

# 三重四极杆质谱测定玫瑰花叶中酸性生长素

LCMSMS-164

**摘要:** 本文建立了岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定玫瑰花叶中酸性生长素吲哚乙酸、脱落酸、茉莉酸和水杨酸的分析方法。玫瑰花叶经 80 % 甲醇水溶液提取, 超高效液相色谱 LC-30A 进行梯度洗脱分离, 用串联质谱进行多反应监测分析, 采用内标法建立定量方法。4 种酸性生长素在 1~100  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内线性良好, 相关系数在 0.9981~0.9993 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样进行精密度实验, 4 种酸性生长素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.036 %~0.76 % 和 2.92 %~4.85 % 之间, 仪器精密度良好, 检出限范围为 0.066~0.349  $\mu\text{g/L}$ 。考察玫瑰花叶分析及加标实验, 4 种酸性生长素的回收率范围为 76.2 %~104.7 %, 可以满足植物中 4 种酸性生长素的检测需求。

**关键词:** 酸性生长素三重四极杆质谱

植物激素, 作为痕量信号分子, 对植物的正常生长起着至关重要的作用。吲哚乙酸 (IAA) 作为生长素的代表, 能调控细胞的分裂、分化和生长等多种生理过程; 脱落酸 (ABA) 被普遍认为是逆境激素, 调节胚胎发育、种子萌芽、气孔关闭、细胞分裂和茎的生长等生理现象; 水杨酸 (SA) 可调节植物的生长发育, 对植物的光合作用、蒸腾作用与离子的吸收与运输也有调节作用, 同时还作为内生信号参与植物对病原体的抵御; 茉莉酸 (JA) 具有广泛的生理功能, 目前被认为是高等植物体内的内源生长调节物质。更为重要的是, 它是病原物、激发子及创伤诱导植物防卫基因表达的信号分子, 并且其本身也可作为激发子。植物激素是对植物生长发育具有

重要调控作用的小分子化合物, 在低浓度下就能发挥生理作用, 参与调控植物生长发育的每一过程。植物激素的合成、运输、代谢和分子作用机理的深入研究都需要对植物激素进行定量分析。但是, 植物激素定量分析受到低含量、次生代谢产物背景干扰严重等因素的影响, 一直是植物激素研究领域的瓶颈。

本文以甲醇水溶液提取, 使用岛津串联质谱 LCMS-8040, 建立了玫瑰花叶中酸性激素 IAA、ABA、SA、JA 的分析方法, 该方法能有效地减少样品中杂质的干扰, 操作简便、快捷, 灵敏度高, 精密度好, 供相关检测人员参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

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 $\times$ 2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 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. 5.60 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: Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 3.0 mmI.

D. $\times$ 75 mmL., 2.2  $\mu\text{m}$

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 20  $\mu\text{L}$

柱温: 50 $^{\circ}\text{C}$

流动相: A-0.1 % 甲酸, 10 mmol/L 甲酸铵水溶液;

B- 甲醇

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度 20 %, 梯度洗脱见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time (min)	B.Con.
6.50	95
8.00	95
8.01	20
10.00	stop

质谱条件	碰撞气: 氦气
分析仪器: LCMS-8040	脱溶剂管温度: 300°C
离子源: ESI, 正负离子同时扫描	加热模块温度: 500°C
离子源接口电压: 4.5 kV	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
喷雾针位置: 1 mm	驻留时间: 30 ms
雾化气: 氮气 3 L/min	延迟时间: 3 ms
干燥气: 氮气 15 L/min	MRM 参数: 见表 2

表2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
吲哚乙酸	Indole acetic acid	87-51-4	176.20	130.10*	-30.0	-20.0	-30.0
				77.10	-30.0	-46.0	-14.0
D5-吲哚乙酸	-	-	181.10	134.15*	-16.0	-24.0	-12.0
脱落酸	Abscisic acid	21293-29-8	263.15	153.20*	13.0	11.0	30.0
				219.25	13.0	13.0	22.0
D6-脱落酸	-	-	269.0	159.15*	19.0	10.0	30.0
水杨酸	Salicylic acid	69-72-7	137.10	93.15*	14.0	16.0	17.0
				65.15	14.0	30.0	26.0
D4-水杨酸	-	-	141.0	97.10	30.0	17.0	17.0
茉莉酸	Jasmonic acid	77026-92-7	209.25	59.15*	15.0	13.0	23.0
				41.10	15.0	35.0	15.0
D4-茉莉酸	-	-	213.0	61.15*	15.0	12.0	25.0

\*表示定量离子

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 样品前处理方法

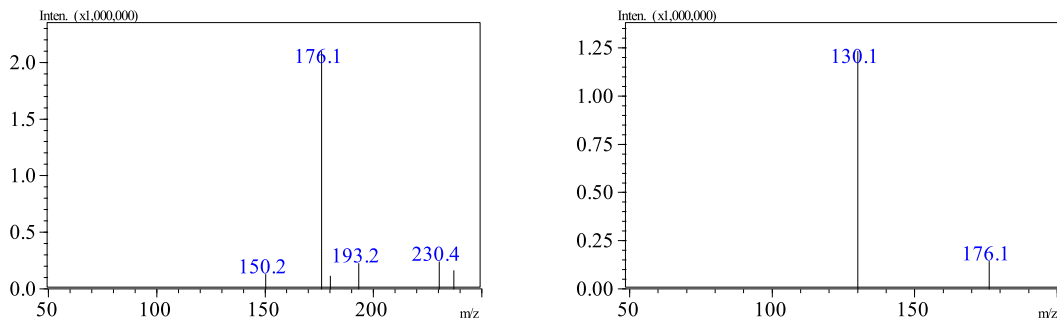
采摘新鲜水仙花叶片, 用剪刀将其剪成面积约为 1 cm<sup>2</sup> 的形状大小, 精密称取 2.0 g 玫瑰花叶 (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中, 加入 25 mL 80% 甲醇水溶液, 匀浆 5 min, 10000 转/min 离心 15 min, 取上清液置于 50 mL 蒸馏瓶中。残渣加入 5 mL 甲醇清洗, 重复上述步骤, 合并两次上清液, 40°C 旋转蒸发至近干。用 20% 甲醇水溶液定容至 1 mL, 过膜, 待仪器使用。

#### 1.3.2 标准溶液配制

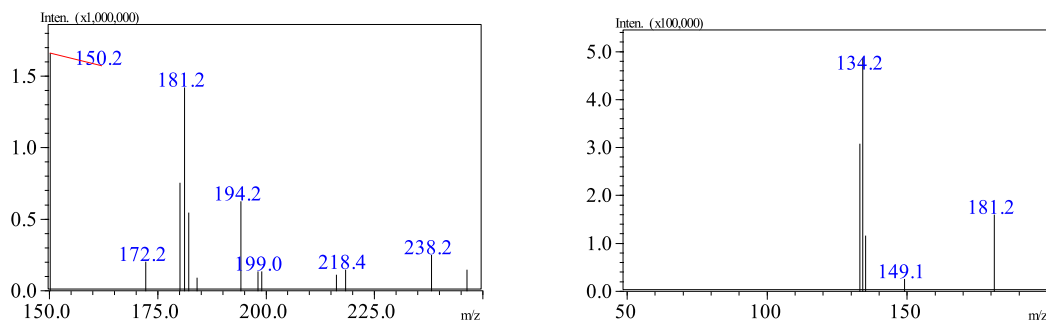
用甲醇分别配制 1.0 mg/L 的混合标准中间溶液和混合内标溶液, 用水溶液释成内标浓度为 10 μg/L 混标浓度为 1, 5, 10, 20, 50, 100 μg/L 标准工作液。

## 结果讨论

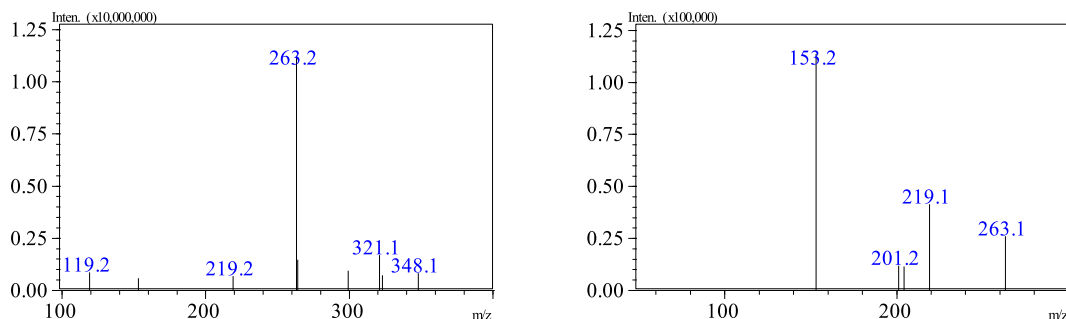
### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



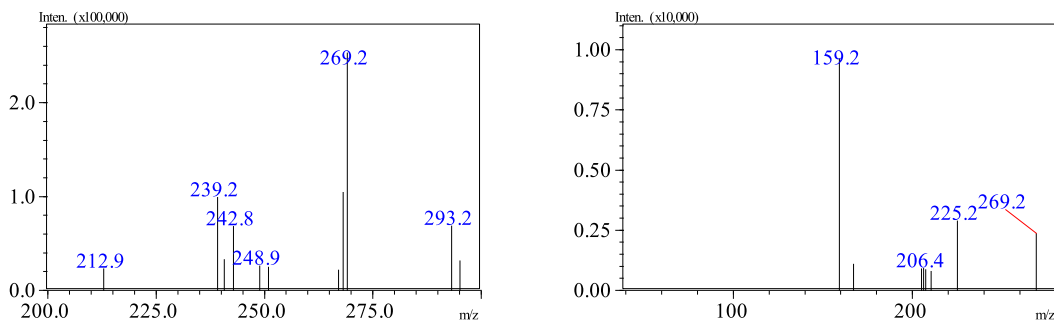
1 吲哚乙酸 IAA 的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-15V) (右图)



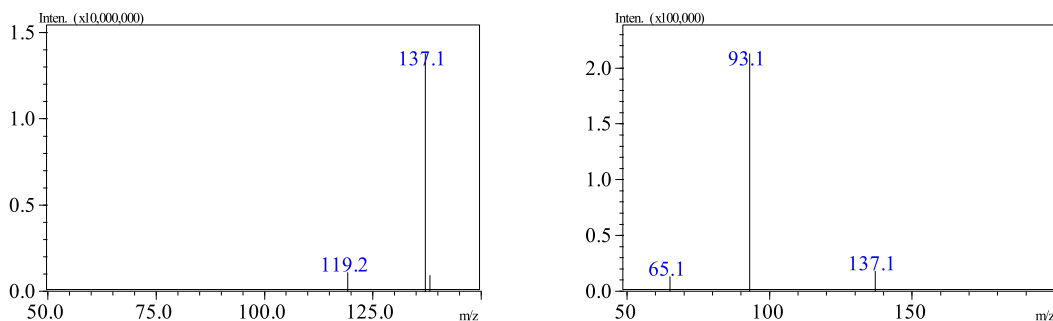
2 D5-吲哚乙酸的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为-15V) (右图)



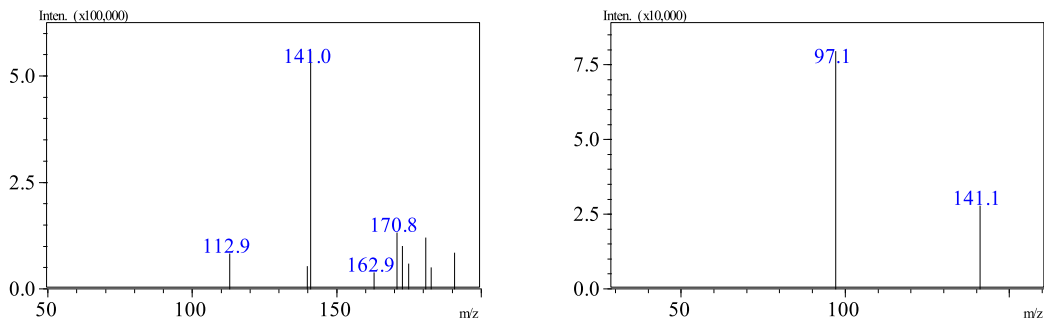
3 脱落酸的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 12V) (右图)



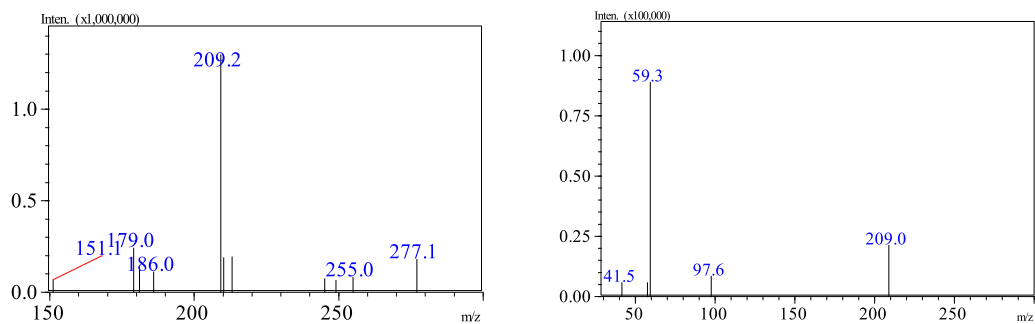
4 D6-脱落酸的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 12V) (右图)



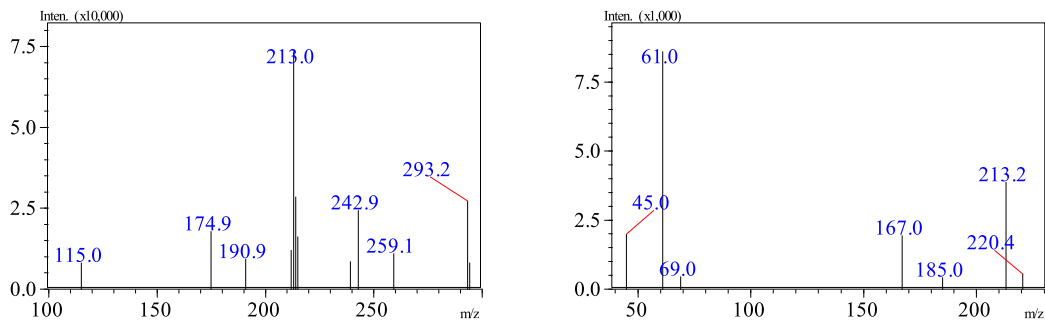
5 水杨酸的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 22V) (右图)



6 D4-水杨酸的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 18V) (右图)



7 茉莉酸的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 15V) (右图)



8 D4-茉莉酸的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE 值为 12V) (右图)

图1 酸性生长素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

## 2.2 标准溶液的 MRM 色谱图

标准溶液 MRM 色谱图如图 2 所示。

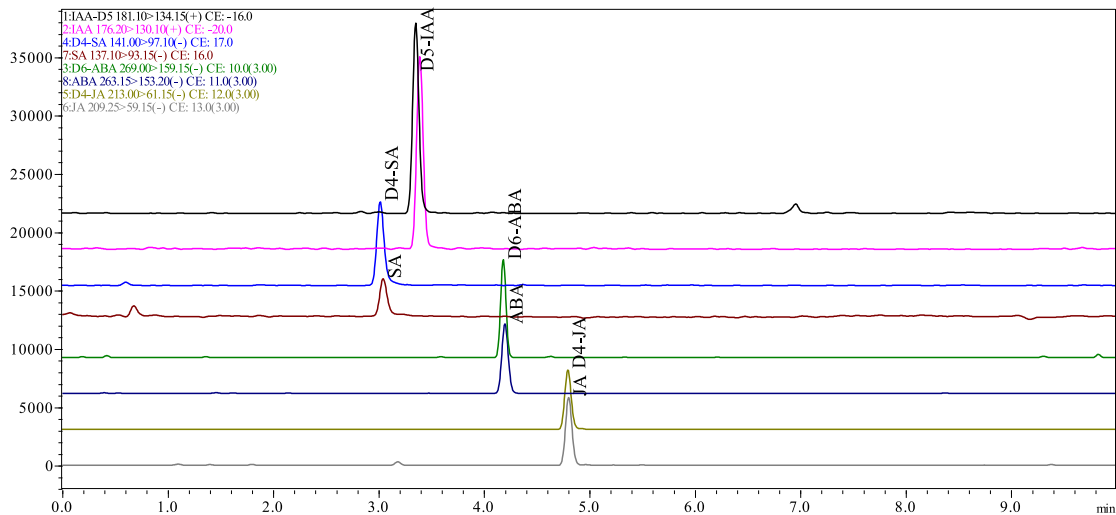


图 2 5 µg/L 混合标准溶液 (内标浓度 10µg/L) 的 MRM 色谱图

### 2.3 线性关系

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，目标物与内标物峰面积比为纵坐标，以 1, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/L}$  为浓度点，采用内标法建立校准曲线，如图 3 所示，4 种酸性生长素线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.9981~0.9993 之间，回读值在 86.0%~114.1% 之间，软件自动计算检出限和定量限见表 3。

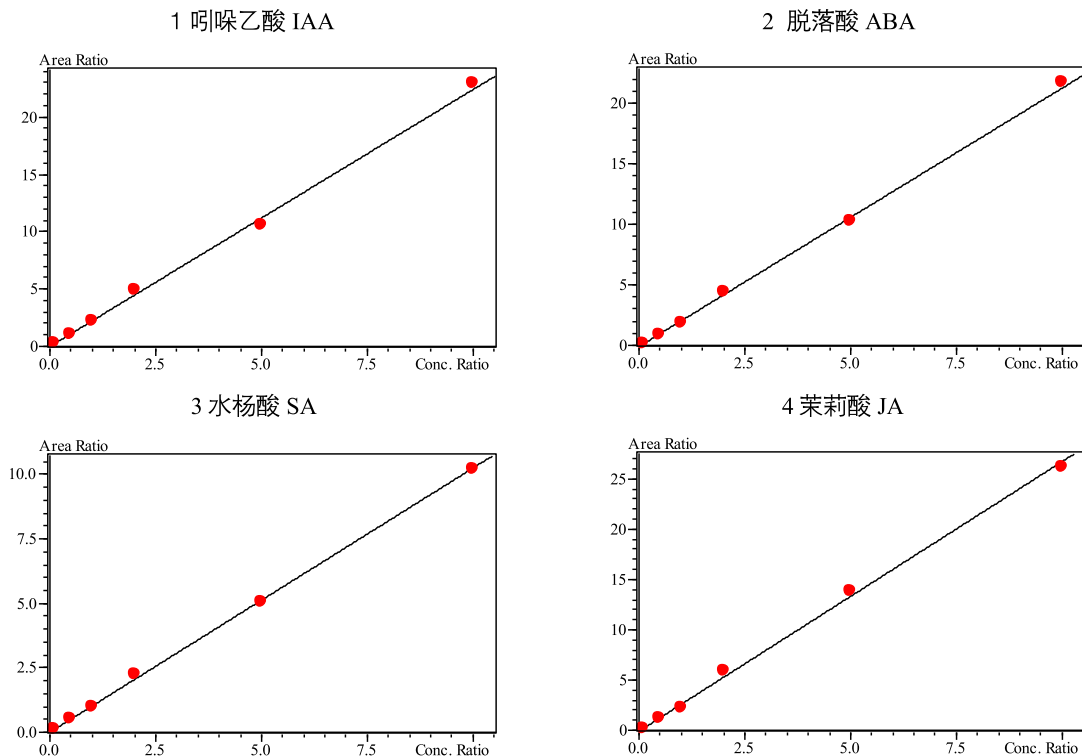


图3 4种酸性生长素的标准工作曲线

表3 4种酸性生长素的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ )	相关系数 (R)	检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/L}$ )
1	吲哚乙酸 IAA	$Y = (2.23994)X + (-0.00703603)$	1-100	0.9987	0.083	0.252
2	脱落酸 ABA	$Y = (2.13828)X + (-0.100541)$	1-100	0.9991	0.089	0.268
3	水杨酸 SA	$Y = (1.02517)X + (-0.00391938)$	1-100	0.9993	0.346	1.04
4	茉莉酸 JA	$Y = (2.68224)X + (-0.0921058)$	1-100	0.9981	0.066	0.201

### 2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样，平行测定 6 次，3 种物质的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在 0.036%~0.76% 和 2.92%~4.85% 之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (1 $\mu\text{g/L}$ )		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$ )		RSD% (100 $\mu\text{g/L}$ )	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
吲哚乙酸 IAA	0.088	4.85	0.049	3.59	0.061	2.74
脱落酸 ABA	0.046	3.35	0.043	2.98	0.053	3.59
水杨酸 SA	0.64	2.92	0.44	3.64	0.76	3.04
茉莉酸 JA	0.049	4.19	0.042	4.10	0.036	4.37

## 2.5 实际样品分析及回收率实验

将所建立的分析方法用于实际样品分析，检测玫瑰花叶，测到四种酸性生长素。图4为玫瑰花叶样品的MRM色谱图。在此玫瑰花叶中添加浓度为0.5 μg/kg的混合标准溶液，加标回收率结果见表5。

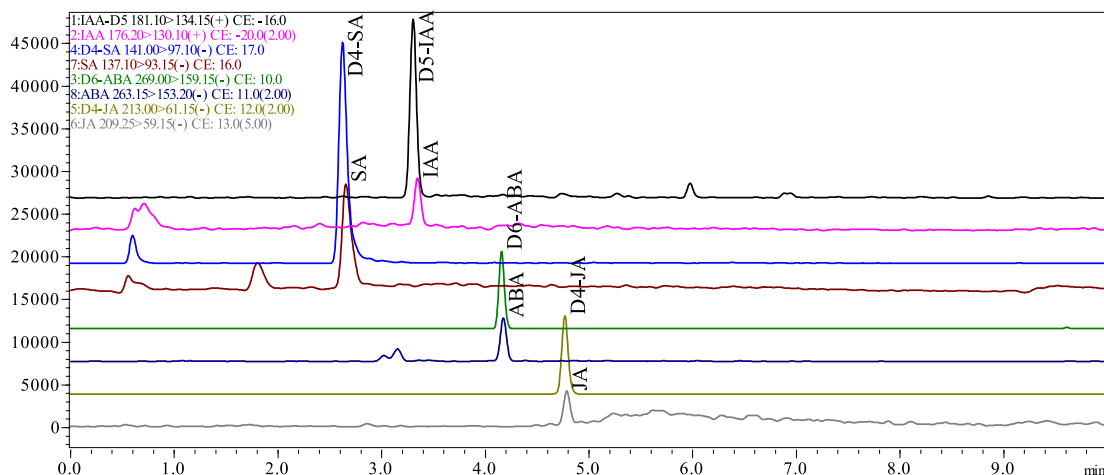


图4 玫瑰花叶样品的MRM色谱图

表5 4种酸性生长素玫瑰花叶检测与加标回收结果

编号	名称	样品浓度 (μg/kg)	加标浓度 (μg/kg)	实测浓度 (μg/kg)	回收率 (%)
1	吲哚乙酸 IAA	0.335	0.5	0.414	82.7
2	脱落酸 ABA	0.962	0.5	0.371	74.1
3	水杨酸 SA	2.48	0.5	0.523	104.7
4	茉莉酸 JA	0.475	0.5	0.381	76.2

注：实测浓度=加标样品浓度-样品浓度

## 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪LCMS-8040测定玫瑰花叶的4种酸性生长素。4种酸性生长素线性范围宽，在1~100 μg/L浓度范围内线性良好，相关系数在0.9981~0.9993之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续6次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.036%~0.76%和2.92%~4.85%之间，仪器精密度良好，检出限范围为0.066~0.349 μg/L。考察玫瑰花叶分析及加标实验，4种酸性生长素的回收率范围为76.2%~104.7%，可以满足植物中4种酸性生长素的检测需求。