

液相色谱 – 串联质谱法测定水稻中生长素及其氨基酸结合物

曹赵云^{1,2}, 马有宁², 陈铭学², 牟仁祥², 胡秀芳^{1*}

(1. 浙江理工大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018; 2. 中国水稻研究所 农业部稻米及制品质量监督检验测试中心, 浙江 杭州 310006)

摘要: 建立了同时测定水稻中吲哚-3-丁酸(IBA)、吲哚-3-乙酸(IAA)及其7种氨基酸结合物的液相色谱 – 串联质谱(HPLC – MS/MS)检测方法。样品在4℃下于80%甲醇中浸提12 h后,经混合阴离子交换反相固相萃取(MAX)净化,以5 mmol/L的甲酸铵溶液和甲醇为流动相,在C₁₈柱上进行液相色谱分离,电喷雾正离子模式下用三重四极杆质谱仪多反应监测方式测定。对水稻根、茎、叶和籽粒4种基质分别进行加标回收实验,9种分析物的平均加标回收率为75% ~ 106%,RSD为3.6% ~ 15.2%,方法检出限(S/N=3)为0.01 ~ 25 μg/kg。方法准确、灵敏,能满足水稻中9种生长素及其结合物在其生理水平的测定。

关键词: 液相色谱 – 串联质谱; 生长素; 氨基酸结合物; 水稻

中图分类号: O657.63; S963.732 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 – 4957(2011)12 – 1419 – 06
doi: 10.3969/j.issn.1004 – 4957.2011.12.017

Analysis of Auxins and Their Amino Acid Conjugates in Rice by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

CAO Zhao-yun^{1,2}, MA You-ning², CHEN Ming-xue², MOU Ren-xiang², HU Xiu-fang^{1*}

(1. Department of Life Science, Zhejiang Sci – Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Rice Product Quality Inspection and Supervision Center, Ministry of Agriculture, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: A liquid chromatography – tandem mass spectrometric (LC – MS/MS) method was developed for the simultaneous determination of indole-3-butyric acid (IBA), indole-3-acetic acid (IAA) and its 7 amino acid conjugates including IAA – Asp, IAA – Ala, IAA – Val, IAA – Trp, IAA – Leu, IAA – Ile and IAA – Phe in rice. The sample was extracted with 80% methanol for 12 h at 4℃. The extract was cleaned up on an Oasis MAX cartridge (60 mg × 3 mL), and eluted with methanol contained 0.5% formic acid. 9 analytes were separated on a C₁₈ column (1.8 μm, 100 mm × 2.1 mm i. d.) using 5 mmol/L ammonium formate (A) – acetonitrile (B) as mobile phase by gradient elution. The analytes were detected by positive-ion electrospray ionization – mass spectrometry under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The recoveries of 9 analytes from the matrixes of root, sheath, leaf and seed in rice tissue ranged from 75% to 106% with relative standard deviations (RSDs) of 3.6% – 15.2%. The detection limits (S/N=3) ranged from 0.01 μg/kg to 25 μg/kg. The method was sensitive and reliable, and could meet the requirements for quantification of auxins and their amino acid conjugates in rice at the physiological level.

Key words: liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS); auxin; amino acid conjugates; rice

生长素在植物生长发育过程中起着至关重要的调控作用,其参与了从胚胎发育、原基形成到果实成熟等各个过程^[1-2],甚至严重影响水稻等重要农作物的产量^[3-4]。天然生长素主要是吲哚类衍生物,主要以游离态的吲哚-3-乙酸(IAA)为活性形式发挥生理作用。然而在植物体内,IAA因经历复杂的代谢、转化等过程,主要以结合态或修饰态存在,如其中较为重要的一类是IAA的氨基酸结合物^[5-6]。这些结合物虽不具生理活性,但参与了IAA的长距离运输,并作为其储存载体而维持植株体内游离

收稿日期: 2011 – 08 – 03; 修回日期: 2011 – 08 – 22

* 通讯作者: 胡秀芳, 博士, 研究员, 研究方向: 功能微生物的分子生物学研究, Tel: 0571 – 86843195, E – mail: huxiuf@zstu.edu.cn

IAA 的动态平衡^[7-8], 甚至可能与环境胁迫信号的应答关系密切^[8]。因此, 准确测定生长素及其主要结合物的水平, 可为研究植株体内的活性生长素水平在时间和空间上的自我调控机理及其与外界胁迫因子应答关系起到重要的推动作用。

目前, 有关生长素的测定方法中, 国内主要是关于游离 IAA、吲哚-3-丁酸(IBA)等的测定^[10-14], 很少涉及其氨基酸结合物。而国外已有相关报道, 如 Tam 等^[15]采用 GC-MS 法测定了 IAA-Asp 等 4 种 IAA 氨基酸结合物, 但由于 IAA 的氨基酸结合物均为水溶性的强极性物质, GC-MS 法通常采用强碱水解、甲基化或三甲基硅烷化等衍生化处理, 再结合多步净化法进行测定, 过程相对复杂且不适合高通量分析^[16-17]。LC-MS/MS 技术具有高选择性、高灵敏度的优点, 尤其对较强极性物质的分析能力较 GC-MS 法具有明显优势, 适合分析生长素及其氨基酸结合物^[18-21], Kojima 等^[21]采用 HLB 串联混合阳离子交换反相固相萃取(MCX)净化, LC-MS/MS 法测定了水稻中 IAA-Ala、IAA-Leu 等 7 种氨基酸结合物。本文以 80% 甲醇-水溶液为提取溶剂, 首次采用 MAX 净化, 建立了 LC-MS/MS 法同时测定水稻中 9 种生长素及其氨基酸结合物的分析方法。该方法快速、灵敏, 能满足水稻中 9 种生长素及其结合物在其生理水平的测定。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Survryor 系列液相色谱仪、TSQ Quantum Access Max 三重四极杆质谱仪附电喷雾离子源、台式冷冻离心机 Biofuge Primo R(美国 Thermo Fisher 公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸(色谱纯, Tedia 公司); 甲酸铵(色谱纯, Fluka 公司); 氨水(25%~28%, 杭州长征化学试剂有限公司); 混合阴离子交换反相固相萃取柱 OASIS MAX (60 mg×3 mL, Waters 公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水; 5 mmol/L 甲酸铵溶液: 取 0.315 g 甲酸铵用水稀释至 1 000 mL。9 种植物激素标准品: 吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)、N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-丙氨酸(IAA-Ala)、N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-缬氨酸(IAA-Val)、N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-亮氨酸(IAA-Leu)、N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-异亮氨酸(IAA-Ile)(纯度均不低于 98%, Sigma Aldrich 公司); N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-天冬氨酸(IAA-Asp)、N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-色氨酸(IAA-Trp)(Olomouc 公司); N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-苯丙氨酸(IAA-Phe)(纯度均不低于 98%, IL 公司)。各标准品用乙醇分别配成 1 000 mg/L 的单标储备液, 并于 -40 °C 下封存。

实验选用中浙优 1 号水稻, 于齐穗开花期选取生长整齐一致同日开花的单茎(穗), 标记开花日期, 自开花后第 7 d 开始取样。用高纯水冲洗样品根部, 并用纱布擦去表面水分, 再将植株按根、茎、叶和籽粒分割为 4 部分, 剪碎, 置于液氮中冷冻 30 s 后, 置于 -40 °C 冰箱中保存。

1.2 样品处理

1.2.1 提 取 取预冷冻样品, 加液氮研磨后, 准确称取 0.2 g(精确至 0.001 g)于 5 mL 离心管中, 加入 2 mL 经 4 °C 下预冷的 80% 甲醇溶液, 于 4 °C 下浸提 12 h, 将浸提液置于冷冻离心机中, 在 4 °C 下 10 000×g 离心 10 min, 取清液置于 5 mL 离心管中, 残渣再用 1 mL 80% 甲醇淋洗, 并在相同条件下离心, 合并两次上清液, 再加入 60 μL 氨水, 混匀待净化。

1.2.2 净 化 将 MAX 净化柱依次用 2 mL 甲醇和 2 mL 1% 氨水溶液预洗, 当溶剂液面到达柱吸附层表面时, 转入上述待净化溶液, 并用 1 mL 含 1% 氨水的 80% 甲醇洗涤离心管后一并上柱; 依次用 2 mL 1% 氨水溶液和 2 mL 甲醇淋洗; 最后用 2 mL 含 0.5% 甲酸的甲醇溶液重复洗脱 2 次, 用 10 mL 离心管收集, 在常温下氮吹近干, 残渣用 10% 甲醇溶解并定容至 0.5 mL, 混匀, 过 0.22 μm 滤膜后供液相色谱-串联质谱测定。

1.3 仪器条件

分析柱: ZORBAX Extend-C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相 A: 5 mmol/L 甲酸铵溶液; 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱程序: 0~30 min, 10%~45% B; 30~35 min, 45%~95% B; 35~35.1 min, 95%~10% B; 35.1~55 min, 10% B。流速: 150 μL/min, 柱温: 40 °C; 进样量: 2 μL。

电喷雾离子源(ESI+), 喷雾电压 3 500 V; 离子源温度 300 °C; 鞘气压力: 5 250 kPa; 辅助气流

量：1.5 mL/min；离子传输管温度：300 ℃，其他参数见表 1。

表 1 9 种生长素及其氨基酸结合物的母离子、子离子、透镜电压及碰撞能量

Table 1 Precursor ions, product ions, tube lenses and collision energy of 9 auxins and their amino acid conjugates

Auxin	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Tube lens (V)	Collision energy (V)
IAA (吲哚-3-乙酸)	176.1	130.2	83	16
IBA (吲哚-3-丁酸)	204.2	186.2	80	13
IAA - Asp (N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-天冬氨酸)	291.2	130.2	94	35
IAA - Phe (N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-苯丙氨酸)	323.2	130.2	85	35
IAA - Ile (N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-异亮氨酸)	289.3	130.2	95	32
IAA - Ala (N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-丙氨酸)	247.2	130.2	81	21
IAA - Trp (N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-色氨酸)	362.2	130.2	96	32
IAA - Val (N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-缬氨酸)	275.2	130.2	90	23
IAA - Leu (N-(羟吲哚-3-乙酰)-L-亮氨酸)	289.3	130.2	91	34

2 结果与讨论

2.1 LC - MS/MS 条件优化

实验采用蠕动泵注射方式，分别对 9 种目标物标准品进样，通过母离子扫描发现，所有目标物在正离子模式下均比负离子模式有更高的响应，且均为 $[M + H]^+$ 峰。经子离子扫描发现，IAA 的母离子 $[M + H]^+$ 脱 HCOOH 后产生丰度最高的 *m/z* 130.2 碎片离子（见图 1），因此，实验选择 *m/z* 176.1/130.2 为 IAA 的定性/定量离子对。

因 IAA 的 7 种氨基酸结合物结构相似，即 Asp、Ala、Val、Trp、Leu、Ile 及 Phe 均通过酰胺键与 IAA 相连接。经子离子扫描发现，这 7 种 IAA 氨基酸结合物均产生丰度最高的 *m/z* 130.2 二级离子，其碎裂机理为氨基酸结合物在吲哚环侧链上的同一位点发生断裂，最终形成 3-亚甲基吲哚的特征碎片离子（见图 2）。因此，选择 *m/z* 130.2 为 7 种氨基酸结合物的子离子。

对 IBA 进行二级质谱扫描（见图 3），发现其母离子 $[M + H]^+$ 分别经脱 H₂O、HCOOH、CH₃COOH 及 C₂H₅COOH 形成 *m/z* 186.2、158.3、144.2 及 130.2 的碎片离子，其中以 *m/z* 186.2 子离子的灵敏度最高且信号稳定，因此选择 *m/z* 204.2/186.2 为 IBA 的定性/定量离子对。9 种目标分析物的具体质谱参数见表 1。

在 LC - MS/MS 分析中，流动相主要对分析物的离子化效率产生影响，从而引起灵敏度的变化。实验分别考察了以乙腈 - 水和甲醇 - 水为流动相对目标分析物的分离效果，发现采用甲醇 - 水作流动相时目标分析物均具有更高的灵敏度，而向水相中添加 5 mmol/L 甲酸铵时，目标分析物可获得最佳的灵敏度和色谱分离度。图 4 为 9 种分析物在以甲醇 - 5 mmol/L 甲酸铵溶液为流动相梯度洗脱下的 LC - MS/MS 图。

2.2 样品提取

因生长素及其氨基酸结合物的极性较强，为将其从植物组织中提取完全，目前主要以 75%、80% 体积分数的甲醇 - 水体系作为提取试剂^[13,21]。实验考察了 60%、75%、80%、85% 和 100% 甲醇 - 水

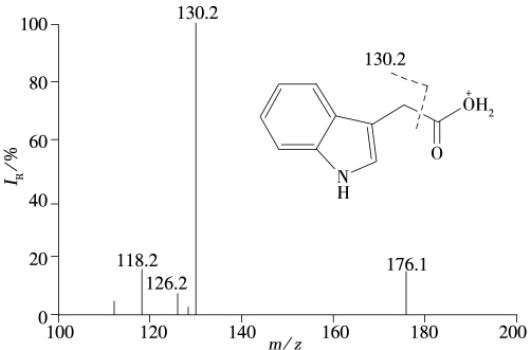


图 1 正离子模式下 IAA 的子离子扫描质谱图

Fig. 1 MS² spectra of IAA under positive ion mode

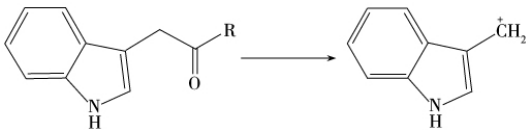


图 2 IAA 的 7 种氨基酸结合物的离子碎裂机理

Fig. 2 Fragmentation mechanisms for 7 amino acid conjugates of IAA

R: - Asp, - Ala, - Val, - Trp, - Leu, - Ile and - Phe

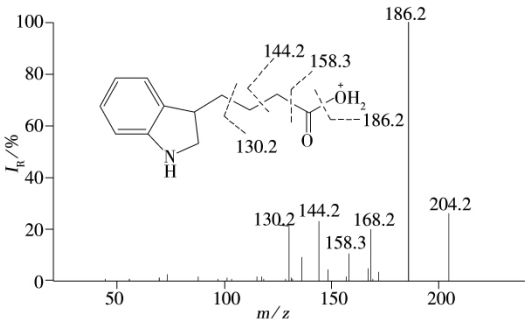


图 3 正离子模式下 IBA 的子离子扫描质谱图

Fig. 3 MS² spectra of IBA under positive ion mode

的提取效率, 每种溶剂对应的加标水平为 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (IAA 和 IAA - Asp 均为 $5\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$), 过 MAX 后测定其回收率。实验结果表明, 混合溶剂中甲醇含量越高回收率越低, 但甲醇含量较低会导致离子抑制效应增强, 综合考虑以 80% 甲醇为样品提取溶剂。实验还考察了不同提取时间(0、4、8、12、24 h)对提取效率的影响, 结果表明, 当提取时间达 12 h 时目标物的回收率均达到最大值, 随着提取时间的延长, 各目标物的回收率无明显变化, 因此, 实验选择提取时间为 12 h。

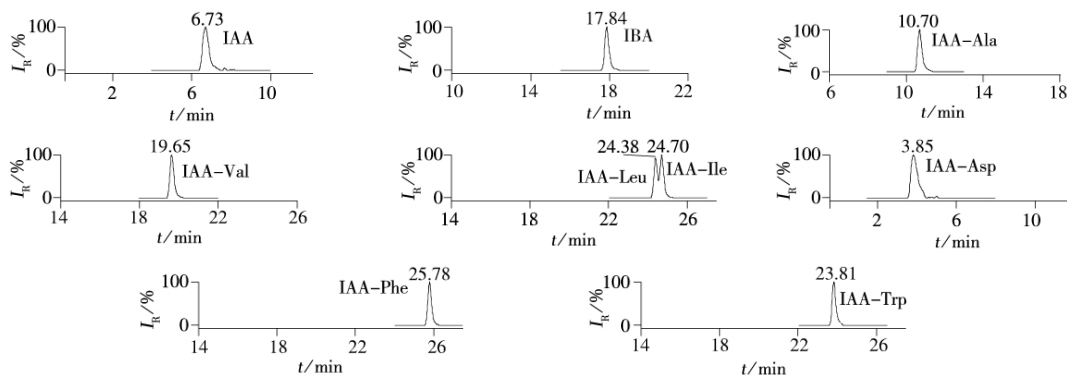


图 4 9 种分析物混合标准溶液的 LC-MS/MS 图

Fig. 4 LC-MS/MS chromatograms of 9 analytes mixed standard

2.3 MAX 净化条件的选择

MAX 是混合阴离子交换反相萃取柱, 主要的保留机理为强阴离子交换相互作用及非极性相互(反相)作用, 对弱酸性目标物具有很高的选择性。生长素及其氨基酸结合物的分子结构因具有羧基侧链而呈弱酸性, 本实验采用 MAX 对其净化, 并对上样溶剂组成和洗脱条件进行了优化。

试剂极性强弱和分析物的离子化程度是影响 MAX 对分析物吸附的主要因素, 但为简化样品前处理步骤, 实验仅对 80% 甲醇(与提取液组成保持一致)中的氨水含量进行了优化, 分别设计了含 0.1%、0.5%、1%、2% 氨水的 80% 甲醇溶液, 每种溶液中均含有 $50\ \mu\text{g}/\text{L}$ (IAA 和 IAA - Asp 均为 $2\ 000\ \mu\text{g}/\text{L}$) 的混标溶液, 按“1.2.2”方法中的上柱步骤操作并收集流出液。结果表明, 当溶液中含 1% 氨水时, 9 种目标物均不穿透, 为此, 方法选择含 1% 氨水的 80% 甲醇溶液为上柱前的溶剂。

为完全洗脱目标物, 实验预先用含 1% 氨水的 80% 甲醇溶液配制了均含有 $50\ \mu\text{g}/\text{L}$ (IAA 和 IAA - Asp 均为 $2\ 000\ \mu\text{g}/\text{L}$) 的混标溶液, 按“1.2.2”净化步骤进行。首先考察了洗脱液中甲酸含量的影响, 结果发现, 设定洗脱体积为 4 mL, 目标物的回收率随着甲酸含量增大而提高, 当甲酸含量达 0.5% 以上时, 所有目标物的回收率均在 85% 以上, 继续增大甲酸含量, 9 种目标物的回收率均无明显改善, 因此, 方法选择洗脱液中甲酸含量为 0.5%。实验进一步对洗脱体积进行考察。结果表明, 当实验采用 0.5% 的甲酸-甲醇溶液, 洗脱体积为 3 mL 时, 所有目标物的回收率均大于 84%, 继续增加洗脱体积, 9 种目标物的回收率趋于平稳, 考虑到方法的可靠性, 最终采用 4 mL 含 0.5% 甲酸的甲醇溶液为洗脱溶剂。

2.4 MAX 净化效果的考察

选用中浙优 1 号水稻品种, 以水稻叶作为研究对象, 预先分别添加 9 种待测物的标准品, 使其含量均为 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (IAA 和 IAA - Asp 为 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$), 分别按“1.2.1”步骤提取后, 1 份直接供 LC-MS/MS 测定, 另 1 份则经 MAX 净化后测定, 同时分别测定空白值, 计算各自回收率。提取液经 MAX 净化和未经净化的回收率比较结果见图 5。结果显示, 样品粗提液经 MAX 净化后, 除 IBA 和 IAA - Val 的回收率变化不明显外, IAA - Trp 的回收率从 88% 提高到 93%, IAA 从 78% 提高到 98%, 尤其是 IAA - Ala、IAA - Leu、IAA - Ile 和 IAA - Phe 4 种结合物, 其未

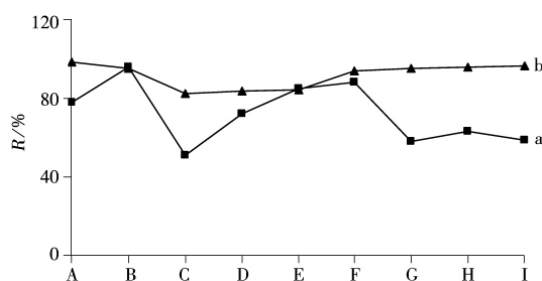


图 5 9 种分析物在未净化(a)和采用 MAX 净化(b)条件下的回收率比较

Fig. 5 Recovery comparison of 9 analytes without any cleanup (a) and with MAX cleanup (b)
A. IAA, B. IBA, C. IAA - Ala, D. IAA - Asp, E. IAA - Val, F. IAA - Trp, G. IAA - Leu, H. IAA - Ile, I. IAA - Phe

经净化的回收率均未超过 65%，而净化后的回收率均在 82% 以上。

为更好地反映 MAX 的除干扰能力，实验对 9 种分析物在各自定量下限附近的样品加标进行回收实验考察。以 IAA 为例，当 IAA 的样品加标水平为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时，提取液经 MAX 净化后，除绝对响应值显著提高外，基质噪音明显降低，信噪比由未经净化的 2.8 提高至 15.2 (见图 6)。

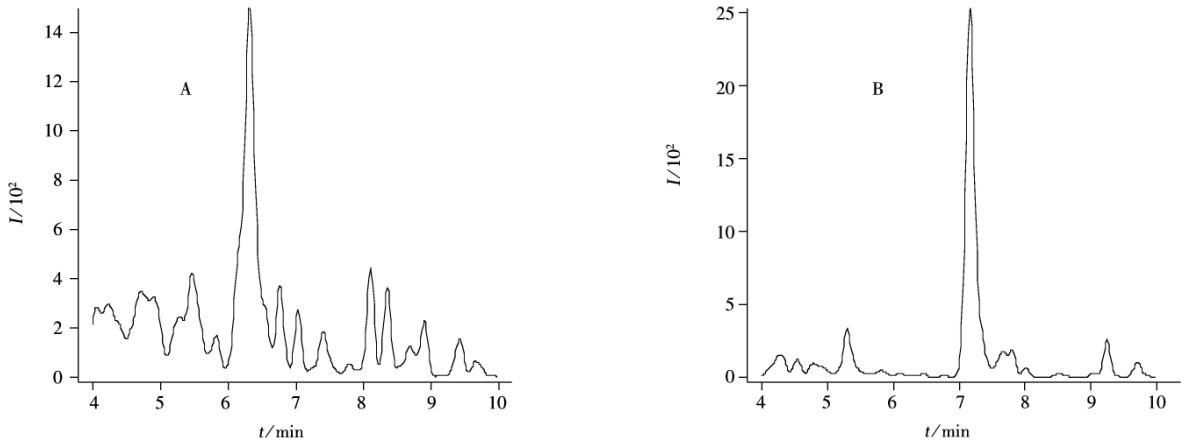


图 6 IAA 在未净化(A)和 MAX 净化(B)条件下的信噪比($n=5$)
Fig. 6 SNR of IAA without any cleanup(A) and with MAX cleanup(B) ($n=5$)

综上所述，MAX 能有效去除基质干扰，有利于提高方法准确度和降低方法检出限，适于本方法中 9 种分析物的净化。

2.5 方法的线性关系、检出限与精密度

取标准储备液，用 10% 甲醇配制一系列不同浓度的标准溶液，在最佳实验条件下进行测定，用色谱峰面积和浓度绘制标准曲线。结果表明，9 种分析物的线性良好，其线性范围、线性方程和相关系数(r)见表 2。通过基质加标并按 $S/N=3$ 确定方法检出限，9 种目标分析物的方法检出限为 0.01 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实验选用中浙优 1 号水稻为材料，对水稻根、茎、叶和籽粒 4 种基质分别进行 1、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2 个水平(IAA、IAA-Asp 为 500、5 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的加标回收实验($n=5$)，计算平均回收率和 RSD。结果表明，9 种分析物的平均加标回收率为 75% ~ 106%，RSD 为 3.6% ~ 15.2%。

表 2 9 种分析物的线性关系、检出限及 4 种基质的平均回收率和相对标准偏差($n=5$)
Table 2 Linear relationships, LODs of 9 analytes and their mean recoveries and RSDs obtained from 4 matrices($n=5$)

Auxin	Linear range $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	Linear equation	r	LOD $w/$ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	Added $w/$ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	Mean recovery $\bar{R}/\%$	RSD $s_r/\%$
IAA	10 ~ 5 000	$y = 40\,312x + 6\,619.4$	0.999 6	5	500, 5 000	89, 93	9.4, 3.6
IBA	0.1 ~ 500	$y = 36\,534x + 8\,095.4$	0.999 8	0.05	1, 10	79, 103	8.1, 7.3
IAA-Asp	50 ~ 5 000	$y = 1\,285.8x + 1\,858.0$	0.999 9	25	500, 5 000	75, 86	10.9, 7.2
IAA-Ala	0.02 ~ 200	$y = 64\,374x - 6\,158.0$	0.995 8	0.01	1, 10	97, 80	11.2, 8.7
IAA-Val	0.02 ~ 200	$y = 39\,899x + 3\,510.2$	0.999 8	0.01	1, 10	77, 93	7.7, 5.8
IAA-Trp	0.05 ~ 500	$y = 20\,203x + 1\,117.5$	0.999 6	0.03	1, 10	96, 88	6.3, 6.9
IAA-Leu	0.02 ~ 500	$y = 31\,567x - 5\,386.3$	0.999 6	0.01	1, 10	90, 106	15.2, 9.5
IAA-Ile	0.05 ~ 500	$y = 44\,178x + 3\,792.8$	0.999 7	0.03	1, 10	81, 84	12.1, 6.2
IAA-Phe	0.02 ~ 200	$y = 32\,846x + 3\,793.9$	0.999 9	0.01	1, 10	79, 85	7.4, 4.5

y : peak area; x : mass concentration($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.6 实际样品检测

选用中浙优 1 号水稻，于齐穗开花期选取生长整齐一致同日开花的单茎(穗)18 株，挂上纸牌，标记开花日期，并于开花后第 7 d 开始取其籽粒，每次取挂牌单穗主茎穗 3 株优势粒(即每穗顶部第 1、2、3 个第 1 次枝梗的着粒)，前 4 次每隔 3 d，后 2 次每隔 7 d 取样，按优化的测定条件分别对 IBA、IAA 及其 7 种氨基酸结合物进行动态变化测定。结果表明，IAA、IAA-Asp、IAA-Trp 和 IAA-Phe 均被检出(见表 3)。由表 3 看出，在籽粒灌浆阶段，内源 IAA、IAA-Asp 含量均维持在较高的水平，但各自呈现出不同规律，如随着灌浆过程的推移，籽粒中 IAA 的含量呈逐渐下降趋势，其含量从开花后

第 7 d 的 3 549 $\mu\text{g/kg}$ 下降至第 35 d 时的 757. 7 $\mu\text{g/kg}$, 而 IAA – Asp 却整体呈上升趋势(除开花后第 15 d 的 2 026 $\mu\text{g/kg}$ 外), 其含量从 2 134 $\mu\text{g/kg}$ 上升至 4 551 $\mu\text{g/kg}$ 。此外, IAA – Trp 和 IAA – Phe 的含量分别在 1. 59 ~ 3. 39 $\mu\text{g/kg}$ 和 0. 06 ~ 0. 33 $\mu\text{g/kg}$ 间变化, 而其它 5 种生长素均未检出。

表 3 不同开花期水稻籽粒中 9 种分析物的测定结果 ($n=3$)
Table 3 Analytical results of 9 analytes in seed harvested at different flowering stages of rice ($n=3$) $w/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$

Auxin	Sampling time					
	7 th (第 7 天)	11 th (第 11 天)	15 th (第 15 天)	19 th (第 19 天)	27 th (第 27 天)	35 th (第 35 天)
IAA	3 549	2 465	2 207	1 451	1 182	757. 7
IAA – Asp	2 134	2 720	2 026	2 869	3 353	4 551
IAA – Trp	3. 35	3. 22	3. 04	1. 86	3. 39	1. 59
IAA – Phe	0. 30	0. 22	0. 33	0. 27	0. 06	0. 14

3 结 论

本文建立了水稻中 9 种内源生长素及其氨基酸结合物的液相色谱 – 串联质谱检测方法, 分别对仪器条件、样品提取条件进行了优化, 研究并确定了混合阴离子交换反相固相萃取的最佳净化条件。结果表明, 混合阴离子交换反相固相萃取柱能有效去除基质干扰, 并提高分析灵敏度和方法的准确性, 加标回收实验及实际样品的测定结果表明, 本方法准确、可靠, 具有较高的实用性, 可为相关生长素生理方面的后续研究提供有力的技术支撑。

参考文献:

[1] Teale W D, Paponov I A, Palme K. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2006**, 7(11): 847 – 859.

[2] Friml J, Benfey P N, Benkova E, Bennett M, Berleth T, Geldner N, Grebe M, Heisler M, Hejatko J, Jurgens G, Laux T, Lindsey K, Lukowitz W, Luschig C, Offringa R, Scheres B J G, Swarup R, Torres R R, Weijers D, Zazimalova E. *Trends Plant Sci.*, **2006**, 11(1360/1385): 12 – 14.

[3] Sreevidya V S, Oane R J H, Gyaneshwar P, Flores M L, Ladha J K, Reddy P M. *Plant Sci.*, **2010**, 178(6): 531 – 538.

[4] Wang F, Cheng F M. *Mod. Agric.* (王丰, 程方民. 现代化农业), **2003**, 20(10): 20 – 21.

[5] Park J E, Park J Y, Kim Y S, Staswick P E, Jeon J, Yun J, Kim S Y, Kim J, Lee Y H, Park C M. *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282(13): 10036 – 10046.

[6] Normanly J, Slovin J P, Cohen J D. *Plant Physiol.*, **1995**, 107(2): 323 – 329.

[7] Woodward A W, Bartel B. *The Plant Cell*, **2005**, 17(9): 2425 – 2429.

[8] Müller L. *J. Exp. Bot.*, **2011**, 62(6): 1757.

[9] Davies P J. *Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!*. Netherlands: Springer, **2010**: 36 – 62.

[10] Lu Q M, Zhang L, Chen T W, Lu M H, Chen G N. *Sci. China: Ser. B*(卢巧梅, 张兰, 陈天文, 卢明华, 陈国南. 中国科学: B 辑), **2009**, (8): 785 – 792.

[11] Cao J, Miao L, Liu J X, Qi X Y. *Chin. J. Anal. Chem.* (曹进, 苗兰, 刘建勋, 戚雪勇. 分析化学), **2011**, 39(3): 367 – 371.

[12] Chen H, Guo X F, Zhang H S, Wang H. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879(20): 1802 – 1808.

[13] Lu Q M, Chen L H, Lu M H, Chen G N, Zhang L. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58(5): 2763 – 2770.

[14] Liu H T, Li Y F, Luan T G, Lan C Y, Shu W S. *Chromatographia*, **2007**, 66(7): 515 – 520.

[15] Tam Y Y, Epstein E, Normanly J. *Plant Physiol.*, **2000**, 123(2): 589 – 595.

[16] Tucker G A, Roberts J A. *Plant hormone protocols*. UK: Humana Press, **2000**: 49 – 66.

[17] Ribnicky D M, Cooke T J, Cohen J D. *Planta*, **1997**, 204(1): 1 – 7.

[18] Matsuda F, Miyazawa H, Wakasa K, Miyagawa H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2005**, 69(4): 778 – 783.

[19] Pěnčík A, Rolčík J, Novák O, Magnus V, Barták P, Buchtík R, Sondi B S, Strnad M. *Talanta*, **2009**, 80(2): 651 – 655.

[20] Izumi Y, Okazawa A, Bamba T, Kobayashi A, Fukusaki E. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 648(2): 215 – 225.

[21] Kojima M, Nobusada T N, Komatsu H, Takeik, Kuroha T, Mizutani M, Ashikari M, Tanaka M U, Matsuoka M, Suzuki K, Sakakibara H. *Plant Cell Physiol.*, **2009**, 50(7): 1201 – 1214.