

超高效液相 – 三重四极杆质谱联用检测 水果中的赤霉素

LCMSMS-053

摘要： 本文建立使用超高效液相色谱仪与岛津三重四极杆质谱仪联用快速检测 GA1、GA3、GA4、GA5、GA7、GA9 这 6 种赤霉素的方法。通过超高效液相色谱分离，三重四极杆质谱仪进行定量分析，6 种化合物在 13 分钟内得到快速分离和检测。6 种化合物在 5 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.9990 以上；对 25 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行重复性实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.170% 和 9.10% 以下；最低检测限在 0.48 ~ 1.74 $\mu\text{g/L}$ 之间。

关键词： 赤霉素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

赤霉素，是广泛存在的一类植物激素，可加速细胞的伸长，对细胞的分裂也有促进作用，它可以促进细胞的扩大，可刺激叶和芽的生长。但随着植物生长调节剂使用情况增多，其使用的安全性也越来越受到重视。近年来发现，生长调节剂农作物中残留通过食物链进入人体后一定程度上会造成危害：轻者造成腹泻等疾病；重者使人体免疫力下降，骨骼疏松、甚至致畸、致癌、致突变等严重后果。发达国家对此类物质均制订严格的限量要求。但目前国内外对外源性植物生长调节剂检测的报道较少，现有的研究报道主要使用了高效液相色谱和液质联用法，研究对象多为其中的 1~2 种，研究基质包括水果、蔬菜等。但高效液相色谱法的分辨率和灵敏度低，不能适用水果等复杂基质中痕量残留物质的分析，且液相色谱仪不能提供结构方面的信息，故不能完成对目标化合物的确证工作，因而在实际残留分析应用中受到很大的限制。将 LC-MS/MS 法应用于外源性植物生长调节剂的残留分析，不仅可以实现对多种调节剂的同时测定和结构确证，还能满足复杂基质的痕量检测要求，本实验采用超高效液相色谱 – 串联质谱法同时快速检测水果中 6 种外源性植物生长调节剂，方法灵敏度、重复性均令人满意。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统：LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.5 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS
III 75 \times 2.0 mm I.D., 1.6 μm

流动相：1%甲酸水溶液 – 1%甲酸甲醇溶液 (A/B)

流速：0.3 mL/min

进样体积：1 μL

柱温：30 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，
时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	30
1.00	Pumps	Pump B Conc.	30
8.00	Pumps	Pump B Conc.	100
10.00	Pumps	Pump B Conc.	100
10.01	Pumps	Pump B Conc.	30
13.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI(-)

离子源接口电压：-3.5 kV

雾化气及干燥气：氮气 3.0 L/min、15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：450 $^{\circ}\text{C}$

检测器电压：1.1 kV

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间及延迟时间：20 ms、1 ms

表 2 6种赤霉素的MRM参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	GA1	347.00	273.15*	15.0	23.0	28.0
			285.20	15.0	21.0	30.0
2	GA3	345.00	143.20*	15.0	35.0	26.0
			239.20	15.0	15.0	25.0
3	GA4	331.00	225.20	20.0	18.0	24.0
			243.20*	20.0	19.0	25.0
4	GA5	329.00	145.15*	14.0	24.0	26.0
			285.20	14.0	17.0	29.0
5	GA7	329.00	223.25*	14.0	18.0	23.0
			211.25	14.0	29.0	22.0
6	GA9	315.00	271.20*	19.0	20.0	28.0
			253.30	19.0	25.0	16.0

*表示定量离子

1.3 标准溶液制备

用甲醇配制 1 mg/L 的混合标准溶液，用甲醇稀释成浓度为 1, 5, 10, 50, 100 μg/L 的标准工作液。

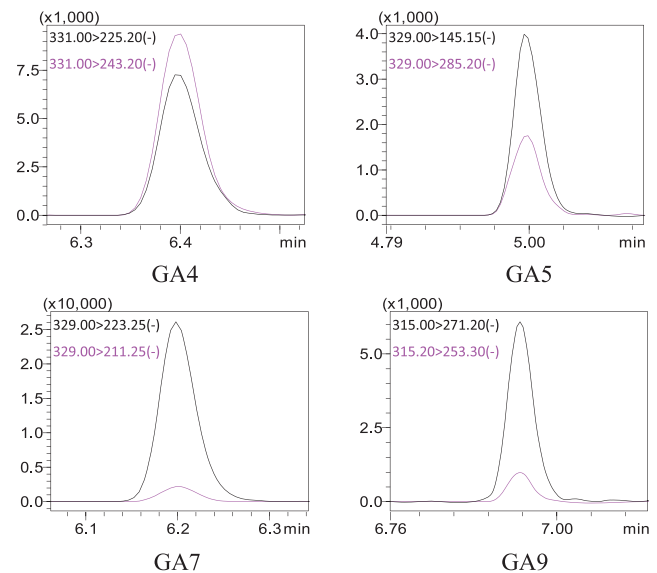
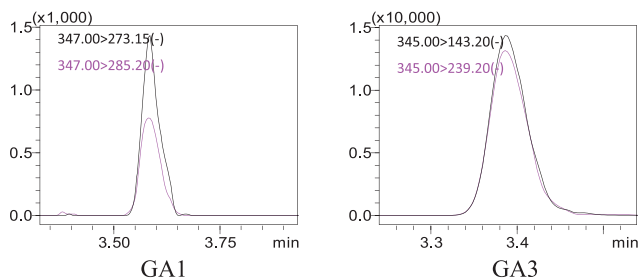
1.4 样品制备

1.4.1 称取样品 5.0 g (精确到 0.001 g)，置于 50 mL 具螺旋盖聚丙烯离心管中，加入 15 mL 80% 乙腈溶液，漩涡振荡 1 min，加入 1 g NaCl 后振荡混匀 3 min，5000 r/min 以上离心 5 min，取 10 mL 上层乙腈液于 45°C 吹氮浓缩至近干，用甲醇定容至 10 mL，混匀。

1.4.2 净化依次以 3 mL 甲醇，3 mL 水和 3 mL 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 分别预淋洗 Bond Elut Certify II 柱床；将 5 mL 提取液过柱，流速控制在约 1 d/s。用 2 mL 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液淋洗柱床；抽真空 5 min 以上，用 2 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液至 15 mL 具刻度的试管中；45°C 吹氮浓缩至近干，用甲醇定容至 1.0 mL。溶液过 0.22 mm 滤膜，滤液供 LC-MS/MS 分析测定用。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图



2.2 50 μg/L 标准样品的总离子流色谱图

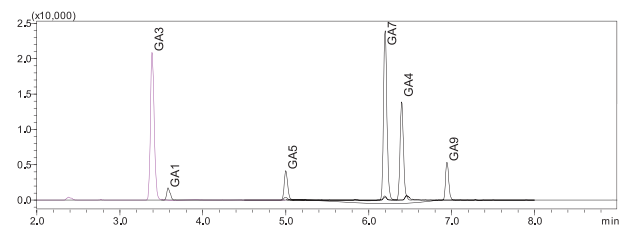


图1 50 μg/L 标准样品的总离子流色谱图

表 3 各组分的保留时间表

组分名	GA1	GA3	GA4	GA5	GA7	GA9
保留时间 (min)	3.60	3.39	6.43	5.02	6.22	6.97

2.3 标准样品的线性关系

将浓度为 5, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线如下图所示, 线性方程及相关系数见表 4。

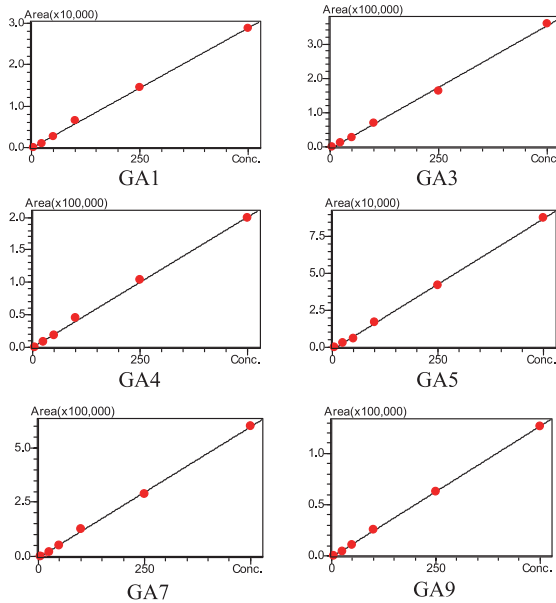


表4 6种化合物的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数 r
1	GA1	$Y = (2890.21)X + (-120.567)$	0.9993
2	GA3	$Y = (1796.71)X + (-1005.02)$	0.9991
3	GA4	$Y = (20104.2)X + (-144.793)$	0.9993
4	GA5	$Y = (8892.73)X + (-1603.98)$	0.9996
5	GA7	$Y = (60330.4)X + (-4099.67)$	0.9994
6	GA9	$Y = (12785.0)X + (-1280.44)$	0.9997

2.4 重复性实验

对 50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作液连续测定 6 次, 考察仪器的重复性, 保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示: 20 $\mu\text{g/L}$ 标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.009%~0.025% 和 0.49%~4.97% 之间, 该方法重复性良好。

表5 50 $\mu\text{g/L}$ 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	名称	R.T(min)	RSD% R.T	RSD% Area
1	GA1	3.60	0.166	9.07
2	GA3	3.39	0.105	3.54
3	GA4	6.43	0.042	6.50
4	GA5	5.02	0.070	1.60
5	GA7	6.22	0.057	1.36
6	GA9	6.97	0.038	2.81

2.5 灵敏度实验

配制浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 空白加标样 7 份, 经前处理后进样分析, 对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S, 此时 t 分布值为 3.143, 检出限 $MDL = S \times 3.143$ 。参照标准 HJ168, 以 4 倍方法检出限确定为本方法目标物的定量限。测定结果如表 6 所示。

表6 6种赤霉素物质的检出限和定量限

名称	平行样 ($\mu\text{g/L}$)							平均值 ($\mu\text{g/L}$)	标准 偏差(S)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
	1	2	3	4	5	6	7				
GA1	4.96	5.38	5.97	4.87	5.28	6.01	6.29	5.54	0.55	1.74	6.97
GA3	4.99	5.24	5.18	5.57	5.43	5.21	5.47	5.30	0.20	0.63	2.52
GA4	5.32	5.87	5.43	5.56	5.46	5.74	5.97	5.62	0.24	0.76	3.06
GA5	5.78	5.63	5.37	5.96	5.12	5.87	6.32	5.72	0.39	1.24	4.96
GA7	5.21	5.32	5.26	5.49	5.36	5.25	5.64	5.36	0.15	0.48	1.93
GA9	4.85	5.21	5.67	5.75	5.36	5.28	5.75	5.41	0.33	1.05	4.21

2.6 回收率实验

选取空白苹果, 分别加入不同浓度的 6 种赤霉素标准工作液, 使最终含量分别为 5 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 250 $\mu\text{g/L}$, 回收率具体数据见表 7

2.7 实际样品分析结果

按本方法测定市面上购置苹果, 得到的图谱如图 2 所示, 在样品中检出 GA3、GA4、GA7 三种赤霉素。

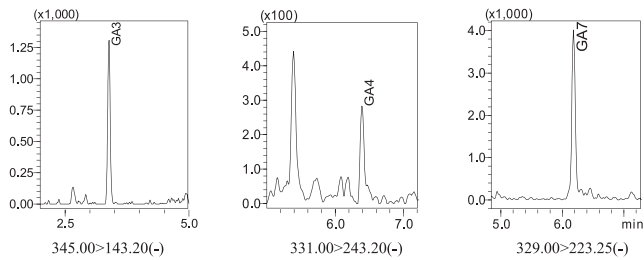


图2 实际样品的总离子流色谱图

结论

建立了使用超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用快速检测 6 种赤霉素的方法。该方法分析速度快，重复性良好；校准曲线在 5 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 范围内的相关系数均在 0.999 以上并对苹果样品进行了检测，该方法适合相关生长激素检测。

表7 不同浓度样品回收率

加样量 ($\mu\text{g/L}$)	化合物	计算结果 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
5	GA1	3.53	70.6	71.5
		3.62	72.4	
	GA3	3.61	72.2	
		3.63	72.6	
	GA4	3.75	75.0	
		3.12	62.4	
	GA5	3.61	72.2	
		3.58	71.6	
	GA7	3.82	76.4	
3.87		77.4		
GA9	3.72	74.4		
	3.78	75.6		
50	GA1	40.3	80.6	82.8
		42.5	85.0	
	GA3	41.9	83.8	
		42.6	85.2	
	GA4	39.2	78.4	
		40.1	80.2	
	GA5	43.6	87.2	
		42.5	85.0	
	GA7	45.1	90.2	
42.8		85.6		
GA9	43.7	87.4		
	43.1	86.2		
250	GA1	198	79.2	82.0
		212	84.8	
	GA3	207	82.8	
		225	90.0	
	GA4	218	87.2	
		233	93.2	
	GA5	206	82.4	
		215	86.0	
	GA7	221	88.4	
257		102.8		
GA9	225	90.0		
	219	87.6		