

QuEChERS 结合 HPLC-MS/MS 技术同时测定多种水果中的 21 种 植物生长调节剂

应用简报

食品

作者

Dunming Xu, Hehe Huang,
Yu Zhou
厦门出入境检验检疫局，
中国厦门

Meiling Lu, Shan Zhou
安捷伦科技（中国）有限公司，
中国北京

摘要

本应用简报基于我们之前的研究^[1]，介绍了一种利用 QuEChERS 结合 HPLC-ESI-MS/MS 技术同时检测水果中 21 种植物生长调节剂的方法。首先用含 1% 乙酸的乙腈对样品进行萃取，然后在硫酸镁的存在下使用 C18 吸附剂进行净化。使用 Agilent Infinity UHPLC 1290 系统在 C18 色谱柱上分离所得的溶液，并使用安捷伦 ESI-三重四极杆质谱仪在多反应监测 (MRM) 模式下进行检测。采用基质匹配外标校准方法进行定量分析。对于检测的苹果、梨、草莓、葡萄和橙子基质，所有 21 种化合物均表现出 0.10–1000 µg/L 范围内 2–3 个数量级的动态线性范围，相关系数高于 0.99。该方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别在 0.020 µg/kg–6.0 µg/kg 和 0.10 µg/kg–15.0 µg/kg 之间。对于所有化合物，平均加标回收率在 73.0%–111.0% 的范围内，且相对标准偏差 (RSDs, n = 6) 在 3.0%–17.2% 的范围内。该方法快速、简单、有效、灵敏且准确，符合对水果中这些植物生长调节剂的测定要求。

前言

植物生长调节剂 (PGRs) 通常是合成的化合物，其结构和生理功能与天然和内源性植物激素相似。它们可能在增强植物抗逆性、促进植物细胞分裂和生长以及提高植物产量和质量方面发挥关键作用。因此，它们已广泛应用于农业生产中。但是，在缺乏监督的情况下过度使用这些 PGRs，可能导致蔬菜和水果中 PGRs 残留量升高，从而可能威胁公共健康。目前，许多国家和国际组织已制定相关法规，规定了各种水果中某些 PGRs 的最大允许残留限量 (MRLs)。欧盟已规定大多数新鲜水果中丁酰肼、噻苯隆和抑芽唑的 MRLs 分别为 0.02、0.01 和 0.01 mg/kg^[2]。日本将西瓜中抗倒酯的 MRL 限制为 0.02 mg/kg^[3]；中国将葡萄中氯吡脲的 MRL 限制为 0.05 mg/kg，将某些水果（如苹果和梨）中 2,4-D 的 MRL 限制为 0.01 mg/kg^[4]。因此，开发一种高灵敏方法来监测相关农产品中的这些 PGRs 残留至关重要。

研究人员提出采用 LC/MS 代替 ELISA、GC 和 LC 等传统方法来测定 PGRs 残留^[5-7]。由于 PGRs 种类很多，化学结构差异巨大。这使得同时分析多类 PGRs 面临非常大的挑战。目前报道的大多数 LC/MS 方法仅关注几类 PGRs。本应用简报介绍一种通用方法，该方法可将 QuEChERS 提取净化方法与 HPLC-MS/MS 技术结合起来，用来同时测定多种水果中的常用 PGRs。

实验部分

试剂与材料

21 种植物生长调节剂 (PGRs) 包括丁酰肼、矮壮素、助壮素、氯化胆碱、2,4,5-三碘苯甲酸、赤霉酸、环丙酰草胺、脱落酸 (ABA)、氯吡脲、6-苄氨基嘌呤、噻苯隆、2,4-D、调果酸、4-氯苯氧乙酸 (4-CPA)、1-萘乙酸、吲哚-3-乙酸 (IAA)、抗倒胺、多效唑、烯效唑、抑芽唑和抗倒酯，它们全部购自 Dr. Ehrenstorfer (德国)，纯度高于 96%。

用甲醇 (HPLC 级) 配制浓度为 100.0 mg/L 的标准溶液，并将其保存在 4 °C 下。使用初始流动相或基质提取物将储备液进一步稀释至一系列浓度，用于外标定量。

样品前处理

准确称取 10 g 样品，加入 50 mL 离心管中。然后加入 10 mL 酸化乙腈 (1% 乙酸的乙腈溶液)。将混合物均质化 2 分钟。将 4 g MgSO₄ 和 1.5 g 乙酸钠加入样品瓶中。然后将其涡旋混合 1 分钟，再以 4000 rpm 离心 3 分钟。将 2 mL 上清液样品溶液装入洁净的 2 mL 样品瓶中，该样品瓶中含 25 mg C18 吸附剂和 150 mg 无水 MgSO₄。将样品瓶涡旋混合 1 分钟，然后以 16000 rpm 离心 5 分钟。使上清液通过 0.22 μm 膜的过滤，储存在 4 °C 下，待 LC-MS/MS 分析。

仪器条件

液相色谱配置和条件

- Agilent Infinity UHPLC 1290 二元泵 (G4220A)
- 安捷伦高性能自动进样器 (G4226A)
- 安捷伦自动进样器温控 (G1330B)
- 安捷伦柱温箱 SL (G1316B)

色谱柱 Agilent XDB-C18, 4.6 × 100 mm, 5.0 μm

柱温 35 °C

进样量 5 μL

进样针清洗 冲洗口 (100% 甲醇)，5 秒

流动相 A) 5 mmol/L 乙酸铵/0.05% 甲酸水溶液
B) 乙腈

梯度流速 0.5 mL/min

梯度洗脱曲线如表 1 所示

表 1. 梯度洗脱曲线

时间	溶液 A (%)	溶液 B (%)
0	95	5
2	95	5
12	20	80
18	20	80
18.1	95	5
24	95	5

质谱配置和条件

- 配备了安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪

电离模式	正/负离子模式
扫描模式	多反应监测 (MRM)
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	500 V
雾化气压力	45 psi
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	10 L/min
鞘气温度	375 °C
鞘气流速	11 L/min

结果与讨论

质谱检测的优化

最初，将各种化合物的标准溶液注入质谱仪中来优化质谱采集条件。选择稳定的母离子，例如正离子模式下的 $[M+H]^+$ 或负离子模式下的 $[M-H]^-$ 实施进一步碎裂。某些化合物（如 6-BA、噻苯隆、氯吡脲和抗倒胺）可同时生成 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$ 。考虑到化合物的性质和灵敏度以及进行时间段扫描的必要性，采用负离子模式检测 6-BA、噻苯隆和氯吡脲，采用正离子模式检测抗倒胺。选择母离子后，然后优化碎裂电压以使母离子获得最高的灵敏度。然后通过子离子扫描和 MRM 扫描获得每个母离子的特异碎片离子和碰撞能量，从而使得每个化合物的响应尽可能高，干扰尽可能低。优化的 MRM 离子对及相应参数如表 2 所示。

表 2. 21 种 PGRs 的 MS/MS 参数

注：* 代表定量离子

分析物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	CE (V)	碎裂电压 (V)
0-5 分钟				
氯化胆碱	(+) 104.1	45.1	23	100
		60.2*	17	
矮壮素	(+) 122.1	58.2*	33	130
		63.1	21	
助壮素	(+) 114.2	58.2	29	140
		98.1*	28	
丁酰肼	(+) 161.1	143.1*	8	90
		61.2	10	
5-13 分钟				
赤霉酸	(-) 344.9	143.1*	25	170
		239.2	8	
6-苄氨基嘌呤	(-) 224.1	133.0*	21	140
		106.2	36	
IAA	(-) 174.0	130.1*	7	70
		128.1	20	
ABA	(-) 263.2	153.1*	2	120
		204	12	
1-萘乙酸	(-) 185.0	141.3*	4	100
噻苯隆	(-) 219.1	100.1*	4	80
		71.2	35	
2,4-D	(-) 219.0	161.0*	8	100
		125.0	25	
调果酸	(-) 199.1	70.9	4	80
		127.0*	10	
2,3,5-三碘苯甲酸	(-) 498.8	126.8	18	45
		454.8*	1	
4-氯苯氧乙酸	(-) 185.0	127.1*	10	100
	(-) 187.0	129	10	
氯吡脲	(-) 246.1	91.1	26	130
		127.1*	6	
环丙酰草胺	(-) 272.0	160.0*	15	100
		227.9	2	
13-24 分钟				
抗倒胺	(+) 339.2	321.2*	17	140
		80.2	33	
抗倒酯	(+) 253.5	69.2*	17	70
		185.3	7	
多效唑	(+) 294.1	70.1*	21	120
		125	44	
烯效唑	(+) 292.1	70.1*	26	110
		124.9	35	
抑芽唑	(+) 264.2	67.1	37	70
		70.1*	25	

液相色谱条件的选择

最初使用窄径细颗粒柱分离 21 种 PGRs。但是，由于 21 种 PGRs 的极性差异很大，因此极性极强的化合物（如丁酰肼、矮壮素、助壮素和氯化胆碱）会在 2 分钟内从色谱柱中洗脱，且 ESI-MS/MS 检测期间的共流出干扰物质对这些目标物响应抑制非常严重。使用常规色谱柱 Agilent XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm) 后发现，所有化合物的保留时间均长于 2.5 分钟，基质的共流出干扰有一定程度的降低。因此，选择 Agilent XDB-C18 色谱柱来分离目标化合物。

最初选择由乙腈/水组成的二元流动相。为获得更出色的分离和检测灵敏度，通常将甲酸、乙酸铵或甲酸与乙酸铵的混合物加入水相中，来调节分离选择性和灵敏度。对三种类型的流动相组成进行比较，结果发现，浓度分别为 5 mmol/L 乙酸铵和 0.05% 甲酸混合溶液表现出了最出色的峰分离度和峰形，因此选择混合添加剂水溶液作为水相。

在经过优化的质谱和液相色谱条件下，21 种 PGRs 的典型叠加 MRM 色谱图如图 1 所示。

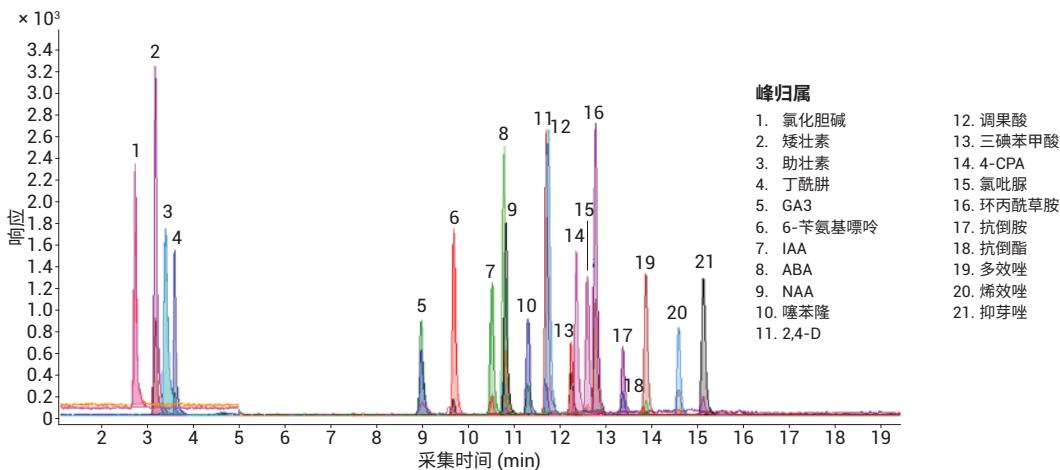


图 1. 21 种 PGRs 的典型叠加 MRM 色谱图

QuEChERS 提取和净化步骤的优化

应用 QuEChERS 方案进行样品提取和净化。为更好地从水果基质中提取目标分析物，对乙腈、乙腈/1% 乙酸、乙腈/2% 乙酸和乙腈/1% NaOH 进行了比较。如图 2 所示，使用乙腈/1% 乙酸时，苹果基质中所有 21 种 PGRs 的加标回收率可达到 80% 或更高。因此，选择乙腈/1% 乙酸作为提取溶剂。

为进一步净化，对使用经典吸附剂（例如在 $MgSO_4$ 存在下，PSA、C18、GCB 或三者组合）的分散式固相萃取 (dSPE) 进行了考察。如图 3 所示，使用 PSA 作为净化吸附剂，仅五种化合物（包括氯吡脲、抗倒胺、多效唑、烯效唑和抑芽唑）的回收率高于 70%，而所有其他化合物的回收率均低于 40%。将 PSA 与 C18 或 GCB 结合使用，未表现出任何改善。相比之下，在 $MgSO_4$ 存在下使用 C18 作为净化吸附剂，可有效回收 21 种分析物，其回收率均高于 75%。因此，选择 C18 进行净化。

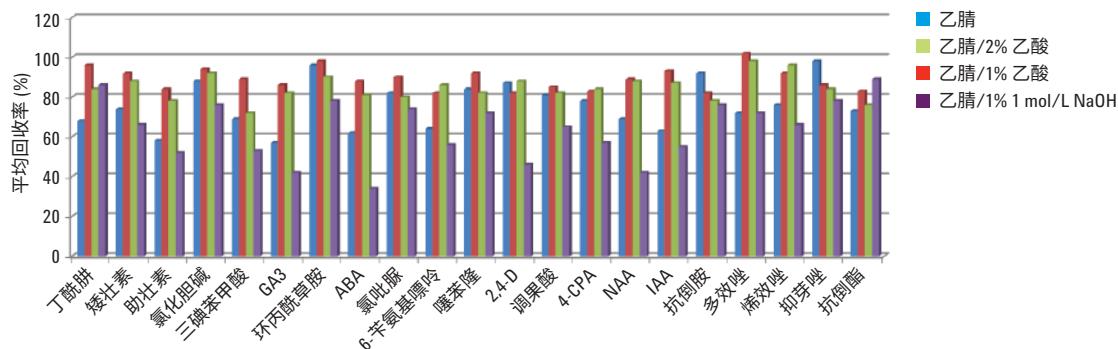


图 2. 不同溶剂对分析物提取效率的影响

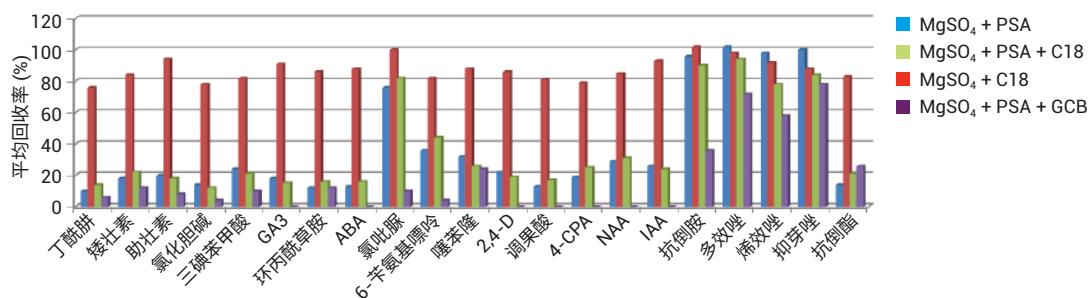


图 3. 不同吸附剂对分析物回收率的影响

方法性能

在 LC/MS 分析过程中，基质干扰不可忽略，它可能增强或抑制目标分析物的响应，从而降低定量分析准确度。为提高分析准确度，必须对基质干扰进行评估，且必须采用适当策略最大程度减小基质效应。在本研究中，我们使用相对响应来评估基质效应（基质效应 ME% = 基质中的峰面积/纯溶剂中的峰面积 × 100%，其中当 ME% > 100% 时存在基质增强效应，而在 ME% < 100% 时存在基质抑制效应）。如图 4 所示，48% 的化合物表明 ME% 超过大多数监管机构规定的可接受范围 (80%–120%)。特别是在苹果和橙子基质中，分别有约三分之一的化合物表现出基质增强和抑制效应。这表明在分析过程中不能忽略该基质效应。

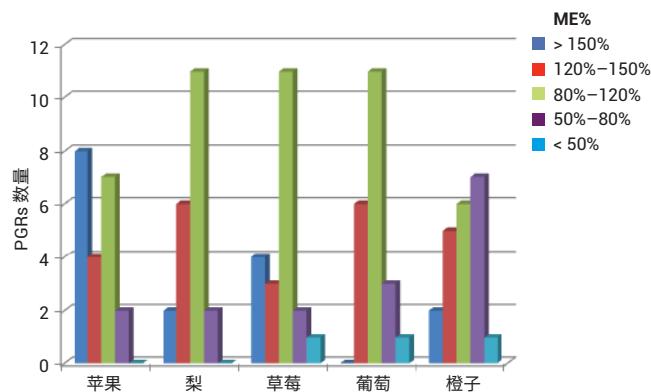


图 4. 五种水果基质中 21 种 PGRs 的基质效应分布 (以 ME% 表示)

为最大程度降低由基质效应引起的定量分析偏差，本研究使用基质匹配的外标法进行校准。如图 5 所示，在每种化合物各自的检测范围内，线性相关系数均高于 0.99，表现出优异的线性。根据最低浓度基质匹配溶液中各化合物的定量离子提取色谱图，确定方法的 LOD ($3 \times S/N$) 和 LOQ ($10 \times S/N$)。如图所示，所有化合物的 LOQs 均明显低于监管机构规定的当前可用的 MRLs，表明该方法具有高灵敏度并符合监管要求。

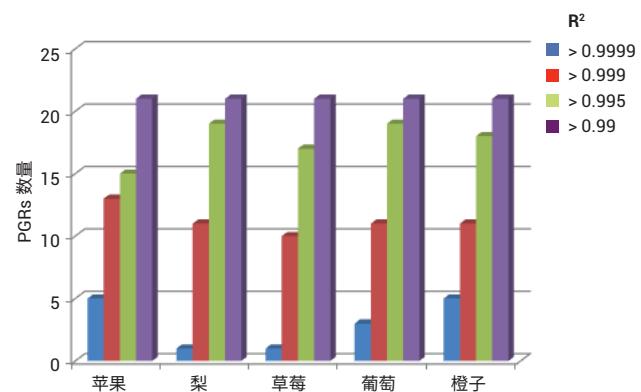


图 5. 五种水果基质中基质匹配校准曲线的线性 (R^2)

表 3. 五种水果基质中的方法 LOD 和 LOQ

名称	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)	名称	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
氯化胆碱	0.050	0.30	调果酸	1.5	8.0
矮壮素	0.050	0.20	三碘苯甲酸	1.0	5.0
助壮素	0.050	0.30	4-CPA	1.0	5.0
丁酰肼	0.50	2.0	氯吡脲	0.020	0.10
GA3	6.0	15.0	环丙酰草胺	0.040	0.20
6-苄氨基嘌呤	0.80	3.0	抗倒胺	0.050	0.20
IAA	5.0	15.0	抗倒酯	1.4	5.0
ABA	1.5	5.0	多效唑	0.020	0.10
NAA	4.0	10.0	烯效唑	0.080	0.80
噻苯隆	0.050	0.80	抑芽唑	0.040	0.40
2,4-D	1.2	5.0			

准确度和精密度

为进一步评估该方法的准确度和精密度，对包括苹果、梨、草莓、葡萄和橙子在内的各种样品进行检测。选择未检测到目标分析物的样品作为空白基质。将三种浓度的各种分析物加入空白基质中，重复分析六次，然后对加标样品进行提取和净化，然后进行 LC/MS/MS 分析。如图 6 所示，五种空白基质中 21 种分析物的添加回收率均在 73.0%–111.0% 的范围内，且相对标准偏差 (RSD) 在 3.0%–17.2% 的范围内，满足残留分析关于准确度和精密度的要求。

结论

本应用简报展示了一种同时定量测定 21 种植物生长调节剂的方法。借助基质匹配校准，所开发的方法具有宽的动态线性范围，线性相关系数高于 0.99。该方法准确而稳定，其加标回收率在 73.0%–111.0% 的范围内，且 RSD 为 3.0%–17.2%。此外，该方法灵敏度高，21 种 PGRs 的 LOQ 在 0.10 µg/kg 至 15.0 µg/kg 的范围内，这一范围显著低于目前可用的测定方法和法规规定的限量水平，因此可以将其用于水果中这些 PGRs 残留的常规监测。

参考文献

1. H. H. Huang, et al. *Chin. J. Chromatogr.* **32**:707 (2014)
2. EU Pesticide Database. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides
3. The Japan Food Chemical Research Foundation. <http://www.ffcr.or.jp/zaidan/ffcrhome.nsf/>
4. China National Food Safety Standard, GB-2763-2014, 2014
5. X. Esparza, et al. *J. Chromatogr. A.* **1216**:4402 (2009)
6. S. Riediker, et al. *J. Chromatogr. A.* **966**:15 (2002)
7. L. Ma, et al. *Food Anal. Methods*, **6**:941 (2013)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

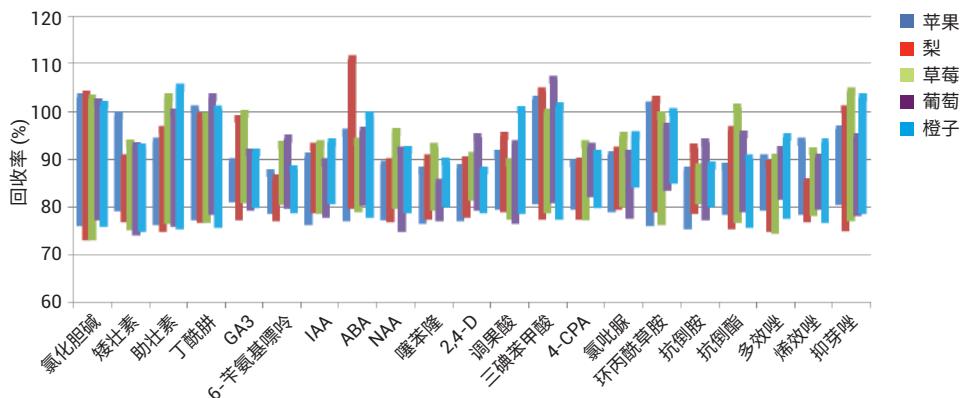


图 6. 五种空白基质中 21 种分析物的回收率

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本
资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2015
2015 年 2 月 2 日, 中国出版
5991-5506ZHCN



Agilent Technologies