

文章编号: 1004-0374(2010)01-0036-09

植物激素检测技术研究进展

白玉, 杜甫佑, 白玉*, 刘虎威

(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要: 植物激素是植物体内合成的一系列痕量有机化合物, 它们在植物的生长发育和环境应答过程中具有非常重要的作用, 其超微量及原位测定技术仍是制约植物激素研究的瓶颈问题之一。该文着重介绍了近年来茉莉酸及其甲酯、脱落酸、生长素、赤霉素和多肽激素等植物激素分析检测技术的最新研究进展, 并对植物激素超微量、高灵敏检测技术研究中存在的问题和发展前景进行了简要的讨论。

关键词: 植物激素; 分析检测; 进展

中图分类号: Q946.855; Q94-334 **文献标识码:** A

Recent development in determination of plant hormones

BAI Yu, DU Fu-you, BAI Yu*, LIU Hu-wei

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Phytohormones, a series of trace organic compounds synthesized in plants, play important roles in plant growth, development and environmental response. The ultrasensitive and in-situ detection of phytohormones has been a crucial issue in the plant research. This paper mainly presents the recent development in determination of jasmonic acid, methyl jasmonate, abscisic acid, auxin, gibberellin and peptide hormones, and discusses the challenges and prospects in this topic.

Key words: phytohormones; determination; progress

植物激素是植物体内合成的一系列痕量有机化合物, 它在植物的某一部位产生, 运输到另一个或一些部位, 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、生长和分化到生殖、成熟和衰老的每个生命过程, 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互相作用调节其对环境的适应^[1, 2]。通过调控如细胞分裂素、油菜素内酯和生长素等植物激素的代谢可显著地改良作物的株型结构和产量构成, 从而大幅度提高作物产量和品质^[3, 4]。因此, 国家自然科学基金委员会按照国家粮食发展需要、中长期科学和技术发展规划以及我国在植物激素研究方面所具有的知识积累和坚实的工作基础, 在1997年启动了“植物激素作用的分子机理”重大研究计划, 其中“植物激素成分分析、超微量检测 and 原位检测”成为该重大研究计划中的六个核

心科学问题之一^[5]。

植物激素主要包括生长素(auxin)、赤霉素(gibberellin, GA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、油菜素甾醇类(brassinosteroids, BRs)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)及其甲酯(MeJA)、水杨酸类(salicylic acids, SA)、乙烯(ethylene)和多肽激素(peptide hormones)等, 它们在植物体内的含量极低(通常在 ng/g, 甚至 pg/g 水平上), 且周围共存的基体成分非常复杂, 几乎不可能同时分析所有植物激素^[6, 7]。此外, 多数植物激素的性质不稳定, 对温度等外界条件敏感, 在各器官中呈现一定的动态分布。因此, 如何精确可靠地对超微量的植物激

收稿日期: 2009-08-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(90717002; 20805001)

* 通讯作者: E-mail: yu.bai@pku.edu.cn

素进行定性和定量分析,如何准确、实时、原位在线检测激素在植物体各部位的分布及转运,如何准确、快速鉴定新型激素的分子结构,已成为目前植物激素作用机理研究中的瓶颈问题之一,严重制约了我国植物科学研究领域在植物激素代谢、转运和信号转导等方面的研究进展。正如许智宏院士和李家洋院士所指出^[1]:虽然分析鉴定植物激素成分和含量有一定的难度,尤其是油菜素内酯、赤霉素和细胞分裂素的超微量分析,在国际上也仅有少数实验室具备相关的设施与技术手段,但目前我国在这方面的研究却仍是空白,国内几家实验室在研究激素代谢和信号转导途径中所涉及的相关激素的超微量分析还主要依赖于国外实验室,制约了研究的深入和研究进度。

近年来,随着分离与分析新技术和新方法的发展以及植物激素作用机理研究的迫切需要,我国科研工作者在植物激素分析与测试技术方面做了很多重要的工作并建立了一些相关的分析检测方法,大大提高了植物激素分析检测的水平。关于植物激素检测技术,前几年国内已有一些综述^[7-9],本课题组也曾对细胞分裂素的相关分析方法进行了总结^[10],因此本文仅就近年来国内外在茉莉酸及其甲酯、脱落酸、生长素、赤霉素和多肽激素等植物激素分析检测技术的最新发展及应用情况进行综述,并就目前面临的挑战和进一步发展的方向进行了简要的讨论。

2 主要分析技术

生物鉴定法是一类经典的植物激素检测方法,它利用激素作用于植物的组织或器官时产生的特异性反应对植物激素进行测定^[6,10]。1928年,Went首先将这种方法运用于生长素的测定,利用生长素能使燕麦胚芽鞘弯曲的特性来测定生长素浓度。生物鉴定法虽然简便,但对样品纯度要求较高,需要复杂的样品前处理过程来实现,同时由于其专一性和重复性较差,因而这种方法的应用逐渐减少。

免疫检测技术是测定植物激素的常用方法。该方法是基于抗原和抗体的特异性结合,因此有较好的专一性。采用放射性元素标记的方法,即放射免疫分析(radioimmunoassay,RIA)^[11],其检测灵敏度高,重复性好,但对实验条件的要求较高。酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)是一种简单易行并被广泛应用的分析检测技

术^[12-14],其原理主要是将抗原或抗体固定在载体表面,再与酶标记的抗体或抗原进行结合,洗涤除去未结合的部分后进行检测。Maldiney等^[12]在ELISA中引入抗生物素蛋白-生物素复合物体系,测定了生长素、脱落酸和玉米素核苷三种激素,检测限能够达到3~5 pg。此外,免疫传感器也开始用于植物激素的测定^[15,16],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,检测信号利用转换器转换为电信号,从而进行定量检测。免疫检测的方法一来容易受到交叉反应的干扰;二来由于抗体的不通用性以及制备时间较长,使得整个实验周期较长。

近年来,色谱技术的飞速发展使其在植物激素检测中的应用越来越广泛,主要利用各组分在色谱固定相上保留性质的差异实现分离,并根据色谱图中得出样品含量及纯度信息。气相色谱火焰离子化检测法(GC-FID)^[17,18]和气相色谱质谱法(GC-MS)^[18-22]能够对所分析样品进行准确、高灵敏度测量,但由于气相色谱对样品的特殊要求,使得待测组分需具有一定挥发性,因此在植物激素样品的前处理过程中需对样品进行衍生化。高效液相色谱紫外检测法(HPLC-UV)^[23]、高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FL)^[24]和高效液相色谱质谱检测法(HPLC-MS)^[25-32]也大量用于植物激素的纯化及定量分析,其中MS因为具有良好的选择性和灵敏度,并且能够给出化合物的结构信息,在实际检测中得到了更普遍的运用。以MS作检测器时,常采用稳定同位素标记的化合物作为内标,这样既扣除了萃取步骤中样品损失的影响,同时也能排除背景基质干扰,因此使得定量分析结果更为准确。此外,毛细管电泳技术(CE)的样品消耗量少、分离效果好,因而也是分离检测植物激素的有效手段^[33,34],但由于灵敏度和重现性等方面的限制阻碍了其进一步的运用。

另外,目前还有一些其他的分析方法也被用于植物激素的检测,如光谱法^[35]、电化学法^[36]等。本文主要介绍了近年来以色谱法为主的植物激素分析检测技术的研究进展。

3 各类植物激素检测技术现状

3.1 茉莉酸及其甲酯

茉莉酸(JA)是十二碳的环戊烷酮酸,具有多种生物功能,可作为植物在应对外界伤害时产生的抵御信号,如植物在受到昆虫取食或非生物胁迫等伤

害时, 植株内茉莉酸含量就会增多。Zadra 等^[37]测定了番茄在经臭氧刺激后, 其茉莉酸含量的变化情况。实验中首先将茉莉酸衍生为具有一定挥发性的茉莉酸甲酯, 然后采用顶空固相微萃取(HS-SPME)-GC-FID/MS 进行检测, 发现在停止臭氧熏蒸后 9 h, 番茄叶中检测到的茉莉酸的量最高, 增加了 13 倍。该方法快速简单, 消耗的植物原料少, 灵敏度高, 检测限可达 2 ng/g, 对正常植物产生的茉莉酸甲酯含量也可利用此方法进行测定。

Matsuura 等^[38]建立了利用 UPLC-MS/MS MRM (multiple reaction monitoring) 方式同时测定植物内源的茉莉酸、水杨酸及其相关化合物的方法。采用氘代化合物作为内标进行定量, 无需对目标化合物进行其他修饰, 尤其对相关化合物如水杨酸葡萄糖苷 (salicylic acid glucoside, SAG) 和块茎酸葡萄糖苷 (tuberonic acid glucoside, TAG) 等的直接测定, 与传统的分析方法相比大大节省了分析时间。由于 SAG、TAG 等化合物在植物体内的累积会对茉莉酸和水杨酸含量有一定影响, 通过测定这些相关化合物的含量能够给出更多关于茉莉酸和水杨酸的信息, 因此对其进行同时测定也具有重要的意义。

此外, CE 技术也被用于茉莉酸的分析检测。Zhang 等^[39]利用 5-溴甲基荧光素(5-bromomethylfluorescein, 5-BMF) 作为荧光衍生剂, 通过柱前衍生的方式标记茉莉酸, 采用 CZE-LIF 分析模式, 检测了橡胶树皮提取物中的茉莉酸含量, 并研究了外加损伤情况下和正常生长树皮中茉莉酸含量的变化。实验结果表明受到损伤的样品中茉莉酸含量比正常生长样品中高近 5 倍, 这一结果与茉莉酸的生物功能是一致的。该方法的衍生检测限为 5×10^{-7} mol/L, 柱上检测灵敏度为 2 nmol/L。

Flores 等^[40]将在线 RPLC-GC 联用技术应用于茉莉酸甲酯的分析检测中。LC-GC 的主要优点在于能够将含有分析对象的样品馏分从 LC 全部转移至 GC, 而不需要借助其他离线手段从复杂基质里分离目标化合物, 简化了样品制备过程, 同时避免了样品损失, 提高了检测灵敏度。LC-GC 间采用炉转移吸附-解吸接口(through oven transfer adsorption-desorption, TOTAD)^[41], 能够实现从 LC 到 GC 间组分转移、去溶剂化等过程的在线自动化操作。该方法能够方便、快速地对商品化的茉莉香精中茉莉酸甲酯进行检测, 检测限可达 0.01 mg/L。

Ruiz del Castillo 和 Blanch^[42]用固相微萃取

(SPME)-GC-MS 联用技术分离检测茉莉酸甲酯的两种异构体: (-)-(3R,7R)- 和 (+)-(3S,7S)-, 并对五种茉莉属植物叶、三种迷迭香叶和多种商品化的茉莉、迷迭香香料样品进行了分析比较。发现在茉莉属植物中存在一定范围的对映体过量(13%~95%), 而在所有迷迭香样品中只存在纯的(-)-茉莉酸甲酯异构体。另外, 在香料样品中不同的对映体过量情况能够反映出生产工艺中是否有外添加的情况。

Blanch 等^[43]利用 HPLC 分离了茉莉酸甲酯的四种手性异构体, 实验采用全甲基化的 β 环糊精手性柱(Nucleodex- β -PM column), 当流动相甲醇(含 0.1% 乙酸三乙铵)和水的比例为 55:45 时, 四种异构体能够得到较好的分离。该方法无需其他柱前衍生步骤即可直接借助 HPLC 对四种化合物进行分离检测, 方便快捷, 通过组分收集可以得到纯的(-)-和(+)-茉莉酸甲酯, 提供了一种制备光学纯茉莉酸甲酯的简单方法。

3.2 脱落酸

脱落酸(ABA)是一类单环倍半萜化合物, 能够调节植物种子萌发、气孔闭合等生理过程, 并且与许多胁迫诱导的基因控制表达有关, 从而调节植物适应干旱、盐度、寒冷等环境胁迫^[44]。因此, 通过考查植物体内 ABA 的浓度变化可获得关于 ABA 生物合成和降解路径的信息, 以及各种生理条件、外界环境变化等因素对植物的影响。

Vilaró 等^[44]用 LC-ESI-MS 在选择离子检测(selected ion monitoring, SIM)模式下测定了不同灌溉情况下葡萄叶中的 ABA 含量, 采用氘代 ABA 作为内标, 检测限可达 0.2 nmol/g(以干重计)。López-Carbonell 等^[45]运用 LC-ESI-MS/MS MRM 的方法测定了微白岩蔷薇中脱落酸(ABA)及其主要的葡萄糖偶联物-脱落酸葡萄糖酯(ABA-GE)浓度。该方法在萃取样品前加入一定量的氘代内标化合物, 经过简单的萃取、离心等处理, 样品便可用于 LC 分析, 得到的色谱图简单, 易于分析, 其中 ABA 的检测限可达 1.4 ng/g(以湿重计)。该方法分析了地中海气候条件下生长的微白岩蔷薇一年内其 ABA 与 ABA-GE 的含量变化, 结果表明内源 ABA 的合成至少在一定程度上是同 ABA-GE 的分解有关联的。

免疫亲和色谱技术也被用于脱落酸的高灵敏检测。Hradecká 等^[46]制备了对 C1 固定的(+)-顺, 反-脱落酸有较高选择性的多克隆抗体, 将其做成免疫亲和凝胶柱, 与 LC-ESI-MS 结合用于烟草叶中的

ABA分析。免疫亲和柱的优势在于能够快速纯化、富集样品,由于其较高的选择性,大大降低了复杂基质的影响,简化了被分析样品的成分,使得经LC分析得到的谱图更简单、更易辨认,灵敏度提高了十几倍。实验中通过对缺水烟草和正常生长的烟草的对比分析,发现在缺水条件下内源的ABA含量是正常情况的5~7倍,其值在缺水24 h时达到极值,这一结果与ABA能够调节干旱胁迫的生物功能是相一致的。

此外,CE也用于对ABA的分析测定。Liu等^[47]发展了CE-LIF测定烟草叶中ABA的方法。实验采用8-氨基苊-1,3,6-三磺酸盐(APTS)作为荧光衍生剂,在乙酸和氰基硼氢化钠存在条件下,与ABA的羰基反应形成具有荧光的APTS-ABA衍生物,用毛细管区带电泳(CZE)-LIF进行分析检测。该方法样品处理过程简单,衍生检测限为 2.8×10^{-8} mol/L,柱上检测灵敏度可达1.1 nmol/L,足够用于检测实际植物内的痕量ABA。

3.3 生长素

生长素是最先被发现的一类植物激素,主要由吲哚衍生物构成,是主要的植物生长调节因子,能够调节细胞的分裂、伸长和分化。

Lu等^[48]利用LC-ESI-离子阱质谱(ITMS)同时测定了四种生长素:内源性的吲哚-3-乙酸(IAA)、吲哚-3-丁酸(IBA)和外源性的吲哚-3-丙酸(IPA)、1-萘乙酸(NAA)。该四种化合物在7 min内出峰并实现基线分离,方法的检测限达8.0 ng/mL。Rolèik等^[49]利用固相萃取(SPE)技术提取和纯化植物叶中IAA,并优化了相关的实验条件。实验过程中分两步使用C18-SPE柱,第一步将粗提溶液过柱除去叶绿素和其他残渣,然后在稀释的洗脱液中加入甲酸使IAA质子化成中性结构,中性的IAA再次经C18柱保留、甲醇洗脱后进行分析。用氘标记的IAA作标准溶液,闪烁计数测量IAA在不同洗脱强度下的保留情况,从而优化洗脱液成分。纯化后的样品再经甲基化衍生后用GC-MS测定IAA含量。采用该方法测定了天竺葵属植物叶中的IAA,其含量为84 ng/g(以湿重计)。

Dobrev等^[50]发展了二维液相技术分离测定生长素的方法。经过SPE处理后的样品进入第一维进行初步分离后,采用“中心切割(heart cutting)”的方法,将第一维的部分组分引入第二维进行再次分离,使分离纯化效果明显提高,即使不采用质谱检

测的选择离子检测模式,而利用选择检测性不高的紫外或荧光检测器时,得到的分离效果依然令人满意,用荧光检测器对IAA的检测限可达0.4 pmol。

3.4 赤霉素

赤霉素(GA)是一类四环二萜羧酸化合物,能够调节影响植物的生长发育,如种子萌发、茎的伸长、叶的伸展和开花等过程。Taylor等^[51]利用GC-MS分析了在短日照草莓叶分泌物中GA的含量情况,通过与标准品对比全谱扫描和Kovats保留指数结果,发现其中存在GA₁、GA₃、3-epi GA₁和GA₃-异内酯。

Ge等^[52]发展了一种CE-MS的方法,利用阳离子聚合物涂层的毛细管分离了11种GA(GA₁、GA₃、GA₄、GA₅、GA₆、GA₇、GA₁₃、GA₁₉、GA₂₀、GA₂₄和GA₃₃)的混合液,在25 min内实现基线分离,对11种化合物的检出限达亚微摩尔浓度,在实际样品椰汁的分析中检出了GA₁和GA₃。实验中用SPE处理样品时,采用同时具有反相和阴离子交换性质的混合型吸附材料,有较好的纯化效果,回收率可达95%。随后,他们又进一步发展了部分填充(PF)-胶束电动色谱(MEK-CE)-质谱(MS)方法^[53],添加阳离子表面活性剂十六烷基三甲基铵,分离了八种GA混合物,检测限仍为亚微摩尔浓度级别,同样在椰汁中检出了GA₁和GA₃。

3.5 多肽激素

长期以来,人们认为植物细胞间的信号转导主要是由生长素、脱落酸、茉莉酸、细胞分裂素、赤霉素、油菜素内酯等亲脂小分子完成的,因而将它们作为经典的植物激素;但近二十年来的研究表明,一些植物多肽同样参与了植物生长发育的调控,同样能够作为被传递的信号,行使激素的功能。对于植物多肽激素的认识还在进一步的深入中,多肽激素的种类也在逐渐增加,较公认的多肽激素有系统素、植物硫肽素、SCR/SP11、CLV3和快速碱化因子等^[54-56]。

系统素是一类研究得相对较多的多肽激素,含有18个氨基酸,是系统性防御反应的信号分子,当植物受到伤害时诱导产生防卫性蛋白^[57]。1991年,Pearce等^[58]从番茄叶中首次分离鉴定出系统素,实验中取2 kg番茄叶,经过匀浆、凝胶过滤及反复多次的C18反相柱和强阳离子交换柱纯化,得到近1 μg较纯的系统素,其氨基酸序列为AVQSKPPSKR-DPPKMQTD。

Mucha等^[59]发展了用CE检测系统素纯化效果的方法,以合成的系统素作为标准物,追踪各个色谱步骤中内源系统素的提纯效果。实验中利用简单的毛细管区带电泳(CZE)模式便可以较好的将系统素分离,用于分析经过各个提纯步骤后的样品,从而判断系统素的纯度情况。

3.6 多种激素同时测定

由于各类植物激素在植物体内同时存在,它们在调控植物的各种生理过程中具有协同作用,因此,同时准确测定多类植物激素对研究植物激素的作用机理非常重要。

Schmelz等^[6]采用GC-MS方法同时测定了玉米、烟草、番茄和拟南芥等植物中的JA、IAA、ABA及其相应的甲酯,并研究了环境胁迫条件下植物体内各激素含量的变化情况及其对植物体挥发性物质的影响。Zhang等^[60]利用GC-MS方法分析了五角枫、白蜡槭和玉米中JA、ABA和IAA的含量。实验中以氘代或¹³C标记的化合物为内标,只需少量植物组织样品,便可实现对三种化合物的检测,其检测限分别为10 ng/g(JA)、5 ng/g(ABA)和3 ng/g(IAA)。

Hou等^[61]利用LC-MS/MS方法同时测定了小麦叶中GA₃、IAA和ABA的含量。经过SPE预处理的样品在C18的反相色谱柱上等梯度洗脱,三种激素在7 min内实现分离,利用ESI源的线性离子阱质谱进行了检测,采用苯甲酸作为内标化合物,线性范围在5~200 μg/mL(IAA)和0.005~10 μg/mL(GA₃、ABA),对GA₃、IAA和ABA的检测限分别为0.005 μg/mL、2 μg/mL和0.003 μg/mL。

Pan等^[62]用LC-ESI-MS/MS的方法同时测定了生长素、细胞分裂素、脱落酸、赤霉素、茉莉酸、水杨酸和相关的甲酯类化合物。将少量拟南芥叶匀浆后经液液萃取后进行分析,用杂化三重四级杆-线性离子阱质谱仪的MRM模式,以氘代化合物为内标,测定了粗提物中的各种激素及相关代谢物的含量,对于JA、MeJA、SA和ABA等四种植物激素,该方法的定量限能达到0.01~0.1 pg/g(以湿重计)。

加压毛细管电色谱(pCEC)也被用于多种植物激素的同时检测。Wang等^[63]采用硅胶C18整体柱,以紫外吸收的检测方式分离了玉米素(ZT)、GA₃、IAA和ABA四种激素的混合物。由于毛细管的进样量少,检测光程短,因而需要借助富集技术提高检

测灵敏度。实验中采取溶剂梯度区带增强和场强放大样品堆积两种富集技术,将样品富集了9~23倍,使最终的检测限能达到亚10⁻⁶级别,成功从玉米样品中测出IAA的含量。

表1中列出了近年来用色谱法分析检测各类植物激素的简要情况。

4 总结展望

总体而言,近几年来随着检测仪器的不断推陈出新,各类植物激素的分析检测方法已得到了很快的发展,一定程度上也促进了植物激素作用机理的研究,但在植物激素超微量、高灵敏、原位、瞬时、动态分析方法和高效分离与预富集技术等方面仍然面临诸多的难题,尤其是在实现原位实时动态的检测方面更面临严峻的挑战。基于目前分析检测植物激素所存在的问题和面临的困境,笔者认为今后应当继续在如下几方面开展深入的研究:

(1)进一步将现有的高效分离与预富集技术有机的结合,发展和完善新的技术,以期实现同类植物激素的在线富集与分析检测,并进一步实现不同类型植物激素的同时分析检测。植物激素在植物体内含量甚微,因而发展高效、快速和简便的分离与富集技术对于准确定量分析植物激素以及进一步探讨植物激素的作用机理等都是至关重要的,如采用固相微萃取、液-液-液微萃取、分子印记技术和免疫亲和色谱等选择性的分离和富集方法,同时与LC-MS/MS等高灵敏定量技术联用,有效地实现各类植物激素的准确分析。

(2)发展超微量、高灵敏的准确定量方法,发现新的植物激素,尤其是一些新的多肽植物激素等。植物激素的种类很多,不同的结构对植物的生命活动产生不同的调控作用,由于仪器检测灵敏度的限制,可能一些含量过低但在植物生命活动中起重要作用的激素尚未被发现。尤其是对研究得相对较晚的多肽类植物激素的发现。因此,随着分析和检测方法的不断完善,通过采用新的超微量、高灵敏的准确定量方法,进一步发现新的植物激素,完善和丰富植物激素的种类。

(3)发展新的动态检测技术,实现亚细胞水平上和复杂基体成分中痕量植物激素的原位实时检测,促进植物激素作用机理的研究。将免疫标记技术和分子成像技术结合,可对植物体中的植物激素进行原位实时动态研究,但此过程中需要通过特异

表1 近年植物激素的色谱检测方法概况

时间	样品	主要预处理方法	分析激素	检测方法
2002 ^[21]	拟南芥	固相萃取	SA、JA、IAA、ABA	GC-MS/MS
2002 ^[33]	烟草花	液液萃取	ABA、IAA、GA	CE-UV
2002 ^[28]	柑橘叶	直接萃取	ABA	LC-ESI-MS/MS
2003 ^[25]	莴苣	固相萃取	ABA、ABA-GE、PA、DPA、IAA、IAAsp、Z、ZR、IPA、GA ₁ 、GA ₃ 、GA ₄ 、GA ₇	LC-ESI-MS/MS
2003 ^[18]	拟南芥	顶空-固相微萃取	MeJA	GC-FID, GC-MS
2003 ^[19]	烟草根、拟南芥	直接萃取	IAA、JA、SA、ABA、Z	GC-MS
2003 ^[32]	拟南芥	直接萃取	ABA、ABA-GE	LC-ESI-MS/MS
2003 ^[47]	烟草叶	直接萃取	ABA	CE-LIF
2004 ^[31]	拟南芥、加州白松、甘蓝型油菜	固相萃取	ABA	LC-ESI-MS/MS
2005 ^[26]	柑橘、大麦、番木瓜	液相萃取	IAA、ABA、JA	LC-ESI-MS/MS
2005 ^[49]	天竺葵属植物	固相萃取	IAA	GC-MS
2005 ^[50]	春小麦、烟草叶、拟南芥	固相萃取	IAA、ABA	2D-HPLC
2005 ^[39]	橡胶树皮	直接萃取	JA	CE-LIF
2006 ^[44]	葡萄叶	直接萃取	ABA	LC-ESI-MS
2006 ^[37]	番茄	顶空-固相微萃取	JA	GC-FID, GC-MS
2007 ^[52]	椰汁	固相萃取	GA ₁ 、GA ₃ 、GA ₄ 、GA ₅ 、GA ₆ 、GA ₇ 、GA ₁₃ 、GA ₁₉ 、GA ₂₀ 、GA ₅₃ 、GA ₂₄	CE-MS
2007 ^[46]	烟草叶	免疫亲和柱纯化	ABA、MeABA	LC-ESI-MS
2007 ^[23]	芭蕉	固相微萃取	IAA、ABA、IBA	LC-UV
2008 ^[29]	椰汁	固相萃取	IAA、IBA、ABA、GA、Z、BA、NAA、2,4-D	LC-ESI-MS/MS
2008 ^[40]	茉莉香精	稀释	MeJA	RPLC-TOTAD-GC
2008 ^[53]	椰汁	固相萃取	GA ₁ 、GA ₃ 、GA ₅ 、GA ₆ 、GA ₇ 、GA ₉ 、GA ₁₂ 、GA ₁₃	CE-MS
2008 ^[60]	五角枫、白蜡槭、玉米	固相萃取	JA、ABA、IAA	GC-MS
2008 ^[62]	拟南芥	液液萃取	JA、MeJA、SA、ABA、IAA、IBA、ICA、GA ₃ 、GA ₄ 、Z	LC-ESI-MS/MS
2008 ^[62]	小麦	固相萃取	GA ₃ 、IAA、ABA	LC-ESI-MS/MS
2008 ^[63]	玉米	直接萃取	ZT、GA ₃ 、IAA、ABA	CEC-UV
2008 ^[48]	白菜	液液萃取	IAA、IPA、IBA、NAA	LC-ESI-MS
2009 ^[38]	烟草叶	固相萃取	JA、SA及相关化合物	UPLC-MS/MS
2009 ^[45]	微白岩蔷薇	直接萃取	ABA、ABA-GE	LC-ESI-MS/MS

性和稳定性的免疫标记来实现。将免疫技术与微流控芯片技术结合,在亚细胞水平上实现高通量的在线实时检测。另一方面,发展新的标记和成像分析技术,将植物激素的原位实时定性与定量技术相结合。从现有的方法和仪器条件以及目前的研究结果来看,实现原位实时的定量分析还需要一段较长时

间的探索过程。考虑到量子点独特的荧光特性,量子点免疫标记技术与荧光成像技术的发展为植物激素的原位实时动态检测提供新的思路。

总之,建立植物激素新的超微量、高灵敏、原位、瞬时、动态分析方法和高效分离与预富集技术,建立亚细胞水平上和复杂基体成分中痕量植物

激素的分离与分析的新技术和新方法,仍是分析学科研究者们面临的挑战。随着新技术新仪器的发展以及不断完善的分离富集方法,植物激素的分离检测技术也会不断改进和完善。我们相信,经过相关研究领域科研工作者的合作,目前在植物激素分析检测技术中所面临的困难将会不断被解决,新的分析检测方法的出现和建立将会在深入认识植物激素的分布、转运及信号转导方面以及研究植物激素分子作用机理方面发挥重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] 许智宏,李家洋. 中国植物激素研究:过去、现在和未来. 植物学通报, 2006, 23(5): 433-42
- [2] López MA, Bannenberg G, Castresana C. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(4): 420-7
- [3] Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 2005(5735), 309: 741-5
- [4] Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, et al. Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(1): 105-9
- [5] 谷瑞升,杜生明. 国家自然科学基金委员会启动“植物激素作用的分子机理”重大研究计划促进我国植物激素研究的跨越发展. *生命科学*, 2007, 19(3): 251-3
- [6] Schmelz EA, Engelberth J, Alborn HT, et al. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10552-7
- [7] 李雨薇,肖浪涛. 植物激素检测技术的现状和发展. *生命科学仪器*, 2007, 5(12): 10-4
- [8] 李素梅,张自立,姚彦如. 植物激素检测技术的研究进展. *安徽农业大学学报*, 2003, 30(2): 227-30
- [9] 李亚男,陈大清. 近年植物激素检测技术的发展与展望. *湖北农学院学报*, 1996, 16(1): 67-74
- [10] 梁渊,赵美萍,刘虎威. 细胞分裂素分析检测方法的研究进展. *分析化学*, 2009, 37(8):1232-9
- [11] Weiler EW. Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic-acid. *Planta*, 1979, 144(3): 255-63
- [12] Maldiney R, Leroux B, Sabbagh I, et al. Biotin-avidin-based enzyme-immunoassay to quantify 3 phytohormones - auxin, abscisic-acid and zeatin-riboside. *J Immunol Methods*, 1986, 90(2): 151-8
- [13] Pence VC, Caruso JL. Elisa determination of IAA using antibodies against ring-linked IAA. *Phytochemistry*, 1987, 26(5): 1251-5
- [14] Gómez-Cadenas A, Tadeo FR, Talón M, et al. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol*, 1996, 112(1): 401-8
- [15] Li J, Wu ZY, Xiao LT, et al. A novel piezoelectric biosensor for the detection of phytohormone β -indole acetic acid. *Anal Sci*, 2002, 18(4): 403-7
- [16] Li J, Xiao LT, Zeng GM, et al. A renewable amperometric immunosensor for phytohormone β -indole acetic acid assay. *Anal Chim Acta*, 2003, 494(1-2): 177-85
- [17] Du LM, Xu QQ, Fan ZF. Direct determination of plant growth regulators by gas chromatography on wide bore capillary column. *Chin J Anal Chem*, 2000, 28(9): 1114-7
- [18] Meyer R, Rautenbach GF, Dubery IA. Identification and quantification of methyl jasmonate in leaf volatiles of *Arabidopsis thaliana* using solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 2003, 14(3): 155-9
- [19] 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(1-2): 89-102
- [20] Else MA, Tiekstra AE, Croker SJ, et al. Stomatal closure in flooded tomato plants involves abscisic acid and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. *Plant Physiol*, 1996, 112(1): 239-47
- [21] Müller A, Düchting P, Weiler EW. 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(1): 44-56
- [22] Netting AG, Milborrow BV, Duffield AM. Determination of abscisic-acid in eucalyptus-haemastoma leaves using gas-chromatography mass-spectrometry and deuterated internal standards. *Phytochemistry*, 1982, 21(2): 385-9
- [23] Liu HT, Li YF, Luan TG, et al. Simultaneous determination of phytohormones in plant extracts using SPME and HPLC. *Chromatographia*, 2007, 66(7-8): 515-20
- [24] Crozier A, Loferski K, Zaerr JB, et al. Analysis of picogram quantities of indole-3-acetic-acid by high-performance liquid chromatography-fluorescence procedures. *Planta*, 1980, 150(5): 366-70
- [25] Chiwocha SDS, Abrams SR, Ambrose SJ, et al. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J*, 2003, 35(3): 405-17
- [26] Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, et al. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(22): 8437-42
- [27] Fletcher AT, Mader JC. Hormone profiling by LC-QToF-MS/MS in dormant *Macadamia integrifolia*: correlations with abnormal vertical growth. *J Plant Growth Regul*, 2007, 26(4): 351-61
- [28] Gómez-Cadenas A, Pozo OJ, García-Augustín P, et al. Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray/tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 2002, 13(4): 228-34
- [29] Ma Z, Ge L, Lee ASY, 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. *Anal Chim Acta*, 2008, 610(2): 274-81
- [30] Prinsen E, Van Dongen W, Esmans EL, et al. Micro and capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research. *J Chromatogr A*, 1998, 826(1): 25-37
- [31] Ross ARS, Ambrose SJ, Cutler AJ, 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(2): 324-33
- [32] Zhou R, Squires TM, Ambrose SJ, et al. Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2003, 1010(1): 75-85
- [33] Liu BF, Zhong XH, Lu YT. 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(1-2): 257-65
- [34] Jiang TF, Lv ZH, Wang YH, et al. Separation of plant hormones from biofertilizer by capillary electrophoresis using a capillary coated dynamically with polycationic polymers. *Anal Sci*, 2006, 22(6): 811-4
- [35] 薛泉宏, 李东, 汤莉. 赤霉素荧光测定法改进研究. *西北农业大学学报*, 2000, 28(4): 34-9
- [36] de Toledo RA, Vaz CMP. Use of a graphite-polyurethane composite electrode for electroanalytical determination of indole-3-acetic acid in soil samples. *Microchem J*, 2007, 86(2): 161-5
- [37] Zadra C, Borgogni A, Marucchini C. Quantification of jasmonic acid by SPME in tomato plants stressed by ozone. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(25): 9317-21
- [38] Matsuura H, Aoi A, Satou C, et al. Simultaneous UPLC MS/MS analysis of endogenous jasmonic acid, salicylic acid, and their related compounds. *Plant Growth Regul*, 2009, 57(3): 293-301
- [39] Zhang ZL, Liu X, Li DF, et al. Determination of jasmonic acid in bark extracts from *Hevea brasiliensis* by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382(7): 1616-9
- [40] Flores G, Blanch GP, Ruiz del Castillo ML. Through oven transfer adsorption-desorption interface for the analysis of methyl jasmonate in aromatic samples by on-line RPLC-GC. *J Sep Sci*, 2008, 31(6-7): 1207-14
- [41] Perez M, Alario J, Vazquez A, et al. On-line reversed phase LC-GC by using the new TOTAD (through oven transfer adsorption desorption) interface: application to parathion residue analysis. *J Microcolumn Sep*, 1999, 11(8): 582-9
- [42] Ruiz del Castillo ML, Blanch GP. Enantiomeric purity of (+/-)-methyl jasmonate in fresh leaf samples and commercial fragrances. *J Sep Sci*, 2007, 30(13): 2117-22
- [43] Blanch GP, Flores G, Caja MD, et al. Enantioselective isolation of methyl jasmonate using permethyl- β -cyclodextrin HPLC. *J Sep Sci*, 2009, 32(2): 180-4
- [44] 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(2): 306-12
- [45] López-Carbonell M, Gabasa M, Jáuregui O. Enhanced determination of abscisic acid (ABA) and abscisic acid glucose ester (ABA-GE) in *Cistus albidus* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47(4): 256-61
- [46] Hradecká V, Novák O, Havlíček L, et al. Immunoaffinity chromatography of abscisic acid combined with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2007, 847(2): 162-73
- [47] Liu X, Ma L, Lin YW. Determination of abscisic acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2003, 1021(1-2): 209-13
- [48] Lu QM, Zhang L, Chen TW, et al. Identification and quantitation of auxins in plants by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(16): 2565-72
- [49] Rolèik J, Řečinská J, Barták P, et al. Purification of 3-indolylacetic acid by solid phase extraction. *J Sep Sci*, 2005, 28(12): 1370-4
- [50] Dobrev PI, 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(1-2): 159-66
- [51] Taylor DR, Blake PS, Crisp CM. Identification of gibberellins in leaf exudates of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Growth Regul*, 2000, 30(3): 221-3
- [52] Ge LY, Peh CYC, Yong JWH, et al. Analyses of gibberellins by capillary electrophoresis-mass spectrometry combined with solid-phase extraction. *J Chromatogr A*, 2007, 1159(1-2): 242-9
- [53] Ge LY, Yong JWH, Tan SN, et al. Analyses of gibberellins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry with reversal of electroosmotic flow. *Electrophoresis*, 2008, 29(10): 2126-34
- [54] Matsubayashi Y, Sakagami Y. Peptide hormones in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 649-74
- [55] Bahyrycz A, Konopinska D. Plant signalling peptides: some recent developments. *J Pept Sci*, 2007, 13(12): 787-97
- [56] 蒋细兵, 余迪求. 植物多肽激素研究概况. *云南植物研究*, 2008, 30(3): 333-9
- [57] 谢永红, 丁志祥, 欧毅, 等. 植物系统素研究进展. *西南园艺*, 2006, 34(1): 45-9
- [58] Pearce G, Strydom D, Johnson S, et al. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible inhibitor proteins. *Science*, 1991, 253(5022): 895-8
- [59] Mucha P, Rekowski P, Kupryszewski G, et al. Monitoring of the purification of systemin by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1996, 734(2): 410-5
- [60] Zhang FJ, Jin YJ, Xu XY, 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(6): 560-7
- [61] Hou SJ, Zhu J, Ding MY, 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(4): 798-802
- [62] Pan XQ, Welti R, Wang XM. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 2008, 69(8): 1773-81
- [63] Wang SJ, Jia L, Xing D, et al. On-line concentration and pressurized capillary electrochromatographic analysis of phytohormones in corn. *J Sep Sci*, 2008, 31(5): 859-64