植物内源激素液质联用检测

ESI-HPLC-MS/MS Analysis of phytohormone

订单编号：

客户姓名

电子邮箱：

客户单位：

编写日期：**2020/09/18**

客户：

您好，感谢您选择南京瑞源生物技术有限公司的检测服务。本公司基于与客户互利互信原则，为了能及时了解客户需求，也为了能为客户提供更优质的服务，请您了解以下实验须知：

1、 本公司承诺所采用检测方法科学严谨，参考国内外领先技术并经多次前期实验验证，保证检测的结果客观真实。但是植物样品采取与保存的本身的不确定性，植物材料基质及植物代谢过程的复杂性，检测结果与客户的预期结果不承诺一定完全一致。如客户对实验结果有异议，请早向我方反馈，以方便本公司为客户提供调查或复检。

2、 客户对实验结果的异议原则上应在 15 个工作日内提出，以方便我方安排排查或复检。申请复检的样品应为《检测报告》中对应的同批次的样品（留存样）。我方将免除正式实验样品 10%以内样品的复检费用，此外若复检结果与《检测报告》结果的误差在正常范围内，客户需正常缴纳复检费；反之，则退回检测费和复检费。

3、 在完成实验后，本公司将为您免费保存样品三个月。临期时我方会向您咨询样品是否继续存留或返还。

4、 本公司提供面向科研用户的检测服务，对送检样品检测结果的真实性负责。对检测结果的使用所产生的直接或间接法律后果，本公司不承担任何经济和法律责任。

5、如有任何疑问请联系瑞源客服电话 400-8638-520 及邮箱 order@bestofbest.top。

实验报告

摘要

本实验提取提取样品中植物内源激素，而后以安捷伦 1290 高效液相色谱仪串联 AB 公司 Qtrap6500 质谱仪，以定植物内源激素 BLs。

一、实验原理与设计

1.1 激素提取实验

有许多内源信号和调控分子可以影响植物的生长，发育和生理过程。其中，内源植物激素是专门作为信号物质在植物体内合成的小分子化合物。它们通常从合成位点运输到远处的作用位点，并以非常低的浓度发挥作用。虽然植物体内也有其他一些小分子物质可以发挥信号作用(如初级代谢物、活性氧、无机盐)，但他们的主要功能并非作为信号物质，并且只有在特定情况下发挥信号作用。其中，油菜素淄醇(BLs)是近年来新发型的植物激素类物质，也是公认的活性最高的高效、广谱、无毒的植物生长激素。。

由于植物激素在植物体内含量极低(通常为 0.1-10 ng/g)级别，并且对光照、温度十分敏感，同时植物组织基质复杂，对检测过程可能引起干扰。因此，如何在复杂基质中提取、净化得到植物激素，同时减少实验过程可能对激素造成的损失是一个重要的挑战。对于常规植物内源激素，本实验采用 95%溶液提取方法并辅以固相萃取净化其中杂质。该方法以相对简单的流程去除了样品基质中大部分杂质，同时由于提取条件温和、步骤迅速，其中待测物损失较小，有利于下游检测实验。

1.2 液质检测

对植物激素的研究可以追溯到 1880 年，现今，植物激素检测通常有酶联免疫(Elisa)，高效液相色谱(HPLC)，气质联用(GC-MS)等方法。但是这些方法或灵敏度有限，或重现性较低，或前处理方式繁琐，现在已逐渐淘汰。随着色谱、质谱技术的不断发展，高效液相色谱串联质谱法（HPLC-MS/MS）逐渐兴起并成熟。

本实验以安捷伦 1290 高效液相色谱串联 AB 公司 Qtrap6500 质谱仪，高效液相色谱二元泵将流动相泵入系统并混合，自动进样器将待测样品注入流动相中，随流动相进入色谱柱，由于样品不同组分

在色谱柱中保留时间不同，各组分被分开，依次进入离子源。在离子源中，各组分以电喷雾电离(ESI)方式电离，被加速后进入质量分析器。Qtrap6500 质量分析器由 Q1、Q2、Q3 三级质谱串联组成。Q1 可将分子离子按质荷比(m/z)大小分开，Q2 是碰撞室，可将母离子进一步裂解为碎片离子；Q3 具有四级杆和线性离子阱两种功能，作为四级杆时可将分子离子或碎片离子按质荷比大小分开，作为离子阱还可富集离子从而提高检测灵敏度。各组分的不同离子在质量分析器中被破碎、分离，并按质荷比大小依次抵达监测器，得到检测数据。

本实验以多反应检测（MRM）模式扫描检测待测物质。该模式是一种基于已知或假定的反应离子信息，有针对性地选择数据进行质谱信号采集，对符合规则的离子进行信号记录，去除不符合规则离子信号的干扰，通过对数据的统计分析从而获取质谱定量信息的质谱技术。该模式由于通过两级离子选择，排除大量干扰离子，使质谱的化学背景降低，目标检测物的信噪比显著提高，从而实现检测的高灵敏度。并且由于选择性的质谱信号采集中，避免了待测分子离子化、质谱信号的抑制及源内碰撞碎裂过程的影响，使得实验有良好的重现性。进而提高了检测的准确性，因此适合作为定量分析的工具。对于待测物，我们将检测 2 个或以上的碎片离子，并将其出峰时间、响应值之比同标准品对应，以鉴定检出物，最终以标曲对检出的待测物定量。

二、材料与方法

2.1 试剂、耗材与标准品

油菜素内酯(BL)标准品(购自 OIchem 公司)

栗木甾酮(CS)标准品(购自 OIchem 公司)

6-脱氧栗甾酮(6DCS)标准品(购自 Sigma 公司)

色谱级甲醇、乙腈(购自德国默克)

CNW Poly-sery MCX SPE 固相萃取小柱（500 mg，6 ml 上海安谱）

2.2 仪器设备

TG-16G 台式高速离心机（湖南凯达科学仪器有限公司）

FA1204 电子天平（梅特勒）

AGLIENT1290 高效液相色谱仪（美国 AGLIENT 公司）

SCIEX-6500Qtrap(MSMS)（美国 AB 公司）

CHA-2 气浴恒温摇床（苏州威尔实验用品公司）

PS40A 超声清洗仪（深华泰科学仪器有限公司）

水浴氮吹仪（上海那艾仪器有限公司）

2.3 材料

客户提供植物样品材料

2.4 激素提取方案

2.4.1 试剂配制

2.4.1.1 提取缓冲液配置

样品提取液：95%甲醇

2.4.1.2 标曲溶液配置

①取甲醇溶液 994 μl 加入 1.5 ml 离心管，加入 500 μg/ml 每种激素标准品储备液各 2 μl，震荡均匀，配置为终浓度 1 μg/ml 的使用母液以备后续使用。

②取甲醇溶液对步骤①中配置的母液分别进行稀释，配置为终浓度 0.5 ng/ml,2 ng/ml,5 ng/ml,20 ng/ml,50 ng/ml,100 ng/ml,200 ng/ml 的标曲溶液。

2.4.1.3 流动相配置

有机相：色谱纯甲醇。

无机相：取超纯水 900 ml 加入 1 L 容量瓶，加入 4 ml 25%氨水，以超纯定容至 1 L，颠倒混匀。

2.4.2 提取步骤

2.4.2.1 植物激素提取

(1) 将客户提供的所有样品于液氮中研磨至粉碎，准确称量全部新鲜植物样品于试管中；

(2) 加入 4℃预冷的 95%甲醇 10 ml，4℃提取 2 h；

(3) 10000 g,4℃,离心 5 min，取上清，沉淀再提取一次，合并上清液，过 MCX 预装柱，以 3 ml 甲醇洗脱；

(4) 氮气吹干甲醇，加入 200 μl 甲醇溶解，过 0.22 μm 滤膜，进 HPLC-MS/MS 检测

2.5 HPLC-MS/MS 方案

2.5.1 液相条件

色谱柱；

柱温：35℃；

流动相：A:B=（甲醇）:（水/0.1%氨水）；

洗脱梯度：

表 1 液相梯度参数
Table1. Gradient Parameters of HPLC

时间(min)	流速(mL/min)	A%
0-2	0.35	80
2-3.5	0.35	由 80 递增至 85
3.5-6	0.35	95
6-6.1	0.35	由 95 递减至 80
6.1-10	0.35	80

进样体积：2 μl。

2.5.2 质谱参数

电离方式：ESI 正离子模式

扫描类型：MRM

气帘气：15 psi

喷雾电压： +4500 v

雾化气压力：65 psi

辅助气压力：70 psi

雾化温度： 350 ℃

表 2、植物激素质子化或去质子化的选择反应监测条件([M+H]$^+$or[M-H]$^-$)
Table2.selected reaction monitoring conditions for protonated or deprotonated plant hormones([M+H]$^+$or[M-H]$^-$)

物质名称	极性	母离子（m/z）	子离子（m/z）	解簇电压 (V)	碰撞能量（V）
BL	+	481.6	445.3*/315.3	230	29/57
CS	+	465.3	429.4*/269.1	44	21/27
6DCS	-	449.4	377.2*/319.3/128.9	-60	-29/-30/-31

注：标记*的为定量离子

三、实验结果与分析

3.1 实验结果

仪器所测得浓度为最终提取液的浓度，经计算获得原样品中激素含量，计算方法如下：

植物样品中激素含量(ng/g)=检测浓度(ng/ml)×稀释体积(ml)/称取质量(g)
其中稀释体积为样品最终溶解进样时所用的溶液体积，称取质量为提取时的取样质量。

检测浓度由待测物质峰面积代入标曲方程，由仪器自动求得。

表 3、BL 检测结果
Table3.Detection result of BL

样品名称	稀释体积(ml)	称取质量(g)	检测浓度(ng/ml)	激素含量(ng/g)
A_1	0.200	0.6417	0.58	0.18
A_2	0.200	0.5149	0.46	0.18
A_3	0.200	0.6631	0.64	0.19
B_1	0.200	0.5114	0.28	0.11
B_2	0.200	0.5008	0.35	0.14
B_3	0.200	0.5441	0.34	0.12
C_1	0.200	0.6465	0.27	0.084
C_2	0.200	0.5958	0.46	0.15
C_3	0.200	0.5479	0.32	0.12
D_1	0.200	0.4785	0.34	0.14
D_2	0.200	0.4711	0.26	0.11
D_3	0.200	0.4882	0.31	0.13

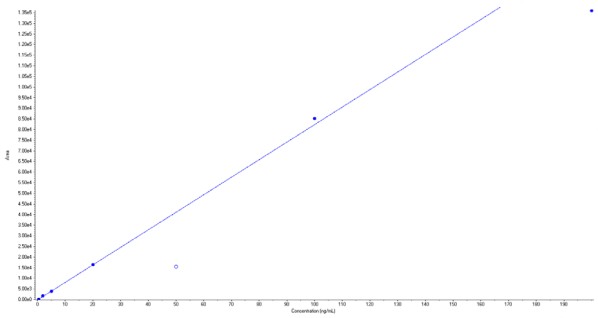
表 4、CS 检测结果
Table4.Detection result of CS

样品名称	稀释体积(ml)	称取质量(g)	检测浓度(ng/ml)	激素含量(ng/g)
A_1	0.200	0.6417	0.73	0.23
A_2	0.200	0.5149	0.67	0.26
A_3	0.200	0.6631	0.84	0.25
B_1	0.200	0.5114	0.68	0.27
B_2	0.200	0.5008	0.73	0.29
B_3	0.200	0.5441	0.63	0.23
C_1	0.200	0.6465	0.61	0.19
C_2	0.200	0.5958	0.61	0.20
C_3	0.200	0.5479	0.82	0.30
D_1	0.200	0.4785	0.50	0.21
D_2	0.200	0.4711	0.70	0.30
D_3	0.200	0.4882	0.74	0.30

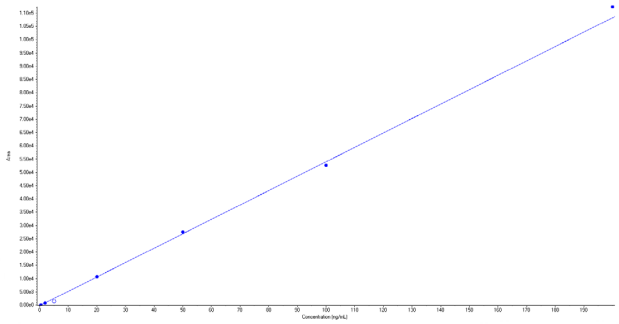
表 5、6DCS 检测结果
Table5.Detection result of 6DCS

样品名称	稀释体积(ml)	称取质量(g)	检测浓度(ng/ml)	激素含量(ng/g)
A_1	0.200	0.6417	14.07	4.39
A_2	0.200	0.5149	11.37	4.42
A_3	0.200	0.6631	15.68	4.73
B_1	0.200	0.5114	7.97	3.12
B_2	0.200	0.5008	9.19	3.67
B_3	0.200	0.5441	8.51	3.13
C_1	0.200	0.6465	14.04	4.34
C_2	0.200	0.5958	14.76	4.95
C_3	0.200	0.5479	12.85	4.69
D_1	0.200	0.4785	6.07	2.54
D_2	0.200	0.4711	9.06	3.85
D_3	0.200	0.4882	5.40	2.21

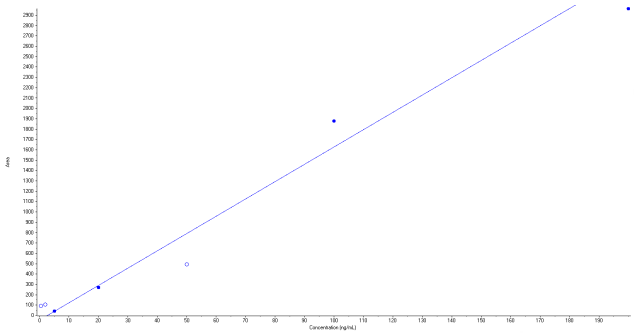
3.2 标准曲线



(a)



(b)



(c)

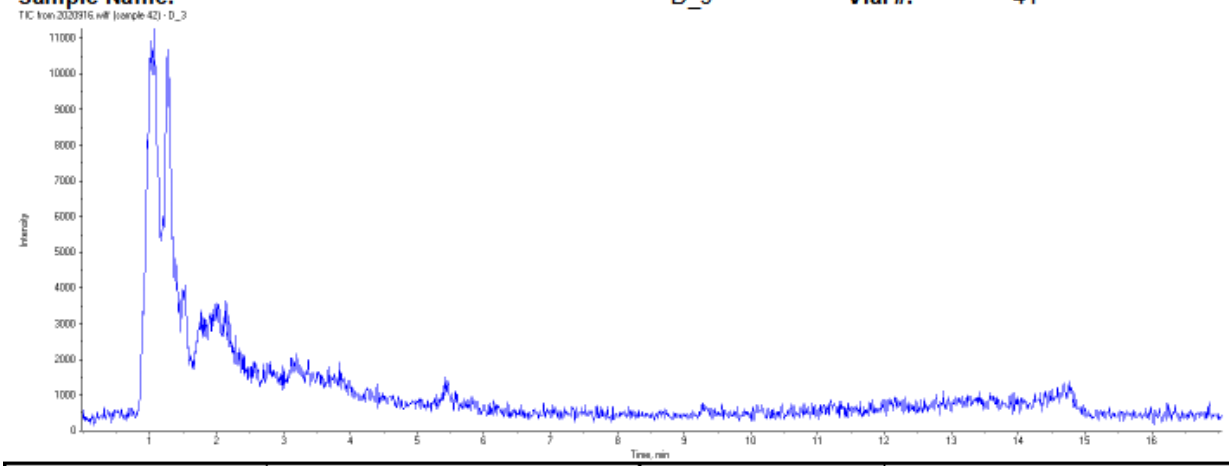
图 1、校准曲线。(a)BL 标准曲线；(b)CS 标准曲线；(c)6DCS 标准曲线。
Picture1. Calibration curve.

表 6、校准曲线
Table6. Calibration curve

物质名称	校正曲线	相关系数 R	权重
BL	y=825.00044 x + -156.70691	(r = 0.99162)	$1/x^2$
CS	y = 542.52442 x + -229.57693	(r = 0.99932)	$1/x^2$
6DCS	y = 16.71579 x + -43.99990	(r = 0.99231)	$1/x^2$

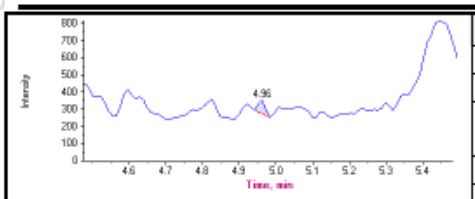
3.3 原始数据

Sample Name: D_3 **Vial #:** 41

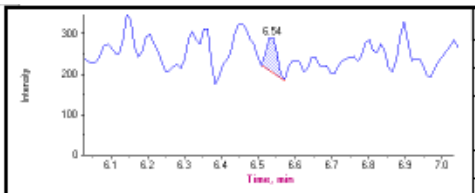


Sample Name	D_3	Injection Vial	41
Data File	2020916.wiff	Injection Volume	5.00
Acquisition Date	9/16/2020 10:59:20 PM	Algorithm Used	MQ4
Acquisition Method	BLs.dam	Sample Type	Unknown
Instrument Name	QTRAP 6500 Low Mass	Result Table	N/A
Sample ID		Dilution Factor	1.00
Sample Comment		Weight to Volume	N/A

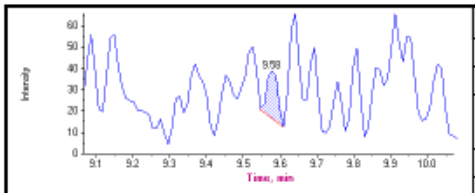
Approved By (Date and Initials):_____.



Compound Name:	BR1 (481.2 / 445.3)
Expected RT:	4.98
Actual RT:	4.96
Equation:	y = 825.00044 x + -156.70691 (r = 0.99162) (weighting: 1 / x^2)
Area Counts:	1.016e2
ISTD Area Counts:	N/A
Amount:	0.31 (ng/mL)



Compound Name:	CS1 (465.3 / 429.4)
Expected RT:	6.53
Actual RT:	6.54
Equation:	y = 542.52442 x + -229.57693 (r = 0.99932) (weighting: 1 / x^2)
Area Counts:	1.698e2
ISTD Area Counts:	N/A
Amount:	0.74 (ng/mL)



Compound Name:	6DCS2 (449.4 / 377.2)
Expected RT:	9.57
Actual RT:	9.58
Equation:	y = 16.71579 x + -43.99990 (r = 0.99231) (weighting: 1 / x^2)
Area Counts:	4.625e1
ISTD Area Counts:	N/A
Amount:	5.40 (ng/mL)