

自动前处理 – 超高效液相色谱质谱在线分析系统用于富贵竹竹叶提取液的基质效应评价

LCMSMS-153

摘要： 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，对《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》方法所得到的柱后流出液进行基质效应评价，得出以下结论：液相流动相中甲酸含量直接影响三种植物激素的质谱响应；经过 MAYI-SAX 柱的净化，富贵竹竹叶提取液中不存在明显的基质效应。此方法可以较准确的评价分析方法的基质效应，为优化样品前处理和液相梯度方法提供了可靠的依据，具有实际指导意义。

关键词： 自动前处理基质效应三重四极杆质谱仪

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，存在色素、淀粉、多糖、磷脂等可能对质谱产生明显基质效应从而影响目标物离子化效率、破坏定量准确性的杂质；另外，对于电喷雾离子源而言，液相流动相的组成也对目标物离子化效率有很大的影响。因此，在具有精确灵敏的检测器和稳定可靠分析方法的前提下，如何优化样品前处理以得到的基质效应尽可能少的样品溶剂，是整个分析方法

的瓶颈。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），在已有植物激素分析方法《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（indoleacetic acid, IAA）、吲哚丙酸（indolepropionic acid, IPA）和吲哚丁酸（indolebutyric acid, IBA）直接检测方法》基础上，于柱后注入标准样品，通过三通将柱洗脱液和标准样品混合进入质谱进行分析，从而评价流动相变化及样品基质对目标物质谱响应的影响。

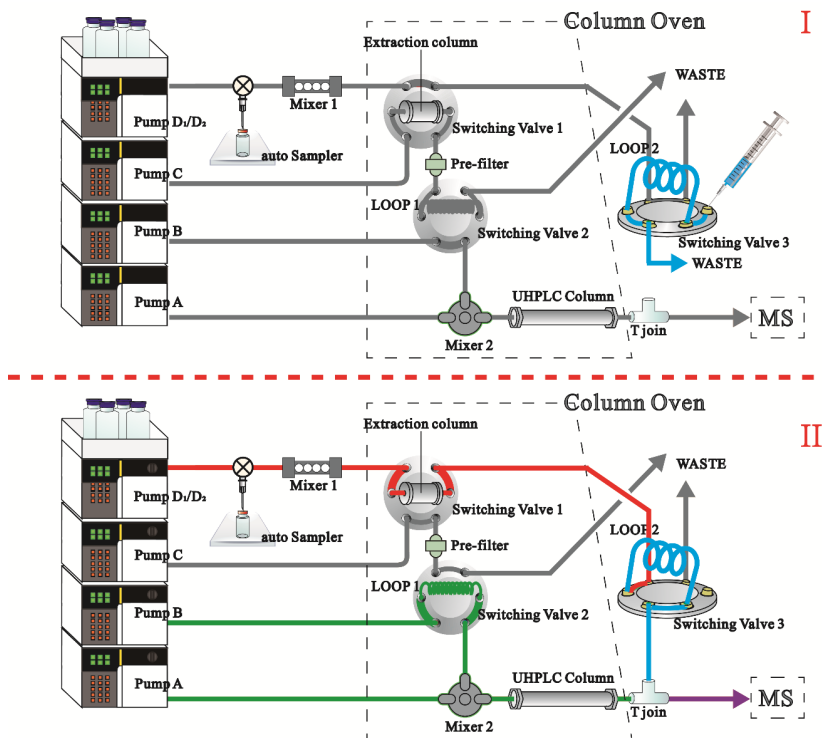


图 1 基于自动前处理-超高效液相色谱质谱在线分析系统的基质效应评价流路

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 C 溶剂切换阀	FCV-11AL, 初始状态为 A: C1(上样液), D1(解吸液)送液; B 状态为 C2 (平衡液), D1 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	Reodyne 7725i 手动切换阀
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	1.5 mL 不锈钢定量环
MS	LCMS-8040
工作站	LabSolutions Ver. 5. 6

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

切阀时间、萃取、解吸、平衡程序: 将时间程序表 2

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm×50mm 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
喷针位置: +3 mm

MRM 参数: 见表 3
萃取条件和解吸条件
萃取溶剂为甲醇 / 水 (80/20, v/v); 萃取流速为 3 mL/min; 萃取时间为 1 min; 解吸溶剂为甲酸 / 甲醇 (0.5/99.5, v/v); 解吸速度为 0.3 mL/min 作; 切换阀 2 的切阀时间为 2.6 min。

表 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.99	Pumps	Pump C Flow	3
1.00	Column Oven	CTO.RVL	0
1.00	7725i 阀	手动切阀	-
1.00	Pumps	Pump C Flow	0.1
2.50	Column Oven	CTO.RVR	0
3.50	Pumps	Pump B Conc.	10
4.50	Column Oven	CTO.RVL	1
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 μL 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 μL 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 50μL。

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 10 μg/L 待用。

样品前处理方法: 准确剪取 1 g 富贵竹竹叶样品, 加入 20mL 80 % 甲醇(水 / 甲醇 = 20/80, v/v) 中, 切细、匀浆后 0.45 μm 滤膜过滤待测。

结果讨论

2.1 时间程序设置

本方法在《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》的基础上，对时间程序表进行以下修改：

- 增加手动切阀时间：由于柱后使用 Reodyne 7725i 手动切换阀，因此在 1min 时进行手动切阀；
- 去除平衡过程：为了使用泵 D 来推送柱后定量环 2 中的标样，必须将其流速降低为 0.1 mL/min，以最大限度的降低进入离子源的液体量，因此去除原先 3 mL/min 的平衡过程；
- 去除 5min 时阀 2 的回切，以减少切阀时产生的液流脉冲影响柱后标样的信号波动。

2.2 空白溶剂和实际样品的 MRM 色谱图

空白溶剂和实际样品的 MRM 色谱图如图 3 和图 4 所示，《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》方法所得富贵竹竹叶分析结果见图 5。

根据图 3 和图 4 的结果，可以得出以下结论：

a, 甲酸含量直接影响三种植物激素的质谱响应：参考表 2 中泵 A 和 B 的梯度时间程序，可以发现空白溶剂和实际样品的质谱响应均与泵 A 的比例成正比；而在 6 min 之后，泵 A 比例维持在 30 % 的情况下，质谱响应出现上扬趋势，其原因是该时间段柱后流出的流动相包含了 0.5 % 甲酸甲醇的解吸液，从而提高了该时间段甲酸含量。由此可以证明，甲酸的含量变化是三种植物激素响应变化的主要原因。对于常规 UHPLC 分析，可以通过在 A、B 两相中添加同等比例的甲酸，从而保证三种植物激素的响应稳定性。在本分析系统中，大体积含高比例甲酸的解吸液会进入到色谱柱中，因此在整个分析过程中甲酸比例无法固定，因此无需对有机相添加甲酸。

b, 经过 MAYI-SAX 柱的净化，富贵竹竹叶提取液中不存在明显的基质效应：对比图 3 和图 4，可知三种植物激素的响应没有明显的差异；参考图 5(自动前处理分析结果)中出现在 4-6 min 的杂质，也没有对植物激素信号产生抑制，因此可以认为经过 MAYI-SAX 净化，基本去除了基质干扰。

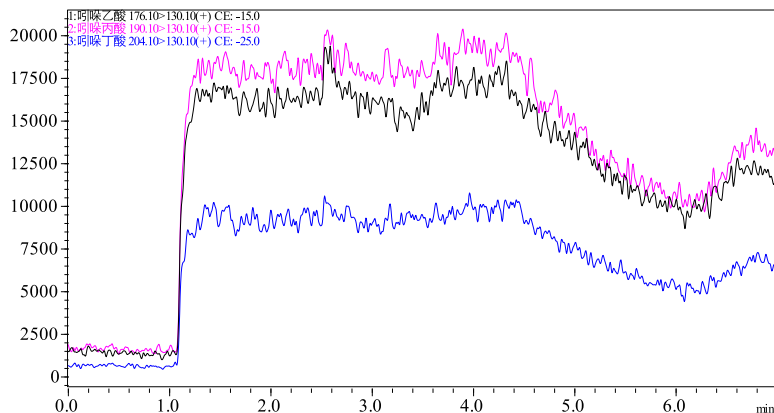


图 3 基质效应考察：空白溶剂的 MRM 色谱图

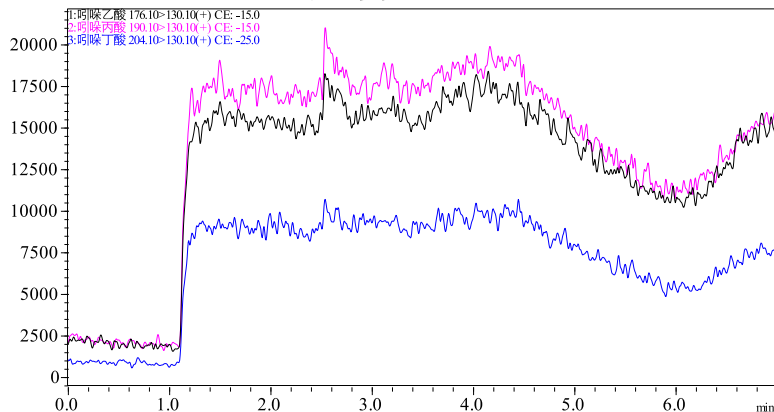


图 4 基质效应考察：富贵竹竹叶样品的 MRM 色谱图 (1.0 µg/L)

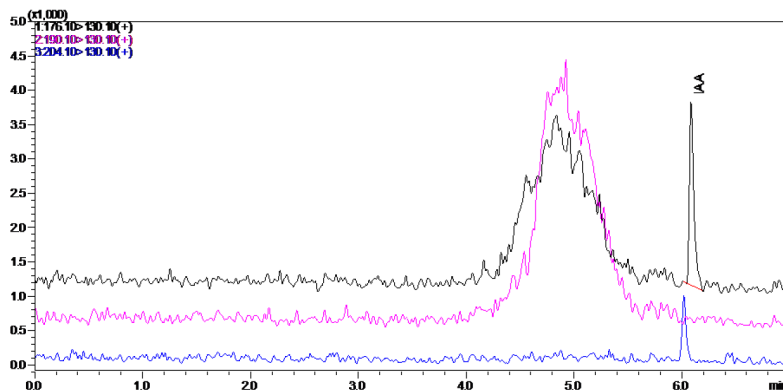


图 5 在线分析方法：富贵竹竹叶空白基质 (IAA 检出量为 6.60 ng/g)

■ 结论

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，对《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》方法所得到的柱后流出液进行基质效应评价，通过对比，得出以下结论：液相流动相中甲酸含量直接影响三种植物激素的质谱响应；经过 MAYI-SAX 柱的净化，富贵竹竹叶提取液中不存在明显的基质效应。此方法可以较准确的评价分析方法的基质效应，为优化样品前处理和液相梯度方法提供了可靠的依据，具有实际应用意义。