DOI：10.19789/j.1004-9398.2024.04.010
文献引用：徐奭，盛仙永，崔素霞.液相色谱质谱联用分离鉴定酸性植物激素的初级教学实验[J].首都师范大学学报（自然科学版），2024，45（4）：77-84. XU S，SHENG X Y，CUI S X. Elementary teaching experiment on the separation and identification of acidic plant hormones by LC-MS [J]. Journal of Capital Normal University（Natural Science Edition），2024，45（4）：77-84.

液相色谱质谱联用分离鉴定酸性植物激素的初级教学实验*

徐　奭，盛仙永，崔素霞**

（首都师范大学生命科学学院，北京　100048）

摘要：液相色谱质谱联用仪（LC-MS）是目前检测脱落酸、吲哚乙酸等植物激素的重要技术手段之一。为了巩固学生对LC-MS基本概念与原理的掌握，提高学生的实践能力，培养学生实验素养，针对目前国内LC-MS实验教学存在的主要问题，本文提供了从易至难的5个基础教学实验，可使学生了解LC-MS样品前处理的基本过程，认识实际样品的复杂性和痕量植物激素检测的瓶颈问题，初步了解实际样品中ABA含量的计算方法。连续3个学期在研究生一年级仪器分析课的实践表明，这5个教学实验的学习实践活动能培养学生使用现代大型分析仪器的能力，提升学生学习仪器分析技术的兴趣。

关键词：教学实验；脱落酸；吲哚乙酸；液相色谱质谱联用仪；定性检测
中图分类号：Q943　　**文献标志码**：A

Elementary teaching experiment on the separation and identification of acidic plant hormones by LC-MS*

XU Shi，SHENG Xianyong，CUI Suxia**

（College of Life Sciences，Capital Normal University，Beijing　100048）

Abstract：Liquid chromatography-mass spectrometry（LC-MS）is currently one of the important technical means for the detection of plant hormones such as abscisic acid（ABA）and indole-3-acetic acid. In order to consolidate students' grasp of the basic concepts and principles of LC-MS，improve their practical abilities and cultivate their experimental literacy，this paper provides 5 basic teaching experiments，ranging from easy to difficult，to address the main problems in current domestic LC-MS experimental teaching. These experiments can help students understand the basic process of LC-MS sample pretreatment，recognize the complexity of real samples and the bottleneck issues in the determination of trace plant hormones and learn preliminarily the method for the calculation of ABA content in real samples. After consecutive practice for three semesters in the Instrument Analysis course for the first year graduate students，these five teaching experiments have shown their teaching efficiency to cultivate the ability for students to use modern large-scale analytical instruments and to enhance their interest to learn instrument analysis technology.

收稿日期：2023-12-29
* 国家自然科学基金面上项目（31970296）
** 通信作者：sxcui@cnu.edu.cn

Keywords: teaching experiment; abscisic acid; indole-3-acetic acid; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); qualitative detection
CLC: Q943 **DC**: A

0 引 言

液相色谱质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)是一种非常重要的分析测试方法,具有广泛的科研应用[1]。由于能够提高学生仪器分析的基础知识、实践能力和实验素养,LC-MS在国内外被普遍用于大型仪器分析实验教学[2-5]。相比大分子蛋白质,LC-MS更适合快速分离鉴定小分子的初级教学实验,且具有一定的学术意义与实践价值。本文以小分子的吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)和脱落酸(abscisic acid, ABA)为例,展开LC-MS教学实验设计。

IAA和ABA是植物体内的2种重要酸性植物激素:IAA控制着植物细胞的分裂、伸长和分化,对植物的生长和发育起着至关重要的作用[6-8];ABA在植物体的胚胎发育、种子休眠、气孔关闭和果实成熟等生理过程中均具有重要的调控作用[9-10],在植物应对温度胁迫、干旱、盐胁迫和渗透胁迫等逆境胁迫中起着重要的调节作用[11-12]。IAA和ABA等通过复杂的信号转导网络对植物的生命活动进行调控[13],准确检测植物体内IAA和ABA的含量对深入研究其分子机制,培育高产、抗旱和抗病虫害的农作物至关重要[14]。目前酸性植物激素的检测技术主要包括生物测定法、免疫测定法、电分析法、色谱法和质谱法[15-16]。其中LC-MS是后2种方法结合的典型应用,具有高分离度、高灵敏度、高分辨率及高准确度等优势,能够实现对复杂样品的定性和定量分析,是目前植物激素检测的强有力工具之一[9,17-18],且在生命科学、医学、环境科学及食品科学等领域有广泛的应用[1]。

由于LC-MS仪器价格相对昂贵,与选课学生数相比,高校购买的可供教学使用的仪器数量非常少;同时,与常规分析仪器相比,LC-MS操作步骤较复杂,且对学生实验技能要求较高。目前,国内外该实践课程普遍存在学生操作仪器时间不足,学生的学习和探索实践严重滞后。这些均为LC-MS实验课程高品质地实施增加了难度[2,19],LC-MS的开放使用更是难以实现。解决此核心教学问题的方法之一是设计合理、高效的LC-MS基础教学实验,使其能在实际操作培训课程中发挥理想的教学效果。

近年来,为了提高学生的学习兴趣、创新能力和科研思维,基于课程的本科生科学研究训练(course-based undergraduate research experience, CURE)被广泛应用于本科生及低年级研究生的大型仪器分析实验教学[2-5]。本文结合CURE教学理念,利用首都师范大学生命科学学院公共仪器平台Waters超高效LC-MS仪,在一年级研究生仪器分析课中,从易至难提供了5个LC-MS基础教学实验,以期巩固学生液相色谱和质谱的重要基础理论知识、锻炼实践能力、提高学生大型仪器分析水平和学习兴趣,为后续学生能独立、安全地操作LC-MS进行科研探索奠定基础;同时也可以为慕课、网上教学和虚拟仿真等信息技术所支持的LC-MS可视化操作视频提供合理可行的课程参考素材。

1 实验部分

1.1 试剂

色谱级IAA、ABA标准物质购自上海源叶公司;色谱纯甲醇和乙腈购自美国Fisher Scientific公司;质谱级甲酸购自美国Thermo Scientific公司;亮氨酸脑啡肽标准物质leucine-enkephalin购自美国Waters公司;避光锡纸购自北京江晨公司;液氮购自北京东泰通达科贸有限公司。实验用水均为超纯水。

1.2 仪器

使用德国赛多利斯(Sartorius)生产的CPA225D型天平称样品质量;使用昆山仪器厂生产的KQ-50DB型数控超声波清洗器超声提取样品溶液;使用德国EPRO公司生产的5417R型台式离心机离心样品溶液,离心力为16 000 N、离心时间为10 min;使用海门其林贝尔仪器制造有限公司生产的QL-901型振荡混合器振荡混匀溶液;使用美国Labconco公司生产的CentriVap Concentrator型真空离心浓缩仪浓缩溶液;使用上海乐枫生物科技有限公司生产的Advantage A10 Milli-Q纯水仪制备实验用水,电阻率为18.2 MΩ·cm。

使用美国Waters公司的Acquity UPLC-Synapt HDMS超高效液相色谱-高分辨率飞行时间质谱仪

(ultra-performance liquid chromatography/high definition time-of-flight mass spectrometry, UPLC-TOF-MS)定性和定量检测IAA和ABA,搭配美国Waters公司的UPLC BEH型C18色谱柱(2.1 mm×50.0 mm,涂层厚度为1.7 μm),柱温30 ℃,进样体积为5 μL;色谱条件(1)的流动相为水和乙腈,梯度洗脱程序为:起始0,$V_{水}$∶$V_{乙腈}$=85∶15;5.0 min,$V_{水}$∶$V_{乙腈}$=60∶40;5.5 min,$V_{水}$∶$V_{乙腈}$=20∶80;8.0 min,$V_{水}$∶$V_{乙腈}$=10∶90;结束10.0 min,$V_{水}$∶$V_{乙腈}$=85∶15;流动相流量为0.5 mL/min。色谱条件(2)的流动相为含0.1%甲酸的水和乙腈,梯度洗脱程序为:起始0,$V_{水}$∶$V_{乙腈}$=85∶15;5.0 min,$V_{水}$∶$V_{乙腈}$=60∶40;结束5.5 min,$V_{水}$∶$V_{乙腈}$=20∶80;流动相流量为0.5 mL/min。质谱条件:电喷雾离子源阳离子模式,扫描范围50~2 000 Da,扫描时间1 s;采用TOF-MS一级全扫描和TOF-MS-MS二级碎片离子扫描模式,IAA和ABA母离子的质荷比(m/z)分别为176和265[20]。使用1 ng/μL亮氨酸脑啡肽标准物质进行质谱仪的调谐和温度补偿校正,其中注入速度为20 μL/min,检测m/z=556.277 1。在元素成分分析实验之前,使用甲酸钠标准溶液($V_{10\%甲酸}$∶$V_{0.1\ mol/L\ NaOH}$∶$V_{乙腈}$=1∶1∶8)校正仪器的质量轴。

1.3　标准溶液的配置

分别称取1.0 mg IAA和1.0 mg ABA置于烧杯中,分别加入228.6和151.5 μL甲醇,搅拌溶解得到25.0 mmol/L的IAA和ABA标准溶液,命名为母液,避光保存在4 ℃冰箱中备用。

取1.0 mL甲酸加入100.0 mL乙腈中,超声混匀后备用,命名为提取液。

取1.0 μL 25.0 mmol/L的ABA和IAA母液,分别加入24.0 μL甲醇,得到1.0 mmol/L IAA和ABA标准溶液;取1.0 μL 1.0 mmol/L ABA和IAA标准溶液,分别加入99.0 μL甲醇,得到10.0 μmol/L的ABA和IAA标准溶液,待测。溶液现用现配。

1.4　植物样品前处理

2023年11月21日摘取首都师范大学本部理科楼内室温(21~25 ℃)盆栽的1株银杏绿色叶片,参考戴琛等[14]的方法前处理植物样品。称取250.0 mg银杏叶片置于液氮中冻干后研磨,加入1.5 mL提取液,超声60 min,离心并收集上清液;向沉淀中加入1.0 mL提取液,振荡10 min后,离心并收集上清液;合并2次上清液,45 ℃真空干燥1 h,得到固体粉末;将其重新溶于550.0 μL甲醇中,命名为植物提取液,待测。

1.5　教学实验

为了巩固学生对LC-MS基本概念与原理的掌握,提高学生的实践能力,培养一年级研究生的实验素养,本文从易至难提供了5个基础教学实验。

1.5.1　教学实验1

实验目的:辨别溶剂杂质峰及不同物质的量浓度ABA标准溶液的液相色谱和质谱图,包括保留时间、标准色谱峰、母离子和特征碎片离子的识别等。

实验方法:在色谱条件1和质谱条件下,分别进样甲醇、5.0和10.0 μmol/L ABA标准溶液,对比色谱图和质谱图。

实验意义:学会辨别溶剂杂质峰,设计更合理的液相分离洗脱梯度以避免溶剂杂质峰的干扰;学习液相色谱图、质谱图的基本分析方法,掌握包括保留时间的意义、合格色谱峰的标准、母离子与特征碎片离子的识别等内容;熟悉液相色谱仪的基本构造和工作原理、掌握质谱仪离子源去溶剂化的基本过程、熟悉离子飞行时间对应质荷比的计算公式,掌握调谐参数基本设置。

实验要求:了解不同危险化学品的特性,认识有机试剂乙腈、甲醇的易燃性和可挥发性;增强使用甲酸等腐蚀性试剂的安全意识。

1.5.2　教学实验2

实验目的:分离并鉴定不同物质的量浓度ABA和IAA混合标准溶液。巩固并运用教学实验1所学内容进行色谱、质谱数据分析,进一步掌握定性和定量分析的方法。

实验方法:在色谱条件2和质谱条件下,进样5.0和10.0 μmol/L的ABA和IAA混合标准溶液,对比色谱图和质谱图。

实验意义:使学生进一步掌握液相色谱分离混合标准物质的技术,通过保留时间进行物质初步的定性判断,掌握液相方法的基本参数设置,巩固色谱、质谱的数据分析。

实验要求:增强对电器火灾的防范意识,掌握触电相关的基本常识和应急处理方法。

1.5.3　教学实验3

实验目的:对比不同碰撞能量下,不同组分母离子与特征碎片离子的区别,理解调试碰撞能量对二级碎片离子扫描的重要意义。

实验方法:比较碰撞能量分别为6、20和40 V,10.0 μmol/L ABA和IAA混合标准溶液的母离子及特征碎片离子的质谱峰强度。

实验意义:通过二级碎片离子扫描模式中的母离子,特别是特征碎片离子才能实现物质的定性分析,碰撞能量决定着离子的碎片化程度。通过本实验使学生理解调试碰撞能量对质谱鉴定实验的重要性,掌握离子碎片化程度的初步分析方法。

实验要求:了解压力容器,如液氮罐、高纯氮气、氩气钢瓶的安全使用常识。

1.5.4 教学实验4

实验目的:使学生掌握质谱仪调谐和质量轴校正的正确操作方法和合格结果的判断标准。通过ABA、IAA混合标准溶液一级全扫描和二级碎片离子扫描质谱图的分析,理解2种扫描模式的意义与区别,掌握质量色谱图的基本概念、峰面积计算方法和元素成分分析方法。

实验方法:(1)调谐。指导学生使用亮氨酸脑啡肽标准物质进行质谱仪的调谐,灵敏度<2e^2,TOF每次push的离子个数(IPP)<0.1,分辨率8 000~10 000,保证质谱峰有较好的峰形。(2)质量轴校正。指导学生使用甲酸钠标准溶液校正质量轴,相对误差结果<1.6×10^{-6}。(3)在色谱条件2和质谱条件下,进样10.0 μmol/L的ABA和IAA混合标准溶液。首先,进行TOF-MS全扫描获得质谱图;其次,从ABA和IAA的质谱图中分别获得2个组分的母离子[20];再次,以这2个母离子进行二级碎片离子扫描,得到ABA和IAA的碎片离子;最后,使用仪器软件进行元素成分分析,获得分子式、相对分子质量、实测值和理论计算值的绝对误差及相对误差,计算峰面积。

实验意义:通过对比母离子和特征碎片离子的质荷比了解分子离子的裂解途径,增强学生对质谱定性解析原理的理解。进一步学习质谱仪各部分的构造和功能,使学生掌握质谱方法的参数设置。使学生认识质谱仪调谐、质量轴校正与温度补偿校正对数据质量控制的重要影响。

实验要求:掌握废液分类回收的重要原则,尤其是氧化剂和还原剂不能混存的原因。

1.5.5 教学实验5

实验目的:定性检测实际样品的ABA,使学生了解LC-MS样品前处理的基本过程,认识到实际样品的复杂性和痕量植物激素检测的瓶颈问题,初步了解实际样品中ABA含量的计算方法。

实验方法:样品1,取500.0 μL植物提取液,待测;样品2,在样品1检测后的溶液中加入50.0 μL 10.0 μmol/L ABA标准溶液,待测;样品3,在样品2检测后的溶液中加入150.0 μL 10.0 μmol/L ABA标准溶液,待测。样品1~3中的外源性ABA物质的量浓度分别为0、917.0和2 892.0 nmol/L。注:计算外源性ABA物质的量浓度时,由于使用常量样品瓶,一次加样体积>500.0 μL,自动进样器每次消耗样品体积为5.0 μL,因此本实验忽略因进样造成的ABA损失。注:若实际中样品体积较少时,因进样造成的损失不可忽略。

实验意义:通过实际样品的制备,使学生了解分析样品提取、浓缩的基本过程。室温环境下绿色银杏叶片粗提取液经过液相色谱可分离出众多组分,学生可观察对比实际样品与标准溶液色谱图的差异,了解实际样品检测的复杂性。观察实际样品保留时间为2.41 min的色谱峰,其强度和面积都非常小,提示在实际植物样品中内源性ABA含量非常低,使学生体会痕量植物激素检测技术的难点与瓶颈。指导学生在实际样品中逐渐增加外源性ABA浓度,可见保留时间为2.44 min的ABA色谱峰强度逐渐增加,而其他保留时间的色谱峰强度均未发生明显变化,推测ABA色谱峰面积随着外源性ABA浓度增加也逐渐变大,为学生未来学习酸性植物激素定量分析奠定一定的基础。

实验要求:结合CURE课程阶段1学习的实验室准入安全培训理论知识,使学生充分认识科研创新工作所面临的安全风险,在提交实验方案时要充分考虑可能存在的安全隐患,与导师及仪器管理教师讨论并提前拟定应对措施。

1.6 教学评价

采用Kirkpatrick教学效果评估模型[21-22]反应层面和学习层面的结果来评估本次教学实验。

反应层面,在课程刚结束时,通过匿名问卷调查和访谈的方式,获得学生对课程内容、流程及其他方面的直观感受和满意程度;由学院教学指导委员会协助仪器管理教师共同完成。

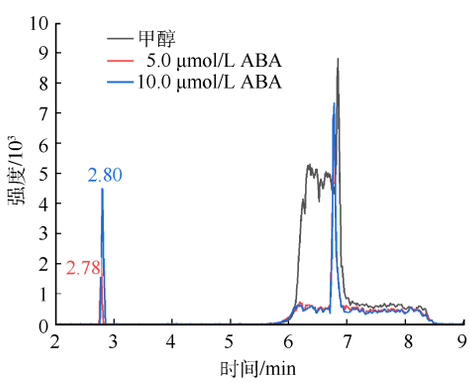
学习层面,评估学生对所学知识和技能的掌握程度,由仪器管理教师完成。对大多数学生的学习评估是在课程进行过程中,通过口头测试和观察法获得;对少数学生的学习评估是在课后,通过一对一LC-MS操作考核及口头测试获得。参考文献[23]的教学评估方法,本教学实验安排了1份笔答试卷,包含4道试题:(1)简述LC-MS仪器各部分构造的名称;(2)色谱峰定性是依靠保留时间还是峰面积;(3)元素成分分析不正确可能的原因分析;

(4)LC-MS安全运行注意事项。课前,学生在完成第1次质谱仪的调谐与校正基本操作培训,即将开始下一次操作培训前,在规定的15 min内笔答完成试题;课后,经过液相分离和质谱鉴定元素成分分析操作学习后,让学生在同样的时间内再次笔答同样的试题。每题的结果评价分为正确、部分正确和不正确3级。对比课前、课后学生作答结果的人数百分比;目测对比课前、课后学生书写字迹的变化;特别关注对第3道分析题作答内容的变化。

2　实验结果

2.1　教学实验1

甲醇、5.0和10.0 μmol/L ABA标准溶液的色谱图如图1所示。甲醇在5.75~8.50 min出现强度较大的宽峰;5.0和10.0 μmol/L ABA标准溶液的出峰情况类似,但强度不同,即在2.78和2.80 min出现正态分布的高斯峰,峰宽<0.20 min,5.75~8.50 min仍然出现甲醇中类似的宽峰。ABA标准溶液的质谱结果显示m/z=265的母离子峰强度较低,m/z=247和229的特征碎片离子峰强度相对较高。



注:ABA为脱落酸。

图1　不同溶液的色谱图

在危险化学品安全教育方面,管理教师提醒学生关注相关试剂的化学品安全技术说明书,对应国家颁布的易制毒、易制爆危险化学品名录,了解其安全属性和等级。使学生掌握LC-MS常用有机试剂色谱级乙腈、甲醇溶液为高度易燃试剂的基本常识,严格避免在操作该试剂的过程中使用明火。针对有机试剂的挥发性,向学生强调实验过程中需佩戴个人防护装置。在流动相中添加的甲酸具有腐蚀性,因此特别提醒学生在操作过程中不要沾染到皮肤或眼睛里,并告知学生一旦沾染的急救处理方法:先用干净的纸或布把甲酸擦掉,再用大量清水洗消;其中洗眼要从侧面入水和出水,避免溅入眼睛。

2.2　教学实验2

为避免溶剂杂质峰的干扰,重新建立液相分离洗脱梯度,洗脱时间从10.0 min缩短至5.5 min。不同物质的量浓度IAA和ABA混合标准溶液的色谱结果如图2所示,二者保留时间分别为1.87和2.36 min(高浓度IAA为1.96 min),均为左右对称正态分布的高斯峰,峰宽<0.20 min。IAA的质谱结果显示m/z=176的母离子峰强度中等偏大,m/z=158的特征碎片离子峰强度相对较低,m/z=130的特征碎片离子峰强度相对较高。

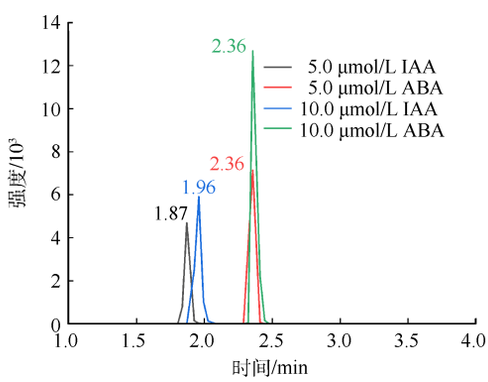


图2　吲哚乙酸(IAA)和ABA混合标准溶液的色谱图

在仪器设备火灾风险的安全教育方面:强调规范操作大型仪器设备以避免火灾或其他人员伤亡和重大财产损失的重要性;了解电器火灾可能具有高压电的特性,为避免触电,使用灭火器前务必要先断电,再灭火的基本原则;掌握避免触电的相关知识,如注意溶液导电性和不要湿手摸电器的基本常识。

2.3　教学实验3

IAA:碰撞能量为6 V时,母离子和2个特征碎片离子均有峰,但峰强度不同;碰撞能量为20和40 V时,仅有m/z=130的特征碎片离子峰。ABA:碰撞能量为6 V时,母离子和2个特征碎片离子均有峰;碰撞能量为20 V时,仅有2个特征碎片离子峰;碰撞能量为40 V时,无特征碎片离子峰。

压力容器的安全使用是实验室安全教育的重要内容。LC-MS实验要常规使用,包括液氮、高纯氮气及高纯氩气等惰性气体钢瓶。在实验教学过程中:使学生熟悉气体压强的单位兆帕斯卡(MPa)和帕斯卡(Pa);使学生掌握气体钢瓶必须安放在防倒支架上的重要原则;使学生掌握气体钢瓶不能用

尽、钢瓶内气体压强必须保留1~2 MPa以免形成负压易发生爆炸的基本常识。

2.4 教学实验4

对比2个组分的二级碎片离子扫描质谱图,TOF-MS模式离子*m*/*z*更为丰富。这是因为TOF-MS模式四极杆没有选择性,合适质荷比的离子都可以通过;而TOF-MS-MS模式四极杆具有选择性,只有母离子才能通过,在碰撞池母离子碎片化,脱去一些基团可以形成特征碎片离子。分别以IAA和ABA实测的母离子*m*/*z*=176.071 7和265.144 3进行二级碎片离子扫描,在测试过程中,持续注入亮氨酸脑啡肽标准物质进行温度补偿校正Lockmass,相关元素成分分析结果列表1,在相对误差合格的前提下,本教学实验结果与已发表结果吻合[20]。

在实验室安全教育方面,结合以往发生的实验室安全事故,着重使学生认识氧化剂、还原剂混存容易引发氧化还原反应,从而释放大量的热量,引发爆炸事故,使学生充分理解废液分类回收的原则。

2.5 教学实验5

实际样品的检测结果如图3所示。叶片粗提液的组分复杂,实际样品的色谱峰较多。在实际样品中逐渐增加外源性ABA浓度,保留时间为2.40 min的组分色谱峰强度逐渐增加,其母离子(*m*/*z*=265)和2个特征碎片离子(*m*/*z*=247、229)与标准溶液ABA的检测结果一致。

结合CURE课程阶段1学习的实验室准入安全培训理论知识,使准备以LC-MS进行独立科研探索的学生综合考虑样品前处理和大型仪器操作各个环节,预估即将开展的科研工作所面临的各种安全风险和隐患,在实验前与导师及仪器管理教师落实具体应对措施。

3 教学效果

本教学实验已在每学年秋季学期连续实施3次,每学期该课程选课学生人数都达到选修课最大课容量为57~60人。参考借鉴国外实验室的理念和经验[24-25],在LC-MS操作实践中有意识地融入实验室安全教育的内容,引导学生对所学习的系统性实验室安全知识进行实际运用,增强了学生的实验室安全意识。

针对国内实验室学生数量大、LC-MS上机实操时间不足的显著问题,本教学实验在5.5 min内可以实现2个物质的分离与定性,可满足所有上课学生的实验操作要求,极大地缓解了仪器少和学生多的供需不平衡的矛盾。教学设计比较合理与高效,实用性很强。

按照Kirkpatrick教学效果评估模型[21-22]对反应层面教学评价的要求,连续2个学期进行了匿名学生反馈与问卷调查。其中:2021—2022学年秋季课程部分学生的评教信息显示,多数学生认为通过该课程学习到了仪器的原理和使用方法,收获了很多仪器的操作技巧,锻炼了动手能力,是一门对未来学习有一定帮助的非常不错的课;2022—2023学年部分学生的评教信息显示,多数学生对该课程的评价很积极,认为该课程很实用,课程内容完整,能帮助学生安全熟练使用大型实验仪器。参与反馈和问卷调查的绝大多数学生对本LC-MS教学实验内容、培训方式等直观感受及满意程度都能达到良好的水平,对LC-MS的学习兴趣普遍很高,因此判断本教学实验在反应层面上达到了良好的教学效果。

笔试问卷统计结果如表2显示。共有31名学生参与问卷调查:试题(1),与课前相比,课后回答正确的学生人数比例从6.5%提高至80.6%,表明本教学实验在LC-MS仪器各部分构造的学习方面达到良好的教学效果;试题(2),学生在课前课后的回答没有差异;试题(3)和(4),从课前仅1名学生回答正确提高到了课后35.5%和32.3%,回答不正确的比例均有所下降,表明达到一定的教学效果。通过

表1 IAA和ABA母离子和特征碎片离子元素成分分析

化合物	离子类型	分子式	相对分子质量		绝对误差	相对误差
			实测值	理论值		
IAA	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{10}NO_2$	176.071 7	176.071 2	5×10^{-4}	2.8×10^{-6}
	$[M+H-H_2O]^+$	$C_{10}H_8NO$	158.062 5	158.060 6	1.9×10^{-3}	1.2×10^{-5}
	$[M+H-HCOOH]^+$	C_9H_8N	130.066 1	130.065 7	4×10^{-4}	3.1×10^{-6}
ABA	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{21}O_4$	265.146 9	265.144 0	2.9×10^{-3}	1.1×10^{-5}
	$[M+H-H_2O]^+$	$C_{15}H_{19}O_3$	247.135 1	247.133 4	1.7×10^{-3}	6.9×10^{-6}
	$[M+H-2H_2O]^+$	$C_{15}H_{17}O_2$	229.123 6	229.122 9	7×10^{-4}	3.1×10^{-6}

注:M为分子式。

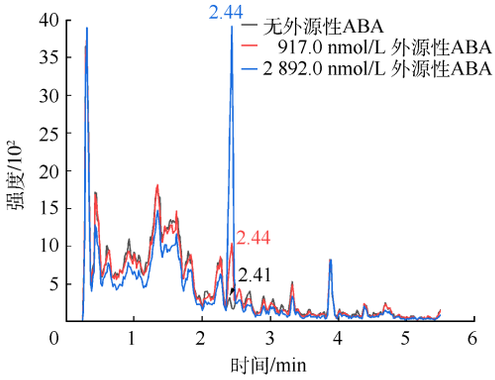


图3　实际样品的色谱图

目测对比学生课前课后笔答试卷,有2名学生课后作答笔迹较课前工整,推测其经过LC-MS操作学习后,学习态度有一定转变。另外有一个现象值得关注:在回答第3题分析元素成分分析不正确可能的原因时,课前有2名学生认为一个可能的原因是已发表的文献结论有错误,但课后其均未再次提到这个可能的因素。学生质疑已发表文献的可靠性属于批判性思维,具有发散性思维的性质,LC-MS操作培训使得学生获得重要知识技能的同时,如何保护学生的想象力值得进一步进行教学研究与实践探索。

表2　笔试问卷调查教学评估数据

试题	评价分级	课前/%	课后/%
(1)	正确	6.5	80.6
	部分正确	6.5	19.4
	不正确	87.1	0
(2)	正确	93.5	96.8
	部分正确	0	0
	不正确	6.5	3.2
(3)	正确	3.2	35.5
	部分正确	48.4	48.4
	不正确	48.4	16.1
(4)	正确	3.2	32.3
	部分正确	48.4	54.8
	不正确	48.4	12.9

在LC-MS操作学习过程中,通过对学生的口头测试、观察学生操作练习情况及对比笔答问卷的结果,可推测绝大多数学生掌握了一定程度的LC-MS的重要基础理论知识、熟悉了仪器的主要构造和参数调试、掌握了最基本的数据分析方法,锻炼了规范操作能力。每学年秋季学期课程结束后,根据学生的兴趣和需求开展一对一LC-MS操作考核及口头测试活动,至今共有9名研究生通过了操作考核,口头测试成绩优秀,能够独立操作该设备进行科研工作;2名研究生已将LC-MS作为常用检测技术手段,在课题组导师的指导下开展研究工作。根据目前学生对所学知识和技能掌握的程度判断,本教学实验在学习层面上也达到了初级教学效果。

4　结束语

LC-MS是检测酸性植物激素最重要的大型分析仪器之一。提供合理的教学实验有助于学生掌握LC-MS的基本概念、原理、实验操作及数据分析,提高学生的实际动手能力、分析和解决实际问题等多方面的能力,对本科生及研究生未来相关专业课程的学习具有积极的指导意义,能促进学生未来的发展。由于教学学时关系,本教学实验的不足点在于缺乏物质的定量检测实验设计,未来将设计检测实际植物样品的定量实验,进一步提升学生的实际应用能力,如设计实际样品的衍生实验,得到更加准确的定量检测结果,缩短学生在理论学习和实际应用之间的差距。此外,LC-MS操作学习教学效果,特别是学习态度评估量化指标和保护学生想象力的教学方法有待进一步开发建立。

志谢　感谢MassTech公司的葛玉春、马跃工程师对LC-MS仪器操作和软件使用的指导。感谢首都师范大学生命科学学院白素兰副教授对实际样品前处理技术的建议。

参 考 文 献

[1] 柴逸峰,邱欣.分析化学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2016:296-302.

[2] 赵玉红,李登文,周浩,等.大型仪器应用于本科开放性实验教学的探索与实践:以高效液相色谱仪为例[J].高校生物学教学研究(电子版),2023,13(1):39-42.

[3] AYSHA A, ILTAF S, SYED S A. An innovative bioanalytical research project course to train undergraduate students on liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Biochemistry and Molecular Biology Education,2019,47(3):228-238.

[4] MICHAEL S,ANNE S,RACHEL V,et al. Using HPLC-mass spectrometry to teach proteomics concepts with problem-based techniques [J]. Biochemistry and Molecular Biology Education,2010,38(4):242-246.

[5] SHA S S, JIA L Q, XIN Y, et al. An integrated course based on two dimensional-electrophoresis and mass spectrometry analysis to teach proteomic techniques for undergraduate students[J]. Biochemistry and Molecular

Biology Education,2018,46(4):354-360.
[6] BRIINS M, BAZZANELLA A, LOCHMANN H, et al. Determination of indole-3-acetic acid in plant tissues by capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A,1997,779(1/2):342-346.
[7] CHEN H, GUO X F, ZHANG H S, et al. Simultaneous determination of phytohormones containing carboxyl in crude extracts of fruit samples based on chemical derivatization by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography B,2011,879:1802-1808.
[8] LIU B F, ZHONG X H, LU Y T. Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking[J]. Journal of Chromatography A,2002,945(1/2):257-265.
[9] FU J H, CHU J F, SUN X H, et al. Simple, rapid, and simultaneous assay of multiple carboxyl containing phytohormones in wounded tomatoes by UPLC-MS/MS using single SPE purification and isotope dilution[J]. Analytical Sciences,2012,28:1081-1087.
[10] WASILEWSKA A, VLAD F, SIRICHANDRA C, et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more [J]. Molecular Plant,2008,1(2):198-217.
[11] CUTLER A J, KROCHKO J E. Formation and breakdown of ABA[J]. Trends in Plant Science,1999,4(12):472-478.
[12] RAGHAVENDRA A S, GONUGUNTA V K, CHRISTMANN A, et al. ABA perception and signaling [J]. Trends in Plant Science,2010,15(7):395-401.
[13] TANK J G, PANDYA R V, THAKER V S. Phytohormones in regulation of the cell division and endoreduplication process in the plant cell cycle [J]. RSC Advances,2014,4:12605-12613.
[14] 戴琛,汪瑾,卢亚萍.衍生化UPLC-MS法测定酸性植物激素[J].植物学报,2022,57(4):500-507.
[15] HEDDEN P. Modern methods for the quantitative analysis of plant hormones[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1993, 44: 107-129.
[16] PAN X Q, WANG X M. Profiling of plant hormones by mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2009,877:2806-2813.
[17] PAN X Q, WELTI R, WANG X M. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospraytandem mass spectrometry [J]. Phytochemistry,2008,69(8):1773-1781.
[18] ZHOU R, SQUIRES T M, AMBROSE S J, et al. Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A,2003,1010(1):75-85.
[19] 奚忠华,孔旋凤,戴洁,等.液相色谱质谱联用技术在本科实验教学中的应用[J].广东化工,2020,47(12):206-207.
[20] ZHAO H Z, JIANG M, LIANG Q L, et al. Fragmentation pathway studies of several plant hormones using an electrospray ionization-quadrupole/time-of-flight mass spectrometer [J]. International Journal of Mass Spectrometry,2013,335:7-15.
[21] 陈晨,翁雨燕,范大明,等.一流学科建设中大型精密贵重仪器设备培训体系的改革[J].实验室研究与探索,2020,39(3):258-261.
[22] BATES R. A critical analysis of evaluation practice: the Kirkpatrick model and the principle of beneficence[J]. Evaluation and Program Planning, 2004, 27 (3): 341-347.
[23] LEWIS R L, SEAL E L, LORTS A R, et al. Circular dichroism spectroscopy: enhancing a traditional undergraduate biochemistry laboratory experience[J]. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2017, 45(6):515-520.
[24] 张彦峰.国外高校实验教学的他山之石:以澳大利亚为例[J].实验室科学,2020,23(1):237-240.
[25] 程敬丽,楼建晴.美国大学大型仪器设备共享的管理与启示[J].实验室研究与探索,2013,32(2):168-170.

(责任编辑:王 媛)