

三重四极杆质谱法快速痕量测定豆芽中的无根豆芽素

LCMSMS-165

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用快速准确测定豆芽中无根豆芽素的分析方法。样品经适当样品前处理后，用超高效液相色谱分离，三重四极杆质谱仪进行定性定量分析。无根豆芽素在 0.5~50 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数为 0.9999，仪器检出限为 0.01 ng/mL，定量限为 0.04 ng/mL。实际样品加标不同浓度所得回收率范围为 100.1%~112.2%，精密度 RSD % 范围为 3.22%~6.53%。

关键词：豆芽无根豆芽素超高效液相色谱仪三重四极杆质谱

6-苄基腺嘌呤是一种人工合成的植物生长调节剂，它主要用于促进细胞分裂、促进果实生长、促进细胞增大、促进种子发芽等，是常说的“无根豆芽素”的最主要成分，在国际上被广泛应用于农业园艺，包括葡萄、苹果、水稻、西瓜等作物都广泛应用到。但在我国，6-苄基腺嘌呤在豆芽生产上的应用，却经历了从“允许”到“禁止”的转变过程。目前，在国家已登记的农药目录中，找不到一款明确规定可在豆芽培育中使用的农药，这就意味着目前培育豆芽不能使用任何农药；而在 6-苄基腺嘌呤严禁作为食品添加剂使用后，则意味着加工豆芽不能使用任何食品添加剂。国家质量监督检验检疫总局早在 2011 年就发布了《关于食品添加剂对羟基苯甲酸丙酯等 33 种产品监管工作的公告》。公告中明确指出，包括 6-苄基腺嘌呤等 33 种产品，禁止作为食品

添加剂出厂销售，食品生产企业禁止使用。添加含有 6-苄基腺嘌呤的添加剂后，豆芽不仅产量会大为提高，生产周期也会大幅缩短，而且生产出来的豆芽更具卖相。人们如果长期食用添加了 6-苄基腺嘌呤的食品，对生理机能和内分泌系统都会造成损害，并面临致癌、致畸形等危险。

目前，检测 6-苄基腺嘌呤现有的标准只有 GB/T23381-2009 农产品安全质量标准《食品中 6-苄基腺嘌呤的测定高效液相色谱法》，由于植物基质复杂，含量甚微，因此，寻找选择性好并且灵敏度高的分析方法非常迫切。本文建立岛津超高效液相色谱与三重四极杆串联质谱联用法痕量快速测定豆芽中的无根豆芽素，该方法具有简便、快速、灵敏度高等特点。

实验部分

1.1 仪器和试剂

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。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 SP3 色谱工作站；

高速冷冻离心机（湘仪）；超声波振荡器（泰亚赛福）；匀质器（德国 IKA）；超纯水仪（密理博）；旋转蒸发仪（EYELA）；

甲醇（色谱纯，上海安谱公司），甲酸（质谱级，美国 Fisher 公司），6-苄基腺嘌呤（标准品，百灵威科技）；实验室用水均为超纯水，由 Milli-Q 纯水仪制得；豆芽购买自菜市场。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm×75 mm L, 1.6 μm

流动相：A-水（含 0.1% 甲酸），B-甲醇

洗脱方式：梯度洗脱（见表 1）

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40℃

质谱条件	脱溶剂管温度：200℃
分析仪器：LCMS-8040	加热模块温度：450℃
离子源：ESI，正离子扫描	扫描模式：多反应监测（MRM）
离子源接口电压：4.5 kV	驻留时间：100 ms
雾化气：氮气 2.0 L/min	延迟时间：3 ms
干燥气：氮气 18.0 L/min	MRM 参数：见表 2
碰撞气：氩气	

表1 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	20%
2.00	Pumps	Pump B Conc.	60%
3.00	Pumps	Pump B Conc.	60%
3.10	Pumps	Pump B Conc.	20%
6.00	Controller	Stop	

表2 MRM 优化参数

化合物 名称	英文 名称	CAS 号	前体 离子	产物 离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
6-苄基腺嘌呤	Benzyladenine	1214-39-7	226.10	91.10*	-16.0-	-25.0	-17.0
			226.10	65.05	-16.0-	-53.0	-24.0

*表示定量离子

1.3 标准溶液配制

标准储备液：精密称取 6-苄基腺嘌呤对照品 0.01 g 置于 10 mL 容量瓶中，加入甲醇溶解并定容至刻度即得标准储备液 1.0 mg/mL，于 -18℃ 下保存。

标准中间液：取 100 μL 6-苄基腺嘌呤标准储备液于 10 mL 容量瓶中用水稀释配制成浓度为 10 μg/mL 的中间储备液。

标准工作液：用水稀释上述标准中间液，配成 5 个不同浓度的系列标准工作液，浓度分别为 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 ng/mL，采用外标法进行定量。

1.4 样品前处理方法

称取 2.0 g 事先粉碎好的豆芽样品（精确到 0.01 g），加入 10 mL 含体积分数为 0.1 % 乙酸的乙腈溶液，涡旋 30s，混匀，超声 15 min，加入 2 g 无水硫酸镁，再加入 0.5 g 无水乙酸钠，涡旋混匀，以 10000 r/min 离心 5 min，移出上清液，60℃ 旋转蒸发至近干，加入 2.0 mL 甲醇水溶液（3:7，v/v）溶解，用 0.45 μm 滤膜于进样小瓶中，待 LC-MS/MS 测定。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子质谱扫描图

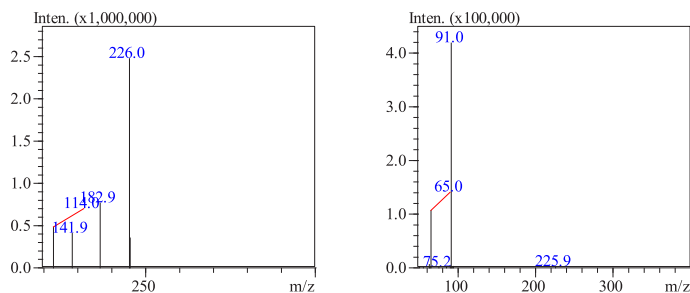


图1 6- 苄基腺嘌呤的一级质谱图（左图）和产物离子质谱扫描图（CE 值为 -45V）(右图)

2.2 标准品的 MRM 色谱图

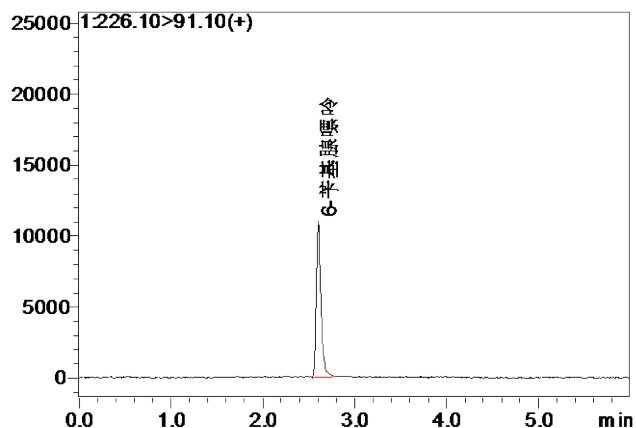


图2 6- 苄基腺嘌呤 0.5 ng/mL 的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将标准系列工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以标准溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标建立外标定量法，如图 3 所示，6- 苄基腺嘌呤在 0.5~50 ng/mL 浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9999，准确度在 86.1%~106.3% 之间（见表 3）。由 LabSolutions 软件算出信噪比，按照 3 倍信噪比和 10 倍信噪比分别作为仪器检出限和定量限结果，计算所得结果为 6- 苄基腺嘌呤仪器检出限为 0.01 ng/mL，定量限为 0.04 ng/mL。

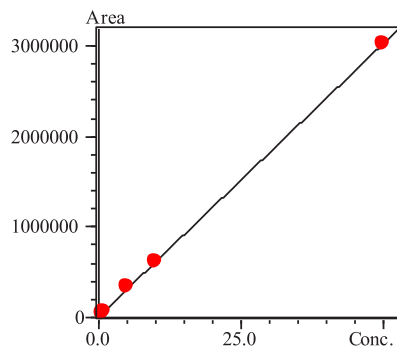


图3 6-苄基腺嘌呤的标准工作曲线

表3 6-苄基腺嘌呤的标准曲线信息

化合物名称	校准曲线	准确度范围	相关系数(R)
6-苄基腺嘌呤	$Y = (60137.8)X + (13441.3)$	86.1%~106.3%	0.9999

2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样（浓度见表4），平行测定6次，6-苄基腺嘌呤的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在0.09%~0.13%和1.01%~2.59%之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表4 仪器精密度结果RSD%(n=6)

化合物名称	0.5 ng/mL		5.0 ng/mL		50 ng/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
6-苄基腺嘌呤	0.12	2.59	0.13	2.15	0.09	1.01

2.5 基质加标实验

图4为市售豆芽按照1.4中样品制备方法所得MRM检测色谱图，由图4可知该市售豆芽检出含有无根豆芽素6-苄基腺嘌呤含量为3.2 μg/kg。豆芽基质加标0.50 μg/kg的6-苄基腺嘌呤MRM色谱图如图5所示。豆芽基质加标不同浓度标样，所得回收率范围为100.1%~112.2%，精密度RSD%范围为3.22%~6.53%（见表5）。

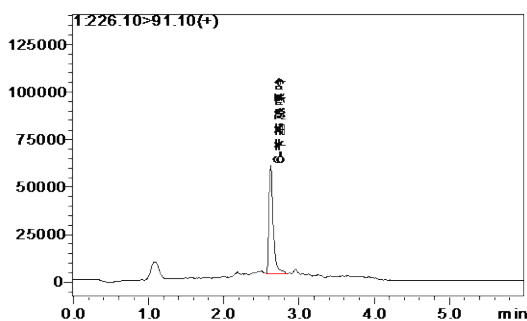


图4 市售豆芽MRM检测色谱图

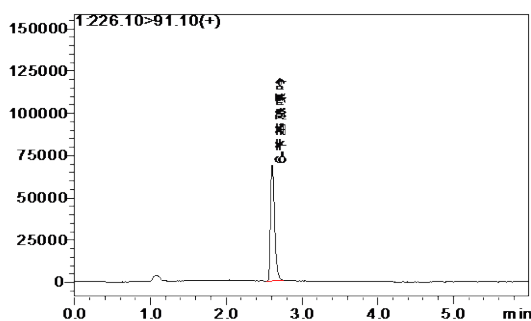


图5 豆芽加标0.5μg/kgMRM检测色谱图

表5 豆芽加标6-苄基腺嘌呤所得回收率结果(n=3)

化合物名称	检出浓度 (μg/kg)	加标浓度 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD%
6-苄基腺嘌呤	3.2	0.5	112.2	6.53
		5.0	100.1	3.22

结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8040联用快速痕量测定豆芽中无根豆芽素的分析方法。6-苄基腺嘌呤在0.5~50 ng/mL浓度范围内线性良好，相关系数为0.9999，仪器检出限为0.01 ng/mL，定量限为0.04 ng/mL。实际样品加标所得回收率范围为100.1%~112.2%，精密度RSD%范围为3.22%~6.53%。实验结果表明使用岛津超高效液相色谱LC-30A和三重四极杆质谱LCMS-8040联用仪建立无根豆芽素分析方法具有简便、快速、灵敏度高的特点，可以满足市场热点检测需求。