·基础研究·

UPLC-MS/MS 测定人参花中 5 种内源植物激素含量△

陈康[1,2]，刘娟[1]，周修腾[1]，纪瑞锋[1]，童宇茹[1,3]，陈同[1]，袁媛[1*]

（1. 道地药材国家重点实验室，中国中医科学院 中药资源中心，北京　100700；
2. 安徽中医药大学，合肥　230038；3. 沈阳药科大学 中药学院，沈阳　110016）

［摘要］ **目的**：探究人参花中内源激素分布规律，为后期研究内源性植物激素调控人参皂苷合成奠定基础。**方法**：采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱（UPLC-MS/MS）对人参花中 5 种内源性植物激素（生长素，赤霉素，脱落酸，茉莉酸，水杨酸）含量进行测定分析。**结果**：人参花中 5 种内源性植物激素含量测定结果都具有专属性，与抗逆相关的激素脱落酸（ABA）和水杨酸（SA）含量较高，分别为 1 126.17 ± 232.52 ng·g^{-1}和 3 929.43 ± 898.52 ng·g^{-1}；与促生长相关的激素生长素（IBA）和赤霉素（GA3）含量较低，分别为 516.70 ± 138.55 ng·g^{-1}和 692.33 ± 228.50 ng·g^{-1}；茉莉酸（JA）合成途径中，茉莉酸前体 12-氧植物-二烯酸（OPDA）含量极高，为 47 158.84 ± 12 910.55 ng·g^{-1}；茉莉酸（JA）并未检出，茉莉酸活性形式异亮氨酸（JA-ile）为 22.08 ± 6.27 ng·g^{-1}。**结论**：本研究首次检测了人参花中5 种内源性植物激素的分布规律，并深入挖掘人参花中茉莉酸途径相关成分的合成，为后期深入研究内源性植物激素调控人参皂苷合成奠定基础。

［关键词］ UPLC-MS/MS；人参花；植物激素

Determination of Various Endogenous Hormones in Flower Buds of *Panax ginseng* by UPLC-MS/MS

CHEN Kang[1,2], LIU Juan[1], ZHOU Xiu-teng[1], JI Rui-feng[1], TONG Yu-ru[1,3], CHEN Tong[1], YUAN Yuan[1*]

(1. *China State Key Laboratory of Dao-di Herbs breeding base*, *National Resource Center for Chinese Materia Medica*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700, *China*;
2. *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230038, *China*;
3. *School of Traditional Chinese Materia Medica*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To explore the important regulation role of plant endogenous hormones on secondary metabolism of Chinese herbal medicine. **Methods**: Five kinds of endogenous phytohormones (auxin, gibberellin, abscisic acid, jasmonic acid, salicylic acid) in flowers of *Panax ginseng* were measured by UPLC-MS/MS. **Results**: The method for determination of 5 endogenous phytohormone content in *P. ginseng* all has high specificity. The higher content of ABA and SA (plant resistance related) was 1 126.17 ± 232.52 ng·g^{-1} and 3 929.43 ± 898.52 ng·g^{-1} respectively; The lower content of IBA and GA_3 (plant growth related) was 516.70 ± 138.55 ng·g^{-1} and 692.33 ± 228.50 ng·g^{-1} respectively; In jasmonic acid synthesis pathway, the highest content of jasmonate precursor, OPDA, was 47 158.84 + 12 910.55 ng·g^{-1}. JA was not detected and JA-ile was 22.08 + 6.27 ng·g^{-1}. **Conclusion**: The study explored the distribution of 5 endogenous phytohormones in ginseng flowers, which laid the foundation for further study on the regulation of endogenous phytohormones on ginsenoside biosynthesis.

［**Keywords**］ UPLC-MS/MS; ginseng flower; plant hormone

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180205007

人参花为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥花蕾，具有补气强身、抵抗疲劳、延缓衰老的作用[1]。研究表明，人参花中含有 20 多种皂苷活性物质、17 种氨基酸、11 种微量元素、3 种抗癌活性蛋白、多种生物活性挥发油等[2-3]，具有药品及保健品开发潜力；同时，人参主要活性成分

△［基金项目］ 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助；“十三五”第一批重点领域科研项目“分子生药的研究及应用”（ZZ10-008）；国家自然科学基金（81603235）

*［通信作者］ 袁媛，研究员，研究方向：分子生药；E-mail：y_ yuan0732@163.com

人参皂苷在人参花中含量高达 5% ~7%，是人参根的 5 ~6 倍[4]，且从人参花中分离得到了多种具有生物活性的新颖结构人参皂苷[5-7]。近年来，随着新药源的拓展研究，有关于人参花的药理、药化、提取工艺报道越来越丰富，但尚未见到有关人参花的内源植物激素报道。

植物内源性激素是植物体内重要的信号分子，其分布具有明显的组织特异性，对植物的生长发育有重要的调节控制作用。其中，生长素（如：IBA、IAA、NAA）、赤霉素（GA）、脱落酸（ABA）参与了多个植物生长发育过程，如种子萌发、休眠、植物生长、开花、叶片衰老脱落等；茉莉酸（JA）、水杨酸（SA）作为胁迫激素，受到生物胁迫和非生物胁迫的调控，增强植物的抗逆性，在植物的胁迫耐受性和抗性中发挥着重要作用[8-10]。研究表明，以上 5 种植物激素对药用植物次生代谢调控均具有重要意义。其中 IBA 可以提高匍枝筋骨草 β-脱皮甾酮的含量[11]，GA 可以诱导丹参毛状根酚酸类物质的积累[12]，ABA 可以调控滇紫草细胞紫草宁生物合成[13]，JA 与 SA 可促进白木香悬浮细胞的倍半萜生物合成[14-15]等。

植物激素对人参皂苷的合成具有重要的调控意义[16-18]，但有关人参内源性激素的研究较少，而在人参花中内源性植物激素的分布尚未见报道。本研究根据课题组前期建立的激素测定方法[19]，采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱（UPLC-MS/MS）对人参花中 5 种内源性植物激素 ABA、GA_3、IAA、JA、SA 进行测定，同时还对 JA 前体 12-氧-二烯酸（OPDA）和 JA 活性形式 JA-异亮氨酸（JA-ile）含量进行测量分析，旨在为揭示内源性植物激素对人参花中次生代谢的调控机制奠定基础。

1　材料与试剂

1.1 材料

供试人参幼苗，由康美新开河种植基地提供，经中国中医科学院中药资源中心黄璐琦研究员鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的幼苗。

1.2 仪器

AB Sciex 公司 QTRAP© 6500 三重四极杆质谱联用分析系统；美国 Thermo Scientific 公司 Millipore 超纯水系统；BT-224S 型万分之一电子分析天平；THZ-C-1 全温震荡摇床；5810R 高速冷冻离心机。

1.3 试剂

生长素、赤霉素、脱落酸、茉莉酸、水杨酸等对照品，均购于中国食品药品检定研究院；色谱纯乙腈、甲酸购自 Fisher 公司；其余试剂为国产分析纯，超纯水自制。

2 方法

2.1 激素提取方法

分别收集新鲜的人参花，液氮冰浴研磨，准确称取根和叶片各 0.1 g 到 5 mL 离心管中，加入异丙醇：水：HCl（2∶1∶0.002）提取液 1 mL，4 ℃，100 r·min^{-1}摇床中振动 30 min，取出离心管后加入 2 mL 二氯甲烷，再次振动 30 min；4 ℃，13 000 r·min^{-1}冷冻离心 5 min，吸取有机相层溶液 1.8 mL，氮气吹干，加入 50% 甲醇-水溶液 400 μL，4 ℃，13 000 r·min^{-1}冷冻离心 15 min，吸取上清液进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.2 色谱-质谱条件

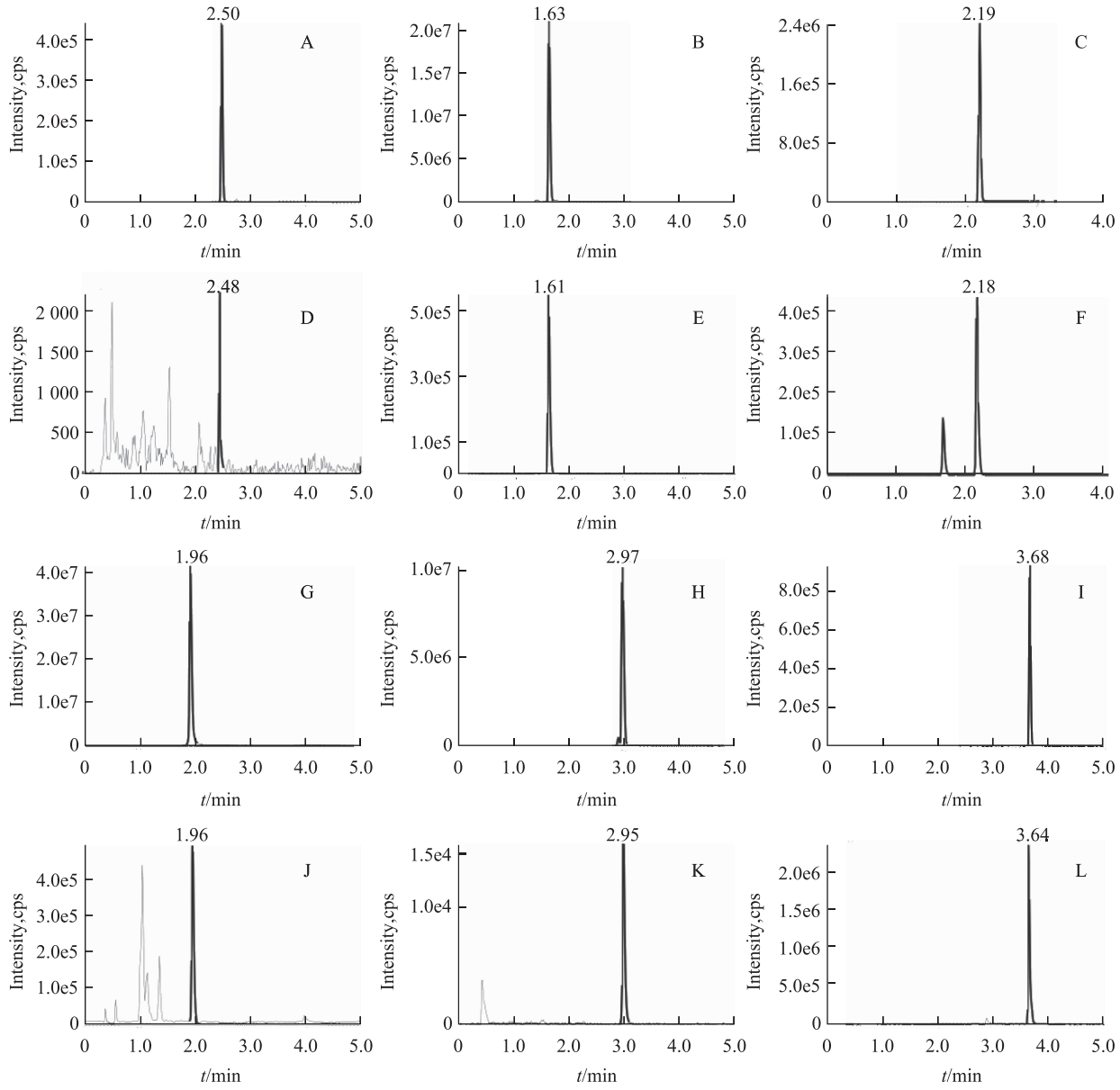
色谱条件：Waters ACQUITYUPLCBEH C18 色谱柱（2.1 mm YUPLCB，1.71 mm），流动相：0.05% 甲酸水-乙腈溶液。线性洗脱梯度：0 ~ 0.3 min，10% 乙腈；0.3 ~ 3 min，10% ~ 60% 乙腈；3 ~ 6 min，60% ~ 95% 乙腈；6 ~ 6.2 min，10% 乙腈。流速为 0.6 mL·min^{-1}，柱温 40 ℃，样品盘温度 4 ℃，进样量 10 μL，分析时间 7 min。

质谱条件：电离方式为电喷雾离子源（ESI）；扫描方式为负离子扫描；监测方式为多反应监测（MRM）；气帘气的压力为 30 psi，离子化电压为 −4500 V，离子源温度 550 ℃，喷雾气压力为 50 psi，辅助加热气压力为 50 psi，数据处理用 MultiQuant 定量软件进行分析。

3 结果及分析

3.1 专属性检测

配置内源性植物激素标准溶液，按 **2.2** 项下的质谱-色谱条件进样分析。结果表明，人参花的内源性植物激素峰型单一、分离度较高，且均在 5 min 以内出峰，实现了植物激素准确快速测定的目的，适用于人参花中激素含量的测定（见图 1）。



注：A：IBA 标准品；B：GA3 标准品；C：ABA 标准品；D：人参花 IBA 样品；E：人参花 GA3 样品；F：人参花 ABA 样品；G：SA 标准品；H：JA-ile 标准品；I：OPDA 标准品；J：人参花 SA 样品；K：人参花 JA-ile 样品；L：人参花 OPDA 样品。

图 1　内源性植物激素选择反应监测离子流图

3.2 人参花中 5 种内源激素含量检测及分析

本实验对人参花中内源性植物激素含量进行分析，每种激素平行 5 个样品。表 1 为人参花中 5 种内源性植物激素含量的检测结果。由结果可以看出，人参花中含有较多抗逆激素 SA 与 ABA，研究也表明水杨酸可以诱导植物开花、促进果实生长[20]，而 ABA 对植物成花的诱导和发育具有重要调控作用[21]；而与植物向性生长相关的 IBA 及伸长生长相关的 GA_3 含量较低，研究表明植物中越是代谢旺盛的器官生长素与赤霉素含量越高，说明人参花的代谢速度较慢；而茉莉酸 JA 在人参花中含量极低（低于检测限以下），因此有必要对 JA 激素合成通路相关的前体及活性成分进行进一步检测分析（图 2）。

表 1　人参花中内源性植物激素含量（$\bar{x} \pm Sd$，$n=5$）

激素	含量/ng·g^{-1}
IBA	516.70 ± 138.55
GA3	692.33 ± 228.50
ABA	1 126.17 ± 232.52
SA	3 929.43 ± 898.52
JA	—

激素	含量/ng·g^{-1}
IBA	516.70±138.55
GA_3	692.33±228.50
ABA	1 126.17±232.52
SA	3 929.43±898.52
JA	—

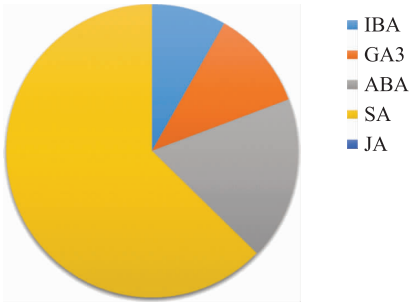


图 2　人参花 5 种内源性植物激素含量比例分析

3.3 人参花中 JA 合成通路关键成分的分析

JA 生物合成通路主要分成三个阶段：(1)在质体中，由甘油酯转变为 OPDA；(2)在过氧化物酶体中，OPDA 转变为茉莉酸(JA)；(3)在胞质溶胶中，JA 转变为活性形式的茉莉酸与异亮氨酸的偶联物(JA-ile)(图 3)。JA 在不同组织的差异性积累导致了特异性的基因调控效应[22]。在对模式植物拟南芥和番茄的研究中，JA 被认为通过调控水运输到花药和花丝的过程来调控花药的开裂和衰老，从而达到调控开花时间的作用[23-24]。在对水稻、小麦、黑麦和高粱等禾本科植物的研究中，同样发现内源性 JA 也参与颖花开放的调控[25]。从我们的数据中可以看到存在大量的 JA 前体 OPDA，这种现象既是为了可能的应激反应诱导大量 JA 信号提供物质基础，同时也是开花期植物花中 JA 组成性表达的必然结果。JA 及其衍生物主要的活性物质 MeJA、JA-ile 早就被证明是人参皂苷合成通路上非常有效的化学诱导子[26]，往往都是通过刺激合路上关键酶基因[27]或是调控信号转导[28]。其中用外源 100 μM MeJA 处理人参不定根，参与人参皂苷生物合成基因如 *HMGR*、*SS*、*SE* 和 *DDS* 有明显上调，而 *CAS* 略有下降[29]。我们的数据中 JA 和 JA-ile 的含量水平不高，考虑到激素本身作用就是具有级联放大的作用效果，维持较低的浓度才是稳态。

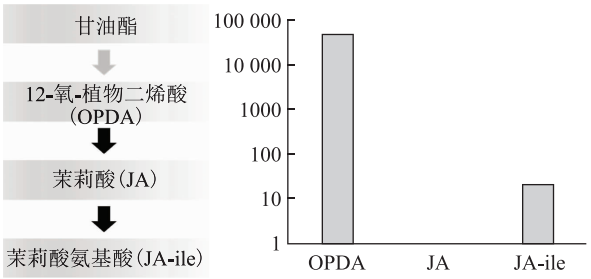


图 3　人参花中 JA 合成通路含量分析

4　讨论

内源性激素对于药用植物的生长及次生代谢产物(多数为药效成分)的含量具有重要的调控作用，植物内源性激素作为天然生长调节剂，参与了多种植物的生长发育过程并调控植物的次生代谢。

本研究发现，内源性植物激素可能参与调控了人参开花过程以及花中人参皂苷的积累。前人研究表明，内源性激素对植物开花过程存在调控[30-32]。ABA 对刺梨 *Rosa roxburghii*[33]、银杏 *Ginkgo biloba* L.[34]、荔枝 *Litchi chinensis*[35]、蝴蝶兰(*Phalaenopsis hybrida*)[36]等花的形成起促进作用[37]。2004 年，Ulger 等的研究结果显示在花诱导和起始阶段高浓度的 ABA 对花的形成起促进作用[38]。中药领域中，在石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 离体培养的研究中也发现，原球茎在 ABA 培养基上预处理 15d 再转入 MS 培养基上培养，花芽形成频率明显提高，且单株花数增加[39]；同时，人参皂苷也在人参的花蕾中含量相对较高[40]，植物激素和人参花中皂苷合成和积累可能存在一定相关性：而 SA 和 JA 都对人参皂苷合成起到调控作用[41]。从内源性植物激素对中药的次生代谢的影响来说，ABA 促进黄花蒿中青蒿素的含量[42]，JA 也对药用植物次生代谢产生重要影响[43]。因此，内源性植物激素对人参的生长及次生代谢的调控影响值得深入讨论，同时内源性植物激素对中药质量的影响及具体机制的研究有待今后的进一步研究。

参考文献

[1]　林楠,钟琳琳,李娜,等. 人参花提取物抗疲劳作用的研究[J]. 长春中医药大学学报,2010,26(3):336-337.

[2] 王恩鹏. 人参花挥发油的质谱研究[D]. 长春:长春中医药大学,2010.

[3] 潘小玲,李振麟,钱士辉,等. 中国人参花化学成分研究[J]. 中国野生植物资源,2014,33(2):13-15.

[4] Ko S K, Cho O S, Bae H M, et al. Quantitative analysis of ginsenosides composition in flower buds of various ginseng plants[J]. Appl Bio Chem,2011,54(1):154-157.

[5] Yoshikawa M, Sugimoto S, Nakamura S, et al. Medicinal flowers. XVI. New dammarane-type triterpene tetraglycosides and gastroprotective principles from flower buds of *Panax ginseng*[J]. Chem Pharm Bull,2007,55(7):1034-1038.

[6] Tung N H, Song G Y, Nhiem N X, et al. Dammarane-type saponins from the flower buds of *Panax ginseng* and their intracellular radical scavenging capacity[J]. J Agric Food Chem,2010,58(2):868-874.

[7] 徐斐,李珂珂,陈丽荣,等. 人参花醇提物中的皂苷类化学成分[J]. 中国现代中药,2016,18(1):67-71.

[8] Duy N, Ivo R, Celestina M, et al. How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory[J]. Plant Mol Biol, 2016,91(6):727-740.

[9] Campos-Rivero G, Osorio-Montalvo P, Sánchez-Borges R, et al. Plant hormone signaling in flowering: An epigenetic point of view[J]. J Plant Physiol,2017(214):16-27.

[10] Eremina M, Rozhon W, Poppenberger B. Hormonal control of cold stress responses in plants[J]. Cell Mol Life Sci, 2016,73(4):797-810.

[11] 赵晓杰,李晓灿,宇佳,等. 生长调节剂和培养方式对匍枝筋骨草生根及 β-蜕皮激素量的影响[J]. 中草药, 2011,42(9):1828-1832.

[12] 崔北米. ABA、GA_3和乙烯利诱导丹参毛状根酚酸类物质的积累研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.

[13] 师帅. 脱落酸(ABA)对滇紫草细胞次生代谢影响的研究[D]. 南京:南京大学,2005.

[14] 刘娟. 程序性细胞死亡与沉香倍半萜次生代谢关系的探索研究[D]. 北京:北京协和医学院,2015.

[15] 蒋研风羊. MeJA 诱导白木香不定根产生倍半萜类物质的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2015.

[16] 李世昌. 植物激素在人参生产中的应用[J]. 植物杂志, 1990(4):31-33.

[17] Park,李方元. 人参根中植物激素类物质活性的季节变化[J]. 特种经济动植物,1989(2):42.

[18] 周倩耘,丁家宜,刘峻,等. 植物激素对人参毛状根生长和皂甙含量的影响[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(1):26.

[19] 周修腾,康利平,李鹏英,等. UPLC-MS/MS 测定 AM 真菌侵染丹参植物 ABA 含量[J]. 中国农学通报,2016, 12:92.

[20] 齐秀东. 水杨酸对植物的生理作用[J]. 河北科技师范学院学报,2007,21(1):74-78.

[21] 徐平珍,刘涛,杨莹,等. 脱落酸在植物花发育过程中的作用[J]. 云南植物研究,2007,29(2):215-222.

[22] Hause B, Stenzel I, Miersch O, et al. Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers-allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles[J]. Plant J. 2000(24):113-26.

[23] Ishiguro S, Kwai-Oda A, Ueda J, et al. The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCIENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2001(13):2191-2209.

[24] Li L, McCaig B, Wingerd B, et al. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development[J]. Plant Cell,2004(16):126-143.

[25] 何永明,林拥军,曾晓春. 水稻颖花自然开放过程中茉莉酸(JA)生物合成的变化[J]. 作物学报,2012,(10): 1891-1899.

[26] Bae K H, Choi Y E, Shin C G, et al. Enhanced ginsenoside productivity by combination of ethephon and methyl jasmoante in ginseng(*Panax ginseng* C. A. *Meyer*) adventitious root cultures[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(15): 1163-1166.

[27] Qian Z G, Zhao Z J, Xu Y, et al. Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signals for plant secondary metabolism[J]. Biotechnol Bioeng,2004,86(7):809-816.

[28] Ali M B, Yu K W, Hahn E J, et al. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng*, roots in bioreactors[J]. Plant Cell Reports,2006,25(6):613-620.

[29] Kim Y S, Yeung E C, Hahn E J, et al. Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate

on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. Biotechnol Lett,2007,29(11):1789.

[30] Marschmartínez N,De F S. Hormonal control of the development of the gynoecium[J]. Current Opinion in Plant Biology,2016(29):104-114.

[31] Okada K,Ueda J,Komaki M K,et al. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation[J]. Plant Cell,1991,3(7):677.

[32] Mouradov A,Cremer F,Coupland G. Control of flowering time:interacting pathways as a basis for diversity[J]. Plant Cell,2002(14):S111.

[33] 樊卫国,刘国琴,安华明,等. 刺梨花芽分化期芽中内源激素和碳、氮营养的含量动态[J]. 果树学报,2003,20(1):40.

[34] 史继孔,张万萍. 银杏雌花芽分化过程中内源激素含量的变化[J]. 园艺学报,1999,26(3):194.

[35] Cui Z,Zhou B,Zhang Z,et al. Abscisic acid promotes flowering and enhances LcAP1,expression in *Litchi chinensis*,Sonn[J]. South Afr J Bot,2013,88(9):76.

[36] Wang W Y,Chen W S,Chen W H,et al. Influence of abscisic acid on flowering in *Phalaenopsis* hybrida[J]. Plant Physiol Biochem,2002,40(1):97.

[37] 赵家昱,潘远智,李永红. 外源 ABA 对叶子花开花及内源 ABA 合成关键酶的影响[J]. 园艺学报,2014,41(10):2085.

[38] Ulger S,Sonmez S,Karkacier M,et al. Determination of endogenous hormones,sugars and mineral nutrition levels during the induction,initiation and differentiation stage and their effects on flower formation in olive[J]. Plant Growth Regul,2004(42):89.

[39] 王光远,刘培,许智宏,等. 石斛离体培养中 ABA 对诱导花芽形成的影响[J]. 植物学报,1995(5):374.

[40] Kim Y J,Zhang D,Yang D C. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides[J]. Biotechnol Adv,2015(33):717.

[41] Gutjahr C,Paszkowski U. Weights in the balance:jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions[J]. Mol Plant Microbe Interact,2009,22(7):763-772.

[42] 何军. SA 与 ABA 调节青蒿素的生物合成及青蒿副产物的综合利用[D]. 重庆:西南农业大学,2004.

[43] 田娇,刘园,房敏峰. 外源茉莉酸类激素对药用植物次生代谢的影响研究[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(1):185-190.

(收稿日期　2017-02-05)

(上接第 696 页)

[27] 刘健锋,丁艳平,王建林,等. 脑水通道蛋白的分布、功能及调控机制[J]. 中国组织工程研究,2014,18(2):314-321.

[28] 李胜,屈春凤,李润水,等. 水牛水通道蛋白 8 基因克隆及表达分析[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(3):44-48.

[29] 屈春凤,李胜,李卉,等. 水牛水通道蛋白 9 基因克隆及其表达分析[J]. 中国畜牧兽医.2015,42(7):1621-1629.

[30] Aoki K,Uchihara T,Tsuchiya K,et al. Enchanced expression of aquaporin4 in human brain with infarction[J]. Acta Neuro Pathologica,2003,106(2):121-124.

(收稿日期　2017-11-11)