

UPLC-MS/MS 测定水稻内源茉莉酸含量的研究

胡欣¹, 王冬根², 曾晓春^{1,3*}, 罗林广², 陈子林⁴

(1. 江西农业大学 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室, 江西 南昌 330045; 2. 江西省农业科学院 农产品质量安全与标准研究所, 江西 南昌 330200; 3. 宜春学院 生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000; 4. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072)

摘要:以水稻幼苗为材料, 研究内源茉莉酸的超高效液相色谱-质谱/质谱(UPLC-MS/MS)定量分析。用甲醇浸没植物组织样品提取JA, 提取液经过固相萃取小柱(SPE-NH₂)去除杂质, 二氢茉莉酸(H₂JA)作为内标物, 通过UPLC-MS/MS仪进行定量分析。设置5, 20, 100 ng/g 3个加标水平, 测定加标回收率及其变异系数。JA和H₂JA均采用ES-电离模式和MRM扫描模式, 采集特征离子分别为母离子209 m/z、子离子58.7 m/z和母离子211 m/z、子离子58.7 m/z。结果表明利用UPLC-MS/MS检测的JA在2~100 ng/mL的浓度范围内呈良好的线性关系, 使用氨基柱进行处理前后的变异系数分别为: 10.83%和1.92%。3个加标水平的加标回收率为79.16%~93.46%。

关键词:超高效液相色谱-质谱/质谱; 茉莉酸; 定量; 水稻

中图分类号: Q946.81 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)03-0418-07

Quantification of Endogenous Jasmonic Acid in Rice with UPLC - MS/MS

HU Xin¹, WANG Dong-gen², ZENG Xiao-chun^{1,3*}, LUO Lin-guang², CHEN Zi-lin⁴

(1. Jiangxi Agricultural University / Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education, Nanchang 330045, China; 2. Institute for Quality & Safety and Standards of Agricultural Products Research, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Jiangxi Province, Nanchang 330200, China; 3. Department of Life Science and Environmental Resources, Yichun College, Yichun 336000; 4. College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: UPLC-MS/MS quantification of endogenous jasmonic acid(JA) was carried out in rice seedlings. Analyses were conducted by UPLC - MS/MS with dihydro-JA(H₂JA) as the internal standard. JA was extracted from rice tissue with methanol, purified with solid phase extraction column (SPE-NH₂) and then followed by the UPLC-MS/MS analysis procedure. Three spiked concentration levels of 5 ng/g, 20 ng/g and 100 ng/g were set for the determination of the recovery and coefficient of variation. ES-mode and MRM scan mode were used both for JA and H₂JA. Collecting characteristic ions were 209 m/z > 58.7 m/z and 211 m/z

收稿日期: 2011-02-22 修回日期: 2011-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760113, 30960180)、国家自然科学基金重大研究计划项目(90817103)和教育
部博士点专项基金项目(2007)

作者简介: 胡欣(1986—), 女, 硕士生, 主要从事作物生理生态研究, E-mail: huxin860417@163.com; * 通讯作者: 曾
晓春, 教授, 博士生导师, E-mail: xchzeng2002@yahoo.com.cn。

>58.7 m/z. The result showed that JA quantification with UPLC-MS/MS had a linear relationship in the range of 2-100 ng/mL. The coefficients of variation for SPE-NH₂ purified sample and unpurified samples were 1.92% and 10.83% respectively. The average recoveries of the three spiked concentration levels were in the range of 79.16%-93.46%.

Key words: UPLC-MS/MS; jasmonic acid; quantification; rice

茉莉酸类物质(jasmonates, JAs)是一类能使植物引起多种形态或生理效应的新型植物激素,广泛存在于高等植物体内。其作用表现为诱导颖花开放^[1]、茎块的形成^[2]、抑制花粉的萌发^[3]、根的生长^[4]等。此外,JAs已被确认为一种植物防御体系的内源信号分子,当植物体遭遇病原体^[5]、食草性动物^[6]侵害时能通过内源含量的改变诱导植物体启动防御系统;在环境胁迫下^[7-8]内源茉莉酸含量迅速的升高,以抵御胁迫。JA是JAs家族中其他衍生物的前体,且作为内源信号分子在植物体内的生理效应极其复杂,因此建立一种稳定、灵敏的茉莉酸定量方法对研究其生物学功能而言具有非常重要的意义。JA在植物体内的含量极低,对其的测定非常困难。随着各种分离与鉴定技术的发展,前人使用了多种方法对植物内源茉莉酸进行测定。使用GC或HPLC对样品进行成分分离后,进入不同的检测器对JA进行检测是目前普遍采用的方法。GC-MS是一种分析常用的分析手法,多次被报道对植物内源茉莉酸进行定量检测^[9-12],但由于JA的挥发性不高,所以在做GC分析之前必须将JA衍生成具有高挥发性的衍生物MeJA,这增加了测定程序,在一定程度上限制了GC-MS技术在JA分析中的应用。HPLC-MS能很好的与GC-MS互补,在茉莉酸分析中使用广泛,1998年,Wilbert等^[13]应用毛细管液相色谱电喷雾串联质谱(CEC-ES-MS/MS)的方法分别对植物中JA、MeJA、和水杨酸(SA)的含量进行了定量分析。HPLC多与三重四级杆质谱串联仪^[14-17]、时间飞行质谱仪^[18]、荧光检测仪^[19-20]进行联用能同时测定茉莉酸类的含量。近年来,随着液相色谱柱填充物的不断发展,超高效液相色谱(UPLC)越来越普及,UPLC较HPLC大大缩短了分析时间,被应用于对茉莉酸类物质的快速检测^[18,21-22]。2005年,Zhang等^[23]使用毛细管电泳-激光诱导荧光检测方法测定了橡胶树树皮提取物茉莉酸的含量。此方法需要将不带荧光发射基团的JA进行荧光衍生处理,使得分析过程较为繁琐。此外,酶联免疫检测法(ELISA)能使样品中茉莉酸得到较好的富集,用单克隆抗体对茉莉酸进行筛选,再通过色谱仪进行分析,样品回收率较高^[24],但单克隆抗体难以制备,不易普及。本研究拟在HPLC-MS的基础上,利用UPLC-MS/MS对样品进行分析,找出相对稳定的纯化前处理,并对纯化过程进行优化,建立灵敏、稳定的水稻内源茉莉酸UPLC-MS/MS定量检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料 水稻品种为中早23。在人工培育光照箱中成苗,培养条件:30℃下光照16h,26℃黑暗条件下8h,每天加水1次。取下叶片,液氮碾磨后充分混匀。碾磨后的粉末置于-20℃冰箱作为植物材料保存。

1.1.2 试剂 茉莉酸[(+/-)jasmonic acid,JA]购于sigma公司,二氢茉莉酸[(+/-)-dihydrojasmonic acid]购于TCI(上海)化成工业发展有限公司,色谱甲醇(Merck,Germany),乙酸(TEDIA,USA),色谱乙腈(Merck,Germany),二氯甲烷。

1.2 植物材料前处理方法

1.2.1 提取 称取液氮碾磨后的植物材料1g置于离心管中,加入20ng二氢茉莉酸作为内标。漩涡震荡混匀1min,加入10mL甲醇后置于4℃冰箱浸提1d后在4℃条件下13000r/min离心10min,转移上清液。下部植物材料中再加入10mL甲醇,漩涡混匀1d后重复提取工作,合并提取液。将提取液吹干后,加入10mL二氯甲烷/甲醇(V:V=99:1)溶解,涡旋1min,待过固相萃取柱处理。

1.2.2 纯化 固相萃取小柱为Agela Cleanert SPE-NH₂(500mg/6mL)。按图1进行过柱处理,采用不同浓度的洗脱液对样品进行洗脱。分别收集淋洗液、每个浓度的第1次洗脱液6mL及第2次的洗脱液3mL,以确定洗脱效果。

1.2.3 上机样品处理 将洗脱液氮气吹干后,用体积分数为0.05%乙酸水溶液/乙腈(V:V=80:20)定容至1 mL,漩涡2 min后通过0.22 μm的滤膜,收集过滤液。

1.3 仪器条件

1.3.1 色谱条件 超高效液相色谱(UPLC):Waters Acquity 超高效液相色谱。色谱柱:BEH C18(1.7 μm, 2.1×50 mm)。流动相为:A.0.05%乙酸水溶液 B.乙腈。流速为0.3 mL/min,初始为A:B=80:20,之后匀速变化3 min时达到A:B=20:80,在第4 min时瞬时改变流动相到A:B=80:20,运行时间为5.00 min。柱温30 ℃,样品室温度4 ℃,进样量10 μL。

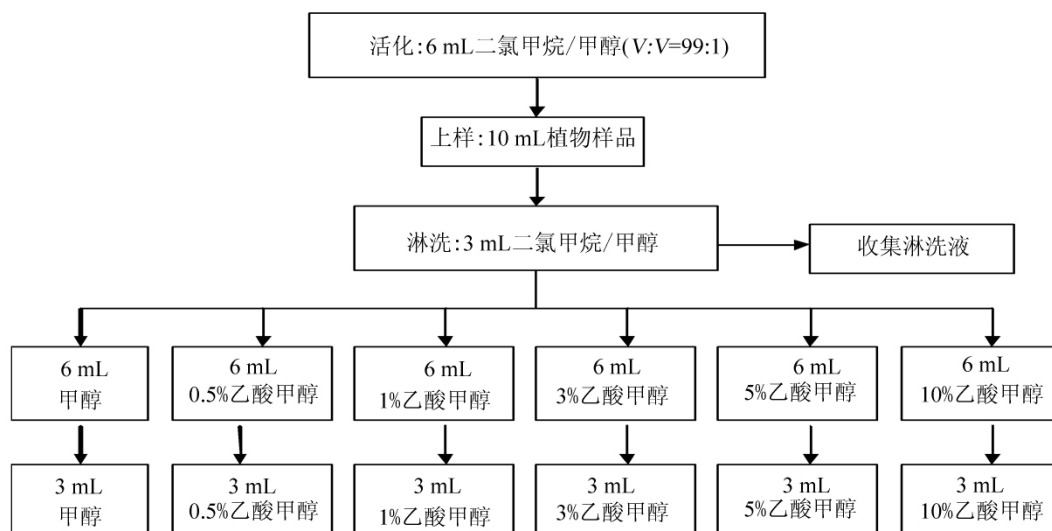


图1 洗脱条件的优化

Fig. 1 The selection of elution conditions

1.3.2 质谱条件 串联质谱仪(MS/MS):Waters Quattro Premier XE,电离模式:ES⁻,检测方法:MRM,毛细管电压:2.8 kV,离子源温度:120 ℃,脱溶剂气温度:380 ℃,锥孔气流速:50 L/h,脱溶剂气流速:600 L/h,二级碰撞气:氦气,碰撞气流速:0.18 mL/min,其他条件见表1。

表1 茉莉酸和二氢茉莉酸高效液相质谱联用测定电喷雾离子化条件的设置

Tab. 1 ES settings for UPLC/MS/MS analysis of Jasmonic acid and Dihydrojasmonic acid

名称 Name	母离子/(m·z ⁻¹) [M-H] ⁻ Parent ion	产物离子/(m·z ⁻¹) Fragment ion	处理时间/s Dwell time	碰撞能量/eV Collision energy	锥孔电压/V Cone voltage
JA	209	58.7	0.10	15	30
H ₂ JA	211	58.7	0.10	14	32

1.4 定性与定量

1.4.1 定性 用JA标准品和H2JA标准品进行碎片离子扫描,确定其特征子离子。由于植物体内成分复杂,故在[M-H]⁻条件下,利用单四级杆获取母离子209 m/z(JA)的色谱图确定分离效果,后加标50 ng,确定JA保留时间,同时用三重四级杆获取其特征子离子。

1.4.2 定量 使用内标法定量,以二氢茉莉酸作为内标物。每份测试样品中加入20 ng/g内标物,定容至1 mL。用流动相稀释标准样品,使茉莉酸浓度分别为:2.5,10,20,50,100 ng/mL 6个浓度,每个标准样品中含有20 ng/mL的内标,用于标准曲线的绘制。

1.5 加标回收率和变异系数

由于目前未发现植物中有不含茉莉酸的空白样品,故加标试验在水稻幼苗材料上完成。将植物样品粉末震荡混匀,分别称取植物粉末1 g,设置5,20,100 ng/g 3个标准样品添加水平,每个水平设6个平行,添加标准液后样品漩涡1 min,混匀,静置15 min后,按前处理方法进行处理后进行UPLC-MS/MS分析。随机选取3 d,重复以上步骤,计算平均回收率、日内变异系数和日间变异系数。

2 结果与分析

2.1 茉莉酸的定性与定量

2.1.1 定性 通过对标准样品的分析(图2、3),可见得 58.7 m/z、165 m/z(JA)、167 m/z(H₂JA) 等特征离子与文献记载相符。根据其峰度,选择 58.7 m/z 作为 JA 和 H₂JA 的定量离子。从对母离子扫描出的色谱图(图4)观察,植物样品中化合物分离度较好。加标准样品 50 ng 后,确定 JA 的保留时间为 1.88 min(图5)。在以后的植物内源茉莉酸分析中,只用 MRM 获取子离子 58.7 m/z,扫描时间为 1.64 ~ 2.32 min。二氢茉莉酸的保留时间为 2.16 min(图6),扫描时间为 1.76 ~ 2.54 min。

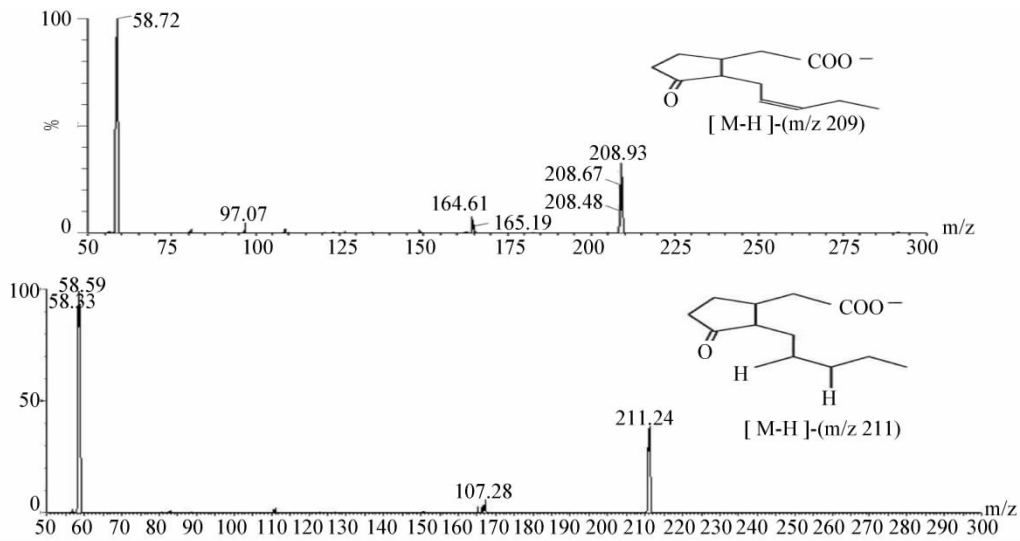


图2 JA 和 H₂JA 标准品质谱

Fig.2 Mass spectrum for JA and H₂JA

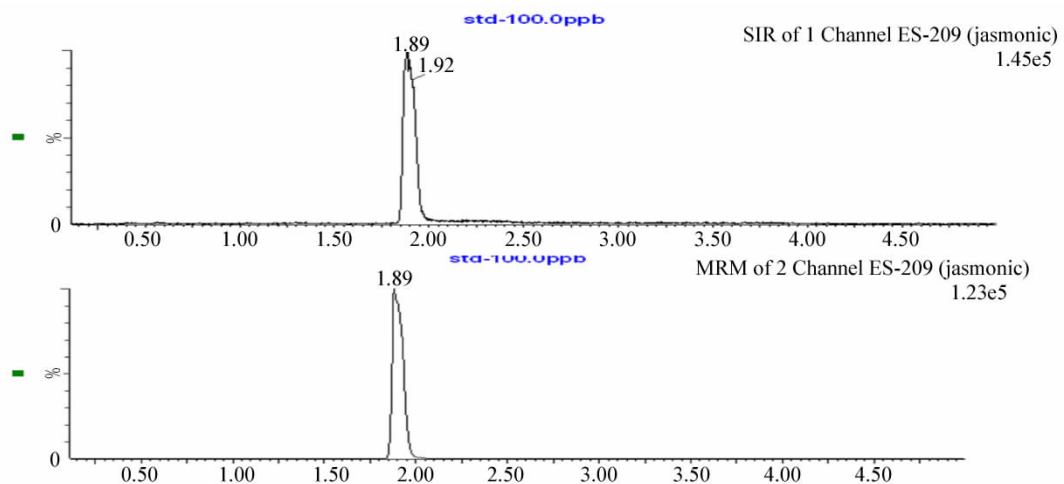


图3 标准样品中 209 m/z 与 58.7 m/z 扫描色谱

Fig.3 Parent ion(209 m/z) and daughter ion(58.7 m/z) scan for JA in standard

2.1.2 水稻幼苗叶片内源茉莉酸的定量 JA 浓度为 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL 6 个含有 20 ng/mL 内标的标准样品,以 JA 的上机响应面积与 H₂JA 的响应面积之比与 JA 的浓度绘出标准曲线 $Y = 0.783856X + 0.621384$, $r^2 = 0.997597$ 。运用 MassLynx4.1 处理软件,根据标准曲线对植物样品中内源茉莉酸进行定量(图7)。水稻幼苗测定的内源茉莉酸鲜质量含量为 21.74 ng/g。

2.1.3 检测限和定量限 最低检测浓度为 0.2 ng/mL ($S/N \geq 3$) 最低定量浓度为 0.5 ng/mL ($S/N \geq 10$)。

2.2 洗脱条件的确定

对不同浓度的洗脱液进行 UPLC-MS/MS 分析。淋洗液中均未检出 JA 和 H₂JA,用纯甲醇洗脱的洗脱液中前 6 mL 中几乎不含有 JA 和 H₂JA,后 3 mL 中少量含有 JA 和 H₂JA;使用体积分数为 0.5% 乙酸

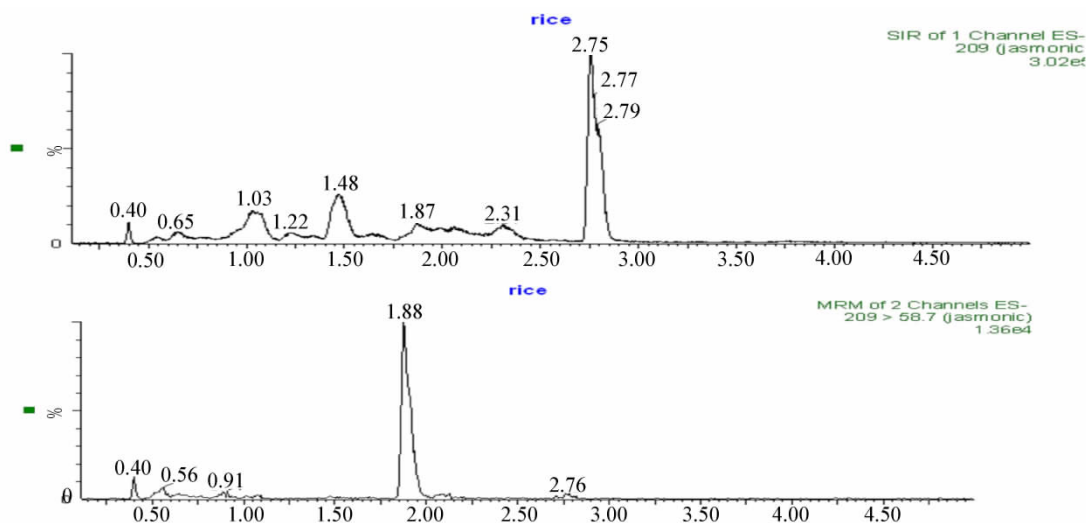


图 4 水稻样品中 209 m/z 与 58.7 m/z 扫描

Fig. 4 Parent ion (209 m/z) and daughter ion (58.7 m/z) scan for JA in rice

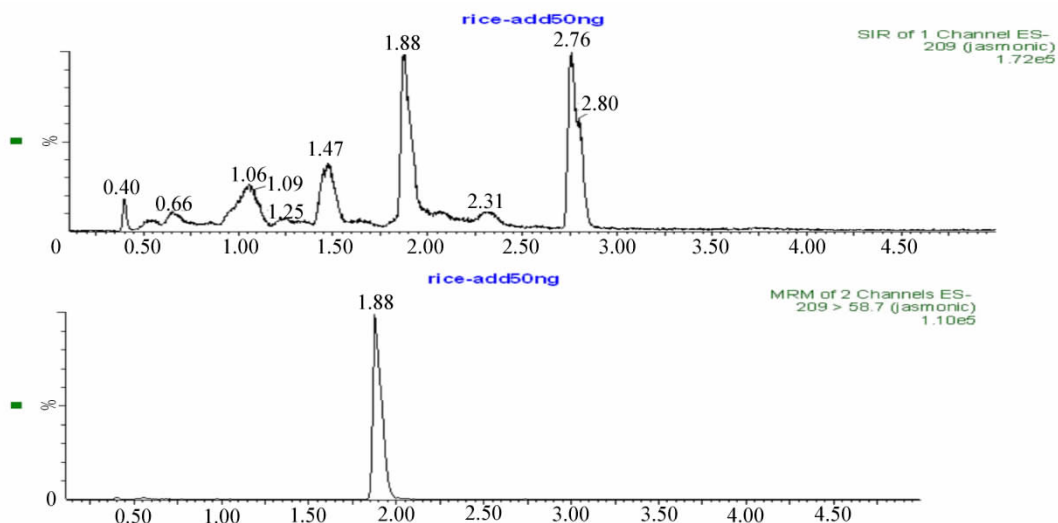


图 5 水稻样品加标 50 ng 后 JA 母离子与特征子离子扫描

Fig. 5 Parent ion and daughter ion scan for JA in rice-added

甲醇溶液洗脱的洗脱液中前 6 mL 含较多的 JA 和 H₂JA, 后 3 mL 中仍能检测出含有 JA 和 H₂JA。体积分数为 1% ~ 5% 的乙酸甲醇溶液其洗脱效果相差不明显, 在前 6 mL 中大量含有 JA 和 H₂JA, 后 3 mL 中未检出 JA 和 H₂JA。体积分数为 10% 的乙酸甲醇溶液虽然也在 6 mL 中完全洗脱 JA 和 H₂JA, 但其使用 UPLC-MS/MS 分析时响应值较低浓度酸的响应值低。在后续实验中选择体积分数为 2% 的乙酸甲醇溶液进行洗脱。

2.3 加标回收率及变异系数

在 5, 20, 100 ng/g 添加水平时, 水稻幼苗中内源 JA 的添加回收率范围在 79.16% ~ 93.46%, CK 变异系数为 1.92% (表 2)。

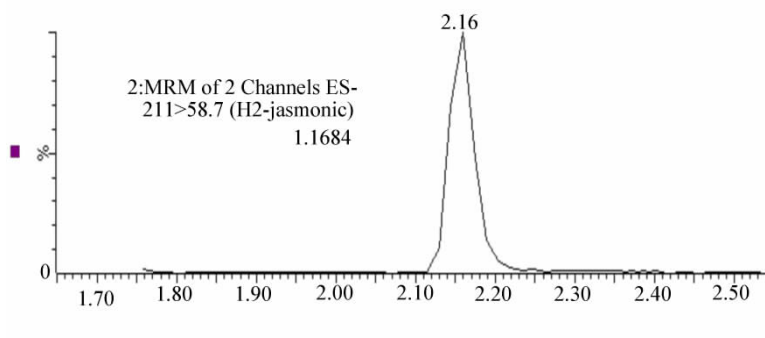


图 6 二氢茉莉酸标准样品保留时间

Fig. 6 The retention time for H₂JA

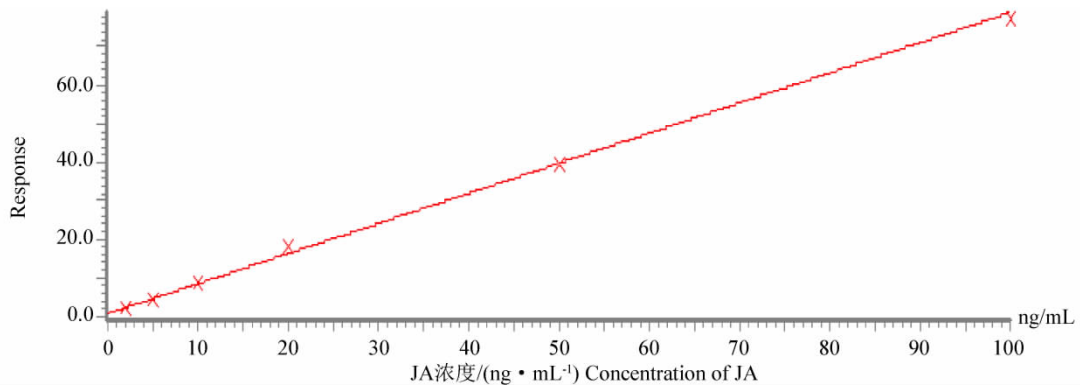


图7 JA 定量分析标准曲线

Fig.7 Standardization curves used for concentration determination of JA

表2 UPLC-MS/MS 测定水稻幼苗叶片中 JA 的添加回收率和变异系数

Tab.2 The recoveries of added and variation coefficients of JA in rice leaf by UPLC-MS/MS

添加水平/(ng · g ⁻¹) Spiked concentration	平均添加回收率(n=18) / % The average recoveries	日内变异系数(n=6) / % Within-day CV	日间变异系数(n=3) / % Within-run CV
0		1.92	2.74
5	79.16	6.12	3.14
20	93.46	4.34	0.53
100	88.62	10.17	9.73

3 讨论

JA 在植物中的内源含量相对较低,许多方法在对样品进行前处理时没有采取纯化步骤^[13,15],以减少茉莉酸的损失,提高方法的准确度。但在我们的试验中发现,不经过任何纯化步骤的植物样品经 UPLC-MS/MS 分析后,变异系数达到 10.83% (n=6),这个数值远远大于通过氨基小柱纯化的植物样品的 RSD 1.92%。所以,我们认为在测定植物内源茉莉酸时,有必要对样品进行纯化处理。

在样品纯化阶段,我们用含有 20 ng JA 和 20 ng H₂JA 的混合标准样品分别比较了 MAX 柱(waters)、HLB 柱(waters)和 SPE-NH₂ 柱(agela)的纯化效果。具体步骤为:HLB 过柱方法:用 6 mL 甲醇溶解样品,6 mL(甲醇)-6 mL(水)-上样-6 mL(体积分数为 5% 甲醇水溶液)-6 mL[甲醇(收集)];MAX 过柱方法:用 6 mL 甲醇溶解样品,3 mL(甲醇)-3 mL(水)-上样-1 mL(50 mmol/L 乙酸钠溶液)-2 mL(甲醇)-3 mL[体积分数为 2% 甲酸甲醇(收集)]。结果表明,经 SPE-NH₂ 柱纯化的样品的绝对回收率最高,达到 81.05%,SPE-NH₂ 柱适合水稻 JA 样品的纯化。

2009 年,Matsuura 等^[21]使用 UPLC-MS/MS 对茉莉酸进行测定时,使用的内标由 Matsuura 等人在实验室合成所得,许多实验室没有合成条件及方法,市场上在售商品价格昂贵。选择 H₂JA 作为内标物,大大降低了检测成本。由于 Mueller 等^[25]提示在植物组织中可能含有 H₂JA,将 H₂JA 作为内标物时需要检测植物样品中是否有 H₂JA 存在。为此,笔者对水稻幼苗组织进行了 H₂JA 的检测。检测结果未发现水稻幼苗组织中有 H₂JA 存在,以 H₂JA 作内标适用于水稻幼苗的 JA 检测。

综上所述,利用 UPLC-MS/MS 检测水稻组织内源 JA 在 2~100 ng/mL 的浓度范围内呈良好的线性关系,使用 SPE-NH₂ 固相萃取小柱进行前处理能有效的除去样品中的杂质。此方法高效、稳定,适合水稻组织内源茉莉酸的定量检测。

参考文献:

- [1]曾晓春. 茉莉酸类对稻、高粱和果园草颖花开放的诱导效应[D]. 南京:南京农业大学,2000.
- [2]Teruhiko Yoshihara, El-Sayed A Omer, Hiroyuki Koshino, et al. Structure of a tuber-inducing wtimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Agric Biol Chem, 1989, 53(10): 2835-2837.

- [3] 蒋海燕, 曾晓春, 吴晓玉. 茉莉酸类植物激素对丝瓜及油菜花粉萌发的影响[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(1): 31-35.
- [4] Staswick P E, Su W P, Howell S H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant [J]. *Plant Biology*, 1992, 89: 6837-6840.
- [5] Penninckx I A, Thomma B P, Buchala A, et al. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(12): 2103-2113.
- [6] McConn M, Creelman R A, Bell E, et al. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(10): 5473-5477.
- [7] Agrawal G K, Tamogami S, Iwahashi H, et al. Transient regulation of jasmonic acid-inducible rice MAP kinase gene (OsB-WMK1) by diverse biotic and abiotic stresses [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, 41(4): 355-361.
- [8] 葛云侠, 姚允聪, 许雪峰, 等. 干旱胁迫下杏叶片中茉莉酸积累的作用 [J]. 园艺学报, 2007, 34(3): 575-578.
- [9] 王俊斌, 王海凤, 王海英, 等. 气相色谱-质谱联用仪测定植物茉莉酸含量的研究 [J]. 华北农学报, 2009, 24(4): 226-230.
- [10] 宋圆圆, 徐建峰, 梁笑婷, 等. 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 [J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(5): 1056-1060.
- [11] Zhang F J, Jin Y J, Xu X Y, et al. Study on the extraction, purification and quantification of jasmonic acid, abscisic acid and indole-3-acetic acid in plants [J]. *Phytochemical Analysis*, 2008, 19(6): 560-567.
- [12] 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(2): 242-250.
- [13] Sibylle M, Wilbert, Lowell H, Ericsson, Milton P, Gordon. Quantification of jasmonic acid, methyl jasmonate, and salicylic acid in plants by capillary liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Biochemistry*, 1998, 257(2): 186-194.
- [14] Segarra G, Jauregui O, Casanova E, et al. Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(4): 395-401.
- [15] Pan X, Welti R, Wang X. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(8): 1773-1781.
- [16] Durbhanshi A, Arbona V, Pozo O, et al. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Agric Food Chem*, 2005, 53(22): 8437-8442.
- [17] 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 Methods*, 2009, 5: 17.
- [18] Glauser G, Grata E, Rudaz S, et al. High-resolution profiling of oxylipin-containing galactolipids in *Arabidopsis* extracts by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(20): 3154-3160.
- [19] Kristl J, Krajncic B, Darinka Brodnjak - Vončina, et al. Evaluation of measurement uncertainty in the determination of jasmonic acid in *Lemna minor* L. by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*, 2007, 12(6): 303-310.
- [20] Janja Kristl, Marjan Veber, Božidar Krajncić, et al. Determination of jasmonic acid in *Lemna minor* (L.) by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 383(5): 886-893.
- [21] Matsuura H, Aoi A, Satou C, et al. Simultaneous UPLC MS/MS analysis of endogenous jasmonic acid, salicylic acid, and their related compounds [J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, 57(3): 293-301.
- [22] Glauser G, Boccard J, Rudaz S, et al. Mass spectrometry-based metabolomics oriented by correlation analysis for wound-induced molecule discovery: identification of a novel jasmonate glucoside [J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21(1): 95-101.
- [23] Zhang Z L, Liu X, Li D F, et al. Determination of jasmonic acid in bark extracts from *Hevea brasiliensis* by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(7): 1616-1619.
- [24] 辛泽毓, 周燮. 茉莉酸酶联免疫检测法 (Elisa) 的建立 [J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(4): 19-23.