

超高效液相色谱—三重四级杆质谱联用法同时测定荔枝中4种细胞分裂素¹

黄雨莲¹, 赵明磊^{1,2}, 马兴帅^{1,2}, 李建国^{1,2*}, 徐婧^{1*}

(¹农业农村部华南地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 园艺学院, 广州 510642; ²广东荔枝工程中心, 广州 510642)

摘要:【目的】应用超高效液相色谱—三重四级杆质谱联用仪 (UPLC-MS/MS), 建立一种同时测定荔枝反式玉米素核苷 (tZR)、异戊烯基腺嘌呤核苷 (IPR)、二氢玉米素 (DHZ)、异戊烯基腺嘌呤 (IP) 4种细胞分裂素的方法。【方法】0.25 g 荔枝样品用乙腈-水 (80:20, 体积比) 溶液浸提 8 h, 经 Bond Elut Plexa PCX 固相萃取柱纯化, 2.5% 氨水甲醇洗脱后过 0.22 μm 有机滤膜检测。选取 XSelect HSS T3 色谱柱, 以甲醇和 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液为流动相进行 7 min 梯度洗脱, 采用电喷雾正离子 (ESI+) 模式电离, 选择反应监测 (MRM) 模式对细胞分裂素进行定量。【结果】4 种细胞分裂素的检出限和定量限分别低于 18.12 和 60.39 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$, 在 0.05~50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性关系, 线性相关系数 (r^2) 大于 0.999。在高、中、低浓度三种加标水平下, 4 种细胞分裂素的平均回收率为 80.0%~108.2%, 标准偏差介于 0.8%~15.5% 之间。采用建立的方法可以同时检测出荔枝果皮、果肉、种子、幼果、叶片和果柄离区中 4 种细胞分裂素含量。【结论】该方法简便、快速、灵敏、准确, 适用于荔枝不同组织中细胞分裂素含量的测定。

关键词: 液质联用; 细胞分裂素; 荔枝; 定量测定

中图分类号: S667.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)06-0001-08

Simultaneous Determination of Four Cytokinins in Litchi by Ultra-high Performance Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry

HUANG Yulian¹, Zhao Minglei^{1,2}, MA Xingshuai^{1,2}, Li Jianguo^{1,2*}, Xu Jing^{1*}

(¹Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (South China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, Guangdong, China; ²Guangdong Litchi Engineering Research Center, Guangzhou, 510642, Guangdong, China)

Abstract:【Objective】A method has been developed to simultaneously measure four types of cytokinins (tZR, IPR, DHZ, IP) in litchi using ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

【Method】The experiment was conducted using litchi pericarp 50 days after

收稿日期: 2024-02-06 接受日期: 2024-03-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (32330092); 国家现代农业产业技术体系建设项目 (CARS-32-07)

作者简介: 黄雨莲, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物激素测定。E-mail: 1401175682@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: jxu@scau.edu.cn; E-mail: jianli@scau.edu.cn

flowering. The XSelect HSS T3 chromatographic column was selected. Methanol and 5 mmol·L⁻¹ ammonium formate aqueous solution were used as the mobile phase with a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. A gradient elution was conducted for 7 minutes. Positive electrospray ionization (ESI+) and the multiple reaction monitoring (MRM) mode were set for mass spectrometry detection. Under these conditions [The ion source temperature was maintained at 150°C, the capillary voltage at 0.35 kV, the desolvent gas temperature at 500°C, the atomization gas flow rate at 1000 L·hr⁻¹, the cone hole gas flow at 50 L·hr⁻¹, and the collision gas (argon gas) at 0.17 L·h⁻¹], quantification of cytokinins was achieved. The effects of different extraction solvents (80% methanol, 80% acetone, 80% acetonitrile), different extraction times (4 h, 8 h, 12 h, 16 h), different purification methods (PCX column, C18 column, HLB column, no column), different concentrations of ammonium-methanol eluent (0.5%, 1%, 2.5%, 5%), and different aqueous phases when methanol is the organic phase (0.05% formic acid solution, 0.1% formic acid solution, 1 mmol·L⁻¹ ammonium formate solution, 5 mmol·L⁻¹ ammonium formate solution) were separately examined for their impact on cytokinin extraction, enrichment, and separation efficiency. Compared to other plant endogenous hormones, cytokinins are unique in that they have a purine ring and are alkaline. The PCX column is a strong cation exchange column filled with polymer cation exchange resin, which concentrates alkaline analytes and thereby enhances the detection sensitivity of alkaline compounds. Cytokinins exist as cations in the acidified extraction solution (pH ≈ 2~3). They are tightly adsorbed by the filler during passage through the PCX column, and then rinsed with a 0.1% formic acid methanol solution (pH ≈ 5~6). At this point, most acidic and neutral compounds are removed, leaving the target substance on the column to be eluted with a 2.5% ammonia-methanol solution (pH ≈ 11.3). Target substances flow out with the eluent and are collected ultimately. In addition, cytokinins are also polar substances which can be separated according to the principles of C18 column and HLB column separation, namely the principle of similar solubility. The stationary phase of C18 and HLB reverse phase columns is a non-polar stationary phase. When the polarity of the mobile phase is greater than that of the stationary phase, the target substance is eluted with the polar mobile phase. **【Results】** As for the extraction conditions, the extraction effect is better when the extraction solvent is 80% acetonitrile and the extraction time is 8 hours, resulting in smooth, sharp peaks and high response values. Regarding the purification conditions, solid phase extraction with PCX is chosen, and the concentration of the ammonia methanol eluent is 2.5%; under this condition, chromatogram has less interference, offering the best enrichment separation effect. For the mobile phase conditions, when methanol is the organic phase, a 5 mmol·L⁻¹ aqueous solution of ammonium formate is most effective, with which the response

intensity of the target substance is high and the peak time is appropriate. Take fresh litchi samples and grind them finely in a mortar with liquid nitrogen. Accurately weigh 0.25 g of the sample on a one-thousandth balance into a 15 mL plastic centrifuge tube, and add 2.5 mL of 80% acetonitrile pre-cooled at 4°C. Extract it at 4°C for 8 hours, shaking it twice during this period. After extraction, centrifuge it at a speed of 10,000 r·min⁻¹ for 10 minutes at 4°C, and collect the supernatant. Add an equal volume of 80% acetonitrile to the residue, shake for 10 minutes, and centrifuge at a speed of 10,000 r·min⁻¹ for 10 minutes at 4°C. Combine the two extracts, add formic acid to adjust the pH≈2-3, mix well to obtain the crude extract of the sample. Then consecutively use 2.5 mL methanol and an equal volume of 2% aqueous solution of formic acid for activation and balancing. The crude extract is passed through the column at a rate of 1-2 drops per second. Afterwards, rinse with an equal volume of 0.1% formic acid methanol solution, and finally wash twice with an equal volume of 2.5% ammonia-water methanol solution. Collect the eluent in a test tube, blow it almost dry with nitrogen, and add 0.25 mL of a 15% methanol solution to re-dissolve. After vortex mixing, filter it through a 0.22 μm organic membrane for testing. Methodological validation of this method: the detection and quantification limits for the four cytokinins were both below 18.12 and 60.39 pg·g⁻¹, respectively, showing a good linear relationship within the concentration range of 0.05~50 ng·mL⁻¹, with a correlation coefficient (r²) greater than 0.999. At three spiking levels of high, medium, and low concentrations (0.4, 2, and 20 ng·mL⁻¹), the average recovery rates of the four cytokinins were between 80.0%~108.2%, with a standard deviation ranging from 0.8%~15.5%. The established method was used to measure the endogenous cytokinins in litchi fruit pericarp, pulp, seeds, young fruit, leaves, and detachment zones, and all four cytokinins could be detected. 【 Conclusion 】 This method has the advantages of easy preprocessing, short detection cycle, good reproducibility, high sensitivity, and low cost. The final results are reliable, making it suitable for the rapid screening and quantitative detection of cytokinins in various parts of the litchi. The method is of great practical value.

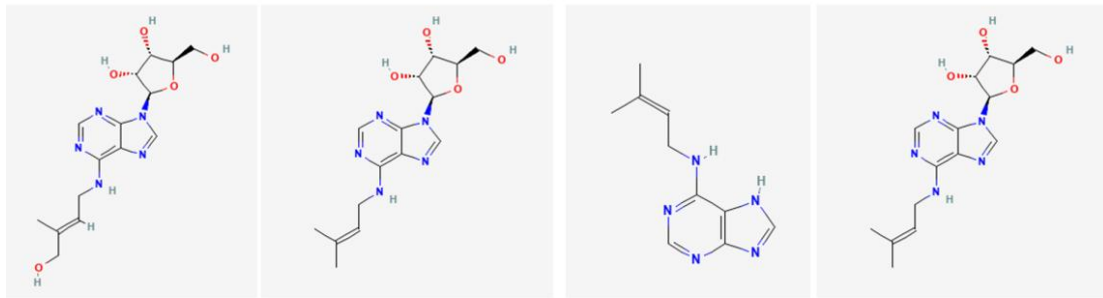
Key words: Liquid chromatography-mass spectrometry; Cytokinin; Litchi; Quantitative determination

细胞分裂素是天然存在的腺嘌呤衍生物，是一类较活跃的植物激素，具有广泛的生物学活性，参与植物从种子萌发到衰老的各个阶段^[1]。在植物中，它们主要以游离碱的形式存在，各种细胞分裂素分子结构不同，但它们都具有芳香族环和侧链，其中，芳香族环上带有羧基和甲基或羟基等官能团，侧链则包括苯丙氨基、异戊二烯基等官能团，这些官能团赋予了细胞分裂素特定的生理功能。根据侧链的不同，天然细胞分裂素又可以分为两类，分别是异戊二烯类细胞分裂素和苯环类细胞分裂素，且前者更为普遍^[2]。反式玉米素核苷（tZR）、异

戊烯基腺嘌呤核苷 (IPR)、二氢玉米素 (DHZ)、异戊烯基腺嘌呤 (IP) 都属于前者 (图 1)。细胞分裂素的主要存在形式在不同的植物、相同植物的不同组织以及发育阶段会有很大的差异。例如在猕猴桃中, IPR 是细胞分裂素最为常见的存在形式^[3]; 而在葡萄中, tZR 才是最常见的存在形式^[4]。作为一种植物生长必不可少的激素, 细胞分裂素在荔枝发育的整个过程中都发挥了重要的作用, 该文涉及的 4 种细胞分裂素在细胞分裂素的合成代谢过程中较为关键。

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 为无患子科荔枝属常绿植物, 是华南的重要经济果树, 在热带农业产业中占有重要的地位^[5]。中国是荔枝的原产地, 现有荔枝种植面积 55 万 hm^2 , 主要分布在广东、广西、福建、海南等省区^[6]。荔枝在中国南方已有数千年的种植历史, 且因色、香、味俱佳, 深受广大消费者喜爱。李伟才等^[7]发现无核荔果实中高含量的 IAA 和低含量的细胞分裂素可能是其产生无核的一个重要原因。在花芽分化过程中, 细胞分裂素含量的升高会促进芽的分化和侧芽发育, 消除顶端优势, 促进花芽分化^[8-9]。环剥是抑制落果, 提高产量的有效措施, 环剥后叶片的细胞分裂素含量明显提高^[10]。采前落果期果柄离区内细胞分裂素含量的增加会抑制果柄离层的形成, 减少果实的脱落^[11]。在荔枝体胚发育过程中, 添加外源玉米素可以促进体胚的进一步发育, 促进球形胚的形成^[12]。这些研究结果均说明细胞分裂素对荔枝的生长发育和产量形成至关重要, 然而细胞分裂素在植物体内的含量极低, 且在提取和测定过程中受其他代谢物的干扰严重^[13], 因此, 选择一种合适的测定方法对获取细胞分裂素准确的测定结果是至关重要的。

目前, 荔枝上多采用酶联免疫法 (ELISA)^[14-17]和高效液相色谱法 (HPLC)^[18]测定细胞分裂素含量, 且前人所测多针对细胞分裂素中的一种进行测定, 这两种方法精密度存在不足, 获得的数据差异大。植物体本身除了基质组成复杂外, 检测过程中还存在取样难, 称量难和分析难等问题, 这就对植物的定量分析提出了更高的要求^[19]。因此, 具有检测限低, 带有质谱准确性, 检出准确率高等特点的高效液相色谱-串联质谱法, 已成为目前植物激素分析的主流检测方法。荔枝果实的样品酚类物质含量高, 需要探讨细胞分裂素提取的最佳方案, 高效液相色谱-质谱联用检测的色谱和质谱条件也需要进一步的优化。笔者在本研究中以仙进奉荔枝为材料, 首次建立了用超高效液相色谱—三重四级杆质谱联用仪 (UPLC-MS/MS) 同时测定荔枝不同部位 (果皮、果肉、种子、幼果、叶片、果柄离区) 中 tZR、IPR、DHZ、IP 的检测方法, 为相关研究提供参考。



反式玉米素核苷 (tZR) 异戊烯基腺嘌呤核苷(IPR) 异戊烯基腺嘌呤 (IP) 异戊烯基腺嘌呤核苷(IPR)

图 1 4 种细胞分裂素结构式

Fig. 1 Four types of cytokinin structural formulas

1 材料和方法

1.1 供试材料

以广州市增城石滩中荔园的仙进奉荔枝为实验材料, 选花后 50 d 的荔枝果实, 将荔枝果实的果皮、果肉、种子和果柄离区分别作为试验材料, 以及采集冬梢叶片, 置于冰盒迅速带回实验室, 做好标记后, 置于液氮速冻后存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2 仪器与试剂

Waters 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪 (ACQUITY UPLC H-Class/ Xevo TQD)、Eppendorf 台式冷冻离心机、Eppendorf Thermo Mixer 混匀仪, 氮吹仪。

乙腈 (质谱纯)、甲醇 (质谱纯)、甲酸 (质谱纯) 均购自赛默飞世尔科技公司、甲酸铵 (色谱纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司)、28%~30%氨水 (色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), Bond Elut Plexa PCX 柱 (安捷伦科技有限公司), 试验用水为屈臣氏蒸馏水。细胞分裂素标准品 tZR, DHZ, IPR 和 IP 均购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度均 $\geq 98\%$ 。

1.3 标准溶液的配制

准确称取 tZR、IPR、DHZ、IP 的标准品, 用质谱甲醇制成单标准储备液密封储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 用 15% 的质谱甲醇配制成 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞分裂素混合标准溶液, 密封储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用, 使用时再稀释成相应浓度。

1.4 样品前处理

过程参考曹赵云等^[20]的方法并加以改进, 以花后 50 d 荔枝果皮为材料, 分别考察不同提取剂, 80% 甲醇^[21-23]、80% 丙酮、80% 乙腈^[24]; 不同提取时间, 4 h、8 h、12 h、16 h; 不同纯化方式, PCX 柱^[25]、C18 柱^[26]、HLB 柱^[27]、不过柱; 不同浓度的氨水甲醇洗脱液, 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%; 同时以 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准品为材料, 考察甲醇为有机相时不同水相, 0.05% 甲酸水溶液、0.1% 甲酸水溶液、 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液、 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液对细胞分裂素提取富集及分离效果的影响, 筛选出适合荔枝样品的前处理流程。

优化后的流程如图 2 所示。取新鲜的荔枝果皮样品，于研钵中加液氮磨细，用千分之一天平准确称取 0.25 g 样品于 15 mL 塑料离心管中，加入 2.5 mL 4 °C 预冷的 80% 乙腈溶液，在 4 °C 下浸提 8 h，期间振摇 2 次。取出后于 4 °C 在 10 000 r·min⁻¹ 的转速下离心 10 min，收集上清液。残渣中加入 2.5 mL 80% 乙腈，振荡 10 min，于 4 °C 在 10 000 r·min⁻¹ 的转速下离心 10 min，将两次提取液合并，加甲酸调 pH 至 2~3，混匀，获得样品粗提液。

依次用 2.5 mL 甲醇和 2.5 mL 2% 甲酸水溶液进行活化和平衡固相萃取柱，约 5 mL 粗提液以每秒 1~2 滴的速度过柱，之后再用等体积甲醇溶液（含 0.1% 甲酸）淋洗，最后用 2.5 mL 甲醇溶液（含 2.5% 氨水）洗脱两次，洗脱液收集于试管，氮吹至 10 μL，加 0.25 mL 15% 甲醇水溶液复溶，漩涡混匀后过 0.22 μm 有机滤膜后待测。

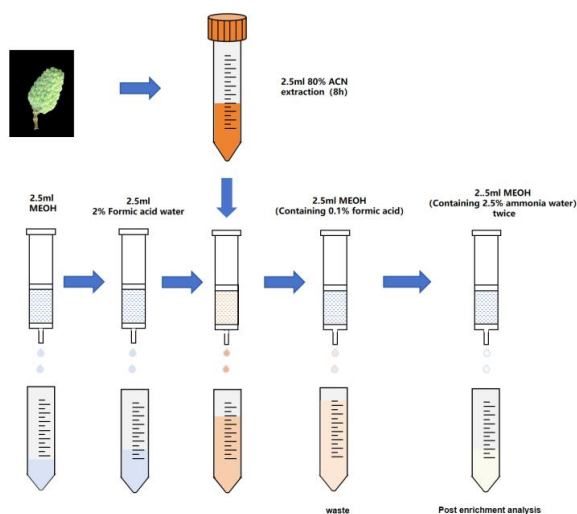


图 2 细胞分裂素提取纯化流程图

Fig. 2 Flow chart of cytokinin extraction and purification

1.5 色谱和质谱条件

色谱条件：Waters 公司 X Select HSS T3 柱（2.1 mm × 100 mm，2.5 μm），流动相 A 为甲醇，流动 B 为 5 mmol·L⁻¹ 的甲酸铵水溶液，梯度洗脱程序见表 1。

质谱条件：为电喷雾离子源（ESI+），检测方式为多反应检测（MRM）模式。离子源温度为 150 °C，毛细管电压为 0.35 kV，脱溶剂气温度 500 °C，雾化气氮气流速 1000 L·hr⁻¹，锥孔气流 50 L·hr⁻¹；碰撞气（氩气）0.17 L·h⁻¹。质谱参数见表 2，4 种细胞分裂素标准溶液的选择反应检测色谱图见图 3。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间 /min	流速/ (mL·min ⁻¹)	体积分数/%	
		A	B
0.0	0.3	10	90
1.5	0.3	60	40

5.0	0.3	90	10
6.0	0.3	90	10
6.1	0.3	10	90
7.0	0.3	10	90

表 2 4 种细胞分裂素的相关质谱参数

Table 2 Relevant mass spectrometry parameters of four types of cytokinin

细胞分裂素	母离子	子离子/ ($m \cdot z^{-1}$)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞能量/V
反式玉米素核苷 tZR	352.05	148.00*	0.019	35	22
		136.20	0.019		30
异戊烯基腺嘌呤核苷 IPR	336.10	136.10*	0.019	35	31
		204.00	0.019		15
二氢玉米素 DHZ	222.05	148.02*	0.019	36	18
		135.95	0.019		20
异戊烯基腺嘌呤 IP	204.10	148.0*0	0.019	28	10
		136.20	0.019		13

注：*为定性离子。

Note: * is characterized ion.

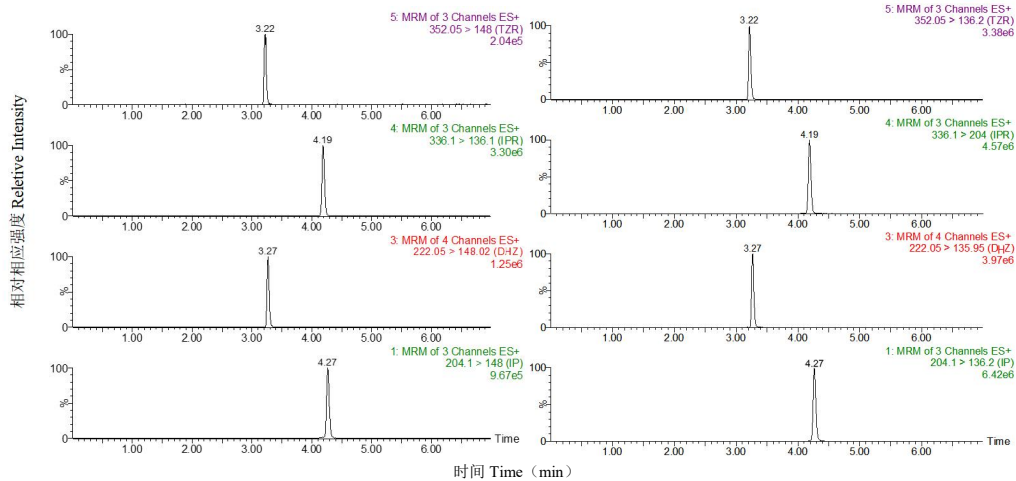


图3 4种细胞分裂素的选择反应检测色谱图

Fig. 3 Chromatograms for selective reaction detection of four types of cytokinins

2 结果与分析

2.1 提取条件优化

2.1.1 提取剂优化

在植物激素测定中，常用的提取剂有甲醇，乙腈和丙酮^[28-30]。以仙进奉果皮为样品，在其他条件相同的情况下，考察了 80%甲醇、80%丙酮、80%乙腈作为提取溶剂的提取效果（图 4-a）。结果表明，对于 tZR 和 IPR 而言，80%乙腈的提取效果好；对 DHZ 而言，80%甲醇提取效果更好；对 IP 而言，80%丙酮提取效果更佳。经过综合比较，选择 80%乙腈作为提取剂。

2.1.2 提取时间优化

选定 80%乙腈作为提取剂，考察了提取时间分别为 4 h、8 h、12 h、16 h 时对细胞分裂素提取效果的影响（图 4-b）。结果表明，提取时间从 4 h 延长到 8 h 时，tZR 和 DHZ 的提取效果得到了显著提升；提取时间从 8 h 延长到 12 h 时，除 IPR 和 IP 提取效果略有下降外，其他两种细胞分裂素的提取效果没有发生显著变化；提取时间从 12 h 延长到 16 h 时，IP 的提取效果略有下降，tZR 的提取效果显著下降。综合比较，提取时间最终选择 8 h。

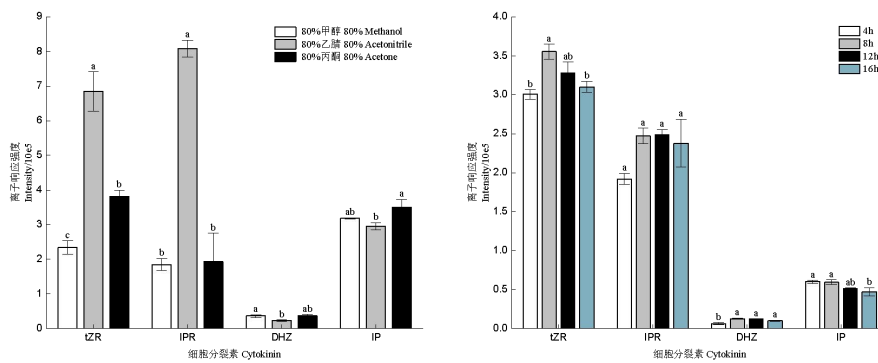


图 4 不同提取剂 (a) 和不同提取时间 (b) 的提取效果

Fig. 4 Extraction effects of different extraction conditions (a) Extraction effects of different extraction agents (b) Extraction effects of different extraction times

2.2 纯化条件优化

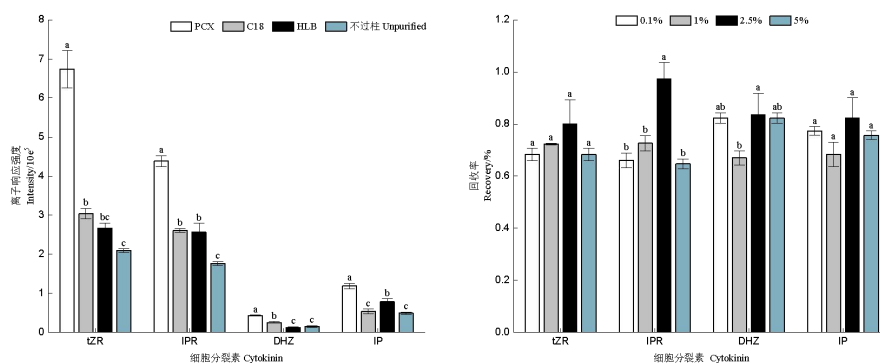
2.2.1 固相萃取柱优化

纯化条件主要考虑两个重要参数：固相萃取柱和洗脱溶剂。目前比较常见的固相萃取柱有以十八烷基键合相硅胶为填料的 C18 柱，以亲水—亲油平衡聚合物材料为填料的 HLB 柱以及以混合阳离子交换材料为填料的 PCX 柱等。以仙进奉果皮为样品，选择 C18 柱、HLB 柱、PCX 柱，以及不进行纯化这四种处理方式进行比较（图 5-a）。C18 柱可有效去除果皮中酯类及色素类化合物；HLB 柱无需活化，纯化步骤少，可有效除去磷脂，蛋白质和色素等大分子物质；PCX 柱能够除去大量酸性和中性化合物；空白对照不进行除杂。选择 PCX

柱进行纯化时，4种细胞分裂素检测响应值高且分离度好。其他三种纯化方式，4种细胞分裂素检测响应值都较PCX柱低，DHZ和IP在色谱图中分离度差。综上所述，选择PCX柱对样品进行纯化。

2.2.2 洗脱液优化

根据选定PCX柱的特点，再结合细胞分裂素的理化性质，在空白样品中添加相同浓度（ $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）4种细胞分裂素，选择不同浓度的氨水甲醇溶液进行洗脱，考察回收率差异（图5-b）。实验发现，不同浓度氨水甲醇洗脱液均可影响细胞分裂素回收率。当氨水甲醇的浓度为0.1%和1%时，碱性较弱，PCX柱上固定的细胞分裂素不能被充分洗脱；氨水甲醇浓度增加到2.5%时，碱性增强，被洗脱的IPR和DHZ含量显著增加；氨水甲醇浓度增加到5%时，碱性进一步增强，但IPR和DHZ洗脱效果不佳，其他几种细胞分裂素无明显变化。因此，综合比较之后，选择浓度为2.5%的氨水甲醇溶液进行洗脱。



(a). 不同萃取柱纯化效果；(b) 不同浓度氨水甲醇洗脱液洗脱效果。

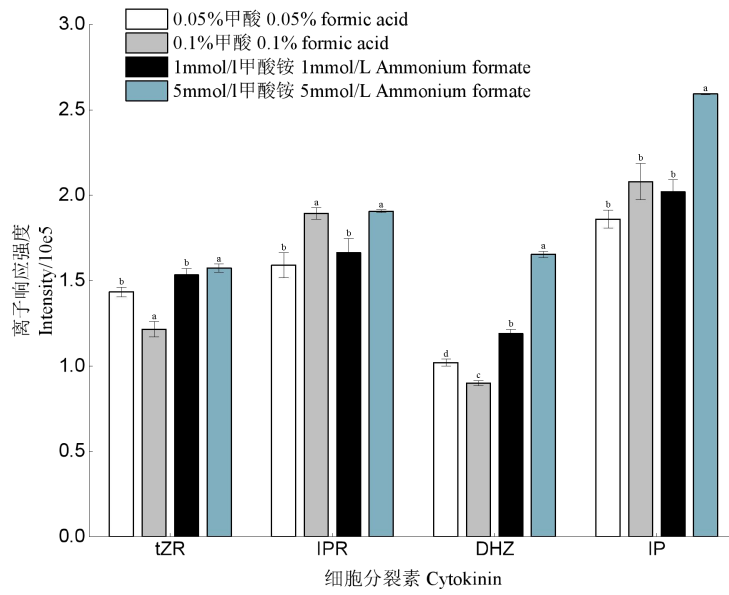
(a). Purification efficiency of different extraction columns; (b). Elution efficiency of methanol elution solution with different concentrations of ammonia water.

图5 不同纯化方式纯化效果

Fig. 5 Purification efficiency of different purification methods

2.3 色谱条件优化

细胞分裂素是一类碱性物质，流动相的pH值和组成会对色谱分离和响应强度有较大的影响。试验采用甲醇分别与0.05%甲酸水溶液，0.10%甲酸水溶液， $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸水溶液和 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸水溶液组合，作为流动相进行考察，发现 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸水溶液（ $\text{pH}\approx 4.5$ ）—甲醇为流动相时，4种细胞分裂素峰形较好，目标物响应值高（图6）。



FA: 甲酸水溶液; JSA:甲酸铵水溶液。

图 6 不同水相对测定结果的影响

Fig. 6 The influence of different water phases on the measurement results

2.4 方法准确度及精密度考察

2.4.1 线性关系和检出限

取浓度为 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准溶液，依次稀释配制成系列浓度为 0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、50.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准溶液进行检测，绘制标准曲线，并进行线性回归，得到回归方程和相关系数 (r^2)。再分别以 3 倍信噪比 (S/N) 和 10 倍信噪比所对应的质量浓度确定检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。结果表明，tZR、IPR、DHZ、IP 在 0.05~50.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性良好， $r^2 > 0.999$ ，LOD 和 LOQ 分别介于 3.11~18.12 和 10.37~60.39 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间，说明本研究方法对细胞分裂素有较高的检测灵敏度 (表 3)。

表 3 4 种细胞分裂素的线性方程、线性范围、相关系数和检出限

Table 3 Linear equations, linear ranges, correlation coefficients, and detection limits for four types of cytokinins

分析物 Analytes	线性方程 Calibration	浓度范围	相关系 数 r^2	检出限 LOD/ ($\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$)	定量限 LOQ/ ($\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$)
		Concentration range/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
tZR	$y = 137550x + 40902$	0.05~50	0.9997	18.12	60.39
IPR	$y = 174525x + 32593$	0.05~50	0.9996	11.76	39.22
DHZ	$y = 160160x + 5174$	0.05~50	1	3.11	10.37

2.4.2 回收率

为了评价方法的准确性和重复性,以荔枝果皮为样品,向其中添加低、中、高三种不同浓度的标品(0.4、2.0和20.0 ng·mL⁻¹)进行回收率试验,做3次平行试验,计算平均加标回收率和相对标准偏差(表4)。结果显示,4种细胞分裂素的相对回收率在80.0%~102.1%,RSD在0.8%~15.5%之间。

表4 荔枝皮中4种细胞分裂素的加标回收率及相对标准偏差(n=3)

Table 4 Recovery and RSD% of four cytokinins from litchi peel by spiking (n=3)

分析物 Analytes	加标量 Skipped/ (ng·mL ⁻¹)	回收率 Recovery/%	相对标准偏 差 RSD/%
tZR	0.4	93.5	8.1
	2.0	95.0	7.8
	20.0	80.3	2.0
IPR	0.4	93.3	7.1
	2.0	102.1	3.5
	20.0	93.4	1.3
DHZ	0.4	87.1	8.0
	2.0	108.2	1.5
	20.0	93.3	1.7
IP	0.4	89.1	15.5
	2.0	80.0	2.1
	20.0	80.6	0.8

2.4.3 实际样品分析

为了证明方法对荔枝不同部位的普适性,利用所建立的方法对荔枝果皮,果肉,种子,叶片,果柄离区和幼果中的内源细胞分裂素进行测定(图7)。测定结果见表5,tZR含量以种子中最高(3.92 ng·g⁻¹),果肉中最低(0.30 ng·g⁻¹);IPR含量以叶片中最高(11.83 ng·g⁻¹),其次为离区(7.86 ng·g⁻¹),其他组织的含量均低于1.00 ng·g⁻¹;DHZ在所有测定的组织,只有叶片和种子中含量达到0.10 ng·g⁻¹,其他组织均低于此值;IP含量以离区中最高(1.29 ng·g⁻¹),种子种最低。上述部位中的4种细胞分裂素都能被检出,说明该法可用于荔枝不同部位的测定。



图 7 荔枝不同部位

Fig. 7 Different parts of litchi

表 5 荔枝不同部位内源细胞分裂素含量

Table 5 The content of endogenous cytokinins in different parts of litchi						(ng·g ⁻¹)
分析物	果皮	果肉	种子	幼果	叶片	离区
Analytes	Peel	Flesh	Seed	Young fruit	Leaf	Abscission Zone
tZR	1.60±0.15	0.30±0.010	3.92±0.090	1.38±0.020	1.63±0.002	2.08±0.020
IPR	0.62±0.03	0.26±0.004	0.44±0.020	0.60±0.020	11.83±0.160	7.86±0.010
DHZ	0.06±0.01	0.02±0.001	0.10±0.010	0.06±0.001	0.11±0.040	0.03±0.001
IP	0.20±0.01	0.06±0.001	0.04±0.001	0.15±0.020	0.54±0.020	1.29±0.005

3 讨论

在荔枝上，内源激素的测定多采用 ELISA 法以及 HPLC 法（目前难以胜任）。ELISA 法利用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶建立关联，当同一类结构相似激素存在时，抗体专一结合性差，导致检测值偏高；HPLC 法通过混合物各组分通过与固定相、流动相之间的相互作用，在色谱柱中进行分离纯化，高效液相色谱的速度快且依赖于化合物的不同极性和分子量等，因此结构和极性相似的两种化合物可分离度较差。李伟才等^[7]用液相色谱法测得荔枝谢花后 80 d 内果实中细胞分裂素的含量约为 0~800 ng·g⁻¹，而周贤军等^[31]用酶联免疫测量结果约为 0~760 pg·g⁻¹。周昌敏等^[10]用酶联免疫测的白点期前后叶片中细胞分裂素含量约为 300~600 ng·g⁻¹，花静静等^[32]用普通液质联用（LC-MS）测出来的结果约 2.74 ng·g⁻¹。胡桂兵等^[33]用酶联免疫测定结果约为 335.36 ng·g⁻¹，笔者在本研究中用超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用法测定荔枝果皮花后 50 d 的 IPR 含量约为 0.62 ng·g⁻¹，金峰等^[34]用液质联用测定冬梢叶片中 IP 和 IPR 含量分别为 0.66 和 9.88 ng·g⁻¹，与本文测定结果接近。以上结果说明 ELISA 法以及 HPLC 法准确性和灵敏度较差。而质谱分析法（MS），是通过高能电子轰击，检测带电分子离子或碎片离子的质量数，最终确定带电离子质量的方法，具有高选择性和灵敏性。另外与传统的 HPLC 相比，超高效液相色谱（UPLC）在保留 HPLC 优点的同时，还提升了分析速度。UPLC-MS/MS 法更是结合了 UPLC 的高分离性、高速度的特点以及

MS/MS 高选择性、高灵敏度的特点，成为了目前植物激素检测的主要手段之一，在石榴、文冠果、苹果等果树中也有相关报道^[35-37]。

植物内源激素属于微量物质，难以分析，且样品基质效应复杂，所以合适的前处理过程以及分析方法显得尤为重要。当以 80%丙酮和 80%甲醇为提取剂时，对 tZR 和 IP 的提取效果不佳，且 80%丙酮作为提取剂时，提取剂绿色很深，说明其中溶解了很多叶绿素，易对后续检测造成干扰；以 80%乙腈为提取剂时，DHZ 和 IPR 提取效果不如另两种，但 tZR 和 IP 的响应值显著高于另外两种，且色谱图分离度好。综合考虑，选用 80%乙腈作为提取剂。在提取过程中，提取 8 h 可达最佳效果，无需过夜，可实现当天提取，当天测定，提高了检测结果的准确度。与其他植物内源激素相比，细胞分裂素较为特别的地方在于其具有嘌呤环，呈碱性。因此利用其特性，在纯化上选择了 PCX 强阳离子交换柱，该柱以聚合阳离子交换树脂为填料，对弱碱性化合物吸附性较强，进而提高了碱性化合物的纯化效果。细胞分裂素在酸化后的提取液（pH \approx 2~3）中呈阳离子状态，过柱时被填料吸附，再用含 0.1%甲酸的甲醇溶液（pH \approx 5~6）淋洗，此时大多数酸性和中性化合物被清除，留在柱上的目标物再用 2.5%的氨水甲醇溶液洗脱（pH \approx 11.3），目标物随着洗脱液流出，最终实现目标物的收集。XSelect HSS T3 色谱柱以高强度硅胶为填料，可延长极性目标物的保留时间，有利于样品组分更好的分离。同时方法优化了流动相条件，最终实现了荔枝果实中多种细胞分裂素有效分离和准确定量。

4 结论

本文建立了高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定荔枝中 tZR、IPR、DHZ 和 IP 这 4 种细胞分裂素的检测方法。样品通过 80%乙腈低温提取，PCX 纯化，X Select HSS T3 分离，在 ESI+、MRM 模式下分析定量，实现了荔枝不同样品中 4 种关键细胞分裂素的高效提取和测定。样品平均加标回收率为 80.0%~108.2%，RSD 范围为 0.8%~15.5%。经方法学验证，该方法具备前处理检测周期短、重现性好、灵敏度高等优点，适用于荔枝各部位细胞分裂素的快速筛查和定量测定。

参考文献：

- [1] BRIZZOLARI A, FOTI M C, SASO L, CIUFFREDA P, LAZAREVIĆ J, SANTANIELLO E. Evaluation of the radical scavenging activity of some representative isoprenoid and aromatic cytokinin ribosides (N6-substituted adenosines) by in vitro chemical assays[J]. *Natural Product Research*, 2022, 36(24): 6443-6447.
- [2] 马新梅. 拟南芥细胞分裂素 O-糖基转移酶基因功能分析[D]. 济南：山东大学，2011.
MA Xinmei. Function analysis of a cytokinin O-glycosyltransferase gene in *Arabidopsis thaliana*[D]. Jinan: Shandong University, 2011.
- [3] 鲁敏, 黄亚欣, 王国立, 安华明. ‘贵长’猕猴桃果实内源激素的动态分布及含量变化

- 与果实形状发育的关系[J].植物生理学报, 2020, 56(10): 2159-2167.
- LU Min, HUANG Yaxin, WANG Guoli, AN Huaming. The correlation between the dynamic distribution and content of endogenous hormones and the kiwi fruit shape during 'Guichang' fruits development[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(10): 2159-2167.
- [4] 王宁, 张艳霞, 李栋梅, 王振平. 宁夏不同产区霞多丽葡萄内源激素及果实品质差异研究[J]. 果树学报, 2023, 40(7): 1374-1385.
- WANG Ning, ZHANG Yanxia, LI Dongmei, WANG Zhenping. Effect of different terroir conditions on endogenous hormones and berry quality of Chardonnay at the East Helan Mountains[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(7): 1374-1385.
- [5] 李建国, 王惠聪, 周碧燕, 赵明磊, 李彩琴, 夏瑞, 黄旭明. 荔枝花果发育生理和分子生物学研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 119-127.
- LI Jianguo, WANG Huicong, ZHOU Biyan, ZHAO Minglei, LI Caiqin, XIA Rui, HUANG Xuming. Research advances in physiology and molecular biology of flower and fruit development in litchi[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(5): 119-127.
- [6] 郭栋梁, 黄石连, 向旭. 2022 年广东荔枝生产形势分析[J]. 广东农业科学, 2022, 49(6): 130-137.
- GUO Dongliang, HUANG Shilian, XIANG Xu. Analysis of Guangdong Litchi production situation in 2022[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2022, 49(6): 130-137.
- [7] 李伟才, 魏永赞, 胡会刚, 石胜友, 王一承, 谢江辉. 3 种无核荔枝果实发育过程中内源激素含量变化动态[J]. 热带作物学报, 2011, 32(6): 1042-1045.
- LI Weicai, WEI Yongzan, HU Huigang, SHI Shengyou, WANG Yicheng, XIE Jianghui. Dynamic changes of endogenous hormone contents in the pericarp of seedless litchi during fruit growth and development[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(6): 1042-1045.
- [8] 肖华山, 吕柳新, 陈志彤. 荔枝花芽分化过程中内源激素含量的动态变化[J]. 宁德师专学报(自然科学版), 2007, 19(2): 113-115.
- XIAO Huashan, LÜ Liuxin, CHEN Zhitong. Dynamic changes of endogenous hormone in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) during flower bud differentiation[J]. Journal of Ningde Teachers College (Natural Science), 2007, 19(2): 113-115.
- [9] 吴志祥, 周兆德, 陶忠良, 王令霞. 妃子笑与鹅蛋荔枝花芽分化期间内源激素的变化[J]. 热带作物学报, 2005, 26(4): 42-45.
- WU Zhixiang, ZHOU Zhaode, TAO Zhongliang, WANG Lingxia. Changes of endogenous hormones in feizixiao and Edan Litchi during flower bud differentiation[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2005, 26(4): 42-45.
- [10] 周昌敏, 何兆桓, 杨苞梅, 李国良, 姚丽贤. 环剥对荔枝叶片营养及花果生长发育的影

响[J]. 广东农业科学, 2018, 45(4): 34-42.

ZHOU Changmin, HE Zhaohuan, YANG Baomei, LI Guoliang, YAO Lixian. Effect of girdling on litchi foliar nutrient and development of flower and fruit[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2018, 45(4): 34-42.

[11] 付亚男. A4 无核荔枝落果与裂果生理基础及其调控研究[D]. 海口: 海南大学, 2017.

FU Yanan. Studies on the physiological basis of the fruit drop and cracking and its regulation of A4 seedless litchi[D]. Haikou: Hainan University, 2017.

[12] 车建美, 赖钟雄, 赖呈纯, 郭志雄, 刘鸿洲, 黄志宏. 荔枝体细胞胚胎发生早期的 3 种内源激素含量变化[J]. 热带作物学报, 2005, 26(2): 55-61.

CHE Jianmei, LAI Zhongxiong, LAI Chengchun, GUO Zhixiong, LIU Hongzhou, HUANG Zhihong. Changes of endogenous phytohormones during the early somatic embryogenesis in litchi [*Litchi chinensis* Sonn.][J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2005, 26(2): 55-61.

[13] 蔡保东, 刘昭, 丁俊, 冯钰琦. 混合模式色谱-串联质谱联用快速和高灵敏检测植物组织内源性细胞分裂素[J]. 分析科学学报, 2014, 30(5): 613-618.

CAI Baodong, LIU Zhao, DING Jun, FENG Yuqi. Rapid and highly sensitive determination of endogenous cytokinins in plant samples by mixed-mode liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Science, 2014, 30(5): 613-618.

[14] 魏永赞, 董晨, 王弋, 郑雪文, 李伟才. 烯效唑对荔枝花期发育过程内源激素的影响[J]. 热带作物学报, 2017, 38(7): 1188-1192.

WEI Yongzan, DONG Chen, WANG Yi, ZHENG Xuwen, LI Weicai. Effects of uniconazole on the endogenous phytohormone contents in the florescence period of litchi[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(7): 1188-1192.

[15] CHEN X, TAO Z L, WU Z X, WANG L X, FU H Z, ZHOU Z D, FAN W B. Effect of paclobutrazol plus ethephon treatment on endogenous hormones and carbon and nitrogen nutrients in litchi variety 'Feizixiao' [J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 14(8): 1125-1131.

[16] 李建国, 黄旭明, 黄辉白, 周碧燕. 大果型和小果型荔枝品种果实发育细胞学和生理学比较[J]. 果树学报, 2002, 19(3): 158-162.

LI Jianguo, HUANG Xuming, HUANG Huibai, ZHOU Biyan. A cytological and physiological study of large-and small-sized litchi cultivars fruit[J]. Journal of Fruit Science, 2002, 19(3): 158-162.

[17] 李建国, 周碧燕. 大核和焦核“桂味”荔枝果实发育及其发育期间果皮中内源激素含量的变化比较[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 38-41.

LI Jianguo, ZHOU Biyan. Comparison on fruit development and changes in endogenous hormone contents in pericarp between large- and aborted-seeded litchi (*Litchi chinensis* sonn. cv.

- Guiwei][J]. *Plant Physiology Communications*, 2005, 41(5): 38-41.
- [18] 曾庆钱, 陈厚彬, 鲁才浩, 李建国. 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.
- ZENG Qingqian, CHEN Houbin, LU Caihao, LI Jianguo. An optimized HPLC procedure for analyzing endogenous hormones in different organs of litchi[J]. *Journal of Fruit Science*, 2006, 23(1): 145-148.
- [19] 李玉璇, 段春风, 关亚凤. 植物样品中内源性植物激素时空分布的研究进展[J]. *色谱*, 2019, 37(8): 806-814.
- LI Yuxuan, DUAN Chunfeng, GUAN Yafeng. Recent advances in spatio-temporal distribution of endogenous phytohormones[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(8): 806-814.
- [20] 曹赵云, 马有宁, 牟仁祥, 于莎莎, 陈铭学. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定水稻中 17 种细胞分裂素[J]. *色谱*, 2015, 33(7): 715-721.
- CAO Zhaoyun, MA Youning, MOU Renxiang, YU Shasha, CHEN Mingxue. Analysis of 17 cytokinins in rice by solid phase extraction purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(7): 715-721.
- [21] ZHANG M, CHEN X J, ZHAO Y J, ZHANG J Q, HE Q Q, QIAN J Q, TAN G Y, LIU W, YANG X L, WANG B M. Quantification of six types of cytokinins : Integration of an ultra-performance liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric method with antibody based immunoaffinity columns equally recognizing cytokinins in free base and nucleoside forms[J]. *Journal of Chromatography A*, 2022, 1682: 463497.
- [22] 童建华, 赵文魁, 张雪芹, 梁艳萍. 拟南芥中 4 种细胞分裂素的高效液相色谱法测定[J]. *亚热带植物科学*, 2008, 37(4): 18-21.
- TONG Jianhua, ZHAO Wenkui, ZHANG Xueqin, LIANG Yanping. Simultaneous determination of four kinds of cytokinin components in *Arabidopsis thaliana* by high performance liquid chromatography[J]. *Subtropical Plant Science*, 2008, 37(4): 18-21.
- [23] ZHOU X, LI R Q, WANG C, MA X X, SUN Y, SONG W X, WEI X B, LI D H, MA X, WANG R Q. Simultaneous quantitation of cytokinin bases and their glycoconjugates with stable isotope labelling ultrahigh performance liquid chromatography mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1636: 461782.
- [24] CAI B D, ZHU J X, SHI Z G, YUAN B F, FENG Y Q. A simple sample preparation approach based on hydrophilic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of endogenous cytokinins[J]. *Journal of Chromatography B*, 2013, 942/943: 31-36.
- [25] CAO Z Y, SUN L H, MOU R X, ZHANG L P, LIN X Y, ZHU Z W, CHEN M X. Profiling

of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2016, 1451: 67-74.

[26] LI Y H, WEI F, DONG X Y, PENG J H, LIU S Y, CHEN H. Simultaneous analysis of multiple endogenous plant hormones in leaf tissue of oilseed rape by solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry[J]. *Phytochemical Analysis: PCA*, 2011, 22(5): 442-449.

[27] HAN Z, LIU G, RAO Q X, BAI B, ZHAO Z H, LIU H, WU A B. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of acid/alkaline phytohormones in grapes[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 881/882: 83-89.

[28] 张军, 杜平. 高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄中的吡效隆和赤霉素[J]. *色谱*, 2011, 29(11): 1133-1136.

ZHANG Jun, DU Ping. Determination of forchlorfenuron and gibberellin acid in the grapes using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2011, 29(11): 1133-1136.

[29] 徐婧, 王丹, 陈庆欣, 张艳青, 王俊, 赵明磊, 李建国. 超高效液相色谱—三重四级杆质谱联用法同时定量荔枝果实组织中 IAA 和 ABA[J]. *中国南方果树*, 2022, 51(1): 59-66.

XU Jing, WANG Dan, CHEN Qingxin, ZHANG Yanqing, WANG Jun, ZHAO Minglei, LI Jianguo. Simultaneous quantification of indole-3-acetic acid and abscisic acid in Litchi fruit tissues by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *South China Fruits*, 2022, 51(1): 59-66.

[30] IZUMI Y, OKAZAWA A, BAMBATA, KOBAYASHI A, FUKUSAKI E. Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 648(2): 215-225.

[31] 周贤军, 黄德炎, 黄辉白, 吴定尧. 螺旋环剥对‘糯米糍’荔枝坐果与碳水化合物及激素的影响[J]. *园艺学报*, 1999, 26(2): 77-80.

ZHOU Xianjun, HUANG Deyan, HUANG Huibai, WU Dingyao. Carbohydrate and endohormone status in relation to fruit set as influenced by trunk spiral girdling of Young litchi trees[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1999, 26(2): 77-80.

[32] 花静静. 无核荔枝促花技术及其生理研究[D]. 海口: 海南大学, 2021.

HUA Jingjing. Study on flower-promoting technology and physiology of seedless litchi[D]. Haikou: Hainan University, 2021.

[33] 胡桂兵, 陈大成, 李平, 欧阳若, 高飞飞, 王卫华. 荔枝果皮花青苷与内源激素含量的

变化规律[J]. 福建果树, 2000(1): 1-3.

HU Guibing, CHEN Dacheng, LI Ping, OUYANG Ruo, GAO Feifei, WANG Weihua. changes in anthocyanin and endogenous hormone content in litchi peel[j]. Fujian Fruits, 2000(1): 1-3.

[34] 金峰, 向旭, 邱燕萍, 袁沛元, 凡超. 乙氧氟草醚对桂味荔枝冬梢控杀效果及内源激素影响的研究[J]. 核农学报, 2023, 37(9): 1894-1903.

JIN Feng, XIANG Xu, QIU Yanping, YUAN Peiyuan, FAN Chao. Study on oxyfluorfen control effect of oxyfluorfen on Guiwei litchi winter shoots (*Litchi chinensis* Sonn.) and its influence on endogenous hormones[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2023, 37(9): 1894-1903.

[35] YILMAZ C , OZGUVEN A I. Hormone physiology of preharvest fruit cracking in pomegranate (*Punica granatum* L.)[J]. Acta Horticulturae, 2006, 727: 545-550.

[36] 王鹏侠, 阮成江, 杜维, 赵振. 文冠果种子不同发育期内源激素的动态变化[J]. 大连民族大学学报, 2022, 24(1): 1-4.

WANG Pengxia, RUAN Chengjiang, DU Wei, ZHAO Zhen. Dynamic changes of endogenous hormones in *Xanthoceras sorbifolium* seeds during different developmental stages[J]. Journal of Dalian Minzu University, 2022, 24(1): 1-4.

[37] 王庆杰, 金仲鑫, 周李杰, 郝玉金, 姚玉新. 苹果 MdcyMDH 过量表达对光合、激素和生长的影响[J]. 中国农业科学, 2015, 48(14): 2868-2875.

WANG Qingjie, JIN Zhongxin, ZHOU Lijie, HAO Yujin, YAO Yuxin. Impacts of mdcy MDH overexpression on photosynthesis, hormone and growth in apple[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(14): 2868-2875.