

◆ 残留与环境 ◆

QuPpe-超高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄中 28-表高芸苔素内酯残留量

杜功名¹, 查欣欣¹, 吴甜甜¹, 陈刘阳¹, 王洪雷^{2*}

(1. 江苏恒生检测有限公司, 南京 210046 2. 江苏省农药研究所股份有限公司, 南京 210046)

摘要:本研究探究了利用超高效液相色谱-串联质谱检测葡萄中28-表高芸苔素内酯残留的方法。葡萄样品采用QuPpe分析方法处理后,经超高效液相色谱柱分离,采用电喷雾负离子模式,通过多反应监测方式测定,基质匹配标准曲线外标法定量。结果表明,本方法线性相关系数 >0.999 ;28-表高芸苔素内酯在添加水平为0.02~0.50 mg/kg条件下的回收率为78%~90%,相对标准偏差为4.4%~7.3%,其在葡萄样品上的定量限为0.02 mg/kg。本方法线性关系好,操作简单、准确、高效,适用于葡萄样品中28-表高芸苔素内酯农药残留的快速筛查和定量检测。

关键词:葡萄;28-表高芸苔素内酯;QuPpe法;超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号:TQ 450.7 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2021.06.010

Simultaneous Determination of Residue of 28-Homobrassinolide in Grapes by QuPpe-UPLC-MS/MS

DU Gongming¹, ZHA Xinxin¹, WU Tiantian¹, CHEN Liuyang¹, WANG Honglei^{2*}

(1. Jianshu Evertest Limited Company, Nanjing 210046, China; 2. Jiangsu Pesticide Research Institute Co., Ltd., Nanjing 210046, China)

Abstract: A method for the simultaneous identification of 28-homobrassinolide in grapes was developed using quick polar pesticides (QuPpe) extraction procedure combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The analytes were separated by a UPLC column, detected in the negative ion mode (ESI) using multiple reaction monitoring (MRM), and quantified by an external standard method. The result indicated that the correlation coefficient of this method was greater than 0.999. 28-homobrassinolide's recovery range was 78%-90% when the adding level was 0.02-0.50 mg/kg. The relative standard deviation range was 4.4%-7.3%. The limit of quantitation of 28-homobrassinolide in grapes was 0.02 mg/kg. Results suggested that the method was suitable for rapid screening and quantitative analysis of 28-homobrassinolide in grapes with convenient, high precision and efficient, good linear relationship.

Key words: grape; 28-homobrassinolide; QuPpe method; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

芸苔素内酯(Brassinolide)是一种高活性内源植物生长调节剂,最早从油菜素甾醇类化合物(Brassinosteroids)中分离得到,属于内酯型甾体化合物^[1],其生物活性强,广泛用于蔬菜、水果等作物生产,具有促进生根、生长、受精,提苗壮苗,保花保

果,促进果实膨大、早熟,增强作物抗逆性等多重功能^[2-5]。由于其在天然植物内含量极低且提取工艺复杂,无法满足实际生产需求,因此人工合成芸苔素内酯成为趋势。

随着芸苔素内酯等植物生长调节剂类农药用

收稿日期:2021-08-04

作者简介:杜功名(1992—),男,安徽淮南人,本科,助理工程师,主要从事农产品残留样品分析检测研究。E-mail:1165404506@qq.com

共同第一作者:查欣欣(1990—),女,安徽合肥人,硕士,中级工程师,主要从事环境有机污染化学研究。E-mail:752478599@qq.com

通信作者:王洪雷(1963—),男,辽宁丹东人,本科,正高级工程师,主要从事分析化学、制剂加工研究。E-mail:wanghonglei@lucaschem.com

量增多及使用范围日益扩大,其安全性越来越受到关注。相关文献报道指出,不同种类植物生长调节剂均具有生殖毒性^[6],部分还能够增加肿瘤风险^[7]和影响心肌功能^[8]等。当前,测定芸苔素内酯的方法多为薄层色谱^[9]、气相色谱法^[10]、高效液相色谱紫外检测^[11-14]、液相色谱-质谱联用法^[15]等,这些方法有些灵敏度不够,有些方法繁琐,而且均未涉及葡萄中28-表高芸苔素内酯的测定方法。本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄中28-表高芸苔素内酯残留量的方法,该方法简便高效,灵敏度高,适合葡萄中28-表高芸苔素内酯残留量的检测,为葡萄中28-表高芸苔素内酯的残留检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:巨峰葡萄,于收获期采收,由江苏恒生检测有限公司提供。

供试试剂:28-表高芸苔素内酯标准品(纯度99.7%),上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与试剂

ACQUITY UPLC-Quattro ultima,美国沃特世科技公司;Shim-pack XR-ODS C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 2.0 μm),岛津(上海)实验器材有限公司;SQP天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;AL204天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;VORTEX MS3涡旋仪,莱普特科学仪器(北京)有限公司;H/T 16MM离心机,湖南赫西仪器设备有限公司;AM600瓶口分液器,蚂蚁源科学仪器有限公司;KQ-600B超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;SHA-CA水浴恒温振荡器,上海江星仪器有限公司;ULTRAPURE(TYPE1)WATER纯水仪,西安优普仪器设备有限公司。甲酸(分析纯)、丙酮(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯),美国天地试剂公司;石墨化炭黑(GCB),江苏南京化学试验有限公司;N-丙基乙二胺(SPA)、十八烷基硅烷(C₁₈),上海安诺实验科技有限公司。

1.3 试验样品前处理

准确称取10.0 g葡萄样品于50 mL离心管瓶中,加入15.0 mL甲醇,振荡30 min,以5 000 r/min的转速离心5 min,取上清液于25 mL容量瓶,用甲醇定容。取1.0 mL定容液至装有40 mg C₁₈和40 mg PSA的1.5 mL离心管中,涡旋20 s后以10 000 r/min转速离心5 min,过0.22 μm滤膜,转移至进样瓶,待液相色谱-串联质谱仪检测。

1.4 色谱和质谱检测条件

液相色谱条件:流速为0.2 mL/min;流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为甲醇;柱箱温度为30℃,进样量为1 μL。恒流:0~3 min 90% B。

质谱条件:电离源模式为ESI,电离源极性为负;脱溶剂气体及流量为N₂,600 L/h;碰撞气及流量为Ar,0.25 mL/min;离子源温度为110℃;脱溶剂气温度为400℃;毛细管电压为3.5 kV。

28-表高芸苔素内酯的保留时间、母离子、子离子、锥孔电压和碰撞能量等参数见表1。

表1 28-表高芸苔素内酯质谱参数

保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V
1.09	493.45	142.73	35	25
1.09	493.45	349.07	35	25

1.5 标准溶液配制

准确称取0.010 6 g 28-表高芸苔素内酯标准品,用丙酮进行溶解并定容至10 mL,配制成质量浓度为1 057 mg/L的母液,用甲醇进行稀释成浓度为10 mg/L的标准工作溶液,再用甲醇提取的葡萄基质液进行稀释并配制成浓度分别为2、0.2、0.05、0.02、0.005 mg/L的系列标准溶液。

1.6 添加回收率试验

称取葡萄空白样品10.0 g置于50 mL离心管中,添加浓度分别为0.02、0.05、0.5 mg/kg,添加后进行振荡充分混匀,静置30 min,将静置后的样品按照1.3的提取与净化步骤和1.4的仪器条件进行分析检测,计算添加回收率和相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 UPLC-MS/MS条件的选择

分别测试28-表高芸苔素内酯在ESI源正离子、ESI源负离子扫描方式下的信号强度,其中ESI源负离子溶剂效应和基质干扰较小。通过对锥孔电压和碰撞能量等参数进行优化,选择493.45/142.73作为定量离子对,493.45/149.07作为定性离子对进行检测。28-表高芸苔素内酯色谱图见图1。



图1 28-表高芸苔素内酯色谱图

选择甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相,采用相同液相条

件对28-表高芸苔素内酯进行检测。结果表明,甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相时,28-表高芸苔素内酯响应较高并且峰形更好。

2.2 提取条件的选择

选择甲醇、乙腈为提取剂,采用相同条件进行提。结果表明,甲醇做提取剂时,28-表高芸苔素内酯响应和回收率较高并且峰形更好。

2.3 净化剂的选择

葡萄样品基质中含有色素及糖类杂质,基质较为复杂,因此净化剂的选择对后续的样品检测及整个实验结果尤为重要。实验对比了GCB+PSA、GCB+C₁₈和PSA+C₁₈3种净化剂组合的净化效果。结果显示,GCB+PSA、GCB+C₁₈为净化剂进行处理后得到的样品添加回收率相对较低,PSA+C₁₈的净化后得到的样品添加回收率相对较好,且通过控制PSA和C₁₈的质量,发现40 mg PSA+40 mg C₁₈起到较好的净化效果,达到要求。

2.4 方法的线性关系

分别将配制的0.005、0.02、0.05、0.2、2 mg/L系列标准溶液按照浓度从低到高的顺序进行检测,每个浓度重复3次。以其溶液浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标,制作标准曲线。结果表明,在0.005~2 mg/L范围内,28-表高芸苔素内酯线性关系良好,得到28-表高芸苔素内酯的线性回归方程为 $y=56\ 003.2x+123.496$,相关系数(R^2)为0.999 287,大于0.999。

2.5 回收率及相对标准偏差

在葡萄基质中进行0.02、0.05及0.50 mg/kg 3个水平的添加回收率实验,每个处理重复5次。28-表高芸苔素内酯在葡萄中的添加回收率试验结果见表2。结果表明,28-表高芸苔素内酯在葡萄中的平均回收率为78%~90%,相对标准偏差为4.4%~7.3%,符合农药残留检测的要求。

表2 28-表高芸苔素内酯在葡萄中的平均回收率及相对标准偏差

添加水平/(mg·kg ⁻¹)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
0.02	90	7.3
0.05	80	5.8
0.50	78	4.4

2.6 方法定量限

以 $S/N \geq 10$ 倍的信噪比对应的浓度为方法的方法定量限,添加回收试验得出28-表高芸苔素内酯在葡萄上的定量限为0.02 mg/kg。

2.7 空白基质效应评价

取溶剂空白、基质空白(葡萄)分别经前处理后

在液相色谱-串联质谱上进样分析,溶剂空白、基质空白(葡萄)在目标峰位置的干扰峰响应均满足不超过30%定量限峰响应的要求。

3 结论

本研究建立了一种超高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄中28-表高芸苔素内酯残留量的分析方法。葡萄样品经甲醇提取,PSA和C₁₈净化,UPLC-MS/MS测定。28-表高芸苔素内酯在葡萄中的平均回收率为78%~90%,相对标准偏差为4.4%~7.3%。本方法操作简单方便、高效准确,适用于葡萄中28-表高芸苔素内酯的残留检测。

参考文献

- [1] GROVE M D, SPENCER G F, ROHWEDDER W K, et al. A unique plant growth promoting steroid from *Brassica napus* pollen[J]. Nature, 1979, 281: 216-217.
- [2] 李玉利, 杨忠兴, 仇璇, 等. CPPU、TDZ对上海夏黑葡萄果实生长与品质的影响[J]. 中国南方果树, 2015, 44(4): 88-90.
- [3] 陈秀, 方朝阳. 植物生长调节剂芸苔素内酯在农业上的应用现状及前景[J]. 世界农药, 2015, 37(2): 34-36; 42.
- [4] 朱永兴. 茶树生长调节剂的研究与应用[J]. 中国茶叶, 1998, 20(2): 12-13.
- [5] 陆剑飞. 四种植物生长调节剂对茶叶产量与品质的影响[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(3): 192-194.
- [6] LEE K J, JOHNSON V, BLAKLEY B. The effect of exposure to a commercial 2,4-D formulation during gestation on the immune response in CD-1 mice[J]. Toxicology, 2001, 165(1): 39-49.
- [7] ERIN N, AFACAN B, ERSOY Y. Gibberellic acid, a plant growth regulator, increases mast cell recruitment and alters substance P levels[J]. Toxicology, 2008, 254(1-2): 75-81.
- [8] TULUCE Y, CELIK I. Effects of indole-3-acetic acid and kinetin on the adenosine deaminase activity in various tissues of rats[J]. Asian Journal of Chemistry, 2006, 18(1): 528-532.
- [9] YOKOTA T, WATANABE S, OGINO Y, et al. Radioimmunoassay for brassinosteroids and its use for comparative analysis of brassinosteroids in stems and seeds of *Phaseolus vulgaris*[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 1990, 9(1-4): 151-159.
- [10] 龚丽文, 陈旭文. 丙酰芸苔素内酯的气相色谱分析[J]. 云南化工, 2003, 30(6): 39-41.
- [11] 陈树兵, 石利利, 单正军, 等. 芸苔素内酯的水解及其在土壤中的降解特性[J]. 农村生态环境, 2005, 21(1): 55-57.
- [12] 朱洁. HPLC法测定芸苔素内酯含量[J]. 广西化工, 2000(增刊1): 44-45.
- [13] 蔡春燕. 芸苔素内酯含量及部分中间体的高效液相色谱法的测定[J]. 广东化工, 2004(2): 29-31.
- [14] TAYLOR P E, SPUCK K, SASSE P M, et al. Detection of brassinosteroids in pollen of *Lolium perenne* L. by immunocytochemistry[J]. Planta, 1993, 189: 91-100.
- [15] SWACZYNOVA J, NOVAK O, HAUSEROVA E, et al. New techniques for the estimation of naturally occurring brassinosteroids[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2007, 26(1): 1-14.

(责任编辑: 金兰)