



利用安捷伦 1290 Infinity LC 和 6530 精确质量 Q-TOF MS 联用系统分析葡萄中的多种植物生长调节剂

应用简报

食品分析

作者

Kaushik Banerjee 博士
高级科学家, NRCG, 印度普那
Sunil Kulkarni
安捷伦科技(印度)有限公司

摘要

配备喷射流电喷雾离子源 (ESI) 的安捷伦 6530 四级杆-飞行时间质谱与安捷伦 1290 Infinity UHPLC 联用, 采用分散型 C18 ODS 样品净化过程, 对葡萄样品中多种植物生长调节剂 (PGR) 进行了筛查, 测定结果具备杰出的灵敏度和卓越的质量精度。

Q-TOF 是在全扫描 MS 和 MS/MS 模式下, 通过精确质量数鉴别化合物的杰出系统。精确的质量数能够给出化合物的分子式, 借助 MS/MS 过程中形成的产物离子信息能进一步得到化合物的结构信息。

基于分散固相吸附(C18)技术的样品处理过程简单而且廉价, 可有效去除葡萄样品中的背景基质干扰, 适合基于 Q-TOF 的多种 PGR 筛查。

卓越的质量精度: 葡萄样品中, 所有 PGR 在 50 ppb 和 100 ppb 浓度下, 质量精度可达 1 ppm 以下, 在 5 ppb 浓度下可达 5 ppm 以下。



Agilent Technologies

前言

本文论述了使用简单、快速、经济的样品处理技术和高效、灵敏的 LC/MS/MS 系统筛查葡萄样品中 12 种植物生长调节剂 (PGR) 的方法。

植物激素是一种能够调节植物生长的化学物质。其中人工合成的化合物被称为 PGR，用于调节农作物、杂草和离体培养的植物以及植物细胞的生长。合成 PGR 可用于各种技术中，如剪枝、嫁接和微体繁殖等。

PGR 可激活细胞响应，如细胞死亡。有些还会抑制人体癌细胞。欧盟 (EU) 已经明确了这些化合物列表，因此要对它们进行测定。

使用质谱全扫描模式（质量范围）得到的精确质量，可确定化合物的经验分子式用于定性。高质量分辨率可实现共流出物的选择性鉴定。同位素比例可以作为高碳化合物及含氯和硫等元素化合物的辅助鉴定工具。采用四级杆飞行时间质谱 (Q-TOF) 的选择性 MS/MS 扫描进行结构鉴定。因为安捷伦 Q-TOF 的 MS/MS 模式具备非常好的质量精度，可以更容易地根据相应前体离子的结构确定产物离子的结构，从而降低可能结构的数量。

安捷伦 Q-TOF 能够以 20 谱图/秒的速率采集全扫描质谱数据。所得的大量质谱数据包含了丰富的可能存在的化合物信息，采用安捷伦分子特征提取软件 (MFE) 对其进行处理，将之转换为有用的信息。作为 MassHunter 定性分析软件的标准组成部分，MFE 可执行如下操作：

- 消除持久存在的化学干扰
- 分解共流出物干扰
- 对同位素簇离子进行识别和分组
- 可视化 2D/3D
- 数据库检索和化合物识别（精确质量数，同位素匹配）

正模式检测到的 PGR：

- | | |
|---------------|---------------|
| 1. 矮壮素 | 6. 吲哚乙酸 (IAA) |
| 2. D4-矮壮素（内标） | 7. 6-苄基腺嘌呤 |
| 3. 丁酰肼 | 8. 吲哚丁酸 (IBA) |
| 4. 玉米素 | 9. 氯吡脘 |
| 5. 呋喃甲基腺嘌呤 | 10. 氯丁啉 |

负模式检测到的 PGR：

- | | |
|--------|-------------------------|
| 1. 赤霉素 | 3. 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2, 4-D) |
| 2. 脱落酸 | |

新方法

以下为新方法的优势：

- | | |
|--------|---|
| • 易于使用 | 稳定耐用的 UHPLC 方法与配备喷射流 ESI 离子源的安捷伦 6530 精确质量 Q-TOF MS 系统的强大组合 |
| • 样品制备 | 简单、快速、经济的分散型 C18 样品净化 |
| • 稳健性 | 显著提高的方法稳定性，离子抑制效应减至最低 |
| • 质量精度 | 卓越；葡萄样品中的所有 PGR 检测，在 50 ppb 和 100 ppb 浓度，质量精度小于 1ppm，在 5 ppb 浓度，质量精度小于 5 ppm。 |

方法和操作

方法使用四级杆飞行时间 (Q-TOF) LC/MS/MS 系统进行 PGR 分析。样品经分散型 C18 净化处理后直接进样。UHPLC 实现组分分离，ESI-LC/MS/MS（目标离子 MS/MS 模式）进行定性筛查。

分析步骤：

1. 液相萃取后进行分散型 C18 净化
2. 向样品和标准溶液中加入内标物 D4-矮壮素
3. UHPLC 梯度淋洗
4. 喷射流 ESI-LC/MS/MS（目标离子 MS/MS 模式）检测

样品制备步骤

5g 匀浆葡萄样品加入 40ml 甲醇和水的混合液（甲醇:水为 80:20）。在室温下振荡均匀。取 0.8mL 上清液和 200 mg C18 ODS SPE Bulk 吸附剂混匀，将混合物进行涡旋和离心。取 0.4mL 上清液用甲醇稀释到 1mL，进样 2ul 进行 LC/MS/MS 分析。

LC/MS/MS 方法

正模式下, 检测出 10 种 PGR 的总运行时间为 16min。进样 2 μL 进行 LC/MS/MS 分析。正模式下的色谱参数设置如下:

色谱柱:	Agilent ZORBAX Extended C18 2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm		
流速:	0.2 mL/min		
色谱柱温度:	40 $^{\circ}\text{C}$		
流动相 A:	水 (0.5%甲酸)		
流动相 B:	甲醇		
	时间	%流动相 A	%流动相 B
	0	95	5
	7	10	90
	9	10	90
	12	81	5

质谱设置

序号	化合物	前体离子 m/z	保留时间	CE
1	矮壮素	122.0733	1.261	23
2	D4-矮壮素	126.0909	1.261	25
3	丁酰肼	161.0919	1.311	6
4	玉米素	220.1193	4.051	13
5	呋喃甲基腺嘌呤	216.0884	5.211	15
6	6-苄基腺嘌呤	226.1091	6.261	20
7	IAA	176.0702	6.621	4.5
8	IBA	204.1013	7.561	8
9	氯吡啶	248.0594	8.121	11
10	氯丁唑	294.1371	8.695	15

内参比质量

宽泛的线性动态范围扫描便于浓度极低的内参比化合物持续、自动地导入。结果显示没有明显的来自于内参的谱图干扰, 具备卓越的质量精度。

正模式内参比质量: 121.050873 m/z 和 922.009798 m/z

负模式内参比质量: 112.985587 m/z 和 1033.988109 m/z

正模式的 10 种 PGR

谱图如图 1 所示。

负模式下, 运行 3 种 PGR 的总时间为 6 min。进样 2 μL 进行 LC/MS/MS 分析。负模式下的色谱参数设置如下:

色谱柱:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus RRHD C18 2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μm		
流速:	0.2 mL/min		
色谱柱温度:	40 $^{\circ}\text{C}$		
流动相 A:	水 (0.5%甲酸)		
流动相 B:	甲醇		
	时间	%流动相 A	%流动相 B
	0	81	19
	2.5	10	90
	4.5	10	90
	6	81	19

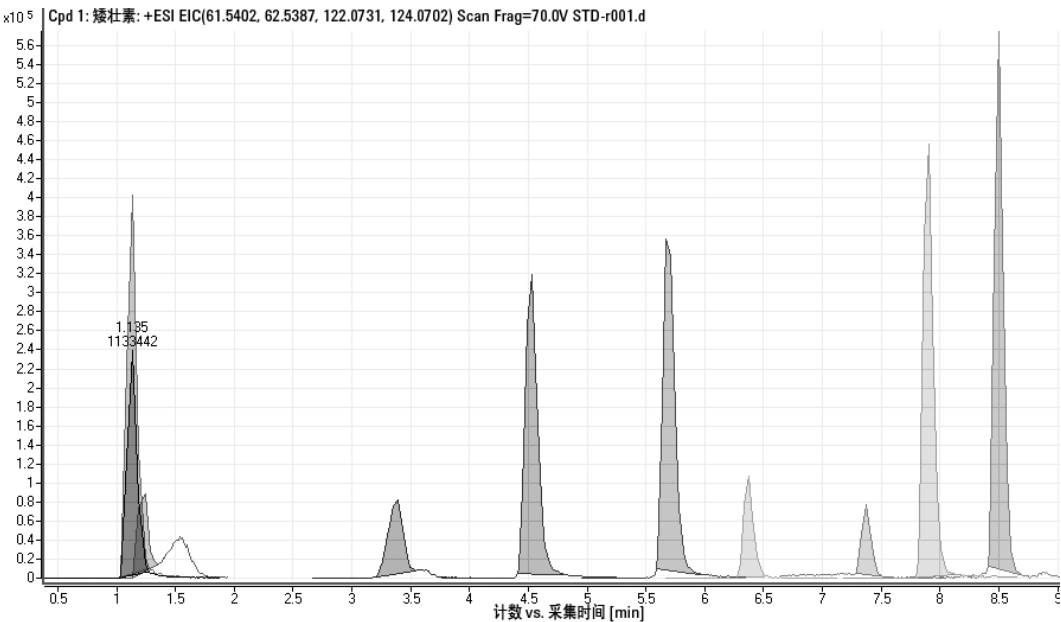


图 1. 10 种 PGR 的谱图。流出物依次为矮壮素、d4-矮壮素、丁酰肼、玉米素、呋喃甲基腺嘌呤、6-苄基腺嘌呤、IAA、IBA、氯吡啶、氯丁唑

负模式的 3 种 PGR

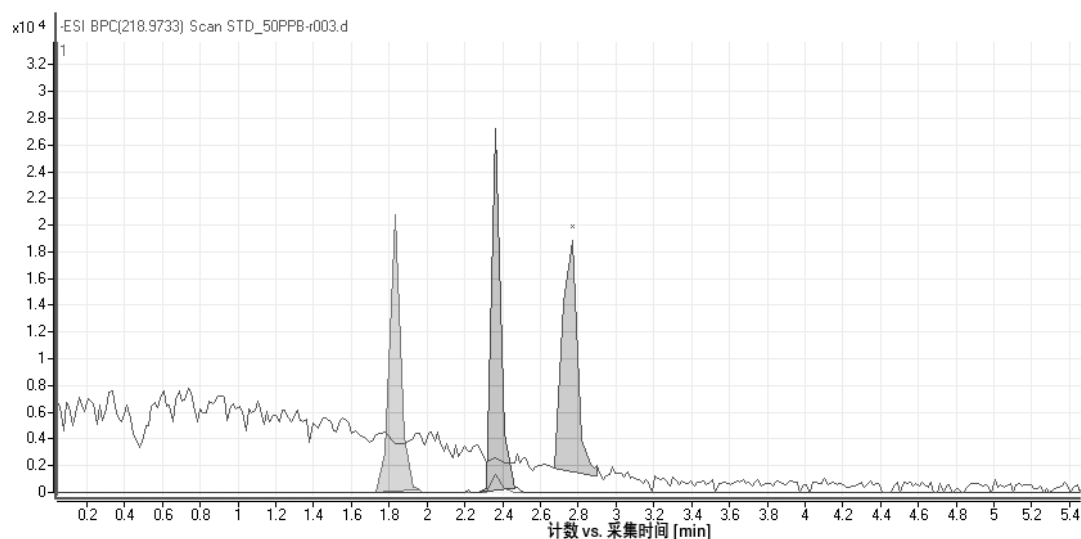


图 2 3 种 PGR 的谱图，浓度为 50.0ppb。流出物依次为赤霉酸、脱落酸、2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D)

质谱设置

序号	化合物	前体离子 m/z	保留时间	CE
1	赤霉酸 (GAAA)	345.1344	1.823	18
2	脱落酸 (ABA)	263.1284	2.353	7
3	2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D)	218.9617	2.705	3

结果

通过分子特征提取程序对所有数据文件进行处理，得到标准溶液和葡萄汁加标回收样品的目标 PGR 定性结果的质量精度均小于 5ppm。利用已知 PGR 的分子式和保留时间数据库可对所有葡萄样品进行筛查。

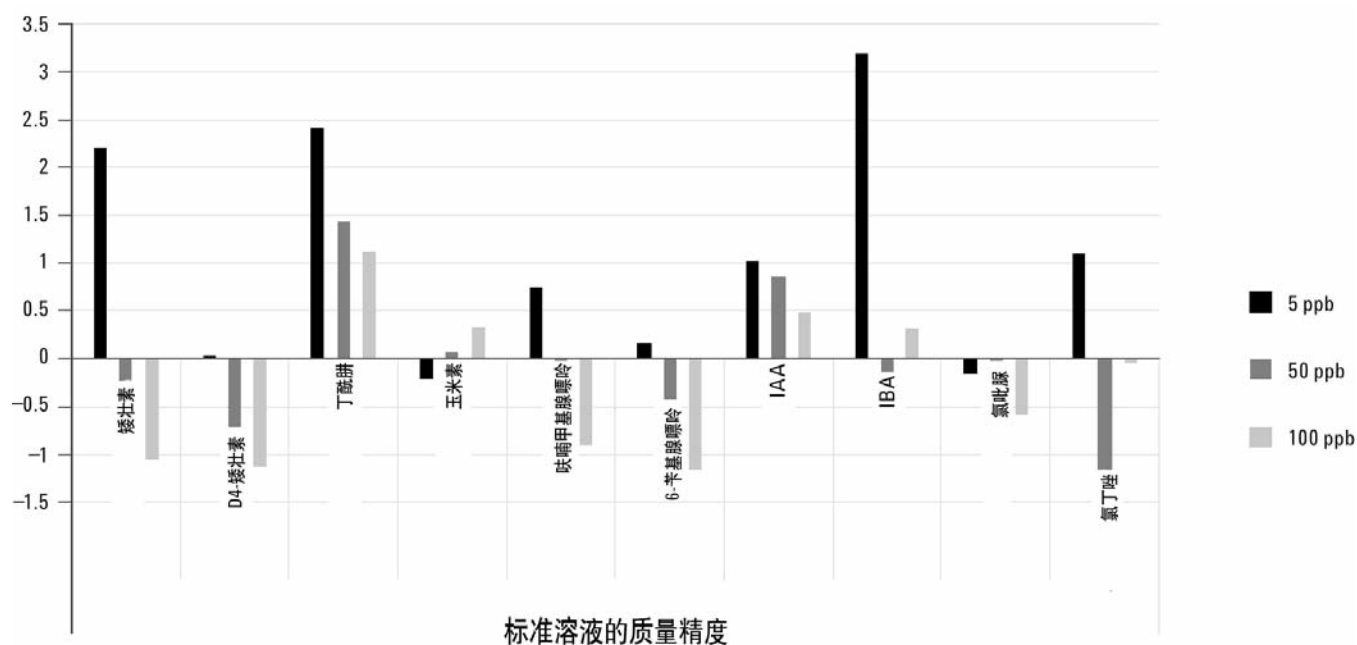


图 3. 正模式下，PGR 标液的质量精度

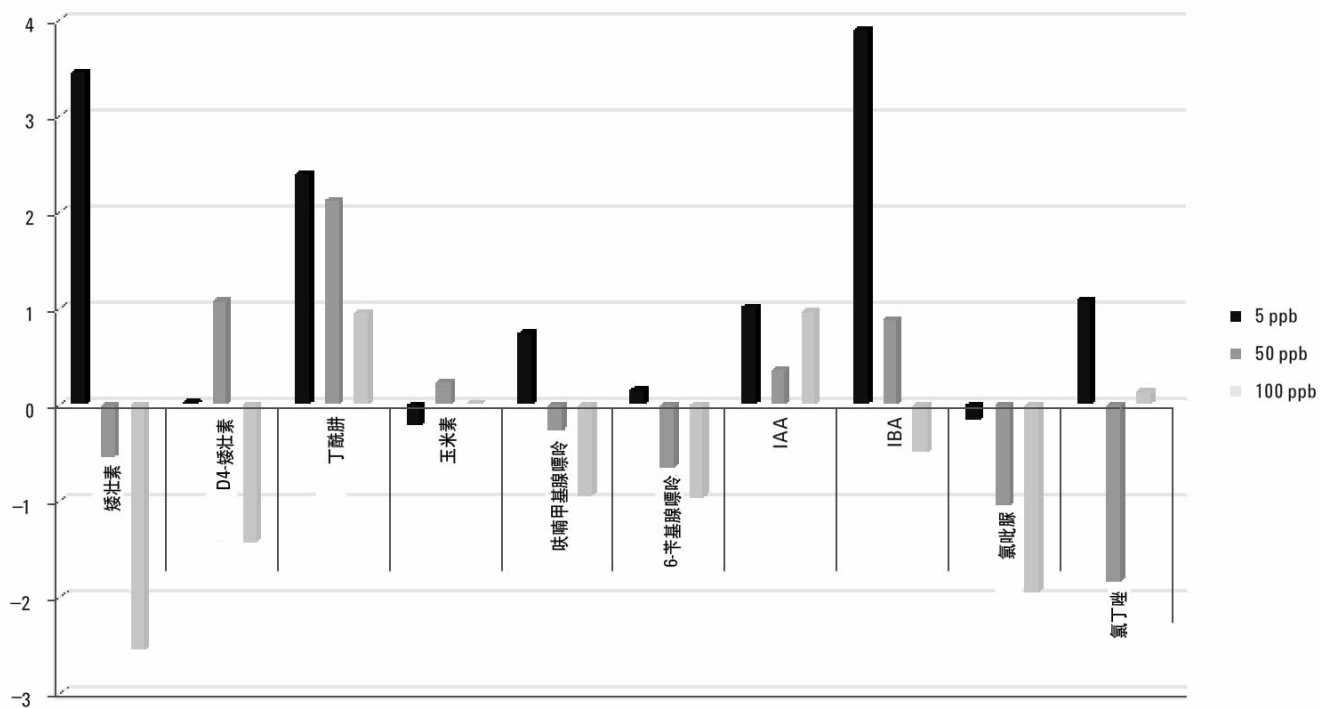


图 4. 正模式下, PGR 加标回收样品的质量精度

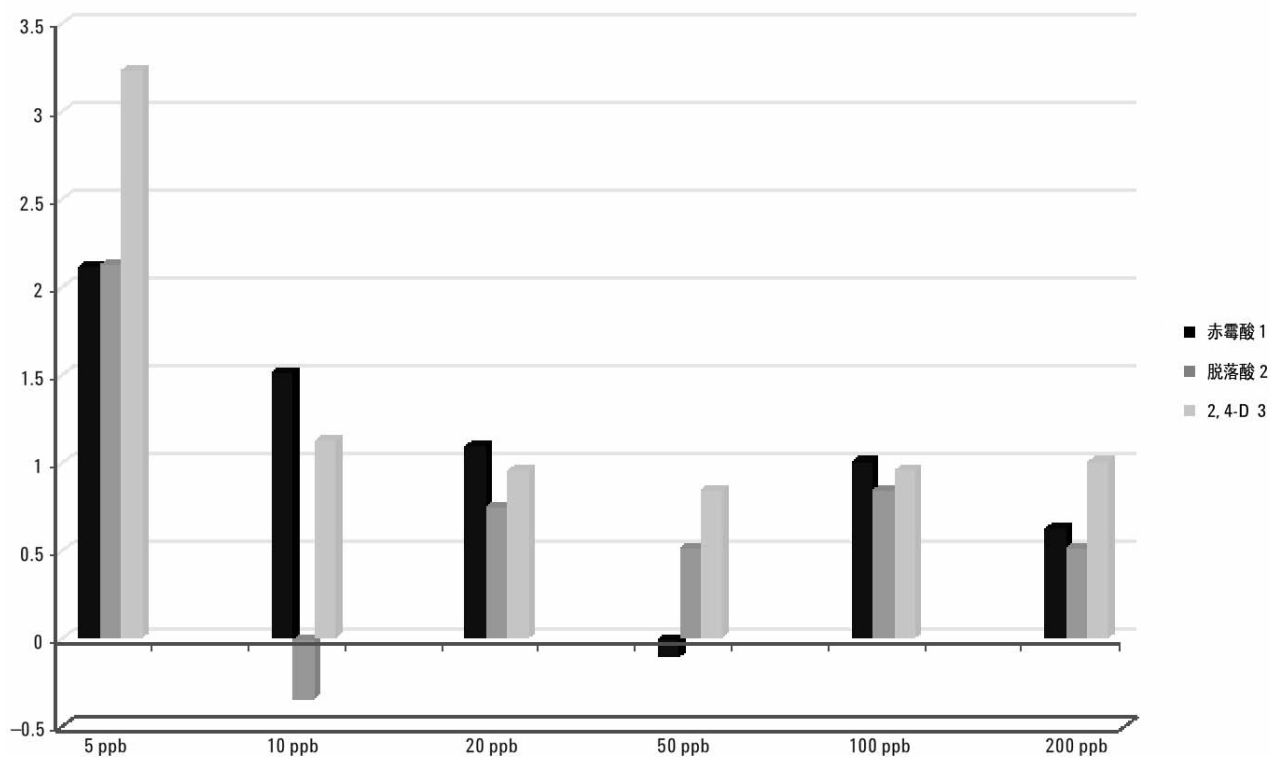


图 5. 负模式下, PGR 标液的质量精度

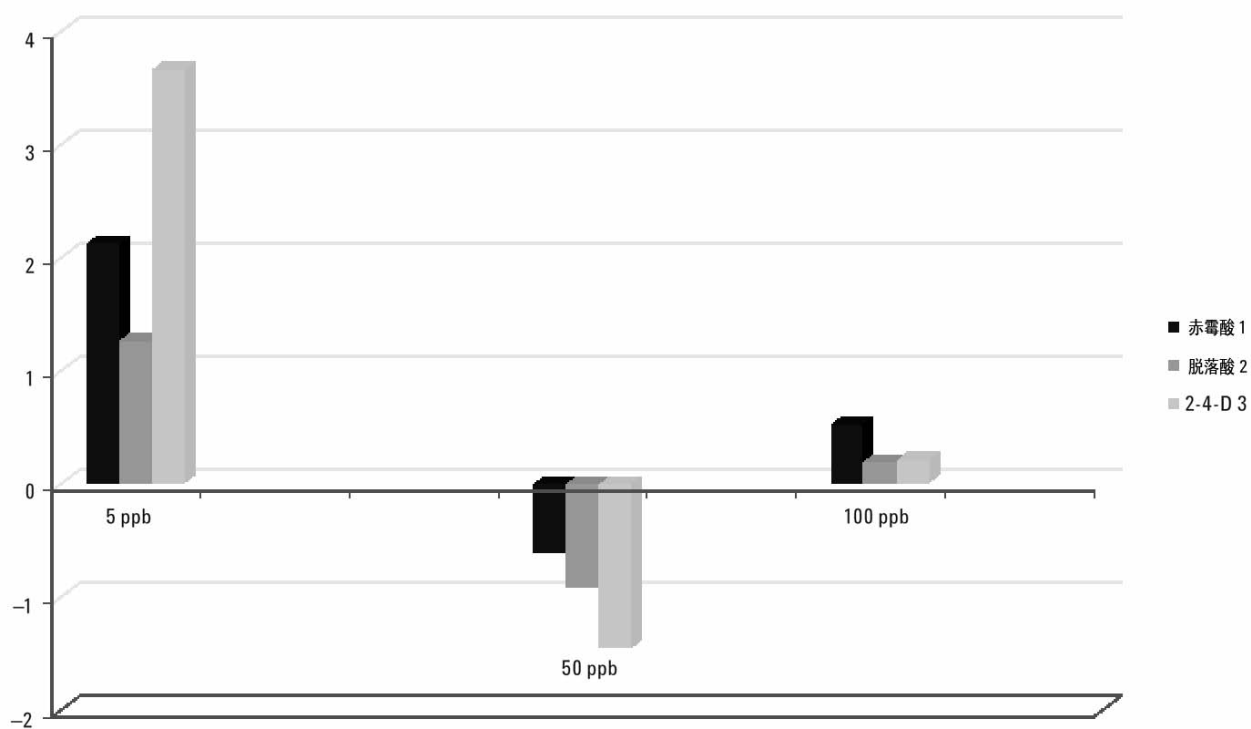


图 6. 负模式下，PGR 加标回收样品的质量精度

Q-TOF 的 MS/MS 模式具有非常好的谱图分辨率。产物离子的精确质量可确定其化学式和可能的结构。图 7 显示了氯吡脞 MS/MS 碎片离子的精确质量。每个产物离子的化学式可由 C、H、N 和 O 的可能组合推导出。已知氯吡脞的结构，根据相应的化学式可推导出碎片离子的结构。

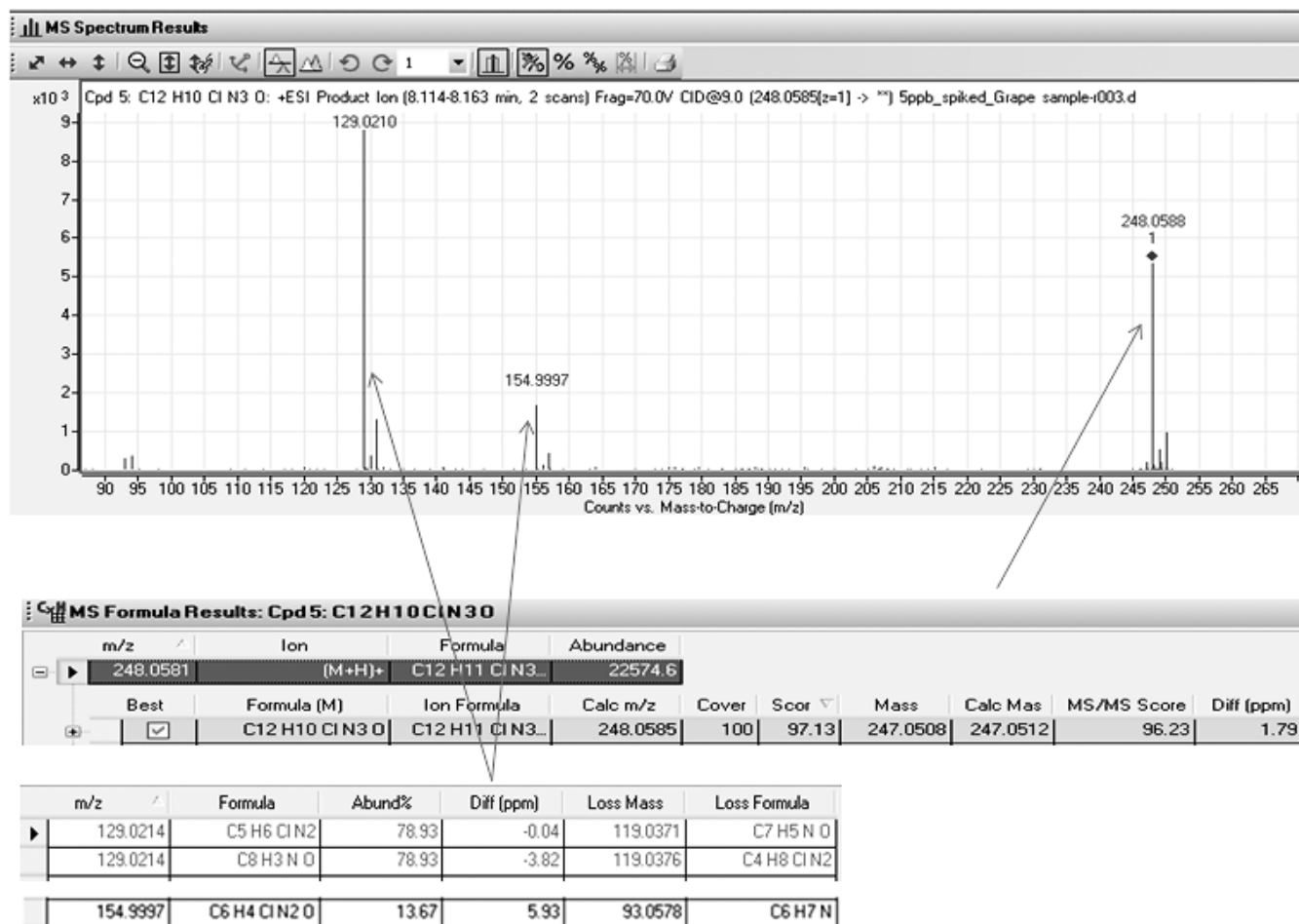


图 7. 氯吡啶目标离子 MS/MS 扫描生成的产物离子可用于结构解析和定量

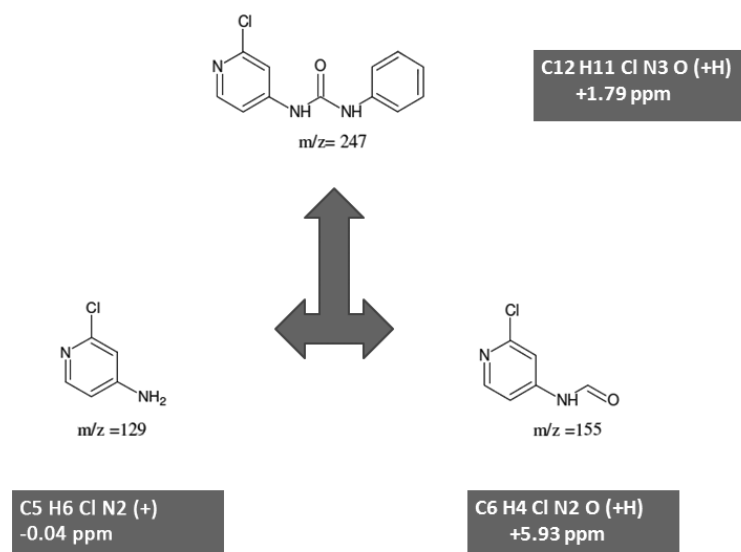


图 8. 产物离子的化学式

MFG (分子式生成) ——重要的分子式鉴别软件

氯丁唑 (PBZ), 分子式 $C_{15}H_{20}ClN_3O$ ($293.1295\ m/z$), 当使用 QqQ 分析时, 主要形成三个碎片离子: $70.1\ m/z$ 、 $60.2\ m/z$ 和 $57.2\ m/z$ (图 9)。在同一保留时间处有 $293.1990\ m/z$ 的离子发生相似的 MRM 转换, 这可能来自于空白或葡萄样品。

图 10 和图 11 显示了样品与标准品相比, 只存在定量离子强度低和离子丰度比不同的差异。样品谱图中低强度的定量离子 ($294.1 > 70.1$) 和极高强度的定性离子 ($294.1 > 60.2$) 表明样品中不存在氯丁唑, 但某些时候, 由于不能区分在同一保留时间下发生相似的 MRM 转换的氯丁唑离子 $294.1368\ m/z$ 和来自葡萄样品或空白的相似离子 $294.2063\ m/z$, 结果也会出现偏差。

低分辨率的系统, 如 QQQ 则不能区分这两个极为相近的离子。

在同一葡萄样品中加入氯丁唑标准品, 使用高分辨率的 LCMS, 即 Q-TOF 进行分析, 提取氯丁唑标准离子 ($M+H$) $294.1368\ m/z$ 和另外的离子 $294.2063\ m/z$ 的谱图, 使用“从谱峰生成分子式”功能生成分子式, 结果发现:

1. 通过使用 Q-TOF, 可以正确区分氯丁唑离子 $294.1368\ m/z$ 和相似离子 $294.2063\ m/z$
2. 图 12 表明, $294.1368\ m/z$ 离子对应的分子式即为氯丁唑分子, 其质量精度高达 $0.11\ ppm$
3. $294.2063\ m/z$ 离子得到了不同的分子式, 其质量精度为 $0.39\ ppm$, 如图 13 所示
4. 安捷伦 G6530 的高质量精度和最佳的分辨率有助于区分目标氯丁唑离子和其他同一保留时间流出、相似度较高的干扰离子, 而 QQQ 对此很难区分

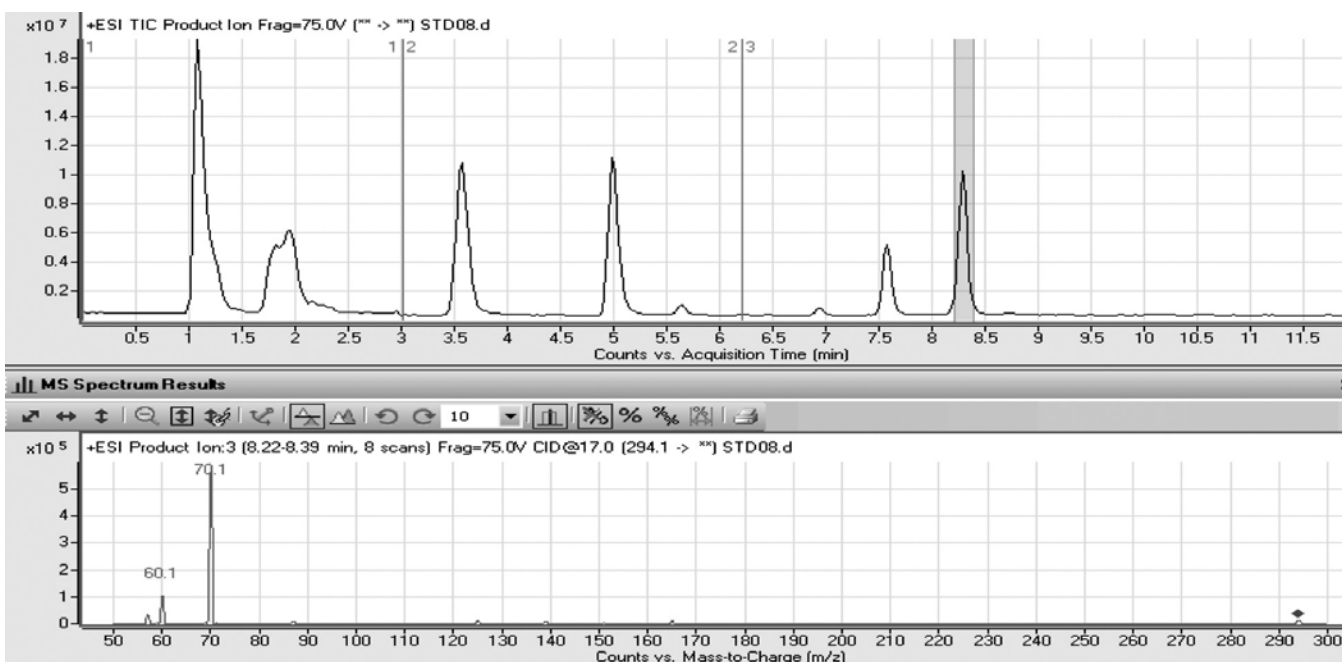


图 9. 使用安捷伦 6460 QqQ 生成的氯丁唑产物离子谱图

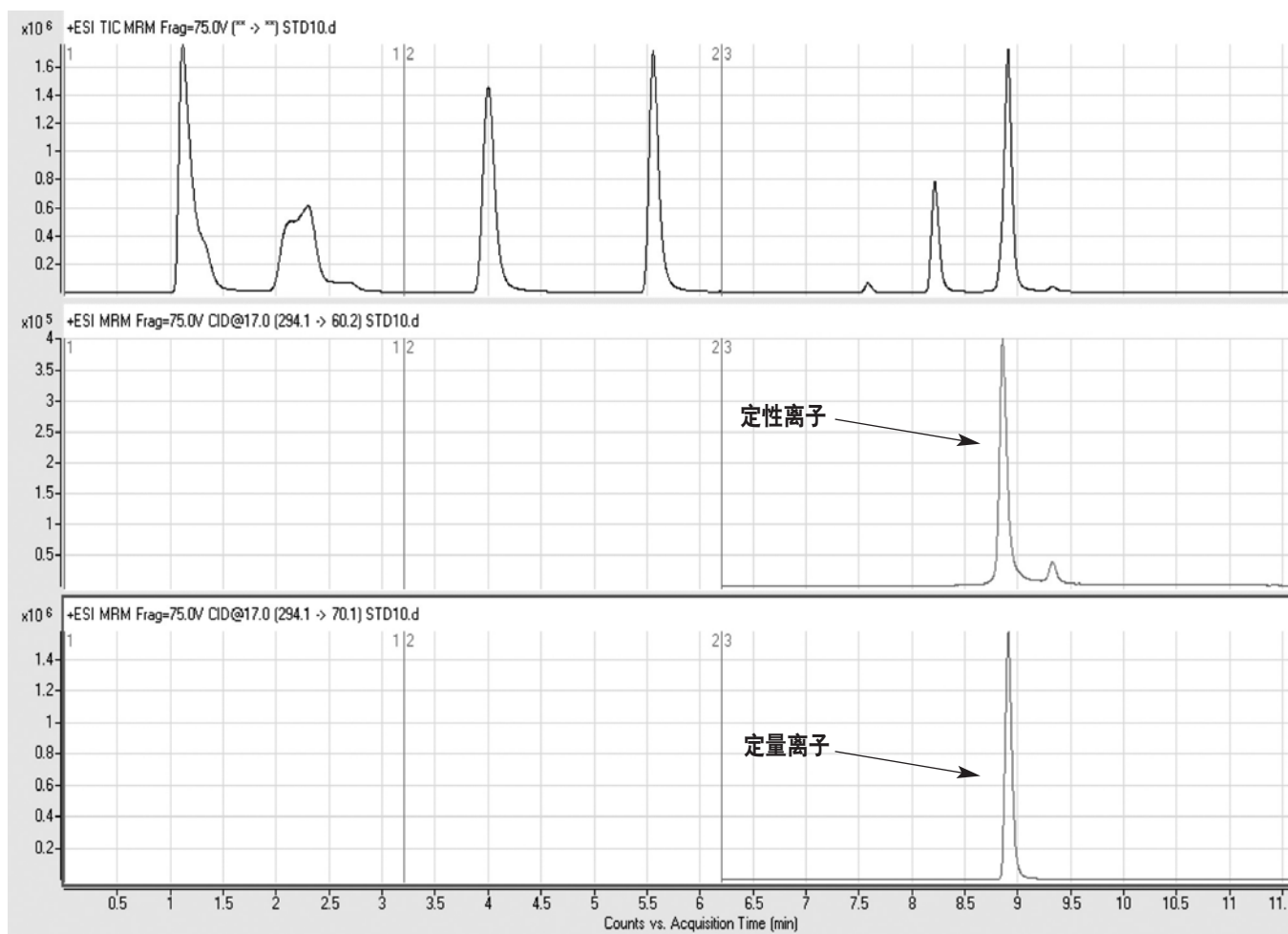


图 10. 使用安捷伦 6460 QqQ 生成的氯丁唑标液的 MRM 谱图

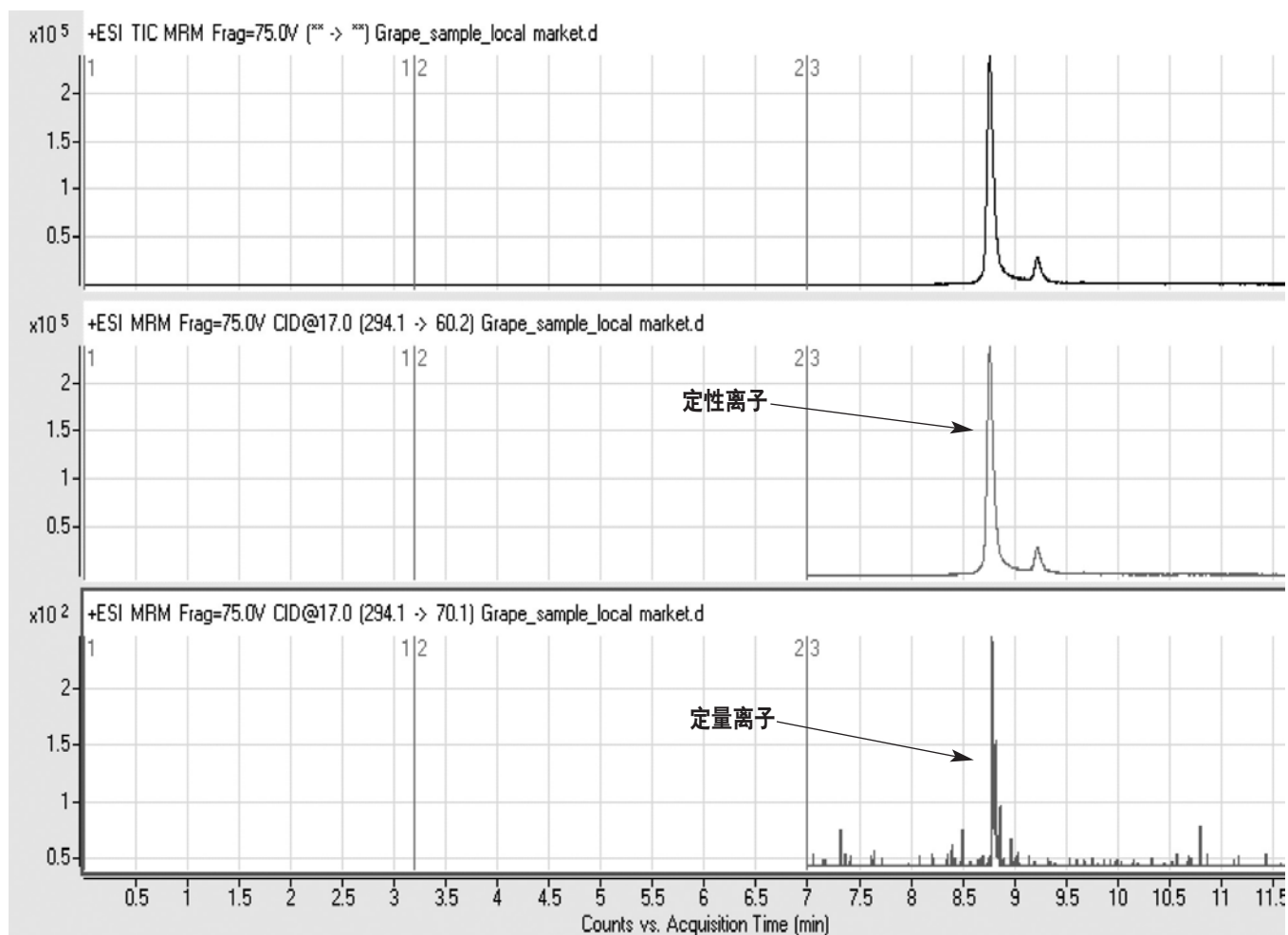
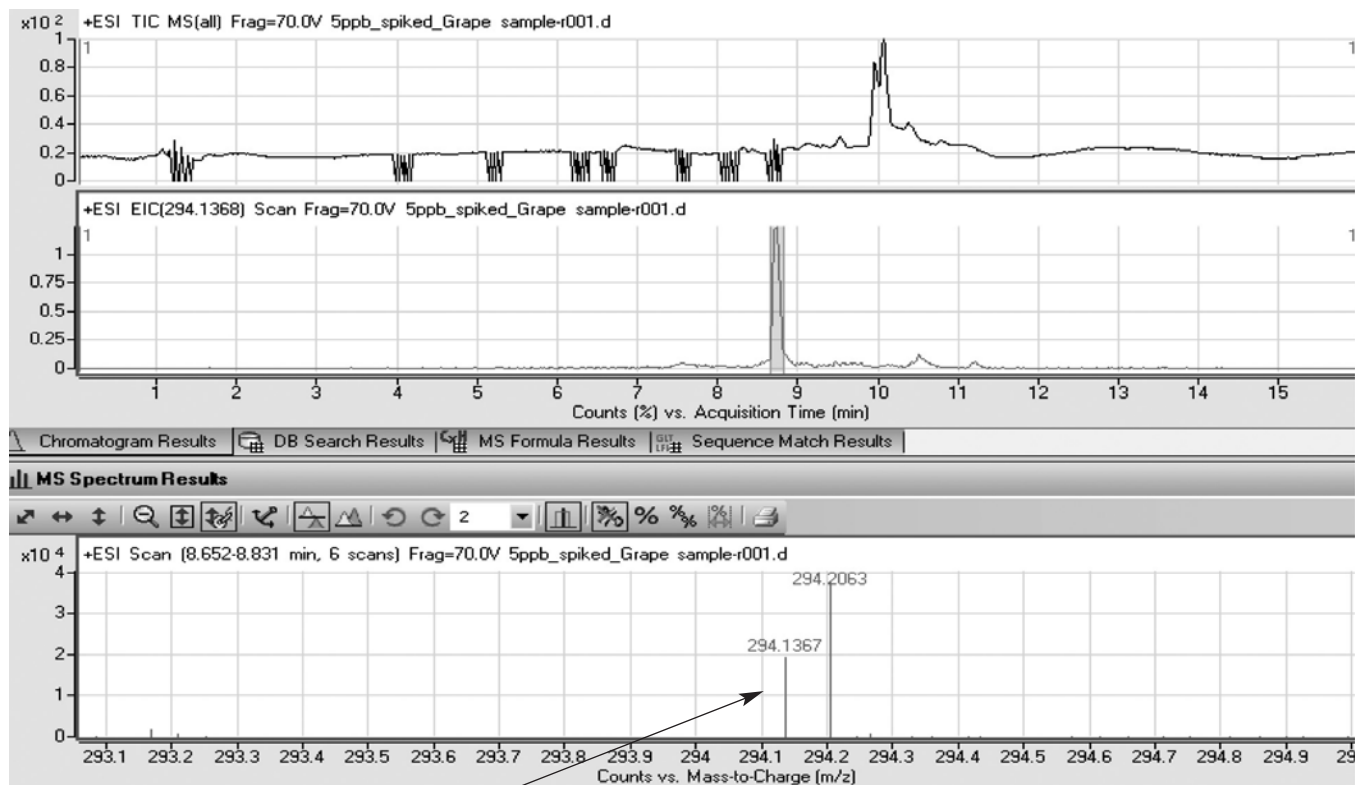


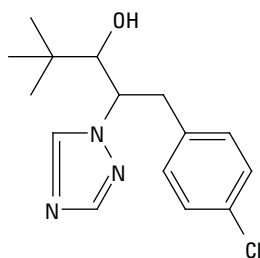
图 11. 使用安捷伦 6460 QqQ 生成的葡萄样品中 293.1990 m/z 离子的 MRM 谱图



MS Formula Results: +Scan(8.652-8.831 min)

m/z	Ion	Formula	Abundance
294.1367	(M+H) ⁺	C ₁₅ H ₂₁ ClN ₃ O	19453.7

Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Score	Cross Score	Mass	Calc Mass	Diff (ppm)	Abs Diff (ppm)	Abund Match
☒	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O	C ₁₅ H ₂₁ ClN ₃ O	294.1368	91.39		293.1295	293.1295	0.11	0.11	90.65



氯丁唑 (C₁₅H₂₀ClN₃O) 293.1295 m/z

图 12. 使用安捷伦 6530 Q-TOF 生成的葡萄样品中 294.1368 m/z 离子的 EIC 谱图表明, C₁₅H₂₀ClN₃O 与氯丁唑匹配, 质量精度为 0.11 ppm

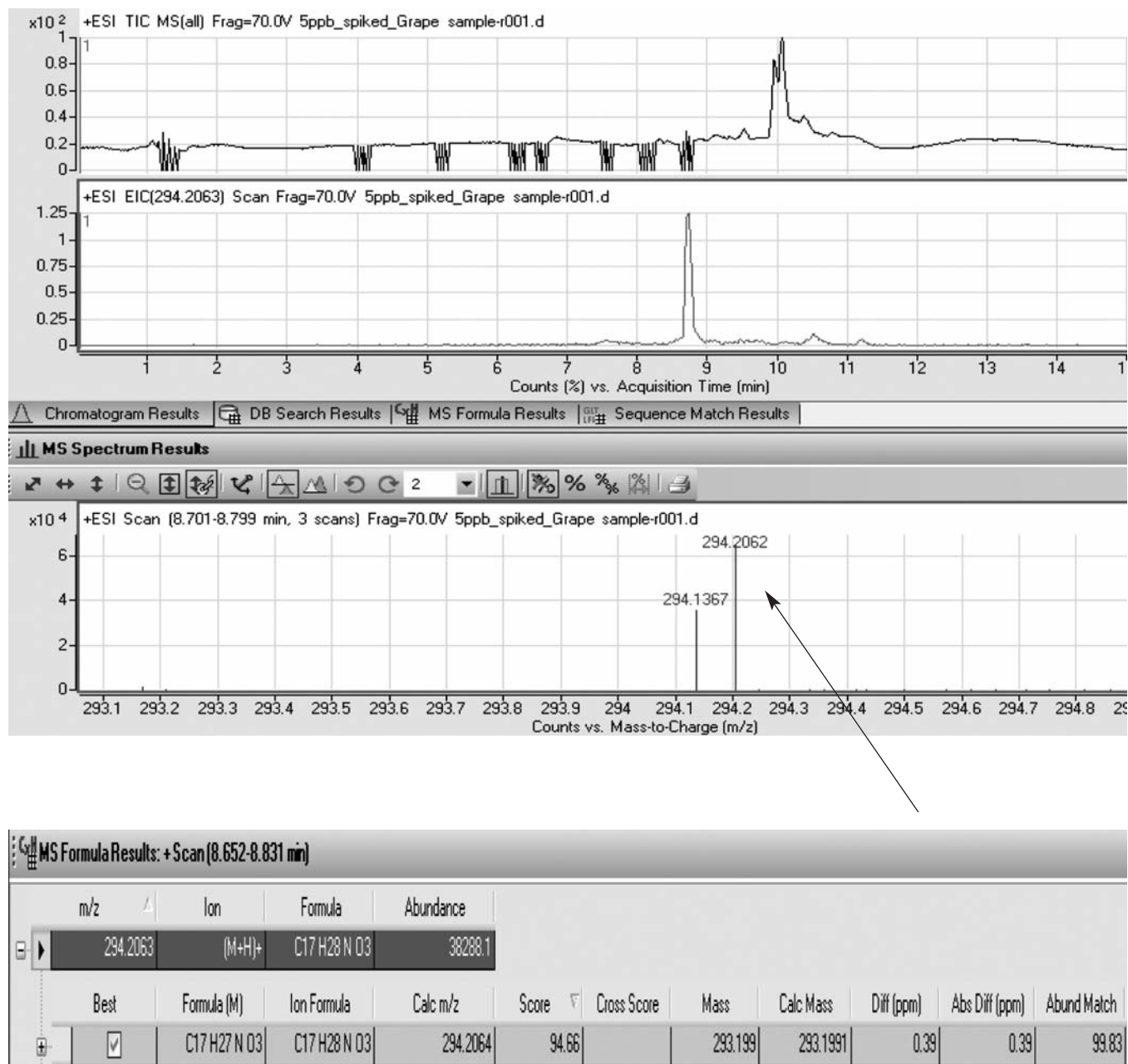


图 13. 使用安捷伦 6530 Q-TOF 生成的葡萄样品中 293.2063m/z 离子的 EIC 谱图得出了不同的分子式 $C_{17}H_{27}NO_3$, 质量精度为 0.39ppm

结论

Q-TOF 凭借极高的质量精度，能够对小分子进行明确的鉴定或确认，这在以往只能通过昂贵而难以操作的仪器如傅立叶变换质谱 FT-MS 来实现。Q-TOF 杰出的质量精度同样显著缩小了无论是小分子还是大分子的候选范围。

Q-TOF 是通过 MS 和 MS/MS 全扫描模式的精确质量对化合物进行鉴定的卓越系统。精确质量可以得出化学式，也能为 MS/MS 的产物离子提供结构信息。使用该系统获得的大量数据中包含了丰富的已知和未知化合物的信息，因此使用分子特征提取 (MFE) 功能从化合物背景中提取有用的特征信息至关重要。软件通过排除随机背景信号和同位素簇离子定位得到谱图中的分子特征。

安捷伦 6530 喷射流 ESI 离子源精确质量四级杆飞行时间 MS 系统，与安捷伦 1290 Infinity LC 联用，结合 C18 ODS 样品净化方法筛查葡萄样品中的多种 PGR，结果表现出了优异的灵敏度和卓越的质量精度。

致谢

葡萄样品由印度普纳国家葡萄研究中心 (NRCG) 提供，本研究 with NRCG 的高级科学家 Kaushik Banerjee 博士合作进行。

参考文献

1. Peter Stone, Yang Chen 和 Jack Cappozzo, “三重串联四极杆液质联用仪用于食品中黄曲霉素 B1, B2, G1 和 G2 的高灵敏度检测”，安捷伦出版物 5990-6894CHCN, 2010
2. Michell Zumwalt, David Weil, Chin-Kai Meng, “The use of Accurate mass, Isotope ratios and MS/MS for the PPCPs in water.”

更多信息

有关我们产品和服务的更多信息，请访问
www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料所引起的相关损失不承担责任。

本文中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 4 月 28 日中国印刷
5990-7185CHCN



Agilent Technologies