

液相色谱-四极杆飞行时间质谱法快速测定草莓中 6 种植物生长调节剂的残留量

刘靖靖*, 宫 萍, 张晓梅, 王建华, 王境堂

(山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002)

摘要: 建立了高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(HPLC-Q TOF MS)快速检测草莓中 2,4-滴、对氯苯氧乙酸、3-吲哚丁酸、氯吡啶、脱落酸、玉米素 6 种植物生长调节剂的分析方法。样品采用 QuEChERS 方法(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method)进行前处理(乙腈提取, C18 吸附剂净化), 采用 Eclipse XDB-C8 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-5 mmol/L 乙酸铵-0.1% (v/v) 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, Q TOF MS 电喷雾负离子模式分析检测。在全扫描采集模式下, 以准分子离子峰的峰面积定量, 以化合物的精确质量数定性。在 Target MS/MS 采集模式下, 通过碎片离子的精确质量数进一步确证化合物。各化合物在 0.005 ~ 1.0 mg/L 范围内均呈现良好的线性关系, 相关系数均大于 0.99。6 种化合物的检出限为 1 ~ 5 μg/kg, 添加回收率为 87% ~ 107%, 相对标准偏差(RSD)均小于 10% (n=6)。本方法简便快捷, 选择性好, 灵敏度高, 可满足国内外现行法规的限量要求。

关键词: 液相色谱-四极杆飞行时间质谱; 植物生长调节剂; 草莓

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)10-1012-05

Determination of six plant growth regulator residues in strawberry by liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry

LIU Jingjing*, GONG Ping, ZHANG Xiaomei, WANG Jianhua, WANG Jingtang

(Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract: A novel method was established for the determination of six plant growth regulators (PGRs), 2,4-dichlorophenoxy acetic (2,4-D), 4-chlorophenoxy-acetic acid (CAP), 4-(3-indolyl)-butyric acid (BAA), forchlorfenuron (CPPU), abscisic acid (ABA) and trans-zeatin (ZT) in strawberry using liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (LC-Q TOF MS). The Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method (QuEChERS) has been validated for the extraction. In this QuEChERS method, the sample was extracted by acetonitrile and cleaned up with C18 adsorbent. The extract was measured directly by LC-Q TOF MS with electrospray ionization in negative mode. The compounds were separated on an Eclipse XDB-C8 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid as mobile phase under gradient elution. The confirmatory analysis was carried out by determining the accurate masses of all compounds and fragment ions upon Target MS/MS. The limits of detection (LODs) were between 1 μg/kg and 5 μg/kg. The linear range was 0.005 - 1.0 mg/L for each analyte. The recoveries ranged from 87% to 107% with the relative standard deviations (RSDs) less than 10% (n=6). The method was proved to be simple and accurate.

Key words: liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (LC-Q TOF MS); plant growth regulators; strawberry

植物生长调节剂(plant growth regulators)是一类具有植物激素活性的人工合成的化学物质,在较

* 通讯联系人: 刘靖靖, 工程师, 主要从事食品中有害物质及代谢物的检测。E-mail: jing_liu2008@yahoo.cn.

基金项目: 山东检验检疫局科研计划支持课题(SK201126)。

收稿日期: 2012-08-15

低浓度下可对植物的生长发育起到调节和控制作用。植物生长调节剂的种类按生化功效分为生长促进剂、生长延缓剂和生长抑制剂 3 大类^[1]。大多数植物生长调节剂是化学合成的,有一定毒性。随着植物生长调节剂的推广使用,中国^[2]、美国^[3]、欧盟^[4]、日本^[4]等国家和组织均建立了针对植物生长调节剂的各种限量,如美国、日本规定草莓中 2,4-滴的残留限量为 0.05 mg/kg。在我国,蔬菜生产中滥用植物生长调节剂的现象普遍存在,对人民健康造成很大威胁。

目前针对食品中植物生长调节剂的检测方法研究已经很多^[5-13],所用的仪器方法主要有液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)以及气相色谱法(GC)。四极杆飞行时间质谱(Q TOF MS)属于高分辨质谱,可根据化合物及碎片离子的精确质量数对其进行定性分析,增加了定性的准确性;利用 Q TOF MS 技术对植物生长调节剂检测的研究报道目前还较少^[12,13]。本文用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q TOF MS)分析技术,建立了草莓中 2,4-滴(2,4-D)、对氯苯氧乙酸(CAP)、3-吲哚丁酸(BAA)、氯吡脞(CPPU)、脱落酸(ABA)、玉米素(ZT) 6 种植物生长调节剂的检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱/6520 四极杆飞行时间串联质谱仪(6520 Accurate Mass Q-TOF LC/MS, 美国 Agilent 公司); Eclipse XDB-C8 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm; 美国 Agilent); GR21G III 高速冷冻离心机(日本 Hitachi); MS 2 涡旋混匀器(德国 IKA); 5982-4956CH QuEChERS 分散固相萃取试剂盒(包括 QuEChERS 离心管、C18 吸附剂 150 mg 和 MgSO₄ 吸附剂 900 mg; 美国 Agilent); 乙腈、甲酸、乙酸铵均为色谱纯;水由 Milli-Q 纯水系统制得。标准物质:2,4-滴、对氯苯氧乙酸、3-吲哚丁酸、氯吡脞、脱落酸 5 种标准品购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH,玉米素标准品购自 Sigma-Aldrich。称取适量的上述标准品用乙腈配制成质量浓度为 500 mg/L 的标准储备液。样品均为当地市售鲜草莓。

1.2 样品制备

称取经过均质的样品 10.0 g 至 50 mL 塑料离心管中,加入 5 mL 水混匀后,分别加入 10 mL 乙腈、4 g 无水 MgSO₄ 和 1 g NaCl,振荡 20 min。以 6 000 r/min 离心 5 min,吸取 5 mL 上清液至 QuEChERS

离心管中,涡旋 1 min,以 6 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 尼龙滤膜,滤液供 HPLC-Q TOF MS 测定。

1.3 液相色谱条件

流动相 A 为乙腈, B 为 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% (v/v) 甲酸水溶液;流速:0.4 mL/min;梯度洗脱程序:0 ~ 1.0 min, 30% A; 1.0 ~ 8.0 min, 30% A ~ 95% A; 8.0 ~ 12.0 min, 95% A; 12.0 ~ 13.0 min, 95% A ~ 30% A; 13.0 ~ 20.0 min, 70% A。柱温:30 °C;进样量:2 μL。

1.4 质谱条件

电喷雾电离源(ESI)负离子模式,干燥气温度 350 °C,干燥气流速 9 L/min,雾化气压力 275.8 kPa (40 psi),毛细管电压 4 000 V,毛细管出口电压 190 V,参比离子 m/z 121.985 6 与 m/z 1 033.988 1,扫描范围 m/z 50 ~ 1 100。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的优化

在空白草莓样品中添加 6 种植物生长调节剂的标准溶液(添加水平 10 μg/kg)用于实验条件的优化。实验对比了水溶液酸碱度对提取效率的影响。称取上述加标样品 10 g,分别用水、0.01 mol/L 盐酸水溶液、0.01 mol/L NaOH 水溶液各 5 mL 溶解样品后,加入 10 mL 乙腈提取。研究结果表明,水溶液酸碱度对 6 种植物生长调节剂的提取回收率无明显差异(结果见图 1)。因此确定使用 5 mL 水溶解样品后,加入 10 mL 乙腈提取。

实验考察了 C18 和乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)两种吸附剂对回收率的影响。称取加标样品 10 g (添加水平 10 μg/kg),按照 1.2 节所述进行处理,

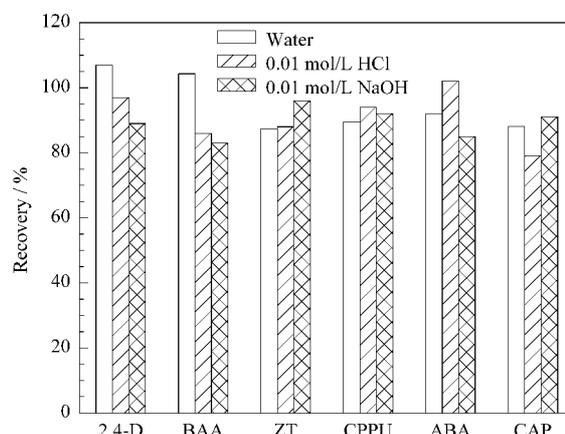


图 1 不同 pH 条件下 6 种植物生长调节剂的回收率
Fig. 1 Recoveries of six plant growth regulators at different pH values

分别采用前述装有 C18 吸附剂的 5982-4956CH QuEChERS 试剂盒和装有 PSA 吸附剂(PSA 150 mg , MgSO₄ 900 mg; 美国 Agilent) 的 5982-5056 QuEChERS 试剂盒对样品进行净化。试验结果表明 ,C18 吸附剂对 6 种化合物的回收率为 87% ~ 107% ,PSA 吸附剂对 ZT 和 ABA 两种化合物的回收率低于 60% ,回收率结果见图 2。综合考虑两种吸附剂的去杂质特性和对目标化合物的吸附情况 ,选择 C18 吸附剂对其进行净化。

2.2 色谱条件的优化

分别以乙腈-5 mmol/L 乙酸铵水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液和乙腈-5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液作为流动相 ,考察三者对待测化合物峰形及离子化效率的影响。结果表明 ,以乙腈-5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液作为流动相时 6 种化合物得到良好的分离 ,且灵敏度较高。

2.3 质谱条件的优化

在全扫描采集模式下 ,对比正、负离子模式下 6 种化合物的响应(见图 3) ,实验结果表明 ,电喷雾负离子模式能使 6 种化合物达到最好的电离。

在 Target MS/MS 模式下 ,以 [M - H]⁻ 离子为母离子得到二级碎片离子的全扫描质谱图 ,选择丰度相对较高和相对分子质量较大的碎片离子 ,优化碰撞能量 ,以 6 种化合物的特征碎片离子的灵敏度达到最大时的碰撞能量为最佳碰撞能量(见表 1)。

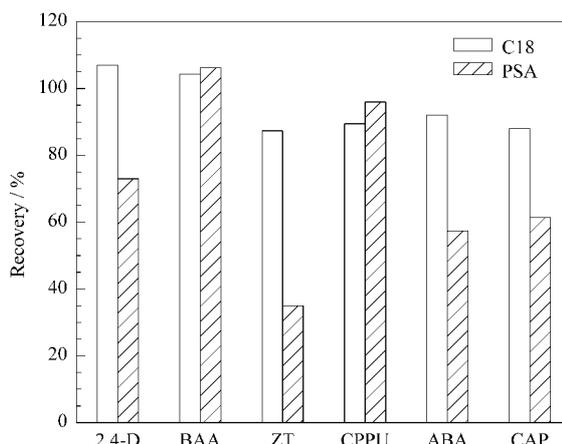


图 2 采用 C18 和 PSA 两种吸附剂净化 6 种植物生长调节剂的回收率

Fig. 2 Recoveries of six plant growth regulators purified with C18 and PSA adsorbents

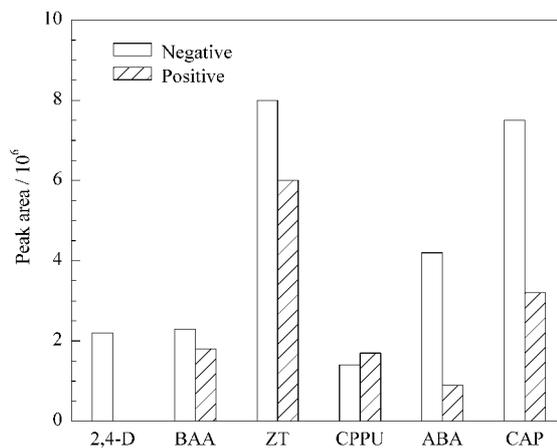


图 3 正、负离子模式下化合物响应值的比较

Fig. 3 Comparison of the responses of target compounds in positive and negative modes

表 1 各化合物准分子离子的理论质量数、实测质量数、相对偏差(RD)及质谱碰撞能量

Table 1 Theoretical masses , experimental masses , relative deviations (RD) of quasi-molecular ions of target compounds and MS collision energies

Compound	Molecular formula	[M - H] ⁻		RD/10 ⁻⁶	Collision energy/eV
		Theoretical mass (m/z)	Experimental mass (m/z)		
2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	218.9616	218.9622	2.7	22
CAP	C ₈ H ₇ ClO ₃	185.0006	185.0003	-1.6	10
BAA	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	202.0868	202.0860	-4.0	10
ZT	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	218.1042	218.1037	-2.2	15
ABA	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	263.1283	263.1276	-2.8	35
CPPU	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₃ O	246.0434	246.0428	-2.5	20

2.4 HPLC-Q TOF MS 结果分析

在 MS 全扫描采集模式下得到一级全扫描质谱图 ,以各化合物的准分子离子 [M - H]⁻ 的精确质量数提取色谱图(见图 4) 。采用外标法定量 ,通过实际测得的化合物的精确质量数与理论值匹配 ,误差小于 5 × 10⁻⁶ 范围内对化合物定性 ; 通过在 Target MS/MS 采集模式下得到的二级碎片离子的精确质

量数对化合物进一步确证(见图 5) 。

以空白样品的提取液稀释标准溶液 ,获得每种化合物对应的信噪比等于 3(S/N = 3) 时的含量 ,将该含量设为该化合物的检出限(LOD) ,6 种化合物的检出限在 1 ~ 5 μg/kg; 各化合物在 0.005 ~ 1.0 mg/L 范围内均呈现良好的线性关系 ,相关系数均大于 0.99; 添加回收率为 87% ~ 107%。结果见表 2。

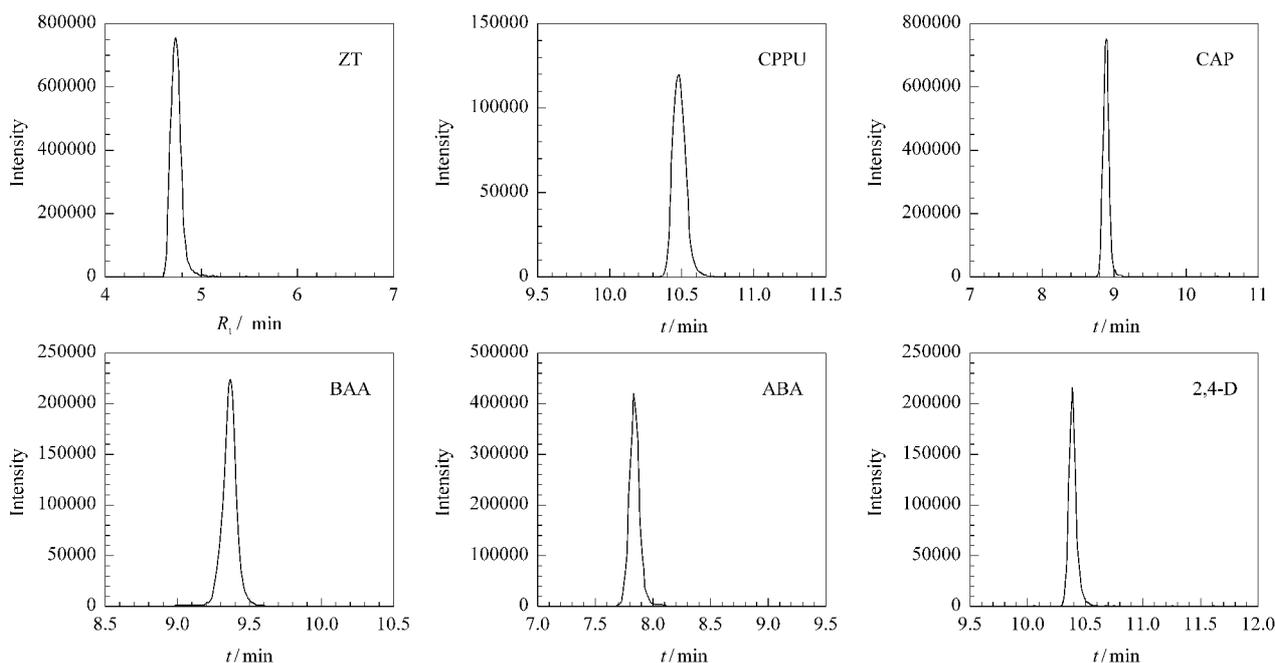


图 4 各目标物 $[M-H]^-$ 的提取离子色谱图

Fig. 4 Extracted ion chromatograms of the $[M-H]^-$ ions of target compounds based on theoretical accurate masses

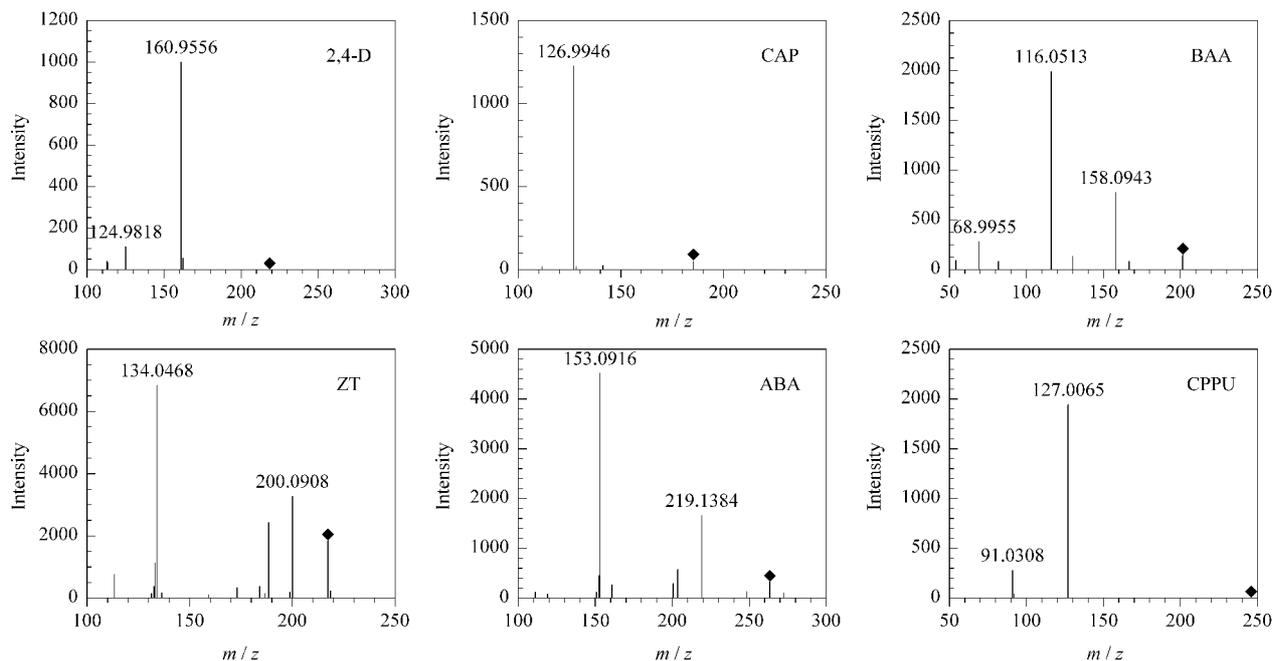


图 5 各目标物准分子离子的二级碎片离子的质谱图

Fig. 5 MS/MS spectra of the fragment ions of $[M-H]^-$ ions of target compounds

表 2 草莓中 6 种化合物的保留时间、线性方程、检出限、加标回收率及精密度 ($n=6$)

Table 2 Retention times (t_R), linear equations, limits of detection (LODs), recoveries and precisions (RSD, $n=6$) of six compounds in strawberry

Compound	t_R /min	Regression equation ¹⁾	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ²⁾ /%	RSD/%
ZT	4.7	$Y=0.6530X+4.0071$	1.0	87.34	9.3
ABA	7.8	$Y=0.8015X+8.0955$	2.0	91.97	7.7
CAP	8.9	$Y=0.1665X+3.1638$	1.0	88.06	5.2
BAA	9.3	$Y=0.4791X+0.6686$	3.5	104.28	6.5
2,4-D	10.4	$Y=0.7101X+7.0487$	3.5	106.93	6.2
CPPU	10.5	$Y=0.6392X+0.3029$	5.0	89.45	5.5

1) Y: peak area; X: mass concentration, mg/L . 2) spiked level: $10 \mu\text{g}/\text{kg}$.

由表 2 回收率结果可以看出,采用 QuEChERS 方法,经乙腈提取,C18 吸附剂净化,6 种植物生长调节剂均能被液相色谱-四极杆飞行时间质谱有效分析检测。

2.5 方法应用

应用本方法对本地市售 10 份草莓样品进行检测,一份样品中检出脱落酸(含量为 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$),其他植物生长调节剂在所有样品中均未检出。

3 结语

建立了草莓样品中 2,4-D、对氯苯氧乙酸、3-吲哚丁酸、氯吡脞、脱落酸、玉米素 6 种植物生长调节剂的高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱快速分析方法。样品采用 QuEChERS 前处理方法,经乙腈提取,C18 吸附剂净化,实现了 6 种植物生长调节剂的有效提取;利用四极杆飞行时间质谱的精确质量数对化合物进行定性。本方法简便快捷,灵敏度高,可满足国内外现行法规的限量要求。

参考文献:

- [1] Fu H L, He T J, Wu Q Y, et al. Chinese Journal of Bioprocess Engineering (傅华龙,何天久,吴巧玉,等. 生物加工过程), 2008, 6(4): 7
- [2] GB 2763-2005
- [3] FAO/WHO. Pesticide Residues in Food. (2007-09-24) [2012-09-07]. http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp
- [4] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China. Food Safety Data Base (国家质量监督检验检疫总局进出口食品安全局. 食品安全网). [2012-09-07]. <http://www.tbt-sps.gov.cn/foodsafety/xbz/Pages/pesticide.aspx>
- [5] Liao Y H, Jiang L M, Mu X L, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (廖雅桦,蒋腊梅,穆小丽,等. 分析试验室), 2010, 29(1): 72
- [6] Xue J Y, Wang S L, You X W. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011, 25(21): 3289
- [7] Prasad K, Das A K, Oza M D, et al. J Agric Food Chem, 2010, 58(8): 4594
- [8] Pan X Q, Welti R, Wang X M. Phytochemistry, 2008, 69(8): 1773
- [9] Wu F Q, Jin B H, Chen B, et al. Chinese Agricultural Science Bulletin (吴凤琪,靳保辉,陈波,等. 中国农学通报), 2010, 26(15): 115
- [10] Oulkar D P, Banerjee K, Ghaste M, et al. J AOAC Int, 2011, 94(3): 968
- [11] Chen W J, Zhang Y H, Li Y C, et al. Food Science (陈卫军,张耀海,李云成,等. 食品科学), 2012, 33(11): 283
- [12] Oulkar D P, Banerjee K. J AOAC Int, 2011, 94(6): 1715
- [13] Akiyama Y, Matsuoka T, Mitsuhashi T. J Pest Sci, 2009, 34(4): 265