

植物内源激素的反相高效液相色谱法测定

谢 君, 张义正

(四川大学 生命科学学院 分子生物学实验室, 四川 成都 610064)

摘 要: 报道了以 6-N-苄基腺嘌呤 (BA) 为内标的反相高效液相色谱法测定玉米素 (ZT)、赤霉素 (GA_3)、激动素 (KT)、3-吲哚乙酸 (IAA) 和脱落酸 (ABA) 等 5 种植物内源激素的条件; 采用 μ Bondapak C_{18} 柱、乙腈-甲醇-0.6% (v/v) 乙酸流动相、检测波长 254 nm, 建立了一种从植物中提取 5 种激素的样品处理方法, 并测定了马铃薯块茎中的 5 种植物内源激素的含量。

关键词: 植物; 内源激素; 反相高效液相色谱; 内标法

中图分类号: Q946.885 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2001)01-0060-03

植物基因的表达、生长发育以及植物对某些环境刺激的反应均受其体内多种激素的控制。植物激素 (plant hormones) 是植物体内天然存在的有机化合物, 虽然含量很低, 但调控植物生命活动的整个过程, 因此, 它们与植物生长发育的基本规律和代谢过程的调控都密切相关。植物内源激素的研究是植物生理学领域中的重要内容之一, 它在植物体内的分布和含量的准确测定, 对植物生命活动和作物遗传育种、栽培等领域的研究具有重要意义。

早期植物激素的测定, 基本都采用生物测试方法, 但因灵敏度和选择性不足, 已逐渐被淘汰。气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 和以单克隆抗体为基础的免疫法, 都是现代植物激素检测的新技术, 这两种技术都能准确测定痕量激素 (pg)。在 GC-MS 法中, 选择性离子监测技术更加迅速有效, 它不仅具有很高的灵敏度, 而且能准确鉴定激素的分子结构, 但这些方法均需经冗长的样品纯化程序, 设备昂贵, 使用和维护成本高。

高效液相色谱 (HPLC) 是植物内源激素分析的有效手段, 而且反相 HPLC 用水溶液为流动相更有利于激素的分离和测定。在同时测定植物组织提取液中的多种内源激素时, 经常见到分离度差、存在干扰峰及严重拖尾现象, 因此选择合适的内源激素提取方法和色谱条件较为重要。本研究旨在建立有效的植物内源激素提取方法, 并探讨内标反相 HPLC 法同时测定玉米素 (ZT)、赤霉素 (GA_3)、激动素 (KT)、3-吲哚乙酸 (IAA) 和脱落酸 (ABA) 5 种激素的色谱分析条件。有关 HPLC 分析植物内源激素, 多见于 GA_3 、IAA、ABA 的外标法测定^[1-5], 而 5 种激素的内标法 HPLC 同时分析尚未见报道。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-6A HPLC 系统, 包括 LC-6A 高压溶剂输送泵; SPD-6A 紫外可见检测器; LC-6A 系统控制器; C-R3A 色谱处理器; CTO-6A 柱温箱; 萃取装置; 旋转蒸发器; Sep-Pak C_{18} 小柱; 截流 0.5 ku (kDa) 超滤膜。

GA_3 、IAA、ABA 标准品购于 FLUKA 公司; BA、ZT、KT 购于中国科学院上海生物化学研究所; 石油醚 (30-60 °C) 为优级纯; 其它试剂均为分析纯; 乙腈为色谱纯; 甲醇为 AR 重蒸; 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

精确称取新鲜马铃薯块茎表皮 1.000 g, 将其切碎, 用 10 mL 重蒸甲醇于 4 °C 分 2 次冷浸提取 24 h; 过滤, 冰浴下将上述样品研磨匀浆, 再加入 80% (v/v) 甲醇 20 mL 于 4 °C 分 3 次冷浸提取 24 h; 于 4 °C 5 000 r/min 离心 10 min, 重复 3 次, 残渣用少许 80% 甲醇洗 3 次, 合并全部洗涤液和浸提液; 用等体积石油醚萃取脱色 3 次, 用 1 mol/L HAc 调 pH 至 2.5, 用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 弃去水相; 乙酸乙酯相用等体积 1 mol/L NaAc (pH 7.5) 的缓冲液萃取, 其有机相为中性组分; 水相用 1 mol/L HAc 调 pH 至 2.5, 用等体积乙酸乙酯萃取; 乙

收稿日期: 2000-04-06; 修回日期: 2000-09-27

作者简介: 谢君 (1965-), 男, 安徽灵璧人, 副教授, 博士研究生。

酸乙酯相为酸性组分, 水相为水溶性组分; 将 3 类组分分别于 35~ 40 °C 下减压浓缩至约 5 mL, 过 Sep- Pak 小柱, 收集后合并其馏分, 然后用流动相溶液定容至 10.0 mL; 再经截流 0.5 ku 超滤膜过滤, 作为供试液。

色谱条件: 色谱柱 μ Bondapak C₁₈, ID 4 mm × 250 mm, 10 μ m; 预柱为 ID 4 mm × 30 mm; 柱温 40 °C; 流动相为乙腈- 甲醇- 0.6% (φ) 乙酸(体积比为 5: 50: 45), 0.8 mL/min 恒流洗脱; 检测波长 254 nm。

2 结果与讨论

2.1 植物内源激素的提取分离

在测定前, 需要用有机溶剂从植物组织提取游离态激素。但因激素常以各种结合态存在, 且含量较高, 在操作过程中必须防止结合态激素的水解。植物样品中干扰内源激素测定的物质, 包括待测激素的类似物、色素、酚类与有机酸等。植物样品随机采集后应立即称重, - 20 °C 贮藏; 有条件时应予以冰冻干燥。制取样液时的所有操作均应在弱光下进行, 冰浴条件下往植物鲜样中加入 80% 甲醇进行研磨, 提取 3 次。张能刚等^[6]以 ³H- IAA 作为内标, 发现 2 次离心回收率只有 89%, 经 3 次离心才达 97%, 为了充分提取 IAA 等激素, 离心 3 次是必要的。

分析前除去植物样品中干扰内源激素测定的物质是必要的。通常采用溶剂萃取法、层析法和 Sep- Pak C₁₈ 小柱预分离法去除植物色素等干扰物质。超滤技术是去除蛋白质、核酸等生物大分子干扰物质最有效的方法之一。本实验采用 HPLC 方法测定了多种处理剂及处理技术对 5 种激素回收率的影响, 以选择有效去除干扰物质且不影响 5 种激素回收率的处理剂和处理技术, 其结果列于表 1。

表 1 各种处理剂及处理技术对样品处理后的 5 种激素回收率

Table 1 5 hormones recoveries of sample dealt with various methods

R/ %

Method	ZT	GA ₃	KT	IAA	ABA
n-Hexane(正己烷)	50.06	61.12	72.89	36.64	18.79
Cyclohexane(环己烷)	81.69	84.39	79.85	53.37	79.00
Isooctane(异辛烷)	25.60	75.11	67.50	80.10	49.10
Petroleum benzine(石油醚)	88.80	98.46	105.8	105.1	86.66
Isopropanol(异丙醇)	50.40	77.60	87.30	108.1	79.70
Acetic ether(乙酸乙酯)	84.06	91.89	82.90	106.1	104.0
Active carbon(活性炭)	0.356	3.96	0.100	3.240	0.202
CaCO ₃	71.04	76.59	94.05	103.1	50.30
SiO ₂	106.2	75.48	2.400	88.20	68.01
Al ₂ O ₃	55.02	17.56	90.50	15.0	36.90
PVP	85.11	108.0	103.0	3.10	108.2
Sep- Pak C ₁₈	96.02	94.98	89.85	96.99	100.3
0.5 ku 超滤膜	99.23	98.56	100.1	96.06	98.68

上述试剂对去除干扰内源激素测定的亲脂性色素及其它物质都是比较有效的, 从表 1 回收实验结果可以看出, 石油醚较好, 因此本实验选择它作为处理试剂; 同时从表 1 可以看出, Sep- Pak C₁₈ 小柱预分离和超滤能有效地去除干扰物质, 对 5 种激素的回收率为 95% ~ 100%。

提取液置于 - 20 °C 黑暗中保存, 并应于一周内分析完毕。ABA、GA 等结合态激素大多存在于植物的酸性液泡中, 相当稳定。但在用溶剂萃取时, 若遇碱性溶液则易水解为 ABA 与葡萄糖, 可能会导致游离 ABA 水平的上升。一般而言, 游离态的吲哚乙酸、脱落酸与赤霉素溶于酸化的乙酸乙酯中, 但也有例外, 如含 3 个或 2 个羧基的 GA₂₈ 及含 4 个羧基的 GA₃₂ 溶于水相; 不含羧基的 GA₉、GA₁₅、GA₂₄ 等部分地溶于中性的乙酸乙酯。因此, 宜采取先酸化、后碱化的溶剂萃取程序。

本实验选用 80% 的甲醇、乙醇和乙酸乙酯, 提取样品中植物激素, 采用石油醚萃取和 Sep- Pak C₁₈ 小柱预分离相结合, 再通过截流 0.5 ku 超滤膜超滤, 去除激素类似物、色素、酚类、有机酸以及其它生物大分子。

2.2 内部标准物的确立

人工合成的植物激素 6-N- 苄基腺嘌呤 (BA) 与植物内源激素具有相似的结构和性质, 由图 1 可见, BA 在

已建立的色谱条件下,与植物内源激素可完全分离,而保留值接近;植物体内并不含有人工合成的植物激素 BA,故选用 BA 作为内部标准物质。

2.3 色谱条件选择

植物内源激素的 HPLC 分析,采用硅烷化键合相 C₁₈ 反相色谱柱,以甲醇-水为流动相时色谱峰型不好,拖尾严重,加入一定量的乙酸可使 GA₃、IAA、ABA 分离得到改善,再加入一定量的乙腈会使 ZT、GA₃、KT、IAA 和 ABA 5 种激素分离效果均佳。以乙腈-甲醇-0.6% 乙酸(体积比 5:50:45)为流动相时,5 种激素标样和内标物 BA 均得到满意的基线分离(见图 1)。

2.4 标准样品和植物样品的分析测定

采用本法,5 种激素标准样品工作曲线线性良好($r = 0.882 \sim 0.996$),回收率 80% ~ 105%,RSD($n = 6$)为 0.85% ~ 6.2%。

采用内标法对马铃薯块茎的 5 种激素进行了定量测定,其质量分数分别为 ZT 0.2985×10^{-9} 、GA₃ 253.2×10^{-9} 、KT 2.154×10^{-9} 、IAA 112.5×10^{-9} 、ABA 0.6529×10^{-9} ,其色谱图见图 1B。

本研究建立了以 80% 的甲醇、甲醇和乙酸乙酯提取植物内源激素,采用石油醚萃取、Sep-Pak C₁₈ 小柱预分离和通过截流 0.5 ku 超滤膜超滤相结合,去除激素类似物、色素、酚类、有机酸以及其它生物大分子等干扰物质的样品处理方法,确定了 HPLC 分析系统色谱条件,并首次采用内标法完成 5 种激素的同时测定。

参考文献:

- [1] HEDDEN P. Modern methods for the quantitative analysis of plant hormones[J]. *Annu Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol*, 1993, 44(1): 107.
- [2] HORMANS S. Determination of plant hormones by high performance liquid chromatography[J]. *J Zpft Bot*, 1984, 35: 1832.
- [3] 彭运生,凌祖铭. 高效液相色谱测定水稻幼苗中内源激素的方法研究[J]. *分析测试学报*, 1992, 11(2): 52.
- [4] 张政,张强,王转花,等. 荞麦幼苗内源激素的高效液相色谱测定法[J]. *色谱*, 1994, 12(2): 140.
- [5] 谢君. 高效液相色谱测定多种植物内源激素方法研究[J]. *四川农业大学学报*, 1997, 15(3): 297.
- [6] 张能刚,郑志富,周夔. ELISA 法测定植物内源激素方法的研究[J]. *南京农业大学学报*, 1992, 15(1): 120.

Determination of Plant Intrinsic Hormones by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography

XIE Jun, ZHANG Yi_zheng

(Molecular Biological laboratory, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: A method for the determination of 5 intrinsic hormones: zeatin(ZT), gibberellin(GA₃), kinetin(KT), 3-indoleacetic acid(IAA) and abscisic acid(ABA), in plant by reversed-phase high-performance liquid chromatography with μ Bondapak C₁₈ column and UV detector was developed. The optimal chromatographic conditions were selected. An acetonitrile-methanol-0.6% acetic acid system was used as mobile phase and 6-N-benzyl adenine as an internal standard. A method for the extraction of the 5 hormones and the extract preparation was established. A sample of potato was analyzed. The mass fractions of ZT, GA₃, KT, IAA and ABA are 0.2985×10^{-9} , 253.2×10^{-9} , 2.154×10^{-9} , 112.5×10^{-9} and 0.6529×10^{-9} , respectively. The proposed method is simple, convenient and sensitive.

Key words: Plant; Intrinsic hormones; Reversed-phase high-performance liquid chromatography; Internal standard method

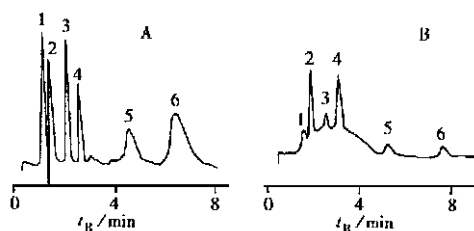


图 1 标准物质(A)和样品(B)的 HPLC 色谱图
Fig. 1 Chromatograms of standards(A) and of sample(B)
1. ZT; 2. GA₃; 3. KT; 4. BA; 5. IAA; 6. ABA