

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.03.003

# 利用高效液相色谱法同时测定 枇杷果实中10种植物激素<sup>①</sup>

李 华, 郭启高, 梁国鲁, 何 桥

西南大学 园艺园林学院/南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400716

**摘要:** 以三倍体枇杷花和幼果为研究材料, 建立了一套可同时分离和测定玉米素、赤霉素、激动素、水杨酸、6-苄氨基腺嘌呤、苯甲酸、吲哚乙酸、脱落酸、吲哚丁酸和茉莉酸10种植物激素的方法。在甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH值为3.0)体积比为20:20:60为流动相, 流速为1 mL/min, 柱温35℃, 波长为210 nm和254 nm条件下, 测定枇杷幼果中10种激素, 其线性相关系数在0.9915以上, 加标回收率在58.6%~85.2%之间; 检出限在0.004~4.92 ng之间, 精密度在0.026%~3.05%之间。此外, 利用该方法对番茄和甘蓝叶片中10种内源激素含量进行了验证, 表明该方法可用于植物中多种激素的同时测定。

**关键词:** 高效液相色谱; 枇杷; 植物激素; 果实发育

**中图分类号:** S667.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2018)03-0018-08

植物内源激素(plant pytohormones)是植物体内自身合成的、能从产生部位运输到作用部位并在低浓度(小于 $1\mu\text{mol/L}$ )下具有生理作用的微量小分子物质, 其在植物发育的多个生理过程和环境刺激反应中发挥着重要作用。传统观点认为植物激素有五大类: 生长素(IAA, Indole-3-acetic acid)、细胞分裂素(CKs, Cytokinins)、赤霉素类(GA, Gibberellins)、乙烯(ETH, ethylene)和脱落酸(ABA, abscisic acid)。新近的研究将油菜素内酯(BR, brassinosteroid)、茉莉酸(JA, jasmonic acid)、水杨酸(SA, salicylic acid)和独脚金内酯(SLs, strigolactones)等具有生长调节活性的信号分子也作为了植物激素成员<sup>[1]</sup>, 目前的内源激素测定仍以五大类激素为主。

植物激素在植物体内的含量极低, 检测过程中容易受色素、多酚等次生代谢物的干扰。因此, 如何快速、准确、高效地测定植物内源激素含量一直是困扰科学家的重要难题。目前常用的植物激素检测方法有酶联免疫检测法、高效液相色谱法、超高效液相色谱法、超高效液相色谱-质谱法、超高效液相色谱-质谱/质谱法等, 其中酶联免疫检测法具有简单和成本低廉等特点, 但其检测信号灵敏度较低, 重复性较差。色谱与质谱联用技术虽然可以在较短时间内分离鉴定多种植物激素, 但由于前处理技术要求和成本高, 未得到广泛运用。而高效液相色谱法具有易操作、灵敏度高和稳定性好等特点, 已成为分析测定植物激素的主要方法之一, 现已成功应用于李<sup>[2]</sup>、榛子<sup>[3]</sup>、苹果<sup>[4]</sup>、芒果<sup>[5]</sup>、骏枣果实<sup>[6]</sup>、梨<sup>[7]</sup>等木本植物的 IAA、

① 收稿日期: 2017-03-27

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2013BAD02B02); 重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2014jcyjA80006); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2015C164, XDJK2016E144)。

作者简介: 李 华(1990-), 女, 河南鹤壁人, 硕士研究生, 主要从事果树资源与遗传育种研究。

通信作者: 何 桥, 副研究员, 硕士研究生导师。

ABA、ZT 和  $GA_3$  等激素含量测定。曾庆钱等<sup>[8]</sup>利用高效液相色谱法测定了荔枝根、叶和果实中的 IAA、 $GA_3$ 、ABA 和 ZT(回收率分别为 78.52%, 82.36%, 79.83% 和 78.57%), 保留时间稳定, 试验重现性好。马海燕<sup>[9]</sup>采用高效液相色谱法测定了葡萄植株生长周期中冬芽、新梢、叶片、果实 4 个部位的 IAA、 $GA_3$ 、ABA 3 种内源激素的含量变化过程, 其样品中添加混标的回收率达到 98.65% 以上。陈建华等<sup>[10]</sup>运用高效液相色谱方法测定了板栗枝条的 IAA、ABA、ZT 和  $GA_3$  4 种内源激素, 同时提取与纯化的过程连续使用 3 种分离柱的方法, 取得了良好效果。

枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.) 属于蔷薇科亚热带常绿木本果树, 原产于中国东南部, 目前广泛分布于世界各地包括中国、日本、印度、巴基斯坦、埃及、希腊、以色列、意大利、西班牙和土耳其等<sup>[11-14]</sup>。枇杷果实酸甜可口, 具有丰富的营养物质, 并且具有润喉、止咳、健胃等多种药用价值, 深受消费者喜爱<sup>[15]</sup>。然而, 枇杷的种子数目多, 平均单果含有 3~5 粒种子, 并且种子较大, 约占果实总重量的 20%~30%, 可食率较低。目前, 植物多倍体基因表达研究相当活跃也取得了很大进展。染色体的倍性能改变基因的表达模式, 而基因表达模式的改变和功能的变化最终会导致表型的变化<sup>[16]</sup>。本研究小组自 1997 年开始率先进行天然三倍体枇杷的选育, 已从筛选得到的三倍体种质资源中优选出大果、无籽、优质新品种 3 个, 但三倍体枇杷自然结实率非常低, 人为施加适量的外源  $GA_3$  则可以提高坐果率, 保证其果实生长发育, 提高产量。本研究旨在通过建立高效液相色谱法同时测定枇杷果实发育过程中的 10 种植物激素的方法, 检测三倍体无籽枇杷果实发育过程中内源激素的含量变化, 为深入解析无籽枇杷坐果的机制提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

2015 年 10 月在重庆市枇杷工程技术中心种质资源圃对盛花期三倍体枇杷 A322 株系及二倍体同源株系大五星进行单花处理(每个株系选取 3 株)。选取露白末期的花朵, 去除雄蕊后涂抹浓度为 100 mg/L  $GA_3$ , 以清水(含 0.1% 吐温-80)和无处理为对照。分别对处理当天和处理后 1 d、2 d、3 d、5 d、10 d、15 d、20 d、25 d 和 30 d 不同处理单花进行取样。每个株系采取混合取样, 每个单株取 4 个不同方位共 15~20 朵花。验证试验的甘蓝和番茄叶片取自重庆市级高校蔬菜学重点实验室盆栽苗。

### 1.2 试验方法

标准品的配置: 配制 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ZT、KT、IAA、6-BA、IBA 标准母液, 2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $GA_3$ 、SA、BA、IBA、JA 标准母液, 所有标样购于 sigma-aldrich 公司。样品用液氮研磨成细粉, 称取 50 mg 左右干粉, 加入 0.5 mL 异丙醇/水/盐酸(V/V/V=2:1:0.002), 4  $^{\circ}\text{C}$  下 100 rpm 震荡 1 h。加入 1 mL 二氯甲烷 4  $^{\circ}\text{C}$  震荡 1 h。4  $^{\circ}\text{C}$  13 000 g 离心 5 min, 取下清溶液。经氮气吹干后, 加入 1 mL 80% 甲醇溶液溶解样品。C18 固相萃取小柱(500 mg, 3 mL)用 6 mL 甲醇活化, 6 mL 80% 甲醇平衡后, 将提取的样品过柱纯化, 用 1 mL 80% 甲醇洗脱, 收集洗脱液。然后氮气吹干, 加入 500  $\mu\text{L}$  色谱甲醇溶液溶解, 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤后注入 2 mL 棕色上样瓶, 置于-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中避光保存备用。

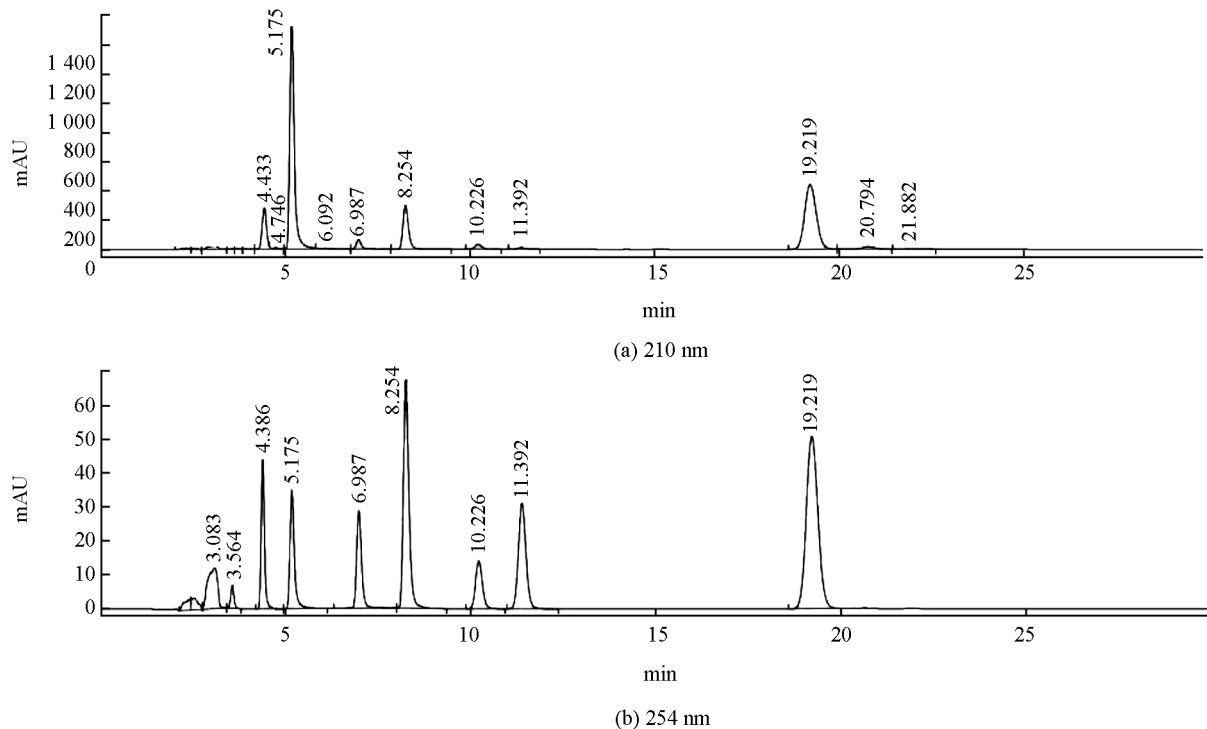
色谱条件: 检测仪器为 Agilent 1260 LC 高效液相色谱仪, C18 色谱柱(250 mm $\times$ 46 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Dikma 公司产品), G1314B 紫外检测器。流动相: 甲醇(A): 乙腈(B): 磷酸缓冲液(C)(pH 值为 3.0)=20:20:60; 等度洗脱; 流速 1 mL/min; 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 测定时间 30 min; 检测波长: IAA、IBA 和 JA 为 210 nm; ZT、 $GA_3$ 、KT、SA、6BA、BA、ABA 为 254 nm。

数据分析: 根据植物激素标准品的保留时间对样品中的植物激素定性, 外标曲线计算植物激素的含量。试验数据用 Excel 和 origin 9.0 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的优化

以 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸甲醇溶液为流动相, 参考 Pan 等的方法<sup>[17]</sup> 进行梯度洗脱, 10 种激素不能完全分开, 峰形较差. 改变流动相以甲醇(A): 乙腈(B): 磷酸缓冲液(C)(pH 值为 3.0)=20: 20: 60, 进行等度洗脱后基线较好, 10 种激素可以完全分开. 取 10 种激素标准品溶液各 100  $\mu\text{L}$  配置成混合标样, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ , 混合标样色谱图如图 1 所示.



a 图(210 nm): IAA: 10.226 min; IBA: 19.219 min; JA: 20.794 min; b 图(254 nm): ZT: 3.083 min;  $\text{GA}_3$ : 3.564 min; KT: 4.386 min; SA: 5.175 min; 6-BA: 6.987 min; BA: 8.254 min; ABA: 11.392 min.

图 1 10 种植物激素混标在两种检测波长下的色谱图

### 2.2 测定方法的线性范围和检出限

将配制好的混合标样稀释成一系列梯度浓度, 在相同的色谱条件下测定其峰面积, 以浓度  $x$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为横坐标, 色谱峰面积( $y$ )为纵坐标得标准曲线, 并求出相应的线性回归方程及相关系数. 结果表明: 10 种内源植物激素在浓度范围内具有良好的线性关系, 相关系数在 0.991 5 以上. 按 3 倍信噪比计算得到标准样品中 10 种植物激素的检出限(表 1), 检出限在 0.004~4.92 ng 之间, 说明本研究对植物激素有较高的检测灵敏度.

表 1 10 种植物激素线性方程及方法检出限

标准样品	线性回归方程	相关系数/ $r^2$	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	检出限/ng
玉米素(ZT)	$y=22.127x+5.262$	0.991 5	0.15~10	0.01
赤霉素( $\text{GA}_3$ )	$y=0.412 3x-1.339 5$	0.995 9	1.00~200	1.41
激动素(KT)	$y=27.382x-2.767 1$	0.999 0	0.15~10	0.004
水杨酸(SA)	$y=1.524 2x-1.509 9$	0.998 6	0.40~200	0.09
6-苄氨基嘌呤(6-BA)	$y=25.842x-1.498 7$	0.998 8	0.02~10	0.009
苯甲酸(BA)	$y=3.364 1x-3.667 4$	0.998 6	0.40~200	0.062
吲哚乙酸(IAA)	$y=42.199x-1.919 1$	0.998 2	0.04~10	0.02
脱落酸(ABA)	$y=41.724x-2.753$	0.998 5	0.02~10	0.02
吲哚丁酸(IBA)	$y=5.611 4x-3.336$	0.998 4	0.40~200	4.92
茉莉酸(JA)	$y=2.252 4x+12.567$	0.997 4	1.00~200	0.84

### 2.3 测定方法的精密度

采用同样的色谱条件对混合标准溶液重复测定 3~5 次, ZT、GA<sub>3</sub>、KT、SA、6BA、BA、IAA、ABA、IBA 和 JA 峰面积相对标准偏差分别为 1.95%, 2.44%, 1.66%, 1.66%, 3.05%, 0.82%, 0.84%, 1.51% 和 1.41%, 在 0.026%~3.05% 之间. 结果表明: 本研究方法的重复性较好, 其精密度满足分析要求.

### 2.4 回收率测定

液氮研磨后称取两份相同质量的样品, 其中一份添加 200  $\mu$ L 混合标准溶液, 以不添加混标的样本为对照, 测定样品的回收率, 枇杷中 10 种激素的回收率测定结果如表 2 所示. 为了进一步检验本研究建立方法的适用性, 我们以番茄和甘蓝两种植物幼嫩叶片为样本测定了加标回收率, 如表 3 所示. 结果表明: 各种激素的回收率存在差异, 同一激素在不同植物中的回收率也不同. 3 种植物中, 枇杷幼果中回收率最高的是 JA(85.2%); 番茄嫩叶中回收率最低的是 BA(62.4%), 甘蓝中回收率最低和最高的分别是 ZT 和 JA, 分别为 60.9% 和 89.5%. 整体而言, 番茄和甘蓝中各种激素的回收率高于枇杷.

表 2 枇杷 10 种激素加标回收率的测定

标准样品	添加量/ $\mu$ g	检出量/ $\mu$ g, $n=3$	回收率/%
玉米素(ZT)	2	1.59	79.9
赤霉素(GA <sub>3</sub> )	40	31.42	78.6
激动素(KT)	2	1.35	67.3
水杨酸(SA)	40	24.13	60.3
6-苄氨基嘌呤(6-BA)	2	1.27	63.5
苯甲酸(BA)	40	23.45	58.6
吲哚乙酸(IAA)	2	1.41	70.6
脱落酸(ABA)	2	1.56	78.2
吲哚丁酸(IBA)	40	26.89	67.2
茉莉酸(JA)	40	34.07	85.2

表 3 番茄和甘蓝植物幼嫩叶片 10 种激素加标回收率的测定

标准样品	添加量/ $\mu$ g	番 茄		甘 蓝	
		检出量/ $\mu$ g, $n=3$	回收率/%	检出量/ $\mu$ g, $n=3$	回收率/%
玉米素(ZT)	2	2.02	101.0	1.22	60.9
赤霉素(GA <sub>3</sub> )	40	33.96	84.9	25.4	63.5
激动素(KT)	2	1.34	65.2	1.39	69.3
水杨酸(SA)	40	31.84	79.6	26.9	67.2
6-苄氨基嘌呤(6-BA)	2	1.42	71.1	1.53	76.2
苯甲酸(BA)	40	24.96	62.4	29.8	74.4
吲哚乙酸(IAA)	2	1.42	70.8	1.66	82.8
脱落酸(ABA)	2	1.74	86.8	1.79	89.4
吲哚丁酸(IBA)	40	30.8	76.9	33.44	83.6
茉莉酸(JA)	40	24.4	68.2	35.8	89.5

### 2.5 枇杷果实发育过程中植物激素的测定

对三倍体 A322 和二倍体大五星枇杷果实发育早期的激素测定结果表明: SA 和 GA<sub>3</sub> 的含量相对较高, 二倍体中各激素含量普遍高于三倍体, 且各激素含量的变化趋势在二倍体和三倍体中存在差异. 自然条件下, 二倍体枇杷开花当天 GA<sub>3</sub> 含量明显增加, 随后迅速降低, 在花后 20 d 左右又增加, 而同样处理的三倍

体中  $GA_3$  含量一直呈降低趋势, 赤霉素处理和二倍体和三倍体中  $GA_3$  含量变化趋势基本一致, 在开花后一直降低, 而清水处理条件下, 三倍体枇杷在开花后第 3 d  $GA_3$  含量骤然上升然后迅速降低, 而二倍体枇杷同时期条件下呈现出先降低后升高, 变化幅度相对较小, 导致这种变化的原因尚未探明(图 2)。

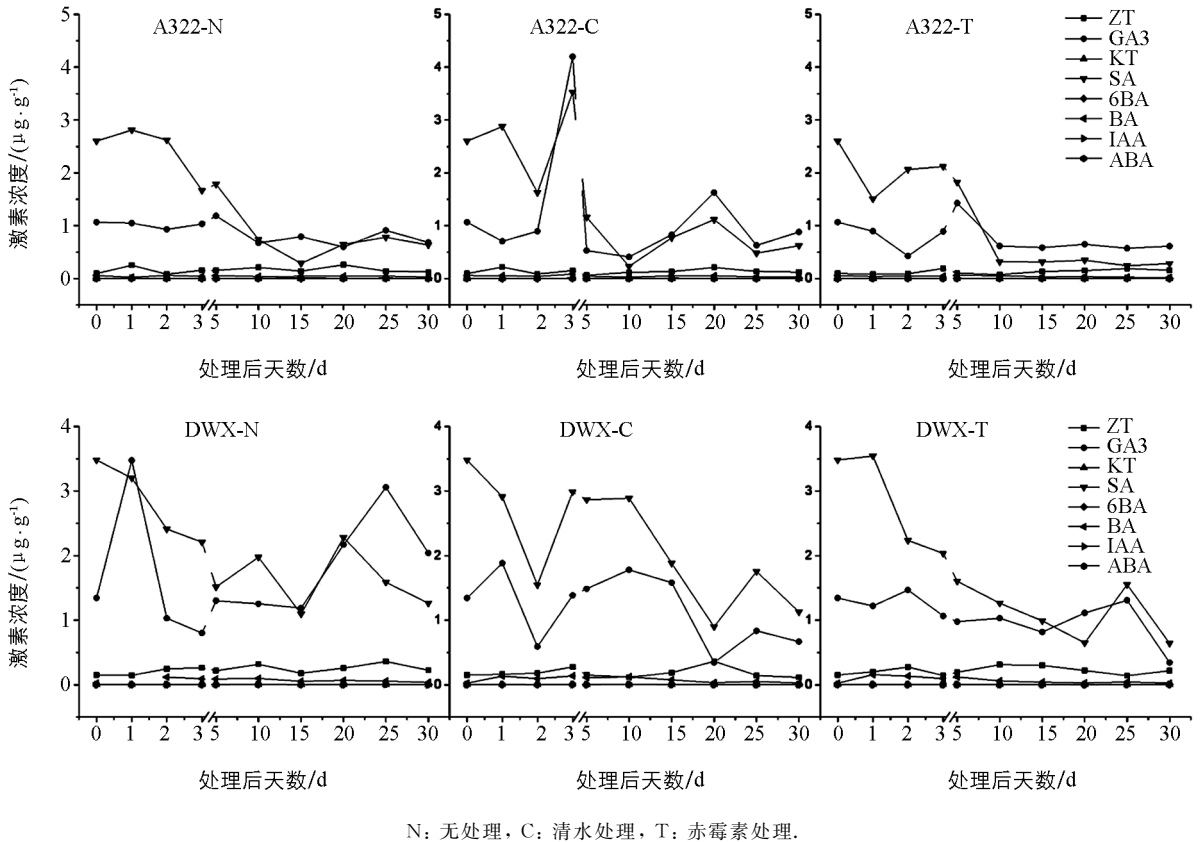


图 2 三倍体和二倍体枇杷果实发育早期各激素含量变化情况

## 3 讨论

### 3.1 木本植物提取剂的选择和 C18 固相萃取小柱的应用

样品前处理是激素分析的关键环节之一, 前处理的好坏决定着分析的准确性和精密度. 木本植物具有组织多年生、结构复杂、单宁、黄酮醇、香豆酸等次生代谢物多等原因而造成杂质干扰对样品的前处理要求高<sup>[18]</sup>. 因此, 针对木本植物组织应采用适合的前处理方法. 植物中激素提取最常用的提取剂是 80% 的甲醇<sup>[19-21]</sup>, 4 °C 黑暗浸提过夜和旋转蒸发浓缩, 分离时水相(含 ZT)和有机相(含 IAA、ABA 和  $GA_3$  等)的植物激素需要分别进行提取纯化, 整个提取过程复杂且花费时间较长. Pan 等<sup>[17]</sup>采用异丙醇/水/浓盐酸=2/1/0.002(V/V/V)及二氯甲烷在短时间内同时提取了样品中的 IAA、CK、ABA、GAs、JA、SA 及其甲酯态化合物. 近几年参照此法测定植物内源激素的研究较多, 雷静等<sup>[22]</sup>参照此方法并进行改进, 在短时间内测定了马铃薯中的  $GA_3$  含量. 邓文红等<sup>[23]</sup>利用该方法测定了菊科植物油蒿叶片的激素含量, 取得了较理想的结果.

本试验参照 Pan 等<sup>[17]</sup>的方法测定枇杷内源激素时, 杂质干扰较大, 不能很好地分离各目标物质. 因此, 本试验中增加了 C18 固相萃取小柱纯化处理过程, 但样品过柱后回收率同比降低了 20% 左右. 卢巧梅等<sup>[21]</sup>采用固相萃取柱对水仙样品中的 IAA、ABA 和  $GA_3$  进行了富集纯化, 加标回收率在 81.0%~94.0% 之间. 杨途熙等<sup>[19]</sup>利用高效液相色谱法同时分离测定了仁用杏花芽中的 ZT、 $GA_3$ 、IAA、6-BA、ABA、IBA、秋水仙素和腺素 8 种植物激素, 但样品未进行纯化处理, 样品加标回收率较高, 在 95.4%~

103.5%之间. 这可能是由于固相萃取小柱除杂的纯化方法的基质效应较大, 纯化过程复杂且激素的损失较大, 而萃取后直接上样分析可以减少激素的损失. 此外, 本试验结果表明, 枇杷花和幼果中各激素的加标回收率在 58.6%~85.2%之间, 而草本植物番茄和甘蓝叶片中各激素的加标回收率在 60.9%~101%之间, 整体较枇杷的回收率高, 其原因可能由于所用组织部位的不同.

### 3.2 植物激素测定的波长选择

已报道的高效液相色谱同时检测多种植物激素的含量方法采用的波长为 254 nm. 陈波浪等<sup>[24]</sup>和吴红京等<sup>[25]</sup>选用了 254 nm 波长同时检测 ZT、GA、IAA 和 ABA 几种激素. 杨途熙等<sup>[19]</sup>以 254 nm 为检测波长同时测定了 ZT、GA<sub>3</sub>、IAA、6-BA、ABA、IBA、秋水仙素和腺素 8 种植物激素. 本试验通过全波长扫描发现 IAA 和 IBA 在 210 nm 和 273 nm 左右处各有 1 个吸收峰, 且 273 nm 处小于 210 nm 处的吸收峰, 而在 254 nm 处吸收峰值较小, 因此本试验选取 210 nm 波长用于 IAA 和 IBA 含量的测定, 以提高检测的灵敏度. 此外, 植物激素单标检测时发现 JA 在 210 nm 处基线较 254 nm 处平稳, 因此选择 210 nm 作为 JA 的检测波长. 综合文献报道及全波长扫描结果, 最终选取 210 nm 和 254 nm 作为本研究检测 10 种激素的波长.

### 3.3 枇杷果实发育过程中多种植物激素的测定

植物激素的种类和含量变化与果实的发育密切相关. 如施加外源性植物激素(GA<sub>3</sub>、IAA 和 CKs 等)可以诱导果实单性结实<sup>[26]</sup>, 比如柑橘<sup>[27]</sup>、苹果<sup>[28-29]</sup>、梨<sup>[30]</sup>、枇杷<sup>[31]</sup>、桃子<sup>[32]</sup>、西瓜<sup>[33]</sup>、番茄<sup>[34-35]</sup>和猕猴桃<sup>[36]</sup>等. 前人的研究普遍认为 GA<sub>3</sub> 含量较高被认为有助于促进坐果. 本试验结果显示, 枇杷果实发育初期, 二倍体枇杷 GA<sub>3</sub> 含量高于三倍体同时期, 三倍体枇杷经外源 GA<sub>3</sub> 处理后内源 GA<sub>3</sub> 含量有所增加, 这与 GA 促进坐果理论相一致. 除了 GA<sub>3</sub>, 在枇杷幼果中还检测到 ZT、KT、SA、6-BA、BA、IAA、ABA、IBA 和 JA 9 种植物激素, 说明果实发育是多种激素相互作用的结果.

在果实发育初期除 JA 和 IBA 两种激素在部分样本中未检测到外, 其余激素在各个时期的样品中均能检出, 各激素色谱图分离效果较好, 表明本研究建立的方法可用于枇杷等植物激素含量的分离和测定研究.

### 参考文献:

- [1] TARKOWSKÁ D, NOVÁK O, FLOKOVÁ K, et al. Quo Vadis Plant Hormone Analysis? [J]. *Planta*, 2014, 240(1): 55-76.
- [2] 高佳缘. “绥李三号”李芽内源植物激素动态变化规律的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [3] 李 宁, 苏淑钗, 陆小辉, 等. 榛子果实生长中激素变化规律的研究 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2013, 33(2): 69-72.
- [4] 王献革, 郝 婕, 李学营, 等. HPLC 法测定苹果实生苗叶片生长过程中内源激素含量变化的研究 [J]. *河北农业科学*, 2013, 17(5): 27-30.
- [5] 杨 杨, 范 蓓, 生吉萍, 等. 高效液相色谱法测定芒果皮中脱落酸的含量 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(2): 76-79.
- [6] 于 婷, 李建贵, 侍 瑞, 等. 骏枣果实中的内源激素含量与其生理落果的关系 [J]. *经济林研究*, 2016, 34(2): 45-49.
- [7] 刘 雅, 张虎平, 张绍铃, 等. 梨萌芽期僵芽和正常芽的生理差异分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2016, 39(3): 373-378.
- [8] 曾庆钱, 陈厚彬, 鲁才浩, 等. HPLC 测定荔枝不同器官中内源激素流程的优化 [J]. *果树学报*, 2006, 23(1): 145-148.
- [9] 马海燕. 葡萄生长过程中内源激素含量变化的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [10] 陈建华, 曹 阳, 李昌珠, 等. 板栗内源激素的高效液相色谱测定方法 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2004, 24(5): 39-41.

- [11] LIN S, SHARPE R H, JANICK J. Loquat; Botany and Horticulture [J]. Horticultural Reviews, 1999, 23: 233—276.
- [12] MARTINEZCALVO J, BADENSE M L, LLACER G, et al. Phenological Growth Stages of Loquat Tree (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) [J]. Annals of Applied Biology, 2008, 134(3): 353—357.
- [13] GISBERT A D, ROMERO C, MARTÍNEZCALVO J, et al. Genetic Diversity Evaluation of a Loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) Germplasm Collection by SSRs and S-Allele Fragments [J]. Euphytica, 2009, 168(1): 121—134.
- [14] PAREEK S, BENKEBLIA N, JANICK J, et al. Postharvest Physiology and Technology, of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Fruit [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2014, 94(8): 1495—1504.
- [15] 徐 波, 姜 琬, 李晓林, 等. “大五星”天然三倍体枇杷株系的 SSR 分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(3): 22—27.
- [16] 李晓荣, 李加纳. 芸薹属二倍体种、四倍体种及人工合成多倍体的基因表达差异 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(6): 27—34.
- [17] PAN X, WELTI R, WANG X. Quantitative Analysis of Major Plant Hormones in Crude Plant Extracts by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [J]. Nature Protocols, 2010, 5(6): 986—992.
- [18] 杨 婕, 张日清, 金晓玲. 高效液相色谱法在木本植物内源激素含量检测中的应用 [J]. 经济林研究, 2010, 28(1): 122—126.
- [19] 杨途熙, 魏安智, 郑 元, 等. 高效液相色谱法同时分离测定仁用杏花芽中 8 种植物激素 [J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1359—1361.
- [20] LU Q, ZHANG L, CHEN T, et al. Identification and Quantitation of Auxins in Plants by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(16): 2565—2572.
- [21] 卢巧梅, 张 兰, 陈天文, 等. 液相色谱-串联质谱分析盐胁迫下植物激素的含量变化 [J]. 中国科学 B 辑: 化学, 2009, 39(8): 785—792.
- [22] 雷 静, 许立兴, 崔新仪, 等. 高效液相色谱法测定马铃薯中 GA<sub>3</sub> 含量 [J]. 保鲜与加工, 2016(4): 123—127.
- [23] 邓文红, 张俊琦. UPLC-MS/MS 测定油蒿叶片中 4 种内源植物激素 [J]. 植物学研究, 2015, 4(1): 1—7.
- [24] 陈波浪, 郑春霞, 盛建东, 等. HPLC 分离和测定棉花中 3 种植物激素 [J]. 新疆农业大学学报, 2006, 29(1): 28—30.
- [25] 吴红京, 宋虎卫, 唐根源, 等. (木奈)果实中内源激素的高效液相色谱测定 [J]. 福建分析测试, 2003, 12(3): 1792—1795.
- [26] PANDOLFINI T. Seedless Fruit Production by Hormonal Regulation of Fruit set [J]. Nutrients, 2009, 1(2): 168—177.
- [27] MESEJO C, YUSTE R, REIG C, et al. Gibberellin Reactivates and Maintains Ovary-Wall Cell Division Causing Fruit Set in Parthenocarpic Citrus, Species [J]. Plant Science, 2016, 247: 13—24.
- [28] DAVISON R M. Fruit-Setting of Apples using Gibberellic Acid [J]. Nature, 1960, 188(4751): 681—682.
- [29] WATANABE M, SEGAWA H, MURAKAMI M, et al. Effects of Plant Growth Regulators on Fruit Set and Fruit Shape of Parthenocarpic Apple Fruits [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2008, 77(4): 350—357.
- [30] NIU Q F, WANG T, LI J Z, et al. Effects of Exogenous Application of GA<sub>4</sub>+7, and N-(2-Chloro-4-Pyridyl)-n'-Phenylurea on Induced Parthenocarpy and Fruit Quality in *Pyrus pyrifolia*, 'cuiguan' [J]. Plant Growth Regulation, 2015, 76(3): 251—258.
- [31] GOUBRAN F H, EL-ZEFTAWI B M. Induction of Seedless Loquat [J]. Acta Horticulturae, 1986, 1(179): 381—384.
- [32] KIYOKAWA I, NAKAGAWA S. Parthenocarpic Fruit Growth and Development of the Peach as Influenced by Gibberellin Application [J]. Engei Gakkai Zasshi, 1972, 41(2): 133—143.
- [33] NEWBURY H J, SEDGLEY M, POSSINGHAM J V. Nucleic Acid Metabolism During Early Development of Pollinated and Auxin-induced Parthenocarpic Watermelon Fruits [J]. Journal of Experimental Botany, 1978, 29(108): 207—215.

- [34] ANDERSEN J A, SCHIODT T. Genetic Engineering of Parthenocarpic Fruit Development in Tomato [J]. *Molecular Breeding*, 1999, 5(5): 463–470.
- [35] DING J, CHEN B, XIA X, et al. Cytokinin-Induced Parthenocarpic Fruit Development in Tomato Is Partly Dependent on Enhanced Gibberellin and Auxin Biosynthesis [J]. *Plos One*, 2013, 8(7): e70080.
- [36] DAVID H. LEWIS, BURGE G K, SCHIMMERER D M, et al. Cytokinins and Fruit Development in the Kiwifruit (*Actinidia Deliciosa*). II. Effects of Reduced Pollination and CPPU Application [J]. *Physiologia Plantarum*, 1996, 98(1): 187–195.

## Simultaneous Analysis of Ten Plant Hormones in Loquat Fruitlet by High-Performance Liquid Chromatography

LI Hua, GUO Qi-gao, LIANG Guo-lu, HE Qiao

*School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400716, China*

**Abstract:** In this study, a high-performance liquid chromatography method was established for simultaneously determining ten phytohormones (trans-zeatin, gibberellin A<sub>3</sub>, kinetin, salicylic acid, 6-benzylaminopurine, benzoic acid, indole-3-acetic acid, abscisic acid, indole-3-butyric acid and jasmonic acid) in triploid loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl.) flowers and fruitlet. The above-mentioned ten phytohormones were detected under the following conditions: reversed-phase column Dikma C18 (250 mm × 46 mm, 5 μm) at a temperature of 35°C, methanol /acetonitrile /phosphate buffer (pH=3.0) (20 : 20 : 60, vol/vol/vol) mixture as the mobile phase with a flow rate of 1 mL/min and a determination wavelength of 210 and 254 nanometer. The standard calibration curves of the ten phytohormones all showed a high linearity, the correlation coefficients being above 0.991 5. Their limits of detection ranged from 0.004 to 4.92 ng, with a relatively high precision (%RSD=0.026%–3.05%) and accuracy (% recovery=58.6%–85.2%). Then, this method was used to monitor the changes of phytohormone contents during the development of loquat fruitlet, and *Lycopersicon esculentum* and *Brassica oleracea* young leaves, and the results were satisfactory, suggesting that this method is an efficient tool for routine screening of phytohormone contents in various plants.

**Key words:** HPLC; loquat; plant hormone; fruit development

责任编辑 欧 宾



