ICS 65.020.01
CCS B 20

T/GXNS

团 体 标 准

T/GXNS XXXX—XXXX

葡萄植株中 7 种植物激素含量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of 7 phytohormones in grape by liquid chromatography-Mass spectrometry/Mass spectrometry

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布 XXXX－XX－XX 实施

广西农产品质量安全服务协会 发 布

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西大学提出。

本文件由广西农产品质量安全服务协会归口。

本文件起草单位：广西大学、广西西大检测有限公司、广西亚热带作物研究所、广西壮族自治区产品质量检验研究院、广西思浦林科技有限公司。

本文件主要起草人：梁琼月、黄宏飞、石梁稳、范晓苏、吕丽兰、王博、何明远、黄丽宁、裴根、沈方科、路丹、覃雪、隆银燕、王士伟、黄超技、梁芳婷。

葡萄植株中 7 种植物激素含量的测定
液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件描述了液相色谱-质谱/质谱法测定葡萄植株中7种植物内源激素含量的原理，规定了试剂和材料、仪器和设备、分析步骤、结果计算和表述、精密度等的要求。

本标准适用于葡萄植株的叶、芽、果等组织中玉米素、玉米素核苷、赤霉素A3、生长素、水杨酸、茉莉酸、脱落酸含量的测定。

本标准的方法检出限详见附录A中表A.1。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

植物激素 plant hormone

由植物自身合成，通常自产生部位移动到作用部位，并在极低浓度下具有显著生理作用的微量有机物质，也被称为植物天然激素或植物内源激素。

4 原理

试样用异丙醇混合溶液低温震荡提取植物激素，经反相色谱柱分离，液相色谱-质谱/质谱法进行测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法使用的试剂均为色谱纯；水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 异丙醇。

5.2 甲醇。

5.3 二氯甲烷。

5.4 盐酸，优级纯。

5.5 异丙醇+水+盐酸（2+1+0.003）：取 20 mL 异丙醇（5.1）加 10 mL 水，再加入 0.03 mL 盐酸（5.4），混匀。

5.6 50%甲醇溶液：取 50 mL 甲醇（5.2）加 50 mL 水，混匀。

5.7 植物激素标准品：玉米素、玉米素核苷、赤霉素 A_3、生长素、水杨酸、茉莉酸、脱落酸，化合物信息详见附录 A 中表 A.1，纯度均≥98%。

5.8 单一标准储备液：分别准确称取各植物激素标准品（精确至 0.1 mg）至棕色容量瓶中，加入甲醇（5.2）溶解配成浓度为 1000 μg/mL 的标准储备溶液，于-80 ℃避光保存，有效期为 6 个月。

5.9 混合标准储备液：分别吸取 7 种植物激素标准储备液 0.1 mL（5.8），置于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释成浓度为 10 μg/mL 的混合标准储备液，于-80 ℃避光保存，有效期为 3 个月。

5.10　混合标准工作溶液：分别准确吸取一定量的混合标准储备液（5.9）于 10 mL 棕色容量瓶中，加入已预冷的 50%甲醇溶液（5.6）定容稀释成浓度为 0.02 ng/mL~100 ng/mL 的植物激素混合标准工作溶液，临用新配。
5.11　液氮。
5.12　滤膜：0.22 μm 滤膜，有机相。

6　仪器和设备

6.1　液相色谱-质谱/质谱仪：配电喷雾离子源（ESI）。
6.2　电子天平：感量 0.1 mg。
6.3　涡旋混匀器。
6.4　低温震荡仪：温度可至 5℃。
6.5　超低温冰箱：温度可至-80 ℃。
6.6　氮吹仪。

7　分析步骤

7.1　样品制备

分别取新鲜的葡萄植株的叶、芽、果等部位供试样，迅速用超纯水洗净样品附着的杂物，表面水分用吸水纸擦干，立即保存于液氮中。将样品从液氮中取出，置于研钵中加液氮磨细，混匀，立即转移至-80 ℃冰箱避光保存。

7.2　试样处理

称取 0.2 g（精确至 0.1 mg）制备好的试样于 15 mL 塑料离心管中，加入 2 mL 预冷（4 ℃）的提取剂（5.5），置于 5 ℃震荡仪中以 200 r/min 振荡 1 h，再加入 4 mL 预冷（4 ℃）的二氯甲烷（5.3），继续震荡 1 h，取二氯甲烷层氮吹至近干。加入 0.5 mL 预冷（4 ℃）的 50%甲醇溶液（5.6）复溶，漩涡混匀，经 0.22 μm 滤膜过滤，滤液供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

7.3　仪器参考条件

7.3.1　液相色谱参考条件

a）　色谱柱：BEH C18柱，2.1 mm × 100 mm，粒度1.7 μm，或性能相当者；
b）　流动相：流动相A为0.1%甲酸水溶液，流动相B为甲醇，梯度洗脱程序见表1；
c）　流速：0.3 mL/min；
d）　柱温：40 ℃；
e）　进样量：5 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A 体积分数/%	流动相 B 体积分数/%
0	80	20
6	50	50
8	0	100
10	0	100
10.1	80	20
13	80	20

7.3.2 质谱参考条件

a） 离子源：ESI源；
b） 扫描方式：正离子扫描模式和负离子扫描模式（参见附录B）；
c） 检测方式：多反应监测(MRM）；
d） 干燥气、雾化气、碰撞气均为高纯氮气，使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求，参考条件参见附录B；
e） 监测离子对、锥孔电压、碰撞能量等参数应优化至最佳灵敏度，参考条件参见附录B。

7.4 测定

7.4.1 定性测定

在相同实验条件下进行样品测定时，如果样品中待测物质的保留时间和标准工作溶液中对应的保留时间一致（变化范围在±2.5%以内），且样品谱图中待测组分监测离子的相对丰度和浓度相当的标准品的相对丰度一致，允许偏差不超过表 2 规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物。

表2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20～50	>10～20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

7.4.2 定量测定

在相同实验条件下，将植物激素系列混合标准工作溶液由低到高浓度依次进样分析，以被测物的峰面积为纵坐标，以被测物的浓度为横坐标，根据样品含量绘制标准工作曲线，外标法定量，应使样品溶液中各被测物的响应值在仪器测定的线性范围内，如果含量超过标准工作曲线范围上限，应适当稀释样液后重新测定。上述条件下，各植物激素的参考保留时间参见附录B中表B.1，多反应监测图参见附录C。

7.5 平行试验

按7.2～7.4步骤对同一试样进行两次平行测定。

7.6 空白试验

除不称取试样外，按7.2～7.4步骤进行空白操作。

8 结果计算和表述

试样中待测物的含量ω按公式（1）计算：

$$\omega = \frac{C \times V \times f}{m} \qquad \text{……（1）}$$

式中：

ω ——试样中待测物含量，单位为纳克每克（ng/g）；
C ——从标准工作曲线上得到的被测组分溶液质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
f ——稀释倍数；
V ——定容体积的数值，单位为毫升（mL）；
m ——试样质量的数值，单位为克（g）。

计算结果应扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 精密度

9.1 在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于其算术平均值的 15%。

9.2 在再现性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于其算术平均值的 20%。

附录A
(规范性附录）
7种植物激素中英文名字（缩写）、CAS号、方法检出限

7 种植物激素中英文名字（缩写）、CAS 号、方法检出限见表 A.1。

表A.1 7种植物激素中英文名字（缩写）、CAS号、方法检出限

序号	中文名称	英文名称（缩写）	CAS号	方法检出限/(ng/g)
1	玉米素	trans-Zeati（Z）	1637-39-4	0.25
2	玉米素核苷	trans-Zeatin-Riboside（ZR）	6025-53-2	0.025
3	生长素	Auxin（IAA）	87-51-4	0.125
4	赤霉素A_3	Gibberellins（GA_3）	77-06-5	0.25
5	水杨酸	Salicylic Acid（SA）	69-72-7	0.125
6	脱落酸	Abscisic Acid(ABA）	14375-45-2	0.25
7	茉莉酸	Jasmonic Acid（JA）	3572-66-5	0.125

附录B
(资料性附录)
液相色谱-质谱/质谱参数参考条件

液相色谱-质谱/质谱参数参考条件如下：

a） 离子源：电喷雾离子源（ESI）

b） 扫描模式：正离子扫描模式和负离子扫描模式（参见表B.1）；

c） 离子源温度：105 ℃；

d） 电喷雾电压：4800 V；

e） 碰撞气流量：0.75 mL/min；

f） 去溶剂气流量：6 L/min；

g） 挡板电压：700 V；

h） 去溶剂气温度：480 ℃；

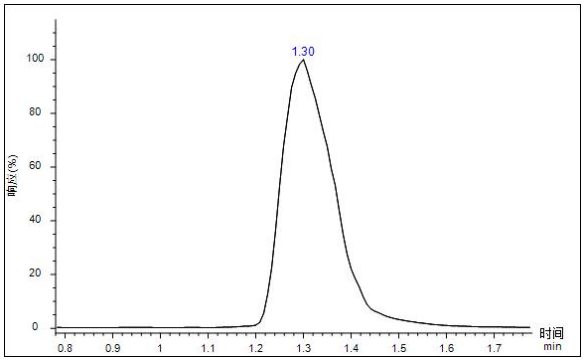
i） 定量离子对、定性离子对、锥孔电压、碰撞能量见表B.1。

表B.1 7种植物激素的保留时间、监测离子对、锥孔电压和碰撞能量

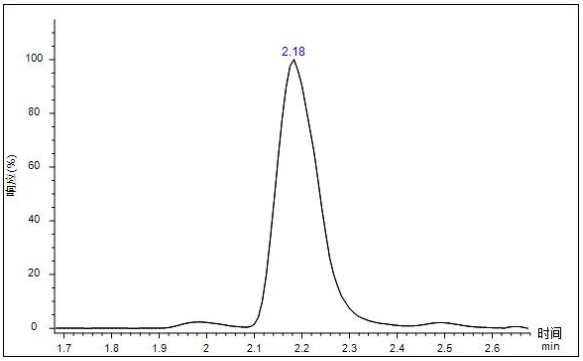
序号	中文名称	英文名缩写	保留时间 min	定量离子 m/z	定性离子 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 V
正离子扫描模式							
1	玉米素	Z	1.30	220.2/136	220.2/136；220.2/202.2	50	20；14
2	玉米素核苷	ZR	2.18	352.2/136.1	352.2/136.1；352.2/220.2	50	42；20
3	生长素	IAA	4.39	176.1/130	176.1/130；176.1/102.9	50	18；40
负离子扫描模式							
4	赤霉素A_3	GA_3	3.79	345.1/143	345.1/143；345.1/221.1	50	36；36
5	水杨酸	SA	4.98	137.1/93.1	137.1/93.1；137.1/65.1	50	18；34
6	脱落酸	ABA	6.27	263.1/219.1	263.1/219.1；263.1/153	50	14；12
7	茉莉酸	JA	7.38	209.1/59.2	209.1/59.2	50	14

附录C
(资料性附录)
7种植物激素的多反应监测（MRM）色谱图

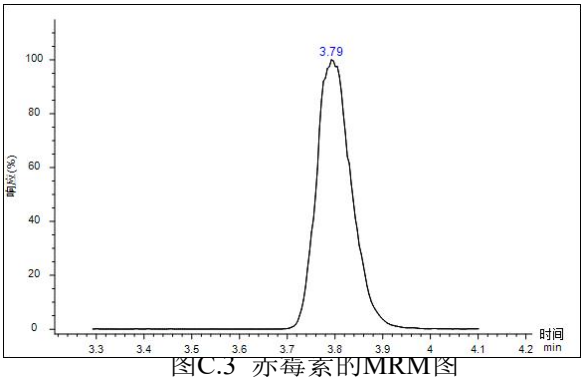
7 种植物激素的多反应监测（MRM）色谱图如图 C.1～图 C.7。



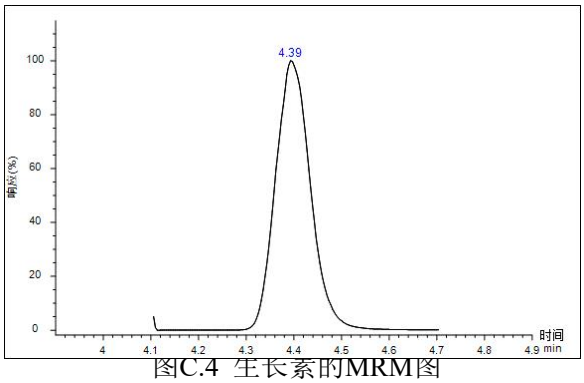
图C.1 玉米素的MRM图



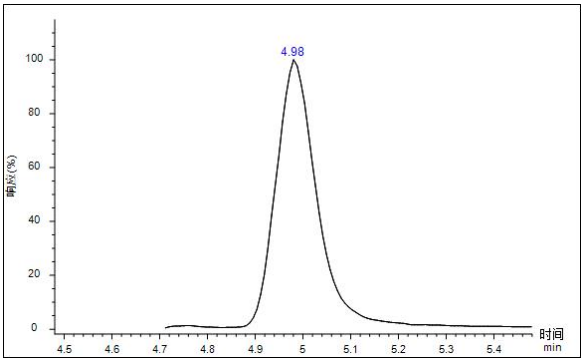
图C.2 玉米素核苷的MRM图



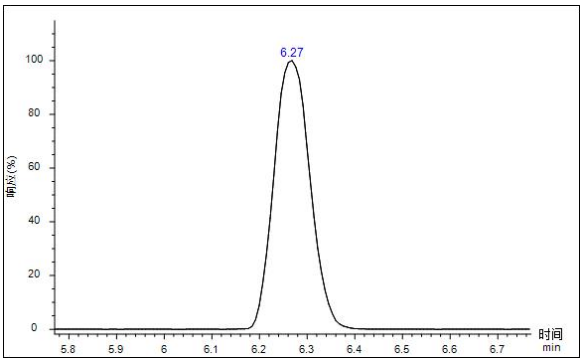
图C.3 赤霉素的MRM图



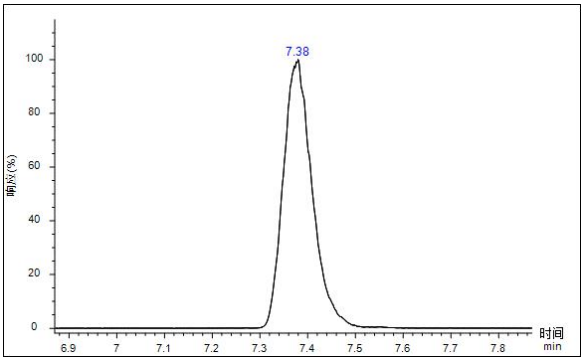
图C.4 生长素的MRM图



图C.5 水杨酸的MRM图



图C.6 脱落酸的MRM图



图C.7 茉莉酸的MRM图