



УДК: 581.192:58.081

МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФІТОГОРМОНІВ У РОСЛИННИХ ТКАНИНАХ

М. М. Щербатюк^{ORCID}*, Л. В. Войтенко^{ORCID}, В. А. Васюк^{ORCID}, І. В. Косаківська^{ORCID}

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ 01004, Україна*

**Кореспондуючий автор: e-mail: chrom.botany@ukr.net*

*Shcherbatiuk M.M., Voytenko L.V., Vasyuk V.A., Kosakivska I.V. Method for quantitative determination of phytohormones in plant tissues. **Studia Biologica**, 2020: 14(2); 117–136 • DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1402.624>*

В огляді проаналізовано й узагальнено відомості про історію розвитку і сучасний стан методичних підходів якісного та кількісного визначення фітогормонів у рослинних тканинах. Фітогормони відіграють ключову роль у багатьох фізіологічних процесах протягом життєвого циклу рослин – від проростання насіння до старіння, тому визначення концентрації ендогенних гормонів має важливе значення для з'ясування ролі певного гормону в будь-якому фізіологічному процесі. Чутливий і швидкий фізико-хімічний метод одночасної кількісної оцінки головних класів фітогормонів надзвичайно важливий для дослідження сигнальних систем контролю конкретних шляхів розвитку та фізіологічних реакцій. У рослинних тканинах фітогормони наявні в дуже низьких концентраціях (від 10^{-9} М до 10^{-6} М), тому розробка високоефективних, комплексних і водночас надійних підходів до їхнього визначення є надзвичайно актуальною. У статті наведено коротку характеристику головних класів фітогормонів, стисло описано їхню функціональну активність. З'ясовано важливість методів ідентифікації фітогормонів у рослинних тканинах для фізіології рослин і виробничої практики. Представлено обґрунтовану та перевірену послідовність процедур з екстракції рослинних гормонів, очищення отриманих екстрактів від інтерферуючих речовин, методологію кількісного визначення індоліл-3-оцтової, абсцизової, гіберелінової, саліцилової кислот і п'яти форм цитокінінів у одному зразку матеріалу, яка поєднує високоефективну рідинну хроматографію з мас-спектрометрією. Наведено чотири хроматографічні методи для розділення речовин у аліквотах проб і їхнього детектування й умови іонізації речовин-аналітів у мас-спектрометрі. Загалом, представлена методика є максимально адаптованою для вітчизняних лабораторій.

Ключова слова: ВЕРХ/МС аналіз, пробопідготовка, фітогормони

ВСТУП

Фітогормони відіграють ключову роль у більшості фізіологічних процесів у рослин. Це група структурно різних сполук з відмінними фізико-хімічними властивостями, які діють зазвичай на наномолярних рівнях [24]. До рослинних гормонів належить п'ять "класичних" груп гормонів: ауксини, серед яких найпоширенішою є індоліл-3-оцтова кислота (ІОК), гібереліни (ГК_n), цитокініни (ЦТК), абсцизова кислота (АБК) і етилен. На сьогодні до числа регуляторів росту рослин належать саліцилова кислота (СК), жасмонати, брасиностероїди, поліаміни та стріголактони. Усі ці речовини відповідають критеріям, які треба пов'язувати з поняттям "гормон" [7, 13, 26]. Крім того, очікується, що список рослинних гормонів збільшиться у майбутньому завдяки подальшому вивченню процесів росту й розвитку рослин і їхніх реакцій на стресори, а також завдяки подальшому вдосконаленню аналітичних методів.

ІОК, цитокініни й АБК є головними сигнальними молекулами регуляції росту і розвитку рослин, а також вони разом із СК залучені до захисту від дії різних абіотичних чинників, зокрема, від гіпо- та гіпертермії. Для нормального перебігу ростових процесів надзвичайно важливі гібереліни. Визначення кількості гормонів у тканинах і визначення їхнього співвідношення можуть виявити різні стратегії рослин для подолання стресу, як, наприклад, сповільнення темпів росту або активація обмінних процесів у організмі [11]. Через динамічну мінливість рівнів фітогормонів у рослинних тканинах закономірно визначати їхній вміст в одному зразку. Сучасні ж методи підготовки проб дають змогу розділити окремі гормональні фракції.

Останні дані свідчать, що, крім стимуляції захисних механізмів, важливою частиною стресової реакції рослин є модуляція росту і розвитку. Процесом поділу клітин керують переважно два гормони – ауксини та цитокініни. Активним ендегенним ауксином є ІОК, яка стимулює поділ і ріст клітин розтягом, а також контролює апікальне домінування, позитивно впливає на ріст коренів, опосередковує тропічні реакції та сповільнює процеси старіння [34]. Велика кількість ІОК (до 90–95 %) наявна в рослинах у кон'югованій формі, головні з амінокислотами (аспаратом, лейцином, аланіном чи глютаміном) або цукрами. Ці кон'юганти або становлять собою форму збереження пулу ауксину, або є продуктами дезактивації гормону. ІОК також може метаболізуватися до індолілмасляної кислоти.

Цитокініни розглядаються як речовини, що стимулюють (за наявності ауксину) процес ділення клітин – цитокінез [17, 22, 32]. Вони незамінні для переходу до наступного етапу поділу в обох контрольних точках клітинного циклу – G2/M та G1/S [10]. Цитокініни позитивно впливають на фотосинтез [3], затримують процеси старіння та зміцнюють структуру клітинних стінок [17, 30, 32]. Вони відіграють вирішальну роль у врівноваженні процесів поглинання та розподілу макроелементів рослинним організмом [18]. Природні цитокініни є похідними аденіну з ізопреноїдним, або ж із ароматичним бічним ланцюгом. Фізіологічно активними формами цитокінінів є речовини з лужними властивостями. Основна роль належить *транс*-зеатину (З). Менш помітну роль відіграють рибозиди, наприклад, зеатинрибозид (ЗР). Цитокініни дезактивуються розщепленням бічного ланцюга цитокініноксидазою / дегідрогеназою, або ж кон'югацією з глюкозою. Глюкозилювання гідроксильної групи в бічному ланцюзі призводить до утворення О-глюкозидів (основна запасна форма для цитокінінів), і ці речовини можуть легко гідролізуватися до активних молекул. У свою чергу, глюкозилювання в пуриновому кільці в положенні N9- і N7- є необоротним [11].

Ключовим гормоном у захисті рослин від абіотичних навантажень, включаючи засолення і температурний стрес, є АБК. Фітогормон опосередковує як швидкі реакції (модуляція потоків іонів, що призводять до закриття продихів), так і відносно триваліші зміни в експресії багатьох генів, пов'язаних із відповіддю на дію стресорів. Регуляція транспірації за допомогою закриття продихів має вирішальне значення для подолання дефіциту води. Зміни в експресії генів призводять до стимуляції утворення цілого діапазону захисних речовин, наприклад, дегідринів, антиоксидантів глутатіону й аскорбату, проліну. АБК-регульовані гени становлять понад 10 % геному у арабідопсису [5]. АВА – є сесквітерпеноїдом (15 атомів вуглецю). Відповідно до положення карбоксильної групи в бічному ланцюгу можна виділити *цис*- і *транс*-ізомери речовини. У рослин, передусім, біологічну активність проявляє *цис*-форма. Унаслідок оптичної активності атома вуглецю в положенні C1, що несе гідроксильну групу, АБК може виникати або як (S)/(+) ізомер, який є найбільш фізіологічно активним, або як набагато менш активний (R)/(-) ізомер [11]. У клітинах рослин АБК дезактивується кон'югацією з глюкозою і запасується для зберігання. Молекули АБК також можуть бути необоротно інактивовані до фазеєвої, дигідрофазеєвої або неофазеєвої кислот.

Цитокініни й АБК виявляють антагоністичну дію в регуляції багатьох процесів, що беруть участь у подоланні стресового стану (ділення клітин, відкриття продихів, фотосинтетична активність). Їхнє співвідношення у тканинах може відображати стратегії рослин, покликані подолати стрес. Оскільки процеси захисту є дуже енерговитратними, сповільнення росту збігається з високим вмістом АБК і низьким вмістом активних форм цитокінінів і може призвести до перерозподілу обмежених енергетичних запасів та джерел на захисні реакції. З іншого боку, стабілізація фотосинтезу як джерела енергії завдяки збереженню відносно високого рівня цитокінінів у тканинах може призвести до мобілізації рослинного обміну. Це може бути виправданим, особливо за більш м'яких або коротких стресових навантажень [3, 5, 11].

Гормональна система регуляції відзначається надзвичайно високим ступенем складності ієрархічних зв'язків у інтактній рослині й особливим динамізмом реагування на той чи інший чинник середовища. У регуляції ростових процесів гібереліни відіграють особливу роль. Вони характеризуються широким спектром дії в рослинному організмі. Одним із проявів їхнього впливу є стимуляція надходження води у клітини завдяки зростанню концентрації осмотично активних речовин, насамперед іонів кальцію Ca^{2+} , що зумовлює збільшення їхніх розмірів [20]. Гібереліни – клас фітогормонів, що об'єднує понад 130 форм із широким спектром реакцій-відповідей, задіяних у життєвому циклі рослин різних систематичних груп [31]. Головними біологічними функціями цих гормонів є їхня участь у регуляції процесів проростання насіння, координація ділення клітин і їхнього росту розтягом, детермінація статі, індукція цвітіння квіткових рослин [14, 16]. Різним видам рослин притаманний специфічний якісний і кількісний склад гіберелінів, який змінюється на певних стадіях росту й розвитку. У кожного виду є домінуючі гібереліни, задіяні у фізіологічних процесах, і гібереліни, які слугують проміжними ланками синтезу цих фітогормонів [6], однак більшість дослідників важливу роль у процесах росту і розвитку відводять саме ГК_3 .

Ендогенний біосинтез СК відіграє головну роль у реакції гіперчутливості рослин, а також важливу роль у формуванні стійкості як проростаючого насіння, так і дорослих рослин до широкого кола інфекцій [29]. У цьому сенсі молекули СК у рослин,

як і у організмах ссавців, є ефективним засобом захисту [8]. У рослин різних видів концентрація ендогенної СК у тканинах може відрізнятися у 100 разів [28]. Зокрема, в арабідопсису Таля (*Arabidopsis thaliana*) вміст СК може коливатися від 0,25 до 1 мкг/г сирової ваги [2, 25, 33]. Вплив екзогенної обробки СК на ростові процеси залежить від виду рослин, стадії розвитку і концентрації речовини. У зв'язку з цим деякі дослідники висловлювали припущення, що стимулюючий вплив СК може бути пов'язаний зі змінами гормонального статусу рослин [1].

Взаємодія рослин із часто несприятливим середовищем регулюється, принаймні частково, фітогормонами. Кількісний аналіз гормонів може дати важливу інформацію про фізіологічний стан рослин і сприяти передбаченню їхнього подальшого фізіологічного стану. Гормони, а також їхні метаболіти можуть бути ідентифіковані та кількісно визначені за допомогою високоефективної рідинної хроматографії в тандемі з мас-спектрометрією (ВЕРХ/МС).

Варто, однак, зазначити, що оцінка вмісту фітогормонів у рослинних тканинах була і є складним завданням через їхній надзвичайно низький вміст (у діапазоні пікомолів на грам сирової ваги – пМ/г). Водночас рослинні тканини дуже багаті на потенційні забруднювачі аналізу різних класів. Це насамперед первинні та вторинні метаболіти, наявні у значно більших концентраціях. Зазвичай їхній вміст становить мкМ-лі й мМ-лі на грам сирової речовини. Першими методиками, які використовували для відносної оцінки вмісту гормонів у тканинах рослин, були біотести [12]. Подальший розвиток аналітичних методів дав змогу точніше визначати вміст фітогормонів. Однак перші аналітичні методи кількісної оцінки фітогормонів мали досить низьку вибірковість і чутливість.

На рис. 1 наведено традиційну схему виділення, очищення, фракціонування й аналізу ауксинів, гіберелінів, цитокінінів, а також абсцизової кислоти у рослинних тканинах. Основні аспекти схеми взято з публікації “Методические рекомендации...” (1988) [15], до них автори додали власні узагальнення й доповнення. За цією схемою здійснювали фітогормональний аналіз протягом досить тривалого часу, зокрема, в Інституті ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. Головною її перевагою було визначення гідролізних, тобто запасних форм ІОК і АБК у пробі. Однак такий аналіз на гормони потребував великої кількості рослинного матеріалу (як правило, це 9 г, по 3 г для кожної аліквоти) і поєднував кілька комплексних етапів очищення проб. Результати процедури виділення часто виявлялися непередбачуваними, а очищення – трудомістким і витратним.

Ще один етап в історії розвитку методів оцінки вмісту фітогормонів пов'язаний із виробництвом антитіл, специфічних для окремих гормонів [21]. Кількісне визначення концентрації гормону в зразку ґрунтувалося на принципі конкуренції за обмежену кількість антитіл або на застосуванні радіоактивно міченого стандарту (радіоімунаналіз). Інший варіант – імуоферментний аналіз, коли стандарти пов'язані з ферментом (наприклад, із фосфатазою або пероксидазою). Обмеженнями імуних методів є низька специфічність антитіл, а також наявність у зразках інтерферуючих речовин. Через відносно невеликий розмір молекул гормонів антитіла можуть з'єднуватися лише з кон'югатом гормону чи високомолекулярними “носіями”. Отже, антитіла мають досить низький рівень розпізнавання частини молекули, яка застосовується для зв'язування з білком. Імунологічний аналіз усе ще часто використовують для визначення АБК, адже структура продуктів дезактивації речовини достатньою мірою відрізняється від активної молекули. Недоліком методу є те, що

він може давати помилкові результати у випадку цитокінінів. Численні продукти дезактивації цитокініну, цитокінін-глюкозиди можуть виявляти досить значну перехресну реакційну здатність. Тому під час визначення цитокінінів частіше використовують фракціонування проб препаративної ВЕРХ із подальшим імунологічним визначенням окремих речовин в окремих фракціях. Такий підхід ускладнюється ймовірною різницею часу затримки, спричиненою іншими сполуками, наявними у зразку (які за кількістю значно переважають гормони), або їхнім впливом на взаємодію гормон-антитіло (це явище може бути як негативним, так і позитивним).

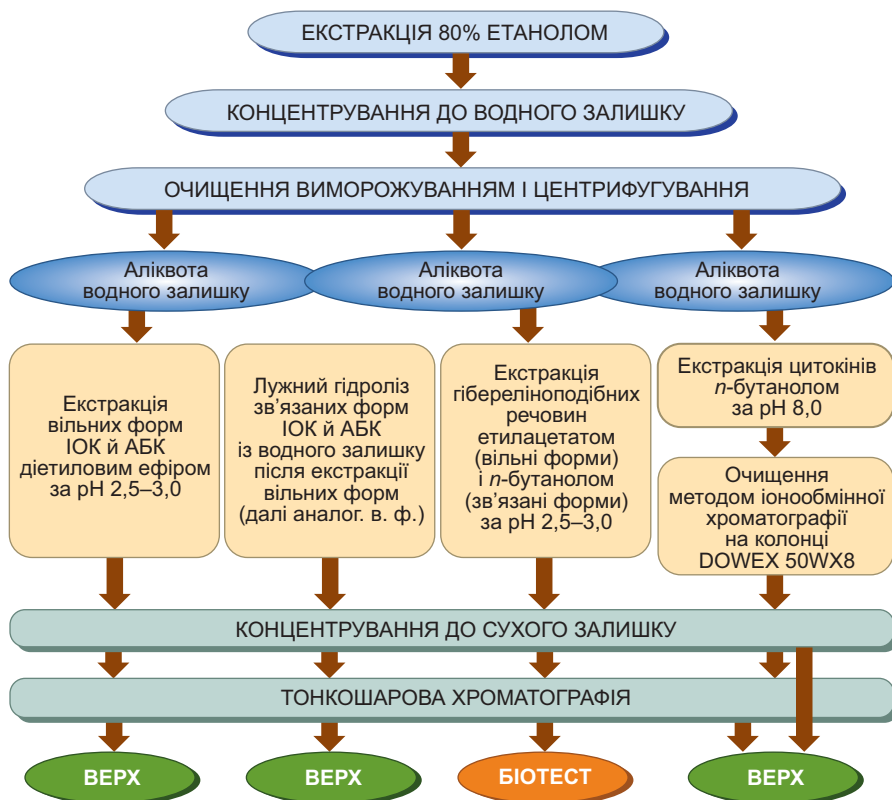


Рис. 1. Традиційна схема визначення фітогормонів у рослинному матеріалі, коли виморожений і відцентрифугований екстракт ділять на три аліквоти для визначення ІОК і АБК, гібереліноподібних речовин, цитокінінів відповідно (в. ф. – вільні форми, ВЕРХ – вискоєфективна рідинна хроматографія)

Fig. 1. Traditional scheme of quantitation of hormones in plant material, when the extract after freezing and centrifugation is divided into three aliquots for determination IAA and ABA, gibberellinlike substances, cytokinins severally (в. ф. – free forms, ВЕРХ – high performance liquid chromatography)

На сьогодні у разі потреби кількісного аналітичного визначення фітогормонів надають перевагу використанню фізико-хімічних методів. Це, насамперед, обернено-фазна ВЕРХ у поєднанні з мас-спектрометрією. Основою цього методу є розділення попередньо очищеного рослинного екстракту за допомогою колонок, заповнених ліпофільно-модифікованим силікагелем, із подальшим визначенням у детекторному

блоці. Хроматограма є серією піків, які належать досліджуваній речовині та домішкам. Точну ідентифікацію піку, записаного спектрофотометричним детектором (DAD-матрицею), можна, наприклад, провести за допомогою одноквадрупольного мас-спектрометра, що показує відношення молекулярної маси до заряду конкретної речовини, якій відповідає пік. Значення цього показника відомі. Також для ідентифікації за часом появи піку застосовують стандарти – хімічно синтезовані аналоги природних фітогормонів.

Раніше повідомлялося про можливість використання газового хроматографа в тандемі з мультиквадрупольним мас-спектрометром (ГХ-МС/МС) для одночасного аналізу ІОК, АБК, СК, жасмонової кислоти (ЖОК) у *Arabidopsis thaliana* [23]. Однак аналіз за допомогою методу ГХ-МС/МС обмежується леткими сполуками, тому перед аналітичними роботами необхідно очистити і дериватизувати гормони. Ще одним недоліком газо-хроматографічного аналізу, крім очищення й дериватизації, є висока температура термостату колонки, за якої має відбуватися розділення компонентів проби. Внаслідок цього термічно лабільні сполуки у процесі аналізу можуть руйнуватися [27].

Рідинна хроматографія, поєднана з мас-спектрометрією (ВЕРХ/МС) є вдалою альтернативою методу ГХ/МС/МС. Сучасна рідинна хроматографія може ефективно і швидко розділяти складні суміші сполук із широким діапазоном полярності без необхідності їхньої дериватизації. Повідомлялося про метод ВЕРХ у тандемі з мас-спектрометрією за умов іонізації “електроспрей” (ВЕРХ/ЕС-МС/МС) для одночасного аналізу гормонів рослин чотирьох різних класів (ауксини, цитокініни, ГК й АБК) і їхніх метаболітів. Це дало змогу ґрунтовно проаналізувати гормональну регуляцію стану спокою насіння салату, зумовленого температурними умовами [4]. Також було розроблено метод ВЕРХ/ЕС-МС/МС аналізу семи основних класів рослинних гормонів, включаючи ауксини, цитокініни, ГК, АБК, жасмонати, брасиностероїди та СК у тканинах *Arabidopsis thaliana* [26]. Крім того, описано методику визначення фітогормонів (цитокінінів, ауксинів, АБК та ГА) у тканинах рису за допомогою ультрависокоєфективної хроматографії (ультрависокого тиску) в тандемі з мас-спектрометрією за умов іонізації “електроспрей” (УВЕРХ/ЕС-МС/МС) [19]. За такого методичного підходу дослідники для підвищення межі виявлення речовин-аналітів, котрі зазвичай іонізуються в режимі негативно заряджених сполук, дериватизували ІОК і АБК за допомогою бромохоліну й аналізували всі сполуки в режимі позитивної іонізації. Водночас такий підхід трохи обмежений і не може бути використаний для аналізу інших рослинних гормонів, зокрема, СК та ЖОК.

У свою чергу, сучасні мас-спектрометри мають важливі особливості, які роблять їх майже ідеальними детекторами, – високу чутливість, селективність і швидкодію. Мас-спектрометри належать до найчутливіших типів детекторів, здатних виявити навіть кілька пікограм речовини-аналіта. Чутливість мас-спектрометрів дає змогу суттєво знизити кількість матеріалу, необхідного для аналізу. Мінімальна наважка, необхідна для аналізу, може становити лише 100 мг свіжого рослинного матеріалу чи навіть менше. Відповідно, це спрощує процедуру відбору зразків і дає змогу аналізувати матеріали в обмеженій кількості, наприклад, фрагменти окремих частин рослин або ж тканин невеликих за розміром і масою рослин. Селективність мас-спектрометрії ґрунтується на здатності вимірювати дуже специфічний параметр сполуки, його молекулярну масу (точніше, відношення маси до

заряду – m/z). У режимі вибору й моніторингу маси конкретного аналіта прилад відфільтровує всі інші маси. Отже, записана хроматограма відображає лише сполуки з однаковою масою, ізомери або ізобари (неспоріднені сполуки з однаковою масою, які, однак, розділяються хроматографічною колонкою). Ще більш вибірковим варіантом аналітичного обладнання є тандем, відомий як МС/МС (рис. 2). Перший квадруполь мас-детектора дає змогу визначати показник маси до заряду m/z однієї речовини (попередника, власне m/z аналіта), яка далі “розбивається” на специфічні фрагменти. Потім утворені фрагменти сепаруються, і лише позначені оператором фрагменти будуть скануватися приладом. Завдяки цьому принципу можна виявити лише сполуки з попередньо вибраними масовими перетвореннями попередник-фрагмент. Тандем МС/МС має настільки високу селективність, що хроматограма навіть неідеально очищеного екстракту часто може містити лише один пік цільової сполуки-аналіта. Висока селективність мас-детекторів підвищує впевненість у процесі ідентифікації сполуки та дає змогу спростити процедуру очищення до кількох етапів. У свою чергу, прогрес в побудові інтегральних мікросхем допоміг зробити швидкодію мас-детекторів надзвичайно високою, що дає змогу миттєво вимірювати і переключатися між багатьма заздалегідь встановленими у програмному інтерфейсі приладу масами. Швидкодія сучасних мас-детекторів дає змогу здійснити одночасний аналіз десятків і сотень сполук в одному зразку, що забезпечує значне розширення метаболічного профілювання.

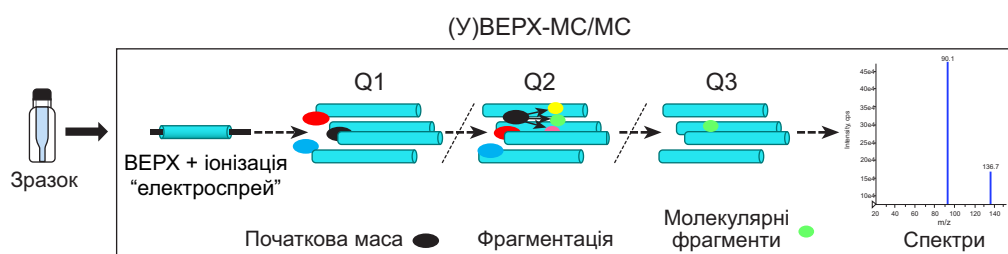


Рис. 2. Загальна схема аналізу аликвот зразків за допомогою мас-спектрометра з трьома квадрупольми МС/МС, за [24]

Fig. 2. The analysis of samples aliquots using a triple-quadrupole MS/MS mass spectrometer [24]

Отже, вдосконалення аналітичних приладів дало змогу значно підвищити ефективність, селективність, чутливість і пропускну здатність стосовно великої кількості речовин, зокрема, фітогормонів. Тепер оптимальним аналітичним методом для аналізу фітогормонів є ВЕРХ, або УВЕРХ (хроматографія ультрависокого тиску) в тандемі з 3-квадрупольним мас-спектрометричним детектором (МС/МС). Проте це обладнання дуже дороге, тому далеко не всі лабораторії його мають. Значно поширенішими є аналітичні хроматографи зі спектрофотометричним детектором і мас-спектрометром з одним квадруполем ВЕРХ/МС.

Крім наявності аналітичного обладнання досить високого рівня, щоб отримати достовірні, фізіологічно релевантні дані про вміст фітогормонів, необхідно вжити запобіжних заходів під час збору проб. Вміст усіх фітогормонів значно коливається упродовж доби, тому відбір проб варто проводити приблизно в однаковий час. Необхідно також брати до уваги, що рівень гормонів змінюється протягом року. Зокрема, зразки, відібрані взимку, суттєво відрізняються від весняних і літніх (навіть у випадку

рослин, вирощених у ростових камерах за однакової температури без будь-якого доступу денного світла). Також інтенсивність світла (і його спектр) суттєво впливає на гормональний пул, що ускладнює відтворення результатів експериментів у різних лабораторіях. Окремі тканини цілісної рослини (листя, корінь, стебло) відрізняються за рівнем фітогормонів. Досить істотні відмінності у концентрації наявні також серед окремих листків на стеблі та навіть усередині однієї листової пластинки, – активніше ростучі частини мають вищий рівень цитокінінів. Це спостерігають, наприклад, у базальній частині листових пластинок однодольних рослин.

Процедури аналізу фітогормонів у рослинному матеріалі включають відбір зразків, екстракцію фітогормонів, очищення отриманих екстрактів, кількісне визначення за допомогою ВЕРХ/МС. Процедури, описані в роботах П. Добрева зі співавторами [9, 11], допомагають визначити три групи рослинних фітогормонів – цитокініни, ІОК і АБК в одному зразку.

Саме методичні підходи П. Добрева з певними модифікаціями є основою представленого методу пробопідготовки. Аналітична ж частина розроблена авторами самостійно і є цілком оригінальною. Крім того, під час підготовки проб у кислотну фракцію (ІОК і АБК) потрапляють гібереліни, зокрема, ГК₃ та саліцилова кислота – речовина, яку прийнято вважати фітогормоном. Їх також можна визначати кількісно. Варто також зазначити, що тепер оптимальним аналітичним методом фітогормонального аналізу є ВЕРХ/МС/МС, однак представлена методика насамперед орієнтована на підготовку до кількісного аналізу за допомогою рідинного хроматографа з діодно-матричним детекторним блоком і одноквадрупольним мас-детектором – ВЕРХ/МС, оскільки в такій конфігурації хроматографічне обладнання є найбільш поширеним у вітчизняних наукових лабораторіях біологічного спрямування.

МАТЕРІАЛИ ТА РЕАКТИВИ

Таблиця 1. Матеріали та реактиви для екстракції фітогормонів, очищення отриманих проб і проведення аналітичних робіт

Table 1. Materials and reagents for extraction of plant hormones, purification of the obtained samples and analysis

№	Найменування	Примітки й уточнення
Екстракція фітогормонів		
1.	Керамічні ступки з товчачиками	
2.	Рідкий азот	
3.	Піпетки	50 мкл та 5 мл
4.	Мірні циліндри	1 л та 100 мл
5.	Аналітичні терези	З точністю до 0,0001 г
6.	Метилловий спирт (метанол)	Найвищого очищення, для ВЕРХ
7.	Вода	Подвійної дистиляції або дистильована й деіонізована
8.	Мурашина кислота	Найвищого очищення, для ВЕРХ
9.	Епіндорфи для проб/центрифужні пробірки	Залежно від об'єму проб
10.	Центрифуга з охолодженням	+4 °С
11.	Морозильна камера	-20 °С

Закінчення табл. 1

12.	Відповідні хімічні стандарти для побудови багаторівневих калібрувальних таблиць хроматографічних методів: ІОК, АБК, ГК ₃ , СА, <i>транс</i> -зеатину (З), <i>транс</i> -зеатинглюкозиду (ЗГ), <i>транс</i> -зеатинрибозиду (ЗР), ізопентеніладеніну (іП) та ізопентеніладенозину (іПА) виробництва Sigma-Aldrich, США	Ще можливий варіант використання хімічно синтезованих фітогормонів – додавання до проб як внутрішніх стандартів або ж для перевірки втрат методу
Очищення проб		
1.	Метиловий спирт (метанол)	Найвищого очищення, для ВЕРХ
2.	Мурашина кислота	Найвищого очищення, для ВЕРХ
3.	За необхідності визначати зв'язані форми (фосфати) цитокінінів – льодяна оцтова кислота	Найвищого очищення, для ВЕРХ, використовується для зупинки ферментативної реакції
4.	Гідроксид амонію (розчин аміаку)	25–26 %
5.	Вода	Деіонізована
6.	SPE C18 картриджі Sep-Pak Plus, Waters	Каталожний номер: WAT036810
7.	SPE Oasis MCX картриджі, 6 cc/150 mg, Waters	Каталожний номер: 186000256
8.	Вакуумний колектор для картриджів твердотільної екстракції SPE на 12 або 24 проби	Використовується, щоби встановити SPE картриджі для одночасного очищення значної кількості проб. Цей пристрій можна замінити вакуумним насосом 12 В малої потужності зі системою капілярів за невеликої кількості проб
9.	Вакуумний евапоратор з вакуумним насосом і термостатованою водяною банею для випаровування органічних розчинників або система SpeedVac	
10.	Колби-концентратори для випарювання	
11.	За необхідності визначати зв'язані форми (фосфати) цитокінінів – теляча лужна фосфатаза	13 U/mg, Sigma, part # P7640
ВЕРХ/МС аналіз		
1.	Оцтова кислота	Найвищого очищення, для ВЕРХ
2.	Метиловий спирт (метанол)	Найвищого очищення, для ВЕРХ
3.	Ацетонітрил	Найвищого очищення, для ВЕРХ
4.	Вода	Дистильована, потім деіонізована
5.	Хроматографічні віали	Бажано виготовлені з темного скла, оскільки деякі фітогормони легко руйнуються на світлі
6.	Конічні вставки у віали	Скло, об'ємом 250 мкл
7.	Хроматографічна колонка з ліпофільно-модифікованим сорбентом (розмір часток 5 мкм) з відповідною передколонкою	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 5 мμ, 250×4,6 мм чи аналогічна колонка іншого виробника, наприклад, Phenomenex GEMINI®-NX 5 мμ C18 110A 250×4,6 мм
8.	Рідинний хроматограф з діодно-матричним і мас-спектрометричним детекторами	

ПІДГОТОВКА РОЗЧИННИКІВ І СТАНДАРТІВ

Екстракційний розчин складається з метанолу, води подвійної дистиляції та мурашиної кислоти у співвідношенні 15/4/1 за об'ємом. Зберігати приготований розчин треба за температури -20°C .

Хімічні стандарти фітогормонів розчиняють у розчині метанолу – 1/1 (метанол/вода за об'ємом) для створення калібрувальних таблиць у хроматографічних методах, для додавання до проб як внутрішніх стандартів або для перевірки втрат методу.

Завантажувальний розчин – 1 М розчин мурашиної кислоти. Для його приготування довести 37,7 мл 99% мурашиної кислоти до об'єму 1000 мл водою подвійної дистиляції, рН приготованого таким способом розчину буде близьким до значення 1,4.

Перший елюційний розчинник – 100% метанол.

Другий елюційний розчинник – 0,35 М NH_4OH . Для його приготування необхідно довести 2,5 мл 26% розчину аміаку (гідроксиду амонію) водою подвійної дистиляції до об'єму 100 мл, рН приготованого таким способом розчину буде близьким до значення 11.

Третій елюційний розчинник – лужний розчин метанолу. Для його приготування до 60 мл метанолу треба додати 2,5 мл 26% розчину аміаку і довести водою подвійної дистиляції до 100 мл.

За потреби визначати зв'язані форми (фосфати) цитокинінів – інкубаційний буфер для реакції лужної фосфатази. Це 0,1 М розчин ацетату амонію, рН такого розчину буде близьким до 10.

Теляча лужна фосфатаза, розчинена в інкубаційному буфері до концентрації 0,2 Од на 20 мкл для 1 г сирової ваги проби (цей розчин варто щоразу готувати наново).

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ І АНАЛІЗ

Відбір зразків. Для кількісного аналізу фітогормонів рослинний матеріал треба нарізати тонкими смужками, точно зважити і якомога швидше заморозити в рідкому азоті, оскільки автолітичні процеси починаються відразу після пошкодження тканин. Маса свіжого рослинного матеріалу може коливатись у відносно широких межах: 0,5–2 г для аналізу за допомогою ВЕРХ/МС, а для тандему ВЕРХ/МС/МС зазвичай значно менше – 0,05–0,2 г сирової ваги. Однак дуже важливо, щоб точну вагу ($\pm 1\%$) для кожного зразка було записано. Взагалі, вага зразка матеріалу залежить від фактичної кількості фітогормонів у тканинах. Ця кількість має бути значно вищою, ніж мінімальна межа виявлення. Див. також прим. 1, 2, 3.

Коли для аналізу відібрано листові пластинки дводольних рослин, центральну жилку треба видалити. Оскільки фітогормони та їхні транспортні форми переміщуються через судинну систему, наявність центральної або іншої великої жилки може суттєво вплинути на результати майбутнього аналізу. Якщо планують брати проби надземної частини однодольних рослин, третину листка згори необхідно також видалити. У цій частині листові пластинки однодольних швидко старіють, і тканини за вмістом фітогормонів істотно відрізняються від пристеблової частини. Варто брати листові пластинки однієї стадії розвитку. Паралельно необхідно відібрати зразки для визначення маси сухої речовини у тканинах, якщо результати будуть представлені на суху масу.

Якщо ж для аналізу треба взяти корені, які росли у ґрунтовій культурі, то спочатку необхідно швидко, але ретельно відмити їх від частинок землі холодною водою, а потім висушити фільтрувальним папером. Якщо корені розвивались у гідропонній культурі, то їх можна брати без відмивання.

Екстракція. Мета екстракції – кількісне вивільнення молекул сполук-аналітів із рослинних клітин в екстракційний розчин без їхньої хімічної руйнації. Для кількісного вилучення використовують мінімум 5-кратне (5 до 1) об'ємне відношення екстракційного розчинника до зразка, а проба має екстрагуватися двічі. Деградації аналітів треба уникати, працюючи за низьких температур з екстракційним розчином, що містить значну частку органічного розчинника і характеризується низьким рівнем рН. Етап екстракції також включає центрифугування. Ця процедура видаляє з екстракту великі нерозчинні й осаджувані біополімери, зокрема, целюлозу, нуклеїнові кислоти й білки.

Екстракцію проводять, дотримуючись такої послідовності дій:

1. Гомогенізувати заморожений у рідкому азоті рослинний матеріал у керамічній ступці за допомогою товкачика до дрібного порошку. Уникати танення тканин. За необхідності дуже обережно підлити у ступку рідкий азот.
2. Перенести гомогенізований і заморожений зразок у відповідну пробірку для центрифугування, попередньо охолоджену в рідкому азоті.
3. Промити (двічі) ступки й товкачики п'ятьма об'ємами розчину для екстрагування, охолодженого до -20°C . Рідину після промивання ступки зливати до зразка у пробірку, щоб кількісно його перенести. Наприклад, 0,5 г сирови ваги зразка промивають двома послідовними об'ємами по 2,5 мл екстракційного розчину.
4. За необхідності додати внутрішні стандарти (див. прим. 3).
5. Пробірки зі зразками, екстракційним розчином і внутрішніми стандартами перенести в морозильну камеру з температурою -20°C на одну годину.
6. Центрифугувати за 15 тис. об/хв (RPM) протягом 30 хв (за $+4^{\circ}\text{C}$).
7. Супернатанти перенести у чисті пробірки.
8. До осаду на дні центрифужних пробірок додати 5 об'ємів екстракційного розчину і перемішати.
9. Залишити центрифужні пробірки на 30 хв за -20°C .
10. Центрифугувати. Супернатанти об'єднати.

Очищення отриманих екстрактів. Рослинні екстракти після видалення органічного розчинника містять велику кількість коекстрактивних речовин, які суттєво заважатимуть подальшому аналітичному визначенню. Залежно від хімічного складу проби з аналітами, від об'єму органічного розчинника та коефіцієнта розподілу коекстрактивних сполук між фазами, кількість домішок, які заважатимуть подальшому аналізу, може відрізнятись. Багато сполук, що потрапляють до екстракту, здатні призводити до виникнення артефактів під час хроматографічного розділення та використання фізико-хімічних методів детектування.

Отже, метою очищення є видалення з екстракту якомога більшої кількості інтерферуючих речовин, водночас важливо не втратити відчутної кількості цільових сполук-аналітів. У нашому випадку використовуємо два типи картриджів твердофазної екстракції (SPE) для очищення, які іноді теж називають колонки. Перший картридж із твердою силікагелевою фазою C18 використовують як фільтр для видалення більшості ліпофільних речовин (рис. 3), фітогормони ж проходять крізь

нього, майже не затримуючись. У другому картриджі (рис. 4) з фазою MCX гормони міцно зв'язуються, а потім послідовно елюються відповідними розчинниками. Полютанти вимиваємо лужним буфером і водою подвійної дистиляції. Провівши необхідну послідовність дій, отримуємо дві фракції, що містять різні типи гормонів (три за умови вимивання фосфатів цитокінінів з їхнім подальшим розщепленням лужною фосфатазою для перетворення фосфатів у рибозиди). Розщеплення лужною фосфатазою є необхідним, оскільки мас-детектори низькочутливі до фосфатів цитокінінів.

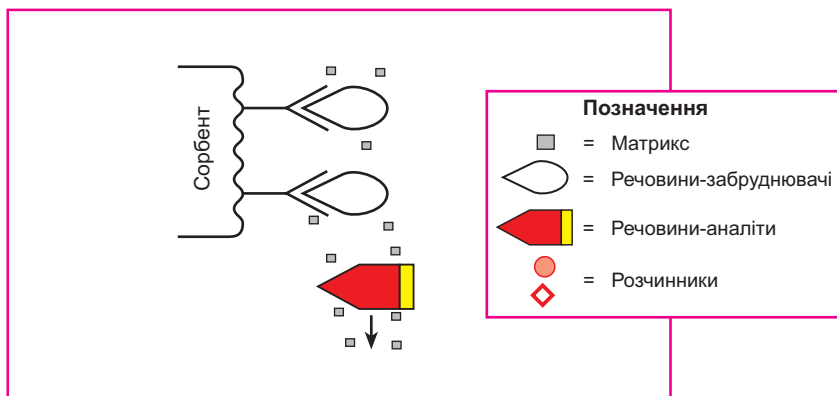


Рис. 3. Процес очищення зразка (селективне вилучення), що відбувається у картриджі SPE C18, Sep-Pak Plus, Waters. Позначення – для рис. 3 і 4

Fig. 3. The process of cleaning samples (selective extraction) occurring in the cartridge SPE C18, Sep-Pak Plus, Waters. The legends – for fig. 3 and 4

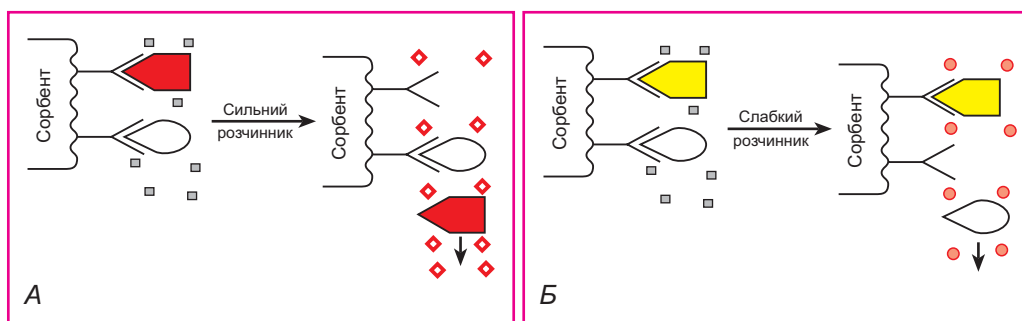


Рис. 4. Спрощена схема процесів розділення речовин зразка, що відбуваються у картриджі SPE Oasis MCX, 6 cc/150 mg, Waters: **А** – селективна елюція речовин-аналітів кислого характеру; **Б** – вимивання речовин-забруднювачів

Fig. 4. A simplified scheme of the processes of separation of substances of the sample, occurring in the cartridge SPE Oasis MCX, 6 cc/150 mg, Waters: **A** – selective elution of acidic analytes; **B** – the leaching of pollutants

1. Використовуючи вакуумний колектор або ж малопотужний вакуумний насос 12В зі системою капілярів і колбою-колектором, підготувати картридж SPE C18, промивши його метанолом (об'єм 5 мл), а потім екстракційним розчинником (об'єм 5 мл). У жодному разі не використовувати картридж сухим (див. прим. 4).

2. Пропустити екстракт зразка крізь картридж C18. Зібраний об'єм випарити в ротаційному вакуумному випаровувачі (евапораторі) за +40 °C або в системі SpeedVac приблизно до 1/10 початкового об'єму.
3. Розчинити залишок в 1 мл завантажувального розчину, за необхідності об'єм розчину можна трохи збільшити.
4. Підготувати до роботи картридж Oasis MCX, промивши його метанолом (об'єм 5 мл) з подальшим пропусканням 5 мл завантажувального розчину.
5. Включивши вакуумний насос, відібрати кінчиком капіляра зразок у колонку Oasis MCX і швидко перекрити потік/вимкнути насос.
6. Промити картридж 5 мл завантажувального розчину і перекрити потік. Отриманий об'єм вилити у злив.
7. Відібрати кінчиком капіляра 5 мл першого елюційного розчинника у картридж MCX. Змив зібрати. Це фракція № 1. Вона містить фітогормони кислого характеру: ІОК, АБК, а також ГК₃ й СК.
8. Промити картридж 5 мл дистильованої води (подвійної дистиляції, або деіонізованої) та перекрити потік. Воду вилити у злив.
9. Відібрати кінчиком капіляра 5 мл другого елюційного розчинника в картридж MCX. Зібрати змив. Це фракція № 2. Вона містить фосфати цитокінінів (цитокінів нуклеотиди). За відсутності лужної фосфатази її потрібно вилити у злив.
10. Ввести 5 мл третього елюційного розчинника в картридж. Зібрати змив. Це фракція № 3, що містить власне цитокініни, їхні рибозиди і глюкозиди.
11. Випарити отримані фракції до сухого залишку в евапораторі за +40 °C, переливши їх у колби-концентратори відповідного об'єму. Фракції № 1 і № 3 готові до кількісного аналізу за допомогою аналітичного методу ВЕРХ/МС.
12. Розчинити фракцію № 2 в 1 мл інкубаційного буфера для лужної фосфатази. Додати лужну фосфатазу й інкубувати за +37 °C протягом 2 год. Щоб зупинити реакцію, додати 20 мкл льодяної оцтової кислоти. Це фракція № 2, що містить дефосфорильовані цитокініни.
13. Підготувати картридж SPE C18, промивши його 5 мл метанолу, а потім 5 мл води.
14. Відібрати з пробірки кінчиком капіляра дефосфорильовану фракцію № 2 у картридж SPE C18 і перекрити потік.
15. Промити колонку SPE C18 водою об'ємом 5 мл.
16. Відібрати кінчиком капіляра в систему 5 мл 100% метанолу і зібрати злив. Він містить цитокінінові рибозиди, продукти дефосфорильовання фосфатів цитокініну. Злив випарити в ротаційному евапораторі за +40 °C або в системі SpeedVac. Дефосфорильована фракція № 2 готова до кількісного аналізу.

Кількісне визначення за допомогою ВЕРХ/МС. Очищені фракції аналізують за допомогою системи ВЕРХ, обладнаної детектором з діодною матрицею, в тандемі з мас-спектрометром, виокремлюючи окремі сполуки-аналіти у вигляді піків на хроматограмах. Фітогормони кількісно оцінюють, порівнюючи відповіді детектора на ендогенний гормон у аліквоті проби з записаними відповідями на кілька рівнів відомої кількості речовини (зовнішнього стандарту), внесених у калібрувальні таблиці, які попередньо сформовані в інтерфейсі обслуговуючої прилад програми. Фактично кількість ендогенних фітогормонів розраховують за площею піків. Що більша кількість речовини-аналіта, то помітніша відповідь детектора, а отже, більша площа піку.

Процедура хроматографічного розділення, параметри визначення й іонізації для ВЕРХ/МС дуже залежать від інструмента, тому оптимальні параметри потрібно знайти для конкретного приладу (див. також прим. 5, 6).

У нашій лабораторії аналітичне визначення ФГ проводили методом високо-ефективної рідинної хроматографії на рідинному хроматографі Agilent 1200 LC із діодно-матричним детектором G1315B (США) у тандемі з одноквадрупольним мас-спектрометром Agilent G6120A. Аналіз і обчислення вмісту фітогормонів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition (rev. C.01.09). За умови попередньо розроблених хроматографічних методів для проведення аналізу треба виконати такі процедури:

1. Сухі залишки кожної фракції у колбах-концентраторах перед аналізом відновити до об'єму 180–200 мкл 45% розчином метанолу.
2. Розчинену пробу бажано відцентрифугувати за 15 тис. обертів і +4 °С протягом 10 хв. Якщо цю процедуру виконати неможливо, то налаштувати висоту занурення голки автосамплера (needle height offset) принаймні на 3 мм вище базового значення, щоб уникнути забивання капілярів хроматографа.
3. Супернатанти перенести у конічні вставки об'ємом 250 мкл, встановлені у хроматографічні віали.
4. Ввести зразок у інструмент. Залежно від початкової ваги зразка, ввести у прилад частину об'єму екстракту (аліквоту), наприклад, 1/10 від 1 г сирової ваги екстракту.

Для кількісного визначення фітогормонів у отриманих зразках нами розроблено чотири хроматографічні методи (табл. 2). Хроматографічне розділення здійснювали у колонці Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 з ліпофільно-модифікованим сорбентом, розмір часток 5 мкм (оберненофазна хроматографія). Після хроматографічного розділення компонентів проб об'ємом 20 мкл кислої фракції системою розчинників (метанол, ультрачиста вода – дистильована, а потім деіонізована, оцтова кислота в об'ємному співвідношенні 45 : 54,9 : 0,1) проводять детекцію ІОК і АБК в УФ-ділянці поглинання за аналітичної довжини хвилі 280 і 254 нм. Для визначення вмісту СК проби об'ємом 10 мкл розділяли системою розчинників (ацетонітрил, ультрачиста вода, оцтова кислота в об'ємному співвідношенні 45 : 54,9 : 0,1) і проводили детекцію СК в УФ-ділянці поглинання за аналітичної довжини хвилі 302 нм. Після розділення аліквот об'ємом 20 мкл системою розчинників (ацетонітрил, ультрачиста вода, оцтова кислота – 30 : 69,9 : 0,1) кількісно детектували ГК₃ за сигналом мас-детектора, оскільки відгук на ГК₃ діодно-матричного детектора є надто малим. Швидкість рухомої фази розчинників під час детекції ІОК і АБК становила 0,7 мл/хв, СК – 0,8 мл/хв, ГК₃ – 0,5 мл/хв.

Аліквоти фракції з цитокінінами розділяли системою розчинників (метанол, вода, оцтова кислота), а детекцію проводили за довжини хвилі 269 нм. У хроматографічному методі для елюції ЦТК використовували ступінчасту градієнтну систему: 0 хв: CH₃OH/0,5% розчин CH₃COOH в деіонізованій воді (37/63) → 25 хв: CH₃OH/0,5% розчин CH₃COOH (70/30) → 35 хв CH₃OH/0,5% розчин CH₃COOH (100/0) з постійною швидкістю потоку 0,5 мл на хвилину. Тривалість врівноваження колонки після аналізу (postrun) становила 15 хв.

Тривалість утримання колонкою t_R кожної речовини в запропонованих методах представлено в табл. 2. Як стандарти під час побудови калібрувальних таблиць ми

використовували немічені ІОК, АБК, СК, ГК₃, *m*-ЗГ, *m*-З, *m*-ЗР, іП та іПА. Внутрішні стандарти до зразків зазвичай не додавали, адже кількість фітогормонів у зразках масою 1–1,5 г значно вища від мінімальної кількості, яку можна детектувати за допомогою застосовуваного інструменту. В окремих випадках для ідентифікації піків можна використовувати внутрішні стандарти, тобто додані у зразок фітогормони в суворо визначеній кількості.

Таблиця 2. Тривалість утримання фітогормонів t_R хроматографічною колонкою у запропонованих методах, показники m/z , умови іонізації їхніх молекул у мас-детекторі та режими елюції

Table 2. Retention times t_R for plant hormones by chromatographic column in the proposed methods, m/z , ionization conditions of their molecules in the mass detector and elution conditions

Речовина	t _R , хв	m/z*	Умови іонізації	Режим елюції
Метод № 1 – тривалість 30 хв				
ІОК	11,075	174	У негативі -H ⁺	Ізократичний
АБК	18,955	263		
Метод № 2 – тривалість 20 хв				
ГК ₃	8,072	345	У негативі -H ⁺	Ізократичний
Метод № 3 – тривалість 20 хв				
СК	7,153	137	У негативі -H ⁺	Ізократичний
Метод № 4 – тривалість 35 хв				
ЗГ	6,746	382	У позитиві +H ⁺	Градiєнтний
З	7,504	220		
ЗР	10,232	352		
ІП	18,290	204		
ІПА	22,673	336		

Примітка: * – подальший розпад молекул фітогормонів на молекулярні фрагменти детально представлено в роботі Müller & Munné-Bosch, 2011 [24]

Comment: * – further fragmentation of phytohormone molecules in details published by Müller & Munné-Bosch, 2011 [24]

Контроль наявності речовин-аналітів у пробах здійснювали за допомогою мас-спектрометра в комбінованому режимі роботи (multimode – електроспрей і хімічна іонізація за атмосферного тиску) за негативної полярності іонізації молекул речовин-аналітів під час аналізу ІОК, АБК, СК, ГК₃ й позитивної під час аналізу ЦК (табл. 2). Для кількісного аналізу ГК₃ використовували сигнал мас-детектора MSD SIM за налаштування 50% часу сканування приладом показника m/z 345 [346-H].

ВИСНОВОК

Представлений метод кількісної оцінки вмісту ендогенних фітогормонів досить чутливий і придатний для аналізу динамічних змін концентрацій гормонів у дослідженнях процесів росту і розвитку рослин або реакцій рослин на біотичні й абіотичні стресори. Вміст фітогормонів зазвичай визначають в органах рослин, які

складаються з тканин кількох типів. Нижня порогова концентрація під час визначення фітогормонів становить приблизно 0,5 нг/мкл екстракту. Автори цілком усвідомлюють, що чутливість методу є нижчою порівняно з більш сучасними методиками [11, 24], де після хроматографічного розділення речовин проби як головного детектора застосовують мас-спектрометр із трьома квадрупольми (МС/МС). Однак, зважаючи на досить неповне забезпечення вітчизняних біологічних лабораторій сучасним високотехнологічним обладнанням, представлений метод цілком можна використовувати. Крім того, представлені процедури з підготовки проб і окремі хроматографічні методи з певними корективами є хорошою основою для застосування на новітнішому обладнанні.

ПРИМІТКИ

1. У результатах вміст фітогормонів можна представляти або на сиру вагу рослинного матеріалу, що безпосередньо береться для аналізу (наприклад, на 1 г), або ж на суху вагу. Представлення кількості фітогормонів на суху вагу може зменшити різницю в кількості фітогормонів між зразками. Така ситуація спричинена різним вмістом води у зразках. Варто також брати до уваги, що, приміром, окремі листові пластинки однієї рослини відрізняються за вмістом води у тканинах.

2. Рівень фітогормонів дуже точно відображає фізіологічний стан окремих рослин. Значну різницю у рівнях ендогенних гормонів можна виявити між рослинами в одному експерименті, а ще більшу – між незалежними експериментами. Отже, кілька експериментів (принаймні три) із повторними зразками мають бути проаналізовані для досягнення релевантних з точки зору фізіології рослин результатів.

3. Дуже важливі моменти аналітичних робіт – це точне зважування рослинного матеріалу для зразка та додавання точно відомих кількостей внутрішніх стандартів (якщо ця процедура проводитиметься), адже ці дані будуть використані під час остаточного розрахунку вмісту речовин-аналітів.

4. Підготовка картриджів твердотільної екстракції для очищення (SPE) важлива для їхньої правильної роботи. Втрата невеликої частини речовин-аналітів проби не так важлива, оскільки за допомогою додавання внутрішніх стандартів можна легко оцінити втрати. Однак втрати не мають зменшувати кінцеву кількість гормонів у зразках нижче межі виявлення.

5. Умови іонізації речовин у мас-спектрометрі – позитивна іонізація речовин проби в режимі “електроспрей” або “комбінований (multimode)” – є оптимальними варіантами для аналізу цитокінінів, оскільки вони проявляють слабкі лужні властивості. Для аналізу фітогормонів кислої природи (ІОК, АБК, ГК₃ та інших гіберелінів, СК) потрібен негативний режим іонізації. Іон найбільшої інтенсивності зазвичай використовують для кількісного визначення, якщо як детектор для кількісної оцінки використовують мас-детектор, а інші – лише для подальшої ідентифікації речовини. Однак за високої інтерференції сигналів для кількісного визначення треба застосовувати інший (менш інтенсивний) іон. Речовини, для яких відсутні стандарти, визначають за допомогою знаходження часу їхнього утримання хроматографічною колонкою та мас-спектрів. Багаторівнева (як мінімум три рівні, наприклад, 0,32, 1,6 та 8 нг/мкл) калібрувальна крива необхідна для оцінки лінійного діапазону відповідей детектора, а також для визначення меж виявлення конкретної речовини. Параметри іонізації мають бути оптимізовані для кожного гормону.

6. Оскільки мас-детектор є дуже чутливим інструментом, важливо утримувати його в чистоті. Рекомендують використання розчинників із найвищою чистотою. Крім того, джерело іонів, газові фільтри й масло всередині форвакуумного насоса з часом забруднюються. Це призводить до поступового зниження чутливості. Тому регламентні роботи, а саме очищення джерела іонів, камери небулайзера, заміну газових фільтрів і масла форвакуумного насоса необхідно проводити через регулярні проміжки часу.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Animal Rights: This article does not contain any studies with animal subjects performed by the any of the authors.

1. Abreu M.E., Munné-Bosch S. Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, 2009; 60(4): 1261–1271.
[DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ern363>; PMid: 19188277; Google Scholar]
2. Brodersen P., Malinovsky F.G., Hématy K., Newman M.A., Mundy J. The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*. **Plant Physiology**, 2005; 138(2): 1037–1045.
[DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.105.059303>; PMid: 15923330; Google Scholar]
3. Chernyad'ev I.I. The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2009; 45: 351–362.
[DOI: <https://doi.org/10.1134/S0003683809040012>; Google Scholar]
4. Chiwocha S.D., Abrams S.R., Ambrose S.J., Cutler A.J., Loewen M., Ross A.R., Kermode A.R. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. **Plant J.**, 2003; 35(3): 405–417.
[DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01800.x>; PMid: 12887591; Google Scholar]
5. Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R., Abrams S.R. Absciscic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. **Annual Review of Plant Biology**, 2010; 61: 651–679.
[DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>; PMid: 20192755; Google Scholar]
6. Davière J.M., Achard P. Gibberellin signaling in plants. **Development**, 2013; 140(6): 1147–1151.
[DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.087650>; PMid: 23444347; Google Scholar]
7. Davies P.J. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies P.J. (Ed.) **Plant Hormones**. Dordrecht: Springer, 2010. 1–15.
[DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1; Google Scholar]
8. Dempsey A.D., Klessig D.F. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? **BMC Biology**, 2017; 15: 23.
[DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0364-8>; PMid: 28335774; Google Scholar]
9. Dobrev P., Kamínek M. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, 2002; 950: 21–29.
[DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00024-9); Google Scholar]

10. Dobrev P., Motyka V., Gaudinová A., Malbeck J., Trávníčková A., Kamínek M., Vaňková R. Transient accumulation of cis- and trans-zeatin type cytokinins and its relation to cytokinin oxidase activity during cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2002; 40(4): 333–337.
[DOI: [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01383-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01383-9); Google Scholar]
11. Dobrev P.I., Vankova R. „Quantification of Absciscic Acid, Cytokinin, and Auxin Content in Salt-Stressed Plant Tissues”. In: Shabala S., Cuin T. (Ed.) **Plant Salt Tolerance** (Methods and Protocols). Totowa, NJ: Humana Press, 2012: 251–261.
[DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-986-0_17; PMid: 22895765; Google Scholar]
12. Dörfling K. Das Hormonsystem der Pflanzen. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1983. 236 s.
[DOI: <https://doi.org/10.1002/jpln.19831460416>; Google Scholar]
13. Dun E.A., Brewer P.B., Beveridge C.A. Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. **Trends in Plant Science**, 2009; 14(7): 364–372.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.04.003>; PMid: 19540149; Google Scholar]
14. Gantait S., Sinniah U.R., Ali N., Sahu N.C. Gibberellins a multifaceted hormone in plant growth regulatory network. **Current Protein & Peptide Science**, 2015; 16(5): 406–412.
[DOI: <https://doi.org/10.2174/1389203716666150330125439>; PMid: 25824386; Google Scholar]
15. **Guidelines for the determination of phytohormones** (Metodicheskie rekomendatsii po opredeleniyu fitogormonov). Kiev: Naukova Dumka, 1988. 78 p. (In Russian)
16. Gupta R., Chakrabarty S. Gibberellic acid in plant. Still a mystery unresolved. **Plant Signaling & Behavior**, 2013; 8(9): e25504.
[DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.25504>; PMid: 23857350; Google Scholar]
17. Ha S., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L-SP. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. **Trends in Plant Science**, 2012; 17(3): 172–179.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.12.005>; PMid: 22236698; Google Scholar]
18. Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentation and translocation. **Journal of Experimental Botany**, 2008; 59(1): 75–83.
[DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm157>; PMid: 17872922; Google Scholar]
19. Kojima M., Kamada-Nobusada T., Komatsu H., Takei K., Kuroha T., Mizutani M., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M., Suzuki K., Sakakibara H. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. **Plant Cell Physiology**, 2009; 50(7): 1201–1214.
[DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp057>; PMid: 19369275; Google Scholar]
20. Kulaeva O.N., Prokoptseva O.S. Recent Advances in the Study of Mechanisms of Action of Phytohormones. **Biochemistry**, 2004; 69: 233–247.
[DOI: <https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000022053.73461.cd>; PMid: 15061689; Google Scholar]
21. Mertens R., Deusneumann B., Weiler E.W. Monoclonal-antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant-growth regulator, abscisic acid. **FEBS Letters**, 1983; 160(1–2): 269–272.
[DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80980-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80980-6); Google Scholar]
22. Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. **Journal of American Chemical Society**, 1955; 77(5): 1392–1392.
[DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01610a105>; Google Scholar]
23. Müller A., Duchting P., Weiler E.W. 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.
[DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0866-6>; PMid: 12430013; Google Scholar]

24. Müller M., Munné-Bosch S. Rapid and Sensitive Hormonal Profiling of Complex Plant Samples by Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Plant Methods**, 2011; 7(1): 37.
[DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-37>; PMid: 22098763; Google Scholar]
25. Nawrath C., Métraux J.P. Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. **The Plant Cell**, 1999; 11(8): 1393–1404.
[DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.11.8.1393>; PMid: 10449575; Google Scholar]
26. Pan X., Welti R., Wang X. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**, 2008; 69(8):1773–1781.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.008>; PMid: 18367217; Google Scholar]
27. Pan X., Wang X. Profiling of plant hormones by mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 2009; 877(26): 2806–2813.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.04.024>; PMid: 19427277; Google Scholar]
28. Raskin I., Skubatz H., Tang W., Meeuse B.J.D. Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. **Annals of Botany**, 1990; 66(4): 369–373.
[DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088037>; Google Scholar]
29. Rivas-San Vicente M., Plasencia J. Salicylic Acid beyond Defence: Its Role in Plant Growth and Development. **Journal of Experimental Botany**, 2011; 62(10): 3321–3338.
[DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>; PMid: 21357767; Google Scholar]
30. Skoog F., Strong F.M., Miller C.O. Cytokinins. **Science**, 1965. 148: 532–533.
[DOI: <https://doi.org/10.1126/science.148.3669.532-a>; PMid: 17842846; Google Scholar]
31. Vasyuk V.A., Lichnevskiy R.V., Kosakivska I.V. Gibberellin-like substances in ontogenesis of the water fern *Salvinia natans* (Salvinaceae). **Ukrainian Botanical Journal**, 2016; 73(5): 503–509. (In Ukrainian)
[DOI: <https://doi.org/10.15407/ukrbotj73.05.503>; Google Scholar]
32. Werner T., Schmülling T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, 2009; 12(5): 527–538.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.002>; PMid: 19740698; Google Scholar]
33. Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, 2001; 414: 562–565.
[DOI: <https://doi.org/10.1038/35107108>; PMid: 11734859; Google Scholar]
34. Woodward A.W., Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, 2005; 95(5): 707–735.
[DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>; PMid: 15749753; Google Scholar]

METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF PHYTOHORMONES IN PLANT TISSUES

M. M. Shcherbatiuk*, L. V. Voytenko, V. A. Vasyuk, I. V. Kosakivska

M. G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine
2, Tereshchenkivska St., Kyiv 01004, Ukraine

*Corresponding author: e-mail: chrom.botany@ukt.net

The review analyzes and summarizes information on the history of development and the current state of methodological approaches to the qualitative and quantitative determination of phytohormones in plant tissues. Plant hormones play an indispensable role in many physiological processes during a plant life cycle, from seed's germination

to senescence. The determination of the endogenous hormones concentration is essential for elucidating the role of a particular hormone in any physiological process. A sensitive and quick analytical method of a simultaneous quantitative estimation of the main classes of phytohormones is essential for the investigation of signaling control networks in specific developmental pathways and physiological responses. In plant tissues, phytohormones are present in very low concentrations (from 10^{-9} M to 10^{-6} M); hence, the availability of highly effective, comprehensive and reliable analytical techniques for their identification is extremely important. The article gives a brief description of the main classes of plant hormones and outlines their functional activity. The importance of methods for hormones identification in plant tissues and their use in plant physiology and agricultural practice is discussed. The study presents a valid and tested sequence of procedures for the extraction of plant hormones, a methodology for purification of the obtained extracts from interfering substances and an up-to-date method of plant hormones quantification (indole-3-acetic, abscisic, gibberellic, salicylic acids and five forms of cytokinins). The quantification method combines a high-performance liquid chromatography with a mass spectrometry. Four chromatographic methods for the separation and detection of substances in aliquots as well as ionization conditions for hormones in a mass spectrometer are described. The presented analytical technique is adapted for scientific laboratories in Ukraine.

Keywords: HPLC/MS-analysis, plant hormones, sample preparation