

三重四极杆质谱测定野生烟草中的三种植物激素

LCMSMS-110

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茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 3 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。3 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, 3 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: 茉莉酸 水杨酸 脱落酸 野生烟草 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

茉莉酸 (jasmonic acid; JA) 是存在于高等植物体内的内源生长调节物质, 有抑制植物生长、萌发、促进衰老、提高抗性等生理作用。水杨酸 (salicylic acid; SA) 是植物的次生代谢产物, 有生理调节作用, 如诱导开花及抗病性等。脱落酸 (abscisic acid; ABA) 别名: 天然脱落酸。一种抑制生长的植物激素, 因能促使叶子脱落而得名, 有阻遏赤霉素及细胞分裂素促进生长的作用, 与叶子的衰老、果实的脱落等有关。

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。虽然以上植物生长调节剂能显著提高烟叶的产量, 但是人工合成的 JA、SA 和 ABA 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	

脱溶剂管温度: 300°C

加热模块温度: 500°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 2

表2 MRM参数

编号	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)
1	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
2	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
3	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 $0.22\ \mu\text{m}$ 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，一级标准品的 MRM 色谱图

对茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 三种植物激素进行前体离子扫描以及产物离子扫描。得到三种植物激素的前体离子质谱图以及产物离子质谱图如图 1~ 图 3 所示。5 ng/mL 三种植物激素标准品的 MRM 色谱图如图 4 所示。茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 的保留时间分别为 5.108、3.571 和 4.495 min。

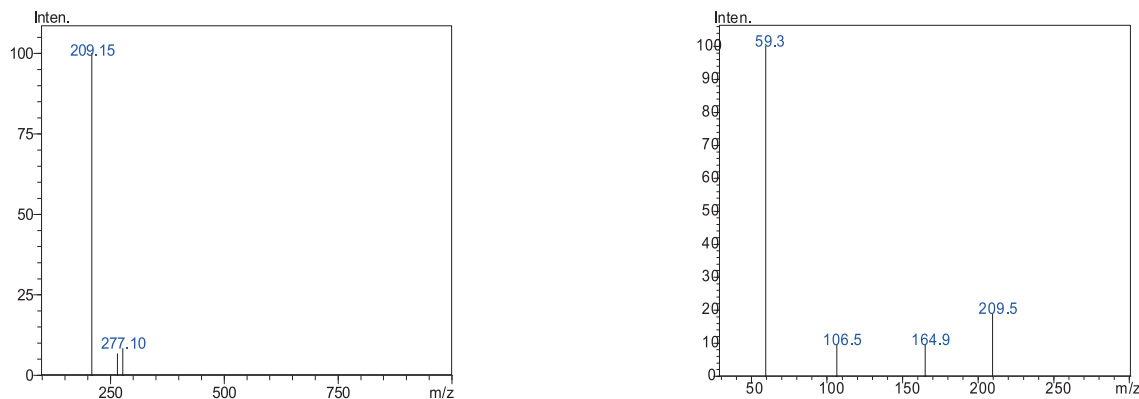


图1 茉莉酸 (JA) 前体离子 (左) 和产物离子质谱图 (右) (25 V)

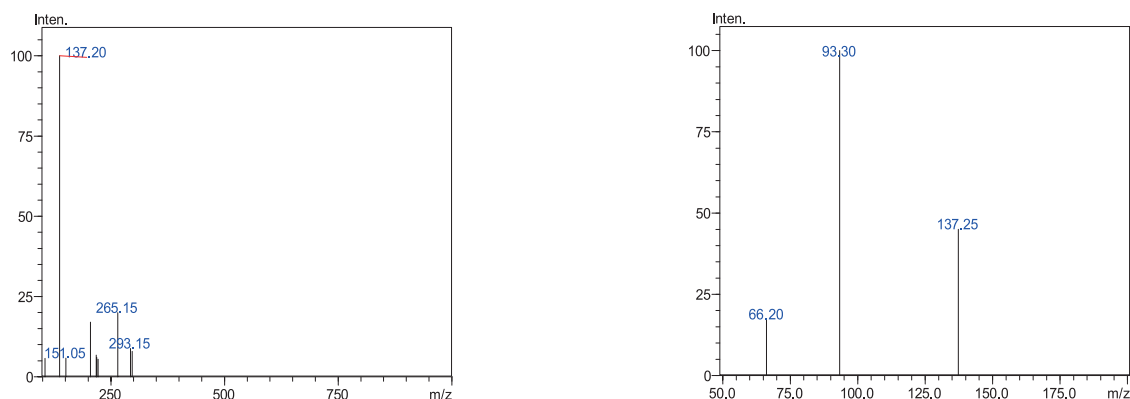


图2 水杨酸 (SA) 前体离子 (左) 和产物离子质谱图 (右) (22 V)

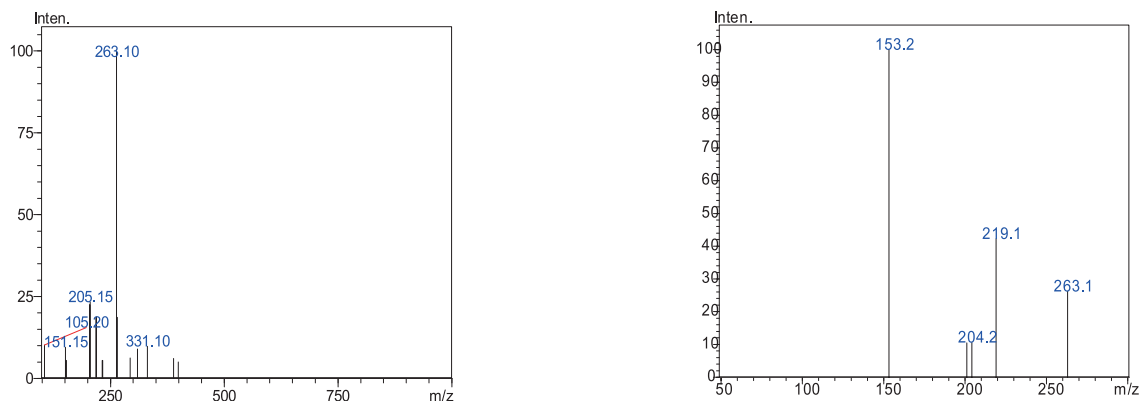


图3 脱落酸 (ABA) 前体离子 (左) 和产物离子质谱图 (右) (12 V)

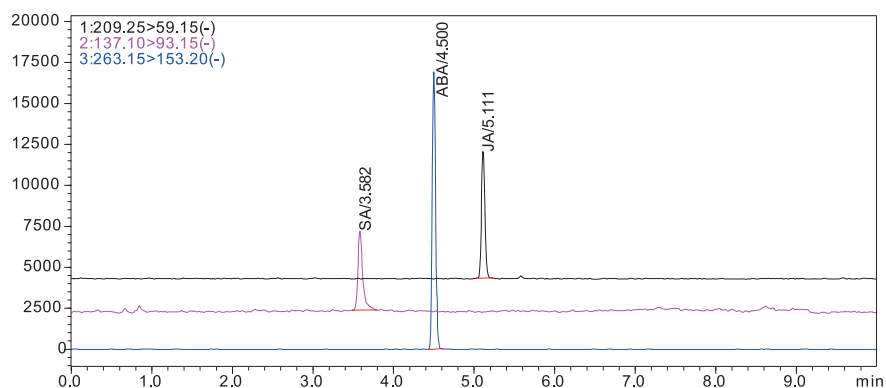


图4 1 ng/mL三种植物激素标准品MRM色谱图

2.2 线性关系

配制 1, 5, 10, 50 和 100 ng/mL 五个浓度的茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 三种植物激素标准液, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标制作标准曲线。具体见图 5~7。三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。

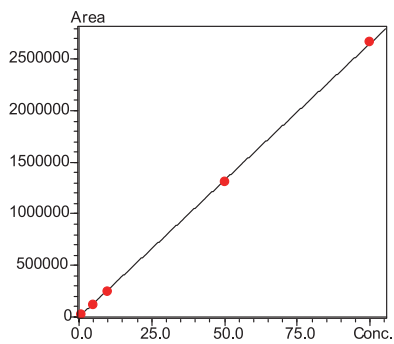


图5 JA的标准工作曲线

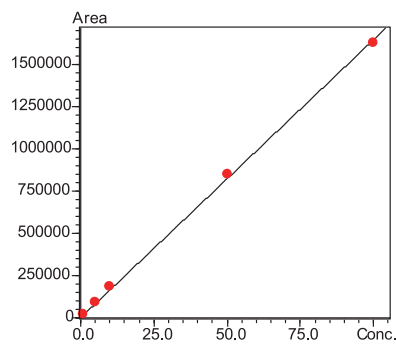


图6 SA的标准工作曲线

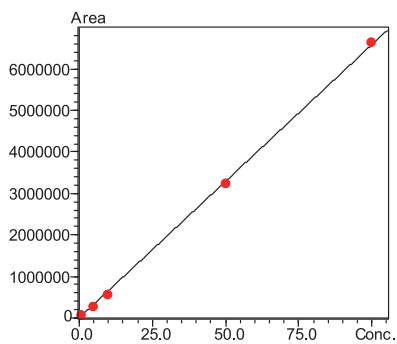


图7 ABA的标准工作曲线

表3 3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	JA	$Y=(26527.6)X$	0.9999	0.027	0.083
2	SA	$Y=(16455.8)X$	0.9998	0.096	0.291
3	ABA	$Y=(65886.2)X$	0.9998	0.001	0.004

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, 3 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。

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
JA	0.03	3.93	0.05	1.80	0.05	0.43
SA	0.06	2.32	0.06	0.78	0.14	1.27
ABA	0.03	1.83	0.04	1.62	0.03	1.38

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 8。具体检测结果见表 5。

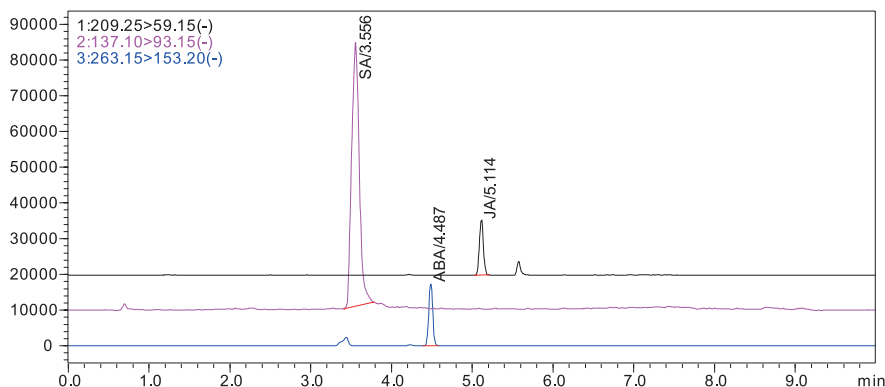


图5 野生烟草样品色谱图

表5 野生烟草样品检测结果

Compound	R.T(min)	Area	Conc.(ng/mL)
JA	5.114	53132	2.00
SA	3.556	487603	29.6
ABA	4.487	59443	0.902

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茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 三种植物激素的方法。3 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 0.03~0.14% 和 0.43~3.93% 之间, 仪器精密度良好。在野生烟草样品中可检出 JA, SA 和 ABA。