

超高效液相色谱串联三重四极杆质谱测定野生烟草中的六种植物激素

LCMSMS-166

摘要：本文建立了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 联用测定野生烟草中的 IAA (吲哚乙酸)、IPA (吲哚丙酸)、IBA (吲哚丁酸)、茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 六种植物激素的方法。样品经提取、液液萃取和反萃取后，液相色谱三重四极杆质谱仪进行定量分析。六种植物激素在 1~100 ng/mL 浓度范围内线性良好；对 1, 10 和 50 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，六种植物激素的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.14 % 和 0.43~3.93 % 之间，仪器精密度良好。

关键词：植物激素野生烟草超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪

吲哚乙酸 (heteroauxin; IAA)，吲哚丙酸 (3-Indolepropionic acid; IPA)，吲哚丁酸 (3-indolebutyric acid; IBA) 均是植物体内普遍存在的内源生长素，属吲哚类化合物。对生长的促进作用主要是促进细胞的生长，特别是细胞的伸长，对细胞分裂没有影响，诱导形成不定根，增加座果，防止落果，改变雌、雄花比率等。可经由叶片、树枝的嫩表皮、种子进入到植物体内，随营养流输导到起作用的部位。较低浓度促进生长，较高浓度抑制生长。

茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 均属于植物生长调节剂，具有促进细胞生长或细胞分化等特点。因为生长素在植物体内存在量很少，且不易保存。为了调控植物生长，通过化学合成，人们发现了生

长素类似物，它们具有和生长素类似的效果且可以进行量产，在植物组织培养中很是常用。茉莉酸，水杨酸除了可调节植物生长发育，还作为内生信号参与植物对病原体的抵御，当植物的一部分受到病原体感染时在其他部分产生抗性。植物生长调节剂能显著提高烟叶的产量，但是人工合成的生长素对人体和动物都有不同程度的伤害，具有致畸性和形成肿瘤潜在危险。

本文建立了 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用同时测定野生烟草中吲哚乙酸 (IAA)、吲哚丙酸 (IPA)、吲哚丁酸 (IBA)、茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 的方法，具有操作简单、快速、可靠、准确等特点，供相关测试人员参考。

实验部分

1.1 仪器配置

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

流动相：A-5 mmol/L 甲酸铵 -0.05 % 甲酸水；

B- 甲醇

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：50°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20 %，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time	Module	Action	Value
6.50	Pumps	Pump B Conc.	95
8.00	Pumps	Pump B Conc.	95
8.10	Pumps	Pump B Conc.	20
10.00	Controller	Stop	

质谱条件	脱溶剂管温度: 300°C
分析仪器: LCMS-8040	加热模块温度: 500°C
离子源: ESI, 正负离子模式	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
离子源接口电压: -3.5 kV	驻留时间: 20 ms
雾化气: 氮气 3.0 L/min	延迟时间: 3 ms
干燥气: 氮气 15 L/min	MRM 参数: 见表 2
碰撞气: 氩气	

表2 MRM 参数

英文名称	化合物名称	CAS No.	离子化方式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
heteroauxin	吲哚乙酸	87-51-4	ESI (+)	176.10	130.15*	-20.0	-15.0	-24.0
					77.10	-20.0	-43.0	-30.0
3-Indolepropionic acid	吲哚丙酸	830-96-6	ESI (+)	190.05	130.10*	-20.0	-15.0	-24.0
					77.10	-20.0	-48.0	-14.0
3-indolebutyric acid	吲哚丁酸	133-32-4	ESI (+)	204.10	186.10*	-22.0	-12.0	-19.0
					130.10	-22.0	-26.0	-23.0
jasmonic acid	茉莉酸	3572-66-5	ESI (-)	209.25	59.15*	10.0	11.0	21.0
					162.45	10.0	20.0	29.0
salicylic acid	水杨酸	69-72-7	ESI (-)	137.10	93.15*	14.0	16.0	17.0
					65.15	14.0	30.0	26.0
abscisic acid	脱落酸	14375-45-2	ESI (-)	263.15	153.20*	13.0	11.0	30.0
					219.25	13.0	13.0	22.0

*表示定量离子

1.3 样品前处理方法

称量: 称取约 200 毫克冷冻研磨野生烟草在微量离心管中, 并将其存储在 -70°C 备用。

提取过程: 取出野生烟草叶, 放置至 4°C, 转移至快速核酸提取仪中, 加入 900 mg 快速核酸提取试剂, 1 mL 乙酸乙酯萃取溶剂, 均质振动 45 S。在 4°C 下, 以 13000 rpm 离心 20 min。取上清液, 在 30°C 下, 减压蒸发浓缩至干。干燥样品以 0.5 mL 70% 甲醇水溶液复溶, 并以 13000 rpm 离心 20 min。上清液采用 0.22 μm 有机滤膜过滤, 上机测试。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子图, 以及标准品的 MRM 色谱图

对六种植物激素进行 Q3SCAN 扫描以及产物离子扫描。得到植物激素的一级质谱图以及产物离子扫描质谱图, 如图 1~ 图 6 所示。5 ng/mL 三种植物激素标准品的 MRM 色谱图如图 7 所示。

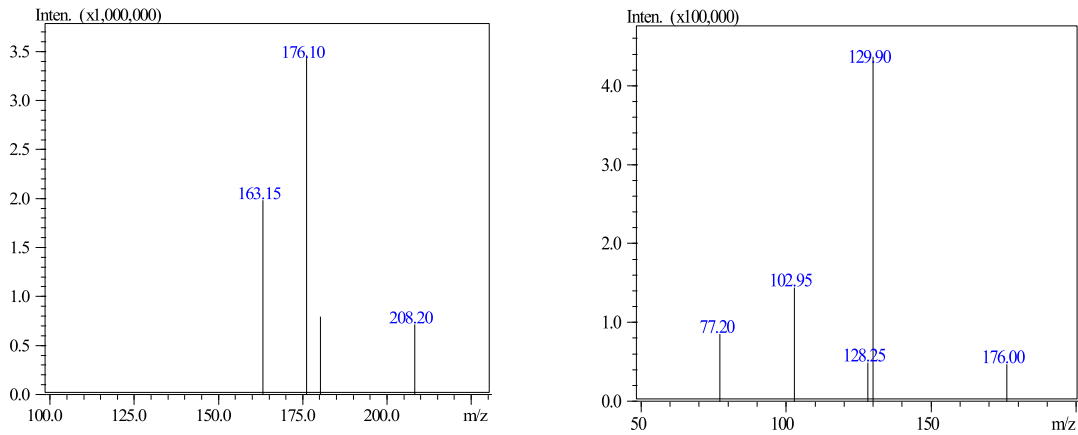


图 1 吲哚乙酸 (IAA) 一级质谱图 (左) 和产物离子扫描质谱图 (右) (-33 V)

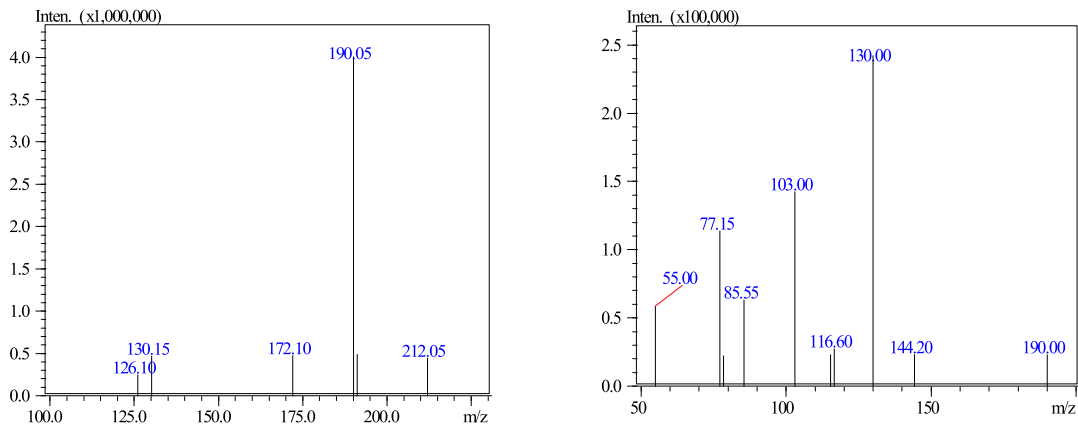


图 2 吲哚丙酸 (IPA) 一级质谱图 (左) 和产物离子扫描质谱图 (右) (-40 V)

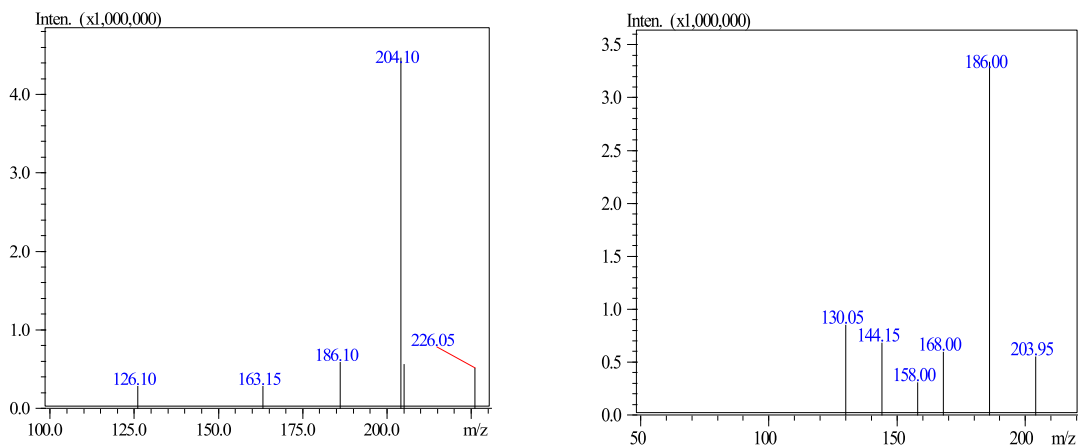


图 3 吲哚乙酸 (IBA) 一级质谱图 (左) 和产物离子扫描质谱图 (右) (-18 V)

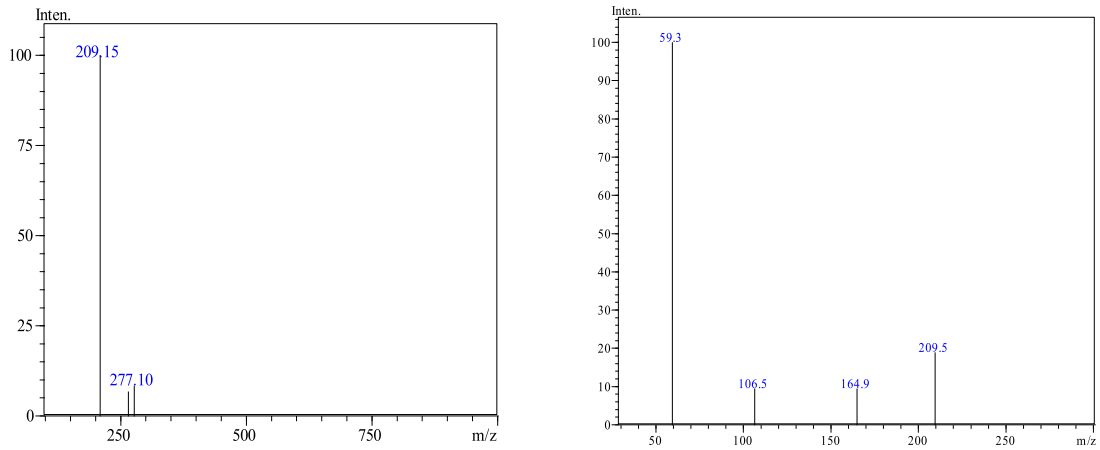


图4 茉莉酸 (JA) 一级质谱图 (左) 和产物离子扫描质谱图 (右) (25 V)

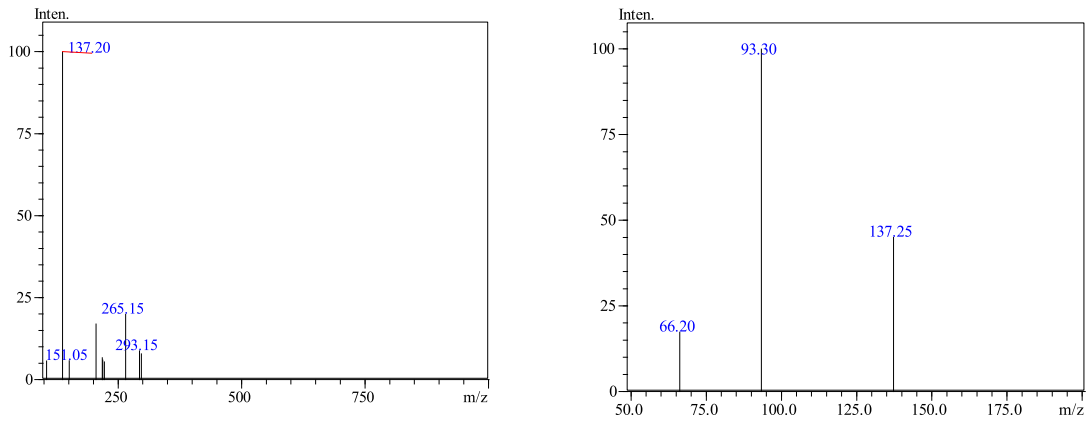


图5 水杨酸 (SA) 一级质谱图 (左) 和产物离子扫描质谱图 (右) (22 V)

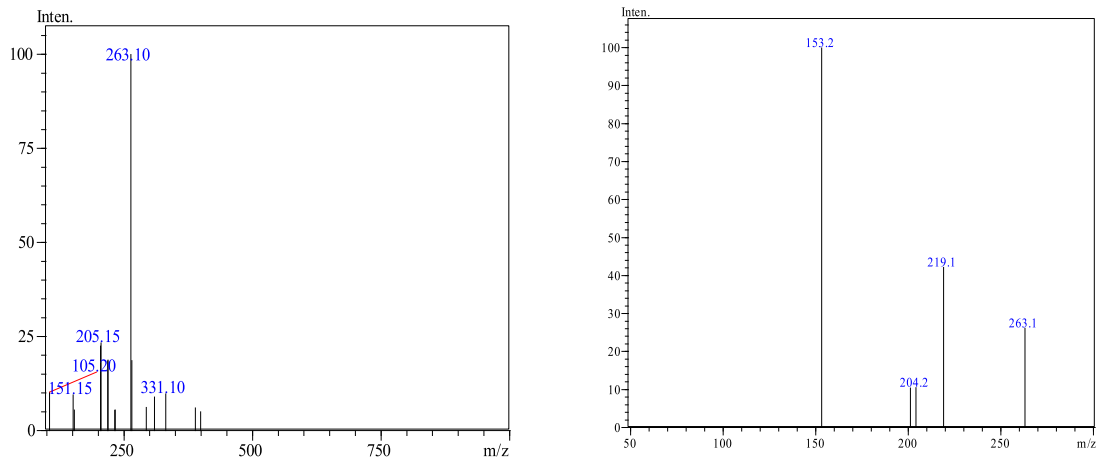


图6 脱落酸 (ABA) 一级质谱图 (左) 和产物离子扫描质谱图 (右) (12 V)

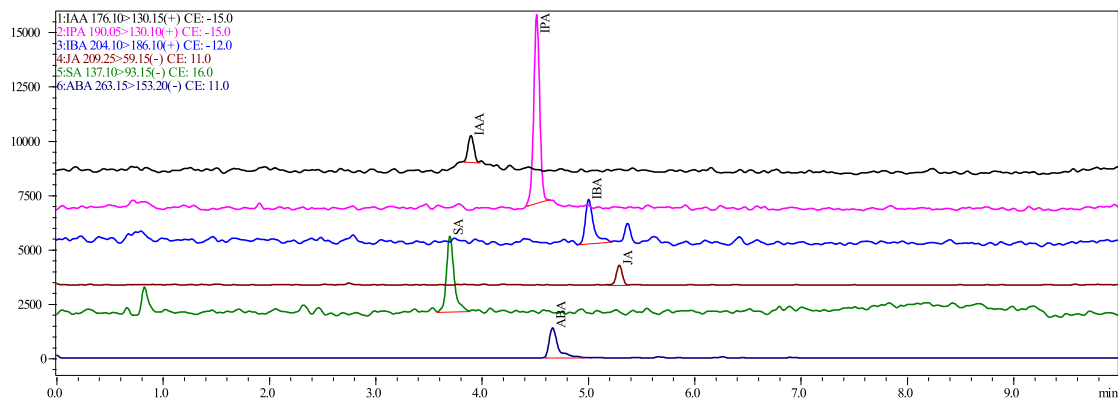


图7 1 ng/mL 六种植物激素标准品 MRM 色谱图

2.2 线性关系

以流动相 A 为溶剂，配制 1, 10, 25, 50 和 100 ng/mL 五个浓度的六种植物激素标准液，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标制作标准曲线。具体见图 8~13。六种植物激素在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

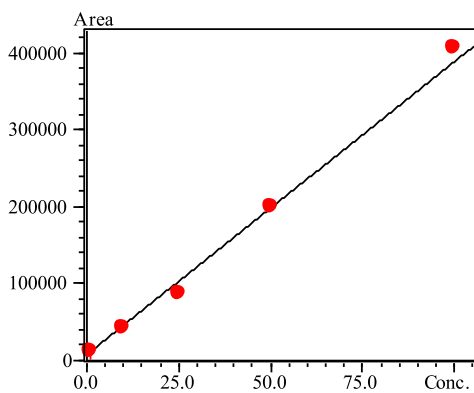


图8 IAA 的标准工作曲线

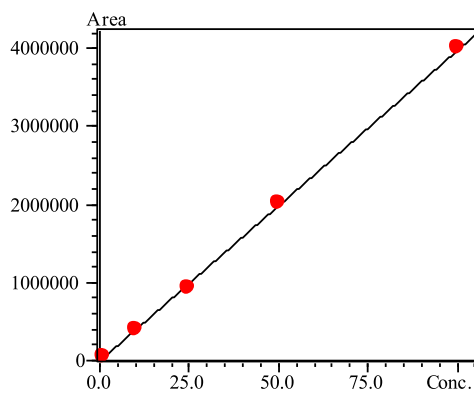


图9 IPA 的标准工作曲线

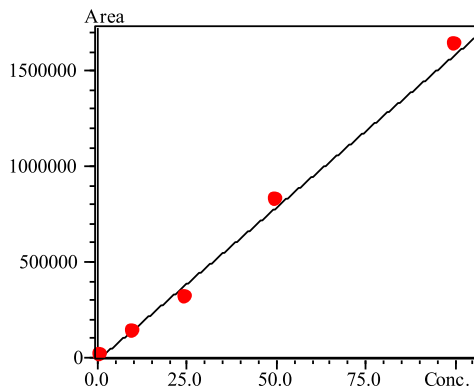


图10 IBA 的标准工作曲线

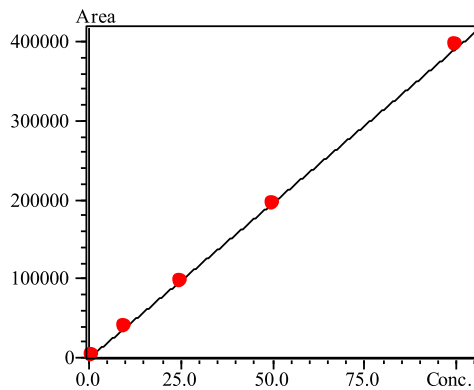


图11 JA 的标准工作曲线

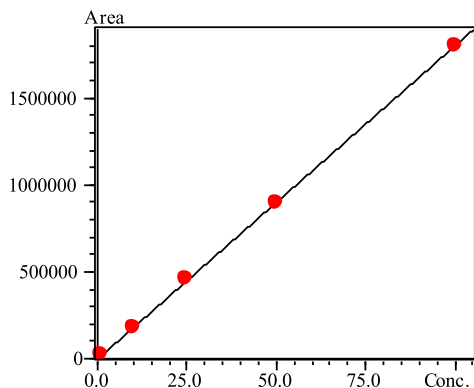


图12 SA 的标准工作曲线

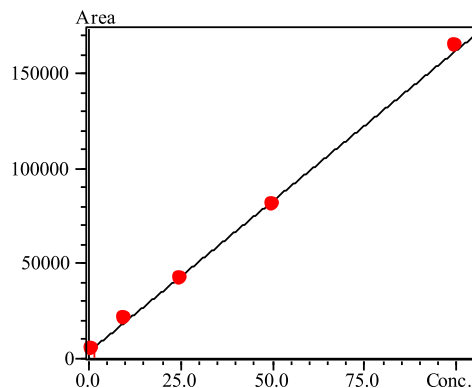


图13 ABA 的标准工作曲线

表3 6种植物激素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	IAA	$Y=(4035.5)X$	0.9979	0.321	0.972
2	IPA	$Y=(39606.6)X$	0.9996	0.079	0.240
3	IBA	$Y=(15629.7)X$	0.9984	0.182	0.553
4	JA	$Y=(3910.47)X$	0.9999	0.083	0.253
5	SA	$Y=(17960.5)X$	0.9999	0.238	0.721
6	ABA	$Y=(1683.68)X$	0.9995	0.133	0.404

2.3 精密度实验

对 1, 10, 50 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样, 六种植物激素的保留时间和峰面积的相对标准偏差如表 4 所示, 分别在 0.03~0.08 % 和 0.39~3.73 % 之间, 仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (1 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
IAA	0.07	3.38	0.07	2.19	0.03	1.23
IPA	0.06	2.11	0.07	1.41	0.03	0.39
IBA	0.05	2.47	0.06	1.52	0.03	1.07
JA	0.04	3.73	0.06	1.60	0.03	0.71
SA	0.08	1.94	0.07	1.62	0.02	0.49
ABA	0.08	1.73	0.08	2.70	0.03	1.04

2.4 烟草样品分析

分析由中国科学院昆明植物研究所提供的野生烟草样品, 测试得到野生烟草色谱图见图 14。具体检测结果见表 5。

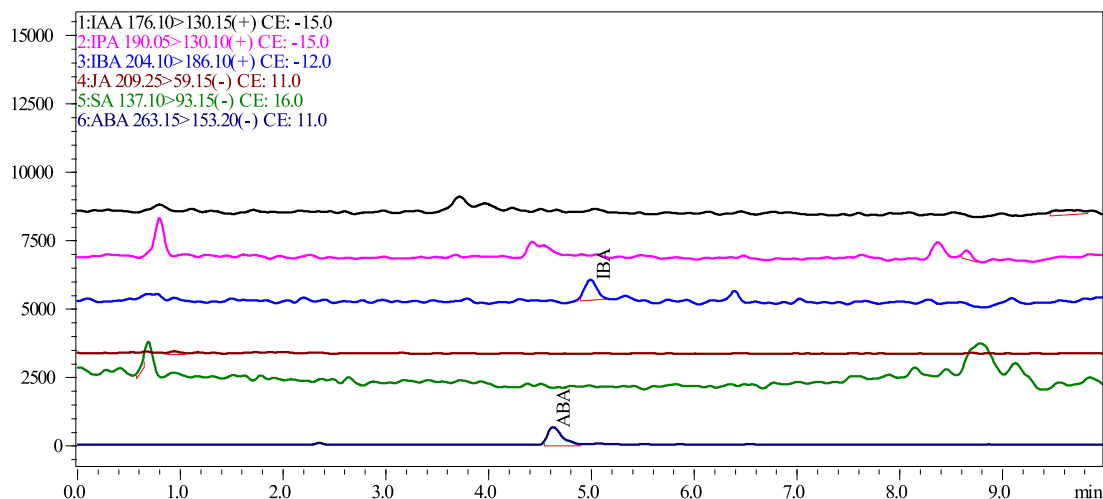


图14 野生烟草样品色谱图

表5 野生烟草样品检测结果

Compound	R.T (min)	Area	Conc.(ng/mL)
IAA	未检出		
IPA	未检出		
IBA	5.008	5675	1.059
JA	未检出		
SA	未检出		
ABA	4.619	6139	1.583

结论

本文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 联用建立了一种测定野生烟草中的吲哚乙酸、吲哚丙酸、吲哚丁酸、茉莉酸、水杨酸和脱落酸六种植物激素的方法。6 种植物激素在 1~100 ng/mL 浓度范围内线性良好。标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.08 % 和 0.39~3.73 % 之间，仪器精密度良好。检测实际样品，得到该野生烟草样品中检出吲哚丁酸和脱落酸。综上所述，本方法可以快速完成野生烟草样品中的六种内源性植物激素的检测。