

三重四极杆质谱结合 QuEChERS 样品前处理方法快速测定果蔬中矮壮素、氯吡啶和多效唑的残留

LCMSMS-168

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera X2 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用快速测定果蔬中三种外源性植物生长调节剂的分析方法。果蔬样品经 QuEChERS 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。三种外源性植物生长调节剂在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内线性良好，基质匹配标准溶液曲线相关系数大于 0.9987，方法检出限范围为 0.007~0.01 μg/kg，定量限范围为 0.03~0.04 μg/kg。实际样品加标所得回收率范围为 71.4%~103.2%，精密度 RSD % 范围为 1.8%~7.2%。

关键词：果蔬植物生长调节剂超高效液相色谱仪三重四极杆质谱

植物生长调节剂是用于调节植物生长发育的一类农药，包括人工合成的化合物和从生物中提取的天然植物激素。在我国，调节剂被广泛用于果蔬生产中，如多效唑在桃生产中、氯吡啶在猕猴桃、西瓜和黄瓜生产中、矮壮素在番茄生产中均已普遍使用。调节剂的适时适量使用对提高果蔬产量与品质都有明显作用，但由于各类调节剂的性质各异，毒理机制和残留安全期尚不明确，其潜在的安全隐患也不容忽视。随着消费水平的提高，人们对调节剂在果蔬中的残留的关注也愈来愈密切，尤其在“西瓜膨大剂”、“香蕉催熟事件”等发生后，人们对生长调节剂的认识造成误会，给生长调节剂的发展蒙上巨大的阴影。在我国，植物生长调节剂虽归入到农药的范畴中，但是它是一类能够调节植物生长发育的农药，不以杀伤有害生物为目的，所以其毒性一般为低毒或微毒。蔬菜中生长调节剂的残留量是指其毒性及有效成分存在于蔬菜体内的量。人类食用后可以通过新陈代谢将其降解，正常使用情况下合理地使用生长调节剂，

将它在蔬菜中的残留量控制在一定范围内，是不会对人体造成危害的。但是不合理的过量生长调节剂被人体吸收后，会在人体内不断地积累，往往会引起消费者患有支端肥大、骨质疏松、恶性肿瘤等疾病，而且易促使儿童提前发育、过早成熟等症状的出现。

为适应加入 WTO 后日趋激烈的竞争，打破发达国家和地区针对我国果蔬中调节剂限量标准的贸易技术壁垒，调节剂残留对蔬菜质量安全的污染已经引起各国的高度重视，其残留限量标准将在保护人类身体健康和生命安全的正当目标下，与农产品贸易国的利益紧密地结合在一起。除正确使用各种调节剂外，加强对果蔬中各种调节剂检测方法的研究，并尽快制定出我国果蔬中相关调节剂的限量标准也是必不可少的。本文采用简单快速 QuEChERS 样品前处理方法，通过 UHPLC-MS /MS 快速检测，建立了 3 种生长调节剂在果蔬中的残留分析方法。

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 Nexera X2 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A_{SR} 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-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60 SP2 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）；旋转蒸发器（EYELA）；氮吹仪（泰亚赛福）；

PSA 及 C18 吸附剂（美国 Varian，40 μm）；无水硫酸镁、无水醋酸钠（优级纯，上海国药集团）；乙腈（色谱纯，上海安谱公司），乙酸铵（色谱纯，上海安谱公司），甲酸（色谱级，上海安谱公司），矮壮素、氯吡啶和多效唑（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；所有果蔬样品均购买自超市。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: Nexera X2 LC-30A 系统

色谱柱: Shim-pack XR-ODS II, 2.0 mm×100 mm L,
2.2 μm

流动相: A-2 mM 乙酸铵 (含 0.1 % 甲酸), B- 乙腈,
A/B=55/45 (v/v)

洗脱方式: 等度洗脱

流速: 0.4 mL/min

进样体积: 10 μL

柱温: 40°C

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 8.0 L/min

加热气: 氮气 12.0 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 200°C

加热模块温度: 350°C

接口温度: 300°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 100 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 1

表 1 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)
矮壮素	Chlormequat	999-81-5	121.75	58.15*	-30.0	-35.0	-30.0
			121.75	63.00	-30.0	-23.0	-26.0
氯吡啶	Forchlorfenuron	68157-60-8	247.75	129.00*	-30.0	-17.0	-13.0
			247.75	93.05	-30.0	-35.0	-17.0
多效唑	Paclobutrazol	76738-62-0	294.05	70.00*	-30.0	-23.0	-29.0
			294.05	125.10	-30.0	-37.0	-23.0

*表示定量离子

1.3 标准溶液配制

标准储备液: 精密称取矮壮素、氯吡啶和多效唑对照品各 10 mg 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°C 下保存。

标准中间液: 取 100 μL 上述三种标准储备液于 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①。取浓度为 10 μg/mL 中间储备液①体积 100 μL 于 10 mL 容量瓶中用水稀释配制成浓度为 100 ng/mL 的中间储备液②。

基质匹配标准工作液: 移取 6 份各 1 mL 空白样品提取液于 1.5 mL 进样小瓶中, 以弱氮气流吹干, 分别加入不同体积的 100 ng/mL 的中间储备液②于进样瓶中, 用乙腈和 0.1% 甲酸水 (体积比 1:1) 稀释至 1 mL, 配制成 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL 相应的基质匹配标准溶液。

1.4 样品前处理方法

称取 10.0 g 均质试样于 50 mL 具塞离心管中, 加入 20.0 mL 含体积分数 1 % 乙酸的乙腈溶液、4.0 g 无水 MgSO₄、1.0 g 无水醋酸钠, 高速均质 1 min, 以 8000 r/min 离心 5 min, 取上层清液 10 mL 于预先加有 150 mg PSA 及 850 mg 无水 MgSO₄ 的离心管中, 再加入 100 mg C18 固相萃取吸附剂, 涡旋 30 s, 以 8000 r/min 离心 5 min, 上层清液经 0.22 μm 微孔膜过滤, 取 5.0 mL 滤液至具塞离心管中, 弱 N₂ 气流吹干, 加入 2.5 mL 乙腈和 2.5 mL 0.1 % 甲酸水溶液溶解供 LC-MS/MS 分析。

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

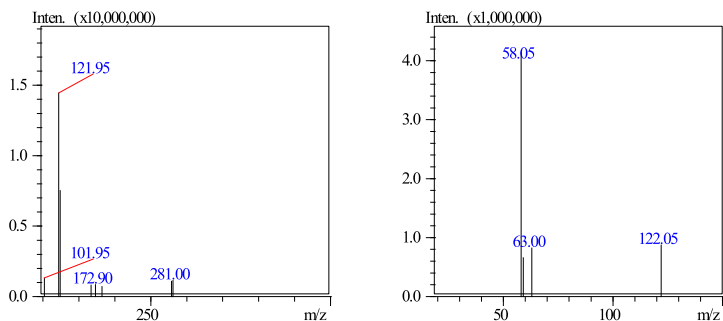


图1 矮壮素的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE 值为 -29 V) (右图)

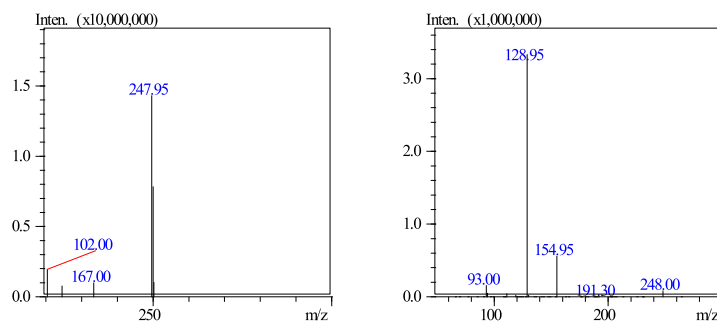


图2 氯吡脞的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE 值为 -20 V) (右图)

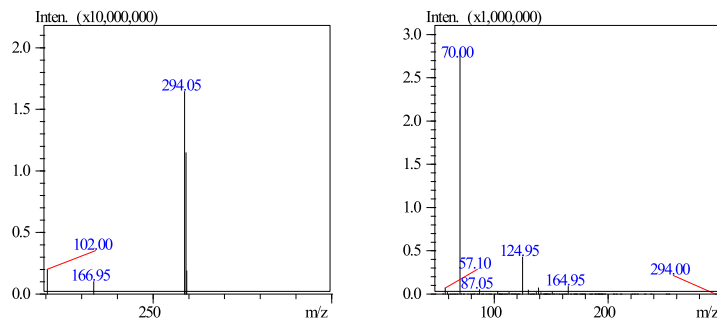


图3 多效唑的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE 值为 -30 V) (右图)

2.2 标准品的 MRM 色谱图

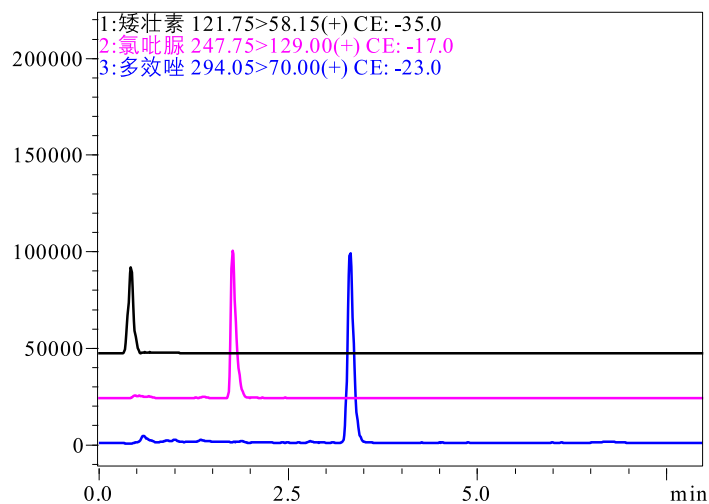


图4 三种植物生长调节剂基质匹配0.5 ng/mL的MRM色谱图

2.3 线性关系

将基质匹配标准系列工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以基质匹配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 5 所示，三种植物生长调节剂在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内，线性相关性良好，相关系数范围为 0.9987~0.9998，准确度范围在 80.1%~116.7% 之间（见表 2）。

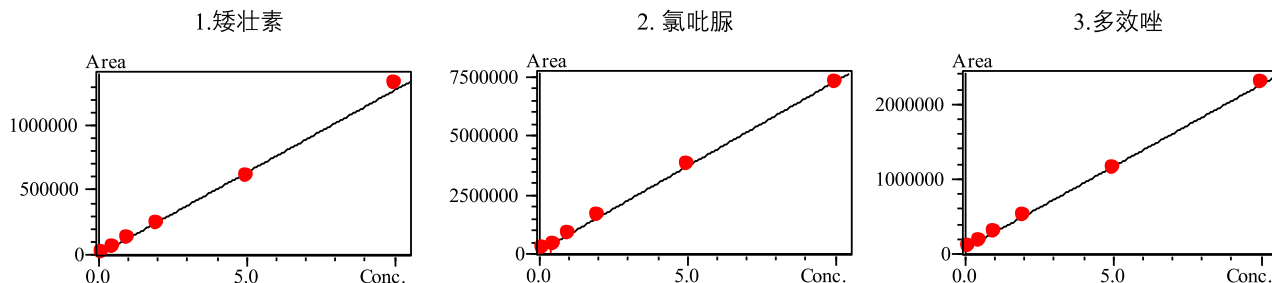


图 5 三种植物生长调节剂的标准工作曲线

表 2 三种植物生长调节剂的基质匹配标准曲线信息

化合物名称	校准曲线	准确度范围	相关系数 (R)
矮壮素	$Y = (126864)X + (254.142)$	94.1~112.6%	0.9987
氯吡脞	$Y = (718636)X + (118552)$	80.1~116.7%	0.9992
多效唑	$Y = (219099)X + (70894.7)$	93.3~104.8%	0.9998

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 3），平行测定 6 次，三种植物生长调节剂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 0.02%~0.30% 和 0.54%~4.38% 之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表 3 仪器精密度结果 RSD% (n=6)

化合物名称	0.1 ng/mL		2.0 ng/mL		10.0 ng/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
矮壮素	0.30	1.34	0.04	1.35	0.02	0.63
氯吡脞	0.04	2.11	0.04	0.93	0.02	0.95
多效唑	0.06	4.38	0.07	1.79	0.04	0.54

2.5 基质加标实验

图 6 为空白样品按照 1.4 中样品制备方法所得 MRM 检测色谱图。由图 6 可知并未有明显的基质干扰峰，空白基质加标 1.0 μg/kg 的三种植物生长调节剂 MRM 色谱图如图 7 所示。样品加标不同浓度标样，所得回收率范围为 71.4%~103.2%，精密度 RSD% 范围为 1.8%~7.2%（见表 4）。按照三倍信噪比和十倍信噪比分别作为检出限和定量限，计算方法检出限范围为 0.007~0.01 μg/kg，定量限范围为 0.03~0.04 μg/kg。

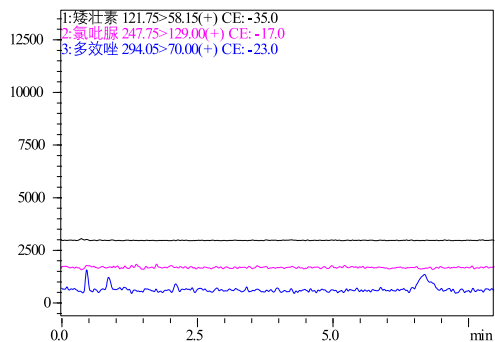


图 6 空白样品 MRM 检测色谱图

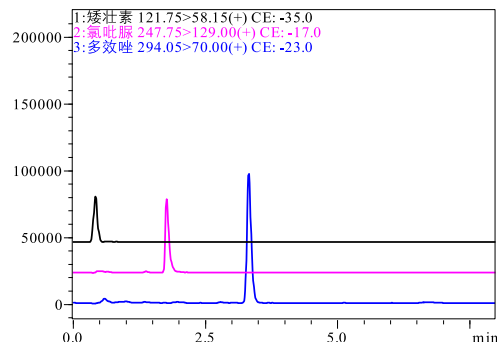


图 7 样品加标 1.0 μg/kg MRM 检测色谱图

表4 三种植物生长调节剂所得回收率结果 (n=3)

化合物名称	加标浓度 (µg/kg)	回收率 (%)	RSD%
矮壮素	1.0	71.4	6.5
	10.0	102.6	3.4
氯吡脞	1.0	91.6	2.7
	10.0	103.2	6.3
多效唑	1.0	87.6	7.2
	10.0	98.5	1.8

2.6 实际样品检测

将所建立的 UHPLC-MS/MS 结合 QuEChERS 样品前处理方法应用到实际果蔬样品的检测，检测结果所得 MRM 谱图如图 8 所示，测定结果见表 5 所示。

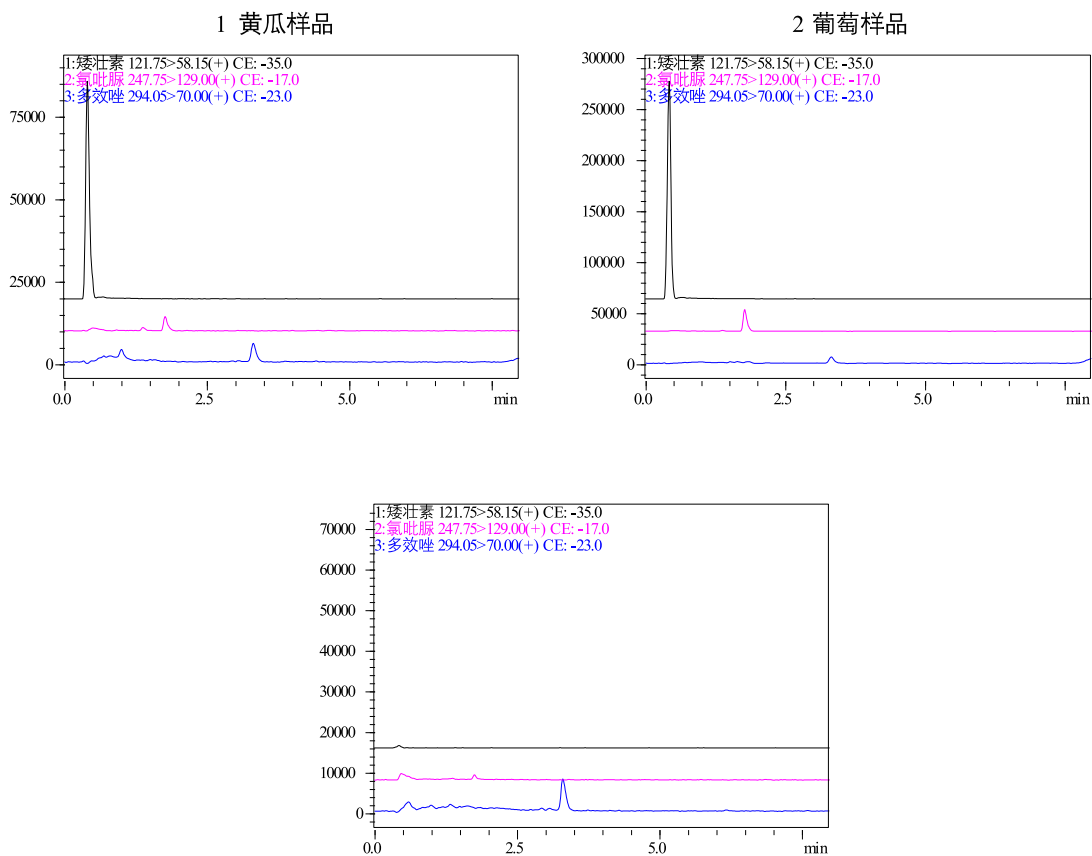


图8 实际样品检测 MRM 谱图

表5 实际果蔬样品检测结果

化合物名称	样品名称 (μg/kg)			方法检出限	方法定量限
	黄瓜	葡萄	番茄	μg/kg)	μg/kg
矮壮素	4.2	13.0	N.D	0.007	0.03
氯吡脞	0.04	0.10	N.Q	0.008	0.03
多效唑	0.08	0.06	0.10	0.01	0.04

N.D: Not Detected.

N.Q: Not Quantified.

结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera X2 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用结合 QuEChERS 样品前处理, 快速痕量测定果蔬样品中的三种植物生长调节剂的分析方法。三种植物生长调节剂在 0.1~10 ng/mL 浓度范围内线性良好, 基质匹配标准溶液相关系数均在 0.9987 以上, 方法检出限范围为 0.007~0.01 μg/kg, 定量限范围为 0.03~0.04 μg/kg。实际样品加标所得回收率范围为 71.4%~103.2%, 精密度 RSD % 范围为 1.8%~7.2%。实验结果表明使用岛津超高效液相色谱 Nexera X2 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8050 联用仪建立植物生长调节剂的分析方法具有简便、快速、灵敏度高的特点, 可以满足日常检测需求。