

SPE-HPLC 法同时分离测定板栗花芽中四种内源激素的研究

李琳玲, 程 华, 吴聪华, 华 娟, 程水源

(经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 黄冈师范学院, 湖北 黄冈 438000)

摘 要:以板栗花芽为试材,研究了建立其花芽中吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、玉米素核苷(ZR)、赤霉素(GA₃)4种内源激素含量的定性、定量分析方法。结果表明:采用80%的预冷甲醇水溶液浸提板栗花芽中内源激素 IAA、ABA、GA₃、ZR,提取效果较好;采用 SPE-C₁₈小柱固相萃取技术进行纯化,采用 Symmetry 300™ C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm),以甲醇:0.075%冰醋酸(90:5, V:V)为流动相,在流速 1.0 mL/min、柱温 30℃,检测波长 219 nm 的条件下,进行梯度洗脱,分离效果理想,加标回收率达到 89.92%~105.30%;该方法准确、灵敏、重现性好。

关键词:固相萃取;高效液相色谱;板栗;花芽;内源激素

中图分类号:S 664.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)01-0022-04

吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、玉米素核苷(ZR)和赤霉素(GA₃)是重要的植物内源激素,在植物生命活动的整个过程中均起着重要的调节作用^[1],对内源植物激素的检测一直是植物学家们关注的问题。现有测定植物内源激素的方法主要有生物鉴定法、酶联免疫(ELISA)法^[2]、气相色谱(GC)法^[2-3]、放射免疫法、高效液相色谱(HPLC)法^[4]和高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法^[5-6]等。相对而言,HPLC法具有灵敏度高、专一性强和重复性好等特点,而且不需要衍生,还可以同时测定多个植物激素,因而广受推崇。但HPLC对测定材料的前处理要求较高,当植物材料中含有色素、酚类物质、蛋白质、脂类、核酸等物质时,会对激素的准确测定产生干扰,因此需要对植物材料进行必要的前处理,否则会直接影响测定结果。目前,对植物内源激素含量测定的报道多集中在小麦、水稻、棉花等农作物中,测定组织也多是茎、叶等器官,对花芽等富含多酚、核酸、蛋白质、多糖的组织器官中内源激素含量测定研究较少。该试验在总结前人研究基础上,结合板栗花芽组织的基本特点,

建立了固相萃取-高效液相色谱法测定板栗花芽组织中吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、玉米素核苷(ZR)和赤霉素(GA₃)的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

板栗花芽采于湖北省黄冈市罗田县白庙河乡板栗园。

Waters2695 高效液相色谱仪, waters2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站(美国, Waters 公司)。

IAA、ABA、ZR 和 GA₃ 标准品(纯度 99.9%), 美国 Sigma 公司; 甲醇、乙腈、丙酮和正己烷(色谱纯), 美国 Sigma 公司; 乙酸和石油醚(分析纯), 天津市凯通化学试剂有限公司; 试验用水为超纯水, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 甲醇和水均经超声脱气处理。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制 准确称取 IAA、ABA、ZR 和 GA₃ 标准品各 10.0 mg, 分别用甲醇溶解并定容至 10.00 mL, 配成 1.00 g/L 的储备液, 置于冰箱中 -20℃ 避光保存。将储备液按一定比例混合后, 用流动相逐级稀释, 配制标准系列溶液, 于 4℃ 下存放(保质期 1 个月)。

1.2.2 内源激素的提取与纯化 样品处理参照文献[7-8]的方法, 对植物内源激素提取纯化方法加以改进, 具体操作流程: 准确称量板栗花芽 1.0 g 加入液氮研磨, 加入 20 mL 预冷 80% 甲醇 4℃ 下浸提过夜, 然后于 4℃ 下以 5 000 r/min 速率离心 10 min。分离上清液, 沉淀物中加 10 mL 预冷 80% 甲醇 4℃ 下再浸提 4 h, 离心。合

第一作者简介:李琳玲(1981-),女,湖北十堰人,博士,讲师,研究方向为微生物防治。E-mail:lilinling1437@126.com.

责任作者:程水源(1965-),男,教授,博士生导师,现主要从事经济林种质资源评价与利用等研究工作。

基金项目:2011 中央财政林业科技推广示范资助项目(2011BH0032);湖北省教育厅中青年基金资助项目(Q20132909);黄冈师范学院产学研合作资助项目(2012025903);湖北省教育厅高校产学研合作重点资助项目(C2010060)。

收稿日期:2013-10-22

并 2 次浸提所得的上清液,减压旋转浓缩至只剩水相(板栗花芽:再按水相体积的 2 倍加入石油醚,以萃取叶绿素,弃去石油醚相),0.1 mol/L 盐酸调 pH 至 2.5~2.8,加等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并酯相,作为样品粗提液。样品粗提液经活化的中性氧化铝柱或 C₁₈ 小柱处理纯化后,将洗脱液再进行浓缩干燥,用甲醇:0.075%冰醋酸(95:5,V:V)定容至 1 mL,最后经过 0.45 μm 微孔有机滤膜得待测液,进行 HPLC 上样检测。

1.2.3 中性氧化铝柱的活化及对样品纯化处理 先用 2 mL 100%甲醇对中性氧化铝柱进行活化,再以 2 mL 甲醇:水:氨水(78:80:2,V:V:V)为溶剂平衡柱子;然后将样品粗提物上样至柱中,待测物以离子的形式被吸附后用 100%甲醇淋洗柱子,最后用 2 mL 甲醇:

0.075%冰醋酸(90:10,V:V)解析,收集解析洗脱液。

1.2.4 C₁₈ 小柱的活化及对样品纯化处理 先用 2 mL 100%甲醇活化 C₁₈ 小柱,再用 2 mL 80%甲醇溶液平衡柱子;然后加入样品粗提物,最后以甲醇:0.075%冰醋酸(95:5,V:V)以 0.5 mL/min 流速均匀洗脱,收集洗脱液。

1.2.5 色谱条件 色谱柱:Symmetry 300™ C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm),美国 Waters 公司;柱温:30℃;检测波长:210~400 μm 范围内进行光谱扫描后确定最佳波长;流动相采用甲醇和 0.075%冰醋酸混合液梯度洗脱方式。为了优化洗脱条件,设计了 3 种洗脱处理方式(表 1);流速 1.0 mL/min;进样量:10 μL;采用外标峰面积定量。

表 1 植物内源激素梯度洗脱条件

Table 1 The condition of gradient scrubbing of plant endogenous hormone

| 处理方式 Treatment mode | 不同时间段洗脱液成分(甲醇:0.075%冰醋酸,V:V) The composition of eluent in different time segment (Methanol:0.075% Glacial Acetic Acid Solution,V:V)/min | | | | |
|------------------------|--|-------|-------|-------|-------|
| | 0~5 | 6~10 | 11~15 | 16~20 | 21~25 |
| 1 | 5:95 | 70:30 | 95:5 | 100:0 | 5:95 |
| 2 | 70:30 | 70:30 | 95:5 | 100:0 | 70:30 |
| 3 | 95:5 | 70:30 | 95:5 | 100:0 | 95:5 |

2 结果与分析

2.1 试验条件的优化

2.1.1 提取试剂的选择 一般常用甲醇、乙腈、丙酮和正己烷作为提取溶剂。已有研究表明,丙酮和正己烷作为提取溶剂,样品净化较困难,乙腈极性大、穿透力强,浓缩温度高,且乙腈、丙酮在激素分离最佳波长区(254 μm左右)有干扰^[9],因此该试验拟选择甲醇作为提取溶剂。前人对植物内源激素提取中常用 2 种提取试剂,即 80%甲醇^[10]和甲醇:水:甲酸(体积比为 2:1:0.002)^[11],为比较二者的提取效果,将一定量的激素标样加入液氮粉碎后的板栗芽粉末中,利用上述 2 种提取

剂提液处理后,测定其回收率。表 2 显示,在 80%甲醇条件下,4 种植物内源激素的回收率范围为 88.56%~103.11%,相对标准偏差在 0.50%~12.51%之间。而甲醇:水:甲酸(体积比为 2:1:0.002)条件下 4 种植物内源激素回收率范围为 61.58%~95.26%,相对标准偏差在 1.20%~11.87%之间。2 种提取液提取效果相比,80%甲醇提取法对 4 种激素的提取回收率除了 IAA 相对较差外,其余 3 种激素提取效果均远远优于甲醇:水:甲酸提取法。因此,该试验最终确定以 80%甲醇作为提取液提取板栗花芽中这 4 种内源激素。

表 2 不同提取试剂的比较

Table 2 Comparison of different organic solvent extraction

| 提取条件 Extration condition | 回收率 Recovery/% | | | |
|---|----------------|--------------|---------------------------|-------------|
| | IAA(40 μg/g) | ABA(32 μg/g) | GA ₃ (32 μg/g) | ZR(16 μg/g) |
| 80%甲醇 80% Methanol | 88.56±12.51 | 103.11±0.50 | 95.85±0.41 | 89.37±6.60 |
| 甲醇:水:甲酸 Methanol:Water:Formic acid(2:1:0.002,V:V:V) | 90.21±3.64 | 95.26±1.20 | 75.93±11.87 | 61.58±3.52 |

2.1.2 固相萃取小柱的优化 植物内源激素在粗提物中含量低、成分复杂,且植物粗提物中有大量有机化合物干扰测定,这些有机化合物在植物内源激素对试验分析结果准确性上直接产生影响,因而需要对板栗芽粗提物进行必要的纯化处理,以尽可能降低或者消除植物提取物中干扰有机化合物。中性氧化铝柱和 C₁₈ 小柱是 2 种常用的固相萃取小柱。中性氧化铝柱是利用氧化铝 N 吸附剂通过与铝金属中心相互作用与表面羟基形成氢键来吸附分子;C₁₈ 小柱是利用活性碳的较强吸附能

力,二者均能达到吸附干扰有机化合物的目的。为了比较二者的纯化效率,试验分别以测定了 4 种激素在 2 种小柱中纯化回收率。由表 3 可知,中性氧化铝小柱中 GA₃ 和 IAA 回收率比较低,在 30%左右,而 ABA 回收率也只有 70.4%,ZR 回收率为 71.5%;C₁₈ 小柱回收率相较于中性氧化铝柱效果要好,回收率范围介于 65.7%~89.6%之间。因此,C₁₈ 小柱纯化富集植物内源激素效果较中性氧化铝柱要好,应选择 C₁₈ 小柱纯化样品粗提液。

表3 Alumina N-SPE 与 C₁₈-SPE 的比较

| Table 3 Comparison of SPE column-Alumina N and C ₁₈ % | IAA | ABA | GA ₃ | ZR |
|--|------|------|-----------------|------|
| 固相萃取小柱 SPE extraction column | | | | |
| 中性氧化铝柱回收率 Neutral alumina column recovery | 31.8 | 70.4 | 21.3 | 71.5 |
| C ₁₈ 柱回收率 C ₁₈ column recovery | 65.7 | 89.6 | 85.5 | 66.3 |

2.1.3 洗脱条件优化 为了改善液相色谱分离条件,提高分析效率,缩短分析时间,得到最佳洗脱条件,配制4种植物内源激素的标准混合溶液,通过C₁₈纯化柱后,分别采用1.2.5的色谱条件进行检测分析。由图1可知,随着洗脱过程的进行,流动相中甲醇比例逐渐增加,色谱峰型逐渐尖锐。当流动相起始浓度采取甲醇:0.075%冰醋酸(95:5,V:V)时采用梯度洗脱,4种植物内源激素分离效果最好。

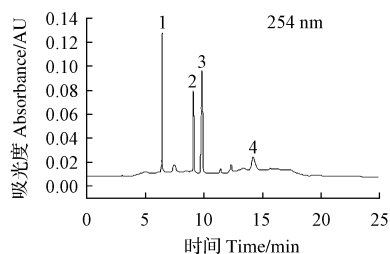
图1 IAA、ABA、GA₃ 和 ZR 液相图谱注:1:ZR; 2:IAA; 3:ABA; 4:GA₃。Fig. 1 HPLC map of IAA and ABA, GA₃ and ZRNote:1:ZR; 2:IAA; 3:ABA; 4:GA₃。

表4

HPLC 方法检测植物激素的特征性参数

Table 4

Response characteristics of the phytohormones standards using HPLC

| 植物激素 Phytohormones | 线性方程 Regression equation | 相关系数 Correlation coefficient | 线性范围 Linear range/mg · mL ⁻¹ |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|
| IAA | $Y=2.2E+7X+52\ 719$ | 0.9985 | 0.50~100.00 |
| ABA | $Y=3.4E+7X-59\ 144$ | 0.9943 | 0.01~10.00 |
| GA ₃ | $Y=1.1E+8X+76\ 029$ | 0.9844 | 0.05~10.00 |
| ZR | $Y=3.2E+7X+12\ 980$ | 0.9849 | 0.01~2.50 |

注:Y表示峰面积(mV · s);X表示浓度(mg/L)。

Note:Y:peak area (mV · s);X:mass concentration (mg/L)。

2.2.2 精确性和稳定性验证 加标回收率试验:在最佳纯化及色谱分析条件下,向测试样品中加入4种植物内源激素各1 mg,测定加标后样品激素含量,5次重复,计算加标平均回收率和相对标准偏差。由表5可知,4种激素的平均回收率为89.92%~105.3%,RSD为4.41%~9.36%,说明试验分离测定精确性良好。稳定性试验:在设定的色谱条件下,配制3种不同浓度

2.1.4 检测波长优化 在2.1.3得到的最佳色谱条件下,检测4种植物内源激素的最佳吸收波长,分析各种植物激素的最佳吸收波长确定检测波长。采用二极管阵列在210~400 nm范围内进行光谱扫描,由图2可知,ABA、GA₃、ZR在250~270 nm处有最大吸收值,IAA在219 nm处有最大吸收峰。综合分析,设置二极管阵列检测器检测波长在254 nm处为宜,4种植物内源激素检测试验效果最佳。

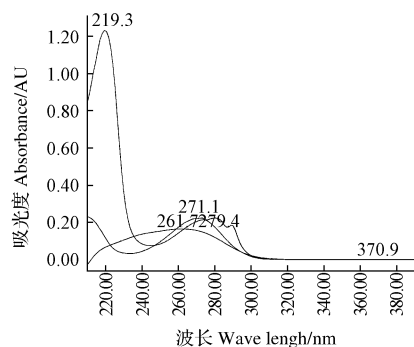


图2 4种植物激素最大吸收峰参数

Fig. 2 Maximum absorption peak parameter of four kinds of plant hormone

2.2 分析方法评价

2.2.1 标准工作曲线 配制浓度分别为0.002、0.004、0.008、0.012、0.016 mg/mL的5个标准混合液,在确定的最佳试验条件下进行检测,得到4种内源激素的标准工作曲线。由表4可知,4种植物激素的线性范围在0.01~100.00 mg/mL,线性方程相关系数在0.9844~0.9985之间,线性关系良好。

的植物激素标准液,通过液相保留时间和峰面积,分析日间和日内植物激素的重现性和再现性。在全天内,测定标准品5次,每次重复3针,进行日内重现性试验,相对标准偏差在2.01%~3.11%;日间分析连续测定4 d,每天测定1次,每次重复3针,试验相对标准偏差在2.56%~3.89%。由表6可知,该方法精密度和重现性良好。

表 5 4 种植物激素的固相萃取的回收率

| 植物激素 Phytohormones | IAA | ABA | GA ₃ | ZR |
|---------------------------|--------|--------|-----------------|--------|
| 平均回收率 Average recovery | 0.8992 | 1.0537 | 0.9562 | 0.9941 |
| 相对标准差 RSD | 6.19 | 4.41 | 7.16 | 9.36 |

表 6 4 种植物激素稳定性试验

| 植物激素 Phytohormones | IAA | ABA | GA ₃ | ZR |
|--------------------------------------|------|------|-----------------|------|
| 日内重现性 Intra-day variance RSD(n=5) | 2.41 | 2.51 | 3.11 | 2.01 |
| 日间重现性 Inter-day variance RSD(n=4) | 3.12 | 3.71 | 2.56 | 3.89 |

3 结论

该试验建立了运用传统的高效液相色谱法同时检测板栗中 4 种植物内源激素的检测方法。通过分析比较,得到测定板栗花芽内源激素 IAA、ABA、GA₃、ZR 提取纯化及测定分析条件为以预冷 80% 甲醇试剂作为提取液,得到板栗芽激素粗体物后采用 C₁₈ 小柱固相萃取技术进行纯化处理。HPLC 分析色谱柱 Symmetry 300™ C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm), 柱温 30℃; 进样量 10 μL; 甲醇:0.075% 冰醋酸 (95:5, V:V) 为洗脱溶液, 流速 1.0 mL/min, 进行梯度洗脱; 检测波长 219 nm。该方法在日内和日间都保持了良好的稳定性。

参考文献

- [1] 朱长进, 刘庆香. 生长调节剂与板栗生长、成花及结果的研究[J]. 林业科学研究, 1992, 5(3): 311-316.
- [2] 杨途熙, 魏安智, 郑元, 等. 高效液相色谱法同时分离测定仁用杏花芽中 8 种植物激素[J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1359-1361.
- [3] Müller A, Dürting 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[J]. Planta, 2002(216): 44-56.
- [4] 张有林, 党娅, 张静, 等. 高效液相色谱法同时测定银凤桃中的赤霉素和脱落酸[J]. 西北植物学报, 2005(7): 1467-1471.
- [5] 刘艳琴, 王浩, 杨红梅, 等. 高效液相色谱-串联四级杆质谱联用测定水果和蔬菜中赤霉素残留量[J]. 农业基础科学, 2009(16): 330-331.
- [6] Forcat S, Bennett M H, Mansfield J W, et al. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress[J]. Plant Methods, 2008(4): 16.
- [7] 王若仲, 萧浪涛, 蔺万煌, 等. 亚种间杂交稻内源激素的高效液相色谱测定法[J]. 色谱, 2002, 20(2): 148-150.
- [8] 赵晓娟, 唐中华, 郭晓瑞, 等. 固相萃取富集-高效液相色谱法测定长春花中的 3 种内源激素[J]. 色谱, 2006, 24(5): 534-534.
- [9] 苏奇珍, 赖钟雄, 叶玲, 等. 不同种类相思树试管苗内源激素的 HPLC 测定[J]. 中国农学通报, 2010, 26(3): 216-221.
- [11] Chiwocha S D, Abrams S R, Ambrose S J, et al. 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 thermodynamicity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds[J]. Plant J, 2003, 35: 405-417.

Simultaneous Determination of 4 Endogenous Hormones in Chinese Chestnut Floral Bud by Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography

LI Lin-ling, CHENG Hua, WU Cong-hua, HUA Juan, CHENG Shui-yuan

(Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Utilization of Resources of Hubei Key Laboratories, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000)

Abstract: With Chinese chestnut floral bud as materials, an analytical method based on solid phase extraction-high performance liquid chromatography (SPE-HPLC) was established for the determination of endogenous hormones IAA, ABA, GA₃ and ZR in chestnut bud. The results showed that, 80% precooled methanol aqueous solution was used to extract the buds endogenous hormones IAA, ABA, GA₃ and ZR from chestnut, and the result of extraction was better. Separation was performed on a Symmetry 300™ C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm×250 mm), using a mixture of methanol and 0.075% glacial acetic acid solution (90:5, volume ratio) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The ultraviolet detection was set at 219 nm, column temperature at 30°C, gradient elution, the separating effect was good, and the recovery ranged from 89.92% to 105.30%. The method was proved to be accurate, sensitive and reproducible.

Key words: solid phase extraction; high performance liquid chromatography; Chinese chestnut; floral bud; endogenous hormones