

自动前处理 – 超高效液相色谱 / 质谱在线分析系统用于植物提取液中植物激素的直接检测

LCMSMS-152

摘要： 本文建立了自动前处理 – 超高效液相色谱 / 质谱在线分析系统用于植物提取液中吲哚乙酸、吲哚丙酸和吲哚丁酸直接检测方法。对萃取条件和解吸条件进行优化，在最优条件下不同浓度的精密度实验得到的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03~0.05 % 和 1.05~2.76 % 之间；方法检出限和方法定量限分别介于 0.56~0.80 ng/g 和 1.85~2.64ng/g 之间。对富贵竹竹叶、羊蹄甲花瓣和花蕾三种植物提取液进行直接检测，三种空白植物样品中都检测到吲哚乙酸，在 2 ng/g 和 20 ng/g 两种不同加标浓度下得到回收率介于 61.00%~116.83 之间。本法无需前处理，全程自动化运行，可对植物提取液中的植物激素进行直接检测；对比离线方法，本在线方法节省时间，灵敏度高，重现性好。

关键词： 自动前处理基质效应在线分析三重四极杆质谱仪

植物激素在植物体内含量极低（通常在 ng/g，甚至 pg/g 水平上）、种类多、存在多种衍生物和代谢产物，各种植物激素之间化学结构和化学性质差异较大，且周围共存的基体成分非常复杂，几乎不可能同时分析所有植物激素。因此，如何精确可靠地对微量的植物内源激素进行定性定量分析，已成为目前植物激素作用机理研究

中的瓶颈问题之一。本文使用岛津自动前处理 – 超高效液相色谱 / 质谱在线分析系统（流路设计见图 1），实现了吲哚乙酸（indoleacetic acid, IAA）、吲哚丙酸（indolepropionic acid, IPA）和吲哚丁酸（indolebutyric acid, IBA）的在线分析。

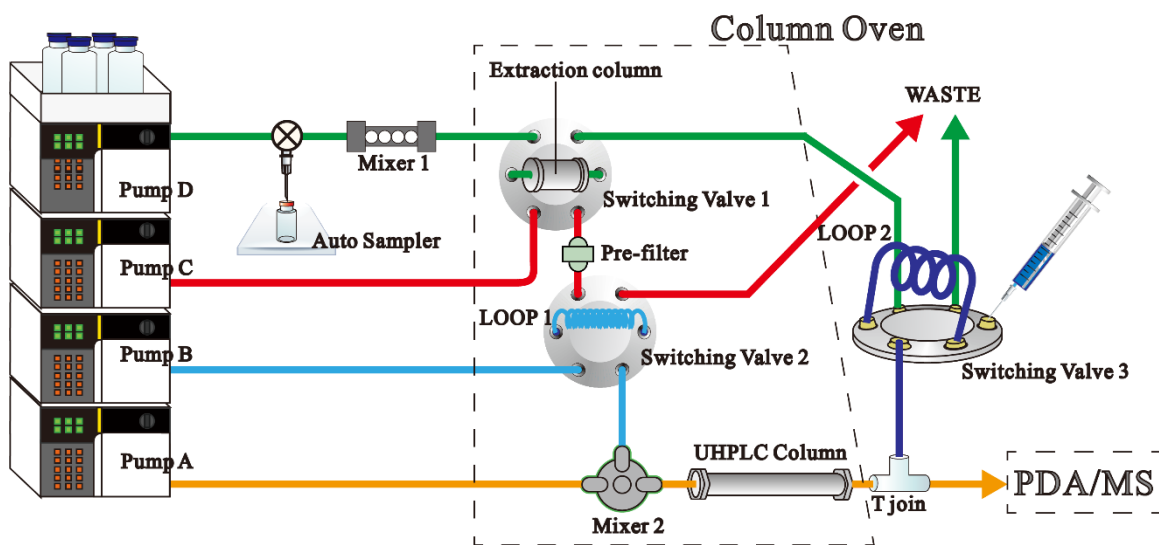


图 1 自动前处理-超高效液相色谱质谱在线分析系统的流路设计

实验部分

1.1 仪器配置

表1 仪器配置

硬件	配置
控制器	CBM-20A
泵 C&D	LC-20AD
泵 D 溶剂切换阀	FCV-11AL, 初始状态为 A: D1 (上样液), C1 (解吸液) 送液; B 状态为 D2 (平衡液), C1 送液
泵 A&B	LC-30AD
自动进样器	SIL-30AC; 50 μ L 定量环
柱温箱	CTO-20AC, 内置切换阀 1 和切换阀 2
切换阀 1	FCV-20AH ₂ , 初始状态 =1: 2-3 口、6-1-4-5 口分别联通
切换阀 2	FCV-32AH, 初始状态 =1: 2-3 口、6-1-4-5 口分别联通
脱气机	DGU-20A ₅ ×2
切换阀 3	无
混合器 1	LC2010 柱前混合器, SN 228-37112-91
混合器 2	LC-30A 混合器 MiRC 20 μ L
过滤器	0.5 μ m 虑孔, 零死体积在线过滤器 SN 290-46042-06
定量环 1	500 μ L 不锈钢定量环
定量环 2	无
PDA	SPD-M20A
MS	LCMS-8040
工作站	LabSolutions Ver. 5. 60

1.2 分析条件

萃取、解吸条件

萃取柱: Shim-pack MAYI-SAX(G) 10 L×4.6

萃取溶液: 水 / 甲醇 (20/80, v/v)

流速: 3 mL/min

柱温: 常温

进样体积: 50 μ L

萃取时间: 1 min

解吸溶液: 甲酸 / 甲醇 (0.5/99.5, v/v)

解吸流速: 0.3 mL/min

平衡溶剂: 甲酸 / 水 (0.2/99.8, v/v)

平衡流速: 3 mL/min

切阀时间、清洗程序: 将时间程序表 2

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm×50 mm L,

1.6 μ m 粒径

流动相: A 相 -0.2% 甲酸水溶液; B 相 - 甲醇

流速: 0.5 mL/min

柱温: 40°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 时间程序见表 2。

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

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 15 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 50 ms

延迟时间: 3 ms

喷嘴位置: +3 mm

MRM 参数: 见表 3

表2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Column Oven	CTO.RVL	0
1.00	Pumps	SV(Pump D)	B
2.60	Column Oven	CTO.RVR	0
3.50	Pumps	Pump B Conc.	10
4.00	Column Oven	CTO.RVL	1
5.00	Column Oven	CTO.RVR	1
5.00	Pumps	SV(Pump D)	A
5.50	Pumps	Pump B Conc.	70
6.98	Pumps	Pump B Conc.	70
6.99	Pumps	Pump B Conc.	10
7.00	Controller	Stop	

表3 MRM参数

名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
IAA	87-51-4	176.10	130.10*	50.0	-12.0	-15.0
			77.10	50.0	-12.0	-44.0
IPA	830-96-6	190.10	130.10*	50.0	-13.0	-15.0
			77.10	50.0	-13.0	-48.0
IBA	133-32-4	204.10	130.10*	50.0	-14.0	-25.0
			186.10	50.0	-14.0	-12.0

*表示定量离子

1.3 离线方法

取 50 μ L 样品, 用 80 % 甲醇水溶液稀释成 3 mL; 以 3 mL/min 的流速将稀释液注入到 MAYI-SAX 萃取柱中; 取 500 μ L 甲酸 / 甲醇 (0.5/99.5, v/v) 解吸溶液注入 MAYI-SAX 萃取柱进行解吸, 收集所有解吸液, 将其浓缩至 50 μ L; 取 5 μ L 进样。

1.4 样品制备

标准样品配制: 用甲醇配制 10 mg/mL 3 种生长素混合标准溶液。稀释至 0.1 μ g/L、1 μ g/L、10 μ g/L 和 100 μ g/L 不同浓度标样。

样品前处理方法: 选取富贵竹竹叶、羊蹄甲花蕾及花瓣作为实际样品。准确剪取 1 g 样品, 加入 20 mL 80 % 甲醇(水 / 甲醇 = 20/80, v/v) 中, 切细、匀浆后 0.45 μ m 滤膜过滤待测。

结果讨论

2.1 优化萃取条件和解吸条件

对萃取溶剂进行优化, 选取甲醇 / 水 (80/20, v/v), 氨水 / 甲醇 / 水 (0.1/80/20, v/v) 甲醇 / 水 (50/50, v/v), 甲醇 / 水 (90/10, v/v), 氨水 / 水 (0.1/99.9, v/v), 乙腈 / 水 (80/20, v/v), 100 % 甲醇, 100 % 乙腈和 100 % 水作为萃取溶剂, 最终选取甲醇 / 水 (80/20, v/v) 作为最优萃取溶剂。

对萃取流速进行优化, 选择 2 mL/min, 3 mL/min, 4 mL/min 进行优化, 最终选取 3 mL/min 作为最优萃取流速。

对萃取时间进行优化, 设置 1 min, 2 min 作为萃取时间, 最终选取 1 min 作为萃取时间。

对解吸溶剂进行优化, 选取甲酸/甲醇 (0.5/99.5, v/v), 甲酸/甲醇 (1/99, v/v), 甲酸/甲醇 (0.2/99.8, v/v), 甲酸/乙腈 (0.5/99.5, v/v), 100% 甲醇, 甲酸/水/甲醇 (0.5/50/50, v/v), 100% 乙腈作为解吸溶剂, 终选取甲酸/甲醇 (0.5/99.5, v/v) 作为最优萃取溶剂。

对解吸速度进行优化, 选取 0.2 mL/min, 0.3 mL/min 和 0.4 mL/min 进行优化, 最终选取 0.3 mL/min 作为最优流速。

对切换阀 2 的切阀时间进行优化, 选取 2.4 min, 2.5 min, 2.6 min 和 2.7 min 进行优化, 最终选取 2.6 min 作为最优切阀时间。

对泵 C 活化溶液进行优化, 选取 100% 水, 甲酸/水 (0.1/99.9, v/v), 甲酸/水 (0.2/99.8, v/v), 氨水/水 (0.1/99.9, v/v), 甲酸/水/甲醇 (0.1/90/10, v/v) 进行优化, 最终选取甲酸/水 (0.2/99.8, v/v) 作为泵 C 平衡溶液。

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱图如图 2 所示。

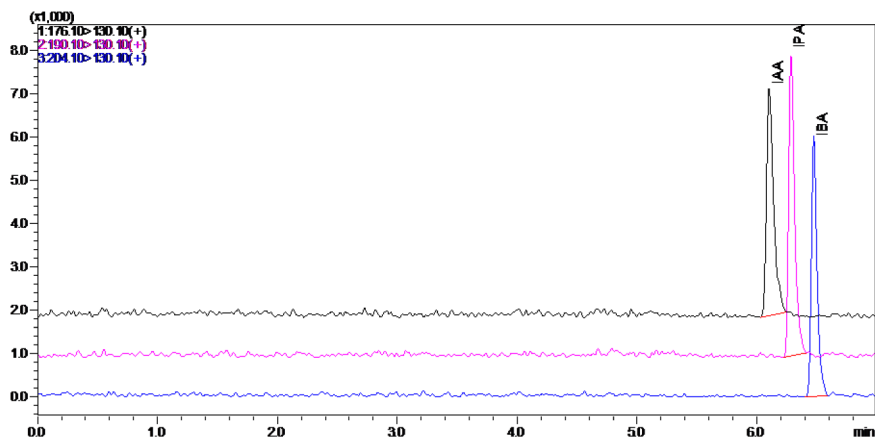


图 2 三种生长素标准样品的 MRM 色谱图 (1.0 μ g/L)

2.3 线性关系

配制不同浓度混合标准工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 外标法制作校准曲线, 如图 3 所示线性良好。线性方程、相关系数和线性范围见表 4。

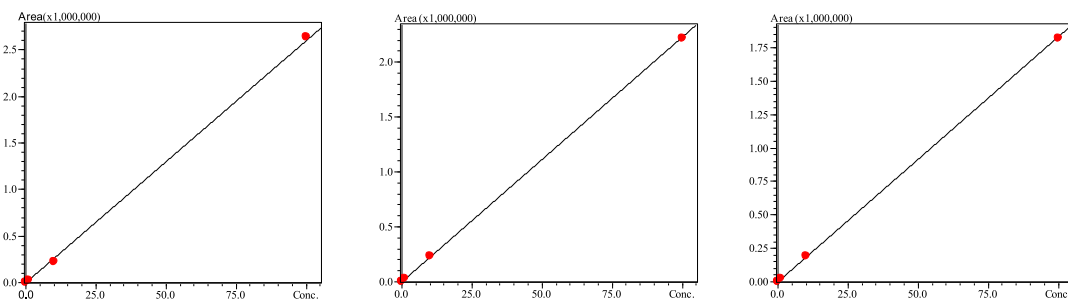


图3 IAA、IPA 和 IBA 的标准工作曲线

表 4 10 种物质的校准曲线参数

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (μ g/L)	检出限* (ng/g)	定量限** (ng/g)
IAA	$Y = (25997.2)X + (-564.876)$	0.9987	0.1-100	0.80	2.64
IPA	$Y = (22262.5)X + (605.402)$	0.9999	0.1-100	0.64	2.11
IBA	$Y = (18314.8)X + (499.184)$	0.9998	0.1-100	0.56	1.85

* 三倍信噪比计算; ** 十倍信噪比计算

2.5 精密度实验

配制如表 5 浓度的混合标液，平行进样 6 次。三种生长素保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.05 % 和 1.05 ~ 2.76 % 之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

目标物	RSD% (1 µg/L)		RSD% (10 µg/L)	
	R.T	Area	R.T	Area
IAA	0.03	2.32	0.05	1.31
IPA	0.05	2.76	0.04	1.54
IBA	0.05	2.10	0.05	1.05

2.6 离线方法评价

表 6 离线方法 的检出限、定量限以及重现性

化合物	检出限* (ng/g)	定量限** (ng/g)	重现性 N=6, RSD (%)			
			1 µg/L		10 µg/L	
			R.T	Area	R.T	Area
IAA	6.30	19.1	0.06	7.1	0.09	10.5
IPA	4.71	14.3	0.06	4.9	0.08	9.3
IBA	6.45	19.6	0.06	6.3	0.07	8.2

离线方法操作比较繁琐，耗时共约半小时。在与在线方法相同的萃取、解吸条件下，离线方法得到的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.06~0.09 % 和 4.9~10.5 % 之间；方法检出限和方法定量限分别介于 4.71-6.45 ng/g 和 14.3-19.6 ng/g 之间。通过对比，表明在线方法的的分析速度，检出限、定量限以及重现性均优于离线方法。

2.7 基质加标实验

在植物样品中添加浓度为 2 ng/g 和 20 ng/g 的混合标样，按照 1.3 中样品制备方法制备样品后上机测试，结果如图 4~9 所示。在三种空白植物样品中都检测到 IAA，三种加标浓度下得到回收率介于 61.00 %~116.83 之间，具体检测值和回收率见表 6。

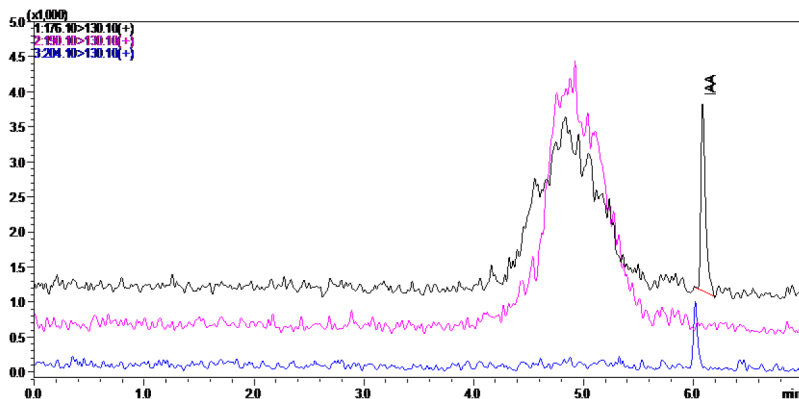


图 4 富贵竹竹叶空白基质 (IAA 检出量为 6.60 ng/g)

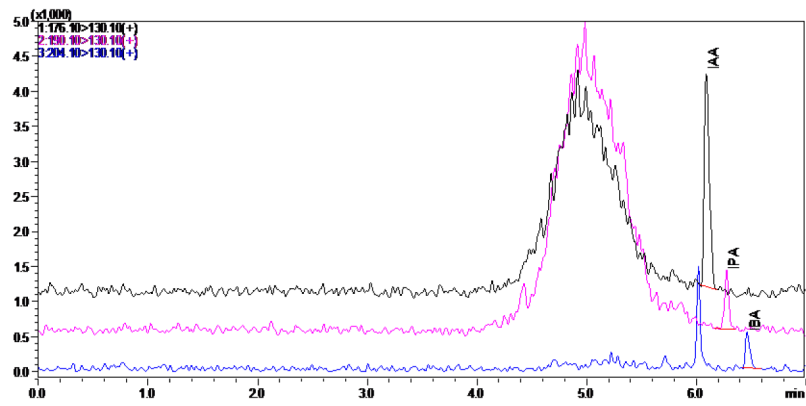


图5 加标 2 ng/g 富贵竹竹叶样品

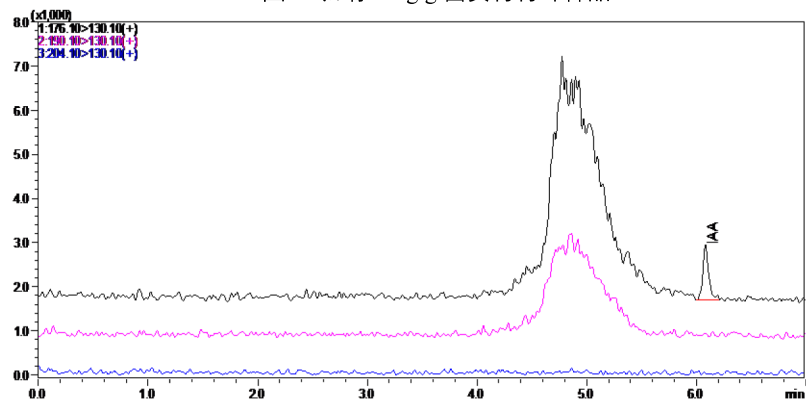


图6 空白羊蹄甲花瓣基质 (IAA 检出量为 2.84 ng/g)

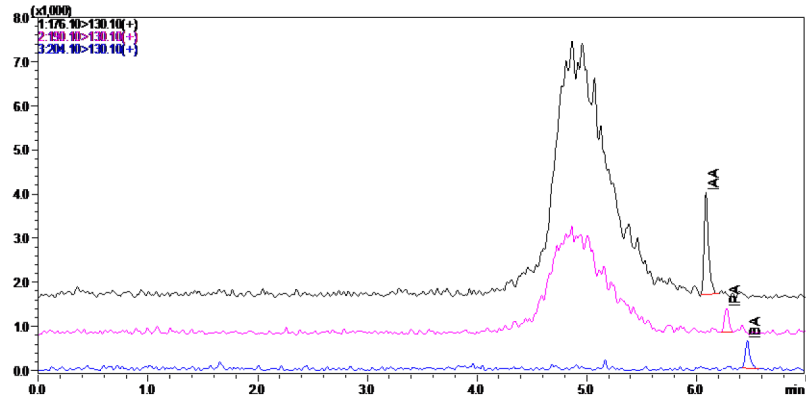


图7 加标 2 ng/g 羊蹄甲花瓣样品

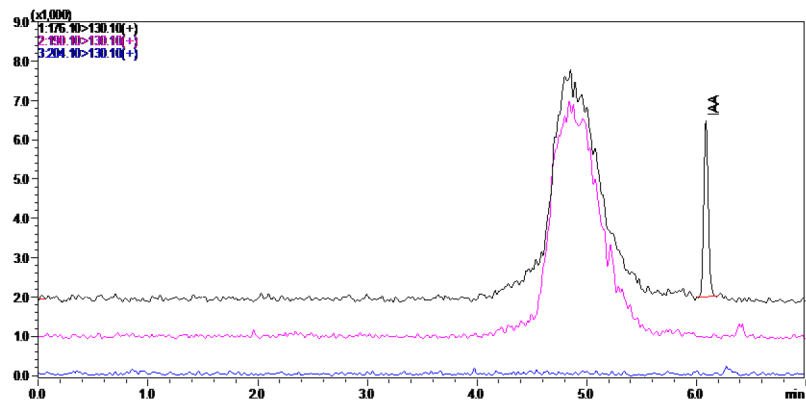


图8 空白羊蹄甲花蕾基质 (IAA 检出量为 12.36 ng/g)

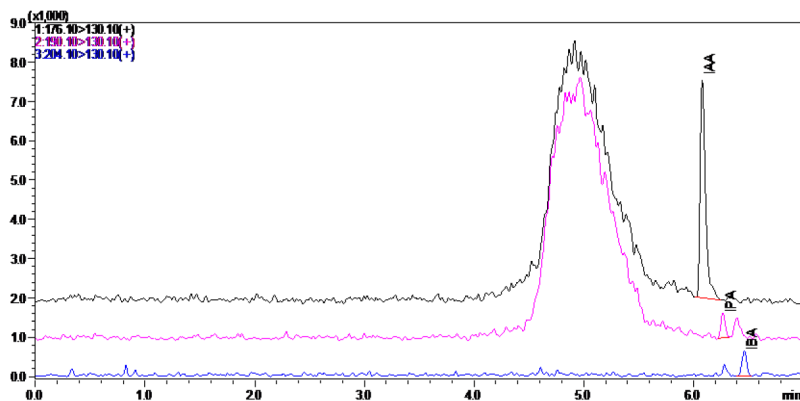


图9 加标 2 ng/g 羊蹄甲花蕾样品

表7 三种植物样品检测量和回收率 (n=3)

样品	目标物	空白	2 ng/g		20 ng/g	
		检出量 (ng/g)	检出量 (ng/g)	平均回收率 (%)	检出量 (ng/g)	平均回收率 (%)
富贵竹竹 叶	IAA	6.81±0.21	8.11±0.23	67.00	24.97±0.29	90.40
	IPA	ND*	1.31±0.15	65.00	16.46±0.46	82.43
	IBA	ND	1.63±0.21	83.00	20.03±0.53	99.60
羊蹄甲花 瓣	IAA	2.83±0.10	5.15±0.11	116.83	18.28±0.52	77.08
	IPA	ND	1.20±0.08	61.33	14.24±1.02	71.10
	IBA	ND	1.80±0.04	90.67	20.01±0.75	100.60
羊蹄甲花 蕾	IAA	13.07±0.71	15.26±0.16	108.50	24.89±1.99	61.95
	IPA	ND	1.21±0.03	61.00	12.68±0.64	62.63
	IBA	ND	1.83±0.07	92.33	19.26±0.55	96.90

*ND 为未检出

结论

建立了自动前处理 - 超高效液相色谱 / 质谱在线分析系统直接测定植物提取液中的吲哚乙酸、吲哚丙酸和吲哚丁酸的方法。对萃取条件、解吸条件、自动化控制时间程序进行优化, 在最优条件下不同浓度的精密度实验得到的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03~0.05 % 和 1.05~2.76 % 之间; 方法检出限和方法定量限分别介于 0.56~0.80 ng/g 和 1.85~2.64 ng/g 之间。对比离线方法, 在线方法分析周期短, 具有更低的检出限、定量限, 以及更好的出峰时间、峰面积重现性。对富贵竹竹叶、羊蹄甲花瓣和花蕾三种植物样品进行检测, 三种空白植物样品提取液中都检测到吲哚乙酸, 在 2 ng/g 和 20 ng/g 两种不同加标浓度下得到回收率介于 61.00 %~116.83 之间。结果表明本法只需对植物提取液进行过滤处理, 即可对植物提取液中的植物激素进行检测, 灵敏度高, 结果可靠。