制备

精确称 10 mg 各标准品于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 其中氟喹诺酮类药物先加入甲酸溶解, 再以甲醇定容至刻度, 配制成质量浓度约为 1.0 mg/mL 的标准储备液, 转入棕色标准品瓶中于-20℃保存, 有效期为 6 个月。将上述储备液混合稀释成质量浓度均为 10.0 mg/L 的

混合标准中间液, 有效期为 1 个月。再分别准确吸取混合标准中间液以 10%乙腈稀释成实际所需要的系列标准工作液, 待测。

1.3.4 QuEChERS 前处理

(1)提取液的优化

豆芽样品经粉碎均质后, 准确称取 5.0 g(精确至 0.01 g) 6 份试样置于 50 mL 具塞离心管中, 加入质量浓度为 1 μg/mL 的混合标准溶液 500 μL, 6 份试样分别加入 10 mL 乙腈、10 mL 含 0.1%甲酸的乙腈溶液、10 mL 含 0.2%甲酸的乙腈溶液、10 mL 含 0.5%甲酸的乙腈溶液、10 mL 含 0.8%甲酸的乙腈溶液、10 mL 含 1%甲酸的乙腈溶液, 超声提取 10 min。加入 8 g 无水 Na₂SO₄、2 g NaCl, 立即涡旋混合 1 min, 以 8000 r/min 离心 5 min 使乙腈和水相分层。取上层乙腈溶液 2 mL 置于 QuEChERS 离心管中(含 100 mg 无水 Na₂SO₄、50 mg Z-SEP⁺), 立即涡旋混合 2 min, 以 7000 r/min 离心 5 min, 移取全部上清液于 10 mL 离心管, 于 45℃水浴中氮气吹至近干, 用 20%乙腈水定容至 1 mL, 涡旋混匀 1 min, 上清液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后, 取续滤液供超高效液相色谱-质谱仪测定

(2)盐析材料的优化

豆芽样品经粉碎均质后, 准确称取 5.0 g(精确至 0.01 g) 4 份试样置于 50 mL 具塞离心管中, 分别加入质量浓度为 1 μg/mL 的混合标准溶液 500 μL, 加入 10 mL 含 1%甲酸的乙腈溶液, 超声提取 10 min。分别加入 10 g 无水 Na₂SO₄、2.5 g NaCl; 8 g 无水 Na₂SO₄、2 g NaCl; 6 g 无水 Na₂SO₄、1.5 g NaCl; 4 g 无水 Na₂SO₄、1 g NaCl, 立即涡旋混合 1 min, 以 8000 r/min 离心 5 min 使乙腈和水相分层。取上层乙腈溶液 2 mL 置于 QuEChERS 离心管中(含 100 mg 无水 Na₂SO₄、50 mg Z-SEP⁺), 立即涡旋混合 2 min, 以 7000 r/min 离心 5 min, 移取全部上清液于 10 mL 离心管, 于 45℃水浴中氮气吹至近干, 用 20%乙腈水定容至 1 mL, 立即涡旋混匀 1 min, 上清液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后, 取续滤液供超高效液相色谱-质谱仪测定。

(3)净化材料的优化

豆芽样品经粉碎均质后, 准确称取 5.0 g(精确至 0.01 g) 16 份试样置于 50 mL 具塞离心管中, 分别加入质量浓度为 1 μg/mL 的混合标准溶液 500 μL, 加入 10 mL 含 1%甲酸的乙腈溶液, 超声提取 10 min。分别加入 8 g 无水 Na₂SO₄、2 g NaCl, 立即涡旋混合 1 min, 以 8000 r/min 离心 5 min 使乙腈和水相分层。取上层乙腈溶液 2 mL 分别置于 16 支 QuEChERS 离心管中, 其中 4 支 QuEChERS 离心管内含不同质量的 PSA (40、60、80、100 mg), 4 支 QuEChERS 离心管内含不同质量的 C₁₈ (40、60、80、100 mg), 4 支 QuEChERS 离心管内含不同质量的 Z-sep⁺ (40、60、80、100 mg), 4 支 QuEChERS 离心管内含不同质量的 GCB (40、60、80、100 mg), 立即涡旋混合 2 min, 以 7000 r/min 离心

5 min, 移取全部上清液于 10 mL 离心管, 于 45℃ 水浴中氮吹至近干, 用 20% 乙腈水定容至 1 mL, 立即涡旋混匀 1 min, 上清液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后, 取续滤液供超高效液相色谱-质谱仪测定

(4) 净化材料的复合优化

豆芽样品经粉碎均质后, 准确称取 5.0 g (精确至 0.01 g) 2 份试样置于 50 mL 具塞离心管中, 分别加入质量浓度为 1 μg/mL 的混合标准溶液 500 μL, 加入 10 mL 含 1% 甲酸的乙腈溶液, 超声提取 10 min。分别加入 8 g 无水 Na₂SO₄、2 g NaCl, 立即涡旋混合 1 min, 以 8000 r/min 离心 5 min 使乙腈和水相分层。取上层乙腈溶液 2 mL 分别置于 2 支 QuEChERS 离心管中, 其中 1 支 QuEChERS 离心管内含 40 mg Z-Sep⁺、40 mg Z-C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA, 另外 1 支 QuEChERS 离心管内含不同质量的 20 mg 多壁碳纳米管、40 mg Z-C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA, 立即涡旋混合 2 min, 以 7000 r/min 离心 5 min, 移取全部上清液于 10 mL 离心管, 于 45℃ 水浴中氮吹至近干, 用 20% 乙腈水定容至 1 mL, 立即涡旋混匀 1 min, 上清液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后, 取续滤液供超高效液相色谱-质谱仪测定。

(5) 复溶液的优化

豆芽样品经粉碎均质后, 准确称取 5.0 g (精确至 0.01 g) 3 份试样置于 50 mL 具塞离心管中, 分别加入质量浓度为 1 μg/mL 的混合标准溶液 500 μL, 加入 10 mL 含 1% 甲酸的乙腈溶液, 超声提取 10 min。分别加入 8 g 无水 Na₂SO₄、2 g NaCl, 立即涡旋混合 1 min, 以 8000 r/min 离心 5 min 使乙腈和水相分层。取上层乙腈溶液 2 mL 置于 QuEChERS

离心管中(含 100 mg 无水 Na₂SO₄、50 mg Z-SEP⁺), 立即涡旋混合 2 min, 以 7000 r/min 离心 5 min, 移取全部上清液于 10 mL 离心管, 于 45℃ 水浴中氮吹至近干, 3 份试样分别加入一级水; 10% 甲醇水; 10% 乙腈水, 定容至 1 mL, 立即涡旋混匀 1 min, 上清液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后, 取续滤液供超高效液相色谱-质谱仪测定。

1.4 数据处理

超高效液相色谱质谱仪采集的数据通过 Lab Solutions (Version 5.114) 软件(岛津公司)完成预处理、生成标准曲线, 并进行外标法定量分析; Microsoft Excel 2016 统计分析处理数据, Origin 9.1 进行图谱处理。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

本研究检测对象有 9 种化合物, 化学性质差异相对较大, 色谱峰需要达到完全分离, 才能进行准确定量。因此, 实验针对色谱柱类型和流动相成分分别进行了优化。

2.1.1 色谱柱优化

分别考察了 Shim-pack GIST-HP C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3 μm)、EclipseXDB-C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm)、ACQUITY HSS T₃ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Shimadzu VP-ODS (C₁₈) (100 mm×2.1 mm, 5 μm)、Kinetex F₅ (50 mm×3.0 mm, 2.6 μm) 5 种型号的色谱柱对 9 种目标化合物的分离效果, 结果发现使用 Shimadzu VP-ODS (C₁₈) 色谱柱时, 各组分能够完全分离、且峰型尖锐, 结果见图 1, 最终选择采取 Shimadzu VP-ODS (C₁₈) 色谱柱进行分离。

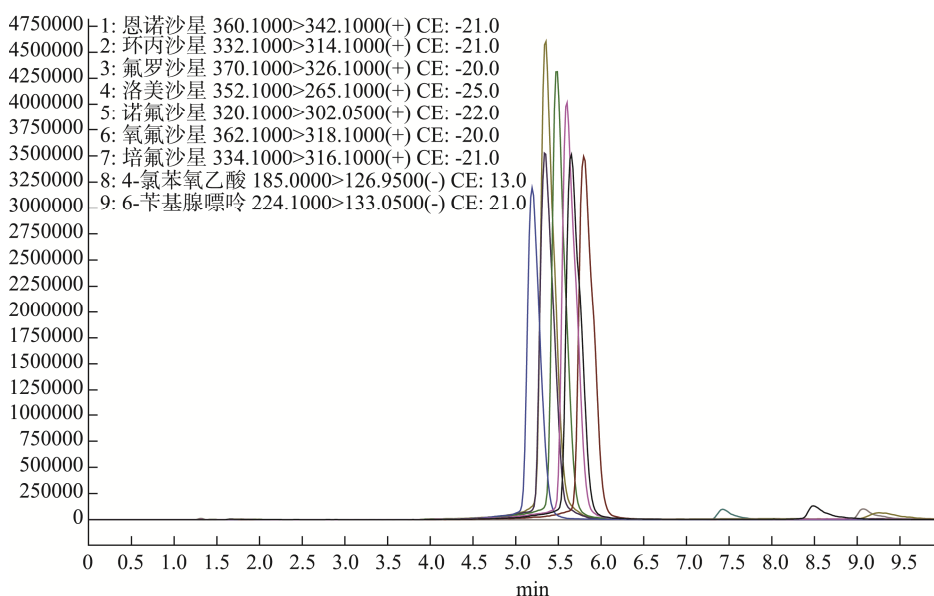


图1 Shimadzu VP-ODS(C₁₈)色谱柱分离9种化合物的TIC图

Fig.1 TIC diagrams of 9 kinds of compounds separated by Shimadzu VP-ODS(C₁₈) chromatographic column

2.1.2 流动相优化

流动相体系直接决定了目标物的响应、峰型以及出峰时间。本研究考察了流动相体系甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.01%甲酸水溶液 3 种流动相体系, 结果发现, 纯甲醇作为有机相时, 氟罗沙星、诺氟沙星等化合物峰形毛刺多、分叉, 出现前沿峰, 且梯度运行时间长。当乙腈作为有机相时化合物峰形较窄、分离度好、灵敏度高, 在 10 min 化合物能够完全分离。电喷雾离子源正离子模式下, 流动相中添加适量甲酸可增强目标分析物离子化效率, 提高灵敏度, 本研究大部分化合物均为正离子模式, 但也有 2 种化合物采用负离子模式, 因此对浓度为 0.1%和 0.01%的甲酸水进行实验, 实验发现甲酸浓度为 0.01%时, 正离子模式的灵敏度较低, 且峰形较差, 甲酸浓度为 0.1%时, 大部分化合物峰形尖锐, 灵敏度较高, 对负离子模式化合物的抑制作用较小, 各化合物灵敏度和峰形均可满足检测要求, 实验最终选择乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相。

2.2 质谱参数优化

质谱参数优化采用针泵连续进样的方式, 分别将 1 μg/mL 的 9 种化合物标准溶液分别在正、负离子模式下对各待测化合物进行全扫描, 确定合适的电离方式和准分子离子, 再对相应的准分子离子进行二级质谱扫描, 每种化合物选择信号高、干扰小的两个离子对作为定性与定量离子, 通过优化碰撞能量, 使特征碎片离子信号达到最大。其色谱-质谱参数见表 2。

2.3 QuEChERS 前处理条件优化

2.3.1 提取试剂的优化

对于喹诺酮类多采用乙腈提取^[24-26], 在乙腈中适当添加甲酸则可以明显改善对生长调节剂的提取效率^[27-29]。本研究在相同加标水平(40 μg/kg)下, 对比了不同体积比例的甲酸和乙腈作为提取溶剂的提取效果。结果见图 2, 氟喹诺酮类化合物(恩诺沙星、环丙沙星、氟罗沙星、洛美沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星)的回收率随着甲酸比例的升高而逐渐升高, 当甲酸乙腈比为 0.8%时, 大部分氟喹诺酮类化合物回收率最高; 而 4-氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤的回收率则随着甲酸比例的升高会先下降后升高的趋势, 当甲酸乙腈比为 0.8%时, 各化合物的回收率表现均良好, 因此选择甲酸乙腈比为 0.8%的混合溶液作为提取溶剂。

2.3.2 盐析材料优化

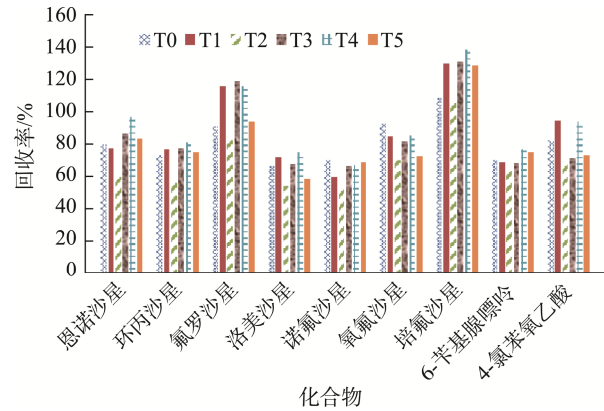
无水 Na₂SO₄、NaCl 均有很强的盐析作用, 本研究在相同加标水平(40μg/kg)下, 对比了不同质量比例的无水 Na₂SO₄ 和 NaCl 作为盐析材料的盐析效果。结果见图 3, 当加入了 10 g 无水 Na₂SO₄、2.5 g NaCl 时, 恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星的回收率最高, 盐析效果最好, 洛美沙星、氧氟沙星的回收率虽然不是最高, 但回收率表现良好, 而氟罗沙星、4-氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤的回收率与其他方案相差无几, 所以最终选择 10 g 无水 Na₂SO₄、2.5 g NaCl 作为盐析材料。

2.3.3 净化材料优化

Z-sep⁺主要吸附复杂基质中的脂肪, C₁₈ 主要吸附弱极性物质, 例如脂肪、多环芳烃、矿物质等, GCB 主要吸附

表 2 9 种化合物定量离子、定性离子、碰撞能量及保留时间
Table 2 Mass spectral parameters and retention times for 9 kinds of compounds

序号	化合物	保留时间/min	电离方式	前体离子	产物离子	母离子电压/V	碰撞电压/V	子离子电压/V
1	恩诺沙星	5.443	ESI ⁺	360.10	342.10	-17.0	-21.0	-24.0
					316.15	-17.0	-20.0	-23.0
2	环丙沙星	5.398	ESI ⁺	332.10	314.10	-15.0	-21.0	-22.0
					231.00	-16.0	-38.0	-24.0
3	氟罗沙星	4.964	ESI ⁺	370.10	326.10	-10.0	-20.0	-24.0
					269.05	-10.0	-28.0	-29.0
4	洛美沙星	5.576	ESI ⁺	352.10	265.10	-17.0	-25.0	-29.0
					308.15	-16.0	-18.0	-16.0
5	诺氟沙星	5.276	ESI ⁺	320.10	302.05	-15.0	-22.0	-22.0
					231.00	-15.0	-43.0	-24.0
6	氧氟沙星	5.142	ESI ⁺	362.10	318.10	-17.0	-20.0	-23.0
					261.05	-17.0	-28.0	-28.0
7	培氟沙星	5.153	ESI ⁺	334.10	316.10	-16.0	-21.0	-23.0
					290.10	-15.0	-19.0	-21.0
8	4-氯苯氧乙酸	8.826	ESI ⁻	185.00	126.95	11.0	13.0	23.0
					91.00	12.0	20.0	23.0
9	6-苄基腺嘌呤	7.175	ESI ⁻	224.10	133.05	14.0	21.0	22.0
					132.00	14.0	31.0	22.0

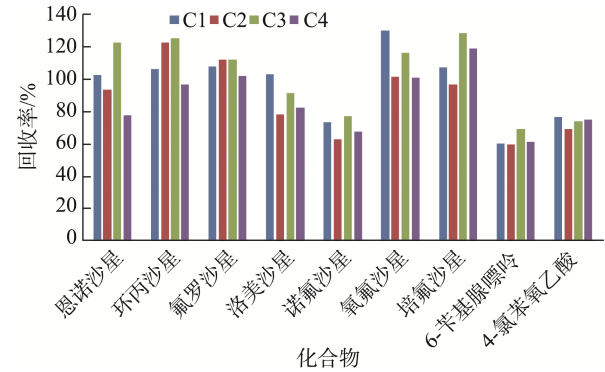


注: 图中T0、T1、T2、T3、T4、T5分别代表的是提取试剂为10 mL 乙腈、10 mL含0.1%甲酸的乙腈溶液、10 mL含0.2%甲酸的乙腈溶液、10 mL含0.5%甲酸的乙腈溶液、10 mL含0.8%甲酸的乙腈溶液、10 mL含1%甲酸的乙腈溶液。

图2 提取溶剂的优化
Fig.2 Optimization of extraction solvents

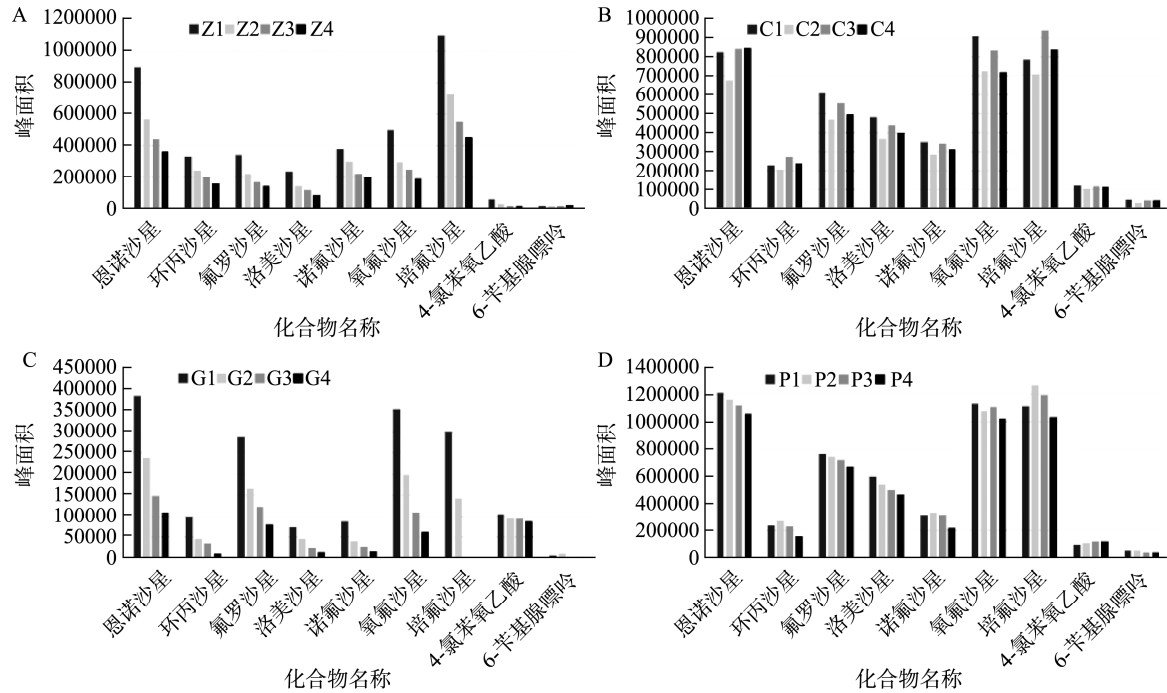
叶绿素、类胡萝卜素等具有平面结构的化合物, PSA 去除样品脂肪酸、糖等干扰物^[30-32], 但对各目标物也有一定的吸附作用^[33-35]。因此, 本研究选用了 Z-sep⁺ (40、60、80、100 mg)、C₁₈ (40、60、80、100 mg)、GCB (40、60、80、100 mg)、PSA (40、60、80、100 mg)等 16 组作为净化优化的实验组, 对比它们的净化效果, 详见下图 4。根据结果可得, 随着

Z-sep⁺的增加, 氟喹诺酮类化合物和 4-氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤峰面积逐渐降低; 随着 C₁₈ 的增加, 氟喹诺酮类化合物和 4-氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤峰面积先降低后升高再降低; 随着 GCB 的增加, 氟喹诺酮类化合物和 4-氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤峰面积逐渐降低; 随着 PSA 的增加, 恩诺沙星、氟罗沙星、洛美沙星、氧氟沙星峰面积逐渐降低, 环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、6-苄基腺嘌呤峰面积先升高后降低。最终得出了 40 mg Z-sep⁺、40 mg C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA 的效果最佳。



注: 图中C1、C2、C3、C4分别代表Na₂SO₄:NaCl的比例为5:2.5、5:5、10:2.5、10:5 (g:g)。

图3 盐析材料的优化
Fig.3 Optimization of salting-out materials

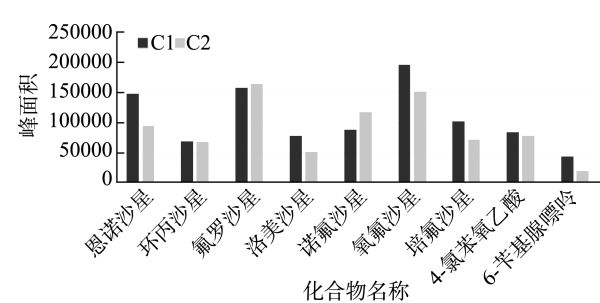


注: 图中ABCD分别表示净化材料为Z-sep⁺、C₁₈、GCB、PSA;图中Z1、C1、G1、P1代表质量为40 mg, 图中Z2、C2、G2、P2代表质量为60 mg, 图中Z3、C3、G3、P3代表质量为80 mg, 图中Z4、C4、G4、P4代表质量为100 mg。

图4 不同净化材料对9种化合物的净化效果
Fig.4 Purification effect of different purification materials on 9 kinds of compounds

2.3.4 净化材料复合优化

在首次优化中, 得出了 40 mg Z-sep⁺、40 mg C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA 有较好的净化效果, 因此, 在后续优化中, 本研究选用了 40 mg Z-sep⁺、40 mg C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA 和 20 mg 多壁碳纳米管、40 mg Z-C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA 两组进行优化, 由图 5 可以看出 40 mg Z-sep⁺、40 mg C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA 的净化材料组合的峰面积更高, 净化效果更好, 因此, 这组作为本研究最终选择的净化材料。



注: C1代表净化包为40 mg Z-sep⁺、40 mg C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA; C2代表净化包为20 mg多壁碳纳米管、40 mg Z-C₁₈、40 mg GCB、40 mg PSA。

图5 净化材料的复合优化
Fig.5 Optimization of purification materials

2.3.5 复溶液优化

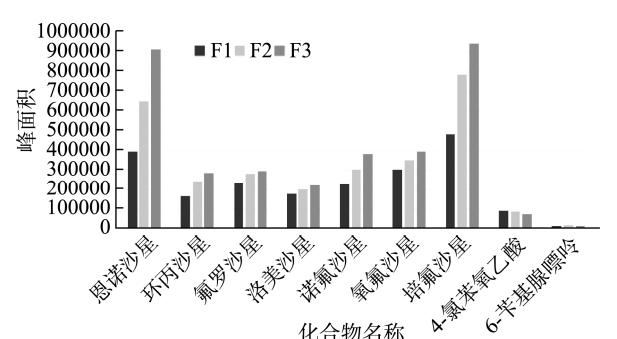
复溶液选择水、10%甲醇水、10%乙腈水进行实验优化, 从图 6 可以得出, 10%乙腈水的效果最佳。

3 方法学评价

3.1 基质效应研究

基质效应(matrix effect, ME)是指样品检测过程中, 基质中某些组分对目标物浓度或检测准确度的影响, 评估并采取降低 ME 的有效措施可以使分析更加可靠。ME 可以

通过基质标准曲线与纯溶剂标准曲线的斜率之比来评价。ME<0.8 时, 表示存在基质抑制效应; 0.8≤ME≤1.2 时, 表示 ME 不明显; ME>1.2 时, 表示存在基质增强效应^[36-37]。实验考察了 9 种化合物在豆芽中的 ME, 实验结果表明, 22%化合物的 ME<0.8, 表现为基质抑制效应; 55%化合物的 ME 为 0.8~1.2, ME 不明显; 22%化合物的 ME>1.2, 表现为基质增强效应。因此, 本研究采用基质匹配标准曲线, 可降低对目标药物 ME 的影响。



注: F1为水; F2为10%甲醇水; F3为10%乙腈水。

图6 复溶液的优化
Fig.6 Optimization of complex solution

3.2 线性关系及检出限

将 9 种化合物用豆芽空白基质配制成质量浓度分别为 10、20、50、100、200 ng/mL 混合标准工作液, 在最优条件下进行上机检测。以被测组分的峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制各组分校准曲线, 通过线性拟合得出线性回归方程及相关系数, 结果如表 3, 9 种化合物在 10~200 ng/mL 浓度范围, 其相关系数为 0.9149~0.9599 之间, 均呈现出良好的线性关系。9 种化合物 ME 为 0.66%~1.42%, 检出限达到 5.0~10.0 μg/kg, 定量限达到 10.0~20.0 μg/kg 满足豆芽种抗生素及生长调节剂残留的测定要求。

表 3 豆芽中 9 种化合物的 ME、线性关系、检出限及定量限
Table 3 ME Linear relationship, detection limit and quantitative limit of 9 kinds of compounds in bean sprouts

药物名称	线性方程	相关系数	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)	ME
恩诺沙星	$Y=2\times10^6X-3\times10^6$	0.9573	5	10	1.37
环丙沙星	$Y=2\times10^6X-2\times10^6$	0.9521	5	10	1.42
氟罗沙星	$Y=1\times10^6X-2\times10^6$	0.9599	5	10	0.89
洛美沙星	$Y=2\times10^5X-9\times10^5$	0.9375	5	10	0.83
诺氟沙星	$Y=2\times10^6X-2\times10^6$	0.9467	5	10	0.91
氧氟沙星	$Y=2\times10^6X-3\times10^6$	0.9589	5	10	0.85
培氟沙星	$Y=3\times10^6X-4\times10^6$	0.9477	5	10	1.06
4-氯苯氧乙酸	$Y=2\times10^5X-3\times10^5$	0.9513	10	20	0.75
6-苄基腺嘌呤	$Y=1\times10^5X-1\times10^5$	0.9149	10	20	0.66

3.3 回收率及精密度

取空白豆芽样品, 每份称取 5.0 g 分别加入的氟喹诺酮类、生长调节剂混合标准液浓度, 使样品加标浓度分别为 10、20、50、100 μg/kg。按优化后的 QuEChERS 步骤进行前处理, 然后上机分析。3 个添加水平的重复实验 6 次测定得到方法回收率和精密度, 由表 4 可知, 回收率范围为 64.8%~135.5%, 由于 ME 的影响, 低浓度时部分的化合物回收率相对偏低。相对标准偏差为 1.05%~12.91%。

表 4 回收率以及相对标准偏差
Table 4 Recoveries and relative standard deviations

药物名称	添加浓度 /(μg/kg)	平均浓度 /(μg/kg)	平均回收率 /%	相对标准 偏差/%
恩诺沙星	10	8.84	88.4	6.04
	50	48.10	96.2	5.58
	100	89.87	89.9	3.02
环丙沙星	10	7.21	72.1	2.57
	50	45.41	90.8	3.18
	100	107.09	107.1	3.52
氟罗沙星	10	7.93	79.3	2.74
	50	39.91	79.8	5.59
	100	110.16	110.2	1.21
洛美沙星	10	6.48	64.8	3.67
	50	37.03	74.1	5.29
	100	135.47	135.5	3.37
诺氟沙星	10	12.22	122.2	2.12
	50	51.80	103.6	1.05
	100	122.56	122.6	3.07
氧氟沙星	10	6.83	68.3	10.62
	50	36.75	73.5	5.05
	100	118.31	118.3	3.47
培氟沙星	10	6.55	65.5	6.04
	50	40.72	81.4	7.46
	100	125.98	126.0	7.14
4-氯苯氧乙酸	20	14.24	71.2	12.91
	50	37.95	75.9	4.49
	100	86.59	86.6	4.16
6-苄基腺嘌呤	20	15.38	76.9	6.13
	50	36.20	72.4	10.14
	100	107.43	107.4	7.19

4 结 论

本研究建立了检测豆芽中氟喹诺酮类药物以及 4-氯苯氧乙酸和 6-苄基腺嘌呤等生长调节剂的超高效液相色谱-质谱法, 优化后的 QuEChERS 前处理方法简便、净化效果

良好、实验结果准确, 实现了对多种化合物的高灵敏度、高效率的检测, 与其他检测方法相比优势明显, 为以后豆芽中的喹诺酮以及生长调节剂的测定提供了参考。

参考文献

[1] 于雪娜, 王荣艳, 张学康, 等. 不同萌发期黄豆芽活性物质检测及营养价值分析[J]. 绿色科技, 2019, (1): 14-15.
YU XN, WANG RY, ZHANG XK, *et al.* Determination of active substances and analysis of nutritional value of soybean sprouts at different germination stages [J]. Green Sci Technol, 2019, (1): 14-15.

[2] 肖金玲, 沈蒙, 葛云飞, 等. 萌发绿豆中多酚类物质动态变化规律及其抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(7): 36-43.
XIAO JL, SHEN M, GE YF, *et al.* Study on the dynamic changes and antioxidant activity of polyphenols in germinating mung beans [J]. J Cere Oils Ass, 2020, 35(7): 36-43.

[3] 梅再胜, 梅晗璐, 戴馨怡. 豆芽生产过程中发生腐烂的原因与防治技术[J]. 植物医院, 2015, 21(4): 36-39.
MEI ZS, MEI HL, DAI XY. The reason of bean sprouts rot and its prevention and cure technology [J]. Bot Hos, 2015, 21(4): 36-39.

[4] 杨秋月. 芽苗菜优势腐败菌生长规律及控制技术研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2012.
YANG QY. Studies on the growth regularity and control techniques of the dominant spoilage bacteria in sprout vegetables [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2012.

[5] 袁嫦静, 王守伟, 黄大昉, 等. 理性、科学地直面中国食品安全持久战(上): 2014 年食品安全热点科学解读[J]. 食品工业科技, 2015, 36(4): 22-26.
YUAN CJ, WANG SW, HUANG DF, *et al.* Facing China's food safety protracted war rationally and scientifically (I): Scientific interpretation of 2014 food safety hot spots [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(4): 22-26.

[6] 北京市食品药品监督管理局. 北京市食品药品监督管理局关于印发《工业化豆芽生产许可审查细则(2014 版)》的通知[EB/OL]. [2014-08-27]. <https://www.beijing.gov.cn/zhengce/gfxwj/201905/t2019052258036.html> [2023-07-15]
Beijing Municipal Food and Drug Administration. Circular of the Beijing municipal food and drug administration on the issuance of the detailed rules for the examination and approval of the production of industrialized bean sprouts (2014 edition) [EB/OL]. [2014-08-27]. <https://www.beijing.gov.cn/zhengce/gfxwj/201905/t2019052258036.html> [2023-07-15]

[7] 李长风, 王沙沙, 崔小利, 等. 4-氯苯氧乙酸钠对大豆芽品质的影响及安全风险性分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(10): 80-87.
LI CF, WANG SS, CUI XL, *et al.* Effect of sodium 4-chlorophenoxyacetate on quality of soybean sprouts and safety risk analysis [J]. Food Ferment Ind, 2017, 43(10): 80-87.

[8] 郝凤桐. “毒豆芽”及其危害治理[J]. 职业卫生与应急救援, 2013, 31(5): 285-288.
HAO FT. "Poisonous bean sprout" and its harm control [J]. Occ Heal Eme

- Res, 2013, 31(5): 285–288.
- [9] 江苏省南通市通州区市场监管局. 食无巨细安全为先: 南通市通州区市场监管局“毒豆芽”系列案件查处的启示[J]. 食品安全导刊, 2019, (11): 50–51.
- Tongzhou District Market Supervision Bureau, Nantong City, Jiangsu Province. No matter the size of food, safety first: Nantong Tongzhou District market supervision bureau “Poisonous bean sprouts” series of cases investigated inspiration [J]. China Food Saf Magaz, 2019, (11): 50–51.
- [10] HAO D, YUJIE F, GUANG W, *et al.* Detection and degradation characterization of 16 quinolones in soybean sprouts by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Foods, 2022, 11(16): 192–205.
- [11] YA TL, YUAN JY, LU LG, *et al.* A fluorescent Salamo-Salen-Salamo-Zn(II) sensor for bioimaging and biosensing H_2PO_4 -in zebrafish and plants [J]. Spectrochim Acta A, 2023, 303: 217–223.
- [12] PIMOLWAN S, PANYADA P, THANAWAT P, *et al.* Effect of germination and illumination on melatonin and its metabolites, phenolic content, and antioxidant activity in mung bean sprouts [J]. Plants, 2022, 11(21): 33–42.
- [13] HONG J, CHAO Q, YAN PZ, *et al.* Biochanin A partially restores the activity of ofloxacin and ciprofloxacin against topoisomerase IV mutation-associated fluoroquinolone-resistant *Ureaplasma species* [J]. J Med Microbiol, 2017, 66(11): 98–110.
- [14] WENDISCH FV, BRITO FL, LOPEZ GM, *et al.* The flexible feedstock concept in industrial biotechnology: Metabolic engineering of *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and yeast strains for access to alternative carbon sources [J]. J Biotechnol, 2016, 234: 158–163.
- [15] 张新中, 彭涛, 李晓春, 等. 植物生长调节剂的残留与安全性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 614–619.
- ZHANG XZ, PENG T, LI XC, *et al.* Residue and safety analysis of plant growth regulators [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(3): 614–619.
- [16] 邓正正, 王力华, 王庆礼. 植物生长调节剂对水曲柳组培苗生长及内源激素的影响[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(12): 10–13.
- DENG ZZ, WANG LH, WANG QL. Effects of plant growth regulators on growth and endogenous hormones of *Fraxinus mandshurica* *in vitro* [J]. J Nort Forest Univ, 2009, 37(12): 10–13.
- [17] 龚睿蓉, 金悦敏. 气相色谱法测定豆芽中 2,4-二氯苯氧乙酸残留量[J]. 农业工程, 2016, 6(3): 46–49.
- GONG RR, JING YM. Determination of 2,4-D residue in bean sprouts by gas chromatography [J]. Agric Eng, 2016, 6(3): 46–49.
- [18] 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.* A method for the determination of 10 plant growth regulators in bean sprouts by gas chromatography-mass spectrometry was developed [J]. China J Anal Chem, 2014, 42(6): 866–871.
- [19] LI GL, LIU SC, SUN ZW, *et al.* A simple and sensitive HPLC method based on pre-column fluorescence labeling for multiple classes of plant growth regulator determination in food samples [J]. Food Chem, 2015, 170: 123–130.
- [20] 刘运明, 刘华良, 吉文亮, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定豆芽中7种植物生长调节剂的残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(12): 1880–1883.
- LIU YM, LIU HL, JI WL, *et al.* Simultaneous determination of seven plant growth regulators residues in bean sprouts by QuEChERS-High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. China J Health Lab, 2015, 25(12): 1880–1883.
- [21] 陈木娟. 临床氟喹诺酮类药的药理分析[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(8): 271–272.
- CHEN MJ. Pharmacological analysis of clinical fluoroquinolones [J]. China J Mod Drug App, 2016, 10(8): 271–272.
- [22] 郭欢. 7-位含有取代吡咯烷/哌啶结构片段的氟喹诺酮衍生物的合成与抗菌作用研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- GUO H. Synthesis and antibacterial activity of fluoroquinolone derivatives containing substituted pyrrolidine/piperidine segments at position 7 [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2011.
- [23] 冯亚奇. 氟喹诺酮类药物不良反应及合理用药分析[J]. 临床医学, 2017, (6): 28–29.
- FENG YQ. Analysis of adverse drug reactions and rational use of fluoroquinolones [J]. Clin Med, 2017, (6): 28–29.
- [24] 贾王平, 郭代红, 杨鸿溢, 等. 11962 例氟喹诺酮类药物不良反应报告分析及肝损害风险信号挖掘[J]. 临床药物治疗杂志, 2019, 17(7): 34–38.
- JIA WP, GUO DH, YANG HY, *et al.* Analysis of 11962 adverse drug reaction reports of fluoroquinolones and risk signal mining of liver damage [J]. Clinic Med J, 2019, 17(7): 34–38.
- [25] 林秋文, 胡水勋, 林海燕. 氟喹诺酮类药物的不良反应及合理用药策略分析[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(10): 159–160.
- LIN QW, HU SX, LIN HY. Adverse drug reactions of fluoroquinolones and analysis of rational drug use strategy [J]. China J Mod Drug App, 2019, 13(10): 159–160.
- [26] WANG W, WANG B, LIU Z, *et al.* Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryo exposed to 6-benzylaminopurine [J]. Chemosphere, 2019, 233(5): 336–346.
- [27] 高宗林, 曹旭妮. 二维液相色谱测定绿豆芽中赤霉素、6-苄基腺嘌呤、4-氯苯氧乙酸和2,4-二氯苯氧乙酸[J]. 化学试剂, 2019, 41(1): 63–68.
- GAO ZL, CAO XN. Determination of gibberellin, 6-benzyladenine, 4-chlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in mung bean sprouts by two-dimensional liquid chromatography [J]. Chem Rea, 2019, 41(1): 63–68.
- [28] 刘红, 曾志杰, 李传勇, 等. 4-氯苯氧乙酸钠对小鼠的毒性及其残留分

- 析[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 197–204.
- LIU H, ZENG ZJ, LI CY, *et al.* Toxicity and residue analysis of sodium 4-chlorophenoxyacetate in mice [J]. Food Sci, 2016, 37(3): 197–204.
- [29] BRUZZONITI MC, CHECCHINI L, CARLO RM, *et al.* QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: A critical review [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(17): 4089–4116.
- [30] 王炼, 黎源倩, 王海波, 等. 基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉和牛奶中 20 种兽药残留[J]. 分析化学, 2011, 39(2): 203–207.
- WANG L, LI YQ, WANG HB, *et al.* Matrix solid-phase dispersion-High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 20 veterinary drug residues in meat and milk [J]. Anal Chem, 2011, 39(2): 203–207.
- [31] 李娜, 张玉婷, 刘磊, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 4 类 29 种禁用兽药残留[J]. 色谱, 2014, 32(12): 31–37.
- LI N, ZHANG YT, LIU L, *et al.* Quechers-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 29 restricted veterinary drug residues in food of animal origin [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(12): 31–37.
- [32] 冯楠, 路勇, 姜洁, 等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法快速筛查食品中 73 种有毒有害物质[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 221–227.
- FENG N, LU Y, JIANG J, *et al.* Quechers-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid screening of 73 toxic and harmful substances in food [J]. Food Sci, 2013, 34(16): 221–227.
- [33] 卜明楠, 石志红, 康健, 等. QuEChERS 结合 LC-MS/MS 同时测定虾肉中 72 种兽药残留[J]. 分析测试学报, 2012, 31(5): 552–558.
- BU MN, SHI ZH, KANG J, *et al.* Simultaneous determination of 72 kinds of veterinary drug residues in shrimp meat by Quechers and LC-MS/MS [J]. J Anal Test, 2012, 31(5): 552–558.
- [34] AGUILERA-LUIZ MM, MARTÍNEZ VJL, ROMERO-GONZÁLEZ R, *et al.* Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Chromatogr A, 2008, (1205): 10–16.
- [35] LOZANO A, RAJSKI Ł, BELMONTE-VALLES N, *et al.* Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in real samples [J]. J Chromatogr A, 2012, (1268): 109–122.
- [36] 李若思, 危玲, 刘嘉颖. 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法检测婴幼儿配方奶粉中苯并三唑类紫外线吸收剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(8): 184–190.
- LI RS, WEI L, LIU JY. Determination of benzotriazole ultraviolet absorbers in infant formula milk powder by ultra performance liquid chromatography-quadrupole electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(8): 184–190.
- [37] CHEN D, XU Q, LU YP, *et al.* The QuEChERS method coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of diuretics in animal-derived foods [J]. J Food Comp Anal, 2021, 101: 245–263.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)

作者简介



沈洁, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全分析与风险监测。
E-mail: 458474304@qq.com