

高效液相色谱-串联质谱法测定草莓中5种植物生长调节剂

宫萍*, 孟慧琴, 刘靖靖

(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心食品农产品检测中心, 青岛 266002)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)检测草莓中3-吲哚丁酸、赛苯隆、氯吡脞、3-吲哚乙酸、脱落酸5种植物生长调节剂的方法。**方法** 样品采用QuEChERS方法乙腈提取, PSA吸附剂净化, 高效液相色谱-串联质谱电喷雾(ESI), 多反应监测(MRM)负离子模式分析检测, 外标法定量。**结果** 各化合物在0.01~1.0 mg/L范围内均呈现良好的线性关系, 相关系数均大于0.998。5种化合物的检出限在1~5 µg/kg。添加回收率为72.0%~99.4%。相对标准偏差(RSD)均小于10%。**结论** 通过线性、准确度、精密度实验及样品测定, 验证了以水溶解样品、乙腈提取、QuEChERS净化的方法简便可行。

关键词: 植物生长调节剂; QuEChERS; 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 5 kinds of plant growth regulators in strawberry by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

GONG Ping*, MENG Hui-Qin, LIU Jing-Jing

(Food and Agricultural Products Testing Agency, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 5 kinds of plant growth regulators (PGRs): 4-(3-Indolyl)-butyric acid (BAA), thidazuron, forchlorfenuron (CPPU), 3-Indolyl-acetic acid (ZAA) and abscisic acid (ABA) in food of plant origin using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted by acetonitrile, and cleaned up by QuEChERS. Identification and determination were achieved by multiple reaction monitoring in negative mode using HPLC-MS/MS. The quantification of analytes was carried out by the external standard method. **Results** All the target compounds had a good linear relationship in the range of 0.01~1.00 mg/L. The relative coefficients were larger than 0.998. The LOQ of the tested analytes varied was between 1~5 µg/kg. The recoveries were 72.0%~99.4%. The relative standard deviations (RSD) were less than 10%. **Conclusion** The method was proved to be simple and accurate in practice.

KEY WORDS: plant growth regulators; QuEChERS; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*通讯作者: 宫萍, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: 1427737905@qq.com

*Corresponding author: GONG Ping, Engineer, Food and Agricultural Products Testing Agency of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China. E-mail: 1427737905@qq.com

1 引言

植物生长调节剂(plant growth regulators)是一类与植物激素具有相似生理和生物学效应的物质,是指具有激素活性的人工合成的化学物质^[1]。植物生长调节剂可用于调控植物体内的核酸、蛋白质和酶的合成,能对植物生长发育过程中的不同阶段如发芽、生根、细胞伸长、器官分化、花芽分化、开花、结果、落叶、休眠等起到调节和控制作用^[2]。

随着科学技术和农业的发展,运用植物生长调节剂调控植物的生长发育和产量形成(即作物化学控制技术),已经逐渐形成成为农业生产中不可缺少的重要措施。同时,植物生长调节剂作为一种散布到环境中的化学物质,其本身或降解产物是否危害非靶生物,产生不利的环境后果是人们更加关心的问题^[1]。因此,植物生长调节剂的使用和残留问题越来越受到人们的重视。

植物生长调节剂种类繁多^[3-12],但是多残留检测的研究尤其涉及跨种类检测的相对较少,如吴凤琪等^[3]建立水果中 8 种外源性植物生长调节剂液相色谱-串联质谱测定方法。Kamalesh^[4]以 ESI-MS 定性检测了海藻中的赤霉素、西维因、激动素。Pan^[5]用高效液相色谱和电喷雾串联质谱法检测了天然植物提取物中的生长素、细胞激肽类、脱落酸、赤霉素、茉莉酸、水杨酸及其相关代谢产物。Wang^[7]采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法测定了水果中矮壮素等 6 种植物生长调节剂。本实验采用液相色谱-串联质谱法同时检测草莓中 5 种植物生长调节剂,方法灵敏度、回收率均可满足检验实际要求。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

1200 高效液相色谱(配有二极管阵列检测器,美国 Agilent 公司); 1200 高效液相色谱-6430 串联质谱(配有电喷雾离子源,美国 Agilent 公司); 高速冷冻离心机(日本); QuEChERS(Agilent 5982-4956CH), 乙腈、甲酸、乙酸铵均为色谱纯; 水由 Mill-Q 纯水系统制得。标准物质: 3-吲哚丁酸、3-吲哚乙酸、氯吡脞、脱落酸、赛苯隆 5 种标准品购自德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH。称取适量的上述标准品用甲醇配成质量浓度

为 500 mg/L 的标准储备液。

2.2 样品制备

称取经过均质的样品 10 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 用手振摇 1 min, 震荡 20 min。不低于 6000 r/min、4 °C 条件下离心 5 min。吸取 5 mL 乙腈提取液至 QuEChERS 离心管中,涡旋 1 min, 6000 r/min、4 °C 条件下离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 尼龙滤膜,滤液供高效液相色谱-串联质谱 HPLC-MS-MS 测定。

2.3 液相色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Plus C₁₈(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液; 流速: 0.4 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~1 min, 30% A; 1~8 min, 30% A~95% A; 8~12 min, 95% A; 12~13 min, 95% A~30% A; 13~20 min, 70% A。柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL。

2.4 质谱条件

质谱条件: 电喷雾离子源正离子模式,多反应监测扫描模式; 喷雾压力: 35 psi; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 9 L/min; 定性离子、定量离子、碰撞能量和碰撞电压,详见表 1。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理条件的优化

实验对比了用水溶解样品后,用乙腈、甲醇和乙腈/叔丁基甲基醚 TBME 提取,提取率无明显差异(图 1)。由于甲醇与水混溶,用 MgSO₄ 和 NaCl 进行盐析仍不能分层,提取 5 mL 提取液至 QuEChERS 离心管中,涡旋 1 min, 6000 r/min、4 °C 条件下离心 5 min, 上清液少于 2 mL, 过 0.45 μm 尼龙滤膜非常困难,滤出液少于 1 mL, 因此不宜采用 QuEChERS 方法,而采用 SPE 小柱(Oasis HLB)进行净化。称取经过均质的样品 10 g 至 50 mL 塑料离心管中,加入 5 mL 水混匀后,加入 10 mL 甲醇用手振摇 1 min, 震荡 20 min。于 6000 r/min、4 °C 条件下离心 5 min。HLB 小柱分别用 5 mL 甲醇和 5 mL 水进行活化,5 mL 提取液上样通过,5 mL 甲醇进行洗脱,收集上样通过的提取液以及洗脱液 10 mL,在氮气下吹干,以甲醇定容 1 mL,进行分析。

表 1 各化合物的定性离子、定量离子、碰撞能量和碰撞电压

Table 1 Qualitative ion pair, quantitative ion pair, collision energy and collision voltage of target compounds

化合物名称	定性离子(m/z)	定量离子(m/z)	碰撞能量(eV)	碰撞电压(V)
3-吲哚丁酸(BAA)	202/157.9	202/157.9	8	100
	202/116.2		10	
赛苯隆(thi)	219/100.1	219/100.1	10	60
	219/70.9		30	
氯吡脞(CPPU)	246/127	246/127	5	80
	246/91		20	
3-吲哚乙酸(ZAA)	174/130	174/130	10	60
	174/128		10	
脱落酸(ABA)	263/203	263/203	20	80
	263/122		35	

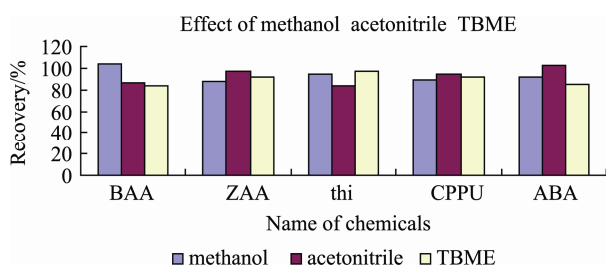


图 1 乙腈、甲醇和乙腈/TBME 提取样品的回收率
Fig. 1 Effect of methanol acetonitrile and TBME

实验对比了 QuEChERS 净化和 HLB 固相萃取小柱的净化效果, 实验结果表明 HLB 固相萃取小柱对基质中色素的净化效果较好, 使峰形尖锐, S/N 相对增强 10%~15%, 但是操作相对 QuEChERS 净化方法较为复杂, 而且 QuEChERS 净化结果可以满足实验要求, 因此选用 QuEChERS 方法进行净化(图 2)。

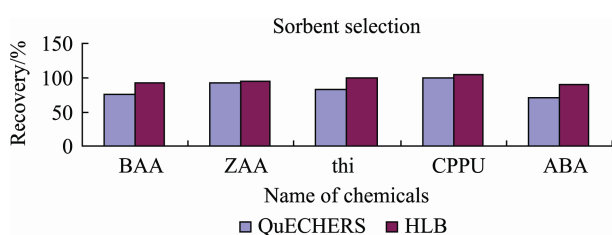


图 2 QuEChERS 和 HLB 种吸附剂回收率的比较
Fig. 2 Sorbent selection between QuEChERS and HLB

3.2 色谱条件的优化

实验对比了乙腈-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, 考察不同流动相组成对待测化合

物峰形及离子化效率的影响。以乙腈-5 mmol/L 乙酸铵 0.1%甲酸水溶液作为流动相时, 5 种化合物的响应最好。

3.3 质谱条件的优化

进行质谱优化时, 分别将 5 种 1 mg/kg 的植物生长调节剂标准溶液以 5 mL/min 的流速注入离子源, 在负离子模式下分别对其进行一级质谱扫描, 得到分子离子峰, 再对分子离子进行二级质谱扫描, 得到子离子等碎片信息。选取丰度最强的离子作为各组分的监测离子, 然后再对锥孔电压及碰撞气能量等参数进行优化, 使分子离子与特征碎片离子强度达到最大。将质谱仪与液相色谱联机, 优化去溶剂气、锥孔反吹气、去溶剂辅助加热温度、毛细管电压等参数, 使每种植物生长调节剂离子化效率达到最佳。

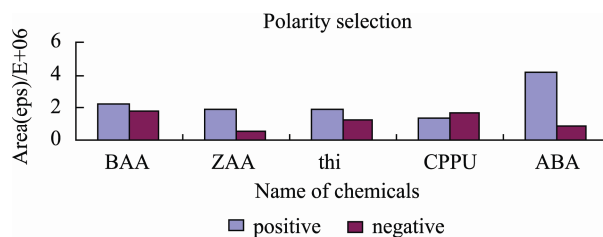


图 3 正、负离子模式下响应值的比较
Fig. 3 Polarity selection between positive and negative modes

3.4 结果分析

在 MRM 模式下进行扫描得到质谱图(图 4), 峰面积绘制校正曲线, 外标法定量。通过实际测得化合物的特征离子碎片, 对化合物进行定性。

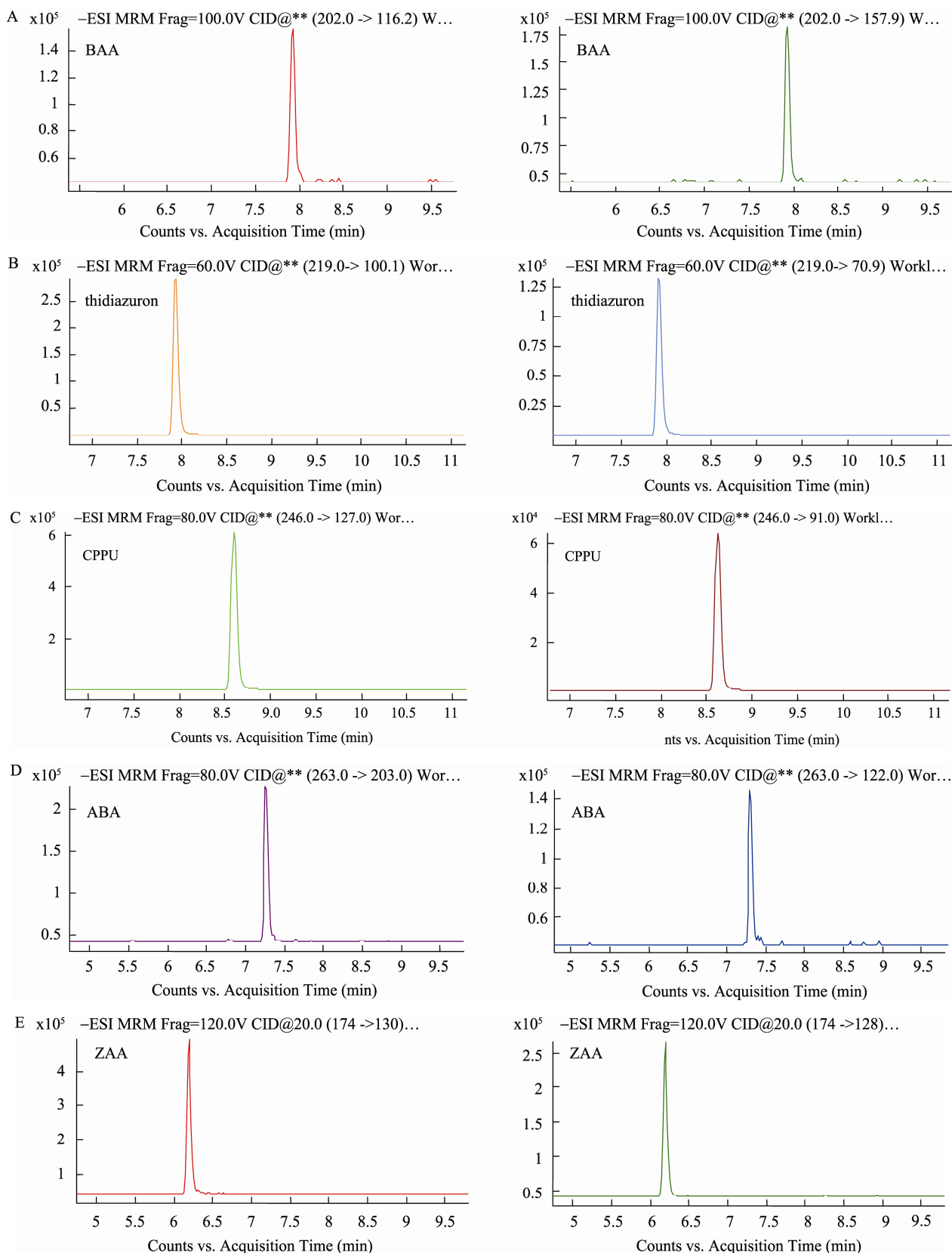


图 4 5 种植物生长调节剂的 MRM 碎片离子色谱图

Fig. 4 Fragment ions of MRM of 5 plant growth regulators

A: 3-吲哚丁酸(BAA); B: 赛苯隆(thidiazuron); C: 氯吡脞(CPPU); D: 脱落酸(ABA); E: 3-吲哚乙酸(ZAA)

表 2 草莓中 5 种化合物的定量限及加标回收率($n=5$)
Table 2 LOD and recoveries of 5 kinds of compounds ($n=5$)

序号	化合物	保留时间(min)	线性方程	相关系数 R^2	检出限($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
1	3-吲哚丁酸 (BAA)	8.0	$Y=0.4791 X+0.6686$	0.998	5.0	5.0	76.3	6.9
						10.0	85.8	5.7
						20.0	96.8	7.5
						5.0	84.1	8.9
2	赛苯隆(thi)	7.9	$Y=0.2743 X+0.1004$	0.998	5.0	10.0	97.2	8.3
						20.0	94.1	9.6
						5.0	99.5	5.8
3	氯吡脞 (CPPU)	10.5	$Y=0.6392X+0.3029$	0.999	5.0	10.0	101.5	5.2
						20.0	101.3	9.0
						5.0	91.7	8.5
4	3-吲哚乙酸 (ZAA)	6.3	$Y=0.3061 X+0.6640$	0.999	5.0	10.0	95.7	7.3
						20.0	89.4	6.0
						5.0	72.0	7.5
5	脱落酸 (ABA)	7.4	$Y=0.8015 X+8.0955$	0.998	5.0	10.0	82.3	9.2
						20.0	85.6	8.7

3.5 方法的加标回收率及精密度、测定低限

将混合标准溶液分别添加到空白样品中, 添加水平为 5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定回收率范围 72.0%~101.5%, 相对标准偏差 5.2%~9.2%。添加水平、平均回收率及相对标准偏差结果见表 2。

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($S/N=3$)时的浓度, 以此为该化合物的定量限(LOD), 结果见表 2。

4 结 论

本研究建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法检测植物源产品中 3-吲哚丁酸、赛苯隆、氯吡脞、3-吲哚乙酸、脱落酸 5 种植物生长调节剂的分析方法。通过线性、准确度、精密度实验及样品测定, 验证了以水溶解样品, 乙腈提取, QuEChERS 净化的方法简便可行。

参考文献

- [1] 赵敏, 邵凤赞, 周淑新, 等. 植物生长调节剂对农作物和环境的安全性[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(5): 370-372.
- [2] 傅华龙, 何天久, 吴巧玉. 植物生长调节剂的研究与应用[J]. 生物加工过程, 2008, 6(4): 7-12.
- [3] 吴凤琪, 靳保辉, 陈波, 等. 水果中 8 种外源性植物生长调节剂的液相色谱-串联质谱测定[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 115-119.S
- [4] Wu FQ, Jin BH, Chen B, *et al.* Fruit of 8 kinds of exogenous plant growth regulators by liquid chromatography tandem mass spectrometric determination [J]. Chin Agric Sci Bull, 2010, 26(15): 115-119.
- [5] Kamalesh P. Detection and quantification of some plant growth regulators in a seaweed-based foliar spray employing a spectrometric technique sans chromatographic separation [J]. Agric Food Chem, 2010, 58: 4594-4601.
- [6] Pan XQ. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. Phytochem, 2008, 69: 1773-1781.
- [7] Zhao M, Shao FB, Zhou SX, *et al.* The security of plant growth regulators on crops and environment [J]. Environ Health, 2007, 24(5): 370-372.
- [8] 赵尔成, 王祥云, 韩丽君, 等. 常用植物生长调节剂残留分析研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(9): 1709-1711.

- Zhao EC, Wang XY, Han LJ, *et al.* Research progress on the residue analysis of commonly used plant growth regulator [J]. *Anhui Agric Sci*, 2005, 33(9): 1709–1711.
- [7] Zhou YM, Han Y, Tian HZ, *et al.* Detection of fruit chlormequat high-performance liquid chromatography mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2009, 10: 67–69.
- [8] Wang JJ, Lu Y, Yang T, *et al.* Determination of 6 plant growth retardants in fruits and vegetables by HPLC-MS/MS [J]. *J Instrum Anal*, 2011, 30(2): 128–134
- [9] 苗钧魁, 李铁松, 王长海. 海带中脱落酸的分离纯化及高效液相色谱分析[J]. *烟台大学学报*, 2009, 4: 295–298.
Miao JK, Li TS, Wang CH. Kelp in abscisic acid purification and high performance liquid chromatography [J]. *J Yantai Univ*, 2009, 4: 295–298
- [10] 沈镇德, 丁静. 用气相色谱-电子捕获器测定脱落酸[J]. *植物生理学通讯*, 1984, (3): 49–51
Shen ZD, Ding J. Determinaton of abscisic acid by gas chromatography with electron capture detector [J]. *Plant Physiol Comm*, 1984, (3):49–51
- [11] Wang J, Li M, Zhang YH, *et al.* HPLC Analysis of ABA and GA₃ in reproductive organs of bruguiera gymnorhiza [J]. *J Xiamen Univ: Nat Sci*, 2008, 47(5): 752–756
- [12] 刘靖靖, 宫萍, 张晓梅, 等. 液相色谱-四级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[J]. *色谱*, 2012, 30(10): 1012–1016.
Liu JJ, Gong P, Zhang XM, *et al.* Determination of six plant growth regulator residues in strawberry by liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(10): 1012–1016.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



宫 萍, 工程师, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: 1427737905@qq.com