

# 利用气相色谱法同时测定番茄叶片中的 信号物质水杨酸和茉莉酸

宋圆圆, 徐建峰, 梁笑婷, 苏贻娟, 谢丽君, 曾任森\*

(华南农业大学/农业部生态农业重点开放实验室/热带亚热带生态研究所, 广东 广州 510642)

**摘要:**茉莉酸(JA)和水杨酸(SA)是植物中重要的内源激素和防御反应信号分子,快速而准确地定量测定植物内源SA和JA含量非常重要。以番茄叶片作为材料,研究利用气相色谱(GC)同时测定植物内源JA和SA的含量。利用丙酮/柠檬酸(50 mmol/L)(体积分数=7/3)和乙酸乙酯提取番茄叶片中的JA和SA,提取液经N<sub>2</sub>吹干后用三甲基硅烷化重氮甲烷甲酯化,然后用顶空-固相微萃取(HS-SPME)方法进行收集,正己烷洗脱后进行气相色谱分析,用氢离子火焰检测器(FID)进行检测,梯度升温程序为60℃(1 min)至250℃,15℃/min,250℃ 3 min。从样品中得到与茉莉酸甲酯(MeJA)和水杨酸甲酯(MeSA)标准品完全吻合的色谱峰。该方法可以广泛用于同时测定植物内源的SA和JA含量。

**关键词:**气相色谱;信号分子;茉莉酸;水杨酸;甲酯化;顶空-固相微萃取

中图分类号:Q948 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2010)05-1056-05

## Simultaneous Quantification of Jasmonic and Salicylic Acids in Tomato Plants by Gas Chromatography

SONG Yuan-yuan, XU Jian-feng, LIANG Xiao-ting,  
SU Yi-juan, XIE Li-jun, ZENG Ren-sen\*

(Key Laboratory of Ecological Agriculture/Ministry of Agriculture; Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Jasmonic and salicylic acids are important phytohormones and plant defensive signaling compounds. Here a new method was developed for the simultaneous quantification of the two signaling compounds in tomato leaves by using headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography with hydrogen ion flame detector (FID). Leaf samples were extracted by mixture of acetone and citric acid (50 mmol/L) (V/V = 7/3), and ethyl acetate. Then the supernatant was dried by N<sub>2</sub> and subsequently methylated with trimethylsilyldiazomethane. The volatilized compounds were collected by using headspace-solid

收稿日期:2010-07-20

基金项目:国家自然科学基金项目(30870390)

作者简介:宋圆圆(1982—),女,博士生,主要从事化学生态学研究。

\* 通讯作者:曾任森(1965—)男,江西玉山人,博士,广东省珠江学者特聘教授,博士生导师。1985年6月本科毕业于江西农业大学农学专业;1988年9月考入华南农业大学硕士研究生;毕业后留校任教,并在在职攻读博士学位。主要从事化学生态学和农业生态学研究。首批教育部新世纪优秀人才培养计划入选者,广东省高校“千百十”工程国家级学术带头人培养对象。担任《Annual Review of Entomology》、《Journal of Chemical Ecology》编委,《Allelopathy Journal》地区编辑和专刊特约编辑,亚洲化感作用学会秘书长,亚太地区化学生态学家协会理事,《应用生态学报》编委。近年来主持各类科研课题30多项,其中国家自然科学基金7项。在国内外发表学术论文70多篇,其中SCI核心刊物论文26篇。主编的英文著作由国际知名的Springer出版社全额资助在美国纽约出版, E-mail: rszeng@scau.edu.cn。

phase microextraction on Tenax adsorbents, and eluted with n-hexane. Eluted samples were analyzed by using GC with hydrogen ion flame detector (FID). The temperature gradient was increased from 60 °C (1 min) to 250 °C in a rate of 15 °C/min and held on 3 min at 250 °C. The final chromatographic peaks of JA and SA in the samples were identical to the authentic compounds. This method will be useful for simultaneous quantification of JA and SA in plants.

**Key words:** gas chromatograph; signal compounds; jasmonic acid; salicylic acid; methylation; head-space – solid phase microextraction

植物不能运动,并且是地球上所有其他生物主要的能量来源(直接或间接),这使植物成为所有植食性昆虫和动物,以及病原菌攻击的主要对象。在自然环境中生长的植物如何保护自己免受危害倍受关注。为了抵御各种生物(病原菌、植食性昆虫)和非生物(干旱、高盐以及冻害)逆境的伤害<sup>[1]</sup>,植物进化了一套复杂而完善的自我防御体系和防御信号网络。

在植物对病虫害的诱导防御中,水杨酸(Salicylic acid, SA)和茉莉酸(Jasmonic acid, JA)被认为是最重要的信号分子<sup>[2-3]</sup>。SA是植物体内含量较低的一种内源酚类物质,它在植物体内的生理作用是多方面的,很多实验证明它是诱发系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)产生的关键信号分子之一。而JA及茉莉酸甲酯(MeJA)是一类脂肪酸的衍生物,它不仅影响植物体的生长发育,而且与抵抗病原菌侵染、昆虫取食和机械损伤有关,能调控植物的防御反应。植物受到病虫袭击时的防御信号响应一直是当今植物诱导防御研究的热点<sup>[4]</sup>。快速而准确地定量测定植物内源SA和JA含量非常重要。

目前测定SA和JA含量的方法主要有:酶联免疫检测法(ELISA)<sup>[5]</sup>,高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)<sup>[6]</sup>和气相色谱-质谱联用法(GC-MS)<sup>[7-9]</sup>。本研究以番茄为实验材料,探讨采用气相色谱(GC)法同时测定植物内源SA和JA含量的方法,以期推动植物诱导防御与防御信号转导途径的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

番茄(*Lycopersicon esculentum*, Mill. cv. Jin Bao)种子育苗前用体积分数为10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消毒8 min,蒸馏水冲洗数次后放置生物培养箱中催芽。番茄种子发芽生长10 d后选取长势一致的秧苗移栽到规格24 cm × 18 cm × 12 cm的塑料盘中(实验前用高锰酸钾溶液浸泡24 h消毒)。番茄幼苗的培养基质为土壤和河砂的混合(3:1)。土壤取自广州华南农业大学校内农场,过5 mm筛,高压蒸汽湿热灭菌2 h。河砂过2 mm筛,洗净,干热灭菌170 ~

180 °C 2 h。把塑料盆置于光照培养箱中,培养条件为:(25 ± 1) °C, 16 h光照,光照强度为150 μE(m<sup>2</sup> · s)<sup>-1</sup>, 8 h黑暗,湿度60%,每天浇水,隔7 d浇50 mL营养液(5 mL 1 mol/L KNO<sub>3</sub>, 5 mL 1 mol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mL 1 mol/L MgSO<sub>4</sub>, 蒸馏水2 mL, 1 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 mL MnCl<sub>2</sub>, 1 mL ZnSO<sub>4</sub>, 1 mL CuSO<sub>4</sub>和1 mL Fe-EDTA定容至1 L)。每处理设置3个重复,随机摆放。

### 1.2 样品处理

选取生长45 d的健康番茄植株,对番茄植株相同部位的叶片进行取样,迅速放置于液氮中冷冻,随即把样品储存于-80 °C冰箱待用。

### 1.3 SA和JA含量测定

1.3.1 提取 SA和JA的提取参照Engelberth and Engelberth和Engelberth et al方法<sup>[7,10]</sup>,并略作修改,具体过程如下。准确称取0.05 ~ 0.15 g番茄叶片置于预先经液氮冷冻的2 mL具螺纹的塑料管中,加入

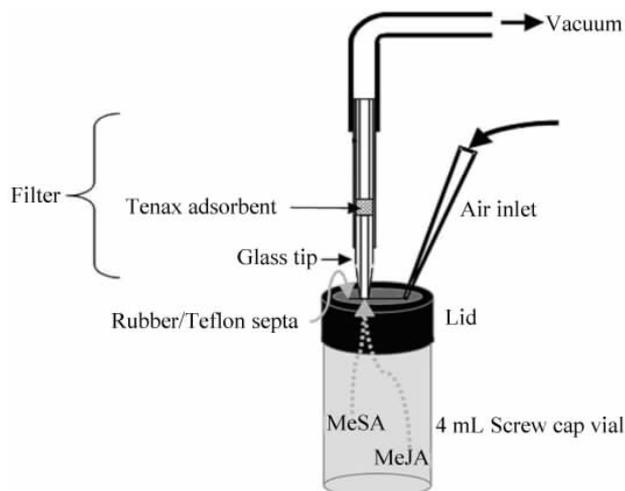


图1 植物信号物质茉莉酸和水杨酸甲酯化装置

Fig. 1 Trapping of methylated plant signaling compounds on Tenax filters

1 mL 丙酮/50 mmol/L 柠檬酸(体积分数 = 7/3) 提取液和磁珠,在液氮挥发完之前拧紧管盖用 FastPrep 进行匀浆 4.5 m/s 30 s,然后再加入 1 mL 乙酸乙酯 4.5 m/s 15 s,取上清,转移至 4 mL 进样瓶中, N<sub>2</sub> 吹干。  
 1.3.2 甲酯化 加入 100 μL 乙醚/甲醇(体积分数 = 9/1) 和 4 μL 2 mmol/L 的三甲基硅烷化重氮甲烷(溶于正己烷)于吹干的进样瓶中,盖紧瓶盖,轻轻摇匀,室温放置 30 min,为了防止过分反应 30 min 之后加入 4 μL 2 mol/L 的溶于正己烷的冰乙酸终止反应,室温放置 30 min。用手术刀片划破进样瓶隔膜,将商用的 Tenax(中科慧杰,50 mg 填料,外径 6 mm,长 10 cm) 吸附管一端伸入进样瓶中,另一端连通抽气装置(图 1) 将进样瓶底部浸入 80 °C 水浴中收集 3 min,待吸附管冷却后用 300 μL 正己烷洗脱,保存于 -20 °C 冰箱,留待 GC 检测。

1.3.3 吸附剂的再生 向样品洗脱后的吸附管中加入 300 μL 甲醇,然后用 300 μL 的正己烷洗 2 次,剩余残留用 N<sub>2</sub> 吹干。保存备用。

1.3.4 茉莉酸甲酯(MeJA)和水杨酸甲酯(MeSA)混合标准品的配置 分别配制正己烷(HPLC 色谱纯)溶解的 1 000 × 20 μg/mL MeJA(购于 Sigma - Aldrich) 和 1 000 × 400 μg/mL MeSA(购于 Sigma - Aldrich) 的标准品贮液,分别稀释得到 20 μg/mL MeJA 和 400 μg/mL MeSA 的工作液,将 MeJA/MeSA(体积分数 = 9/1) 混合,得到 18 μg/mL MeJA 和 40 μg/mL MeSA 的混合标样,稀释一系列浓度以作标准曲线。混合标样保存于 -20 °C 冰箱,留待 GC 检测。

1.3.5 JA 和 SA 标准品的甲酯化 分别吸取 25 μL 80 μg/mL 的 JA 贮存液和 125 μL 160 μg/mL 的 SA 贮存液,重复样品提取和甲酯化步骤,最后用 100 μL 正己烷洗脱,得到 20 μg/mL 的 MeJA 和 200 μg/mL 的 MeSA 的混合甲酯化标准品,保存于 -20 °C 冰箱,留待 GC 检测。

1.3.6 GC 条件 通过 HP - 5 石英毛细管柱(30 m × 320 μm × 0.25 μm) 分离样品。初始温度 60 °C 保持 1 min,以 15 °C/min 升到 250 °C 保持 3 min,进样口温度 280 °C,检测器温度 300 °C。以 N<sub>2</sub> 作为载气,流量 1 mL/min, FID 检测器。不分流进样,进样量 1 μL。

1.3.7 JA 和 SA 的回收率 分别吸取 0, 100, 200, 400 ng 的 JA 和 SA,重复样品提取及甲酯化步骤,用正己烷洗脱后 GC 检测测定回收率。

## 2 结果与分析

### 2.1 JA 和 SA 的定性分析

用甲酯化的 MeJA 和 MeSA 谱图与标准品 MeJA 和 MeSA 谱图进行比对(图 2),通过保留时间进行定性,从色谱图中可以看出 JA 和 SA 经过甲酯化后得到与 MeJA 和 MeSA 完全吻合的色谱峰。

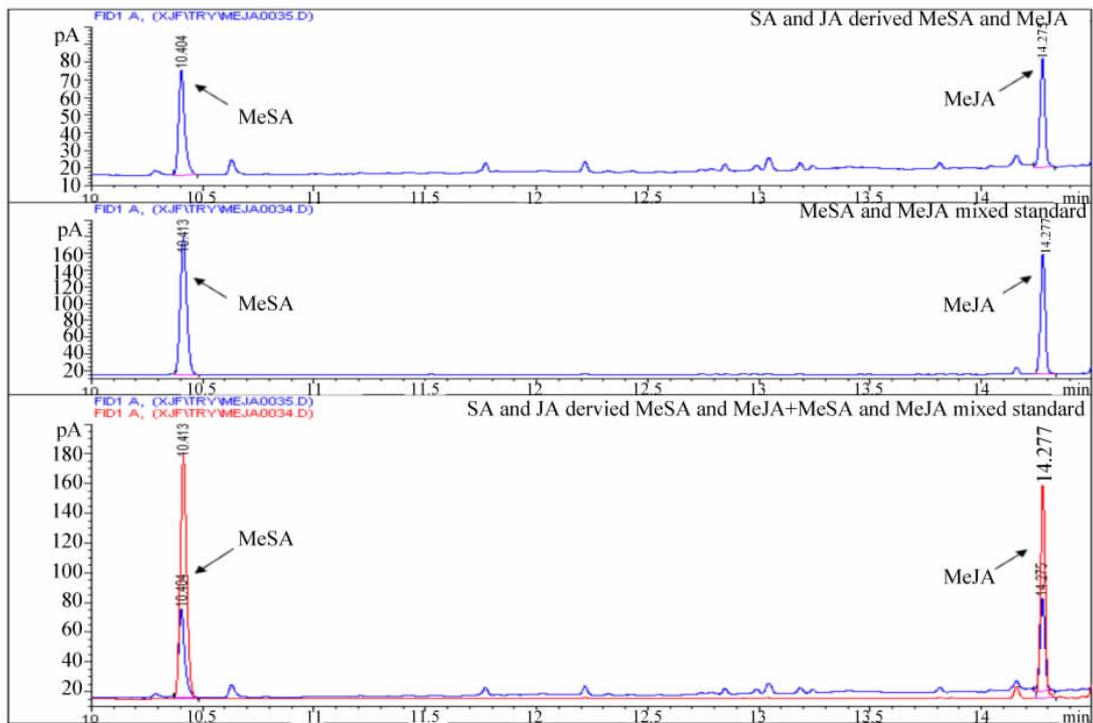


图 2 MeJA 和 MeSA 标准品及番茄叶片中 JA 和 SA 甲酯化后的色谱图

Fig. 2 Profiles of GC chromatography of authentic MeJA, MeSA and JA derived MeJA and SA derived MeSA in tomato leaves

## 2.2 标准曲线及回收率

结果表明, 利用 GC-FID 检测的 JA 和 SA 在 0.225 ~ 18 ng/ $\mu$ l 和 0.5 ~ 40 ng/ $\mu$ L 的浓度范围内呈现良好的线性关系  $r$  值分别达到了 0.999 2 和 0.999 8。其中利用该方法测定 JA 含量的最低检测限 (LOD) 能够达到 0.08 ng/ $\mu$ L, 而 SA 的 LOD 也能达到 0.1 ng/ $\mu$ L (表 1)。这与 Kallenbach et al<sup>[11]</sup> 的结论也比较接近。

表 1 GC-FID 测定 JA 和 SA 的线性回归方程、保留时间和检出限

Tab. 1 Retention time, linear regression equation and limit of detection of JA and SA detected by GC-FID

化合 /Compound	保留时间/min Retention time	线性回归方程 Linear regression	线性范围 /(ng · $\mu$ L <sup>-1</sup> )	相关系数 Coefficient	检出限 /(ng / $\mu$ L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
水杨酸	7.532	Area = 30.120 012 1 × Amt - 25.753 772	0.5 ~ 40.0	0.999 21	0.100 030
茉莉酸	11.250	Area = 37.343 753 1 × Amt - 5.068 504 5	0.225 ~ 18.000	0.999 86	0.080 680

利用绝对加标回收率计算得到 JA 和 SA 的回收率为 65% 和 90% 左右 (图 3), 而 Schmelz et al<sup>[8]</sup> 利用 GC-MS 测得的 JA 和 SA 的回收率为 80% 和 96% 左右, 两者结果比较吻合。总体来说 SA 测定过程中的损失要少于 JA。

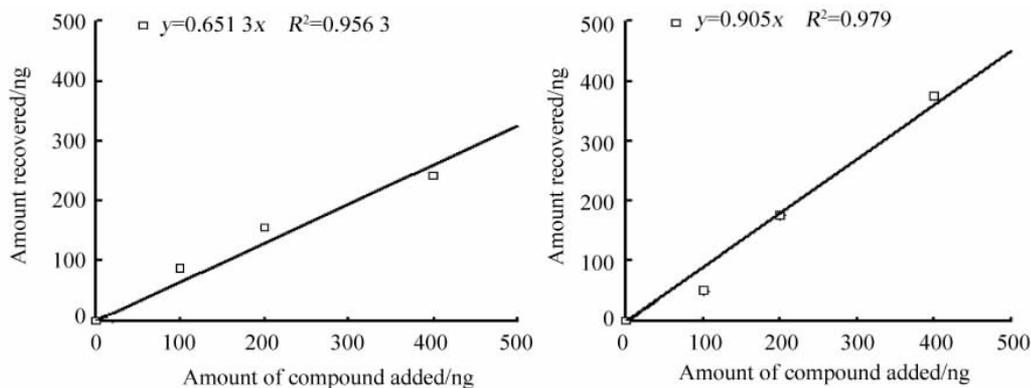


图 3 气相色谱测定 JA 和 SA 的回收率

Fig. 3 Recovery rates of jasmonic and salicylic acids in the GC analysis

## 2.3 吸附剂再生次数对样品 MeJA 和 MeSA 色谱峰面积的影响

由图 4 看出, 吸附剂再生 3 次与再生 1 次对样品中 MeJA 和 MeSA 的色谱峰面积在 95% 的置信水平上没有显著差异, 同时在再生后的洗脱液中检测不到 MeJA 和 MeSA 的存在。说明用 300  $\mu$ L 甲醇和 600  $\mu$ L 正己烷再生效果良好, 吸附剂可以重复利用。

## 3 结论与讨论

作为调控植物防御反应的重要信号分子, 植物内源 JA 和 SA 的定量非常有必要。但是植物体内的 JA 和 SA 含量极低 ( $\mu$ g ~ ng/g 鲜重), 给植物信号分子的测定带来困难。同时 JA 的紫外吸收值较低, 测定的要求很高<sup>[7]</sup>。因此, 目前国内外常用的测定 JA 和 SA 含量的方法有 GC-MS<sup>[12-13]</sup> 和 ELISA<sup>[14]</sup> 法, 随着 LC 分析技术的提高, LC-MS/MS 也被引入到 JA 和 SA 含量的测定中<sup>[15]</sup>。应用这些方法已经对

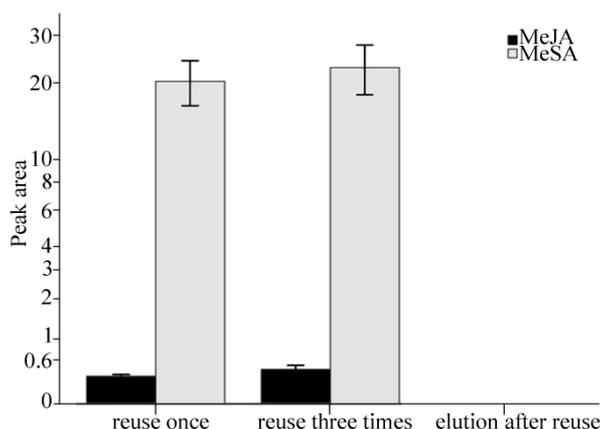


图 4 吸附剂再生次数对 MeJA 和 MeSA 吸附效果的影响

Fig. 4 Effects of adsorbent reuse times on the adsorbability of the adsorbent on MeJA and MeSA

包括苹果<sup>[16]</sup>、豌豆<sup>[17]</sup>、拟南芥、马铃薯<sup>[12]</sup>、烟草<sup>[6]</sup>、利马豆<sup>[10]</sup>、水稻<sup>[15]</sup>等植物进行了JA或者SA的分析。目前3种主要测定JA和SA的方法中,ELISA方法需要构建单克隆抗法,成本很高<sup>[5]</sup>,HPLC-MS方法虽然已经成功用于测定烟草中JA和SA<sup>[6]</sup>,但是需要对样品经过复杂的纯化步骤,而GC-FID测定方法对样品纯化要求不高,同时检测限低,能够灵敏的检测出植物体内受到外界刺激时信号分子的细微变化。本实验选择GC方法测定番茄叶片中JA和SA含量,从一定程度上说明GC测定植物内源激素的稳定性与可靠性。

此外,在样品前处理过程中,提取液的成分对植物叶片中JA和SA的提取十分重要 Engelberth et al<sup>[10]</sup>最早利用丙酮/50 mmol/L 柠檬酸(体积分数=7/3)提取利马豆叶片中JA和SA,随后改用50 mmol/L的柠檬酸单独提取,不过溶剂为水/丙酮(体积分数=3/7)混合溶剂<sup>[9]</sup>。最近 Engelberth<sup>[7]</sup>发现1-丙醇/水/浓盐酸(体积分数=2/1/0.002)和二氯甲烷混合提取对水稻叶片中JA和SA的提取效果也很好。Wu et al<sup>[6]</sup>对烟草叶片中JA和SA的提取只选择了乙酸乙酯。本研究发现丙酮/50 mmol/L 柠檬酸(体积分数=7/3)和乙酸乙酯的混合提取对番茄叶片中的JA和SA提取效果更好。

在用GC测定植物体内SA和JA含量的方法中,其中最重要的一步就是样品的甲酯化,最早用的甲酯化试剂是二异丙基乙胺<sup>[13]</sup>,目前常用的有重氮甲烷<sup>[12]</sup>和三甲基硅烷化重氮甲烷<sup>[8]</sup>。由于重氮甲烷的毒性比较强,而且不容易贮存,因此本研究选择了三甲基硅烷化重氮甲烷作为甲酯化试剂。

GC测定的结果表明,JA和SA的色谱峰面积与浓度之间呈现良好的线性关系,其 $r$ 值分别为0.999 8(JA)和0.999 2(SA)。同时结果表明利用GC-FID方法测定植物内源JA和SA的最低检测限能达到0.08 ng/ $\mu$ L和0.1 ng/ $\mu$ L。本试验探索的方法对其他植物材料的JA和SA含量的测定也有一定的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] Van Dam N M. How plants cope with biotic interactions [J]. *Plant Biol* 2009, 11: 1-5.
- [2] Kazan K, Manners J M. Jasmonate signaling: toward an integrated view [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 1459-1468.
- [3] Loake G, Grant M. Salicylic acid in plant defence - the players and protagonists [J]. *Curr Opin Plant Biol* 2007, 10: 466-472.
- [4] Hummel G M, Schurr U, Baldwin I T, et al. Herbivore - induced jasmonic acid bursts in leaves of *Nicotiana attenuata* mediate short - term reductions in root growth [J]. *Plant Cell Environ* 2009, 32: 134-143.
- [5] Xin Z Y, Zhou X, Zhang N G. The development of an indirect ELISA for jasmonic acid [J]. *J Nanjing Agric Univ* 1998, 21(4): 19-23.
- [6] Wu J Q, Hettenhausen C, Medlau S, et al. Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 1096-1122.
- [7] Engelberth M J, Engelberth J. Monitoring plant hormones during stress responses [J]. *J Vis Exp* 2009, 28: 1127-1129.
- [8] Schmelz E A, Engelberth J, Alborn H T, et al. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins and volatile organic compounds in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 10552-10557.
- [9] Engelberth J, Schmelz E A, Alborn H T, et al. Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor - phase extraction and gas chromatography - chemical ionization - mass spectrometry [J]. *Anal Biochem* 2003, 312: 242-250.
- [10] Engelberth J, Koch T, Schuler G, et al. Ion channel - forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrils coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean [J]. *Plant Physiol* 2001, 125: 369-377.
- [11] Kallenbach M, Baldwin I T, Bonaventure G. A rapid and sensitive method for the simultaneous analysis of aliphatic and polar molecules containing free carboxyl groups in plant extracts by LC-MS/MS [J]. *Plant Method* 2009, 5: 17.
- [12] Weber H, Vick B A, Farmer E E. Dinor - oxo - phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 10473-10478.
- [13] Mueller M J, Brodschelm W. Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography - negative chemical ionization - mass spectrometry [J]. *Anal Biochem* 1994, 218: 425-435.
- [14] Albrechet T, Kehlen A, Stahl K, et al. Quantification of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody [J]. *Planta* 1993, 191: 86-94.
- [15] Tamogami S, Kodama O. Quantification of amino acid conjugates of jasmonic acid in rice leaves by high - performance liquid chromatography - turboionspray tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A* 1998, 822: 310-315.
- [16] Lan Y P, Han Z H, Xu X F. Accumulation of jasmonic acid in apple seedlings under water stress [J]. *Acta Horti Sin* 2004, 31(1): 16-20.
- [17] Liu Y, Pan Q H, Zhan J C, et al. Response of endogenous salicylic acid and jasmonates to mechanical injury in pea leaves [J]. *Sci Agr Sin* 2008, 41(3): 808-815.