

液相色谱-串联质谱分析盐胁迫下植物激素的含量变化

卢巧梅^①, 张兰^{①②③*}, 陈天文^②, 卢明华^{①③}, 陈国南^{①*}

① 福州大学食品安全与检测教育部重点实验室, 福州 350002;

② 福州大学测试中心, 福州 350002;

③ 福州大学运动科学研究中心, 福州 350002

* 通讯作者, E-mail: zlan@fzu.edu.cn; gnchen@fzu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-30; 接受日期: 2009-06-16

摘要 建立了高效液相色谱-离子阱串联质谱高灵敏、快速测定多种内源植物激素的新方法. 在最佳条件下, 吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)和赤霉素(GA₃)在 5 min 内实现完全分离, 最低检测限为 8.0 ng·mL⁻¹. 借助串联质谱技术, 解释了三种激素的结构碎裂过程. 探讨了盐胁迫下, 上述内源激素含量的变化趋势. 研究表明, 随着 NaCl 浓度增大, IAA 和 GA₃ 含量降低, ABA 含量明显升高. 初步揭示了内源激素和植物抗盐性之间的相互关系.

关键词

植物激素
高效液相色谱
离子阱串联质谱
盐胁迫
水仙

1 引言

作为痕量信号分子, 植物激素对植物的正常生长起着至关重要的作用. 吲哚乙酸(IAA)作为生长素的代表, 能调控细胞的分裂、分化和伸长等多种生理过程; 赤霉素(GA₃)可控制茎的伸长、打破种子休眠、控制开花和性别表达等; 脱落酸(ABA)被普遍认为是逆境激素, 调节胚胎发育、种子萌芽、气孔关闭、细胞分裂和茎的生长等生理现象^[1]. 大量研究表明, IAA、ABA、GA₃、乙烯和多胺等激素都与植物抗逆过程有关^[2,3].

土壤中盐分过多对植物的正常生长发育造成的危害称盐害或盐胁迫. 其中, NaCl 是造成盐分过高的主要盐类. 随着土地盐碱化日益严重, 在干旱半干旱地区越来越多地使用盐水灌溉, 盐害已成为继干旱之后的第二大环境问题. 盐胁迫时, 植物内源激素含量发生变化, 从而调控植物一系列的生理和生化反

应. 因此, 研究植物激素与抗逆性之间的关系就显得至关重要.

鉴于植物激素的重要作用, 对其定量检测已引起了广泛的关注. 一些现代分析测试技术已用于测定单种或多种激素, 包括液相色谱法(HPLC)^[4,5]、气相色谱法(GC)^[6]、气质联用法(GC-MS)^[7,8]、毛细管电泳法(CE)^[9,10]等. 较以上这些方法, HPLC-MS 具有更强的定性定量能力. 已有 HPLC-MS 用于测定 IAA^[11,12]和 ABA^[11,13]的报道, 鲜见用于测定 GA₃. 2008 年前, 用 LC-MS/MS 同时测定多种植物内源激素的报道非常稀少. 最近, Ma 等^[14]建立了 LC-MS/MS 测定椰子汁中的不同类植物激素. 在 Ma 的工作中, 对 IAA 和 ABA 的断裂途径有简单涉及, 但未提及 GA₃ 的具体结构解析过程. 其方法的定量限为微摩尔级, 未能满足实际样品中植物激素的痕量分析要求. 此外, Hou 等^[15]近期也报道了小麦提取物中

IAA, ABA 和 GA_3 的同时检测方法, 但其所需分离时间长, 分离效率不高. 与上述研究相比, 本文构建的高效液相色谱-离子阱串联质谱(HPLC-IT-MS/MS)具有高灵敏度和快速分离检测 IAA, GA_3 和 ABA 的特点, 且对其质谱结构碎片进行了合理的推测解释, 并探讨了盐胁迫下三种内源激素的变化趋势, 有利于进一步研究植物的抗逆机理.

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

Agilent 1100 系列液相色谱和离子阱质谱仪(XCT 型)配有电喷雾电离(ESI)源和大气压化学电离源(APCI). 采用 Agilent 化学工作站和数据处理软件对信号进行采集和数据处理.

IAA, GA_3 和 ABA(纯度>98%)购自百灵威化学试剂公司(上海). 准确称取各标准品用甲醇配制成 $1.000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 储备液, 4°C 贮存. 临用前用甲醇逐级稀释. ODS-C18 柱购自 Agela 公司(北京). 甲醇和乙腈均为色谱纯, 购自 Merck(Darmstadt, 德国). 实验用水为二次蒸馏水(Milipore, Bedford, MA, USA). 所有的试剂使用前均用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤(孔径: $0.45 \mu\text{m}$, 直径: 5 cm , 购自上海市新亚净化器件厂).

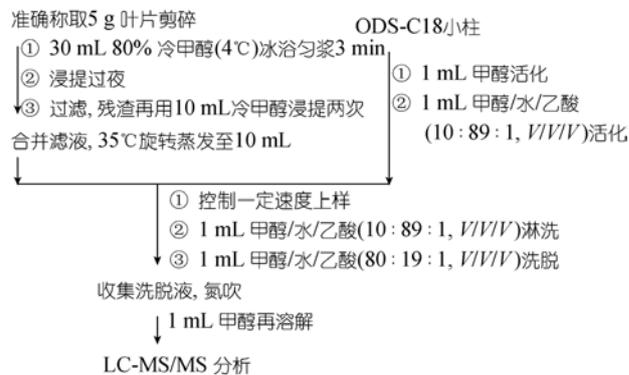
2.2 液相色谱/离子阱质谱

以 50% 甲醇: 50% 水为流动相, 选择 Agilent ZORBAX SB-C18 ($5 \mu\text{m}$, $3.0 \times 250 \text{ mm}$, USA) 色谱柱, 控制流速 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30°C , 每次进样 $20 \mu\text{L}$, 于波长 222 nm 处检测. 实验采用的质谱条件如下: ESI(-)模式, 多反应监测(MRM); 以 N_2 为干燥气($8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 350°C)和雾化气(40 psi), 毛细管电压 3.5 kV , 毛细管出口电压 100 V , 扫描范围 m/z $50\sim 400$. 二级质谱分析中, IAA、ABA 和 GA_3 的碰撞诱导解离(CID)电压分别为 0.8 , 0.8 和 1.5 V . GA_3 的多级质谱 CID 电压均为 1.5 V .

2.3 植物样品的制备和激素提取

供试材料为水仙叶片. 定植水仙幼苗, 实验分 5 组, 灌溉以 40 mL 不同浓度的 NaCl 溶液(0 , 0.3% , 0.6% , 1.2% 和 1.8%). 从浇灌 NaCl 当日开始计, 连续

浇灌一周, 采摘盐胁迫第 8 天和第 10 天的水仙花叶片进行分析. 参照文献[14], 对激素提取和净化方法加以改进, 具体步骤按以下流程进行.



3 结果和讨论

3.1 LC-MS/MS 条件优化

3.1.1 色谱条件

流动相的比例和种类在色谱分离中起着非常重要的作用. 文献[14,15]曾指出: 以甲醇-水为流动相, 分离植物激素效果不佳. 为改善分离效果, 需要加入不同浓度的甲酸. 考察了乙腈-水, 乙腈-水-甲酸, 甲醇-水-甲酸铵、甲醇-水、甲醇-水-甲酸等体系的对照实验. 结果表明, 选择甲醇-水体系, 得到的色谱峰形和质谱的总离子流图都令人满意(图1). 在 $90\%\sim 40\%$ 范围内改变甲醇比例. 结果发现, 流动相中甲醇比例越低, 分析时间延长. 当甲醇比例为 50% 时, 三种待测物在 5 min 内实现完全分离.

分别考察了三种不同型号的色谱柱(ZORBAX SB-C18: $5 \mu\text{m}$, $3.0 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$)对分离效果的影响. 实验表明, 以内径 3.0 mm 的色谱柱为分离通道, 分离效果明显好于另外两种柱子. 优化了 $0.4\sim 1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 范围内流速对分离效果的影响, 选择流速为 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 三种激素能实现良好的分离. 同时, 随着柱温升高($20\sim 35^\circ\text{C}$), 分析时间缩短. 为了在最短时间内获得最好的分离效率和最少的溶剂消耗, 确定 ZORBAX SB-C18($5 \mu\text{m}$, $3.0 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$)分

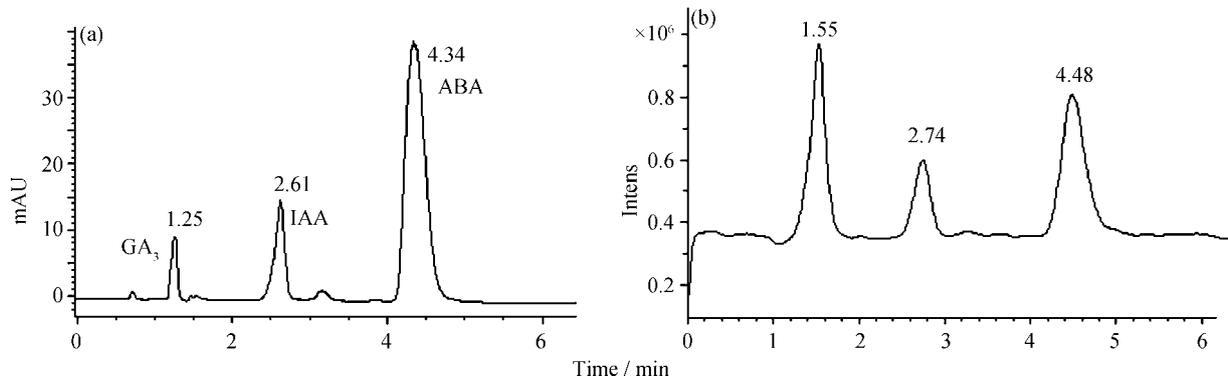


图 1 三种植物激素的液相色谱分离图(a)和质谱总离子流图(b)

流动相: 50%甲醇-50%水, 流速 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30°C , 波长 222 nm , ESI(-)和 MRM 模式, 干燥气 $8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 350°C , 雾化气 40 psi , 毛细管电压 3.5 kV , 毛细管出口电压 100 V , 扫描范围 m/z $50\sim 400$

离柱并设置流速 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、柱温 30°C 为最佳实验条件.

3.1.2 离子源和质谱条件

大气压电离质谱仪通常配备有 ESI 和 APCI 两种离子源, 每种接口各有正负模式. 实验优化了两种接口和相应的离子监测模式, 发现三种植物激素在 APCI 接口下检测, 分离效果不理想且背景干扰严重. 在 ESI(+)模式下, 三种物质中 IAA 与 ABA 重叠, 且强度不如 ESI(-). ESI(-)条件下待测物有更高的相应值和更好的分离效果. 这可从理论和待测物的结构加以解释: ESI 适合分析强极性或中极性的物质, 而 APCI 接口对非极性或弱极性的待测物有利. 另一方面, ESI(+)在分析碱性物质方面较擅长, 而 ESI(-)模式倾向于分析酸性物质. 所选的三种植物激素具有较强的极性, 且都含有一个羧基, 具有一定的弱酸性. 因此, 实验选择 ESI(-)为最佳检测条件. 优化了串联质谱的 CID 电压. 对 IAA 和 ABA, 其 CID 电压为 0.8 V 时, 就可得到相应的质量碎片. 对 GA₃, 因其分子结构复杂, 内部结合能较高, CID 电压设在 1.2 V 以上才能检测到质量碎片. 为得到丰富的二级质谱信息, 选择 IAA、ABA 和 GA₃ 的 CID 电压分别为 0.8 、 0.8 和 1.5 V .

3.2 谱图解析

选择 ESI(-)模式, 得到相应的准分子离子峰

[M-H]⁻为 IAA(m/z): 174.1 ; ABA: 263.1 ; GA₃: 345.1 . 选择 [M-H]⁻为母离子, 在最佳 CID 电压下采用 MS/MS 技术和 MRM 模式进行二级质谱分析(图 2). 断裂途径如图 3 所示, 推断 IAA 对应的碎片为 [M-H-COO]⁻(m/z 130), ABA 断裂后稳定结构为 [M-H-COO-C₅H₆]⁻(m/z 153.0). IAA 和 ABA 的断裂途径与文献[15]涉及的解析过程相符. GA₃ 是以赤霉烷为骨架的衍生物, 结构最为复杂. 根据 GA₃ 的二级质谱图, 我们通过多级质谱技术首次对 GA₃ 的结构进行了解析. 具体断裂过程可由 GA₃ 的 MSⁿ 谱图中得到验证(见图 4).

3.3 方法分析参数

实验中, 采用选择离子监测模式进行定性定量分析, 选定的特征离子列于表 1 中. 配制不同浓度的标准混合液, 发现三种植物激素的线性范围介于 $30\sim 10000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间, 最小检测限为 $8.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 说明该方法有良好的线性关系和较高的灵敏度(见表 1). 将 $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准混合液重复 7 次进样, 精密度 RSDs $< 9.06\%$, 结果令人满意.

3.4 盐胁迫下内源激素含量的变化

不同条件的盐胁迫处理时, 植物激素的变化趋势和涨幅程度也有所不同. 空白样品和受胁迫样品经有机溶剂提取和 SPE 小柱净化后, 进行 LC-MS/MS 定量分析, 最后换算为鲜样中的激素含量($\mu\text{g}/\text{g}$, FW).

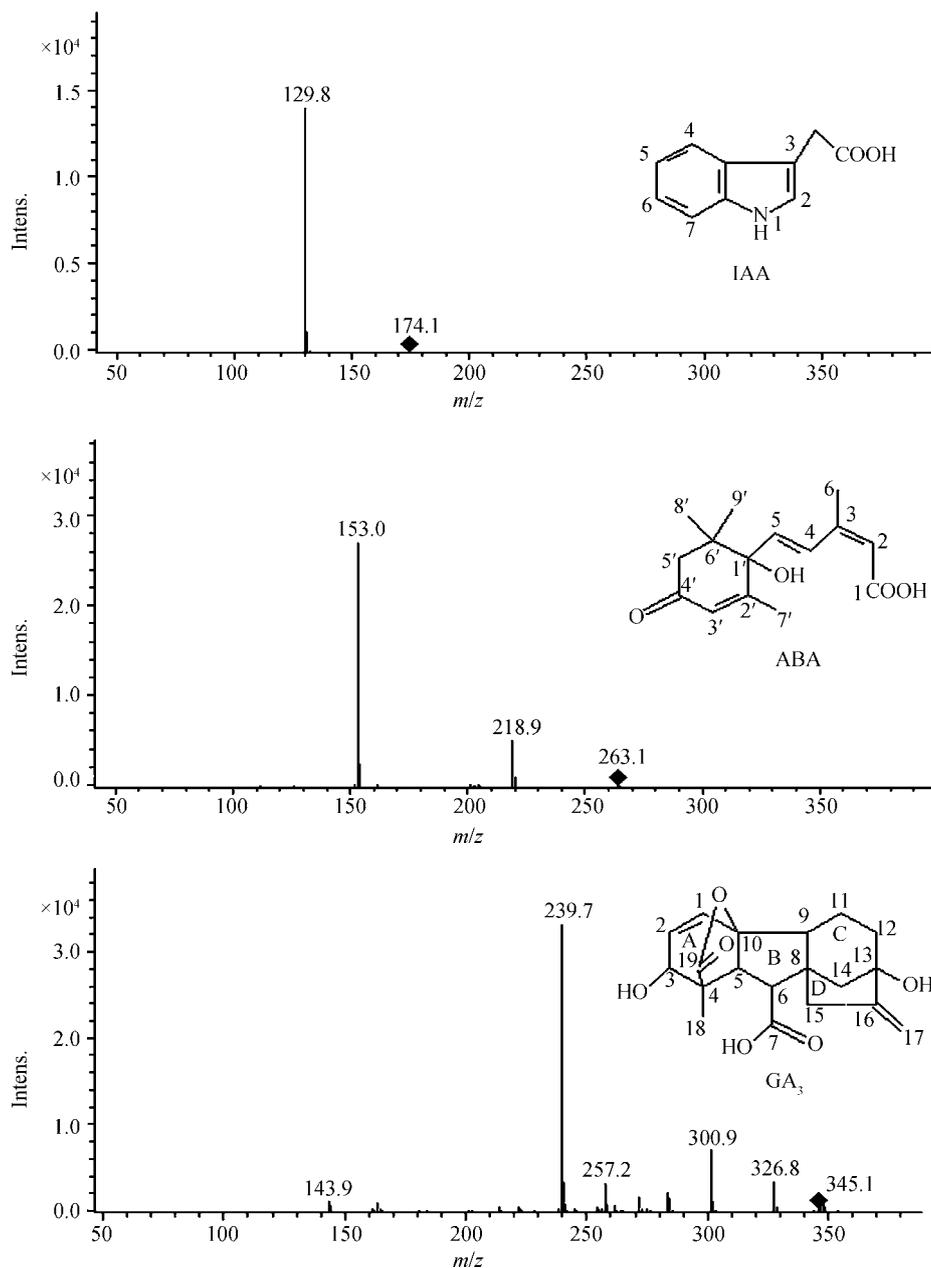


图 2 三种植物激素($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的二级质谱图

IAA、ABA 和 GA₃ 的 CID 电压分别为 0.8, 0.8 和 1.5 V

图 5 描述了不同 NaCl 处理时, 样品中 GA₃、IAA 和 ABA 的变化情况. 和空白样品相比, 植株受盐胁迫时, GA₃ 和 IAA 含量逐渐降低, 而 ABA 含量明显增加. 盐胁迫浓度越高, 处理时间越长, ABA 含量增加越多, GA₃ 和 IAA 含量则缓慢减少. 因此, 盐胁迫促使植物体内源激素形成了一个新的平衡, 从而更有利于抵

制逆境的影响.

3.5 植物抗盐机制初探

植物激素与植物耐盐性的关系一直是抗盐机理研究的重要内容. 基于以上实验结果, 我们提出植物激素和耐盐性相互作用的初步解释. 首先, 盐胁迫导

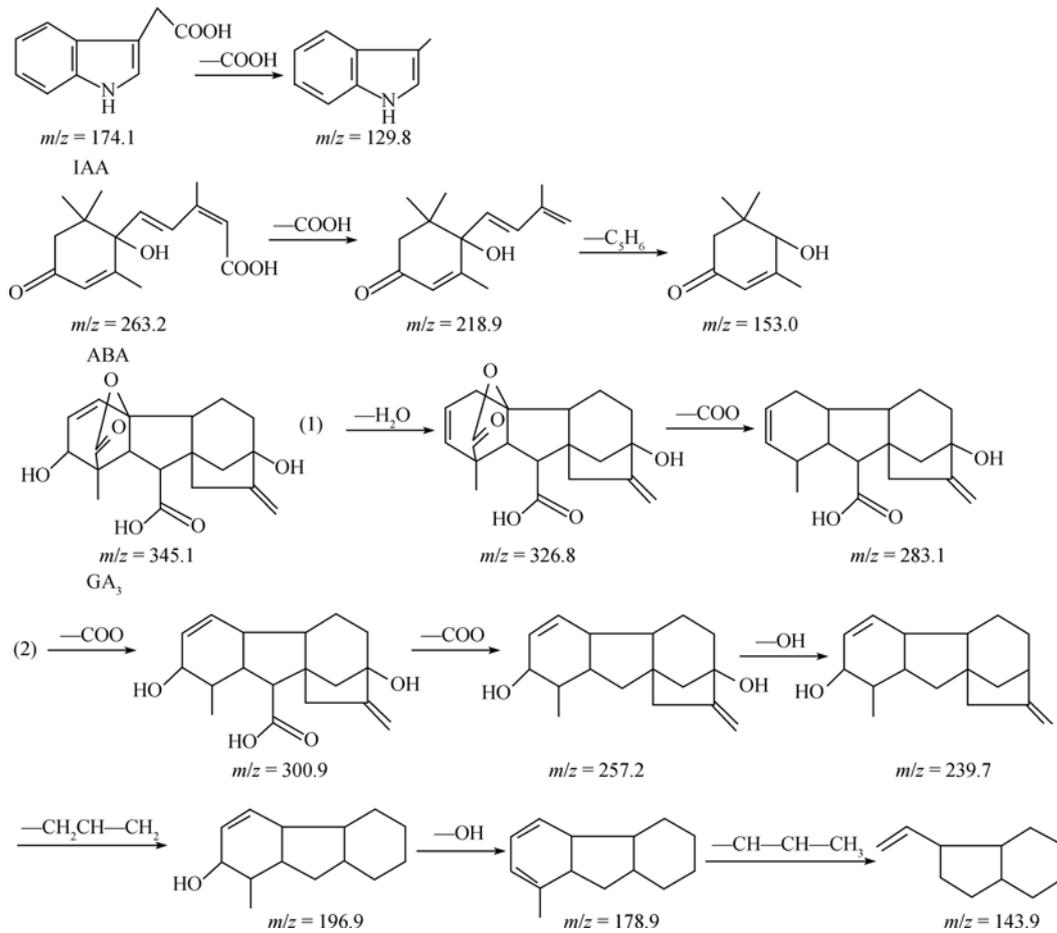


图 3 三种植物激素的断裂途径

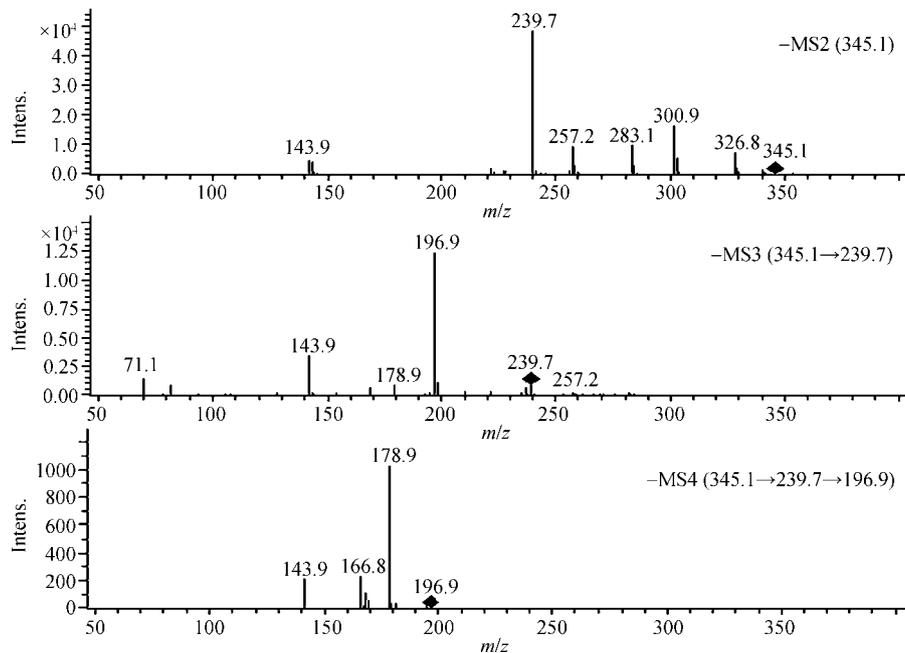


图 4 $\text{GA}_3(10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 的 MS_4 质谱图

CID 电压均为 1.5 V

表 1 三种激素的特征离子和定量参数

待测物	定性离子(m/z)	定量离子(m/z)	线性范围($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回归方程($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	相关系数	检测限($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
IAA	174.1、129.8	129.8	30~10000	$Y = 220141x + 2281.5$	0.9991	10.0
ABA	263.1、218.9、153.0	218.9、153.0	30~5000	$Y = 45914x - 346.4$	0.9984	8.0
GA_3	345.1、239.7、300.9	239.7、300.9	30~5000	$Y = 25970x + 1984.3$	0.9980	8.0

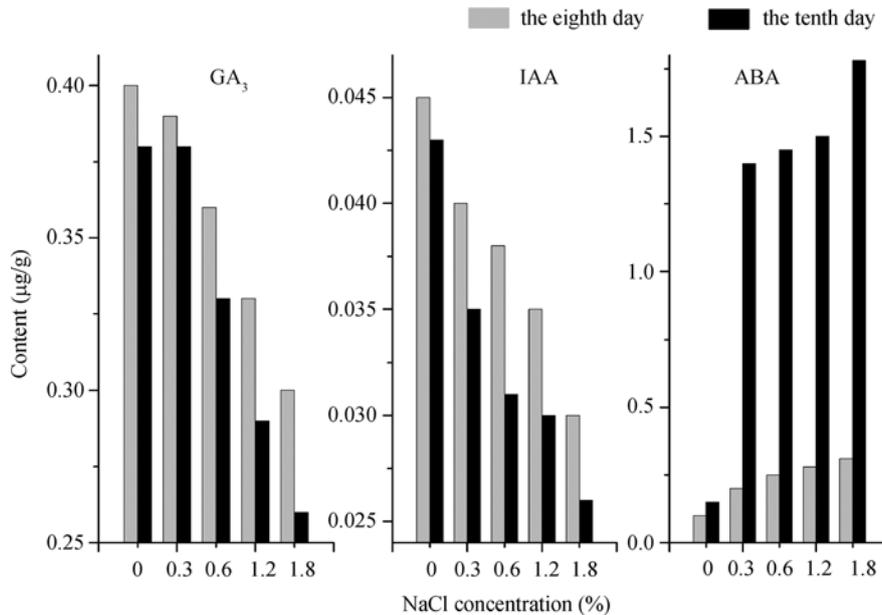


图 5 不同盐胁迫条件下三种植物激素的含量变化

致植物体内单盐离子累积、水分缺失、膜透性改变, 此时内源植物激素对外界逆境作出积极应答. 以逆境激素 ABA 为例, 膜透性的改变促使 ABA 含量增加, 缓解了盐分过多造成的渗透胁迫, 同时提高植物细胞清除活性氧的能力, 增强了抗盐能力. 其他植物激素如 GA_3 、IAA 等也对逆境产生相应的应答, 在不利的生长环境下其合成和含量呈减少趋势. 以上推论与我们的实验结果相符, 也符合相关研究的报道^[16,17]. 此外, 逆境条件下激素含量变化与抗盐机制的研究能为外源性施用某种植物激素提供依据. 不少研究表明: 外源性施用 ABA、 GA_3 和 IAA 同样能增强植

物对逆境的适应性^[18,19].

4 结论

基于激素对盐胁迫能产生积极响应, 用液质联用分析法考察了盐胁迫下内源激素的含量变化. 植物通过增加 ABA、减少 IAA 和 GA_3 含量提高自身的耐盐性. 建立的 HPLC-IT-MS/MS 法灵敏度高、重现性好而且快速, 适合植物激素的痕量测定. 首次借助 MS/MS 技术详细讨论了三种激素的质谱碎裂过程. 此外, 该研究初步解释了激素与耐盐性的关系, 为外源性施用相应植物激素提供指导依据.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(批准号: 20675016, 20735002, 20877019)、福建省体育局重大专项(编号: HX2005-74)和福建省高校新世纪优秀人才支持计划(编号: HX20062101)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 李合生. 现代植物生理学. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2002. 252—259
- 2 毛桂莲, 许兴, 徐兆斟. 植物耐盐性生理生化研究进展. 中国生态农业学报, 2004, 12(1): 43—46
- 3 侯振安, 李品芳, 冀元石. 激素对植物耐盐性影响的研究现状与展望. 石河子大学学报, 2000, 4(3): 239—245
- 4 史作安. 甜樱桃休眠花芽内源激素的高效液相色谱测定. 落叶果树, 2004, (5): 1—3
- 5 Dobrev P I, Havlíček L, Vágner M, Malbeck J, Kamínek M. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2005, 1075: 159—166
- 6 柴梦颖, 李秀根, 张绍铃. 梨幼果中脱落酸和吲哚-3-乙酸的简易气相色谱分析. 果树学报, 2005, 22(3): 276—278
- 7 Claudia B, Ania K, Joachim K. Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J Chromatogr A*, 2003, 993: 89—102
- 8 Barkawi L S, Tam Y Y, Tillman J A, Pederson B, Calio J, Al-Amier H, Emerick M, Normanly J, Cohen J D. A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissue. *Anal Biochem*, 2008, 372: 177—188
- 9 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 Chromatogr A*, 2002, 945: 257—265
- 10 Liu X, Ma L, Lin Y W, Lu Y T. Determination of abscisic acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2003, 1021: 209—213
- 11 Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho J V, Cadenas A G. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 8437—8442
- 12 Lu Q M, Zhang L, Chen T W, Lu M H, Tong P, Chen G N. Identification and quantitation of auxins in plants by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 2565—2572
- 13 Rong Z, Timothy M S, Stephen J A, Suzanne R A, Andrew R S, Adrian J C. Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2003, 1010: 75—85
- 14 Ma Z, Ge L Y, Lee A S, Yong J W, Tan S N, Ong E S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Anal Chim Acta*, 2008, 610: 274—281
- 15 Hou S J, Zhu J, Ding M Y, Lv G H. Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2008, 76: 798—802
- 16 李建英, 郑殿峰, 冯乃杰. 植物激素与逆境的关系. 黑龙江八一农垦大学学报, 2003, 15(4): 35—39
- 17 Tuteja N. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Metho Enzymol*, 2007, 428: 419—438
- 18 Yin C Y, Duan B L, Wang X, Li C Y. Morphological and physiological responses of two contrasting Poplar species to drought stress and exogenous abscisic acid application. *Plant Sci*, 2004, 167: 1091—1097
- 19 Kaur S, Gupta A K, Kaur N. Effect of GA_3 , kinetin and indole acetic acid on carbohydrate metabolism in chickpea seedlings germinating under water stress. *Plant Growth Regul*, 2000, 30: 61—70

Content change of endogenous plant hormones under salt stress by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LU QiaoMei¹, ZHANG Lan^{1,2,3*}, CHEN TianWen², LU MingHua^{1,3} & CHEN GuoNan¹

1. Ministry of Education Key Laboratory of Analysis and Detection for Food Safety (Fuzhou University), Fuzhou 350002, China

2. Analytical and Testing Center, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

3. The Sport Science Research Center, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

Abstract: A quick quantitative analysis of endogenous plant hormones, such as indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA₃) and abscissic acid (ABA) is investigated by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. Under the optimum conditions, the above three plant hormones are separated and detected within 5 min with a detection limit of 8.0 ng·mL⁻¹. By means of MS/MS technique, the fragmentation process of these hormones is discussed in detail. The content change of endogenous plant hormones under salt stress is studied. Researches show that with the increase of NaCl concentration, levels of IAA and GA₃ are diminished, while, level of ABA was upgraded obviously. The relationship between plant hormones and salt tolerance is discussed as well.

Keywords: plant hormones, high performance liquid chromatography, tandem mass spectrometry, salt stress, narcissus