水稻叶片中黄酮类代谢产物的检测和鉴定

Detection and Identification of Flavonoid Metabolites in Rice Leaves

龚亮，陈伟，罗杰*

作物遗传改良国家重点实验室，华中农业大学，武汉

*通讯作者邮箱：jie.luo@mail.hzau.edu.cn

引用格式：龚亮，陈伟，罗杰. (2018). 水稻叶片中黄酮类代谢产物的检测和鉴定. *Bio-101* e1010153. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010153.

How to cite: Gong, L., Chen, W. and Luo, J. (2018). Detection and identification of flavonoid metabolites in rice leaves. *Bio-101* e1010153. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010153. (in Chinese)

实验原理：黄酮是一类常见的次生代谢产物，它们广泛地存在于自然界中某些植物体内，并且具有多种生物活性，最主要包括抗氧化、抗病菌等。高效液相色谱有对代谢物进行分离的功能，质谱可以对代谢物进行鉴定，对于水稻叶片中大量的黄酮类物质，可以利用高效液相色谱-质谱联用技术进行检测和鉴定。

实验目的：通过液相色谱-质谱联用技术对水稻叶片中常见的 15 种黄酮进行检测和鉴定。

关键词：水稻，代谢物，液相色谱-质谱联用

材料与试剂

1. 离心管
2. 0.22 μm 尼龙膜 (上海安谱科学仪器有限公司)
3. 各种型号的枪头
4. 色谱进样样品管
5. 甲醇和乙酸，色谱纯级别 (来自德国 Merck 公司)
6. 双蒸水

仪器设备

1. 色谱仪 (岛津 UFLC shimADZU 色谱仪)

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

2. 色谱柱 (shimpack VP-ODS，150 mm * 5 μm)
3. 涡旋仪
4. 4 °C 冰箱
5. 离心机
6. -70 °C 冰箱

实验步骤

1. 样品制备
   1.1 取适量(3-5 片)新鲜水稻叶片，液氮保存；
   1.2 配制 70%的甲醇溶液用于黄酮的提取；
   1.3 在研钵中用液氮将水稻叶片磨成粉状后加入预冻好的离心管中，然后按 1 g:1 ml 的比例加入 70%甲醇溶液，强烈涡旋 10 s 后将样品放入 4 °C 冰箱，每隔 10 min 再涡旋一次，重复 3 次后放入 4 °C 冰箱过夜。
   1.4 次日用 4 °C 离心机 10,000 rpm 离心 10 min 后吸取上清，然后用 0.22 μm 尼龙膜将上清液过滤后装入色谱进样样品管中，放-70 °C 冰箱保存，待测。
2. 按照以下所描述的仪器条件准备好仪器，以便对黄酮进行检测
   2.1 高效液相色谱条件

   流动相：A(水相)为体积比为 0.04%乙酸水溶液，B(有机相)为体积比为 0.04%乙酸甲醇溶液，柱温 40 °C，流速 0.25 ml/min；

   进样量：5 μl；

   洗脱梯度：0.1 min = 25% B；15 min = 50% B；18-23 min = 75% B；23.1 min = 25% B；33 min = stop。

   2.2 质谱条件

   质谱仪：AB API 4,000 Q TRAP 串联四极杆线性离子阱质谱仪。

   仪器参数：离子源：Turbo V；电离模式：ESI(+)
3. 建立一个多反应监测模式(MRM)的跑样方法，并按照(表 1)内容导入所需要检测的黄酮物质

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

表 **1.** 检测水稻叶片中常见 **15** 种黄酮的相关参数

Q1	Q3	deWell time	ID	DP	CE
449.1	287.1	20	P1	40	30
611.2	299.2	20	P2	20	50
449.2	299.1	20	P3	40	30
463.1	313.0	20	P4	50	30
535.1	499.1	20	P5	40	20
447.1	297.1	20	P6	50	40
581.1	383.0	20	P7	40	30
465.2	303.0	20	P8	10	30
433.1	271.1	20	P9	10	20
463.0	301.1	20	P10	60	20
509.2	347.0	20	P11	20	20
565.1	499.1	20	P12	10	30
463.0	331.0	20	P13	30	20
579.1	331.1	20	P14	50	40
741.1	177.1	20	P15	60	40

4. 用已建立好的方法对要分析的样品进样跑样，完成后对结果进行分析

结果与分析

结果如图 1 所示，每个物质的保留时间及物质名称如表 2 所示。

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

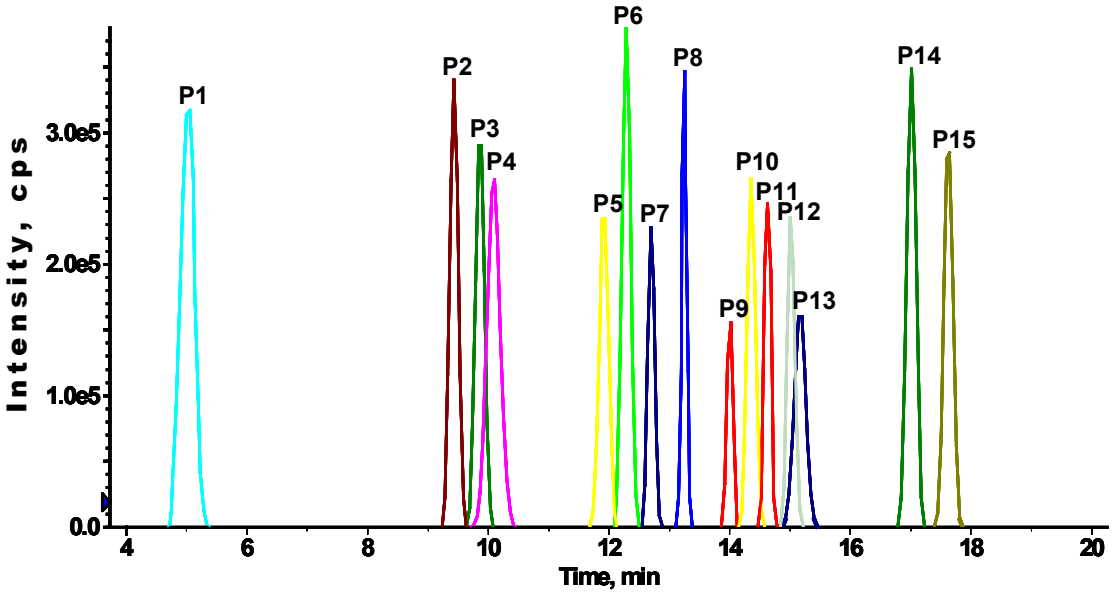

图 **1.** 叶片中 **15** 种常见黄酮的峰图

表 **2.** 水稻叶片中 **15** 中常见黄酮的保留时间及物质名称

Q1	Q3	RT	ID	DP	CE	Compound
449.1	287.1	5.03	P1	40	30	Cyanidin 3-O-glucoside
611.2	299.2	9.42	P2	20	50	C-hexosyl-luteolin O-hexoside
449.2	299.1	9.86	P3	40	30	C-hexosyl-luteolin
463.1	313.0	10.08	P4	50	30	C-hexosyl-chrysoeriol
535.1	499.1	11.91	P5	40	20	di-C,C-pentosyl-apigenin
447.1	297.1	12.29	P6	50	40	C-hexosyl-methylapigenin
581.1	383.0	12.70	P7	40	30	C-pentosyl-luteolin O-hexoside
465.2	303.0	13.25	P8	10	30	Quercetin O-hexoside
433.1	271.1	14.01	P9	10	20	Apigenin O-hexoside
463.0	301.1	14.35	P10	60	20	Chrysoeriol O-hexoside
509.2	347.0	14.62	P11	20	20	3',4',5'-dihydrotricetin O-hexoside
565.1	499.1	15.02	P12	10	30	C-hexosyl-C-pentosyl-apigenin
463.0	331.0	15.17	P13	30	20	Tricin O-pentoside
579.1	331.1	17.01	P14	50	40	Tricin O-malonylhexoside
741.1	177.1	17.60	P15	60	40	C-pentosyl-apigenin O-feruloylhexoside

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

注意事项

1. 最终可以根据标样做标准曲线对这些黄酮进行绝对定量；也可以对峰面积进行积分从而在不同的水稻样品中进行相对定量，并进一步进行相对含量的比较和分析 。
2. 如图 2 是 Cyanidin 3-O-glucoside 在几个常规品种剑叶中的相对含量分布，可以看出，ZS97 中 Cyanidin 3-O-glucoside 的含量远远高于其他品种，甚至是有和无的差别，从表型观察我们也可以发现 ZS97 的叶缘为紫色，而其他几个品种为绿色，据报道，Cyanidin 3-O-glucoside 正是导致水稻叶片颜色出现紫色最主要的物质之一。

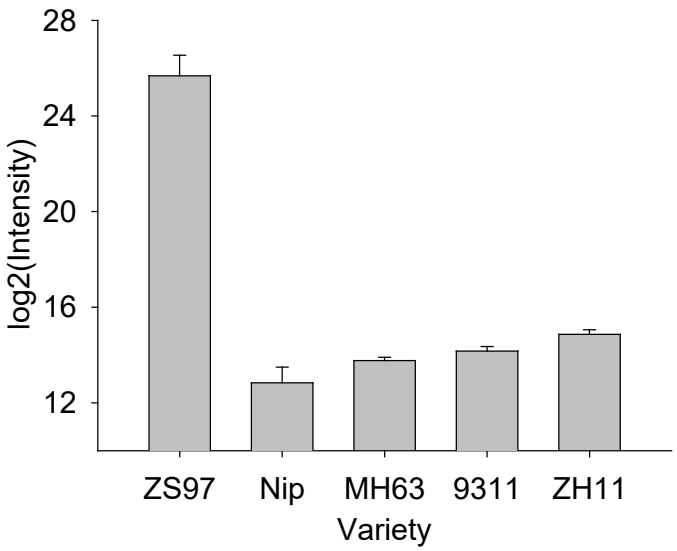

图 **2. Cyanidin 3-O-glucoside** 在几种常规品种剑叶中的相对含量分布

参考文献

1. Chen, W., Gong, L., Guo, Z., Wang, W., Zhang, H., Liu, X., Yu, S., Xiong, L. and Luo, J. (2013). A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics. *Mol Plant* 6(6): 1769-1780.
2. Gong, L., Chen, W., Gao, Y., Liu, X., Zhang, H., Xu, C., Yu, S., Zhang, Q. and Luo, J. (2013). Genetic analysis of the metabolome exemplified using a rice population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50): 20320-20325.

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.