

# 高分辨质谱测定酸性植物激素的方法优化

卢亚萍, 汪瑾

(南京农业大学生命科学院生物学实验教学中心, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为了有效利用超高效液相-高分辨率质谱对酸性植物激素进行定性定量测定, 选取几种衍生化试剂: 2-溴苯乙酮 (BP)、2-二甲氨基乙胺 (DMED)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC) 和溴代丙酮基三甲基溴化铵 (BTA), 分别与脱落酸、赤霉素、吲哚乙酸、茉莉酸和水杨酸进行衍生化反应。通过比较各个激素的质谱响应值来判断衍生化试剂的效果。结果显示, 几种衍生化试剂都可以大幅度提高酸性激素的质谱响应值, 其中 DMED 衍生效果最好, 使得几种激素的质谱灵敏度提高 10-100 倍, 且反应稳定、重复性好。将该方法应用在水稻、小麦、蚕豆等材料中, 有效测定了其内源酸性激素, 灵敏度较衍生前具有显著提高。本研究建立了一种简单、快速、重现性好的基于衍生化的测定方法, 大幅提高了多种酸性植物内源激素测定的灵敏度。

**关键词:** 衍生化; 高分辨质谱; 酸性激素; 定量测定

## Optimization of Determination of Acidic Plant Hormones with High Resolution Mass Spectrometry

Yaping Lu, Jin Wang

(Experimental teaching center of biology, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, 210095)

**Abstract:** This study aims to establish a rapid and efficient method for qualitative and quantitative determination of plant acid hormones by ultra-high performance liquid chromatography/high resolution time-of-flight mass spectrometry. Several derivatization reagents, 2-bromoacetophenone (BP), 2-dimethylaminoethylamine (DMED), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC) and bromoacetone trimethylammonium bromide (BTA) were selected for derivatization with abscisic acid, gibberellic acid, indoleacetic acid, jasmonic acid and salicylic acid, respectively. The effect of derivatization reagent was judged by comparing the response value of the derivative hormones. All the four derivatized reagents could improve the MS response value of acidic hormone, among which the MS sensitivity of hormone derived by DMED is the best, increasing the mass spectrometry sensitivity of several hormones by 10-100 times. The method was applied to the determination of endogenous acidic hormones in rice, wheat and broad bean, and the sensitivity was significantly higher than that before derivation. A simple, rapid and reproducible method based on derivatization was established, which greatly improved the sensitivity of the determination of acidic hormones in plants.

**Keywords:** derivatization; high resolution mass spectrometry; acidic hormones; quantitative determination

酸性植物激素是指脱落酸、水杨酸、茉莉酸、生长素、赤霉素等植物体内所含有的一类小分子羧酸，它们调控了种子的萌发、茎的伸长、开花与结果、生物或非生物胁迫响应等一系列的植物生命过程 (Santner et al., 2009)。植物激素对植物生命活动的调控过程是一个复杂的信号转导网络。在这个网络中，酸性植物激素既各司其职，又相互合作 (Tank et al., 2014)。因此，对植物体内多种酸性激素进行检测对于深入研究激素的分子作用机理，以及培育高产、抗旱、抗病虫害的农作物等方面都有至关重要的意义。而痕量激素的检测往往是激素分析的瓶颈。

植物激素一般是极低浓度的植物内源物质，处于  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  甚至是  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$  级别，而且其含量还会随着植物本身的发育过程与外界环境的变化而改变 (Qaderi et al., 2012)。激素在提取和测定时会受到各种各样物质的干扰，因而需要超高灵敏度的检测方法。激素检测技术一般包括生物测定法、免疫测定法、电分析法、色谱法以及质谱法 (Hedden et al., 1993; Barkawi et al., 2008; Pan et al., 2009; Barkawi et al., 2010)。色谱和质谱联用技术 (LC-MS) 具有强分离能力、高度灵敏性、选择性和准确性，已成为现代激素测定的强有力的工具。LC-MS 广泛应用于多种植物激素的同时定性和定量分析 (Pan et al., 2008; Izumi et al., 2012; Du et al., 2012)。

酸性植物激素含有羧基，一般在负离子模式下测定，然而在负离子模式下有机小分子羧酸化合物的电喷雾质谱 (ESI-MS) 响应低，使低含量的目标激素检测变得非常困难。对分析物进行化学衍生化反应，可以增强其 ESI-MS 响应度，从而实现痕量酸性植物激素的分析 (Santa et al., 2007; Santa et al., 2011)。常用于有机小分子羧酸化合物的衍生化方法包括形成酰胺化、酯化、烷基化和硅烷化等，其中酰胺化和酯化应用于 LC-MS 检测，而烷基化和硅烷化用于 GC-MS 检测。衍生后羧基转变成酰胺或者酯，大大提高了离子化效率 (Zhang et al., 2019; Qi et al., 2014)。Tatsuya Higashi 在 2010 年采用衍生化试剂 1-[(4-二甲基氨基苯基)羰基]哌嗪 (DAPPZ)，通过 LC/ESI-MS/MS 的方式来检测非结合胆汁酸 (Bas) 在鼠脑中的含量，使检测的灵敏度提高了近 75 倍 (Higashi et al., 2010)。Bryce J. Marquis 等于 2017 年设计了一种新型有效的衍生化试剂: 4-溴-N-甲基苄胺 (4-BNMA)，使得原羧酸浓度在  $0.2\sim 44\ \mu\text{g}$  之间的检测限可以提高 2~3 倍 (张晨曦等, 2010)。陈鸣銮采用 3-bromoactonyltrimethylammonium bromide (BTA) 对包括茉莉酸、脱落酸、赤霉素、水杨酸、生长素等 5 大类酸性植物激素进行衍生化反应，衍生化后的酸性植物激素的 ESI-MS 响应提高 5~10 倍 (陈鸣銮等, 2013)。

本实验使用 Waters 公司的超高效液相-高分辨率飞行时间质谱 (UPLC-TOF-MS)，具有很高的分辨率和质量精确度，误差小于 2 mD，采用 MS 一级全扫描的方式就可以对样品进行准确定性。然而，相对于三重四极杆而言，TOF 质谱的灵敏度偏低。测定时，对于一些含量极低的激素，则无法进行测定。因此，对酸性激素进行衍生化反应，以提高了检测的灵敏度。比较了几种具有优良性能的酸性植物激素衍生化试剂，筛选出能够在温和条件下与多种目标激素快速高效反应、适用于 LC-MS 检测的试剂，从而建立一种利用高分辨质谱测定植物中常见的酸性内源激素的高通量方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

五种酸性植物激素标准品，纯度均 >97%: 脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA)、吲哚乙酸 (IAA)、茉莉酸