

文章编号 :1004-0374(2010)01-0045-14

茉莉酸类植物激素分析研究进展

王芳, 陈子林*

(武汉大学药学院 药物分析与筛选研究所, 武汉 430072)

摘要: 以茉莉酸(jasmonic acid, JA)和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)为代表的茉莉酸类物质(jasmonates, JAs)是一种新型天然植物生长调节剂,具有广谱的生理效应,存在于多种高等植物体内。内源茉莉酸类激素通常以多种手性异构体存在,且含量超微(约为 ng/g 鲜重),因此,对内源性茉莉酸类激素进行准确的定性、定量分析具有很大的难度,研究高效分离富集、高灵敏度检测以及分离与检测联用等分析方法,对加速植物激素分子作用机理研究具有重大意义。该文就 JAs(含其衍生物及手性异构体)的分离与检测技术进行了综述,包括各种色谱、色谱与质谱联用技术、毛细管电泳技术、免疫分析等各种方法,并展望了 JAs 分析方法未来的发展趋势。

关键词: 茉莉酸类物质; 色谱; 色质联用; 毛细管电泳; 免疫分析; 分离与检测

中图分类号: Q946; Q94-334 文献标识码: A

Advance in the analysis of plant hormone jasmonates

WANG Fang, CHEN Zi-lin*

(Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Jasmonic acid (JA) and methyl jasmonate (MeJA) have been recognized as a new type of natural plant growth regulator and exist in the plant kingdom at very low concentration. JAs have a very wide range of physiological activities. As endogenous jasmonates exist in enantiomers in nature and at level of nanogram/gram fresh weight, it is very challenging work to develop rapid and accurate method for qualitative and quantitative analyses of JAs. This review paper summarizes the recent advances in the analysis of jasmonates including chromatography, capillary electrophoresis, chromatography-mass spectrometry and immunoassay.

Key words: jasmonates (JAs); chromatography; chromatography-mass spectrometry; capillary electrophoresis; immunoassay; separation and detection

植物激素又称植物天然激素或植物内源激素,是植物体内合成并在植物生命活动的整个过程中起着重要调控作用的微量有机物质。在植物体内,其含量虽然很低,但它几乎参与了调控植物生长发育的每一过程,既包括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而调节植物自身对环境的适应。因此,准确分析植物激素在植物体内的含量分布对研究植物生命活动、作物遗传育种和栽培等具有重要意义,已成为植物生理学领域的重要研究内容。

1 茉莉酸类物质

茉莉酸类物质(jasmonates, JAs)是一种广泛存

在于多种植物体内的新型植物生长调节物质,属环戊烷类化合物。目前已经发现了30多种,其中最具代表性的有茉莉酸(jasmonic acid, JA)和具有挥发特性的茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA),还包括它们的某些氨基酸衍生物、葡萄糖苷和羟化衍生物等。JAs的生理效应非常广泛,包括促进、抑制和诱导等多个方面,故JAs作为生理活性物质,已被第16届国际植物生长会议接受为一类新的植物激素,并已得到国际学术界的公认^[1]。

收稿日期: 2009-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(90817103; 20775055)

* 通讯作者: E-mail: chenzt@whu.edu.cn

1.1 JAs的生物活性

在自然界最早被发现的JAs是MeJA,于1962年从茉莉属素馨花的精油中提取并分离出来^[2]。后来在突尼斯迷迭香中也发现MeJA,被大量用于香水工业,但那时并没有发掘其任何生理作用。1971年,JA作为一种植物生长抑制因子从真菌的培养滤液中被发现^[3],这是JAs具有调控植物生长活性的首次报道。1980年,MeJA作为植物组织促衰老因子被报道^[4],证实JAs在植物生长的过程中具有广泛的生理作用。随后,在许多植物体的各组织中都发现含有JAs,如JAs在生殖器官特别是果实中的含量比营养器官,如茎、芽、叶丰富;生长组织,如茎尖、嫩叶、未成熟的果实及根尖中的JAs活性高。自此之后,关于JA和MeJA及其各种衍生物的报道不断涌现,更多的生物活性与生理功能被揭示和得到证实。

JAs广泛存在于各种植物中,具有多种生物活性,可引起多种形态或生理效应。JAs体内生理功能主要表现为诱导、促进和抑制三大作用,如诱导气孔关闭、块茎形成、卷须形成、逆境蛋白和特异基因表达等;促进器官衰老或者脱落、乙烯生物合成、SOD活性、过氧化物酶活性等;抑制根的生长、种子和花粉萌发、颖花的开放、含羞草叶片运动、叶绿素合成等^[5-11]。

JAs不仅具有类似植物生长调节物质的作用特点,而且已被确认为一种植物防御体系的内源信号分子。JAs既可以在植物体内运输,又具有很强的挥发性,当植物体受到外界环境的胁迫时,可由它们“通知”未受伤部位和邻近植株进入“警戒状态”,产生相应胁迫的应答反应,比如获得对昆虫和病原菌的免疫防卫能力等,从而调控体内JAs和其他相关物质的含量。所以,在植物体对外界环境的应答反应中,包括对昆虫和病原菌、干旱、机械损伤以及氧胁迫反应等,JAs被认为是各种生物和非生物胁迫的调控子^[6-11]。

研究表明,JAs还具有抗癌作用,其中,MeJA最具抗癌活性^[12-15],能抑制多种人体癌细胞增殖和诱导细胞凋亡,包括白血病、皮肤癌、前列腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌等。预示着JAs在抗癌新药的研制及疾病治疗等领域具有很高的应用价值和广阔的发展前景。虽然JAs的生物活性被广泛研究与报道,但随着新的JA和MeJA衍生物或异构体在植物体内的发现,JAs在植物体内可能还存在

一些未被揭示的生理功能。

JAs是迄今发现的惟一能灵敏、快速、有效地诱导水稻颖花开放的一类植物内源激素^[16],其诱导颖花开放机理及其对植物生殖调控理论的阐明是科学家当前的研究热点。国外有关颖花开放机理的研究早期有一些报道,近年很少有新的进展。在我国,王忠华等发现二氧化碳可诱导水稻开颖^[17],并提出了水稻颖花开放的调控模式。曾晓春和周燮等发现茉莉酸甲酯可快速诱导水稻颖花开放^[9,18],且对雄性不育水稻的诱导效应最为明显^[19]。针对内源JA是否参与了颖花自然开放的调控的问题,曾晓春等进行了一定的探索,也获得了一些证据^[20]。尽管如此,但浆片内源JA的含量与颖花开放的直接关系还缺乏强有力的实验证据,其主要原因是缺乏超微量茉莉酸类植物激素的高灵敏度分析方法和实时检测手段。因此,以水稻颖花浆片调控颖花开放为研究体系,对浆片内源激素,尤其是茉莉酸类激素进行高灵敏检测与实时动态分析,是科学家面临的重要课题之一。

1.2 JAs的结构

JAs是一类特殊的环戊烷衍生物,其中大部分含有环戊烷酮结构。从JA和MeJA的结构来看,它们分别有两个手性中心C-3和C-7,存在四种手性异构体,如图1所示。天然存在的(-)-JA,可通过异构作用快速转化为(+)-7-iso-JA,在植物体内两者都拥有很高的活性,含量比例约为1:9^[6]。另外,(+)-epi-MeJA的芳香味要比(-)-MeJA浓烈近400倍,其他两种几乎是没有气味的^[21]。由此可知,JAs的某一个生理功能有可能只和其中某一种手性化合物相关。研究植物组织中各种手性异构体的存在及其含量比例对于研究JAs生物功能具有重大参考价值。

除了JA与MeJA以外的JAs类化合物正在不断被发现,常见的几种化合物结构如图2所示,其中研究较为广泛的为JA氨基酸衍生物,随着其生理功能不断被揭示,建立简便、快速的分析方法对于促进植物激素分子作用机理研究具有非常重要的现实意义。

2 JAs的分离与检测

综上所述,JAs在植物生命活动中发挥着重要的作用,因此,建立快速准确具有高灵敏度的内源性JAs分析方法已成为植物激素研究领域里的研究热点。鉴于JAs在植物组织中的含量非常低,而且

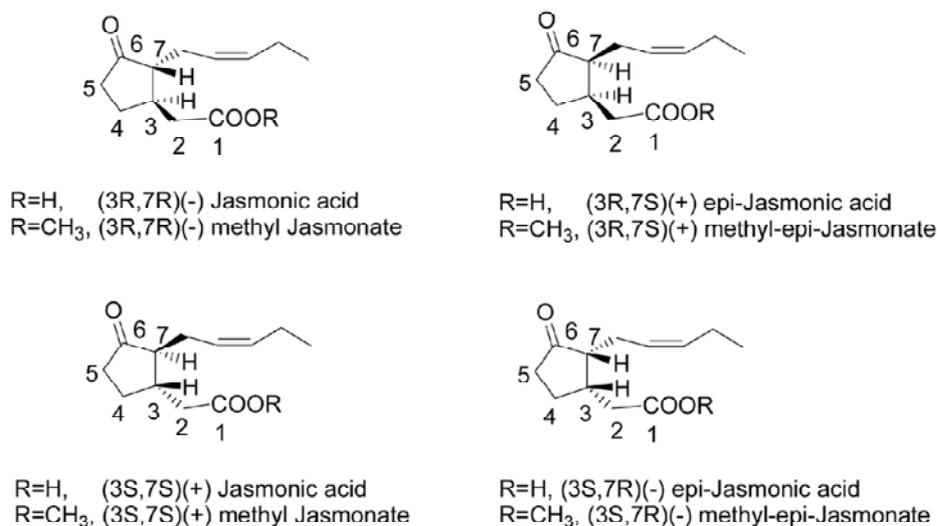


图1 JA与MeJA的结构

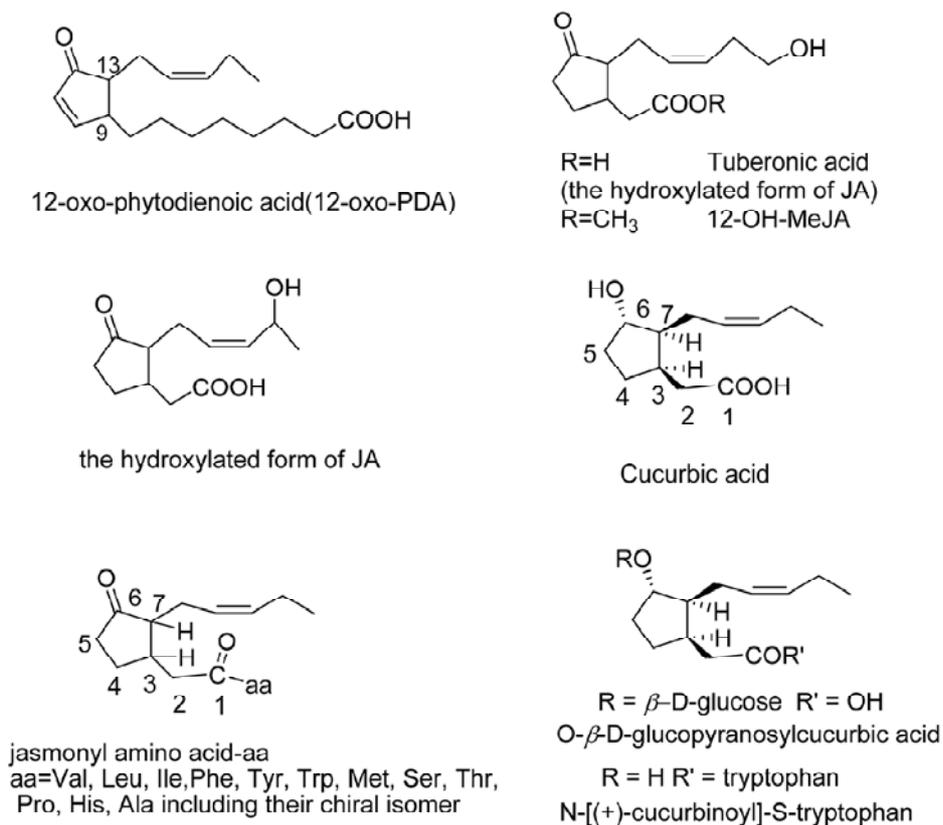


图2 常见JAs化合物的结构

部分JAs具有一定的挥发性,因此,植物组织实际样品中JAs的分离与检测显得非常复杂与困难。随着各种分离与鉴定技术的快速发展,新技术的不断涌现,有望实现JAs的原位快速准确分析。

2.1 GC-MS

气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术是植物激素分析的一种强有力的手段,具有高灵敏度、高分辨率、快速、高效、进样量少等优点,适合于低分

子化合物(相对分子质量 $<1\ 000$)分析,尤其是具有挥发性和热稳定性的化合物。JAs都是小分子有机化合物,且部分化合物具有挥发性,故GC-MS技术是分离检测JAs的有效方法之一^[22]。

实际样品中JAs含量少,且成份复杂,要实现JAs高效分离与准确检测,首先必须进行样品预处理。然后根据不同的分离要求及分析目的建立合适的分析方法。较早的GC及GC-MS技术主要用于JAs或手性单体的鉴定分析^[23-27], Ueda等^[16]对JAs的GC-MS分析进行了相关综述。Mueller等^[28]建立了一个相对优化的样品处理方法,可用于JA常规分析。该方法利用氨基离子交换柱将JA的萃取和相分配及选择性吸附/洗脱一步完成,然后再进行五氟苯的酯化衍生,硅胶柱纯化,最后进行毛细管GC-MS分析。MS选择化学电离方式,负离子检测模式,检测限可达500 fg (2.4 fmol)(S/N 10:1)。该法经进一步改进后进行了JA异构体含量分析,发现经诱导之后植物组织细胞培养过程中能生物合成(3R, 7S)-(+)-7-Iso-JA。2008年,Zhang等^[29]用C18柱代替离子交换柱对0.5 g(鲜重)植物叶片样品进行处理,实现了植物组织样品中吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)及JA的同时检测,该方法便利,耗费很低,易于操作。

萃取是对样品进行预富集处理的常规方法,主要有气相萃取(VPE)^[30-31]和固相微萃取法(SPME)^[32-33]。Engelberth等^[30]报道了使用聚合物吸附剂Super Q采用气相萃取的方法同时分离分析了JA和水杨酸SA,结果如图3所示。该方法装置简单,步骤相对简洁,缩短了样品的预处理时间,灵敏度高,所需实际植物样品为毫克级,采用单离子检测模式,检测限可达500 fg。基于此富集技术,该研究小组建立了多种植物激素、植物毒素及植物体内存在的不稳定有机化合物分析方法^[31]。实验结果显示烟草受损伤后,JA水平增加,而西红柿受干旱胁迫时,JA水平几乎不改变。该方法成功地将GC-MS应用于复杂样品中JAs的直接分析。

SPME是20世纪90年代发展起来的样品前处理与富集技术,有三种常用的萃取模式:直接萃取(direct extraction SPME)、顶空萃取(headspace SPME)和膜保护萃取(membrane-protected SPME)。Meyer等^[32]和Zadra等^[33]分别采用了直接萃取(图4)和顶空萃取的方法对植物组织中的MeJA及JA进行了预富集和GC-MS定量分析。

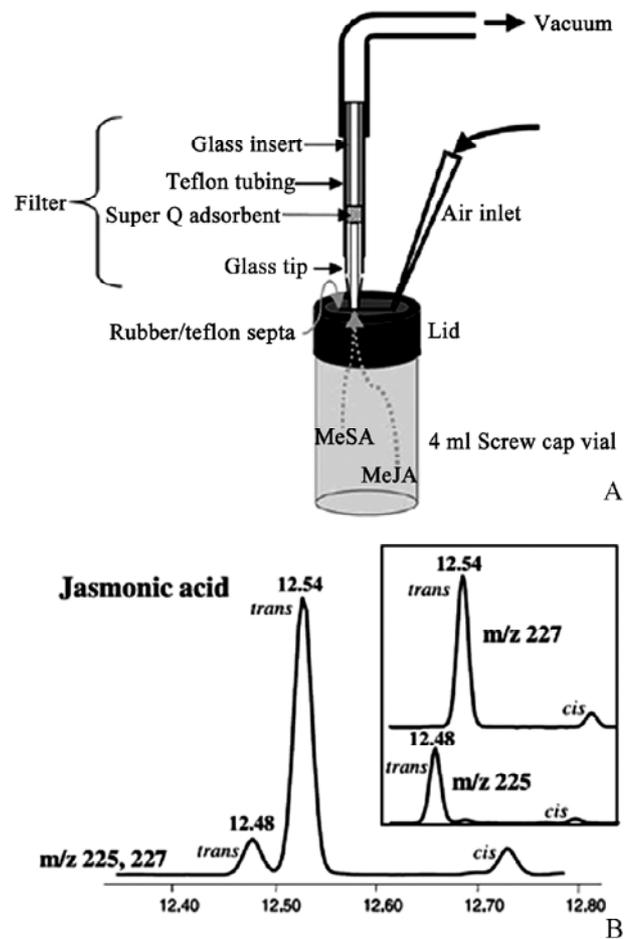


图3^[30]

A: 俘获MeJA的Super Q过滤器装置;

B: GC-MS结果: JA ((m+1)⁺225)和dh-JA ((m+1)⁺227)(其中JA和dh-JA顺反异构体的比例为0.95:0.05)

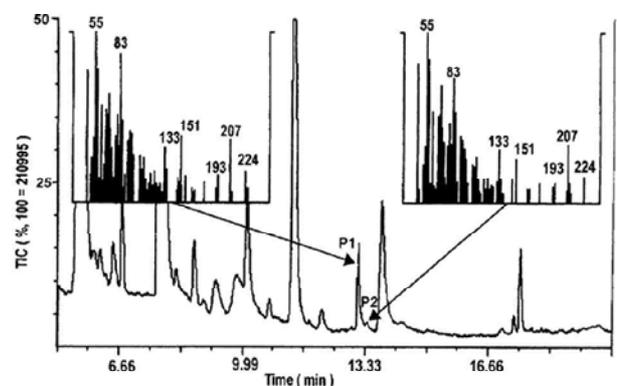


图4 拟南芥叶片受损3 h之后采样分析MeJA总离子流^[32] SPME: 聚二甲硅氧烷固相微萃取柱萃取1 h; GC: 安捷伦DB-1; P1, P2: MeJA异构体。内插图为MS结果。该法检测限可达1.5 ppb(约1.3 ng)

待分析物质的挥发性及热稳定性直接影响 GC 分析的效率, 故可在样品预处理过程中将待分析物质衍生化来改善待分析物质的挥发及热稳定性, 从而提高方法的灵敏度以及准确度。JAs 中绝大部分化合物不具有挥发性, 故在 GC 分析中常常需要将其烷基衍生化或者酯化使其易气化以提高检测的灵敏度。在 JAs 分析中常用的衍生化试剂除了五氟苯以外, 主要有重氮甲烷^[29]、N-(叔丁基二甲基硅)-N-甲基三氟乙酰胺 (MTBSTFA)^[34]及其他^[35]等。样品衍生化处理的复杂过程在一定程度上限制了 GC-MS 技术在 JAs 分析当中的应用; 但是如果衍生化试剂与方法选择适当的话, 可利大于弊, 故开发新的衍生化试剂与方法成为提高灵敏度及准确度的有效手段。

GC-MS 用于 JAs 分析时, MS 大多采用化学电离(CI)的方式。虽然电子轰击(EI)可以给出结构信息, 且有标准谱库作对比分析, 但定量分析结果如

检测限容易被具有相近保留时间的物质或者结构类似的离子碎片干扰, 从而导致分析误差。CI 产生较少碎片离子, 而且表现出非常好的选择性和高的灵敏度, 但不能提供结构信息^[36]。多维气相色谱与质谱的联用(MDGC-MS)^[37]、串联质谱技术(GC-MS/MS)^[38]等等可以提供更多含量及结构相关信息, 故开展新的联用技术研究以提高选择性与准确度成为方法学研究的关键。

综上所述, 随着对植物激素各种生理功能及生物活性研究的深入, GC-MS 用于 JAs 手性分离与检测成为主要的研究方向之一。GC 手性固定相的选择是分离 JAs 对映异构体的关键, 其中常用的手性固定相为环糊精及其衍生化合物^[39-41]。Laudert^[41]等分别利用 β 环糊精和 γ 环糊精填充的毛细管柱对 12-oxo-PDA(结构见图 2)异构体进行了拆分。结果如图 5 所示, 采用全扫描电子轰击质谱对其四种异构体进行了分析, 经过处理后的拟南芥样品中, 消旋

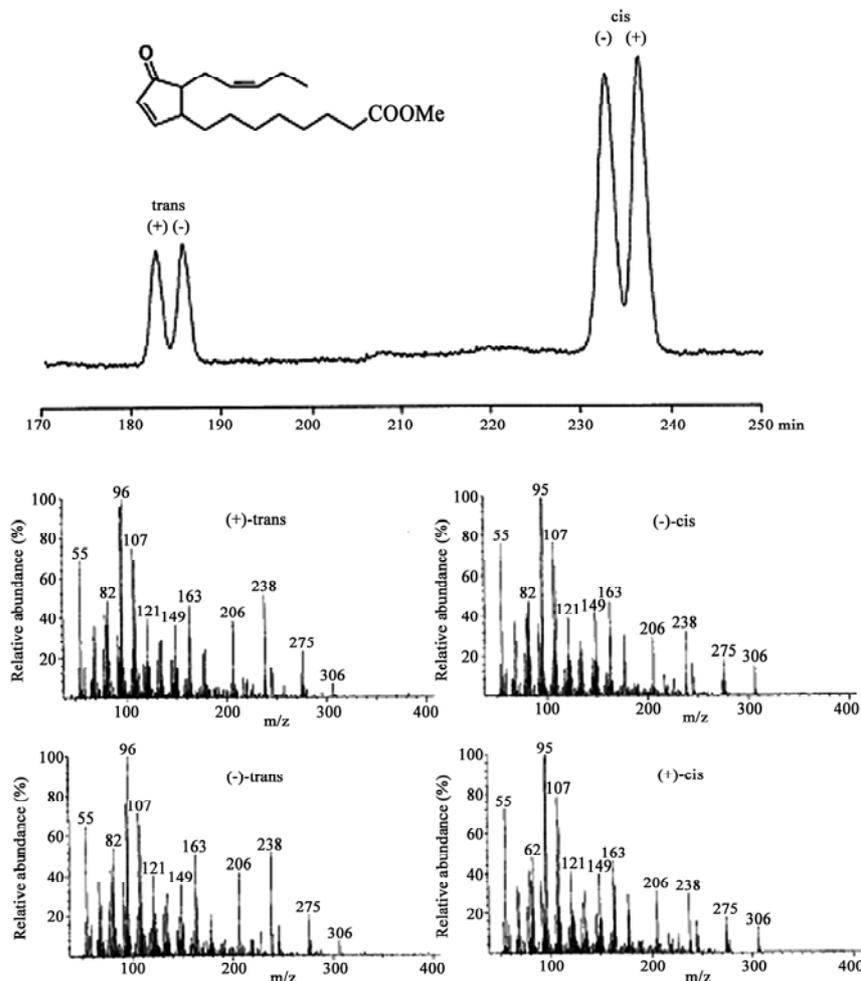


图 5 12-oxo-PDA 甲酯对映体的 GC-MS 分析^[41]

注: γ 环糊精毛细管柱, 1600C; MS 已扣除背景、结果取平均值

12-oxo-PDA 组成 cis trans 为 94 : 6, 而从处理后的马铃薯样品中, 可得到高光学纯度的单一异构体(+)-cis-12-oxo-PDA(cis trans, 98 : 2), 并证实, 植物体内天然存在的 cis-12-oxo-PDA 为右旋异构体。结果与其他文献报道一致。并且, 该方法可得到 ng 级别的高纯单一异构体, 可望实现植物样品中单一异构体的准确分析。由此可见, 开发高效的样品预处理技术、研制高性能气相色谱柱及优化 MS 的检测精确度, 是提高 GC-MS 分析技术灵敏度和准确度的主要途径。

2.2 HPLC

高效液相色谱法(HPLC)是植物激素分析的常用手段之一, 下面按检测器的种类进行评述。

2.2.1 HPLC-UV

早在 1981 年, 日本学者采用 HPLC-UV 法采用 Nucleosil 10 CN 柱对(±)MeJA 进行了分析^[42], 检测波长为 205 nm。Kramell 及 Schneider 等^[43-44]用 C8 反相柱分离了(-)-JA 和(+)-JA 氨基衍生物的非对映异构

体。20 世纪 90 年代关于 JAs 的 HPLC-UV 的报道越来越多, Ueda 等^[6]已对相关工作进行了总结。近十多年来, HPLC-UV 用于 JAs 分析时大多采用 Chiralpak AS 或者 Nucleodex β-PM 色谱柱, 且波长大部分设定为 210 nm 或者 230 nm 处^[45-49]。Kramell 课题组在前人^[45]的基础上较全面的研究和报道了该方面的工作, 包括 JA 对映体的分离^[46]、JA 氨基酸衍生物的手性分离^[47-48]、类多肽 JA 及葫芦酸衍生物的手性分离^[49], 参见表 1, 该作者还比较了不同色谱柱对 JA 衍生物分离的效果, 参见表 2。因为 210 nm 接近流动相(溶剂)紫外吸收截止波长, 检测灵敏度低, 且大部分 JAs 都缺乏强生色团, 在植物中 JAs 含量很低, 通过锁定保留时间分析时若样品纯度达不到要求则直接影响测定结果, 所以大部分的工作只分析了标准品或者合成的衍生化合物。如果要将该方法应用于实际样品的分析, 对样品前处理过程提出更高的要求, 也增加了分析的难度。Kramell 等^[47]也提出, 如果采用 HPLC-MS 技术将会使得以上分

表1 JAs的HPLC手性分离

Compound	Column	Mobile Phase	Rt (min) (-)-JA; (+)-JA	Rs	Ref		
JA	Nucleodex β-PM (250×4.6mmi.d.; 5 μm)	Methanol:water(containing 0.1% TEAA; pH4.0) 60:40 v/v	4.18; 5.11	1.36	[46]		
MeJA		Methanol:water(containing 0.1% TEAA; pH4.0) 50:40 v/v	10.04; 12.39	1.69			
12-OH- MeJA		Methanol:water(containing 0.1% TEAA; pH4.0) 40:60 v/v	3.51; 4.28	1.52			
JA-(S)-Val	Chiralpak AS (250×4.6mmi.d.; 5 μm)	n-hexane/2-propanol=70:30(v/v)	5.75; 8.13	4.07	[48]		
JA-(S)-Leu			4.81; 6.82	4.06			
JA-(S)-Ile			5.32; 7.29	3.62			
JA-(S)-Phe			8.19; 12.77	4.79			
JA-(S)-Met			9.27; 16.89	6.36			
JA-(S)-His			6.65; 9.14	2.53			
JA-(S)-Pro			11.65; 25.45	4.64			
JA-(S)-Ser			9.46; 19.09	6.64			
JA-(S)-Thr			8.70; 17.90	6.01			
JA-(R)-Val			5.45; 6.37	1.51			
JA-(R)-Ile			5.51; 6.25	1.56			
JA-(S)-valinol			LiChrospher 100 RP-18 (250×4.6mmi.d.; 5 μm)	MeOH/0.2%HOAc=60:40(v/v)		8.71; 7.12	3.69
JA-(S)-leucinol						13.70; 10.71	5.27
JA-(S)-isoleucinol						13.25; 10.27	5.06
JA-(S)-Ile			Chiralpak AS (250×4.6mmi.d.; 5 μm)	n-Hexane-2-propanol (70:30,v/v)		5.30; 7.30	3.62
JA-(R)-Ile	5.50; 6.30	1.56					
JA-tyamine	n-Hexane-2-propanol (80:20,v/v)	39.00; 49.20			1.80		
(+)-JA-(S)-leucinol	LiChrospher 100 RP-18 (250×4.6mmi.d.; 5 μm)	Methanol-0.2%(v/v)aqueous acetic acid (60:40,v/v)	10.70	5.25	[49]		
(-)-JA-(S)-Ile			13.60				
3-iso-CA-(S)-Ile			33.00			1.24	
3-iso-6- <i>epi</i> -CA-(S)-Ile	Methanol-0.2%(v/v)aqueous acetic acid (50:50,v/v)		30.60	1.16			
7-iso-CA-(S)-Ile			37.80				
6- <i>epi</i> -7-iso-CA-(S)-Ile			40.40				

表 2 不同色谱柱对 JAs 手性分离的影响^[46]

Compound	RP-18	Chiralpak AS		Nucleodex β -PM	
	t_R	t_R	R_s	t_R	R_s
(-)-JA-2-methylpropylamine	30.70	17.66 ^a	2.53	15.26 ^c	0.74
(+)-JA-2-methylpropylamine		21.67 ^a		17.55 ^c	
(-)-JA-3-methylbutylamine	59.19	16.18 ^a	1.95	30.57 ^c	0.79
(+)-JA-3-methylbutylamine		19.41 ^a		36.56 ^c	
(-)-JA-(S)-2-methylbutylamine	55.61	16.83 ^a	1.84	27.16 ^c	0.86
(+)-JA-(S)-2-methylbutylamine		20.10 ^a		31.84 ^c	
(-)-JA-2-phenylentylamine	59.19	22.32 ^b	4.17	63.28 ^d	1.29
(+)-JA-2-phenylentylamine		31.04 ^b		78.63 ^d	
(-)-JA-tyramine	16.53	38.98 ^b	1.80	49.35 ^e	1.13
(+)-JA-tyramine		49.18 ^b		60.06 ^e	
(-)-JA-tryptamine	48.67	38.22 ^b	1.92	35.77 ^f	1.25
(+)-JA-tryptamine		49.97 ^b		42.66 ^f	

a: n-Hexane-2-propanol, 17:3 (v/v); b: n-Hexane-2-propanol, 4:1 (v/v); c: Methanol-0.1%TEAA(pH 4.1), 3:7(v/v); d: Methanol-0.1%TEAA(pH 4.7), 3:7(v/v); e: Methanol-0.1%TEAA(pH 4.7), 1:3(v/v); f: Methanol-0.1%TEAA(pH 4.7), 2:3(v/v)

析更有效。

2.2.2 HPLC-FD

与紫外检测器相比, 荧光检测器(FD)特点是灵敏度高, 检测限非常低, 适合于痕量分析。20 世纪 80 年代, Anderson^[50,51]采用 HPLC-FD 方法同时分析了植物组织提取物中的 ABA、JA 和 MeJA。后来, Kristl 等^[52]也采用 HPLC-FD 的方法分析了植物样品中的 JA 及其氢加成产物(dh-JA), 选用 9-重氮甲基蒽(ADAM)作为荧光衍生化试剂, 激发与发射波长分别为 254 nm 和 412 nm。该方法灵敏度检测限分别为 2.9 ng/mL 和 3.7 ng/mL, 且有良好的重复性, 其特异性与准确性通过与 LC/MS/MS 方法对比得到证实, 两种方法的结果一致。

虽然荧光检测器的灵敏度非常高, 但是大部分 JAs 自身没有荧光, 必须进行荧光衍生化反应后才能使用 HPLC-FD 方法分析, 另外, 报道的高灵敏度荧光衍生化试剂不多, 因此, 在实际应用中受到一定的限制。

2.2.3 HPLC-MS

质谱是一种很好的定性鉴定方法, 具有灵敏度高、样品用量少、分析速度快等优点, 但对混合物的直接鉴定受到限制。HPLC 是一种很好的分离手段, 结合了两者的液相色谱与质谱联用(HPLC-MS)与 GC-MS 联用互为补充, 主要用于不挥发性化合物、极性化合物、热不稳定化合物、大分子量化合物(包括蛋白、多肽、多聚物)等的分析测定; 作为一种可靠、灵敏度高、选择性好的分

析方法, HPLC-MS 已经广泛应用于各种领域。它可避免复杂的 JAs 荧光等衍生化处理, 在 JAs 的分离检测中发挥着越来越重要的作用。

早年, 由于 HPLC 柱技术的制约及 MS 有限的分辨率及灵敏度, HPLC-MS 主要用于植物组织中 JAs 的简单定性定量分析^[53-54], 方法的灵敏度及选择性都有待提升, 并且对未知物质分析缺乏足够的结构信息。串联质谱(MS/MS)技术不仅提供被检测物的分子量信息, 而且可以得到进一步的结构信息。1998 年, Wilbert 等^[55]应用毛细管液相色谱电喷雾串联质谱(CLC-ES-MS/MS)的方法对植物中 JA、MeJA 和水杨酸(SA)的含量进行了定量分析。JA 和 MeJA 的相关结果, 如图 6 所示。该方法以内标法定量, 采用多反应监控模式排除干扰, 准确定量, 对经过特殊处理的杂交白杨树树叶中 JA、MeJA 和 SA 含量进行了分析, 结果显示植物鲜样中 JA 含量为 2.6 $\mu\text{g/g}$, MeJA 含量为 1.3 $\mu\text{g/g}$, SA 含量为 31.0 $\mu\text{g/g}$ 。

HPLC-MS/MS 技术应用于 JAs 类激素分析时, HPLC 主要采用反相液相色谱柱, 多为 C8 或者 C18 柱。MS 多数采用电喷雾离子化方式及四级杆质量分析器串联。

首先, 结合考虑高压泵的性能参数, 与 MS 联用的 HPLC 柱必须满足一定的要求, 例如允许的流动相流速及使用范围、内径等。早期 HPLC 柱的直径及填充材料的粒径都较粗。虽然 Wilbert^[55]采用的是毛细管柱, 但是固定相粒径较粗, 为 20~30 μm 。

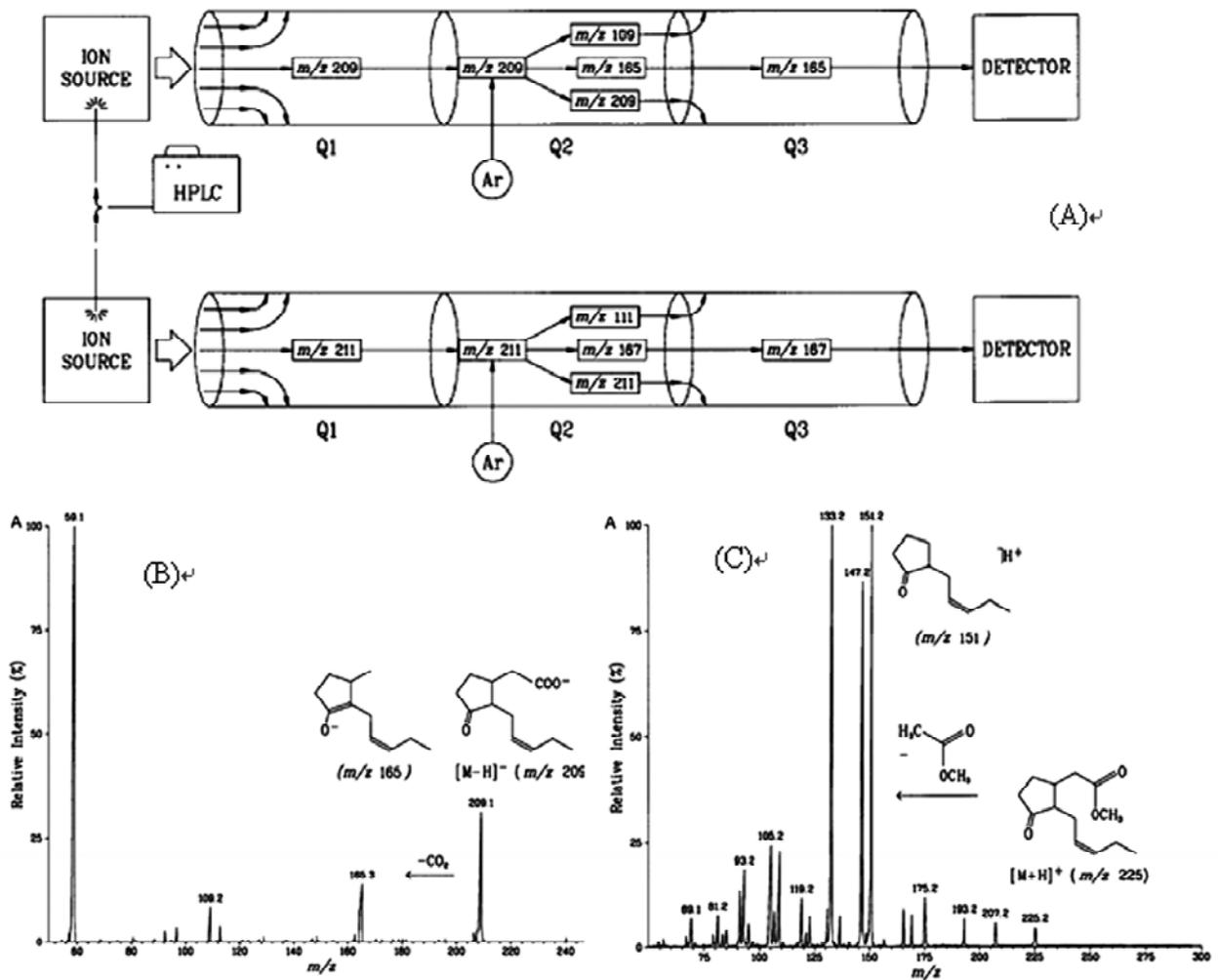


图 6^[55] A : JA 及 H₂-JA 多重反应监测示意图 ; B : JA 质谱结构解析 ; C : MeJA 质谱结构解析

Tamogami 和 Kodama^[56]使用粒径 5 μm 的 C18 反相填充柱对 JA 及其部分氨基酸衍生物进行了分析,缩短了分析柱的长度及分析时间,提高了分析灵敏度。目前,LC 柱主要都是采用 5 μm 粒径的 C18 填充柱,柱的内径和长度都相应不断减小^[57-59],这样可实现快速灵敏的 JAs 分析。随着柱的制备技术及泵的制作工艺的进步,近年填充颗粒粒径为 1.7 μm 超高效液相色谱(UPLC)与 MS 联用已应用于植物中微量植物损伤生物标志物 JAs 的分析^[60-61],成为研究 JAs 生理功能、活性等高效分析手段。

电喷雾离子化(ESI)是液相色谱分离与质谱检测联用的一种接口技术。1998 年, Tanogami 和 Kodama 等^[56]利用 HPLC-TIS(turboionspray)-MS/MS 分析了水稻叶片中 JA 及其部分氨基酸衍生物含量,并研究了叶片的损伤对其含量变化影响(如图 7 所示)。TIS 的高灵敏度及好的重现性为 HPLC-MS/MS 同时准确的

分析内源性 JA、Leu-JA 及 Val-JA 含量提供了技术保证,其检测限可达 1 pg~500 fg。事实证明,JA 的部分内源氨基酸衍生物履行着与 JA 同等重要的生理功能。基于大部分 JAs 化合物极性都比较强,故在 JAs 的分析检测中,绝大部分都采用 ESI 电离技术^[55-61],可以达到高通量、高灵敏度及高精度的要求。同时,MS 质量分析器的性能包括分辨率及使用范围等直接决定分析结果的精密度及灵敏度。HPLC-MS/MS 应用于 JAs 的分析时,大部分采用三重四级杆质量分析器(QqQ)^[55,57-58,60,62]。几种常见的技术参数及结果对比见表 3。

2.3 CE

毛细管电泳方法(CE)具有高效、快速、进样量少、试剂耗费小等特点。作为一种实用性很强的分离分析方法,CE 已被应用于生物、化学、医药等各种领域,包括某些植物激素的分析^[63]。与

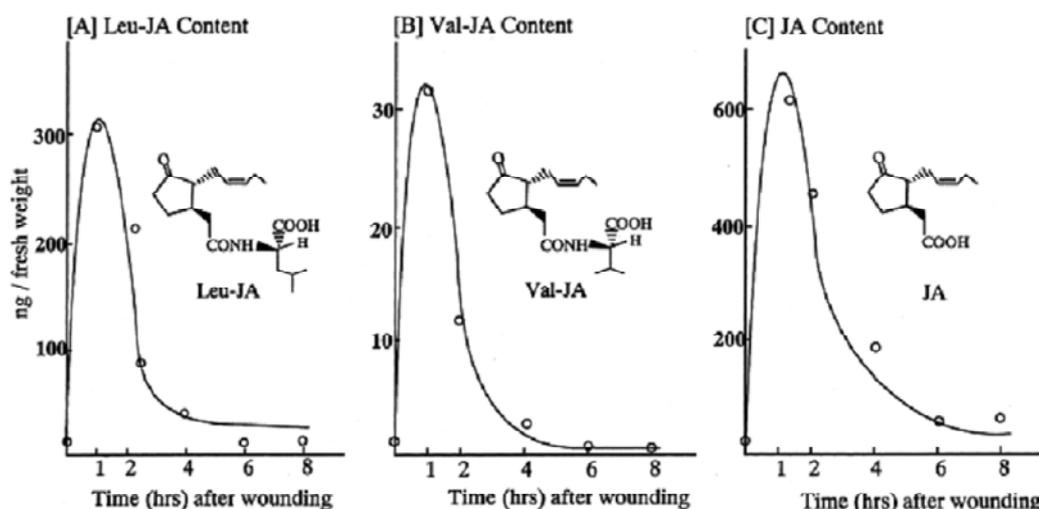
图 7 损伤的水稻叶片中内源性 JA、Leu-JA 及 Val-JA 的含量变化^[56]

表 3 LC-MS/MS用于JAs分析时几种常见的技术参数及结果对比

Compound	Column	Solvent	MS or MS/MS	m/z	Quantification	Sample	Ref
JA	C18 (100 μm i.d. 20cm)	A 水(含 1% 氨水 /5mM 乙酸铵) B 甲醇(含 1% 氨水 /5mM 乙酸铵)	ES/ QqQ	209,165	2.6 g/g	杂交白杨	[55]
MeJA	20~30 μm	A 水(含 1% HCl/5mM 乙酸铵) B 甲醇(含 1% HCl/5mM 乙酸铵)	ES/ QqQ	225,151	1.3 g/g	树叶	[55]
JA	ODS (100 \times 2 mm, 5 μm)	A 甲醇 B 0.01% 乙酸水溶液	ES/QqQ	209, 59	50.28 pmol/g	柑橘叶	[58]
JA	C18	A 水(含 0.1% 乙酸)	ESI/Q-Trap	209, 59	0.01~0.1 pg/g	拟南芥、 种子	[59]
MeJA	(100 \times 2mm, 5 μm)	B 甲醇(含 0.1% 乙酸)		225, 151	0.01~0.1 pg/g		
OPDA				295, 165	0.1~1 pg/g		
JA	C18 (150 \times 2.1 mm, 5 m)	A 水 (0.05% 乙酸) B 乙腈	ES/QqQ	209, 59	0.47 ng/g	黄瓜	[57]
JA	UPLC	A 水(含 0.1% 甲酸)	ESI/TOF or	209		拟南芥	[60]
Tuberonic acid	C18(150 2.1mm,1.7 μm)	B 乙腈(含 0.1% 甲酸)	QqQ	225			
JA	C18	85% 甲醇水溶液	ES/QqQ	209	1 pg	粳稻日 本晴	[62]
OPDA	(150 \times 4.6 mm)		291	1 pg			

HPLC 类似, CE 中应用最广泛的是紫外检测器。但大多数茉莉酸类化合物没有强的生色团, 紫外检测器往往达不到实际样品分析的灵敏度要求。为了提高检测灵敏度, 常常选择激光诱导荧光检测方法(LIF)。LIF 的检测灵敏度可达 10^{-18} 数量级^[63-64], 是与 CE 联用技术中灵敏度最高的方法之一。吕应堂等^[65]采用 CE-LIF 成功分析了橡胶树树皮提取物中茉莉酸的含量, 结果如图 8 所示。在衍生与分离最优化条件下, 其检测限为 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 用质谱作为对比分析, 富集之后在柱检测结果为 10 amol 或者 $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这些结果说明该方法灵敏度高, 可实现植物组织中茉莉酸的痕量分析。但是, 该方法也有一定的局限性。大部分茉莉酸类物质都是没有荧

光发射基团, 必须进行荧光衍生化处理, 使得分析过程更加繁琐复杂。

关于 JAs 的 CE 分析报道很少, 灵敏度及样品预处理问题是限制其应用的主要原因之一。但随着今后高效率样品预处理与富集方法的不断出现、CE 柱技术的快速发展以及高灵敏度检测方法的应用, CE 将会更多的应用于 JAs 的分离分析。

2.4 RIA 和 ELISA

免疫分析法(ISA)是基于抗原和抗体的特异性竞争结合反应而达到定量分析的一种方法。以植物激素作为抗原得到特异性抗体后, 将已知量的标记抗原(Ag^*)与样品中未知量 Ag 混合与已知量抗体(Ab)结合, 至反应平衡, 通过计算抗原抗体复合物 Ag^* -

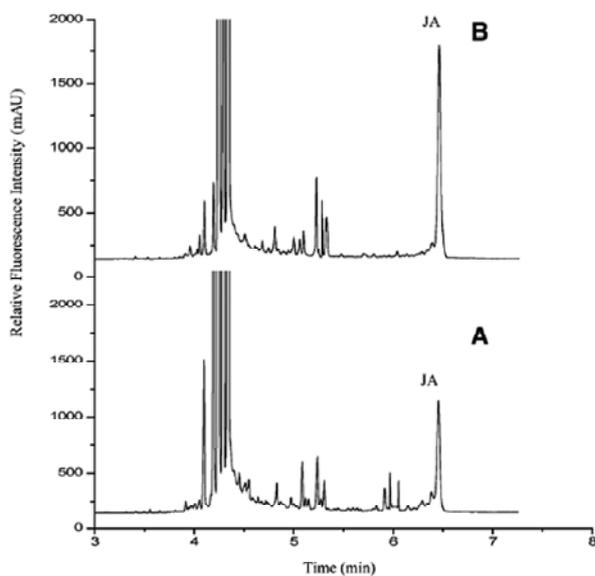


图8 完整(A)及(损伤)树干树皮提取物中JA的含量分析^[65]
pH=8.5 20 mmol/L 硼酸盐缓冲溶液；分离电压：25 kV；
进样：50 mbar, 5s；25 °C

Ab 和游离态 Ag* 的比例，达到分析目的。相对于常规理化分析方法，ISA 具有自己独特的优势：专一性高，能对激素进行组织化学定位，有效测定激素载体、受体蛋白与有关酶的活性，所需植物组织样品量少。另外还具有精确度高，提取纯化步骤少，容易操作，耗时短，可以进行微量、大批样品的同时同步分析等特点。免疫分析法根据不同的检测原理分为很多种，在 JAs 分析中常用的是放射免疫分析(radioimmunoassay, RIA)和酶联免疫法(ELISA)。前者采用同位素标记抗原，后者利用酶的高选择性和灵敏度得到准确的分析结果，比前者相对更灵敏，无需昂贵仪器，且不存在污染问题，故通常情况下 ELISA 比 RIA 更受欢迎。

1984 年，Knöfel 等^[66]基于^[3H]-MeJA 建立了 JA 的放射性免疫分析方法，检测了蚕豆种子及其植物体各组织中的 JA 含量。检测的线性范围为 2~200 ng，检测限为 2 ng，该结果与 GC 分析结果一致。目前该方法被用于植物中 JA 及其代谢物的鉴定与分析^[67]。1990 年，该课题组对此方法进行了改进，采用多克隆抗体技术对植物提取物中的(-)-JA 含量进行了分析，检测限可达 0.8 ng，从灵敏度、检测限及样品用量等方面来说要优于 GC、HPLC 及生物测试方法^[68]。之后，RIA 被应用于植物体内 JAs(JA 及其甲酯、氨基酸衍生物)生物活性及功能的研究^[69-74]。

1993 年，Albrecht 等^[75]制备出抗 MeJA 单克隆抗体，建立了固相抗体型 ELISA 技术，对 3R, 7R-MeJA 的分析可低至 20 pg，并通过受损伤的植物体内 3R, 7R-JA 分析为“损伤诱导的植物防卫反应是通过内源性茉莉酸类植物激素介导”的假设提供了直接证据，进一步表明 ELISA 为 JAs 分析的有效手段^[76-80]。1998 年，辛泽毓等^[81]以茉莉酸-牛血清白蛋白复合物作为免疫原获得了兔抗茉莉酸甲酯抗血清，并在此基础上建立了茉莉酸固相抗原型 ELISA，检测灵敏度可达 0.42 pmol。同时，利用茉莉酸甲酯和辣根过氧化物酶标记的茉莉酸对鼠抗茉莉酸甲酯单克隆抗体的竞争结合，建立了茉莉酸固相抗体型 ELISA，灵敏度为 0.20 pmol。结果表明虽然固相抗体型 ELISA 在特异性和检测的灵敏度等方面优于固相抗原型 ELISA，但前者检测范围较窄，抗体用量较多且不易制备。该方法的建立为 JAs 的分析提供了新的分析手段，推动了 JAs 分析研究的发展^[82-83]。

抗体的特性及检测模式的选择(直接或间接竞争型 dcELISA 和 icELISA)是影响分析方法灵敏度的两个关键因素。Zhao 等^[84]报道，简化的间接竞争型 ELISA 在某些方面要优于传统的间接检测模式。因此，Deng 等^[85]基于单克隆抗体技术建立了新的 MeJA 分析方法，并比较了该 ELISA 的三种检测模式。结果显示 dcELISA 的灵敏度最高，检测范围为(0.7~97.0 ng/mL)，而简化的 icELISA 则略优于传统模式。可见，若要提高分析的灵敏度及选择性，ELISA 的发展还需不断寻找新的简单的抗体制备方法及灵敏的检测模式。

2.5 其他

以上多为用于 JAs 分析的仪器分析方法。虽然过去 Ueda 等^[6]总结的方法目前已不断被更新或取代，但也可以新旧结合，开辟出新的途径。例如将 HPTLC 结合 MS、HPLC 等现代手段对 JA 进行鉴定分析^[86]。此外，Mar Cajo del 等^[87]利用在线 RPLC-TOTAD-GC 技术，结合 GC/MS 分析结果，从柠檬果皮提取物中分离提取出纯天然的(+)-epi-MeJA，这对于 JAs 的手性分离及其在植物体内的生理作用研究都具有重大意义。Glauser 等^[60]利用核磁共振(NMR)技术能够分析化合物精细结构的特点将之与 UPLC-MS 结果相结合，分析了作为一种生物标志物的 JA 衍生物(JA-OH)在受损伤植物叶片中的含量(如图 9 所示)，毛细管 NMR 探针的使用提供了高质

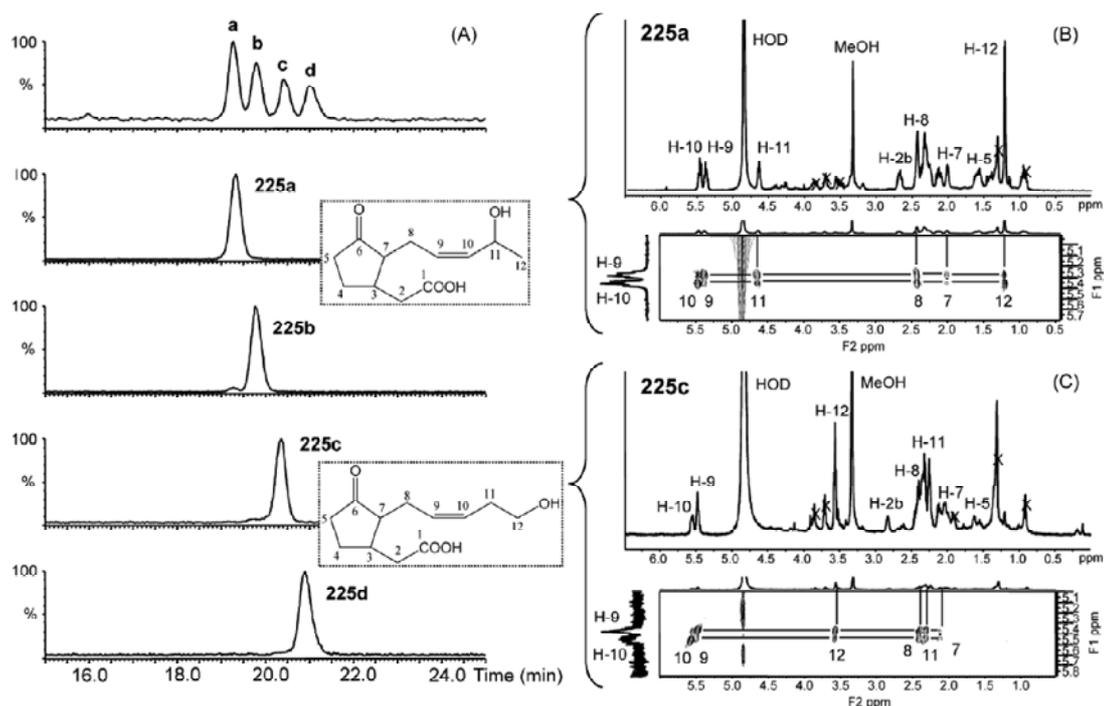


图9^[60] A: 12-OH-JA及TA异构体UPLC-TOF-MS BPI色谱图; B: 225a的¹H-CapNMR图谱; C: 225c的¹H-CapNMR图谱

量高分辨的二维图谱,可得到几十微克纯的化合物,这种微量化合物的纯化与鉴定方法可应用于植物体内大量微量代谢产物的分离与鉴定,为LC-NMR-MS技术广泛应用于JAs的分离检测奠定了基础。

3 展望

JAs在植物防御和发育中等过程发挥了重要的作用,建立快速、高灵敏度、准确测定JAs含量的方法已成为植物激素作用的分子机理研究中一项十分重要的工作。本文综述了JA类植物激素的分离与检测最新进展,从上述文献调研情况可以看出,目前应用于植物激素分析的方法主要是以ELISA和RIA为代表的生物检测技术和以气-质或液-质联用为代表的仪器分析技术。尽管这些技术已经应用在JA类激素分析中,但由于内源性JA类激素在植物体内含量低(通常纳克/每克水平),样品组成复杂,以手性异构体存在,并随时空因素变化而变化,这些技术实际上并不能完全满足植物激素作用分子机理研究的要求,分析方法的检测灵敏度不够高,选择性仍然不能满足排除植物样品复杂性所带来的干扰,样品的前处理、富集技术的效益不高,原位现场实时检测技术缺乏等仍然是制约植物激素研究

的瓶颈问题。因此,对内源性植物激素分析方法研究要求具有高灵敏度、高选择性、实时及适用于现场原位分析等特点。基于内源性植物激素分析的特点,笔者认为,下列研究课题将是植物激素分析研究的重要方向:(1)高选择性、微量样品前处理技术,例如基于分子识别材料的固相微萃取技术、电堆集(electrokinetic stacking)及电扫集(electrokinetic sweeping)等电动在线浓缩技术以及与色谱、电泳等分离技术的联用;(2)多维色谱分离技术以及与质谱、磁共振等检测技术联用;(3)植物激素的手性及位置异构体的色谱、电泳及电色谱高效分离技术;(4)高灵敏度、高选择性的荧光探针试剂的合成与应用;(5)高选择性高灵敏度生物及电化学传感器;(6)现场原位实时检测技术以及微小化集成化芯片或装置的研制。当然,还有很多课题也有待于去研究。我们相信,在我国国家自然科学基金“植物激素作用的分子机理”重大研究计划的资助下,随着我国分析工作者开展的新的分析技术研究的不断深入,制约我国植物激素研究的分析瓶颈问题将会逐步得到解决,我国植物激素研究将会进入国际先进水平。

[参考文献]

- [1] Staswick PE. Jasmonates, salicylic acid and brassinolides [M] // Davies PJ (ed). Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Pub, 1995:179-87
- [2] Demole EP, Lederer E, Mercier D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmine. Helv Chim Acta, 1962, 45: 675-85
- [3] Aldridge DC, Galt S, Giles D, et al. Metabolites of lasiodiplodia theobromae. J Chem Soc C, 1971: 1623-7
- [4] Ueda J, Kato J. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). Plant Physiol, 1980, 66: 246-9
- [5] Kramell R, Miersch O, Hause B, et al. Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. FEBS Lett, 1997, 414: 197-202
- [6] Ueda J, Mijamoto K, Kamisaka S. Separation of a new type of plant growth regulator, jasmonates, by chromatographic procedures. J Chromatogr A, 1994, 658:129-42
- [7] Parthier B. Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? J Plant Growth Regul, 1990, 9: 57-63
- [8] Creelman RA, Mullet JE. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 355-81
- [9] Zeng XC, Zhou X, Zhang W, et al. Opening of rice floret in rapid response to methyl jasmonate. J Plant Growth Regul, 1999, 18: 153-8
- [10] Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, et al. Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. New Phytol, 2008, 177: 114-27
- [11] Ce'esar SJ, Bruno J, Tura'n U, et al. Wound response in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) plants: gene characterization of a novel chloroplast-targeted allene oxide synthase up-regulated by mechanical injury and methyl jasmonate. Plant Cell Rep, 2008, 27: 387-97
- [12] Rotem R, Heyfets A, Fingrut O, et al. Novel anticancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria. Cancer Res, 2005, 65(5): 1984-93
- [13] Tatiana K, Jackman A, Heyfets A, et al. Methyl jasmonate induces cell death with mixed characteristics of apoptosis and necrosis in cervical cancer cells. Cancer Lett, 2008, 1 (271): 34-46
- [14] Fingrut O, Flescher E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. Leukemia, 2002, 16: 608-16
- [15] Rotem R, Fingrut O, Moskovitz J, et al. The anticancer plant stress-protein methyl jasmonate induces activation of stress-regulated c-Jun N-terminal kinase and p38 protein kinase in human lymphoid cells. Leukemia, 2003, 17: 2230-56
- [16] 曾晓春, 周燮, 吴晓玉. 水稻颖花开放机理研究进展. 中国农业科学, 2004, 37:188-95
- [17] 王忠, 顾蕴洁. 水稻开颖机理的探讨:II.CO₂对水稻开颖的效应. 作物学报, 1989, 15: 59-66
- [18] 曾晓春, 周燮. 茉莉酸甲酯(MeJA)诱导水稻颖花开放. 植物学报, 1999, 41: 560-2
- [19] 宋平, 夏凯, 吴传万, 等. 雄性不育和可育水稻开颖对茉莉酸甲酯响应的差异. 植物学报, 2001, 43: 480-5
- [20] 曾晓春, 周燮. 技术跨越与高新技术产业发展[M]// 张玉台 主编. 北京: 中国科学技术出版社, 2001: 79-80
- [21] Acree TE, Nishida R, Fukami H. Odor thresholds of the stereoisomers of methyl jasmonate. J Agric Food Chem, 1985, 33: 425-7
- [22] Robertson GW, Shepherd T, Griffiths DW. The use of gas chromatography-mass spectrometry in the study of plant and insect defence compounds. Plant Biochem Phytochem, 125-7
- [23] Hisakazu Y, Hideo T, Hisato A, et al. Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. Plant Cell Physiol, 1981, 22(4): 689-97
- [24] Schmidt J, Kramell R, Brueckner C, et al. Gas chromatographic/mass spectrometric and tandem mass spectrometric investigations of synthetic amino acid conjugates of jasmonic acid and endogenously occurring related compounds from *Vicia faba* L. Biomed Environ Mass Spectrom, 1990, 19(5): 327-38
- [25] Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 4938-41
- [26] Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, et al. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell culture. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 2389-93
- [27] Juergen S, Kramell R, Brueckner C, et al. Gas chromatographic/mass spectrometric and tandem mass spectrometric investigations of synthetic amino acid conjugates of jasmonic acid and endogenously occurring related compounds from *Vicia faba* L. Biomed Environ Mass Spectrom, 1990, 19(5): 327-38
- [28] Mueller MJ, Brodschelm W. Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. Anal Biochem, 1994, 218(2): 425-35
- [29] 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
- [30] Engelberth J, Schmelz EA, Alborn HT, 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 (2): 242-50
- [31] Eric AS, Juergen E, Hans TA, et al. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(18): 10552-7
- [32] 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: 155-9
- [33] 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
- [34] 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
- [35] Koo YJ, Yoon E, Song JT, et al. An advanced method for the determination of carboxyl methyl esterase activity using gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci*, 2008, 863(1): 80-7
- [36] Engelberth J, Schmelz EA, Alborn HT, 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(2): 242-50
- [37] Kenji K, Hideki M. Identification of potent odorants in Japanese green tea (Sen-cha). *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 5169-72
- [38] 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
- [39] Tamogami S, Awano K, Kitahara T. Analysis of the enantiomeric ratios of chiral components in absolute jasmine. *Flavor Frag J*, 2001, 16(3): 161-3
- [40] Ruiz Del CML, Blanch GP. Enantiomeric purity of (+/-)-methyl jasmonate in fresh leaf samples and commercial fragrances. *J Sep Sci*, 2007, 30(13):2117-22
- [41] Laudert D, Hennig P, Stelmach BA, et al. Analysis of 12-oxo-phytodienoic acid enantiomers in biological samples by capillary gas chromatography-mass spectrometry using cyclodextrin stationary phases. *Anal Biochem*, 1997, 246: 211-7
- [42] Yamane H, Takahashi N, Ueda JI, et al. Resolution of (\pm)-methyl jasmonate by high performance liquid chromatography and the inhibitory effect of (+)-enantiomer on the growth of rice seedlings. *Agric Biol Chem*, 1981, 45(7): 1709-11
- [43] Kramell R, Schmidt J, Schneider G, et al. Synthesis of n-(jasmonoyl)amino acid conjugates. *Tetrahedron*, 1988, 44: 5791-807
- [44] Schneider G, Kramell R, Bruckner C. Separation of diastereomeric amino acid conjugates of jasmonic acid. *J Chromatogr*, 1989, 483: 459-62
- [45] Okamoto OM, Nakazawa H. Direct chromatographic separation of the enantiomers of methyl jasmonate and its derivatives. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(7): 1172-3
- [46] Kramell R, Schneider G, Miersch O. Resolution of racemic jasmonic acid and abscisic acid by chiral high performance liquid chromatography. *Phytochem Anal*, 1996, 7: 209-12
- [47] Kramell R, Schneider G, Wasternack C. Liquid chromatography of jasmonic acid amine conjugates. *Chromatographia*, 1999, 49(1/2): 42-6
- [48] Kramell R, Schneider G, Miersch O. Chiral separation of amide conjugates of jasmonic acid by liquid chromatography. *Chromatographia*, 1997, 45: 104-8
- [49] Kramell R, Porzel A, Miersch O, et al. Chromatographic resolution of peptide-like conjugates of jasmonic acid and of cucurbitic acid isomers. *J Chromatogr A*, 1999, 847: 103-7
- [50] Anderson JM. Simultaneous determination of abscisic acid and jasmonic acid in plant extracts using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1985, 330(2): 347-55
- [51] Anderson JM. Fluorescent hydrazides for the high-performance liquid chromatographic determination of biological carbonyls. *Anal Biochem*, 1986, 152: 146-53
- [52] Kristl J, Veber M, Krajinic B, et al. Determination of jasmonic acid in *Lemna minor* (L.) by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(5): 886-93
- [53] Ueda J, Miyamoto K, Aoki M, et al. Identification of jasmonic acid in *Chlorella* and *Spirulina*. *Bull Univ Osaka Prefecture, Ser B: Agric Life Sci*, 1991, 43: 103-8
- [54] Schmidt J, Kramell R, Schneider G. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry of amino acid conjugates of jasmonic acid under positive and negative ionization. *Euro Mass Spectrom*, 1995, 1(6): 573-81
- [55] Wilbert SM, Ericsson LH, Gordon MP. Quantification of jasmonic acid, methyl jasmonate, and salicylic acid in plants by capillary liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1998, 257: 186-94
- [56] Tamogami S, Kodama O. Quantification of amino acid conjugates of jasmonic acid in rice leaves by high-performance liquid chromatography-turboionspray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1998, 822: 310-5
- [57] Segarra G, Jauregui 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. *Phytochem*, 2006, 67: 395-401
- [58] Durgbanshi A, Arbona V, Pozo Oscar, et al. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 8437-42
- [59] Pan XQ, Welti R, Wang XM. Simultaneous quantification of phytohormones and related metabolites in crude plant extracts by LC-MS/MS. *Phytochem*, 2008, 69: 1773-81
- [60] Glauser G, Guillarme D, Grata E, et al. Optimized liquid chromatography-mass spectrometry approach for the isolation of minor stress biomarkers in plant extracts and their identification by capillary nuclear magnetic resonance. *J Chromatogr A*, 2008, 1180: 90-8
- [61] Grata E, Boccard J, Guillarme D, et al. UPLC-TOF-MS for plant metabolomics: a sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. *J Chromatogr B*, 2008, 871(2): 261-70
- [62] Rakwal R, Tamogami S, Agrawal GK, et al. Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295: 1041-5
- [63] Liu X, Ma L, Lin YW, et al. Determination of abscisic acid

- by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2003, 1021: 209-13
- [64] Cheng YF, Dovichi NJ. Subattomole amino acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Science*, 1988, 242: 562-4
- [65] 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: 1616-9
- [66] Knoefel HD, Brueckner C, Kramell R, et al. A radioimmunoassay for jasmonic acid. *Biochem Physiol Pflanzen*, 1984, 179(4): 317-25
- [67] Meyer A, Miersch O, Buettner C, et al. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J Plant Growth Regul*, 1984, 3(1): 1-8
- [68] Knoefel HD, Brueckner C, Kramell R, et al. Radioimmunoassay for the natural plant growth regulator (-)-jasmonic acid. *Biochem Physiol Pflanzen*, 1990, 186(5-6): 387-94
- [69] Nojiri H, Yamane H, Seto H, et al. Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonic acid in bulbing and non-bulbing onion plants. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33(8): 1225-31
- [70] Christov CH, Bruckner C, Zafirova T. Amino acid conjugate of jasmonic acid in reproductive organs of vines (*Vitis vinifera* L.). *Dokladi na Bulgarskata Akademiya na Naukite*, 1992, 45(3): 91-3
- [71] Appenroth KJ, Dathe W, Hertel W, et al. Photophysiology of turion germination in *Spirodela polyrhiza* (L.) SCHLEIDEN. VII. Action of jasmonic acid. *J Plant Physiol*, 1991, 138(3): 345-9
- [72] Berestetskii V, Dathe W, Daletskaya T, et al. Jasmonic acid in seed dormancy of *Acer tataricum*. *Biochem Physiol Pflanzen*, 1991, 187(1): 13-9
- [73] Brueckner C, Kramell R, Schneider G, et al. Endogenous amino acid conjugates of jasmonic acid type in *Vicia faba* flowers [C]. *Conjugated Plant Horm., Proc Int Symp*, 1987: 308-14
- [74] Lopez R, Dathe W, Brueckner C, et al. Jasmonic acid in different parts of the developing soybean fruit. *Biochem Physiol Pflanzen*, 1987, 182(3): 195-201
- [75] Albrecht T, Kehlen A, Stahl K. Quantitation of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody. *Planta*, 1993, 191: 86-94
- [76] Weiler EW, Albrecht T, Groth B, et al. Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochem*, 1993, 32(3): 591-600
- [77] Ranjan R, Miersch O, Sembdner G, et al. Presence and role of jasmonate in apple embryos. *Physiol Plantarum*, 1994, 90(3): 548-52
- [78] Petrovic N, Ravnikar M, Gogala N. Interactions between potato mosaic virus and methyl jasmonate in potato. *Acta Pharmaceut: Zagreb*, 1995, 45(2, suppl. 1): 289-94
- [79] Ranjan R. Jasmonic acid-mediated lipid mobilization in apple cotyledons during germination. *J Plant Physiol*, 1998, 3(2): 125-8
- [80] Xin ZY, Zhou X, Pilet PE. Level changes of jasmonic, abscisic, and indole-3yl-acetic acids in maize under desiccation stress. *J Plant Physiol*, 1997, 151(1): 120-4
- [81] 辛泽毓, 周燮, 张能刚. 茉莉酸酶联免疫检测法(ELISA)的建立. *南京农业大学学报*, 1998, 21(4): 19-23
- [82] 甘立军, 夏凯, 王才林, 等. 抗茉莉酸甲酯单抗制备及小麦和黑麦草颖花中茉莉酸含量的测定. *实验生物学报*, 2004, 37(5): 359-66
- [83] 甘立军, 夏凯, 周燮. 小麦颖花开放过程中花器不同部位茉莉酸类的动态变化. *南京农业大学学报*, 2005, 28(3): 26-9
- [84] Zhao J, Li G, Yi GX, et al. Comparison between conventional indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) and simplified icELISA for small molecules. *Anal Chim Acta*, 2006, 571: 79-85
- [85] Deng AX, Tan WM, He SP, et al. Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the analysis of jasmonates in plants. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(8): 1046-52
- [86] Dhandhukia PC, Thakkar VR. Separation and quantitation of jasmonic acid using HPTLC. *J Chromatogr Sci*, 2008, 46(4): 320-4
- [87] Mar Caja del M, Blanch GP, Castillo del MLR. Online RPLC-GC via TOTAD method to isolate (+)-methyl epijasmonate from lemon (*Citrus limon* burm.). *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 5475-9