

同位素编码衍生-高效液相色谱串联质谱法测定 果蔬样品中的羧酸类植物生长调节剂

蔡轶平¹ 孙志伟¹ 王小艳² 索有瑞² 尤进茂^{* 1 2}

¹(曲阜师范大学, 山东省生命有机分析重点实验室, 曲阜 273165)

²(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘 要 以 d_0/d_3 -10-甲基吡啶酮-2-磺酰吡嗪 (d_0/d_3 -MASPz) 为同位素编码衍生试剂, 建立了高效液相色谱串联质谱 (HPLC-MS/MS) 快速测定果蔬中 6 种羧酸类植物生长调节剂的分析方法。分别以 d_0 -MASPz (轻型) 和 d_3 -MASPz (重型) 为衍生样品和对照品, 混合后进行 HPLC-MS/MS 分析。轻型和重型衍生物分别以 $[M+H]^+$ m/z 208.2 和 $[M+H]^+$ m/z 211.2 作为多级反应监测离子对, 以重型衍生物作为相应轻型衍生物的内标物, 建立定量分析方法。结果表明, 在 6.5 min 内可实现 6 种分析物的完全分离, 轻/重衍生物保留时间差异小于 0.026 min, 6 种分析物的轻/重信号强度比在 10 倍动态范围内线性关系良好, 相关系数 $r > 0.9991$, 检测限和定量限分别为 0.19 ~ 0.34 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.53 ~ 0.96 $\mu\text{mol/L}$, 相对标准偏差小于 3.8%, 标准加入的回收率为 95.3% ~ 105.5% 之间。

关键词 同位素编码衍生; 高效液相色谱串联质谱; 植物生长调节剂

1 引言

内源性植物激素是一类由植物自身代谢产生, 在极低浓度下发挥明显生理效应的微量有机物质, 影响植物的发芽、生根、开花、结实等生理活动^[1]。在农业生产中, 人们常使用一些结构和活性与内源性植物激素相似的化学物质作为低成本的替代品, 用于调节植物生长和提高产量。为了规范这些外源性植物生长调节剂的应用, 许多国家都制定了农产品中最小残留限量标准^[2]。利用高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 可以同时实现多种植物生长调节剂的快速定量分析^[3]。然而, 基质效应严重影响 HPLC-MS/MS 分析性能, 难以获得可靠的定量结果。以稳定同位素标记物做内标, 可以有效克服基质效应的影响, 但商售同位素内标物种类有限, 价格昂贵。近年来, 同位素编码衍生技术备受关注, 借助同位素编码衍生试剂, 使具有相同官能团的一类分析物同时获得同位素衍生物, 以此作为内标物进行定量分析, 可以极大地降低同位素内标物的造价^[4]。针对于胺基、醛基、羧基等官能团的同位素编码衍生试剂均有报道^[5], 但应用于羧酸类植物生长调节剂的研究还很少^[6, 7]。

本研究制备了一对新型同位素编码衍生试剂 d_0/d_3 -10-甲基吡啶酮-2-磺酰吡嗪 (d_0/d_3 -MASPz)。 d_0/d_3 -MASPz 以吡啶酮为母体, 吡啶酮具有的分子内共振电离机制使得此试剂具有极强的质谱增敏作用^[8], 此试剂以 CH_3/CD_3 为同位素编码部件, 3 个 H/D 编码原子既保证了低分辨质谱对轻/重信号的区分度, 又能最大程度地减小色谱分离过程中的同位素效应。本研究以 d_0/d_3 -MASPz 为同位素编码衍生试剂, 建立了测定 6 种羧酸类植物生长调节剂的同位素内标定量方法, 成功用于果蔬样品中植物生长调节剂的快速、灵敏、准确测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1290 型超高效液相色谱仪, 6460 型三重四级杆串联质谱仪, 配备电喷雾电离源 (ESI), Masshunter 工作站软件 (Agilent 公司)。

2014-10-06 收稿; 2014-12-24 接受

本文系国家自然科学基金 (Nos. 21305076, 31300292) 和山东省自然科学基金 (No. ZR2012BQ022) 资助

* E-mail: jmyou6304@163.com

d_0 -MASPz(轻型)和 d_3 -MASPz(重型)由本实验室自制;吲哚乙酸(IAA)、吲哚丙酸(IPA)、吲哚丁酸(IBA)、1-萘乙酸(1-NAA)、2-萘乙酸(2-NAA)、脱落酸(ABA)均购自Aladdin公司;乙腈(色谱纯,美国Sigma公司);1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)等均为分析纯。

2.2 d_0/d_3 -MASPz的制备

以本实验自制的 d_0/d_3 -10-甲基吡啶酮-2-磺酰氯(d_0/d_3 -MASC)^[9]为原料制备 d_0/d_3 -MASPz。具体步骤如下:称取 d_0/d_3 -MASC固体1g溶于200mL乙腈中,向其中加入30mL水,1g哌嗪固体,60℃反应20min。反应后旋蒸至干,水洗,抽滤,得黄色固体,用95%乙醇重结晶3次,纯度大于99.9%。

2.3 溶液的配制

用乙腈配制 1.0×10^{-3} mol/L植物生长调节剂标准储备液,用乙腈稀释至所需的浓度系列。称取 d_0/d_3 -MASPz固体0.0034g,用乙腈溶解并定容至10mL,浓度为 1.0×10^{-3} mol/L;称取EDC·HCl固体0.1g,用乙腈溶解并定容至10mL,浓度为 5.0×10^{-2} mol/L。

2.4 同位素编码衍生

取一支2mL安瓿瓶,依次加入150 μ L d_0 -MASPz溶液、30 μ L EDC溶液、25 μ L植物生长调节剂标品,密封,在60℃水浴中反应60min;另取一支2mL安瓿瓶,采取同样步骤,以 d_3 -MASPz衍生另一份标准品或样品。两份衍生液冷却后混合,加入等体积水和硫酸铵固体(0.03g)进行盐析辅助萃取,取有机相0.5 μ L进样分析,衍生反应示意图见图1(A)。

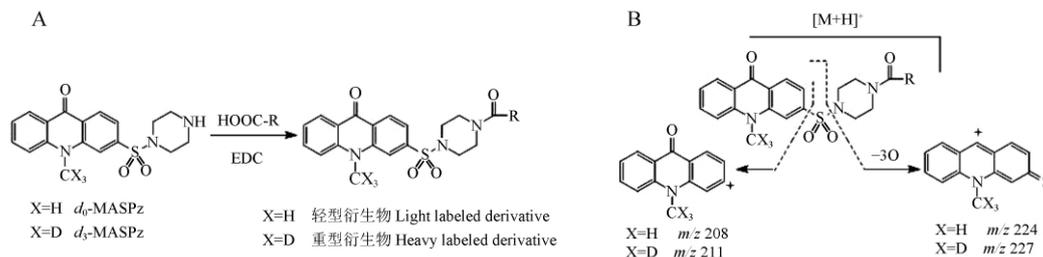


图1 d_0/d_3 -MASPz 衍生植物生长调节剂的反应式(A)及衍生物质谱裂解模式图(B)

Fig. 1 Reaction scheme of plant growth regulators with d_0/d_3 -10-methyl-acridone-2-sulphonyl piperazine (MASPz) (A) and fragmentation pattern of derivatives (B)

2.5 色谱-质谱条件

色谱条件: Agilent ZORBAX Eclipse C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m), 流动相 A 为 95% 乙腈(含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈, 流速: 0.2 mL/min, 梯度洗脱程序: 0 min (40% B) → 6 min (60% B) → 10 min (100% B)。

质谱条件: ESI 电离源正离子模式, 干燥气温度 300℃, 流速 9 L/min, 雾化气压力 40 psi (278 kPa), 鞘气温度 250℃, 流速 8 L/min, 毛细管电压 3.5 kV, 碎裂电压、碰撞能及 MRM 参数见表 1。

3 结果与讨论

3.1 质谱检测及色谱分离

在 2.5 节所述的条件下, 衍生物均显示高丰度的 $[M+H]^+$ 信号和规则的 MS/MS 碎片, MS 和 MS/MS 数据见表 2。衍生物电离及裂解模式见图 1B。轻型衍生物主要产生 m/z 208.2 和 224.2 的碎片, 重型衍生物主要产生 m/z 211.2 和 227.2 的碎片。以 $[M+H]^+$ m/z 208.2 作为轻型衍生物的 MRM 监测离子, $[M+H]^+$ m/z 211.2 作为重型衍生物的 MRM 监测离子。轻型和重衍生物分离的离子流色谱图见图 2A, 各衍生物的保留时间见表 1。结果表明, 在 6.5 min 内可实现 6 种分析物的完全分离, 轻/重衍生物保留时间差异小于 0.026 min。

3.2 衍生化方法评价

本实验考察了衍生化方法的线性、灵敏度、精密度和准确度。浓度为 1 ~ 1000 μ mol/L 的系列标准溶液经 d_0 -MASPz 衍生后进行分析, 结果表明, 各植物生长调节剂均具有良好的线性响应, 相关系数均

表1 植物生长调节剂衍生物的保留时间、质谱参数和相对响应因子

Table 1 Retention time, parameters of MS and relative response factors for plant growth regulator derivatives

序号 No.	衍生物 Derivatives	保留时间 Retention time (min)	一级二级质谱数据 ^a MS and MS/MS data		碎裂电压 Fragmentor (V)	碰撞能 CE (eV)	相对响应因子 ^b Relative response factors
			[M+H] ⁺	MS/MS			
1	d ₃ -MASP-IAA	4.053	518.2	211.2, 227.2	135	55	1.0537
2	d ₀ -MASP-IAA	4.078	515.2	208.2, 224.2	135	55	
3	d ₃ -MASP-ABA	4.205	607.1	211.2, 227.2	195	65	0.9978
4	d ₀ -MASP-ABA	4.231	604.1	208.2, 224.2	195	65	
5	d ₃ -MASP-IPA	4.754	532.2	211.2, 227.2	135	55	0.9923
6	d ₀ -MASP-IPA	4.778	529.2	208.2, 224.2	135	55	
7	d ₃ -MASP-IBA	5.604	546.2	211.2, 227.2	135	55	0.9968
8	d ₀ -MASP-IBA	5.623	543.2	208.2, 224.2	135	55	
9	d ₃ -MASP-(1-NAA)	5.993	529.1	211.2, 227.2	135	55	1.0327
10	d ₀ -MASP-(1-NAA)	6.001	526.1	208.2, 224.2	135	55	
11	d ₃ -MASP-(2-NAA)	6.274	529.2	211.2, 227.2	135	55	1.0289
12	d ₀ -MASP-(2-NAA)	6.278	526.2	208.2, 224.2	135	55	

^a带下划线的为定量离子; ^b 轻型衍生物对重型衍生物的相对响应因子。

^a Quantification MRM transitions are underlined; ^b Relative response factors of light form to heavy form.

IAA: Indoleacetic acid; ABA: Abscisic acid; IPA: Indole propionic acid; IBA: Indolebutyric acid; NAA: Naphthylacetic acid.

大于0.9955。检出限(LOD, $S/N=3$)和定量限(LOQ, $S/N=10$)分别在0.19~0.34 $\mu\text{mol/L}$ 和0.53~0.96 $\mu\text{mol/L}$ 范围内。对10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的标准品重复分析($n=6$),相对标准偏差小于3.8%。对5, 50和500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度水平的标准品进行分析,准确度在97.5%~103.8%之间。结果表明,精密度和准确度良好,能够满足实际检测需求。

3.3 同位素内标定量分析

定量分析模式参考文献[10]并通过两种策略对内标定量法的可靠性进行评价。(1)用d₀-MASPz衍生3份浓度分别为 5×10^{-5} mol/L, 2.5×10^{-5} mol/L和 1.25×10^{-5} mol/L的标准品,同时使用d₃-MASPz衍生3份浓度均为 2.5×10^{-5} mol/L标准品,将轻/重衍液按体积比1:1混合,对3份混合液进行分析。结果表明,在以上3个比率水平上,6种植物生长调节剂的轻/重衍生物质谱信号强度比均接近理论值(见图3A);(2)两份浓度为 2.5×10^{-5} mol/L的植物生长调节剂标准品,分别用d₀-MASPz和d₃-MASPz进行同位素编码衍生,将两份衍生液按照体积比1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 5:1和10:1混合后分析,以轻/重衍生物质谱信号强度之比对体积比做校正曲线,6种分析物线性良好,相关系数 $r \geq 0.9991$,曲线斜率在0.9923~1.0647之间(图3B)。以上数据表明,本实验建立的基于同位素编码衍生的内标定量方法可实现6种植物生长调节剂的快速准确测定,以斜率作为轻/重衍生物质谱响应的相对校正因子,可以方便地实现样品中分析物的绝对定量分析。

3.4 实际样品分析

市场购得黄瓜、西红柿样品,根据文献[11]的方法提取植物生长调节剂,提取液按2.4节方法进行同位素编码衍生后,进行HPLC-MS/MS分析。典型样品MRM色谱图见图2B,测得各植物生长调节剂的含量见表2。西红柿样品中吲哚乙酸、吲哚丁酸植物生长素含量较高,黄瓜样品中萘乙酸残留量较高。向样品中添加标准对照品,测得方法回收率在95.3%~105.5%之间。本方法快速、准确,满足测定果蔬样品中植物生长调节剂残留的要求,可为规范植物生长调节剂的使用提供技术支持。

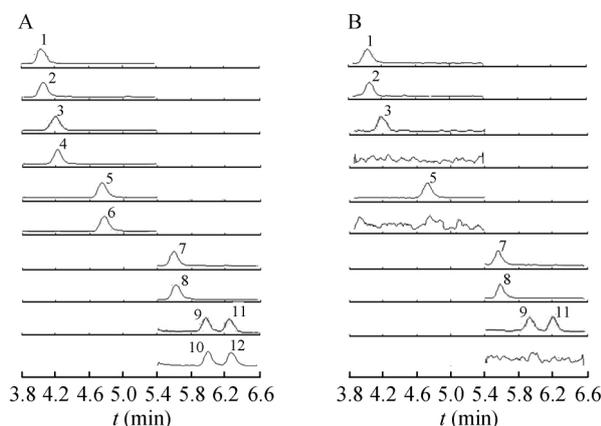


图2 标准对照品(A)和代表性样品(B)的MRM离子流图

Fig. 2 Ion current chromatogram of plant growth regulator standards (A) and representative real sample (B)

峰号同表1 (the peak numbers are same as in Table 1)。

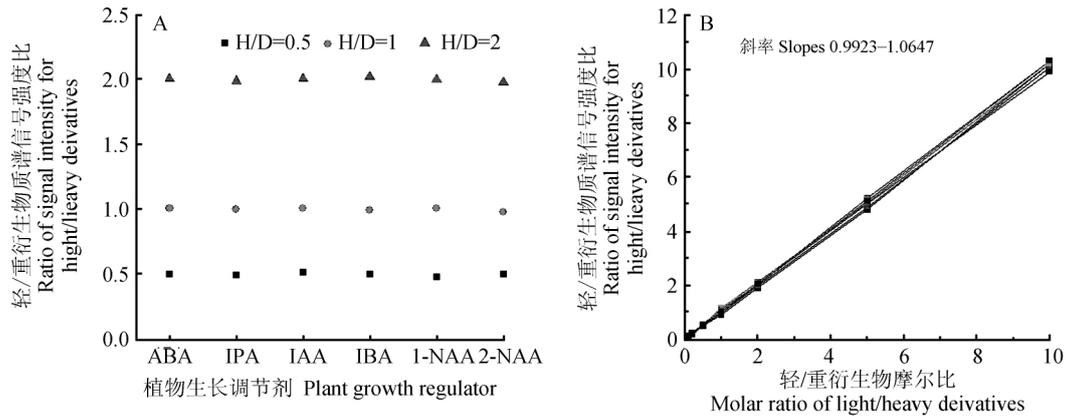


图 3 同位素内标定量方法验证图

Fig. 3 Validation of isotope internal standard quantification method

(A) 浓度比为 1:2, 1:1, 2:1 的标准品经轻/重衍生后的信号强度比; (B) 轻/重衍生物信号强度比与浓度比的线性响应曲线。
 (A) Signal intensity ratios of light/heavy derivatives with the amount of 1:2, 1:1, and 2:1; (B) Linearity of light/heavy signal ratio against molar ratio in range of 1:10 to 10:1.

表 2 果蔬样品中各植物生长调节剂的含量

Table 2 Content of plant growth regulators in selected cucumber and tomato samples

植物生长调节剂 Plant growth regulators	黄瓜 Cucumber			西红柿 Tomato		
	含量 Content ($\mu\text{g/g}$)	添加量 Added ($\mu\text{g/g}$)	回收率 Recovery (%, $n=3$)	含量 Content ($\mu\text{g/g}$)	添加量 Added ($\mu\text{g/g}$)	回收率 Recovery (%, $n=3$)
吲哚乙酸 Indoleacetic acid, IAA	2.9	5	102.4	ND	5	98.5
脱落酸 Abscisic acid, ABA	ND	5	95.7	ND	5	96.2
吲哚丙酸 Indole propionic acid, IPA	ND	5	104.7	ND	5	105.5
吲哚丁酸 Indolebutyric acid, IBA	6.8	5	98.3	ND	5	95.3
1-萘乙酸 1-Naphthylacetic acid, 1-NAA	ND	5	97.8	3.9	5	96.6
2-萘乙酸 2-Naphthylacetic acid, 2-NAA	ND	5	102.5	ND	5	98.7

ND: 未检出(ND means not detected)。

References

- ZHOU Yan-Ming, XIN Xue. *Food Science*, **2010**, 31(18): 301-304
周艳明, 忻雪. *食品科学*, **2010**, 31(18): 301-304
- Chen H, Zhang Z X, Zhang G M, Guo X F, Zhang H S, Wang H. *J. Agr. Food Chem.*, **2010**, 58(8): 4560-4564
- Bai Y, Zhang J, Liu H. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 403(8): 2307-2314
- OUYANG Yue, SUN Xiao-Hong, YAN Jing, CHU Jin-Fang, YAN Cun-Yu. *Chin. Sci. Bull. (Chin. Ver.)*, **2013**, 58(7): 2762-2778
欧阳玥, 孙晓红, 闫静, 褚金芳, 闫存玉. *科学通报*, **2013**, 58(7): 2762-2778
- Sun Z, Sun H, Li H., You J, Xia L. *Curr. Anal. Chem.*, **2014**, 10(3): 381-392
- Huang Y Q, Liu J Q, Gong H, Yang J, Li Y, Feng Y Q. *Analyst*, **2011**, 136(7): 1515-1522
- Sun X, Ouyang Y, Chu J, Yan J, Yu Y, Li X, Yang J, Yan C. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1338: 67-76
- ZHAO Huai-Xin, SUN Xue-Jun, SUN Zhi-Wei, HU Bao-Jun, LIU Qin-Ze, ZHAO Xin-Quan, YOU Jin-Mao. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(2): 187-193
赵怀鑫, 孙学军, 孙志伟, 卢宝军, 刘钦泽, 赵新全, 尤进茂. *分析化学*, **2009**, 37(2): 187-193
- Zhang S, You J, Ning S, Suo Y, Song C. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1280: 84-91
- Dai W, Huang Q, Yin P, Li J, Zhou J, Kong H, Zhao C, Lu X, Xu G. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(23): 10245-10251
- ZENG Qing-Qian, CHEN Hou-Bin, LU Cai-Hao, LI Jian-Guo. *Journal of Fruit Science*, **2006**, 23: 145-148
曾庆钱, 陈厚彬, 鲁才浩, 李建国. *果树学报*, **2006**, 23(1): 145-148

