

文章编号: 1674 - 7054(2016)01 - 0139 - 08

# 油菜素甾醇分析方法概述及其在果实中的应用

杨鑫鑫, 潘秋红

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要:** 油菜素甾醇(Brassinosteroids, BRs)作为第6类植物内源激素,对植物生长发育的调节作用已引起极大关注,但由于该激素在植物组织中含量很低,尤其在果实中基质背景极其复杂,加大了对其高效提取和精确分析的难度。笔者概述了近年来植物油菜素甾醇的提取和分析方法,并比较了各种方法的优缺点,为果实中油菜素甾醇分析方法的建立提供参考依据。

**关键词:** 油菜素甾醇; 提取; 分析

中图分类号: S 663 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.01.024

油菜素甾醇(Brassinosteroids, BRs)是一类植物甾醇类激素,广泛分布于高等植物中,是植物生长和发育必不可少的微量活性物质<sup>[1]</sup>。油菜素内酯在1970年首次被发现,被称之为继生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸和乙烯之后的第6大类植物内源性激素<sup>[2-3]</sup>。目前,人们已从油菜、槟榔花、水稻、豌豆、刺槐、萝卜等植物中分离到至少60余种油菜素甾醇类化合物及其类似物<sup>[4-5]</sup>。与其他的植物内源性激素相比,油菜素内酯含量较低,在花粉和萌发种子中含量为 $1.00 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,而在幼嫩根系和叶子中仅有 $0.01 \sim 0.10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (鲜质量)<sup>[6-7]</sup>,尚未见提取果实中油菜素内酯的报道。油菜素甾醇激素的基本结构如图1所示,不同结构的油菜素甾醇化合物表现出不同的生理活性,在所有已知的天然或人工合成的BRs中,活性最强的是油菜素内酯<sup>[8]</sup>,其化学名称是(22R, 23R, 24S)- $2\alpha, 3\alpha, 22\alpha, 23\alpha$ -四羟基- $24\alpha$ -甲基-7-氧- $5\alpha$ -胆甾烯-6-酮<sup>[4]</sup>,其次是表油菜素内酯。高生理活性的油菜素甾醇类激素具有一定的结构特点:(1) S构型的24位碳是高活性所必需的;(2) B环形成6-酮或7-氧内酯;(3) A环上 $2\alpha, 3\alpha$ 及22R, 23R2对邻羟基存在;(4) A/B环为反式稠合<sup>[4]</sup>。在A环上的 $2\alpha, 3\alpha$ 羟基是高活性结构特征,如油菜素内酯(Brassinolide, BL)、油菜素甾酮(Castasterone, CS),而延长BRs的侧链可以获得更高的生理活性<sup>[4, 9-11]</sup>,如在C-24位置上增加1个甲基或乙基。近30年来,关于油菜素甾醇类激素生理功能的研究取得了很大进展<sup>[12]</sup>。研究表明,这类激素可以参与细胞生长和分裂<sup>[13]</sup>,增加DNA和RNA聚合酶的活性<sup>[14]</sup>,刺激乙烯生成,提高植物逆境抗性<sup>[15-16]</sup>。油菜素甾醇类激素对果实成熟和品质的调控作用也引起广泛关注,但这些研究几乎都采用外源喷施油菜素甾醇类激素以研究对果实生长发育和品质的影响,对于外源喷施是否对内源油菜素甾醇类激素的合成产生影响知之甚少,究其原因可能与目前尚未有灵敏高效的测定果实中内源油菜素甾醇类激素的方法有关。虽然植物油菜素甾醇类激素的检测技术一直在不断发展与完善,但由于其在果实中含量极低加之基质复杂,使激素定量分析更加困难,这就成为了研究果实油菜素甾醇类激素生物学功能的一大瓶颈。因此,笔者综述了油菜素甾醇类激素定量分析方法,比较其优缺点,旨在为建立果实中油菜素甾醇的分析方法提供参考依据。

收稿日期: 2015 - 08 - 18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471834)

作者简介: 杨鑫鑫(1989 -),男,中国农业大学2014级硕士研究生. E-mail: yangxinxin124@126.com

通信作者: 潘秋红(1966 -),女,教授. 研究方向: 葡萄与葡萄酒化学. E-mail: panqh@cau.edu.cn

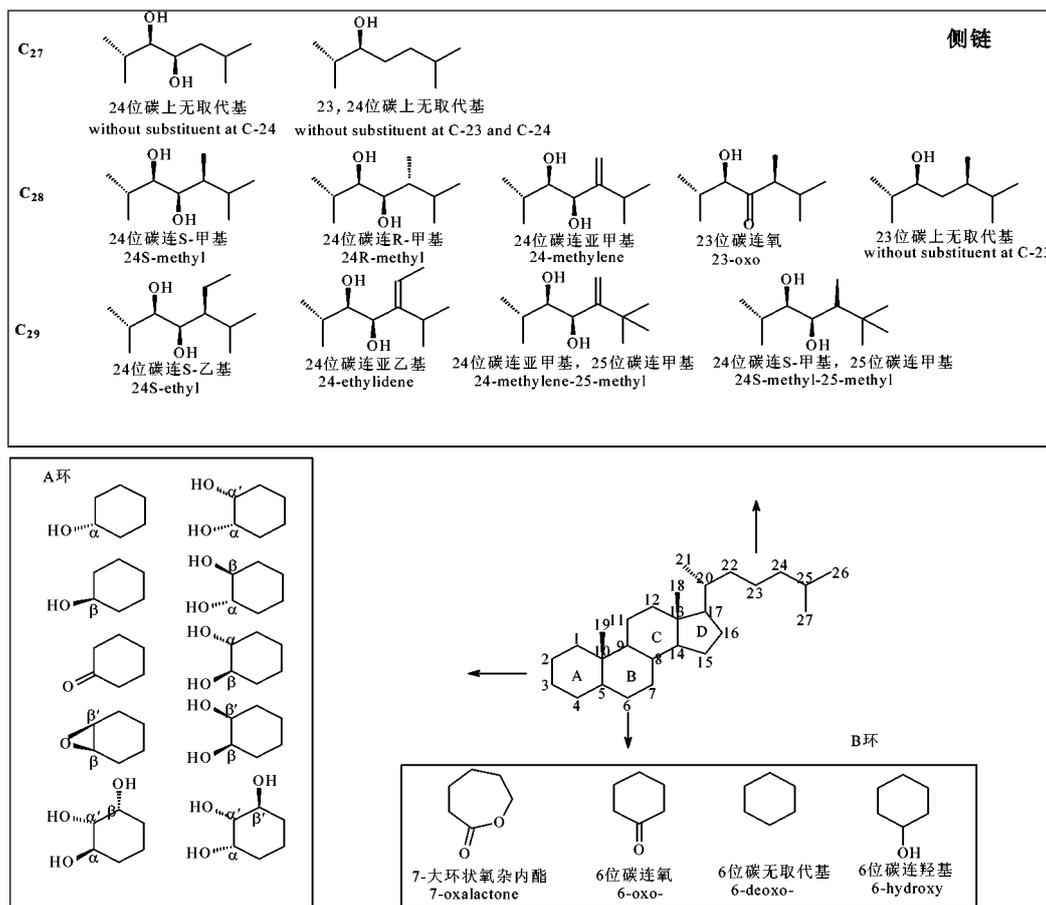


图 1 油菜素甾醇激素的化学结构和 A、B 环和侧链不同取代基

Fig. 1 Chemical structures of brassinosteroids and different substituents in the A-and B-rings and side chain

### 1 油菜素甾醇激素提取和纯化方法的比较

在植物体内,油菜素甾醇激素含量只能达到百万分之一水平,是类黄酮物质含量的万分之一。不同组织中油菜素甾醇含量有很大的不同,花粉种子中最多,嫩根次之,叶片和果实中最少<sup>[17]</sup>。在油菜素甾醇提取过程中,常常会混杂有其它有机化合物,这将会影响后续油菜素甾醇的定量分析。因此,需要建立一种能够有效去除干扰物质并富集油菜素甾醇的提取和纯化方法。

1.1 样品提取方法 在油菜素甾醇激素分析提取中,样品前处理非常重要。由于油菜素甾醇激素在高温下容易降解,因此,植物组织需经过冷冻并尽快提取,且整个提取过程都要保持在低温下进行,以避免油菜素甾醇激素被酶分解或化学结构发生变化。此外,为了高效地、选择性地从目标组织中提取油菜素甾醇激素,选择一套合适的试剂至关重要。溶剂提取是提取油菜素甾醇激素最常用的手段,所用的溶剂可以是单一的,也可以是组合的。根据相似相溶原理,油菜素甾醇激素容易溶于极性溶剂,非极性溶剂如乙醚等则很少被用到,甲醇由于相对分子质量小、容易进入细胞而被作为首选溶剂<sup>[18-19]</sup>,例如, Xin 等<sup>[18]</sup>利用 95% 的甲醇水溶液替代了甲醇/三氯甲烷溶液,能使提取液中油菜素甾醇激素含量到达每毫升几十微克。油菜素甾醇类化合物不稳定,提取时间也是方法建立中重点考虑的问题, Ding 等<sup>[2]</sup>使用乙腈在 -20 °C 下提取水稻植株叶片中的油菜素甾醇需 12 h。有报道指出,采用超声辅助提取,能够将时间缩短至 2 h,王明月等<sup>[20]</sup>使用超声处理槟榔花粉,提取 3 次,每次提取需 30 min,加标回收率超过 95%, Pan 等<sup>[21]</sup>利用甲醇溶液配合低温微波处理和 1 500 r · min<sup>-1</sup> 的搅拌,使从油菜和向日葵中提取油菜素甾醇类激素的时间缩短到 15 min。

除了使用液液萃取外,也常采用固相提取。利用基体分散固相萃取(Matrix Solid Phase Dispersion,

MSPD) 技术,让水稻叶片粉末通过 MSPD 柱时,与  $C_8$  吸附剂结合而达到提取和富集油菜素甾醇类激素的目的,该过程仅需 5 min<sup>[6]</sup>。该方法大大缩短了提取时间,但加标回收率不足 78%。

1.2 油菜素甾醇类激素纯化方法 纯化的目的是去除复杂基质背景的影响,提高定量分析的准确性。目前,油菜素甾醇类激素纯化的方式主要有以下几种。

1.2.1 液液萃取 液液萃取主要包括溶剂提取和液相分离 2 个步骤。通过 2 种极性的溶剂将油菜素甾醇激素与杂质分开,以此达到纯化的目的。最常用的是水和有机试剂,有机试剂最常用的是石油醚、正己烷、氯仿、乙酸乙酯、二氯甲烷和乙醚。其中,石油醚或者正己烷可用来除去溶液中的酯类和色素,乙酸乙酯或者氯仿水溶液可用于除去水溶性杂质。Gupta 等<sup>[22]</sup>使用氯仿和水、己烷和 80% 甲醇进行 2 次液液萃取纯化油菜素甾醇激素提取液。液液萃取虽可有效地提高回收率,但步骤多、耗时长,且试剂消耗也较多,有时,液液萃取过程会出现乳化现象而影响提取效果,加上该方法无法对油菜素甾醇类激素进行有效富集,因此,应用液液萃取方法时,需要大量的试验样品,这也是该方法渐渐被摒弃的原因。

1.2.2 固相萃取 不同于液液萃取方法,固相萃取是基于不同组分的物理性质,利用固相萃取柱(Solid phase extraction, SPE)将目标化合物从其他组分中分离出来,即固体吸附剂将液体样品中的目标化合物吸附,与样品的基体和干扰化合物分离,然后再用洗脱液洗脱或加热解吸附,达到分离和富集目标化合物的目的<sup>[19]</sup>。在油菜素甾醇类激素提取中,与液液萃取相比,固相萃取耗时短、节约溶剂、相对经济。目前,有很多 SPE 柱用于提取和富集油菜素甾醇激素<sup>[2, 15, 18, 23-24]</sup>。为提高纯化效率,应根据目标提取物的结构性质选择合适的固相吸附剂和样品处理方法。表 1 列出了目前常用的 SPE 柱的吸附剂的主要类型。

表 1 固相萃取柱吸附剂的主要类型

Tab. 1 Absorbents in solid-phase extraction (SPE) columns used for analysis of brassinosteroids

SPE 名称 SPE name	类别 Classes	填充物 Filler	极性 Character	参考文献 References
MAX	反相/阴离子交换混合模式	亲水的 N-乙烯吡咯烷酮 和脂溶性的二乙烯基苯	阴离子/无极性	[18]
MCX	反相/阳离子交换混合模式	亲水的 N-乙烯吡咯烷酮 和脂溶性的二乙烯基苯	阳离子/无极性	[18]
Double layered SPE		墨碳和二级胺硅		[2], [23]
Bond ElutPlexa	反相	非极性化合物带有酸性/ 中性化合物中的多环芳烃	非极性	[24]
$C_{18}$	反相	强疏水硅胶基质	无极性	[15]

SPE 的主要分离模式:离子交换、反相吸附和反相/离子交换混合模式。由于提取液中基质比较复杂,仅用 1 个柱子无法达到理想的纯化效果,通常将 2 种或 2 种以上的柱子并用。在所有吸附剂中, $C_{18}$  使用最广泛。 $C_{18}$  柱过滤之前,一般先将植物提取液用缓冲溶液调至酸性,使激素保留在柱子上,再用相应的含甲醇或者乙醇的酸性溶液进行洗脱<sup>[25]</sup>。 $C_{18}$  能有效地去除极性分子和植物色素。油菜素甾醇激素属于疏水性中性分子,结构中只含有几个羟基,在提取过程中,需要调整提取液 pH 值来调节其离子化程度,使目标分子尽可能地附着在吸附剂上,随后,用相应的洗脱液进行洗脱。Xin 等<sup>[18]</sup>曾利用离子交换柱提取到拟南芥和水稻中的 4 种油菜素甾醇激素。但由于油菜素甾醇激素疏水性特点及结构中较少的羟基基团,导致其电离效率较低,容易被提取液中天然的离子代谢物所掩盖,严重影响检测灵敏度,在一般的 SPE 纯化过程后,干扰物依然存在,影响分析的响应值。目前,多采用混合模式阴离子交换(MAX)柱与混合模式阳离子交换(MCX)柱串联进行纯化,如采用 MAX 柱-MCX 柱联用,能明显减少甚至去除溶液中的离子物质,消除负面干扰,使方法检测限显著降低,试验材料也能减至 1.00 g 以下<sup>[18, 26]</sup>。

固相微萃取(Solid phase micro-extraction, SPME)是 1 种集合提取、浓缩、解吸、进样为一体的固相萃取技术,可直接与气相色谱分析结合,减少了目标提取物收集、转移和注射等中间步骤,提高了方法的精确度<sup>[27]</sup>。SPME 也开始应用于油菜素甾醇激素的提取中。在该方法中,SPME 涂层的选择是关键,它很大

程度上影响萃取效率<sup>[28]</sup>,而且 SPME 与气相色谱(GC)结合在现阶段应用比较广泛,但与高效液相色谱(HPLC)联合使用还很少,因为市场上尚缺少可直接使用的光纤涂层。在大多数情况下,用 SPME 法提取油菜素甾醇激素时,光纤涂层都是实验室自制的。在 SPME-HPLC 分析中,吸附在光纤涂层上的目标物用 HPLC 的流动相解吸。因此,涂层材料必须保证在流动相中有较好的稳定性。Pan 等<sup>[21]</sup>采用了一种新的、简单的 SPME 涂层材料——丙烯酰胺-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物[poly(acrylamide-co-ethylene glycol dimethacrylate)]用于提取表油菜素内酯,使方法检测限达到  $0.13 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Wang 等<sup>[28]</sup>也研发出甲基丙烯酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物[poly(methacrylic acid-co-ethylene dimethacrylate)]的 SPME 涂层材料,用于提取表高油菜素内酯,使检测限下降到  $2.00 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,定量限为  $5.00 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

除了一些常规的固相萃取方法外,还衍生出一些特殊的固相萃取方式。例如,Zhang 等<sup>[29]</sup>合成苯乙炔-4-乙炔基吡啶的磁力聚合物小珠,在微波辐射下提取油菜中表油菜素内酯,提取率为  $26.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。Pan 等<sup>[30]</sup>将 SPME 和自动进样系统相结合,使表油菜素内酯的检测限仅为  $0.70 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,回收率达到  $81.20\% \sim 116.00\%$ 。Wang 等<sup>[28]</sup>也将在线的 SPME、自动进样装置和在线衍生化反应三方面结合,不仅使表油菜素内酯的检测限达到  $2.00 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而且大大减少了试材的使用量,只需  $100 \text{ mg}$  的植物组织便可满足定量分析要求,回收率达到  $80.30\% \sim 92.10\%$ 。Wang 等<sup>[6]</sup>利用基体分散固相萃取技术(MSPD),将样品前处理中的样品匀化、组织细胞裂解、提取、净化等过程简化,不再需要进行沉淀、离心、样品转移等步骤<sup>[31]</sup>极大减少了样品处理时间和目标分析物的损失。检测限为  $8.00 \sim 40.00 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外,在同一柱子中加入 2 种吸附剂,使之成为 GCB/PSA 双层柱,也可达到减少步骤、缩短时间的目的<sup>[2]</sup>。

**1.2.3 免疫亲和纯化** 免疫亲和色谱纯化(Immunoaffinity chromatography purification, IAC)主要根据抗原抗体的特异性结合特性,选择性富集目标产物<sup>[19]</sup>。现阶段,对于小分子物质的制备均匀性好,但该方法需要特异性强的抗体,这也是 IAC 面临的困难。尽管如此,运用 IAC 技术纯化植物油素甾醇激素仍有广阔的前景,因为该技术具有较高选择性和高灵敏性。例如,Swaczynova 等<sup>[25]</sup>将表油菜素内酯与牛血清蛋白偶联合成抗原,制备获得了表油菜素内酯抗体,用于 IAC 法提取中,并结合 HPLC-MS 分析,油菜素甾醇激素的检测范围到达  $0.005 \sim 50.00 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

针对果实中高糖、高酚、低含量的特点,液液萃取无法彻底清除基质中的糖类、酚类杂质,而免疫亲和纯化受困于抗体的制备,那么现阶段使用固相萃取中 2 种或者 2 种以上的固相萃取柱进行串联使用的方式是比较适合的 1 种方式。这种方式不仅可以有效地除去糖类和酚类杂质,而且可以将提取液中的油菜素甾醇激素进行进一步富集,克服果实中高糖、高酚的基质特点。

## 2 定量分析方法的比较

在植物油素甾醇激素的分析中,除了高回收率的提取纯化方法之外,选择合适的定量分析方法也是不可忽视的环节,随着分析仪器和技术的发展,油菜素甾醇激素的定量分析也在不断更新。

**2.1 免疫分析方法** 应用于油菜素甾醇激素检测的免疫分析技术主要包括:放射免疫测定法和酶联免疫吸附测定法。这 2 种方法分别利用放射性标记的抗原和酶结合的抗原,与抗体结合形成抗原-抗体结合物,通过测定放射性和酶活性推算油菜素甾醇含量<sup>[25]</sup>。抗原和抗体结合的特异性是定量测定目标物的根本,但提取液中有一些干扰物质会与抗体结合,造成严重的交叉反应,使定量结果出现较大偏差。这些物质有激素的类似物、中间产物和其他结构类似物。在 20 世纪 70 年代,免疫分析技术被应用于激素定量分析,而应用于油菜素甾醇类激素的分析则更晚一些。免疫分析技术的优点在于其极低的检测限和较高的灵敏度,且所需的样品量很少<sup>[32]</sup>。放射免疫测定法<sup>[28]</sup>主要根据抗原-抗体结合物的放射性强度来计算激素含量,因其标记性物质较短的稳定时间和放射存在的安全隐患,现在几乎不被采用。酶联免疫吸附测定法主要是用酶代替放射性同位素,Swaczynova 等<sup>[25]</sup>利用牛血清蛋白-表油菜素内酯偶联合成抗原,制备抗体,通过 ELISA-HPLC-MS 分析表油菜内酯。检测范围达到  $0.005 \sim 50.00 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。目前,免疫分析技术在油菜素甾醇类激素分析中的应用仍然很少,交叉反应是限制该方法精确度的主要原因。

**2.2 色谱分析方法** 色谱分析的原理是混合物溶解在流动相中,混合物中的任意 1 个组分在分配系数

上微小的差异都会在固定相上出现不同的保留时间<sup>[33]</sup>。色谱分析较高的分离效率以及不同的检测器使其成为 1 个比较理想的方法,可以从复杂的基质背景中分离出油菜素甾醇激素并保证较高的定量结果。目前,气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)都被广泛应用于油菜素甾醇类激素的检测。当使用气相 GC 检测油菜素甾醇激素时,油菜素甾醇激素需要通过衍生,以提高其挥发性和热稳定性。Liu 等<sup>[34]</sup>使用气相色谱-质谱(GC-MS)技术分析果蔬中残留的丙酰芸苔素内酯,检测限达到  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,定量限为  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。但衍生过程步骤繁杂且耗时。HPLC 主要用于检测极性化合物,比较适合检测植物激素,但油菜素甾醇激素结构中缺少发光基团,在使用蒸发光散射检测器<sup>[35]</sup>、紫外检测器<sup>[36]</sup>或者荧光检测器时仍然需要进行衍生化<sup>[37]</sup>。

色谱与质谱(MS)联用能够克服传统色谱分析技术的缺点,如 GC-MS/HPLC-MS 成为当前油菜素甾醇激素分析中比较流行的方法。质谱分析法是一种通过测量带电粒子的质量与带电量之比( $m/z$ )的分析方法,分析物在离子源被电离,然后形成离子束通过离子加速器,被质量分析器检测  $m/z$ 。质谱分析器的  $m/z$  分离能力能够提高分析提取能力。研究者可以监测特征离子通过质谱检测器超高的选择性。单个 4 级杆气相色谱-质谱(GC-MS)或液相色谱-质谱(LC-MS)通过选择离子扫描(SIM)模式进行目标化合物特殊特征离子检测,相对于全离子扫描, SIM 提供较高的灵敏度和选择性。化学电离和电子电离(EI)也被广泛使用,但是 EI 容易产生较多的碎片离子,使目标化合物的识别比较困难。大气压化学电离(APCI)技术的发展扩大了 LC/MS 的应用范围,电喷雾电离(ESI)和 APCI 电离克服了 EI 的缺点,成为 LC/MS 中广泛使用的电离方式<sup>[38]</sup>。现在,ESI 是最普遍使用的离子源,因为其较高的灵敏性和较低的背景<sup>[23]</sup>。对于一些低含量的物质,仅仅使用 1 个 SIM 依然会受到基质干扰,最好选择多级反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM),因为后者拥有比传统质谱更高的选择性,它能够在任何时间和空间里进行监测,类似于三重质谱(QQQ-MS)和离子阱质谱(IT-MS)<sup>[15]</sup>。在质谱多反应监测模式(MRM)中,前体离子在第 1 级四极杆被挑选出来,然后碎片进入碰撞池,诊断产物离子过滤到第 3 级四极杆中,这样每一个电离的化学物质都能给出 1 个独特的气体-产物离子转变,因此能够证明提取物中是否存在该特殊化合物<sup>[39]</sup>。MRM 模式比 SIM 模式更加灵敏,且选择性更好,目标化合物检测速度更快。此外,质谱技术的高灵敏度也大大减少了样品量。Xin<sup>[18]</sup>使用 UPLC-MRM3/MRM-MS 检测技术,只需 1.0 g 鲜质量的样品。Ding 等<sup>[23]</sup>采用 LC-ESI-MS 技术,只需要 1.00 g 叶子或者 0.50 g 花的组织。Huo 等<sup>[15]</sup>使用 UHPLC-ESI-QQQ-MS 检测技术,只需要 2.00 g 植物组织。

利用粒径小于  $2.00 \mu\text{m}$  的小颗粒填充色谱柱,打破了色谱仪器科学的瓶颈,克服了高效液相色谱的限制,这种新形式的液相色谱称之为超高效液相色谱(UPLC)。它的柱子通常使用直径  $1.70 \mu\text{m}$  的颗粒,能够忍受 1 000 bar 的压力,使用更小的微粒可使 UPLC 拥有更高的分离效率。使用 UPLC 方法进行油菜素甾醇激素分析仅需几分钟,而 HPLC 需要数十分钟。Xin 等<sup>[18]</sup>使用 UPLC-MRM3/MRM-MS 技术、Huo 等<sup>[9]</sup>使用 UHPLC-ESI-QQQ-MS 技术分析油菜素甾醇激素,用时不到 10 min。

通常在色谱分析的样品前处理中,有 2 种方式可以提高油菜素甾醇定量精确度,一种是同位素内标法,通过利用  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  和  $^{15}\text{N}$  对油菜素甾醇激素进行标记,通过同位素内标和植物内部油菜素甾醇激素,能够纠正油菜素甾醇激素在前处理过程中的损失误差,但是同位素稀释法的成本较高,不太适合大批量测定。另一种方法则是通过衍生化反应提高灵敏度,在 GC/MS 中的衍生反应主要是为了提高目标物质的挥发性,这样才能更加适用 GC/MS 分析。虽然 LC/MS 能够直接分析油菜素内酯,但是衍生反应被用于提高油菜素甾醇激素衍生物的电离效率,相比未衍生的油菜素甾醇激素,能够提高灵敏度 10~1 000 倍。因此,衍生反应也渐渐被人们所关注。目前,多用硼酸盐衍生化油菜素内酯,常用的硼酸类物质如表 2 所示,硼酸与连二醇容易形成硼酸酯,这是油菜素甾醇激素衍生化反应的基础。而一般的衍生过程需要加热及添加衍生化催化剂<sup>[18]</sup>。最近报道用无水四氢吡喃和 2-噁吡啶-5-硼酸(BPBA),只需振荡数秒,无需加热,即可完成衍生化过程,并且衍生化反应完全,衍生物可保存数月<sup>[15]</sup>。

选择合适的衍生试剂需要根据油菜素甾醇激素的结构性质和衍生产物的理化性质,包括稳定性、沸点、分子极性等。优化衍生反应参数包括衍生试剂、反应时间、反应温度。

表 2 油菜素甾醇衍生反应中常用的衍生试剂与衍生条件

Tab.2 Reagents and conditions used in deriving reactions of brassinosteroids

衍生试剂( Reagent)	衍生条件( Derivatization conditions)	参考文献( Reference)
单酰胺基硼酸 Dansylaminophenylboronic	20 min ,75℃	[4]
m-胺基硼酸 m-aminophenylboronic acid ( m-APBA)	0.10 mL min <sup>-1</sup> ,42 s ,80 ℃	[40]
3-胺基硼酸 3-aminophenylboronicacid ( APBA)	6.80% 吡啶乙腈溶液 10 min ,70 ℃	[6]
3-二甲基-苯硼酸 3-( dimethylamino )-phenylboronic acid( DMAPBA)	75 ℃ 在无水乙腈中反应 1 h ,只需要 30 μg	[18]
3-吡啶硼酸 3-pyridylboronic acid ( PyBA)		[18]
9-菲硼酸 9-phenanthreneboronic acid	在吡啶/乙腈溶液( 15 : 85 , v/v) 中 反应 10 min	[21] , [30]
2-溴吡啶-5-硼酸 2-bromopyridine-5-boronicacid( BPBA)	无水四氢呋喃 ,反应数秒	[38] , [15]
丹酰-3-胺基硼酸 dansyl-3-aminophenylboronate	吡啶和乙腈溶液( 1 : 19 ,v/v) 62 ℃ ,30 min	[41]

### 3 果实中油菜素甾醇研究现状

近年来,在果树中关于油菜素甾醇的研究主要集中于外源喷施油菜素内酯对果实品质的影响<sup>[42,43-44]</sup>,但其影响机理仍不明晰。如外源喷施是否导致果实中油菜素内酯含量升高,是否通过改变了内源油菜素甾醇类激素的水平从而影响果实品质,果实中内源油菜素甾醇的来源有哪些,叶片和根系中的油菜素甾醇类激素是否可卸载到果实中,卸载途径是什么,这些从其他器官载入的油菜素甾醇类激素在果实生长发育和品质形成中起着怎样的作用,要解决这些问题,首先应该建立高效精确灵敏的果实油菜素甾醇的测定方法。植物油菜素甾醇类激素的定量分析多见于水稻种子、拟南芥、茶叶等材料,大多数果实拥有高水分、高糖和高多酚的基质背景,与水稻、拟南芥、茶叶等材料有较大差别,且果实中的油菜素甾醇含量相对于花粉、种子、叶子要低得多,在方法建立时要注意以下几个方面:(1)尽可能减少前处理步骤,减少产物损耗;(2)选择合适 SPE 小柱,减小基质效应;(3)筛选出高效、灵敏的衍生试剂,能够大大提高电离效应,降低方法的检测限,以适应果实中超低含量的油菜素甾醇。此外,随着分析仪器的的发展,选择较为灵敏高效的分析仪器,对果实中油菜素甾醇类激素的精确定量分析也有很大的帮助。

### 4 展 望

油菜素甾醇激素因为其极低的浓度和提取液中复杂的基质,分析检测有很大困难。因此,选择 1 种合适的提取纯化方式和灵敏高效的检测手段显得尤其重要。对于提取纯化方式,现阶段多种纯化方式串联使用时比较流行的方式。对于检测方法,每一种方法都有其优缺点。酶联免疫吸附测定能够有很高的灵敏度和选择性,但容易产生交叉反应,并且只能针对 1 种油菜素甾醇激素。色谱分析相对更加全面一些,但 GC/MS 应用于油菜素甾醇激素相对较少,LC/MS 是现在分析油菜素甾醇激素最流行的工具,因为其可以直接被分析。而其设备的昂贵对其广泛使用有所阻碍。

对果实中油菜素甾醇的分析是研究外源喷施果实后,果实真正吸收量与果实品质改变之间的关系的重要步骤。虽然现阶段尚未有直接从果实中提取油菜素甾醇的报道,但是随着提取技术、纯化技术、色谱分析技术、质谱检测技术的发展,对果实中的油菜素甾醇的分析最终能够实现。

## 参考文献:

- [1] Fridman Y, Savaldi-goldstein S. Brassinosteroids in growth control: How, when and where [J]. *Plant Science*, 2013, 209: 24–31.
- [2] Ding J, Mao L J, Wang S T, et al. Phytochem. determination of endogenous brassinosteroids in plant tissues using solid-phase extraction with double layered cartridge followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Phytochem. Anal.*, 2013(24): 386–394.
- [3] 吕习栋, 袁留斌. 油菜素内酯研究进展 [J]. *农业灾害研究*, 2013, 3(1): 56–57, 60.
- [4] Bajguza A, Tretynb A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 1027–1046.
- [5] Khripacha V A, Zhabinskii V N, Zhiburtovicha Y Y, et al. Preparation and synthetic application of partially protected brassinosteroids [J]. *Steroids*, 2010, 75: 27–33.
- [6] Wang L, Duan C F, Wu D P, et al. Quantification of endogenous brassinosteroids in sub-gram plant tissues by in-line matrix solid-phase dispersion-tandem solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1395: 44–51.
- [7] 吴倩, 王璐, 吴大朋. 等. 植物激素样品前处理方法的研究进展 [J]. *色谱*, 2014, 32(4): 319–329.
- [8] 孙伟, 范开业, 王斌. 等. 新型植物激素油菜素内酯研究进展及在农业生产中的应用 [J]. *农业科技通讯*, 2013(2): 116–117.
- [9] Tarkowská D, Novák O, Floková K, et al. Quo vadis plant hormone analysis? [J]. *Planta*, 2014, 240: 55–76.
- [10] Ikekawa N, Fujimoto Y, Ishiguro M. Reminiscences of research on the chemistry and biology of natural sterols in insects, plants and humans [J]. *The Japan Academy*, 2013, 89: 349–369.
- [11] 潘加亮, 谭微, 李攻科. 等. 油菜素甾醇激素分析的研究进展 [J]. *色谱*, 2011, 29(2): 105–110.
- [12] Sasse J M. Physiological actions of brassinosteroids: an update [J]. *Plant Growth Regul.*, 2003, 22: 276–288.
- [13] 郑洁, 王磊. 油菜素内酯在植物生长发育中的作用机制研究进展 [J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(1): 52–58.
- [14] Bajguz A. Metabolism of brassinosteroids in plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45: 95–107.
- [15] Huo F F, Wang X, Han Y H, et al. A new derivatization approach for the rapid and sensitive analysis of brassinosteroids by using ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2012, 99: 420–425.
- [16] Wu C Y, Trieu A, Radhakrishnan P, et al. Brassinosteroids regulate grain filling in rice [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20: 2130–2145.
- [17] 张玉萍, 刘威生, 孙绍春. 等. 油菜素内酯在果树上的应用研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(12): 6153–6157.
- [18] Xin P Y, Yan J J, Fan J S, et al. An improved simplified high-sensitivity quantification method for determining brassinosteroids in different tissues of rice and arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162: 2056–2066.
- [19] Fu J H, Sun X H, Wang J D, et al. Progress in quantitative analysis of plant hormones [J]. *Plant Physiology*, 2011, 56(4/5): 355–366.
- [20] 王明月, 吕岱竹. 高效液相色谱法测定槟榔花粉中的芸苔素内酯 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(4): 1305–1306.
- [21] Pan J L, Hu Y L, Liang T J, et al. Preparation of solid-phase microextraction fibers by in-mold coating strategy for derivatization analysis of 24-epibrassinolide in pollen samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1262: 49–55.
- [22] Gupta D, Bhardwaj R, Nagar P K, et al. Isolation and characterization of brassinosteroids from leaves of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [J]. *Plant Growth Regulation*, 2004, 43: 97–100.
- [23] Ding J, Mao L J, Yuan B F, et al. A selective pretreatment method for determination of endogenous active brassinosteroids in plant tissues: double layered solid phase extraction combined with boronate affinity polymer monolith microextraction [J]. *Plant Methods*, 2013, 9(13): 1–9.
- [24] Stirk W A, Tarkowská D, Turecová V, et al. Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima* [J]. *J. Appl. Phycol.*, 2014, 26: 561–567.
- [25] Swaczynova J, Novák O, Hauserová E, et al. New techniques for the estimation of naturally occurring brassinosteroids [J]. *Plant Growth Regul.*, 2007, 26: 1–14.
- [26] Xin P Y, Yan J J, Fan J S, et al. A dual role of boronate affinity in high-sensitivity detection of vicinal diol brassinosteroids from sub-gram plant tissues via UPLC-MS/MS [J]. *Analyst*, 2013, 138: 1342–1345.
- [27] 黄健祥, 胡玉玲, 李攻科. 选择性固相微萃取涂层的研究进展 [J]. *分析科学学报*, 2008, 24(1): 97–102.
- [28] Wang X, Ma Q, Li M, et al. Automated and sensitive analysis of 28-epihomobrassinolide in *Arabidopsis thaliana* by on-line polymer monolith microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*,

- 2013 ,1317: 121 – 128.
- [29] Zhang Z M ,Zhang Y ,Tan W , et al. Preparation of styrene-co-4-vinylpyridine magnetic polymer beads by microwave irradiation for analysis of trace 24-epibrassinolide in plant samples using high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A* ,2010 ,1217: 6455 – 6461.
- [30] Pan J L ,Huang Y C ,Liu L , et al. A novel fractionized sampling and stacking strategy for online hyphenation of solid-phase-based extraction to ultra-high performance liquid chromatography for ultrasensitive analysis [J]. *Journal of Chromatography A* , 2013 ,1316: 29 – 36.
- [31] 樊晓青,马琳. MSPD 在农药残留分析中的应用进展 [J]. *农药科学与管理* 2014 ,35( 2) : 27 – 30.
- [32] 孙太凡,叶非. 酶免疫分析技术在农药残留分析中的应用 [J]. *理化检验(化学分册)* 2005 ,41: 223 – 226.
- [33] Hedden P. Modern methods for the quantitative of plant hormones [J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* ,1993 , 44: 107 – 29.
- [34] Liu X G ,Dong F S ,Hu H , et al. Residue analysis of propionyl brassinolide in fruit and vegetables by GC-MS [J]. *Chromatographia* ,2009 ,69: 1453 – 1456.
- [35] 曹立冬,杨晶,郑丽,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器检测 2,4-表芸苔素内酯原药含量 [J]. *农药学报* , 2014 ,16( 1) : 72 – 77.
- [36] 乔纪伟,郝红英,姚家元,等. 高效液相定量分析 0.01% 芸苔素内酯可溶液剂 [J]. *上海化工* 2013 ,38( 4) : 9 – 12.
- [37] 王明月,李建国. HPLC 荧光法测定苦瓜中的 2,4-表芸苔素内酯残留 [J]. *农药* 2009 ,48( 9) : 662 – 663.
- [38] 霍飞凤,白玉,刘虎威. 两种油菜素内酯甾醇类植物激素的多级质谱分析 [J]. *科学通报* 2010 ,55( 15) : 1459 – 1464.
- [39] 彭西甜,胡西洲,沈菁,等. 高效液相色谱-串联质谱法在食品中农药残留分析中的应用 [J]. *分析科学学报* 2014 ,30 ( 4) : 572 – 577.
- [40] Wu Q ,Wu D P ,Shen Z , et al. Quantification of endogenous brassinosteroids in plant by on-line two-dimensional microscale solid phase extraction-on column derivatization coupled with high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A* ,2013 ,1297: 56 – 63.
- [41] Svatos A ,Antonchick A ,Schneider B. Determination of brassinosteroids in the sub-femtomolar range using dansyl-3-amino-phenylboronate derivatization and electrospray mass spectrometry [J]. *Mass Spectrom* ,2004 ,18: 816 – 821.
- [42] Luan L Y ,Zhang Z W ,Xi Z M , et al. Brassinosteroids regulate anthocyanin biosynthesis in the ripening of grape berries [J]. *S. Afr. J. Enol. Vitic* 2013 ,24: 196 – 203.
- [43] Wang Q ,Ding T ,Gao L P , et al. Effect of brassinolide on chilling injury of green bell pepper in storage [J]. *Scientia Horticulturae* 2012 ,144: 195 – 200.
- [44] 马立娜,惠竹梅,高翔,等. 脱落酸和 2,4-表油菜素内酯对葡萄成熟过程中果实内源激素含量的影响 [J]. *北方园艺* 2012( 17) : 16 – 19.

## Detection Techniques for Brassinosteroids and Their Potential Application in Fruits

YANG Xinxin , PAN Qihong

( College of Food Science and Nutritional Engineering , China Agricultural University , Beijing 100083 , China)

**Abstract:** Brassinosteroids ( BRs) are the sixth plant endogenous hormone , and their role in regulating plant growth and development has aroused great concern over the world. This hormone has an extremely low concentration in plant tissue , especially in fruits where the matrix is highly complicated , and it is quite difficult to extract efficiently and analyze precisely. Recent methods for extraction and analysis of plant BRs were reviewed , and their advantages and disadvantages compared. This review might provide useful information for analysis of brassinosteroids in fruits.

**Keywords:** brassinosteroids; extraction; analysis