

# 利用 HPLC 法对香蕉根中四种内源激素测定方法的优化

步佳佳<sup>1,2</sup>, 胡玉林<sup>2</sup>, 魏长斌<sup>2</sup>, 谢江辉<sup>2</sup>, 何新华<sup>1</sup>

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530004; 2. 中国热带农业科学院 亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091)

**摘要:**研究了高效液相色谱法测定香蕉根中 4 种内源激素: 赤霉素( $GA_3$ )、3-吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)和玉米素(ZT)的最佳条件。采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m)进行分离测定。结果表明: $GA_3$ 、IAA、ABA 测定的最佳条件是甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)为 15:20:65 为流动相,检测波长为 210 nm。ZT 测定最佳条件为:甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)为 15:15:70 为流动相,波长 265 nm。4 种激素的进样量为 20  $\mu$ L,流速为 1 mL/min,柱温为 35℃。选用外标法进行了定量测定。试验结果表明其回收率高,是一种快速有效的测定方法。

**关键词:**高效液相色谱;内源激素;香蕉;根

**中图分类号:**Q 946.885 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)08-0030-04

高效液相色谱法(HPLC)是一种精密准确的测定有机物的方法,植物激素的 HPLC 测定已在仁用杏花芽<sup>[1]</sup>、甜樱桃<sup>[2]</sup>、梨<sup>[3]</sup>等果实,油菜、莴苣、鸭梨等<sup>[4]</sup>籽粒上有所应用,但在香蕉中只有很少使用酶联免疫法测定的报道,用 HPLC 法对香蕉根中内源激素的测定尚未见报道;在对草本植物的内源激素的测定中由于色谱条件和样品提取方法的限制<sup>[5]</sup>,一些研究结果存在分离效果不理想、峰形不良、拖尾等问题。在已有报道的基础上,该研究对样品的前处理方法进行了改进,使从植物组织中提取的内源激素,保持其“天然”状态,同时,对色谱条件进行比较和优化,摸索出一种操作简单、较快速、准确、重现性好的方法,为同时测定香蕉根中 3-吲哚乙酸、赤霉素、脱落酸、细胞分裂素几种不同的植物内源激素的含量提供了良好的 HPLC 法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试香蕉品种“金手指”,由亚热带作物研究所香

蕉研究室提供,取生长 6~9 片叶的“金手指”幼苗的根洗净,迅速用液氮冷冻并放置于-80℃冰箱待测。

试验仪器:美国 PE Series 200 高效液相色谱仪,美国 Series 200 紫外可变波长检测器,自动进样器,Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m),Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 4-Pack 保护柱(12.5 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m),SHB-III 8 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂),Universal 32R Hettich 台式离心机,Agilent 固相萃取仪,Agela DOS C<sub>18</sub> 固相萃取小柱,DS-5510 超声仪,UV1700 紫外分光光度计,Millipore 纯水仪,JA3003 电子分析天平,真空抽滤系统,0.22  $\mu$ m 有机微孔滤膜。

标准样品:赤霉素( $GA_3$ )、3-吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、玉米素(ZT),纯度≥99.0%,均购自 Sigma 公司。

化学试剂:甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、乙醇(分析纯)、冰醋酸(分析纯)、十二水合磷酸氢二钠(分析纯)、一水合柠檬酸(分析纯)、PVPP(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯)、正丁醇(分析纯)、三乙胺(分析纯)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 香蕉根中内源激素的提取与纯化 提取纯化方法按照曾辉等<sup>[6]</sup>的方法并进行改进,称取冻干样品 1 g 左右,加入预冷的 80%甲醇 8 mL 迅速研磨,于 4℃冰箱过夜,9 000 r/min 离心 20 min,取上清液,再加入 5 mL 预冷的 80%甲醇冲洗,9 000 r/min 离心 20 min,再取上清液,于 40℃旋转蒸干去掉甲醇,加入 PVPP 约 0.2 g

**第一作者简介:**步佳佳(1986-),女,山东济南人,在读硕士,研究方向为果树栽培与生理。E-mail:jiverylovejj@126.com。

**责任作者:**谢江辉(1973-),男,博士,研究员,博士生导师,现主要从事荔枝及香蕉和热带珍稀果树等研究工作。E-mail:xiexianghui@21cn.com。

**基金项目:**海南省自然科学基金资助项目(311069);中央级公益性科研院所基本科研业务专项资助项目(sscri201005,1251022011002);国家香蕉产业技术体系湛江试验站资助项目(CARS-32-12)。

**收稿日期:**2011-02-22

摇匀, 9 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 用乙酸调节 pH 至 2.8 (约加入乙酸 8  $\mu$ L), 用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 得乙酸乙酯相和水相。乙酸乙酯相用旋转蒸发器 40℃ 蒸干, 用 1 mL 95% 乙醇溶解, 加入 pH 3.5 的水充分溶解, 过  $C_{18}$  小柱, 弃去滤液, 用 1.5 mL 甲醇洗脱  $C_{18}$  小柱, 收集洗脱液, 滤液过 0.22  $\mu$ m 有机微孔滤膜入进样瓶, 用于  $GA_3$ 、IAA、ABA 的 HPLC 测定。水相用三乙胺调 pH 至 8.0, 用 80% 水饱和的正丁醇等体积萃取 3 次, 取正丁醇相, 65℃ 旋转蒸发至干, 加入 1 mL 的 95% 乙醇溶解, 再加入 2 mL 的 pH 8.0 的水充分溶解, 过  $C_{18}$  小柱, 弃去滤液, 用 1.5 mL 甲醇洗脱  $C_{18}$  小柱, 收集洗脱液, 滤液过 0.22  $\mu$ m 有机微孔滤膜入进样瓶, 用于 ZT 的 HPLC 测定。

**1.2.2 色谱条件的筛选** 波长的筛选: 分别在 210 和 254 nm 波长条件下对  $GA_3$ 、IAA、ABA 混合标样进行色谱测定, ZT 单标在 210、254、265 nm 进行色谱测定。流动相的筛选: 设定进样量 20  $\mu$ L, 流速为 1 mL/min, 柱温为 35℃ 的色谱条件, 考察不同流动相对样品的分离情况。(1) 甲醇: 乙腈: 磷酸缓冲液 (pH 3.5) = 15: 15: 70; (2) 甲醇: 乙腈: 磷酸缓冲液 (pH 3.5) = 15: 20: 65; (3) 甲醇: 乙腈: 磷酸缓冲液 (pH 3.5) = 15: 25: 60。柱温的筛选: 设定进样量 20  $\mu$ L, 流速为 1 mL/min, 选择流动相: 甲醇: 乙腈: 磷酸缓冲液 (pH 3.5) = 15: 20: 65 时, 分别设定 30、35、40℃ 的柱温, 观察标样的分离情况。流速的筛选: 设定进样量 20  $\mu$ L, 柱温为 35℃, 流动相: 甲醇: 乙腈: 磷酸缓冲液 (pH 3.5) = 15: 20: 65 时, 分别对流速 0.8、1.0、1.2、1.5 mL/min 情况下的标样分离情况进行观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 激素的提取与纯化

香蕉根在研磨过程中极易褐化, 在该试验中选用 PVPP 和  $C_{18}$  小柱去除色素和多酚类物质, 在进行样品研磨和旋转蒸发去掉甲醇后都加入 PVPP, 有研究表明活性炭虽然对色素和酚类氧化物的吸附效果好但对激素也有较强的吸附作用<sup>[7]</sup>, 因此激素提取中不可用活性炭去除色素。该试验中还利用石油醚去除多酚和色素, 但对香蕉的纯化效果不佳, 并且会带走一部分激素。正丁醇沸点 117.7℃, 因此蒸干较慢, 试验中使用氮气吹干, 但最后损失较大而且也比较慢, 经试验证明在温度不超过 70℃ 时对玉米素的影响不大, 因此选用温度 65~70℃ 蒸干正丁醇。 $C_{18}$  小柱主要对内源激素进行收集, 选择甲醇为洗脱液对赤霉素、吲哚乙酸、脱落酸和玉米素洗脱效果都较好, 另外 40% 乙腈对玉米素的洗脱效果也较好, 该试验中均选用甲醇对 4 种激素进行洗脱。

### 2.2 波长的筛选

根据相关文献选择 210 和 254 nm 波长, 分别检测

$GA_3$ 、IAA、ABA 3 种混标, 发现其在 210 nm 波长条件下各峰较好, 而 254 nm 的基线有漂移现象 (图 1、2); 根据相关文献选择 210、254、265 nm 的波长分别检测 ZT 标样, 发现 265 nm 的波长出峰较好, 峰形较对称 (图 3), 而在 210 和 254 nm 波长条件下明显拖尾, 基线也较不平稳 (图 4、5)。因此, 选择  $GA_3$ 、IAA、ABA 的检测波长为 210 nm, ZT 的检测波长为 265 nm。

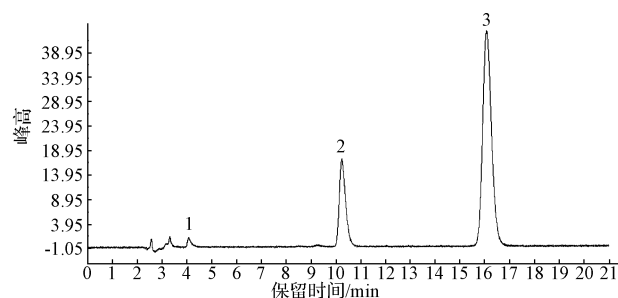


图 1 210 nm 下 1.  $GA_3$ 、2. IAA、3. ABA 标准品的色谱

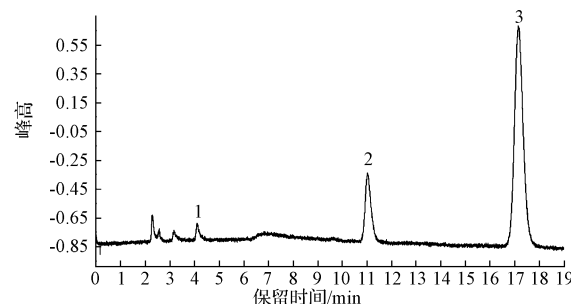


图 2 254 nm 下 1.  $GA_3$ 、2. IAA、3. ABA 标准品的色谱

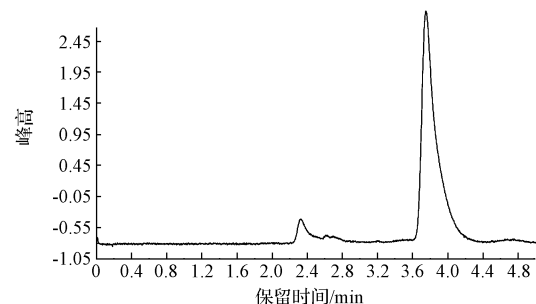


图 3 210 nm 下 ZT 标准品的色谱

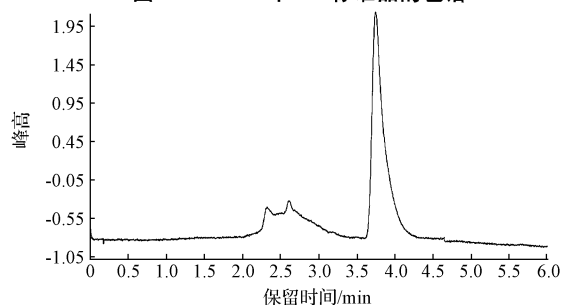


图 4 254 nm 下 ZT 标准品的色谱

### 2.3 流动相的筛选

进样量 20  $\mu$ L, 流速为 1 mL/min, 柱温为 35℃ 时, 3 种不同流动相所得的色谱图见图 6、7、8。流动相为甲

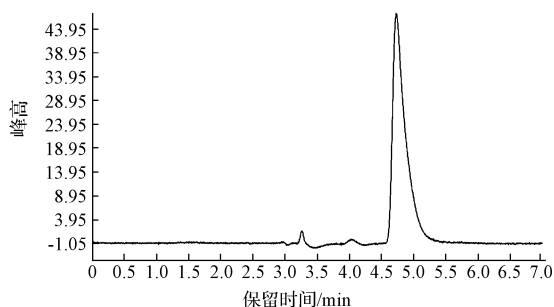
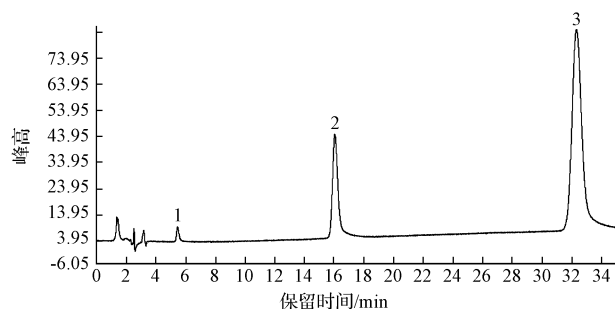
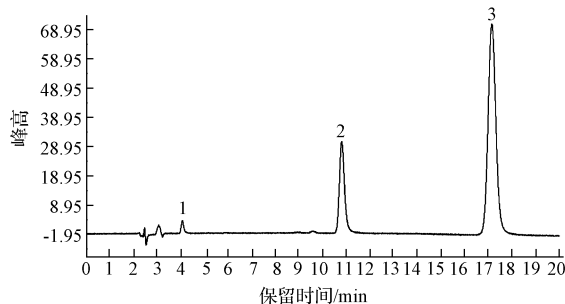
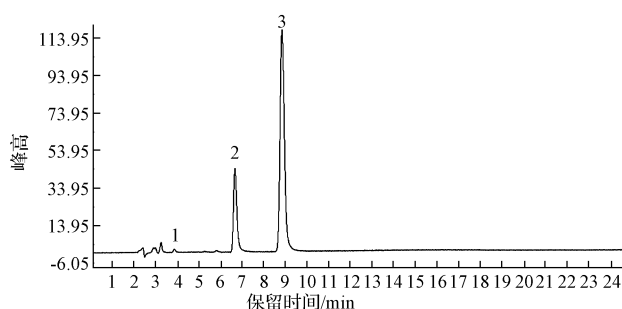


图5 265 nm下 ZT 标准品的色谱

醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)=15:15:70 时出峰时间为 30 min,时间过长,有拖尾现象,而流动相为甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)=15:25:60 时,赤霉素出峰较早,也有少许拖尾。而流动相为甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)=15:20:65 时,3 种激素出峰时间较好,峰型对称,综合考虑选择流动相为甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)=15:20:65。

图6 甲醇:乙腈:磷酸缓冲液  
(pH 3.5)=15:15:70 时 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA 标准品色谱图7 甲醇:乙腈:磷酸缓冲液  
(pH 3.5)=15:20:65 时 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA 标准品色谱图8 甲醇:乙腈:磷酸缓冲液  
(pH 3.5)=15:25:60 时 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA 标准品色谱

## 2.4 柱温的筛选

柱温分别设定 30、35、40℃ 时,分析 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA 和 ZT 标准品的色谱图。结果表明,柱温对色谱图影响不大,主要是对分析时间有影响。温度越高,各组分出峰时间会略微提前。综合考虑激素的适宜保存温度和为避免分析时间过长,经过筛选确定最佳测定温度为 35℃。

## 2.5 流速的筛选

分别研究了 0.8、1.0、1.2、1.5 mL/min 流速影响激素的出峰时间的变化。结果发现,流速越大出峰时间越短,综合考虑分析时间最终确定最佳流速为 1.0 mL/min。

## 2.6 线性关系的测定

在所得最佳色谱条件下用外标峰面积法进行线性关系的测定。将标准混合液稀释不同倍数得到一系列质量浓度的标准品混合溶液,用峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度为横坐标(X,mg/L)做线性回归曲线。得到各激素的回归方程、线性范围、线性相关系数见表 1。由表 1 可知,各激素标准品的浓度与峰面积线性相关性较好,均大于 0.99。

表1 内源激素标准品的标准曲线

内源激素	回归方程	相关系数	线性范围
GA <sub>3</sub>	$y=29\ 969x+4\ 934.6$	0.9930	10~200
IAA	$y=991\ 289x+32\ 104$	0.9999	5~100
ABA	$y=3E+06x+224\ 535$	0.9982	5~100
ZT	$y=4E+06x+67\ 947$	0.9998	5~100

## 2.7 加标回收率与精密度的测定

准确吸取 1 mL 样品待测液于离心管中,分别加入 4 种植物激素各 1 mg,测定各激素含量。4 次重复,计算加标回收率。结果表明,GA<sub>3</sub>、IAA、ABA、ZT 平均回收率分别为 97.5%、96.5%、93.2%、94.7%。将同一标准品采用 HPLC 法平行测定 6 次,4 种激素 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA、ZT 峰面积的相对标准偏差(RSD)值分别为 1.43%、1.50%、1.81%、2.69%,均满足分析要求。

## 2.8 样品中内源激素含量的测定结果

利用该试验优化的色谱方法测定香蕉根中内源激素的色谱图(图 9、10)。“金手指”幼苗根中 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA 和 ZT 的含量分别为 11.06、7.19、0.55 和 14.58 μg/g(折合为 1 g 鲜样中的含量)。

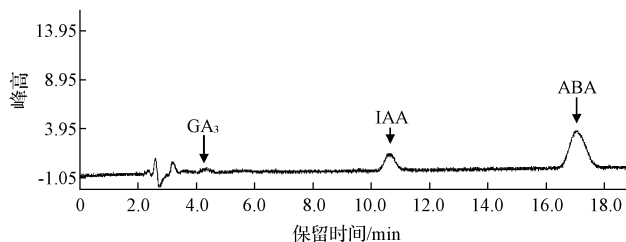


图9 样品的色谱

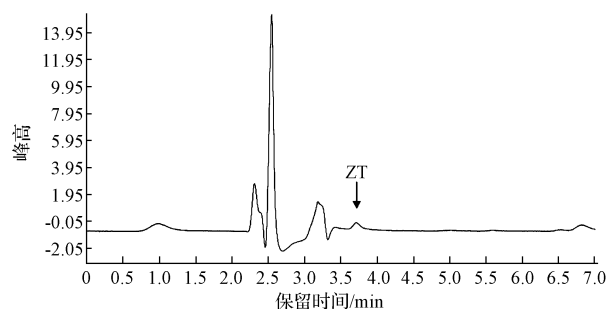


图 10 样品的 ZT 色谱

### 3 讨论

目前对于植物内源激素的测定方法较多的是使用酶联免疫法和 HPLC 法,酶联免疫法虽然较 HPLC 简单,但结果准确度不高,重复性差<sup>[8]</sup>。HPLC 由于灵敏度高、选择性强及数据处理能力好已越来越被国际上广泛应用,所以建立简单、快速、高效的测定植物内源激素的 HPLC 方法就十分具有实际意义。该试验对香蕉根中内源激素的提取和 HPLC 方法进行了优化,发现 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA 3 种混合标样,在 210 nm 波长条件下各峰较好,而 254 nm 的基线有漂移现象,ZT 标样在 265 nm 波长处出峰较好,峰形较对称,而在 210 和 254 nm 波长条件下有明显拖尾,基线也较不平稳,因此,选择 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA 的检测波长为 210 nm,ZT 的检测波长为 265 nm。当流动相为甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)=15:15:70 时出峰时间过长,并且有拖尾现象,而流动相为甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)=15:25:60 时,赤霉素出

峰较早,也有少许拖尾,而流动相为甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)=15:20:65 时,3 种激素出峰时间较好,峰型对称,因此选择流动相为甲醇:乙腈:磷酸缓冲液(pH 3.5)=15:20:65。柱温和流速对色谱图影响不大,主要是对分析时间略有影响,温度越高,各组分出峰时间会略微提前,而流速越大出峰时间越短。综合考虑,最佳柱温为 35℃,流速为 1.0 mL/min。

利用上述试验方法,其结果提取率高,基线分离清晰,可得到满意的峰形、规范的色谱图,并在精密性、重现性和回收率等方面可满足研究要求。

### 参考文献

- [1] 杨途熙,魏安智,郑元,等. 高效液相色谱法同时分离测定仁用杏花芽中 8 种植物激素[J]. 分析化学研究简报,2007,35(9):1359-1361.
- [2] 刘丙花,姜远茂,彭福田,等. 甜樱桃红灯笼果实发育过程中果肉及种子内源激素含量变化动态[J]. 果树学报,2008,25(4):593-596.
- [3] 廖明安,刘旭,邓国涛,等. 梨 2 个品种果实发育期间内源激素含量的变化[J]. 果树学报,2009,26(1):25-31.
- [4] 闫师杰,郭李维,吴彩娥,等. 高效液相色谱法同时测定鸭梨种子中 3 种内源激素[J]. 分析化学研究简报,2010,38(6):843-847.
- [5] 周志祥. 低温浸提法提取板栗器官中的内源激素[J]. 植物生理学通讯,1999(5):382-384.
- [6] 曾辉,杜丽清,邹明宏,等. 澳洲坚果花芽分化期间内源激素的变化[J]. 安徽农业科学,2008,36(34):14949-14953.
- [7] 杨世民,何科学,赵彤. 植物激素提纯中去除色素的有效方法研究[J]. 四川农业大学学报,1996,14(4):613-615,580.
- [8] 冷怀琼,刘畅,刘咏梅. 苹果潜隐病毒的研究-III 茎沟槽病毒对苹果内源激素的影响[J]. 四川农业大学学报,1991,9(2):190-194.

## The Optimum of HPLC Conditions of Four Kinds of Endogenous Hormones in the Roots of Banana

BU Jia-jia<sup>1,2</sup>, HU Yu-lin<sup>2</sup>, WEI Chang-bin<sup>2</sup>, XIE Jiang-hui<sup>2</sup>, HE Xin-hua<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 2. South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Zhanjiang, Guangdong 524091)

**Abstract:** The detection methods of four endogenous hormones [gibberellin acid(GA<sub>3</sub>), indole-3-acetic acid(IAA), abscisic acid(ABA), zeatin(ZT)] in roots of bananas by HPLC with UV detector were established. The separation was performed on an Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The optimum chromatographic conditions were as follows: methanol: acetonitrile: phosphate buffer solution(pH 3.5)=15:20:65 as the mobile phase at 1 mL/min with an injection of 20 μL for GA<sub>3</sub>, IAA, ABA at 210 nm; methanol: acetonitrile: phosphate buffer solution(pH 3.5)=15:15:70 as the mobile phase at 1 mL/min with an injection of 20 μL of ZT at 265 nm. A column temperature of 35℃ was optimum for the separation. The results showed that the recoveries were all high, and this method was rapid and perfect.

**Key words:** HPLC; endogenous hormones; banana; root