

植物激素定量分析方法研究进展

符继红^{①②}, 孙晓红^②, 王吉德^①, 褚金芳^{②*}, 闫存玉^{②*}

① 新疆大学化学化工学院, 乌鲁木齐 830046;

② 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 国家植物基因研究中心(北京), 北京 100101

* 联系人, E-mail: cunyuyan@genetics.ac.cn; jfchu@genetics.ac.cn

2010-07-13 收稿, 2010-09-13 接受

国家自然科学基金资助项目(90917017, 90817008)

摘要 植物激素是对植物生长发育具有重要调控作用的小分子化合物, 在低浓度下就能发挥生理作用, 参与调控植物生长发育的每一过程. 植物激素的合成、运输、代谢和分子作用机理的深入研究都需要对植物激素进行定量分析. 但是, 植物激素定量分析受到低含量、次生代谢产物背景干扰严重等因素的影响, 一直是植物激素研究领域的瓶颈. 近年来, 随着植物激素在提取、纯化和检测方法等方面的发展, 植物激素定量分析取得一定进展. 固相萃取技术和色谱/质谱联用技术的发展为植物激素的高效提取纯化和准确定量分析提供了可能, 成为植物激素定量分析领域广泛被接受的技术手段. 此外, 液相萃取、免疫纯化、免疫分析和电化学分析等纯化检测方法在植物激素分析中也有应用, 本文对各种纯化检测方法进行了比较和讨论. 随着植物激素调控机理和植物激素互作研究的深入, 需要对原位、动态和多种植物激素同时检测, 这将是植物激素分析领域的未来研究方向.

关键词

植物激素
提取方法
液相萃取
固相萃取
免疫纯化
免疫分析
电化学分析
色谱及色谱质谱联用

植物激素是植物体内合成的对植物生长发育有显著作用的微量有机物, 能从产生部位转移到作用部位, 在低浓度下就能调节植物的生长发育, 几乎参与了调控植物生长发育的每一过程, 从影响细胞的分裂、伸长、分化到影响植物发芽、生根、开花、结实、休眠和脱落等^[1], 主要包括乙烯(ethylene)、生长素(auxin)、脱落酸(abscisic acid)、赤霉素(gibberellins)、细胞分裂素(cytokinins)、茉莉酸(jasmonates)、油菜素内酯(brassinosteroids)和水杨酸(salicylates)等(表 1). 另外, 一些次生代谢产物, 如一氧化氮(NO)及近年来发现的独角金内酯(strigolactones)等也被认为在调节植物生长发育方面以类似激素的方式起作用. 当植物受到病原体侵染、害虫及动物的啃咬、干旱及盐胁迫等生物和非生物的伤害后, 植物激素在植物启动防御反应的过程中也发挥着巨大的作用^[2-4]. 植物激素既可以通过调控作物生长发育等过

程而直接影响作物产量, 又可以通过参与调控作物对各种不利条件的适应性而减少产量损失, 其研究成果对提高作物产量起到了革命性的推动作用, 具有较大的农业应用价值, 因而植物激素在植物体内含量的准确测定越来越引起人们的重视. 植物体内的激素含量极低, 性质不稳定, 容易受到其他次生代谢产物的干扰; 同时, 部分用于植物生理学研究的植物突变体材料非常珍贵, 材料量少, 因此要求检测的方法必须十分灵敏和专一. 国家自然科学基金委员会已经就植物激素研究设立了重大研究计划项目, 其中一个核心科学问题就是解决植物激素超微量检测的技术瓶颈.

植物激素的提取纯化与检测通常包括以下几个关键的步骤: 首先, 在样品的收集过程中, 植物材料应迅速用液氮冷冻, 以保证所分析的样品最大限度保持植物的原始状态, 没有因为植物受伤而导致植

表1 主要植物激素及代表性化合物的分子结构和名称

类别	代表性植物激素	
	结构	名称
Auxins		Indole-3-acetic acid (IAA)
Abscisic acid (ABA)		S-(+)-Abscisic acid (S-ABA)
Jasmonates (JAs)		(-)-Jasmonic acid ((-)-JA)
Gibberellins (GAs)		Gibberellin A ₁ (GA ₁)
Salicylates (SAs)		Salicylic acid (SA)
Cytokinins (CKs)		<i>trans</i> -Zeatin (Z)
Ethylene	H ₂ C=CH ₂	Ethylene
Strigolactones (SLs)		2'- <i>epi</i> -5-Deoxylstrigol (<i>epi</i> -5DS)
Brassinosteroids (BRs)		Brassinolide (BR)

物激素含量的失真,并在液氮保护下研磨成粉末;其次,选择合适的提取溶剂对目标激素进行高效率的提取;再次,优化纯化方法,对植物粗提物进行纯化和富集;最后,建立灵敏的测定方法,对植物样品中的植物激素进行准确可靠的分析.因此高选择性的

样品提取纯化方法和高灵敏的测定技术的开发将是植物激素检测的研究重点.植物激素提取与检测技术的快速发展为研究激素在代谢、信号转导及互作网络机理等方面提供了直接的量化信息,从而为进一步阐明植物激素的作用机理提供帮助.

1 提取与纯化方法

植物激素作为特殊的植物次生代谢产物群体,在植物体内的含量非常低,通常只有普通植物次生代谢产物的万分之一甚至更低,在 $0.1\sim 50\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 鲜重范围内^[5]。同时,植物提取物又是复杂的多组分混合物,其所含的次生代谢产物会对植物激素的定性和定量分析产生严重的干扰。因此,为鉴别和定量测定植物激素,必需建立和优化植物激素的提取和纯化流程,尽量除去植物粗提取物中影响植物激素分析的杂质,富集目标化合物,以得到充分纯化的待分析样品供最终分析测定。

1.1 提取方法

植物激素分析首要工作是从植物材料中将目标植物激素充分提取出来。这取决于两个方面:一是植物材料的处理,通常选择液氮冷冻条件下的新鲜或冻干处理的植物材料进行充分研磨;二是选择合适的提取方法将植物激素从这些材料中提取出来。

目前,溶剂提取法仍然是植物激素研究采用的最广泛的提取方法。甲醇、丙酮、丙醇及其水溶液和中性、酸性缓冲溶液是较为常用的提取液^[6-13],有机溶剂与水的比例通常需要依据被检测植物激素的极性来确定,极性很小的溶剂如乙醚通常不用来提取植物激素。在这些有机溶剂体系中,甲醇由于分子量小,渗透性较强,在提取过程中可以渗透到细胞中,一直是植物激素提取的首选溶剂,被广泛地用于植物激素的提取^[14-23]。在提取过程中,部分植物激素化学性质不稳定,容易受到提取环境的影响。例如,生长素类植物激素容易氧化或见光分解,在分析提取过程中一定要避免光照、高氧和高温等外部环境,因此需要在提取过程中加入抗坏血酸、铜试剂等电极电位较低的抗氧化剂,保证其在提取过程中的稳定。除了外部环境对部分目标植物激素稳定性的影响之外,一些植物激素在提取过程中还会受到植物体内酶的影响。例如,在细胞分裂素的提取过程中,植物体内的碱性磷酸酯酶会造成核苷酸型细胞分裂素的水解,这种酶在 80% 甲醇提取液中仍保持一定活性,采用该溶剂体系会对分析结果产生不利影响,改进的方法是使用 Bielecki 试剂($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3:\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}=12:5:1:2$, 体积比),它能有效降低核苷酸型细胞分裂素酶解为核苷^[24]。但该提取液极性偏小,会

将植物组织中的大量脂类物质提取出来,对后续细胞分裂素的进一步纯化造成困难,不利于细胞分裂素的定量分析^[25,26]。在此基础上,通过对有机溶剂和配比进行调整,改良型 Bielecki 试剂($\text{MeOH}:\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}=15:1:4$, 体积比)被应用于细胞分裂素和赤霉素等多种植物激素的提取^[27,28]。尽管改良型 Bielecki 试剂能够减少脂类物质的溶出,简化后续的纯化富集处理流程,但在酸性条件下,细胞分裂素核苷会发生降解释放出游离的细胞分裂素,对定量分析结果也会产生影响。

所以,提取溶剂的选择主要取决于目标植物激素的物理化学性质和植物样品的性质,并综合考虑提取过程中提取环境和植物激素在植物体内存在的形态等影响因素,其基本原则是在不改变植物激素成分变化条件下,最大限度地提取出目标植物激素并尽量降低干扰杂质的溶出。

1.2 纯化方法

一般而言,通过有机溶剂提取的植物粗提取物中含有大量的植物次生代谢产物,而植物激素在粗提取物中含量极低,这些植物次生代谢物会对植物激素的定量分析产生很强的干扰,影响分析结果的准确性,因此植物粗提取物并不适合直接进行植物激素定量分析。通过对植物粗提取物进行一系列的后续处理,能够将感兴趣的目标植物激素进行纯化和富集,降低或者消除植物组织中大量复杂的背景干扰,从而使样品适合定量分析。随着对植物激素研究工作的深入,从经典的液相萃取到固相提取越来越多的新技术和新方法被引入到植物激素分析领域。

(i) 液相萃取。液相萃取主要是利用目标化合物组分在互不相溶的溶剂体系中溶解度的不同而达到分离或纯化目的。对于一些植物组织中含量相对较高的植物激素,利用液相萃取法对植物提取物进行纯化处理,也能得到较好的分析结果。在实际实验中,可根据植物激素的物理化学性质,选择乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醚等有机溶剂纯化植物样品^[7,9,15]。但是,传统液相萃取一般需要经历较多萃取步骤,且消耗时间较长,同时还要使用较多的有机溶剂。值得注意的是,液相萃取技术,对水溶性较好的植物激素纯化效率不高,并且提取过程中还会产生难以克服的乳化现象,这些缺点限制了液相萃取法在微量植物激素提取中的应用,目前在实验室中已较少使用。

最近,有研究人员通过对传统液相萃取技术的改进,开发了基于微孔径的纤维管的液-液-液微萃取方法,其基本原理是将目标分析物从水中萃取到有机相,再从有机相萃取到第二个水相,通过调节样品和萃取相的 pH 完成液-液-液的萃取富集过程,能够对椰子汁中的 IAA, ABA, SA 和 JA 等 4 种酸性植物激素同时提取纯化^[29]. 尽管该方法溶剂用量较少具有快速、低消耗的优点,但是液-液-液萃取过程中有机相的选择要遵循和水互不相溶、与微孔纤维管有相近的极性,且目标化合物在有机相中的溶解性高于样品溶液又低于最后的萃取水相等原则,其体系的设计和选择性限制了该技术的广泛应用. 因此,对于植物激素分析工作,液相萃取只能部分解决植物激素分析中的纯化富集问题,远远不能满足现代科研工作者对样品处理过程的通用、快捷、方便和高通量的分析要求.

(ii) 固相萃取. 固相萃取(SPE)技术是一个包括液相和固相的物理萃取过程,其主要目的是把痕量被测组分进行浓缩和富集. 固相萃取柱用以保留目标化合物,并尽量减少干扰杂质的保留,选择合适的溶剂将干扰杂质淋洗掉,然后再用另一溶剂把感兴趣的分析物从固定相上洗脱下来;反之,也可让目标化合物直接通过固定相而不被保留,同时大部分干扰物质被保留在固定相上,从而得到分离. 与传统的液相萃取技术相比,固相萃取不需要大量互不相溶的有机溶剂,可供选择的固定相种类较多,具有快速、可靠、消耗试剂少、易于实现自动化等优点,能够对复杂基质样品中的目标化合物进行纯化和富集,满足了人们对处理方法的高效、快捷、简单和低消耗的要求,被广泛用于植物激素类样品的处理. 固相萃取操作要充分利用目标植物激素的物理化学性质,例如酸碱性和极性等,选择合适的固相萃取材料和处理流程,达到目标植物激素纯化富集的目的.

在对植物样品中植物激素的提取工作中,有实验室利用高效液相色谱(HPLC)馏分收集用于植物激素的纯化富集, HPLC 也可理解为一种特殊的固相萃取技术手段,粗内径的凝胶柱、 C_{18} 柱和 ODS 柱都曾被用于植物激素的纯化^[30-32]. HPLC 馏分收集法能够高效地富集目标植物激素,大幅度除去背景干扰,使测定结果更为准确可靠. 但 HPLC 纯化法需要较长时间,所使用的色谱柱价格也较为昂贵,并消耗大量的有机溶剂,因此 HPLC 纯化法现在已较少使用,仅在

部分植物体内含量极低的植物激素(如赤霉素等)定量分析中还在使用^[33].

与 HPLC 馏分收集富集纯化植物激素技术相比,固相萃取技术在植物激素研究中的应用日益广泛,这种技术简化了固相萃取流程,样品处理时间大大缩短,并且具有很好的重现性. 较为常用的固相萃取小柱(表 2)包括离子交换柱^[34,35]、反相色谱柱(C_{18} 柱^[16,36-40]、Oasis HLB 柱^[8,28,41])、混合模式色谱柱(Oasis MAX 柱^[41]、Oasis MCX 柱^[28,39,40])等,在分析样品时由于样品基质的复杂性有时需将几种方法结合使用. C_{18} 柱是一种反相机理保留的固相柱,也是使用最为广泛的一种样品处理小柱. 将过 C_{18} 柱前的溶液调成弱酸性,抑制了具有酸性的植物激素的电离而能更好地保留在反相 C_{18} 柱上,最后用相应的甲醇或乙醇的酸性水溶液(一般用甲酸或乙酸调节酸度)将目标化合物洗脱下来. C_{18} 可以较好地除去植物组织中的部分色素和极性化合物. 但 Hou 等人^[43]发现在最后的洗脱步骤中不加酸的甲醇比加了少量酸(1%甲酸)的甲醇具有更好的洗脱效果. 作者认为在酸性甲醇中植物激素的电中性在反相 C_{18} 上更强,所以更难洗脱.

在植物激素分析过程中,通常会根据植物样品的复杂程度、目标植物激素的物理化学性质和固相萃取柱的特点,联合使用两种或者两种以上固相萃取柱对植物提取物进行处理,富集纯化目标植物激素. 阴离子交换柱和阳离子交换柱分别可以较好地保留植物提取物中的酸性化合物和碱性化合物,通过合适的预柱平衡处理和调节上样样品的 pH,使得相应植物激素电离成相应的阴离子或阳离子而被很好的保留,再用相应的酸性或碱性甲醇溶液将目标化合物洗脱下来,因此在固相萃取柱的联合使用中这两种 SPE^[27,40,41]柱常被选择. 细胞分裂素为一类化学性质特殊的化合物,可以酸碱两性电离,其嘌呤环上 6 位碳上连接的 N 原子呈碱性, $pK_b \approx 4$,咪唑环上 9 位 N 原子呈弱酸性, $pK_a \approx 10$,当改变溶液 pH 时,所有的细胞分裂素都可以电离成相应的正负离子^[25]. 而植物内源性干扰物细胞分裂素核苷酸则由于带有 1 个磷酸基团而具有 2 个酸性电离常数 $pK_{a1}(\approx 1.0)$ 和 $pK_{a2}(\approx 6.0)$,其化学特性为细胞分裂素的分离纯化提供了极大帮助. Ge 等人^[40]在提取椰子汁中的细胞分裂素时首先采用 C_{18} 柱除去样品中的脂类物质和部分色素,随后采用反相阳离子柱 Oasis MCX 进一步纯化

表2 常见固相萃取柱的特性及其在植物激素分析中的应用

SPE 名称	分类	基本原理	分析物性质	pH	分析物	参考文献
DEAE-cellulose	阴离子交换	以纤维素为基质键合二乙胺基乙基具有阴离子交换保留机理	阴离子/中极性	2~9.5	CTKs	[34]
SCX	阳离子交换	以硅胶为基质键合苯磺酸基具有阳离子交换保留机理	阳离子/非极性	2~8	CTKs	[35]
C ₁₈	反相	以硅胶为基质键合十八烷基具有反相保留机理	非极性/弱极性	2~7.5	JA, ABA, IAA, IBA, GA, Z, BA, KT, CTKs	[16,36~40]
Oasis HLB	反相	由亲脂的二乙烯苯和亲水的N-乙基吡咯烷酮两种单体按一定比例聚合而成具有反相保留机理	非极性/弱极性	1~14	IAA, ABA, GA, CTKs	[8,28,41]
Oasis MAX	阴离子交换-反相混合模式	以高聚物苯乙烯/二乙烯苯为基质键合季铵基团具有阴离子交换和反相吸附两种保留机理	阴离子/非极性	1~14	IAA, ABA, CTKs	[41,42]
Oasis MCX	阳离子交换-反相混合模式	以高聚物苯乙烯/二乙烯苯为基质键合磺酸基团具有阳离子交换和反相吸附两种保留机理	阳离子/非极性	1~14	IAA, ABA, GA, KT, CTKs,	[28,39,40]

处理,通过调节氨水的不同浓度及甲醇的不同比例,可以将不同性质的细胞分裂素从 Oasis MCX 柱上分离,同时, Oasis MCX 柱还适合除去有紫外吸收的干扰杂质^[27]。实验中发现干扰组分细胞分裂素核苷酸可以被 0.35 mol/L NH₄OH 洗脱,而游离态及核苷和葡萄糖苷等结合态的细胞分裂素可以被 0.35 mol/L NH₄OH 的 60% CH₃OH 溶液洗脱。

在建立离子交换、反相、混合模式固相萃取柱的纯化方法前,目标植物激素的 pK_a 是必需了解的参数之一,根据 pK_a 的大小调节样品溶液的 pH 以确定植物激素是以正离子、负离子或非电离状态存在以选择合适的萃取小柱。固相萃取柱洗脱液的酸度和有机溶剂的比例很大程度上决定了洗脱液的洗脱能力,需进行合理的选择和优化,尽量满足目标化合物被最大程度的洗脱而干扰杂质被固相萃取柱保留。

此外,对于一些易挥发的或者经过衍生化处理的植物激素样品,可以选择固相吸附法进行富集浓缩,该方法具有操作简单、成本较低等优点。茉莉酸(JA)和水杨酸(SA)是植物界广泛存在的一类重要的信号分子,当植物受到生物和非生物伤害后,内源的 JA 或 SA 水平升高并激活植物防御反应基因的表达,抵抗外界伤害^[44~47]。甲酯化的茉莉酸甲酯(MeJA)和

水杨酸甲酯(MeSA)能够在较低温度条件下气化,并被固相吸附材料所吸附,利用这两种化合物的物理化学性质,Engelberth 等人^[13]采用了一种新颖的溶剂萃取结合固相吸附方法同时提取了植物信号分子茉莉酸和水杨酸。Engelberth 首先使用柠檬酸水溶液:丙酮(30:70)作为植物激素的提取溶剂,而 Engelberth 之所以用丙酮而没有用甲醇作为提取液是因为他认为在甲醇提取液中 JA 和 SA 会生成相应的酯,在溶剂浓缩蒸发过程中造成损失,并且丙酮的沸点(56℃)低于甲醇(63.8℃)的沸点更易除去。将目标植物激素进行甲酯化,并加热样品瓶,气化的 MeJA 和 MeSA 在空气流的带动下从样品中挥发而被固相吸附材料 Super Q 所吸附,反应结束后用二氯甲烷将 MeJA 和 MeSA 从 Super Q 上洗脱,样品可直接用气相色谱/质谱(GC/MS)分析。此固相吸附法一步提取,具有操作简单、成本较低等优点,省略了后续的纯化过程,并且具有较高的回收率。

近年来发展起来的固相微萃取技术(SPME)对于目标化合物的富集纯化只需一支类似进样器的固相微萃取装置即可完成萃取、浓缩、解吸、进样等全部前处理和进样工作。目前在植物激素的提取分析中也有应用^[48]。在 SPME 的应用中,要求萃取固定相的

性质要和被分析物的性质相匹配,使分析物在涂层中有较快的富集和扩散速度,能在较短时间内达到分配平衡,同时在进样分析时能迅速脱离固定相涂层.萃取固定相、提取溶剂的盐度、萃取时间、pH和温度等条件决定了样品的萃取效率.SPME技术在气相色谱中应用较广,但在液相色谱中,待测物从溶液中被萃取到固定相上之后,需经流动相洗脱才能进入色谱柱中进行检测,因此要求固定相材料必须对流动相有足够的耐受能力,即除了满足对待测物有较高的萃取率外,还能够在乙腈、甲醇等有机溶剂中保持足够的稳定性,而目前使用的萃取固定相较少能完全满足这样的要求,从而在一定程度上限制了这一方法的应用.

固相萃取技术的应用大大简化了植物激素前处理过程,提高了植物激素分析的通量,目前已经发展成为一种成熟通用的样品处理技术.不同填料性质和容量大小的固相萃取柱为植物激素的前处理过程提供了多种可供选择的样品处理方案,以满足不同样品的不同需要.随着新填料的研究及新技术的推出,固相萃取技术在植物激素前处理过程中的应用将日益广泛.

(iii) 免疫纯化. 免疫亲和色谱(IAC)根据抗原与抗体之间的高亲和力、高专一性和可逆的相互作用能够从复杂的样品基质中选择性地分离出目标分析物,在植物激素的纯化分析中已有应用^[49,50].当含有待测物的样本粗提液经过免疫亲和色谱柱时,提取液中对抗体有亲和力的待测物被结合到抗体上,淋洗除去未被结合的干扰杂质后,再采用适当的洗脱液将结合在抗体上的目标物洗脱下来,从而使待测物被选择性地提取与浓缩.由于 IAC 是利用抗原抗体的特异性反应来分离和纯化样品,只有与其抗原结构相吻合的被测物才能与抗体结合,因此具有非常高的选择性.但在实际应用过程中,由于植物激素一般分子量相对较小,本身不具备抗原特性,需要与大分子物质(载体)连接后才具备抗原特性,在此基础上所获取的抗体才可识别目标植物激素,这为其特异性抗体的制备带来困难.在 Ulvskov 和 Nicander 的研究中,他们使用牛血清白蛋白作为载体分别制备了生长素和细胞分裂素的抗体,并已成功应用于植物激素的分离纯化^[51,52],这为 IAC 在植物激素分析领域的应用提供了借鉴和参考.IAC 固定相中所使用的抗体,直接影响到目标分析物的特异性亲和力,

所以是建立 IAC 方法的关键因素.虽然目前制备大量性质均一、特异性识别某类植物激素的纯化抗体还具有一定的难度,但 IAC 技术所具有的高选择性、高灵敏度及高效能等技术特性使其在植物激素富集纯化研究中具有广阔的发展潜力.

2 分析方法

建立植物组织中微量植物激素灵敏的测定方法,对于阐明植物激素在植物生长发育中的作用和功能具有十分重要的意义.虽然植物提取物经过液液萃取、固相萃取等手段的富集和纯化,但考虑到植物激素在植物体内含量极低、性质不稳定,加上前处理并不能完全消除植物组织中复杂的基质干扰,故植物激素的分析方法必须十分灵敏和专一,才能对植物体内的植物激素进行准确的定量.随着科技的发展和进步,越来越多的技术手段被应用于植物激素的测定当中.

2.1 免疫分析法

免疫检测技术是一种以抗体作为分析试剂,利用抗体(Ab)和抗原(Ag)之间特异性相互识别结合的特性,对待测物进行定性或定量分析的检测方法,主要包括放射免疫法(RIA)和酶联免疫法(ELISA).RIA 和 ELISA 分别采用放射性同位素和酶将 Ag 标记成标记抗原(Ag*)与 Ab 结合形成 Ag*-Ab 复合物后,再测定其放射强度和进行酶活性定量.其中,Ag 和 Ab 之间反应的特异性和灵敏性是免疫检测技术的关键.两个因素制约了这项技术在植物激素定量分析领域的应用.首先,由于植物激素属于半抗原,只有与大分子物质(如牛血清白蛋白)偶联制得抗原后才能刺激动物的免疫系统而获得抗体;其次,植物材料提取物中含有许多与植物激素结构相似的次生代谢物,包括植物激素的同系物、前体、类似物以及其他性质不明的化合物.它们不可避免地会与抗体出现交叉反应,使免疫分析法的特异性降低,影响到定量分析结果的准确性.所以免疫学测定法应用于植物激素的检测直到 20 世纪 70 年代初才发展起来.这种方法应用于植物激素测定的最大优势在于其具有很低的检测限和非常高的灵敏度^[53-55].

放射免疫法(RIA)具有较高的灵敏度,可以检测出 nmol 或 pmol 的微量物质^[56,57],但需要使用 ³H, ¹⁴C 和 ¹²⁵I 等放射性同位素,在操作时要遵守严格的操作

规范. Weiler^[58]制备的玉米素核苷(tZR)抗血清对玉米素(tZ)和玉米素核苷(tZR)都具有很高的特异性和灵敏度,对 IPR, cZR 和 DHZ 的交叉反应很小,对腺苷及相关嘌呤类化合物完全没有交叉反应.但由于放射性元素的不稳定性及对操作者身体的损伤,RIA 法现已较少使用.

酶联免疫测定法(ELISA)是用某些酶对免疫原进行标记,而避免了使用放射性物质. Wang 等人^[59]首次报道了专一识别水杨酸的单克隆抗体的制备.该抗体原以 5-氨基水杨酸(5-ASA)的 5 位氨基为偶联位点,利用血蓝蛋白(KLH)为载体合成的免疫原对 SA 和 5-ASA 具有高亲和力. Maldiney 等人^[53]在测定番茄样品中的 ZR 含量时将生物素-亲和素体系引入 ELISA 法,可以检测出 100 mg 样品中的 ZR 含量,具有很高的灵敏度.但是,由于植物提取液中往往含有较多的对植物激素测定有严重干扰的杂质,使 ELISA 测定结果的重复性较差.目前,此方法在部分植物体内含量极低的植物激素(例如油菜素等)的定量分析中仍有应用^[60].此外,免疫传感器也被用于植物激素的测定,主要利用抗原和抗体间的相互作用进行识别,当被分析物(抗原)与抗体结合后,由转换器将生物.化学信号转换成电信号,从而进行定量检测.湖南农业大学植物激素重点实验室在研制植物激素免疫传感器方面取得了一定进展^[61,62].

免疫分析法具有高选择性、灵敏度和高通量等特点,实验中所需样品及试剂量少,操作简便,但免疫分析法不能同时对多种植物激素进行定量分析,并且具有不可避免的交叉反应,影响了定量分析结果的准确性和重现性.这些局限性导致其在植物激素的定性定量研究中未能得到广泛的应用.

2.2 电化学分析法

电化学分析法相对于气相色谱(GC)、液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE)、免疫法等分析方法具有简单、方便和仪器价廉等特点.在早期的研究中,植物激素的电化学分析方法主要是针对脱落酸^[63]、赤霉素^[64]、玉米素和激动素^[65]等植物激素标准品的电化学行为进行探讨.通过研究发现,植物激素存在的本底溶液的性质和 pH 对测定结果会产生很大影响,在植物样品中情况更为复杂,所以电化学方法较少用于实际样品的测定.近年来,新发展的电化学生物传感器由于具有能在浑浊溶液中操作、选择性好、灵

敏度高等独特的优势,在植物激素的分析检测应用中表现出良好的发展潜力.

电化学生物传感器利用具有生物活性的物质作为识别元件(识别元件所用的生物活性物质主要有酶、微生物、动植物组织、抗体和核酸等),通过特定反应使被测成分消耗或产生相应化学计量数的电活性物质,电极上流过的电流或电极表面与溶液的电势差会随之发生变化,从而实现了特定物质的检测.李春香等人^[66]提出了一种以绿豆芽叶片组织-二茂铁修饰的碳糊电极(LFMCE)作为测定植物激素 IAA 的组织生物传感器.其基本原理是绿豆芽叶片组织内含有一定量的 IAA 氧化酶,能够催化 IAA 的氧化代谢,而存在于植物组织内的 IAA 氧化酶因原有生理环境,稳定性较高,可用作修饰电极的敏感材料,利用此修饰电极的氧化峰电流的升高来定量测定 IAA,其中二茂铁起了电子传递媒介体的作用.除了修饰电极外, Li 等人^[67]开发的压电生物传感器也可用于 IAA 的测定,压电生物传感器是基于石英晶体的压电效应对其电极表面质量变化进行测量的仪器.其基本原理是石英晶体微天平(QCM)表面包被一种抗体,一旦样品中相应的抗原与之发生特异性结合,晶体的质量增加,振荡频率发生变化,而频率的变化与待测抗原的浓度成正比.在实验中,可利用半抗原 IAA 和抗原 IAA-BSA(牛血清蛋白)与固定在石英晶体微天平上的抗体发生竞争的免疫反应对目标植物激素 IAA 进行检测.

近年来,受到生物科学、信息科学和材料科学发展成果的推动,生物传感器技术飞速发展.其具有灵敏度高、检测速度快、操作简便、可进行连续动态监测等优点,但生物传感器的应用也同时受到稳定性、重现性和使用寿命等诸多因素的限制,在植物激素分析应用领域中一直停留在方法学研究的阶段.

2.3 色谱和色谱质谱联用

色谱法是根据不同物质在介质中分配系数的不同对目标化合物进行分离测定的方法.气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)是植物激素分析领域中较为常见的色谱分析手段.除此之外,依据样品中各组分在电场作用下淌度和分配行为上的差异而实现分离的毛细管电泳(CE)分析方法也被归为色谱方法,并应用于植物激素分析^[68,69].由于经过纯化富集处理的植物提取物中成分依然非常复杂,色谱分离手

段为植物提取物提供了进一步的分离能力,利用不同性能的色谱检测器,对其中的植物激素组分进行定性和定量分析. GC和HPLC在20世纪70年代初开始应用到植物激素测定后,迅速发展成为目前植物激素测定最为常用的测试手段. 其中,GC法需要被分析物具有较低的极性和气化温度,而植物激素的挥发性通常较差,除了乙烯以外,植物激素一般都需经过衍生化处理生成易挥发的衍生物才能进行GC分析,衍生化过程较为繁琐,增加了样品前处理的工作量. 与之相比,HPLC能够直接分析极性较大的植物激素,大大简化样品的前处理过程,但其分离能力较GC差很多. 液相色谱紫外检测器(UV)^[70,71]的灵敏度无法满足低含量植物激素的分析要求,在植物激素分析领域已应用较少;而荧光检测器(FLD)则具有很高的灵敏度和良好的选择性,灵敏度要比紫外检测器高2~3个数量级,所需样品量较少,比较适合部分植物激素的测定,在植物激素分析研究中有较多应用报道^[21,22,72,73]. 色谱在早期的植物激素分析工作中发挥了较大的作用,但色谱仪根据保留时间定性,在复杂植物提取物中可能因为不同物质保留时间相同或相近而给出错误的结论,紫外和荧光检测器不能满足超低含量植物激素定性定量分析的要求,色谱质谱联用技术在很大程度上克服了传统色谱技术在植物激素定性和定量分析方面的不足,成为普遍接受和认可的植物激素分析手段.

质谱分析是一种测量离子质荷比(m/z)的分析方法,其基本原理是使样品中各组分在离子源中发生电离,生成不同质荷比的带电荷离子,经加速电场的作用,形成离子束,进入质量分析器进行分析. 植物样品尽管经过多步的分离纯化和富集,但由于激素的超微含量和植物本底杂质的严重干扰,因此使用质谱对目标物进行分析,可以使其选择性得到极大

增强. 在植物激素分析中,GC和HPLC与单级四极杆质谱仪联用技术最早得到应用,采用选择离子监控模式(SIM)对目标植物激素进行定量分析,质谱在此工作模式下,只允许设定质荷比的植物激素分子离子或碎片离子通过并被检测,具有很高的灵敏度. 在气相色谱/质谱联用(GC/MS)中,化学电离源(CI)^[13,74]和电子轰击离子源(EI)^[16,75]是应用最广的两种电离方式,都曾被应用于植物激素的测定. 但是,EI源中使用的70 eV电子具有很高能量,大多数化合物在此条件下往往会发生解离,产生大量的碎片离子,使得定性难度加大^[76]. 大气压电离(API)技术的出现大大扩展了色谱质谱联用技术的适用范围,常见的大气压电离技术主要有电喷雾电离(ESI)和大气压化学电离(APCI),它克服了EI源的不足,可通过软电离获取目标化合物的准分子离子,是目前最为成熟的液相色谱/质谱(LC/MS)接口. 在软电离离子化技术中,尽管快原子轰击(FAB)离子源在植物激素测定中的应用也有报道^[77],但ESI源具有更高的灵敏度和更低的背景噪音^[78]. 对于一些植物激素而言,即使选择SIM工作方式,复杂的基质仍然会干扰目标植物激素的定量分析. 串联质谱(MS/MS)利用时间串联的离子阱质谱(ion trap, IT)或者空间串联的三级四极杆(QQQ)质谱实现,在植物激素定量分析中通常使用多级反应监控模式(multiple reaction monitor, MRM). 其工作原理如图1所示,待测物在离子源形成离子,第一级质谱分离待测物离子(母离子),使其进入碰撞区与惰性气体碰撞,经过碰撞诱导解离(CID)产生子离子,子离子在第二级质谱内分离. 不同物质的离子裂解规律不同,若前体离子可能受其他物质干扰,子离子仍受干扰的可能性则会降低,因而MRM具有比单级质谱SIM工作模式更高的选择性和特异性,可以快速灵敏地从少量植物粗提物中直接检测出相关

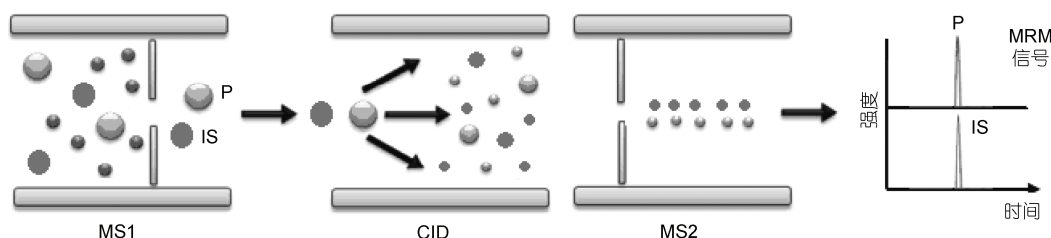


图1 三级四极杆质谱多反应监测扫描(MRM)同位素稀释法工作原理示意图
MS1, 监测母离子; CID, 碰撞池; MS2, 监测子离子; IS, 同位素内标; P, 目标植物激素

激素^[79,80],并结合保留时间和母离子/子离子对植物样品中的激素进行准确性与定量.基于 LC-MS/MS 技术的优势,这项技术在植物激素分析中得到广泛应用^[8,12,37,80].质谱技术的高灵敏极大减少了测定样品的用量,Müller 等人^[81]使用 GC-MS/MS 检测出 20 mg 植物样品中的 SA, JA, IAA 和 ABA 等植物激素,使一些珍贵的植物突变体材料内源激素的测定变得简单易行,一步完成了多种植物激素的同时检测.纳流电喷雾(nanoESI)是一种新近发展的电喷雾离子源技术,使用纳升流速(1 nL/min~1 μL/min)和纳米柱能够大幅提高系统的灵敏度,这项技术在植物激素的定量分析中也得到应用^[82],但其喷雾器喷嘴容易受到样品颗粒和沉淀物的堵塞,分析结果的稳定性和可重现性较常规电喷雾离子源差,并且色谱匹配技术也有待完善,这些原因阻碍了纳流电喷雾技术的普及使用^[83].

除了质谱技术的广泛使用和改进外,新的色谱技术也逐渐应用到植物激素分析领域,近年来发展起来的超高效液相色谱(UPLC)使用更小粒径(1.7 μm)填料的色谱柱进行分离,可耐受 1000 bar (1 bar=10⁵ Pa)的压力,具有更强的分离能力和更快的分析速度.UPLC 与 MS 的完美结合极大提高了仪器的工作效率,在 HPLC-MS 上需要几十分钟完成的工作现在仅需几分钟就可以完成,其强大的分离效率和分离速度为高通量检测多种植物激素提供了保障.Novak 等人^[10]建立了 UPLC-MS/MS(QQQ)检测 32 种细胞分裂素的方法,比以往建立的 HPLC-MS 方法分析速度提高了 4 倍,方法的精密度大幅提高.由于 UPLC 的分离速度优势,它可以很好地与飞行时间质谱(UPLC-TOF MS)实现联用,在植物激素的分析中也有报道^[84].

植物激素分析中有两个关键问题需要注意.首先,确保植物激素分析结果的准确性.色谱质谱联用技术充分利用质谱的工作特点,在实际植物样品分析中采用同位素稀释法(isotope dilution)确保分析结果的准确性.质谱同位素稀释法是一种灵敏度高、准确性好的定量方法,是在样品处理前定量加入稳定同位素(²H 或者 ¹³C)标记的待测植物激素,利用质谱 SIM 或者 MRM 工作模式检测植物提取物中同位素内标与内源性植物激素比率的变化来进行定量.稳定同位素标记的植物激素内标物的使用校正了样品在提取和纯化过程中带来的损失及定量过程中带来的

误差,使测定结果更为准确可信^[85].稳定同位素内标与对应的植物激素几乎有着完全相同的物理化学性质,是理想的内标化合物,在 MS 分析中植物激素的稳定性同位素内标(如²H₂-IAA, ²H₆-ABA, ²H₅-JA 和 ²H₄-SA 等)在植物激素定量分析中被广泛使用^[8,12,37,80].其次,需要提高植物激素的检测灵敏度.由于植物激素在植物体内含量很低,虽然经过液相萃取、固相萃取等多种手段的分离和纯化,部分植物激素仍然难以进行定量,为了提高灵敏度,需要对目标植物激素进行衍生化处理.对植物激素样品衍生化处理在 GC/MS 和 LC/MS 的方法研究中也是一种重要的技术手段.因为植物激素的挥发性较差,对于 GC/MS 分析,一般需衍生化反应生成易挥发的衍生物才可以进行分析,已经成为气相色谱分析不可缺少的重要环节;而植物激素提取物尽管可以直接在 LC/MS 上得到检测,但通过合适的衍生化可将目标化合物的检测灵敏度提高 1~3 个数量级,能够使用更少的植物样品进行植物激素定量分析,因此也越来越受到研究者的重视,在植物激素的检测分析中已有应用^[86-88].

重氮甲烷是一种气相色谱较常用的衍生化试剂,具有反应速率快,副产物少等优点,但其性质不稳定,具有毒性和爆炸性,使用时必须十分小心,避免接触皮肤并保持良好的通风^[89].Prinsen 等人^[90]建立了一个新颖的样品处理方法,他们使用重氮甲烷作为 LC/MS 分析的衍生化试剂衍生处理了生长素(IAA)及其代谢产物使其检测限提高了 1000 倍.三甲基硅烷化^[91]、丁基二甲基硅烷化^[92]、三氟乙酰化^[93]和乙酰化^[75]等多种衍生化方法在植物激素的 GC/MS 分析中都被使用.Björkman 和 Tillberg^[75]采用乙酸酐对细胞分裂素类激素进行衍生化反应后 GC/MS 检测,具有回收率高、背景低、副产物少等优点.但作者也指出了此方法的缺点:R₃ 为葡萄糖基的乙酰化产物在 GC/MS 中不稳定;乙酰化的玉米素和二氢玉米素在 EIM 谱图中分子离子峰较弱,因此该方法不适合这两种类型的 CTKs 新型化合物的鉴定.Svatoš 等人^[86]采用衍生化试剂丹磺酰基-3-氨基苯基硼酸与油菜素内酯(BRs)的 22 和 23 位上的邻羟基反应生成丹磺酰基-3-氨基苯基硼酸盐可以极大地降低检测限.衍生化后的 BRs 的检测线可以低至 125 attomole,从而建立了一个 LC/MS 分析测定植物提取物中 BRs 的高选择性和高灵敏度的方法.因此,对于 GC/MS 分析,植物激素的衍生化处理是为了改善样品挥发性,

使其成为易于气化的样品;而对于 LC/MS 分析,衍生化处理是为了提高植物激素的离子化效率,极大降低其检测限. 衍生化处理不同的植物激素需采用不同的方法(表 3),具体使用哪种衍生化试剂与所分析的样品和衍生化效率及衍生化产物的稳定性、物理化学性质、沸点、分子极性都有很大关系. 这些因素是样品能否成功地使用色谱分析的先决条件,往往要对衍生化试剂、反应的时间和温度等条件进行多步优化才能确定最佳方案.

3 结论与展望

植物激素在植物体内的超微含量和大量代谢干扰物的存在使植物激素的提取和测定变得非常困难. 目前所采取的每一种提取和测定方法都有各自的选择性和特异性,适用于某种样品的检测. 怎样有效地

使检测灵敏度得到提高,一直是困扰植物激素研究者的问题之一,也是解决低含量植物激素定量分析的关键问题之一. 植物样品一般都需要选择合适的纯化富集方法进行处理,以期将干扰杂质的含量降到最低,才能进一步检测分析. RIA 和 ELISA 等免疫检测法需继续完善,减少交叉反应,提高测定结果的准确性. 电化学分析法受到稳定性、重现性和使用寿命等诸多方面的限制在植物激素的检测分析中一直未能普及应用. CE, GC 和 LC 与 MS 的联用在植物激素的检测中表现出广阔的应用前景,特别是 LC, GC 与 MS/MS 的联用,使得检测灵敏度得到大幅提高,不但可以根据离子的碎片提供重要的结构信息,而且因为稳定同位素内标的使用使测试结果更为准确可靠. 其中 LC-MS/MS 联用避免了 GC-MS 分析中对样品进行繁琐衍生化的处理过程,已经在植物激素

表 3 植物激素的衍生化方法^{a)}

植物激素	衍生试剂	衍生条件	参考文献
IAA	重氮甲烷	处理后的样品溶液直接用重氮甲烷气体吹干进行反应	[30]
		10%甲醇的二乙基醚溶液中 0℃反应 10 min	[7]
	MTBSTFA BETAB	甲醇溶液中在室温下快速反应	[81,90]
		100℃反应 60 min	[94]
	水:三乙胺(25:1)溶液中加入 500 mmol/L BETAB(溶于 70%乙腈)	80℃反应 130 min	[87]
ABA	重氮甲烷	10%甲醇的二乙基醚溶液中 0℃反应 10 min	[7]
		甲醇溶液中在室温下快速反应	[81]
	MTBSTFA BETAB	100℃反应 60 min	[94]
		水:三乙胺(25:1)溶液中加入 500 mmol/L BETAB(溶于 70%乙腈)	80℃反应 130 min
JA	MTBSTFA	100℃反应 60 min	[94]
	重氮甲烷	甲醇溶液中在室温下快速反应	[81]
SA	MTBSTFA	100℃反应 60 min	[94]
	重氮甲烷	甲醇溶液中在室温下快速反应	[81]
CTKs	MTBSTFA	100℃反应 60 min	[94]
		乙腈:乙酸酐:NMIM(100:10:1)	室温下反应 30 min
	MSHFBA BTMSA	90℃反应 30 min	[94]
		乙腈溶液中 60℃反应 5 min	[91]
	BETAB	乙腈:N-甲基咪唑:丙酸酐(10:6:3)溶液中 37℃反应 30 min	[88]
		水:三乙胺(25:1)溶液中加入 500 mmol/L BETAB(溶于 70%乙腈)	80℃反应 130 min
GA ₁ , GA ₃ GAs	BSTFA	重氮甲烷甲基化后加入 BSTFA 在吡啶溶液中 80℃反应 15 min	[18]
		90℃反应 30 min	[94]
	BETAB	水:三乙胺(25:1)溶液中加入 500 mmol/L BETAB(溶于 70%乙腈)	80℃反应 130 min
BRs	丹磺酰基-3-氨基苯基硼酸	在噻啶:乙腈(1:19)溶液中 62℃反应 30 min	[86]

a) MTBSTFA, N-甲基-N-(特丁基二甲基硅烷)三氟乙酰胺; MSHFBA, N-甲基-N-(三甲基硅烷)七氟丁酰胺; BSTFA, N,O-双(三NMIM(N-甲基咪唑)); BTMSA, 双(三甲基硅烷)乙酰胺; BETAB, 2-溴乙基三甲基溴化铵

研究中发挥出巨大的作用. 与此同时, 串联质谱仪的昂贵和同位素内标化合物的不易获得也在一方面制约了该方法的普及推广, 但色谱质谱联用技术目前依然是植物激素检测分析中应用最为理想的技术手段.

植物激素成分及超微量级的准确检测可以帮助研究者对植物激素调控植物生长、发育、衰老、器官和性状形成及对环境适应等机制的深入认识, 为农作物产量和品质调控以及育种创新提供重要的理论基础. 目前, 我国植物激素定量分析水平随着国家自然科学基金委员会植物激素重大研究计划的启动发展很快, 基于色谱质谱联用技术的植物激素分析平台已经能够基本解决含量水平较高植物激素的定量分析. 对于植物激素检测分析技术的发展趋势应包括以下几方面: 第一, 植物激素信号传导途径一直是生物学领域的研究热点, 并且许多主要植物激素(生长素、脱落酸、细胞分裂素、赤霉素等)的受体已经得到确认^[95]. 现在已经认识到调节植物的某一生长或生理反应过程是由多种激素协同作用完成的^[96], 对植物某单一激素的研究已不能真实地解释植物所表现出的生理现象, 对其起协同作用的多种激素的同时检测才能反映出植物激素相互作用的本质. 因

此需要建立植物激素组的分析方法体系, 既可同时分析不同激素的组合(种类和含量), 又可检测特定激素不同结合状态的分布比例或含量. 第二, 植物激素在植物体内的不同时期、不同组织及不同器官的分布水平不同, 建立植物激素的超微量、高灵敏、原位、瞬时、动态的分析方法可以从单分子、单细胞以及活体原位中分析检测植物激素, 也帮助研究者更加深入了解植物激素的合成及代谢本质. 第三, 植物激素标准品或同位素标记的植物激素标准品是植物激素准确定量的基本条件, 但对其提取和制备却非常困难. 因此, 建立大量合成与提取植物激素或同位素标记的植物激素标准品及其部分关键中间体的方法也是今后研究工作者需要努力的方向. 第四, 需要建立高通量、快速、高效分离与预富集的植物样品处理方法, 提高植物激素的检测效率, 可以对生物学研究的实验结果有迅速的反馈. 可以预见, 随着科学技术的快速发展, 植物激素的检测水平也会得到突飞猛进的进步, 新型仪器的开发和联用将在植物激素定量分析和结构鉴定中发挥重要的作用, 并将会有越来越多的新型植物激素的发现达到深入认识植物激素在植物的生长发育过程中所起作用的本质.

参考文献

- 1 Davies P J. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 1—12
- 2 Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. Trichoderma species-opportunistic avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol, 2004, 2: 43—56
- 3 Bray E A. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. Plant Cell Environ, 2002, 25: 153—161
- 4 Durrant W E, Dong X. Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopathol, 2004, 42: 185—209
- 5 郝建军, 康宗利. 植物生理学. 北京: 化学工业出版社, 2005. 160
- 6 Barkawi L S, Tam Y Y, Tillman J A, et al. A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissue. Anal Biochem, 2008, 372: 177—188
- 7 Vine J H, Noiton D, Plummer J A, et al. Simultaneous quantitation of indole 3-acetic acid and abscisic acid in small samples of plant tissue by gas chromatography-mass spectrometry/selected ion monitoring. Plant Physiol, 1987, 85: 419—422
- 8 Ross A R S, Ambrose S J, Cutler A J, et al. Determination of endogenous and supplied deuterated abscisic acid in plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. Anal Biochem, 2004, 329: 324—333
- 9 Vilaró F, Canela-Xandri A, Canela R. Quantification of abscisic acid in grapevine leaf (*Vitis vinifera*) by isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, 2006, 386: 306—312
- 10 Novak O, Hauserova E, Amakorova P, et al. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Phytochemistry, 2008, 69: 2214—2224
- 11 Gawronska H, Yang Y Y, Furukawa K, et al. Effects of low irradiance stress on gibberellin levels in pea-seedlings. Plant Cell Physiol, 1995, 36: 1361—1367
- 12 Kristl J, Veber M, Krajničič B, et al. Determination of jasmonic acid in *Lemna minor* (L.) by liquid chromatography with fluorescence detection. Anal Bioanal Chem, 2005, 383: 886—893
- 13 Engelberth J, Schmelz E A, Alborn H T, et al. Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase

- extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2003, 312: 242—250
- 14 Cao J, Murch S J, O'Brien R, et al. Rapid method for accurate analysis of melatonin, serotonin and auxin in plant samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2006, 1134: 333—337
 - 15 Liu B F, Zhong X H, Lu Y T. Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar Electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. *J Chromatogr A*, 2002, 945: 257—265
 - 16 Zhang F J, Jin Y J, Xu X Y, et al. Study on the extraction, purification and quantification of jasmonic acid, abscisic acid and indole-3-acetic acid in plants. *Phytochem Anal*, 2008, 19: 560—567
 - 17 Moritz T, Olsent J E. Comparison between high resolution selected ion monitoring, selected reaction monitoring and four-sector tandem mass spectrometry quantitative analysis of gibberellins in milligram amounts of plant tissue. *Anal Chem*, 1995, 67: 1711—1716
 - 18 Symons G M, Reid J B. Hormone levels and response during de-etiolation in *Pea*. *Planta*, 2003, 216: 422—431
 - 19 Jager C E, Symons G M, Nomura T, et al. Characterization of two brassinosteroid C-6 oxidase genes in *Pea*. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1894—1904
 - 20 Zullo M A T, Adam G. Brassinosteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications. *Braz J Plant Physiol*, 2002, 14: 143—181
 - 21 Rozhon W, Petutschnig E, Wrzaczek M, et al. Quantification of free and total salicylic acid in plants by solid-phase extraction and isocratic high-performance anion-exchange chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382: 1620—1627
 - 22 Eshita S M. 3-hydroxybenzoic acid as an internal standard for the high-pressure liquid chromatography quantitation of salicylic acid in plants. *Anal Biochem*, 2001, 289: 99—102
 - 23 Enyedi A J, Yalpani N, Silverman P, et al. Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 2480—2484
 - 24 Bielecki R L. The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal Biochem*, 1964, 9: 431—442
 - 25 Horgan R, Scott I M. Cytokinins. In: Rivier L, Crozier A, eds. *The Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*. London: Academic Press, 1987. 304—365
 - 26 Laloue M, Terrine C, Gawer M. Cytokinins: Formation of the nucleoside-50-triphosphate in tobacco and Acer cells. *FEBS Lett*, 1974, 46: 45—50
 - 27 Hoyerová K, Gaudinová A, Malbeck J, et al. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1151—1159
 - 28 Izumi Y, Okazawa A, Bamba T, et al. Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analyt Chim Acta*, 2009, 648: 215—225
 - 29 Wu Y, Hu B. Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7657—7663
 - 30 Ribnicky D M, Cooke T J, Cohen J D. A microtechnique for the analysis of free and conjugated indole-3-acetic acid in milligram amounts of plant tissue using a benchtop gas chromatograph-mass spectrometer. *Planta*, 1998, 204: 1—7
 - 31 Wijayanti L, Kobayashi M, Fujioka S, et al. Identification and quantification of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellins in phloem exudates of *Pharbitis nil*. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59: 1533—1535
 - 32 Dunlap J R, Guinn G. A simple purification of indole-3-acetic acid and abscisic acid for GC-SIM-MS analysis by microfiltration of aqueous samples through Nylon. *Plant Physiol*, 1989, 90: 197—201
 - 33 Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, et al. Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell*, 2007, 19: 32—45
 - 34 Astot C, Dolezal K, Moritz T, et al. Deuterium *in vivo* labelling of cytokinins in *Arabidopsis thaliana* analysed by capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2000, 35: 13—22
 - 35 Novák O, Tarkowski P, Tarkowská D, et al. Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analyt Chim Acta*, 2003, 480: 207—218
 - 36 Ma Z, Ge L, Lee A S Y, et al. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analyt Chim Acta*, 2008, 610: 274—281
 - 37 Matsuda F, Miyazawa H, Wakasa K, et al. Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69: 778—783
 - 38 Rhijn J A V, Heskamp H H, Davelaar E, et al. Quantitative determination of glycosylated and aglycon isoprenoid cytokinins at sub-picomolar levels by microcolumn liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2001, 929: 31—42
 - 39 Ge L, Yong J W H, Goh N K, et al. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J*

- Chromatogr B, 2005, 829: 26—34
- 40 Ge L, Yong J W H, Tan S N, et al. Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr A*, 2004, 1048: 119—126
- 41 Ge L, Yong J W H, Tan S N, et al. Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *J Chromatogr A*, 2006, 1133: 322—331
- 42 Dobrev P I, Havlíček L, Vágner M, et al. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2005, 1075: 159—166
- 43 Hou S, Zhu J, Ding M, et al. Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2008, 76: 798—802
- 44 Smith J L, Moraes C M D, Mescher M C. Jasmonate-and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Manag Sci*, 2009, 65: 497—503
- 45 Baldwin I T, Zhang Z P, Diab N, et al. Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta*, 1997, 201: 397—404
- 46 Chen H, Wilkerson C G, Kuchar J A, et al. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 19237—19242
- 47 Koo A J K, Gao X, Daniel J A, et al. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, 59: 974—986
- 48 Liu H T, Li Y F, Luan T G, et al. Simultaneous determination of phytohormones in plant extracts using SPME and HPLC. *Chromatographia*, 2007, 66: 515—520
- 49 Vankova R, Gaudinova A, Sussenbekova H, et al. Comparison of oriented and random antibody immobilization in immunoaffinity chromatography of cytokinins. *J Chromatogr A*, 1998, 811: 77—84
- 50 Hauserová E, Swaczynová J, Doležal K, et al. Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *J Chromatogr A*, 2005, 1100: 116—125
- 51 Ulvskov P, Marcussen J, Rajagopal R, et al. Immunoaffinity purification of indole-3-acetamide using monoclonal antibodies. *Plant Cell Physiol*, 1987, 28: 937—945
- 52 Nicander B, Stahl U, Bjorkman P O, et al. Immunoaffinity co-purification of cytokinins and analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet-spectrum detection. *Planta*, 1993, 189: 312—320
- 53 Maldiney R, Leroux B, Sabbagh I, et al. A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: Auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *J Immunol Methods*, 1986, 90: 151—158
- 54 Morris R O, Blevins D G, Dietrich J T, et al. Cytokinins in plant pathogenic bacteria and developing cereal grains. *Aust J Plant Physiol*, 1993, 20: 621—637
- 55 Yong J W H, Wong S C, Letham D S, et al. Effects of elevated [CO₂] and nitrogen nutrition on cytokinins in the xylem sap and leaves of cotton. *Plant Physiol*, 2000, 124: 767—779
- 56 Grayling A, Hanke D E. Cytokinins in exudates from leaves and roots of red *Perilla*. *Phytochemistry*, 1992, 31: 1863—1868
- 57 Cook N C, Bellstedt D U, Jacobs G. Endogenous cytokinins distribution patterns at budburst in Granny Smith and Braeburn apple shoots in relation to bud growth. *Sci Hort*, 2001, 87: 53—63
- 58 Weiler E W. Radioimmunoassays for trans-zeatin and related cytokinins. *Planta*, 1980, 149: 155—162
- 59 Wang S C, Li G J, Kai X, et al. Preparation and application of monoclonal antibodies specific for salicylic acid. *Acta Bot Sin*, 2001, 43: 1207—1210
- 60 Swaczynová J, Novák O, Hauserová E, et al. New techniques for the estimation of naturally occurring brassinosteroids. *J Plant Growth Regul*, 2007, 26: 1—14
- 61 Li J, Wu Z Y, Xiao L T, et al. A novel piezoelectric biosensor for the detection of phytohormones-indole acetic acid. *Analyt Sci*, 2002, 18: 1—5
- 62 李春香, 李劲, 萧浪涛. 基于巯基自组装单层膜的植物生长激素吲哚乙酸电化学免疫传感器的研究. *化学学报*, 2003, 61: 790—794
- 63 王宏, 胡胜水, 周性尧. 植物激素脱落酸伏安行为的研究. *武汉大学学报*, 1997, 43: 721—724
- 64 刘旭红, 王力生, 蒋治良. 赤霉素的 2.5 次微分伏安法研究及应用. *分析科学学报*, 1997, 13: 222—224
- 65 江子伟, 姜彤波, 琚常青, 等. 玉米素和激动素的伏安行为. *高等学校化学学报*, 1994, 15: 355—359
- 66 李春香, 李劲, 萧浪涛, 等. 植物激素吲哚乙酸电化学传感器研究. *分析科学学报*, 2003, 19: 205—208
- 67 Li J, Wu Z Y, Xiao L T. A novel piezoelectric biosensor for the detection of phytohormone β -indole acetic acid. *Analyt Sci*, 2002, 18: 403—407
- 68 Ge L, Peh C Y C, Yong J W H, et al. Analyses of gibberellins by capillary electrophoresis-mass spectrometry combined with solid-phase

- extraction. *J Chromatogr A*, 2007, 1159: 242—249
- 69 Ge L, Yong J W H, Tan S N, et al. Determination of cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2006, 27: 2171—2181
- 70 Albrecht T, Kehlen A, Stahl K, et al. Immunoaffinity co-purification of cytokinins and analysis by high-performance liquid chromatography liquid chromatography with ultraviolet-spectrum detection. *Planta*, 1993, 191: 86—94
- 71 Gamoh K, Kitsuwa T, Takatsuto S, et al. Determination of trace brassinosteroids by high performance liquid chromatography. *Analyt Sci*, 1988, 4: 533—535
- 72 Verberne M C, Brouwer N, Delbianco F, et al. Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material. *Phytochem Anal*, 2002, 13: 45—50
- 73 符继红, 褚金芳, 王吉德, 等. 固相萃取反相高效液相色谱荧光检测法测定拟南芥中的生长素. *分析化学*, 2009, 37: 1324—1327
- 74 Schmelz E A, Engelberth J, Alborn H T, et al. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10552—10557
- 75 Björkman P O, Tillberg E. Acetylation of cytokinins and modified adenine compounds: A simple and non-destructive derivatization method for gas chromatography-mass spectrometric analysis. *Phytochem Anal*, 1996, 7: 57—68
- 76 Ikekawa N, Takatsuto S. Microanalysis of brassinosteroids in plants by gas chromatography/Mass spectrometry. *Mass Spectroscopy*, 1984, 32: 55—70
- 77 Astot C, Dolezal K, Moritz T, et al. Precolumn derivatisation and capillary liquid chromatographic/frit-fast atom bombardment mass spectrometry analysis of cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *J Mass Spectrom*, 1998, 33: 892—902
- 78 Tarkowski P, Ge L, Yong J W H, et al. Analytical methods for cytokinins. *Trends Analyt Chem*, 2009, 28: 323—335
- 79 Pan X Q, Welti R, Wang X M. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 2008, 69: 1773—1781
- 80 Segarra G, Jáuregui O, Casanova E, et al. Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry*, 2006, 67: 395—401
- 81 Müller A, Düchting P, Weiler E W. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2002, 216: 44—56
- 82 Izumi Y, Okazawa A, Bamba T, et al. Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analyt Chim Acta*, 2009, 648: 215—225
- 83 帕拉马尼克 B N, 甘古利 A K, 格罗斯 M L. 电喷雾质谱应用技术. 北京: 化学工业出版社, 2005. 132
- 84 Glauser G, Grata E, Dubugnon L, et al. Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J Biol Chem*, 2008, 283: 16400—16407
- 85 Rivier L C. Principles and Practice of Plant Hormones Analysis, 1 and 2. London: Academic Press, 1987
- 86 Svatoš A, Antonchick A, Schneider B. Determination of brassinosteroids in the sub-femtomolar range using dansyl-3-aminophenylboronate derivatization and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18: 816—821
- 87 Kojima M, Kamada-Nobusada T, Komatsu H. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-Probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: An application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 1201—1214
- 88 Ordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, et al. Derivatization for LC-electrospray ionization-MS: A tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Anal Chem*, 2004, 76: 2869—2877
- 89 王立, 汪正范. 色谱分析样品处理. 北京: 化学工业出版社, 2006
- 90 Prinsen E, Dongen W V, Esmans E L, et al. HPLC linked electrospray tandem mass spectrometry: A rapid and reliable method to analyse indole-3-acetic acid metabolism in bacteria. *J Mass Spectrom*, 1997, 32: 12—22
- 91 Most B H, Williams J C, Parker K J. Gas chromatography of cytokinins. *J Chromatogr A*, 1968, 38: 136—138
- 92 Hocart C H, Wong O C, Letham D S, et al. Mass spectrometry and chromatography of t-butyltrimethylsilyl derivatives of cytokinin bases. *Anal Biochem*, 1986, 153: 85—96
- 93 Ludewig M, Dörffling K, König W A. Electron-capture capillary gas chromatography and mass spectrometry of trifluoroacetylated cytokinins. *J Chromatogr A*, 1982, 243: 93—98
- 94 Birkemeyer C, Kolasa A, Kopka J. Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J Chromatogr A*, 2003, 993: 89—102
- 95 Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature*, 2009, 456: 1071—1078
- 96 Rost T L, Weier T E. Botany, An Introduction to Plant Biology. New York: Wiley, 1979. 155—170