

# Determination of Four Endogenous Phytohormones in *Artemisia ordosica* Leaves by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Wenhong Deng, Junqi Zhang

Analysis and Testing Center, Beijing Forestry University, Beijing  
Email: [dengwh@bjfu.edu.cn](mailto:dengwh@bjfu.edu.cn)

Received: Dec. 16<sup>th</sup>, 2014; accepted: Jan. 5<sup>th</sup>, 2015; published: Jan. 19<sup>th</sup>, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.  
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).  
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

Four endogenous phytohormones, indole-3-acetic acid, abscisic acid, gibberellins and jasmonic acid in the leaves of *Artemisia ordosica* were examined by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to provide effective and reliable methods for identification of phytohormones in plants. The four analytes were extracted from *A. ordosica* leaves by isopropanol-water-hydrochloric acid (2:1:0.002, V/V/V), and partitioned by dichloromethane, and then separated by Agilent C<sub>18</sub> column with gradient elution using acetonitrile and 0.1% acetic acid in water as mobile phases. Negative electrospray ionization with multiple reaction monitor mode was used in the detection. External standard method was used to quantify the analytes concentrations. The recoveries of this method were higher than 94.0%, and the relative standard deviations were 0.92% - 1.56%. The results showed that phytohormones was well separated, and the ideal quantitative data of phytohormones in *A. ordosica* leaves were obtained, and this method suited the purpose of the determination for phytohormones in plant material.

## Keywords

Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Phytohormones, *Artemisia ordosica*

---

# UPLC-MS/MS测定油蒿叶片中4种内源植物激素

邓文红, 张俊琦

北京林业大学公共分析测试中心, 北京

Email: [dengwh@bifu.edu.cn](mailto:dengwh@bifu.edu.cn)

收稿日期: 2014年12月16日; 录用日期: 2015年1月5日; 发布日期: 2015年1月19日

## 摘要

本文以菊科植物油蒿(*Artemisia ordosica*)为研究材料,采用超高效液相色谱串联质谱法对叶片中的植物激素进行分析,以探讨植物组织中的植物激素鉴定方法。油蒿叶片经异丙醇-水-盐酸(2:1:0.002, V/V/V)浸提,二氯甲烷萃取,反相C<sub>18</sub>柱分离,流动相为0.1%的乙酸水溶液和乙腈,梯度洗脱。多反应监测离子模式进行定性和定量分析,外标法定量。用该方法测定吲哚-3-乙酸、脱落酸、赤霉素和茉莉酸4种内源植物激素的回收率高于94.0%,精密度和重现性均较好(相对标准偏差为0.92%~1.56%)。对实际植物样品的分析也取得了较理想的结果,表明该方法完全适用于植物样品中植物激素含量的检测。

## 关键词

超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS), 植物激素, 油蒿

## 1. 引言

植物激素是植物体内合成的一系列痕量有机化合物,在极低的浓度下便可引发生理反应,几乎参与了调控植物从种子休眠、萌发、营养生长到生殖生长,以及成熟和衰老的整个生命过程[1]-[3]。既可调控植物自身的生长发育,又通过与植物所生存的外部环境相互作用调节其对环境的适应性[4] [5]。植物激素在植物体内含量极低(一般 ng/g, 甚至 pg/g 水平),而且与其共存的成分非常复杂[6] [7],此外,植物激素性质不稳定,易被光解、热解和氧化[8],因此,如何对微量植物激素进行简便、快速和准确的定量分析,一直是植物激素研究领域的难题之一。

目前,植物激素的测定方法主要有酶联免疫吸附法[9]、气相色谱法[10] [11]、液相色谱法[12] [13]和气相色谱-质谱法[14] [15],上述方法存在着前处理复杂繁琐、耗费试剂多、处理过程易造成待测成分损失、检测时杂质成分干扰严重等缺点。超高效液相色谱-串联质谱具有高灵敏度和高选择性的优势,增加了定性和定量的可靠性[16] [17]。本研究以油蒿叶为材料,建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法测定油蒿叶片中吲哚-3-乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA<sub>3</sub>)和茉莉酸(JA)4种内源植物激素的检测方法。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 植物材料

2013年6月,在宁夏盐池荒漠生态系统定位研究站采集当年生油蒿叶片,采样后立即放入液氮罐中,

真空冷冻干燥, 研磨成粉末, 过 40 目筛, 混匀备用。

## 2.2. 仪器与试剂

### 2.2.1. 仪器

Agilent1260 超高效液相色谱仪串联 AB Qtrap5500 质谱仪(美国), 配有电喷雾电离接口(ESI)及 Analyst 数据处理系统; Thermo481 恒温制冷摇床(美国); Beckman Avanti J-26 XP 高速离心机(美国); Organomation 氮吹仪(美国); 上海亿倍冷冻干燥机。

### 2.2.2. 试剂

盐酸、异丙醇、二氯甲烷为分析纯(北京化工厂生产); 实验用水为美国 Milli-Q plus 超纯水机生产的超纯水; 乙腈、甲醇、乙酸为色谱纯(美国 Fisher 公司生产); 吲哚-3-乙酸、脱落酸、赤霉素和茉莉酸标准品购自 Sigma 公司。

### 2.2.3. 标准溶液的配制

分别准确称取吲哚-3-乙酸、脱落酸、赤霉素和茉莉酸标准品 5 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配制成  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液, 密封储存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中。用时稀释成一系列质量浓度的标准溶液。

## 2.3. 试验条件

### 2.3.1. 色谱条件

色谱柱: Agilent SB-C<sub>18</sub>, 4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm; 柱温: 30°C; 进样体积: 10 μL; 流速:  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 流动相: 乙腈(A), 0.1% 乙酸 - 水溶液(B); 洗脱程序: 0~0.5 min, 90% B, 0.5~5 min, 90%~5% B, 5~5.1 min, 90% B, 5.1~8 min, 90% B。

### 2.3.2. 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 负离子模式; 检测方式: 多反应监测(MRM); 气帘气压力为 30 PSi, 温度为 600°C, 雾化器压力为 40 PSi, 辅助气压力 50 PSi, 离子化电压 -4500 V。

## 2.4. 样品提取方法

准确称取 50 mg 油蒿鲜叶干粉, 加入 0.5 mL 异丙醇/水/盐酸(体积比 2:1:0.002),  $4^\circ\text{C}$  100 r.p.m 震荡 30 min, 然后加入 1 mL 二氯甲烷  $4^\circ\text{C}$  震荡 30 min,  $4^\circ\text{C}$  13,000 g 离心 5 min, 取下层溶液, 氮吹仪吹干, 加入 0.1 mL 甲醇溶液溶解样品,  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

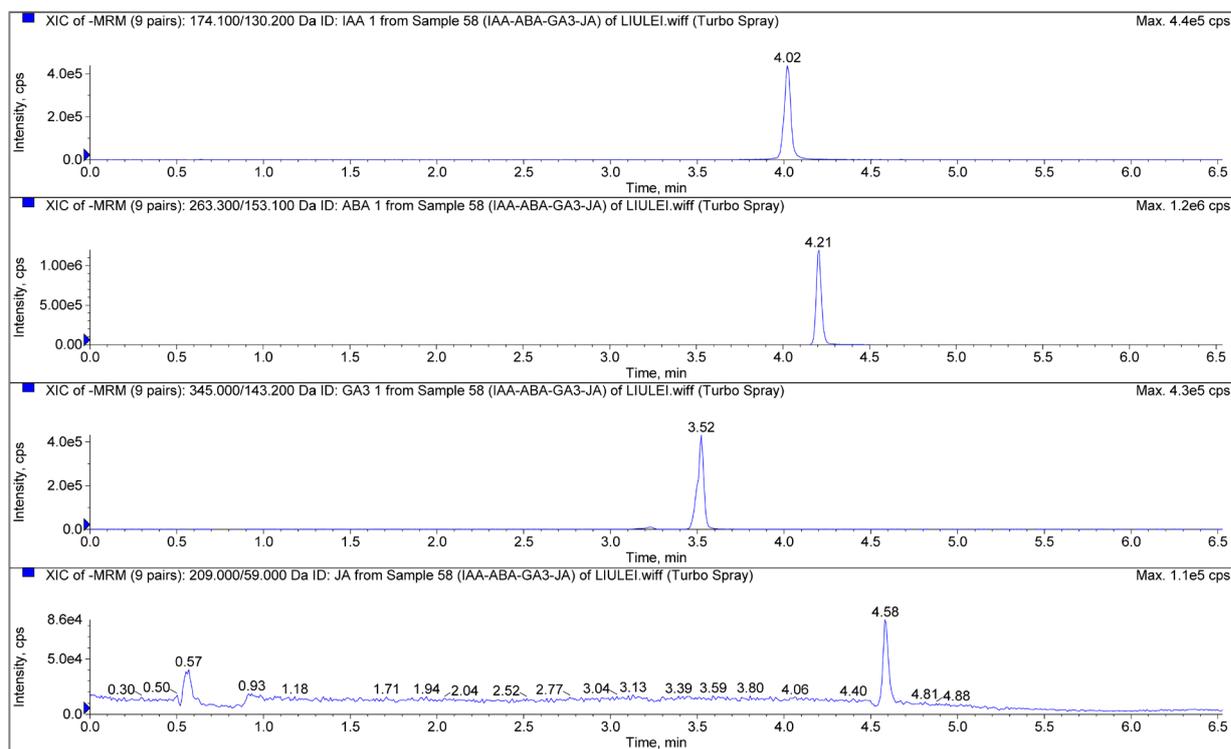
## 2.5. 植物激素的定性和定量测定

根据植物激素标准品的保留时间和质谱定性离子对样品中的植物激素定性, 外标曲线计算植物激素的含量。每种指标的测定重复 3 次, 实验数据用 Excel 软件进行分析。

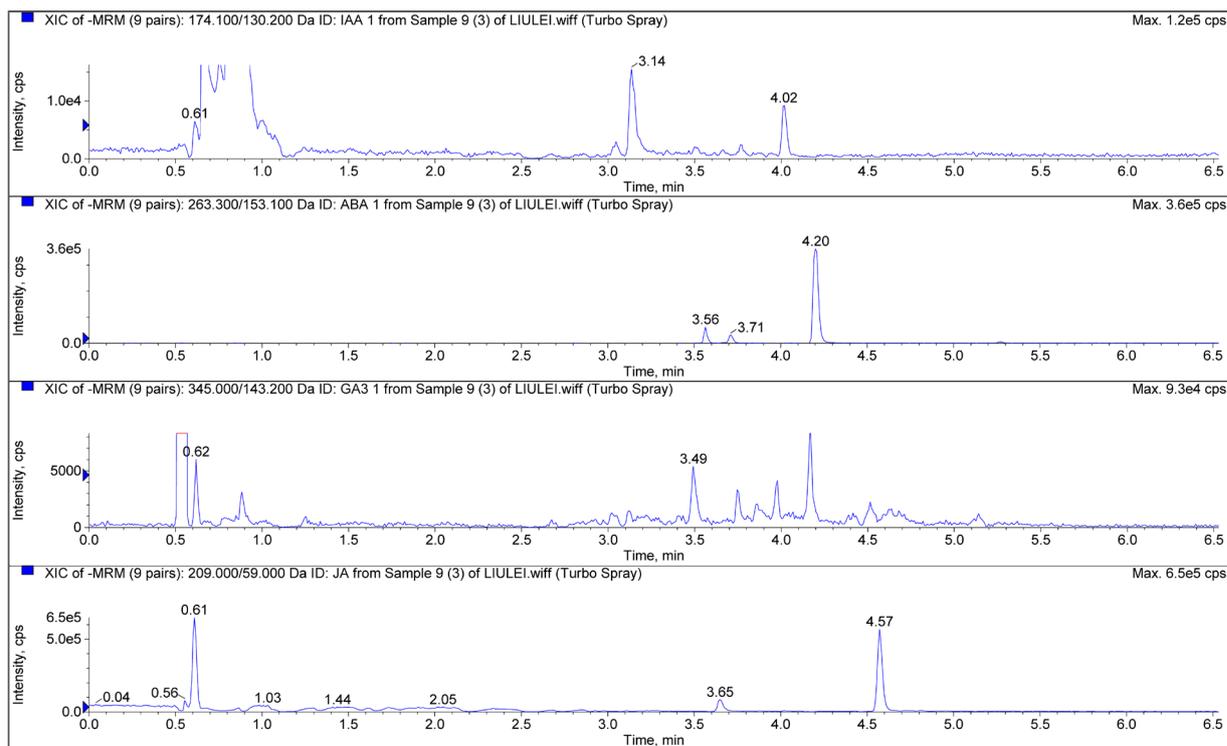
## 3. 结果与分析

### 3.1. 色谱条件的优化

当甲醇作流动相时, 离子化程度受到抑制, 丰度明显降低, 导致灵敏度下降, 而乙腈的离子化效率明显优于甲醇, 因此采用乙腈作为流动相。在流动相中加入乙酸能增加酸性植物激素在 ESI 模式下的离子化效率。分别配制 0.05%、0.1%、0.2% 的乙酸水溶液作为流动相, 试验表明 0.1% 的乙酸水溶液能提供最佳离子化条件, 峰面积信号最强, 灵敏度最高。图 1 为 4 种植物激素标准溶液(a)和沙蒿叶中植物激素(b)的 MRM 色谱图。



(a)



(b)

Figure 1. Multiple reaction monitor (MRM) chromatogram of four phytohormones of standard solution (a) and leaves of *A. ordosica* (b)

图 1. 4 种植物激素标准溶液(a)和沙蒿叶中植物激素(b)的 MRM 色谱图

### 3.2. 质谱条件的优化

分别取 10 ng·mL<sup>-1</sup> IAA、ABA、GA<sub>3</sub>、JA 标准溶液，以流动注射方式进行 ESI 源质谱分析。4 种内源植物激素负离子信号比正离子信号明显，所以选择负离子监测模式进行检测。在此模式下，对质谱条件进行充分优化，选取经碰撞后所得丰度较高的离子作为定量离子，并确定其最佳碰撞能量、去簇电压以及碰撞池出口电压(表 1)。在负离子监测模式下，各激素在 Agilent SB-C<sub>18</sub> 色谱柱上实现有效分离，各离子之间不会产生干扰。

### 3.3. 方法的线性范围和检出限

取质量浓度分别为 1、5、20、50、200 ng·mL<sup>-1</sup> 的 IAA、ABA、GA<sub>3</sub>、JA 混合标准溶液，在相同的色谱和质谱条件下测定其峰面积，以浓度为横坐标，定量离子的色谱峰面积为纵坐标得标准曲线，并求出相应的线性回归方程及相关系数。结果表明：4 种内源植物激素在 1~200 ng·mL<sup>-1</sup> 的浓度范围内具有良好的线性关系，相关系数均在 0.9989 以上。按 3 倍信噪比计算得到样品中 4 种植物激素的检出限(表 2)，可见各植物激素线性关系良好，检出限均低于 0.07 ng·mL<sup>-1</sup>，说明该方法对植物激素有很高的检测灵敏度。

### 3.4. 方法的精密度

在上述色谱条件下，对 10 ng·mL<sup>-1</sup> 的 IAA、ABA、GA<sub>3</sub>、JA 混合标准溶液重复测定 7 次，IAA、ABA、GA<sub>3</sub>、JA 峰面积相对标准偏差分别为 0.92%、1.36%、1.25%、1.56%。结果表明，本法的精密度良好。

### 3.5. 方法的回收率

分别在已测知植物激素含量的油蒿叶样品中添加 5、20、100 ng·g<sup>-1</sup> 的 IAA、ABA、GA<sub>3</sub>、JA 混合标准溶液，按上述样品提取方法进行处理，UPLC-MS/MS 进行测定，平均回收率 94.0%~98.3%，回收率相对标准偏差小于 4.2% (表 3)，说明该方法重现性良好。

**Table 1.** MS/MS parameters for determination of phytohormones

**表1.** 植物激素的质谱分析参数

植物激素	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(eV)	碰撞池出口电压(V)
生长素	174.1	130.2	-14.2	-13
脱落酸	263.3	153.1	-17	-14
赤霉素3	345.0	143.2	-33	-10
茉莉酸	209.0	59.0	-40	-16

**Table 2.** Linearity and detection limits of four phytohormones

**表2.** 4种植物激素的线性方程及方法检出限

植物激素	线性范围/ng·mL <sup>-1</sup>	线性方程	相关系数/r <sup>2</sup>	检出限/ng·mL <sup>-1</sup>
生长素	1~200	Y = 35353x - 43776	0.9997	0.02
脱落酸	1~200	Y = 64457x - 68265	0.9998	0.01
赤霉素	1~200	Y = 49712x + 105131	0.9994	0.01
茉莉酸	1~200	Y = 7812.4x + 18349	0.9989	0.07

**Table 3.** Recovery rates of four phytohormones by UPLC-MS/MS  
**表3.** UPLC-MS/MS测定4种植物激素的回收率

植物激素	添加水平/ng·g <sup>-1</sup>	回收率/%	相对标准偏差/%, n = 3
生长素	5	94.0	4.2
	20	95.7	1.5
	100	97.7	2.2
脱落酸	5	95.2	1.8
	20	97.5	3.3
	100	98.3	3.7
赤霉素	5	94.4	3.5
	20	98.1	1.5
	100	96.8	3.1
茉莉酸	5	94.6	1.2
	20	96.4	2.1
	100	98.1	1.7

### 3.6. 实际样品的测定

按照本文所建立的分析方法,对油蒿叶片中的植物激素含量进行测定,生长素、脱落酸、赤霉素、茉莉酸含量分别为 4.74 ng·g<sup>-1</sup>、11.67 ng·g<sup>-1</sup>、3.41 ng·g<sup>-1</sup>、77.00 ng·g<sup>-1</sup>。

## 4. 讨论

超高效液相色谱串联质谱法测定植物激素是近年来发展起来的一种新方法[18],它结合了色谱对复杂样品的高分离能力和质谱的高选择性、高灵敏度的特点,大幅度地提高了检测的灵敏度[19],而且可以避免 GC-MS 分析中样品繁琐衍生化的处理过程[20],此外,与传统的液相色谱和气相色谱检测方法相比,色谱质谱联用可以消除色谱由于工作原理而可能导致的定性错误,保证了定性和定量结果的可靠性[21]。能为同时测定多种植物激素提供简便,准确,快速的检测方法。

关于植物激素的提取方法,目前多采用有机溶剂浸提,固相微萃取小柱纯化后进样分析,此方法虽然具有节约溶剂,简单快速等优点。但是这种基于除杂的纯化方法往往有较大的基质效应,而且过程也较为繁琐、损失也大。而本文采用的二氯甲烷萃取后直接进样分析,可以达到理想的分离结果。

本文建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定油蒿叶中多种植物激素的分析方法。该方法具有简单、灵敏度高、选择性好、分析时间短、回收率高等优点,完全适用于植物样品中植物激素含量的检测。

## 参考文献 (References)

- [1] 缪颖, 伍炳华, 陈德海, 杨汉金 (2000) 植物激素研究中的遗传学和分子生物学方法. *植物生理学通讯*, **3**, 281-288.
- [2] Nambara, E. and Marion, P.A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 165-185.
- [3] Smet, I.D., Zhang, H., Inzé, D. and Beeckman, T. (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science*, **11**, 434-439.
- [4] Finkelstein, R.R., Gampala, S.S. and Rock, C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, **14**, 15-45.

- [5] 曹慧颖, 王可, 高何瑞, 张立军, 夏润玺 (2013) 植物激素相关 microRNA 研究进展. *植物生理学报*, **11**, 1121-1126.
- [6] 许智宏, 李家洋 (2006) 中国植物激素研究: 过去、现在和未来. *植物学通报*, **5**, 433-442.
- [7] 吴倩, 王璐, 吴大朋, 段春风, 关亚风 (2014) 植物激素样品前处理方法的研究进展. *色谱*, **4**, 319-329.
- [8] 文静, 孔维军, 罗红梅, 王建, 杨美华 (2014) 植物内源激素检测方法新进展. *中南药学*, **1**, 47-52.
- [9] 白玉, 杜甫佑, 白玉, 刘虎威 (2010) 植物激素检测技术研究进展. *生命科学*, **1**, 37-44.
- [10] 张有林, 陈锦屏, 张宝善 (1999) 用嗅甲基五氟苯衍生气相色谱法测定葡萄浆果中的脱落酸和吲哚-3-乙酸. *西北植物学报*, **2**, 357-361.
- [11] 刘志勇, 沈春章, 董元彦 (2006) 气相色谱法速测油菜中的乙烯释放量. *化学与生物工程*, **2**, 55-56.
- [12] 胡佩, 刘德辉, 胡锋, 沈其荣 (2002) 蚓粪中的植物激素及其对绿豆插条不定根发生的促进作用. *生态学报*, **8**, 1205-1208.
- [13] 马宏棋, 陈敏敏, 朱海生, 温庆放 (2014) 草莓 ABA 的快速提取方法及超高效液相色谱分析. *园艺学报*, **3**, 577-584.
- [14] Engelberth, J., Schmelz, E.A., Alborn, H.T., Cardoza, Y.J., Huang, J. and Tumlinson, J.H. (2003) Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **312**, 242-250.
- [15] Zhang, F.J., Jin, Y.J., Xu, X.Y., Lu, R.C. and Chen, H.J. (2008) Study on the extraction, purification and quantification of jasmonic acid, abscisic acid and indole-3-acetic acid in plants. *Phytochemical Analysis*, **19**, 560-567.
- [16] Segarra, G., Jáuregui, O., Casanova, E. and Trillas, I. (2006) Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry*, **67**, 395-401.
- [17] 王璐, 吴倩, 段春风, 吴大朋, 关亚风 (2011) 基质固相分散萃取 - 高效液相色谱 - 串联质谱法分析拟南芥中的赤霉素. *色谱*, **9**, 923-926.
- [18] 徐生坚, 曹慧, 陈小珍 (2013) 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定粮谷中 6 种植物生长调节剂残留. *食品科学*, **18**, 218-222.
- [19] 曾少华, 高洁莹 (2013) 植物激素理化检测方法的研究进展. *农产品加工(学术)*, **5**, 62-66.
- [20] 王芳, 陈子林 (2010) 茉莉酸类植物激素分析研究进展. *生命科学*, **1**, 45-58.
- [21] 章虎, 钱鸣蓉, 李振, 王祥云, 徐浩, 王新全, 陈志民 (2010) 高效液相色谱 - 串联质谱快速测定稻米中氯虫苯甲酰胺残留. *农药*, **12**, 906-908.

汉斯出版社为全球科研工作者搭建开放的网络学术中文交流平台。自2011年创办以来，汉斯一直保持着稳健快速发展。随着国内外知名高校学者的陆续加入，汉斯电子期刊已被450多所大中华地区高校图书馆的电子资源采用，并被中国知网全文收录，被学术界广为认同。

汉斯出版社是国内开源（Open Access）电子期刊模式的先行者，其创办的所有期刊全部开放阅读，即读者可以通过互联网免费获取期刊内容，在非商业性使用的前提下，读者不支付任何费用就可引用、复制、传播期刊的部分或全部内容。

