

一种全自动在线分析茉莉酸类化合物的定量分析方法

程淑静¹, 辛培勇¹, 褚金芳^{1,2}

(1.中国科学院遗传与发育生物学研究所 国家植物研究中心(北京), 北京 100101; 2.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 茉莉酸类化合物是植物防御的信号分子和重要的生长调节物质, 建立其精准定量分析方法可大大推动植物次生代谢物相关领域的发展。然而, 因化合物间挥发性不同, 传统离线方法难以同时分析多组分茉莉酸类化合物。此外, 离线方法还存在步骤繁琐、通量低等问题。通过对全自动在线分析仪的流路与阀切换方案设计, 解决同时分析挥发性与非挥发性茉莉酸类化合物的难题, 成功实现仅需一份 30 mg 植物样品便可准确定量茉莉酸与茉莉酸甲酯, 为阐明植物代谢途径和分子遗传机制提供更加便捷有力的技术支持。

关键词: 全自动在线固相萃取; LC-MS/MS; 植物激素茉莉酸与茉莉酸甲酯

A quantitative method for Jasmonates based on fully automated on-line solid phase extraction

CHENG Shujing¹, XIN Peiyong¹, CHU Jinfang^{1,2}

(1.National Centre for Plant Gene Research (Beijing), Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Jasmonates are crucial signalling molecules for plant defense response and key regulators of growth. Therefore, the development of precise quantitative analysis method could significantly promote the development of plant secondary metabolism. However, it's difficult to analyse jasmonates simultaneously due to their diverse volatility properties. In addition, the off-line methods also have some problems such as cumbersome steps and low throughput. To address these challenges, we designed the scheme of instrument's flow path and valve switching, and solved the problem of simultaneously analysing volatile and non-volatile jasmonates. We applied the established method to plant materials, JA and MeJA were detected in 30 mg fresh

weight. The novel on-line SPE LC-MS/MS analysis methods have advantages and will provide better technical support to elucidate metabolic pathways and molecular genetic mechanisms.

Keywords: on-line solid phase extraction; LC-MS/MS; Jasmonates

1 引言

植物激素是植物体内重要的痕量小分子次生代谢物^[1], 准确测定其在植物体内的含量对阐明其分子作用机理具有非常重要的意义。目前, 痕量小分子次生代谢物的定量分析方法多采用液相色谱串联质谱联用技术(Liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS), 其关键性前处理过程多为离线方法, 存在步骤繁琐、耗费时间长、通量低、样品利用率低、重复性差等问题^[2], 无法满足生物学研究对于灵敏度和稳定性的技术要求。

在线固相萃取(solid phase extraction, SPE)技术是在离线基础上, 通过软件控制仪器自动完成整个 SPE 流程, 可显著减少人为的操作误差, 提高分析结果的准确性与重复性。同时, 洗脱液能够直接转移至后续的液质分析, 节省离线操作中吹干浓缩等步骤的时间, 提高分析通量与样品利用率, 能够极大程度提高工作效率。近年来, 随着在线固相萃取(on-line solid phase extraction, On-line SPE)前处理技术的发展, 痕量次生代谢物分析方法逐渐向自动化与高通量方向发展^[3]。将自动高效的在线样品前处理技术与 LC-MS 相结合, 开发高效高灵敏度的定量分析方法是复杂基质中痕量次生代谢物在线分析研究中面临的一大挑战。

因茉莉酸类化合物(Jasmonates, JAs)挥发性差异较大^[4], 茉莉酸甲酯(Jasmonic acid methyl ester, MeJA)含甲酯基团, 具有良好的挥发性(图 1.1)。近年来多以气相色谱质谱联用方法检测植物内源 MeJA 含量的方法居多^[5]。然而, 茉莉酸(Jasmonic acid, JA)不具有挥发性, 在进行气相色谱质谱联用方法检测时, 通常需要复杂的衍生化反应使其具有挥发性。因此, 基于 On-line SPE-LC-MS/MS 系统, 通过整体流路的路线设计以及软件的合理配置, 进行仪器操作步骤程序编写, 以实现软件根据指令自由操控仪器的目标, 最终开发出能够同时分析挥发性与非挥发性茉莉酸类化合物的分析方法。

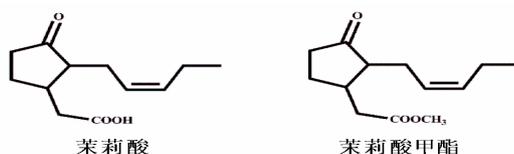


图 1.1 茉莉酸与茉莉酸甲酯的结构图

2 全自动在线分析茉莉酸类化合物方法开发

2.1 全自动在线系统搭建

样品全自动在线固相萃取系统是由自动进样器、二元高压梯度泵、在线固相萃取装置和柱温箱组成。在线固相萃取装置由两个高压溶剂注射器和机械臂以及多通阀与管路组成。MeJA 为中性化合物，而 JA 为酸性化合物，因性质的差异使得两者无法在同一流分里同时检测。原有全自动在线固相萃取仪，硬件和软件配置只能允许进行单一的简单操作流程，无法进行复杂的操作。因此，首先确定本操作系统所需搭载的硬件配置，通过整改固相萃取仪与质谱仪通讯连接，创建相应硬件通讯串口，结合 Sparklink 软件添加新硬件配置。随后，调试网线通讯串口，协调各部件间操作动作及时间，达到无干扰独立工作，使得软件可对所配置的硬件进行详细事件的时间控制，编写仪器操作程序，最终实现软件根据指令自由操控仪器的目标。

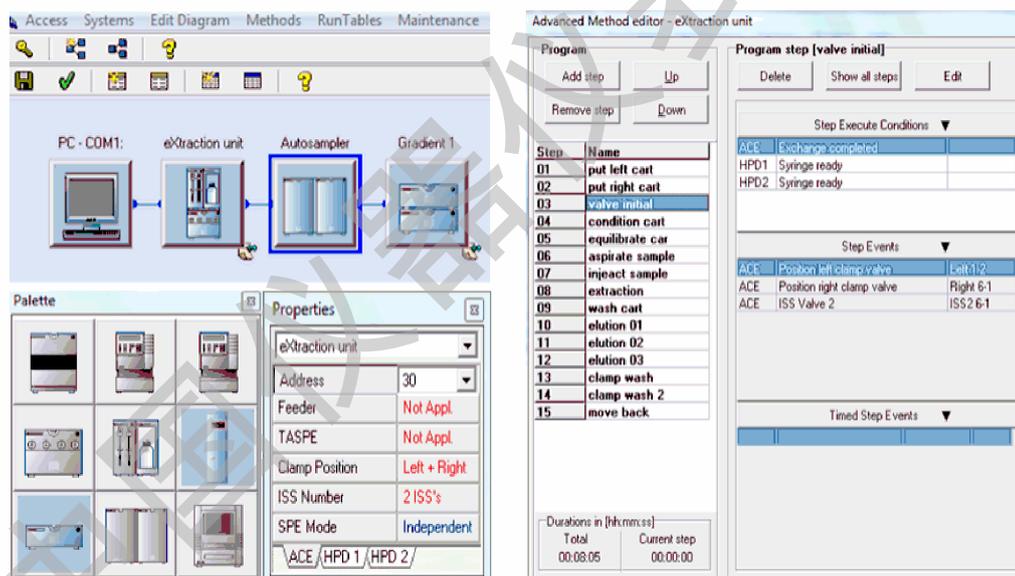


图 2.1 系统软硬件配置及操作程序

2.2 全自动在线方法流程设计

全自动在线固相萃取的步骤：活化、平衡、上样、淋洗、洗脱、小柱再生。系统受软件控制，自动切换各个模式。案例所建立前处理以及 LC-MS 检测仪 36 min，系统流路同图 2.2。

首先，机械臂按照方法设定好的位置选取 SPE 柱，将其转移至左钳夹处；第二步，高压注射器 1 依次注射出甲醇、水对 SPE 柱进行活化平衡；第三步，进样针吸取样品上样至

SPE 柱；第四步，高压注射器 1 注射出淋洗液对 SPE 柱进行淋洗；第五步，机械臂将 SPE 柱从左钳夹处转移至右钳夹处；第六步，高压注射器 2 注射出 MeJA 洗脱液，对其进行洗脱；此时，触发质谱与液相开关，洗脱液与流动相进行混合，待洗脱液完全注射完毕后，开始进行 MeJA 分离检测；第七步，待 MeJA 检测完，高压注射器 2 注射出 JA 洗脱液对 SPE 柱进行第二次洗脱。此时，触发质谱与液相开关，对 JA 进行分离检测。第八步，在质谱检测过程中，系统执行 SPE 柱清洗再生；第九步，ACE 中的机械臂将 SPE 柱由右钳夹处转移至 SPE 盒中。

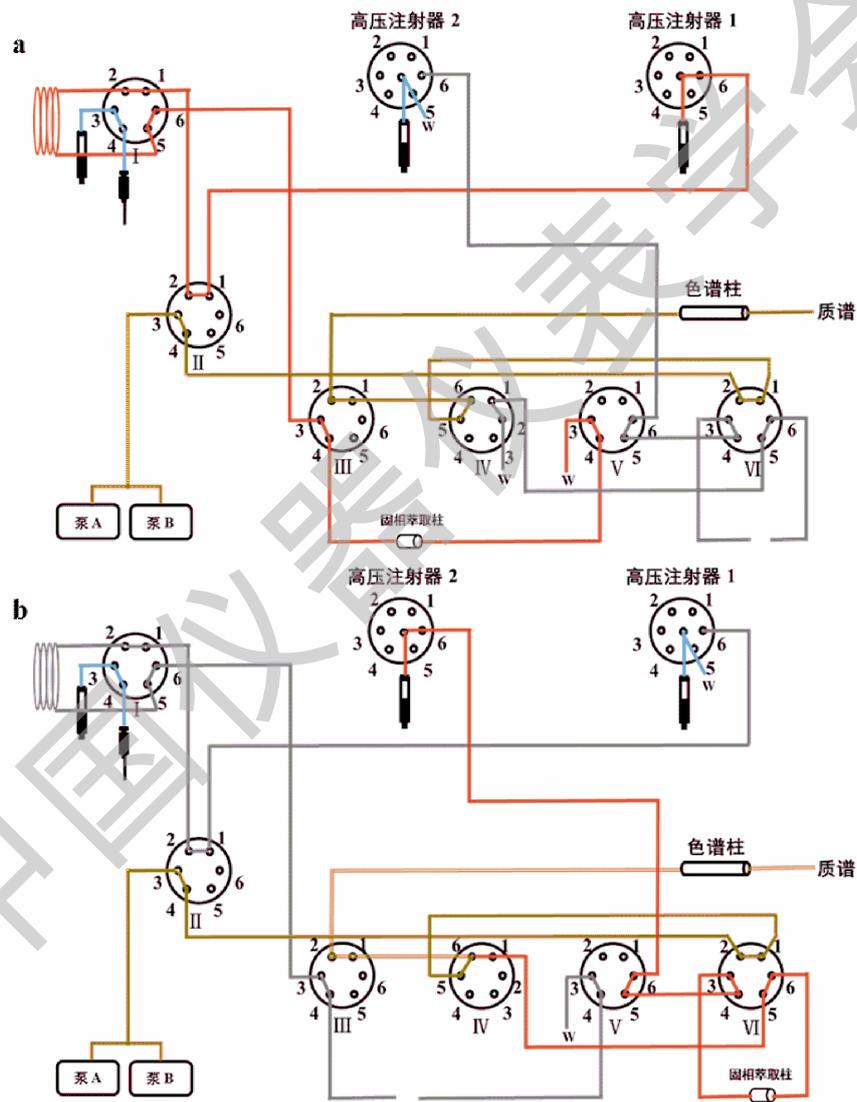


图 2.2 在线固相萃取-液相色谱系统示意图

2.3 液相方法与质谱方法建立

根据 JA 与 MeJA 的化学性质选取反相色谱柱进行色谱分离,洗脱反相 SPE 柱所使用的高比例有机相很容易引起目标化合物在色谱柱中扩散,导致峰形及分离效果差。为避免这种现象的产生,采用聚焦洗脱模式,即为使洗脱液中的目标化合物在色谱柱入口处产生聚集效应,流动相要保持高浓度水相,以稀释高浓度洗脱液。同时,为避免由于瞬间总体速度变化快,进而导致压力波动较大,造成峰型异常,需将洗脱后的流速进行调整。洗脱流程具体见表 2.1 至表 2.2。

表 2.1 JA 的液相洗脱梯度表

时间 (min: sec)	流速 (mL/min)	A %	B %
00:01	0.3	98	2
00:02	0.3	100	0
03:30	0.3	100	0
03:31	0.4	80	20
12:30	0.4	0	100
13:30	0.4	98	2
14:30	0.4	98	2

注: A 为 0.05%乙酸水溶液, B 为乙腈溶液。

表 2.2 MeJA 的液相洗脱梯度表

时间 (min: sec)	流速 (mL/min)	A %	B %
00:01	0.3	98	2
00:02	0.3	100	0
02:00	0.3	100	0
02:01	0.4	70	30
11:00	0.4	0	100
12:00	0.4	98	2
13:00	0.4	98	2

注: A 为 0.05%乙酸水溶液, B 为乙腈溶液。

根据 JA 与 MeJA 的性质，分别采用 ESI 源负离子和正离子模式，通过使用多重反应监测(MRM)模式检测，对标准品溶液的 MRM 参数进行优化。其中优化的离子源参数为 CUR, 30 psi; TEM, 600°C; GS1, 50 psi; GS2, 55 psi; CAD, 8 psi; JA 的 IS 为-4500 V, MeJA 的 IS 为 5500V。优化后, JA、MeJA 及其内标的 MRM 参数见表 2.3。

表 2.3 JA 与 MeJA 的 MRM 参数

分析物	母离子 (Da)	子离子 (Da)	碰撞能量 (eV)	去簇电压 (V)	入口电压 (V)	碰撞室出口电压 (V)																						
JA	209.1	59.0	-17	-80	-10	-12																						
		49.0	-60				D ₅ -JA	214.1	59.0	-17	50	10	12	49.0	-60	MeJA	225.1	151.1	17	50	10	12	147.1	19	D ₅ -MeJA	230.1	156.1	17
D ₅ -JA	214.1	59.0	-17	50	10	12																						
		49.0	-60				MeJA	225.1	151.1	17	50	10	12	147.1	19	D ₅ -MeJA	230.1	156.1	17	50	10	12	152.1	19				
MeJA	225.1	151.1	17	50	10	12																						
		147.1	19				D ₅ -MeJA	230.1	156.1	17	50	10	12	152.1	19													
D ₅ -MeJA	230.1	156.1	17	50	10	12																						
		152.1	19																									

2.4 方法学考察

为评估整套检测定量方法的灵敏度和稳定性，对所建方法进行一系列的方法学考察。结果呈现良好的线性关系， R^2 都为 0.9999，表明该方法在此范围内具有良好的线性；MeJA 与 JA 的检测限 LODs 分别为 0.10 pg 和 0.08 pg，定量限 LOQs 分别为 0.33 pg 和 0.25 pg。所建方法对 JA 与 MeJA 的回收率分别为 102%和 74%；基质效应分别为 68%和 96%。同时，通过对 3 个平行样品内源的 JA 与 MeJA 进行定量，定量结果的 RSD 均小于 10%，体现了方法具有稳定的重现性。具体方法学考察参数及结果如表 2.4 至 2.5。

表 2.4 方法的线性范围、线性回归方程、 R^2 、检出限和定量限

分析物	线性范围(pg)	线性回归方程	R^2	检出限(pg)	定量限(pg)
D ₅ -JA	0.31 - 125	$y = 6213.5x - 291.62$	0.9999	0.08	0.25
D ₅ -MeJA	0.31 - 125	$y = 4963.5x + 2534.9$	0.9999	0.10	0.33

注： R^2 为线性相关系数的平方，y 为内标峰面积，x 为相应内标量。

表 2.5 方法的基质效应、回收率和重现性

分析物	基质效应 (%, n = 3)	回收率 (%, n = 3)	重现性 (%, n = 3)
JA	68 ± 7.21	102 ± 3.41	1.37
MeJA	96 ± 8.48	74 ± 6.99	7.53

2.5 方法的应用

JAs 是植物胁迫中快速响应的一类信号分子，是介导植物发育与防御机制的重要激素^[6-7]。模拟机械损伤对植物叶片进行伤害实验，对水稻损伤叶片中 JAs 合成与积累的时间动态变化进行研究。图 2.3 表明，在未受伤的水稻叶片中，MeJA 与 JA 的含量分别是 0.23 ± 0.01 ng/g 与 0.89 ± 0.08 ng/g；受伤后，叶片开始积累大量的 MeJA 与 JA。JA 在受伤 15 min 内，对胁迫作出了迅速响应，含量急剧上升至 283.28 ± 11.13 ng/g；在受伤 30 min 时，JA 含量下降至 173.00 ± 16.45 ng/g；受伤 2 h 后，其含量达到新峰值，为 397.37 ± 3.27 ng/g，随后 JA 含量开始下降。因为 MeJA 是通过 JA 在甲基转移酶的催化下生成的，所以 MeJA 与 JA 的趋势相似。MeJA 在受伤后 2 h 时的含量最高，为 1.84 ± 0.16 ng/g，随后开始下降。

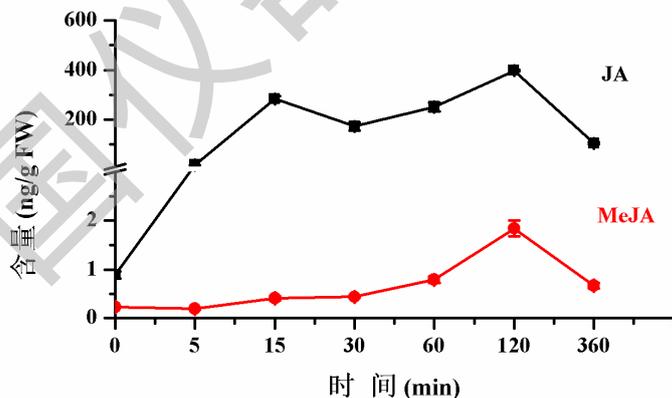


图 2.3 水稻受伤叶片 MeJA 与 JA 含量的时空动态变化

3 结语

在原全自动在线分析仪的基础上，通过对仪器流路与阀切换方案的设计，实现软件根据指令自由操控仪器，开发出能够同时分析挥发性与非挥发性茉莉酸类化合物的分析方法。同时，相比于离线前处理操作，该方法仅需 36 min 就可以完成样品的前处理与检测分析，

大大提高了分析通量。同时,该方法可将洗脱液直接移至后续的液质分析,大幅提高了样品利用率,降低了样品用量,仅需 30 mg 便可进行内源 JA 与 MeJA 的检测,推动了 JAs 相关领域研究的深入发展。

参考文献:

- [1] Smith S M, Li C Y, and Li J Y. Hormone function in plants. hormone metabolism and signaling in plants[M]. New York, America, Elsevier, 2017, pp 1-29.
- [2] Shen F, Xu Y J, Wang Y. et al. Rapid and ultra-trace levels analysis of 33 antibiotics in water by on-line solid-phase extraction with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J. Chromatogr. A, 2022, 167, 463304.
- [3] Maciel-Silva F W, Lachos-Perez D, Buller, L S. et al. Green extraction processes for complex samples from vegetable matrices coupled with on-line detection system: a critical review [J].Molecules, 2022, 27, 6272.
- [4] Li J J, Quan Y, Wu Z S. et al. EBR and JA regulate aroma substance biosynthesis in 'Ruidu Hongyu' grapevine berries by transcriptome and metabolite combined analysis[J].Front plant sci, 2023, 14, 1185049
- [5] Huang Z H, Wang Z L, Shi B L. et al. Simultaneous determination of salicylic acid, jasmonic acid, methyl salicylate, and methyl Jasmonate from ulmus pumila leaves by GC-MS[J]. Int. J. Anal. Chem, 2015, 698630.
- [6] Xie D X, Feys B F, James S. et al. *COI1*: an arabidopsis gene required for jasmonate regulated defense and fertility[J]. Science, 1998, 280, 1091-1094.
- [7] Glauser G, Dubugnon L, Mousavi S R. et al. Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded arabidopsis[J]. J. Biol. Chem, 2019, 284, 34506-34513.