

薯蓣中内源激素的提取及高效液相色谱测定法

胡建斌*, 李建吾, 孙守如

河南农业大学林学院园艺学院, 郑州 450002

Extraction and High Performance Liquid Chromatographic Determination of Endogenous Hormones in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

HU Jian-Bin*, LI Jian-Wu, SUN Shou-Ru

College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

摘要: 以薯蓣的叶片、茎、块茎和根为材料, 探讨了4种内源激素的提取和纯化方法以及适宜于高效液相色谱(HPLC)联合测试的色谱条件。方法的线性关系良好, 回收率高, 试验稳定性好。

关键词: 薯蓣; 内源激素; 高效液相色谱; 测定

一些植物内源激素或生长调节物质, 如吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA_3)、脱落酸(ABA)和茉莉酸(JA)在大蒜(Ravnikar 等 1993)、马铃薯(Marschner 等 1984; 马崇坚等 2003)、地黄(薛建平等 2004)、甘薯(Naktani 和 Komeichi 1991; 王庆美等 2005)等植物的贮藏器官形成过程中有调节作用。研究植物内源激素或生长调节物质含量的变化规律不仅可以加深对植物器官变态机制的认识, 还有望以通过施加外源激素或生长调节物质的手段调控贮藏器官发育过程, 为提高这类作物的产量提供技术支持。但植物体内激素和生长调节物质种类多、含量甚微, 且易被破坏, 因此, 寻求灵敏、专一而又简单易行的测定方法是研究植物内源激素和生长调节物质的前提。植物内源激素的测定方法有生物学鉴定法(丁静等 1979)、气相色谱法(杜黎明和许庆琴 2000)、酶联免疫法(吴颂如等 1988)和高效液相色谱法(HPLC)(谈锋 1986; 李金永等 1994)等。相对而言, HPLC 法有灵敏度高、专一性强和重复性好等优点, 但对样品纯度要求甚高, 需要有适宜的提取和纯化内源激素或生长调节物质的方法。罗正荣(1990)认为, 不同植物材料甚至同一植物不同组织的组分差异较大, 用同一方法难以满足提取和纯化不同组分组织中内源激素或生长调节物质的要求, 所以迄今对此尚无一个理想的方法。

薯蓣为薯蓣科薯蓣属多年生草质藤本植物, 有地下块茎, 由于组织中富含多糖、多酚、色素、甙类等多种成分, 分析其内源激素或生长调

节物质含量较为困难(李鹤鸣和张晓蓉 1999)。因此, 目前有关薯蓣属植物的内源激素或生长调节物质的研究报道甚少。为此, 本文对薯蓣的4种内源激素或生长调节物质, 即 IAA、 GA_3 、ABA 和 JA 的提取、纯化以及 HPLC 检测方法作了探讨, 同时也为测定其他具有贮藏器官的植物中内源激素时提供参考。

材料与amp;方法

1 材料

材料为一年生薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)的叶片、茎、块茎和根。采集新鲜样品后迅速投入液氮中固定, 于 -20℃ 保存备用。

2 仪器与试剂

试验采用 Waters 公司 2010 型高效液相色谱系统, 包括 510 型双泵, 717 型自动进样器, 2487 型紫外检测器, 2010 色谱工作站。内源激素提取装置包括减压旋转浓缩仪、高速离心机和 pH 计等。激素标样品 IAA、 GA_3 及 ABA 购于 Sigma 公司, JA 购于 Fluka Chemie AG 公司。

3 内源激素的提取与纯化

准确取 1 g 冻存样品, 加入 20 mL 预冷的 80% 甲醇溶液, 低温中研磨匀浆后, 于 4℃ 下搅拌 12 h, 以 7 200×g 离心 15 min, 沉淀再用 80% 甲醇

收稿 2007-03-19 修定 2007-05-22

资助 河南省科技攻关重点项目(0123011000)。

* E-mail: jbh220@yahoo.com.cn; Tel: 0371-63554959

提取2次(20 mL, 2 h; 10 mL, 1 h)。合并上清液, 于40 °C下旋转减压蒸至水相, 用0.4 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄调整pH至8.0。水相除杂采取3种方案: (1)等体积石油醚萃取3次; (2)2倍体积石油醚萃取3次; (3)等体积石油醚和乙酸乙酯混合液(1:1, V/V)萃取3次。旋转减压蒸去残存酯相, 加0.4 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP, Sigma)并于4 °C下搅拌30 min, 以7200×g离心10 min, 弃去PVP, 以0.4 mol·L⁻¹柠檬酸调pH值至3.0, 用等体积乙酸乙酯萃取3次。合并酯相并于40 °C下减压蒸干, 用1 mL 95%乙醇溶解残留物, 以0.45 μm微孔滤膜过滤后, 作试液用。

4 色谱条件

标样液经200~300 nm全波长扫描, 取210 nm显示检测, 灵敏度0~0.5 AUFS。色谱柱为Nova-pak C₁₈柱(Waters 3.9 mm ID×150 mm, 10 μm P.S.), 柱温35 °C。在已确定的适宜检测波长下, 比较甲醇:2%乙酸:水(40:40:20, V/V)、色谱纯甲醇与0.05 mol·L⁻¹ pH 7.0的磷酸缓冲液(40:60, V/V)、15%-30%-15%色谱纯甲醇与0.05 mol·L⁻¹ pH 7.0的磷酸缓冲液3种流动相洗脱效果, 流速0.8 mL·min⁻¹, 进样量为10 μL。样品内源激素含量用内标法定性, 外标法进行峰面积定量, 绘制浓度与峰面积的标准曲线(马崇坚2003)。

实验结果

1 萃取剂的选择

采取3种方案对样品进行脱色处理的结果表明, 常规的石油醚萃取法中的方案(1)和(2)的两相分层速度慢, 萃取时间过长(萃取一次大约需30 min), 两相界面模糊不清, 且脱色不彻底; 而方案(3)的分层速度快, 数分钟内两相明显分层, 且水相基本上呈无色和透明状, 脱色效果和工作效率提高。因此认为用石油醚和乙酸乙酯混合萃取法, 即方案(3)更适合于薯蓣组织中内源激素或生长调节物质的净化。

2 流动相的选择

以3种流动相分别对含有IAA、GA₃、ABA和JA 4种标样溶液进行洗脱和测试的结果显示, 甲醇:2%乙酸:水和等浓度的甲醇和磷酸缓冲液2种

流动相虽然测试时间较短, 但均难以将GA₃和ABA完全分离。从HPLC图谱来看, GA₃和ABA波峰明显受到干扰。而甲醇和磷酸缓冲液混合梯度洗脱虽时间稍长, 但4种激素的标样品均达到满意的分离效果(图1)。

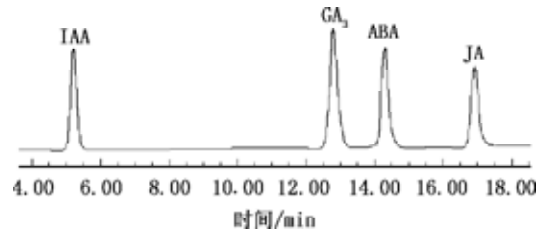


图1 4种标样以色谱纯甲醇和磷酸缓冲液(0.05 mol·L⁻¹, pH 7.0)为流动相混合梯度洗脱时的图谱

3 C₁₈柱的样品分离图谱

薯蓣样品中内源激素的分离和测定采用最佳的提纯方法和色谱条件, 提取液以C₁₈柱分离的色谱图见图2。在相应的保留时间, 4种内源激素均出现清晰的波峰, 所有波峰均未出现不良峰型和拖尾现象, 说明本法的除杂效果较好, 样品中4种内源激素得到了良好的分离。这些结果表明, 试验中所用的分离纯化方法和HPLC色谱条件均可满足HPLC分析测定薯蓣组织中内源激素或生长调节物质的要求。

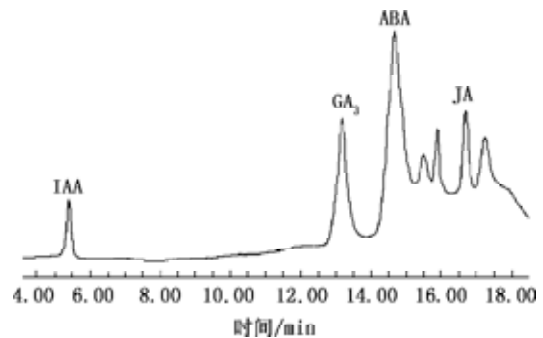


图2 薯蓣样品以色谱纯甲醇和磷酸缓冲液(0.05 mol·L⁻¹, pH 7.0)为流动相混合梯度洗脱时的图谱

4 线性关系的测验

4种标样品分别配制成已知系列浓度的溶液并进行HPLC测定, 绘制波峰面积与之对应的标样浓度之间的函数关系, 即4种内源激素或生长

调节物质的标准曲线。不同激素的标准曲线方程分别为： $Y_{IAA}=8.18704E-6X+0.01059$ ($r=0.9995$)； $Y_{GA_3}=2.94418E-5X+0.04696$ ($r=0.9947$)； $Y_{ABA}=3.66746E-5X+0.02276$ ($r=0.9889$)； $Y_{JA}=5.06107E-4X-0.14395$ ($r=0.9892$)。其中， Y 为标样浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)， X 为色谱图上标样所对应的峰面积。

5 回收率

采用加样回收法测定本法的回收率(王若仲等 2002)。将薯蓣样品等量分成 2 份，其中一份加入已知量的 IAA、 GA_3 、ABA 和 JA 标样品，另一份不加以计算本底值。2 份样品分别按前述方法中步骤平行操作，重复 5 次。测定结果表明，4 种内源激素或生长调节物质的平均回收率分别为 93.6%、88.4%、91.3% 和 92.5%。相对标准偏差(RSD)分别为 3.4%、6.2%、4.7% 和 6.8%。说明本法的回收率符合定量分析要求，且数据误差小，因而可以认为上述的提取和纯化方法以及 HPLC 色谱条件是可行的。

6 方法的应用

用上述提取、纯化和测定方法，测定薯蓣块茎膨大期的叶片、茎、块茎和根中的内源 IAA、 GA_3 、ABA 和 JA 的结果见表 1。同时，用本文中方法测定薯蓣种子和气生块茎的内源激素也较为理想，说明此法适合于薯蓣各种器官和部位中内源激素或生长调节物质含量的测定。

表 1 薯蓣块茎膨大期间的不同器官中内源激素含量

部位	$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)			
	IAA	GA_3	ABA	JA
叶片	1.02±0.07	0.82±0.07	1.48±0.13	17.84±1.01
叶柄	1.16±0.14	0.43±0.03	0.85±0.06	9.06±0.43
块茎	1.41±0.11	0.11±0.01	2.00±0.17	25.33±2.16
根	2.15±0.23	0.04±0.00	0.40±0.03	11.13±0.55

表中数值为 5 次重复平均值 ± 标准误。

讨 论

用 HPLC 分析植物组织中激素或生长调节物质的难易取决于组织中组分的复杂程度。一般来说，组织中组分简单，内源激素或生长调节物质的提取、纯化和测定较容易；反之，提取和测定工作难度则大(罗正荣 1990)。薯蓣属植物组织

的组分复杂，且组分性质各异，因而分析测试其内源激素或生长调节物质较为困难。

样品的纯化是内源激素或生长调节物质分析测定的首要工作。许多植物组织通常只采用石油醚一种萃取剂即可达到满意的纯化效果，但此法用于薯蓣则效果较差。由于薯蓣组织中酯溶性杂质种类多，而不同性质的杂质的最佳溶剂并不一致，这可能是混合萃取法比单一萃取法效果较好的主要原因。此外，由于薯蓣不同器官中杂质种类及其含量并不一致，因而提纯方法可作相应变动。例如，根中杂质种类和含量均较少，混合萃取 1 次就可以达到纯化的目的，PVP 的用量也可减少；而叶片和茎中的色素含量较高，需 3 次萃取；块茎中虽然色素较少，但多糖、多酚等杂质较多，因而可适当减少萃取次数而增加 PVP 的用量。因此，针对不同器官组分的特点，可采取灵活的除杂方法，既可提高工作效率，又可防止内源激素或生长调节物质损失过多而影响结果的准确性。另外，采用 PVP 净化并结合高速离心，不仅可最大限度地除去酚类杂质，还可使样品液中的大分子等杂物充分沉淀。因此，溶解有内源激素或生长调节物质的提取液不需再经复杂的过柱等纯化程序，但为了防止操作过程中遗留或不甚带入的杂物，提取液在上样之前还须经过微孔过滤。我们的结果表明，提取液经高速离心 ($7\ 200\times g\sim 8\ 000\times g$) 5~8 min 后，取其上部液体直接上样，同样能得到满意的图谱。用本方法，每人每天可完成 15~20 份样品的分析，比已有报道(陈雪梅和王沙生 1992；陈昆松等 2003)的操作时间大大缩短。

适宜的色谱条件是内源激素或生长调节物质准确定量的有力保证，流动相的选择则是测定工作的重要环节。本文结果表明，薯蓣组分复杂且性质差异较大，常规的有机溶剂流动相难以将其内源激素或生长调节物质完全分离，而用中等离子强度的磷酸缓冲液并采用梯度洗脱方式则可得到较好的分辨率和分离效果。方能虎和侯树泉(1998)也认为，无机盐缓冲液梯度洗脱可提高分离度，改善峰形，提高灵敏度，对组分复杂样品的分离有较好的效果。但用磷酸缓冲液作为流动相时应注意：(1)使用前一定要经过 $0.45\ \mu\text{m}$ 的

滤膜过滤以防盐沉淀堵塞色谱柱, 最好现配现用; (2) 采用超声脱气法除去流动相中的溶解氧; (3) 测试前先用低浓度有机相(如 10% 甲醇)作过渡洗脱剂, 防止缓冲液中盐在高浓度有机相中析出; (4) 测试完毕, 依次用 100% 纯水、甲醇和水(95:5, V/V)、100% 甲醇清洗整个系统 20~30 min, 以防止盐分残留。

植物体内存在多种内源激素和生长调节物质, 控制贮藏器官形成的内源激素和生长调节物质的种类远不止此 4 种, 还有它们的类似物或衍生物。本文方法对这类物质的定量分析可能也是可行的, 但须深入探讨。

参考文献

- 陈昆松, 徐昌杰, 李方, 陈青俊, 张上隆(2003). HPLC 法测定果实组织中内源 IAA、ABA 方法的改进. 果树学报, 20 (1): 4~7
- 陈雪梅, 王沙生(1992). HPLC 法定量分析植物组织中 ABA, IAA 和 NAA. 植物生理学通讯, 28 (5): 368~371
- 丁静, 沈镇德, 方亦雄, 冯秀香, 李琳, 倪晋山(1979). 植物内源激素的提取分离和生物鉴定. 植物生理学通讯, (2): 27~39
- 杜黎明, 许庆琴(2000). 气相色谱法分离和测定 3 种植物内源激素. 色谱, 18 (1): 67~69
- 方能虎, 侯树泉(1998). 植物激素的反相高效液相色谱法分离和测定. 色谱, 16 (5): 417~420
- 李鹤鸣, 张晓蓉(1999). 我国薯蓣属植物基础研究进展. 经济林研究, 17 (2): 43~45
- 李金永, 石晶, 赵晓亮, 王广, 于惠芬, 任彦军(1994). 高效液相色谱法分离和测定三种植物内源激素. 分析化学, 22 (8): 801~804
- 罗正荣(1990). 植物激素测定方法. 果树科学, 7 (3): 186~190
- 马崇坚(2003). 马铃薯试管块茎形成与内源生长物质的关系[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学
- 马崇坚, 谢从华, 柳俊, 李培武, 张文(2003). 内源生长物质在马铃薯试管块茎形成中的作用. 华中农业大学学报, 22 (4): 389~394
- 谈锋(1986). 植物激素的高效液相色谱. 植物生理学通讯, (5): 15~23
- 王庆美, 张力明, 王振林(2005). 甘薯内源激素变化与块根形成膨大的关系. 中国农业科学, 38 (12): 2414~2420
- 王若仲, 萧浪涛, 简万煌, 曹庸, 卜晓英(2002). 亚种间杂交稻内源激素的高效液相色谱测定法. 色谱, 20 (2): 148~150
- 吴颂如, 陈婉芬, 周燮(1988). 酶联免疫法(ELISA)测定内源激素. 植物生理学通讯, (5): 53~54
- 薛建平, 葛德燕, 张爱民, 柳俊, 朱艳芳(2004). 试管地黄的不定根膨大过程中 4 种内源激素的消长. 作物学报, 30 (10): 1056~1059
- Marschner H, Sattelmacher B, Bangerth F (1984). Growth rate of potato tubers and endogenous contents of indolylacetic acid and abscisic acid. *Physiol Plant*, 60: 16~20
- Naktani M, Komeichi M (1991). Changes in the endogenous level of zeatin riboside, abscisic acid and indole acetic acid during formation and thickening of tuberous root in sweet potato. *Jpn J Crop Sci*, 60: 91~100
- Ravnikar M, Žel J, Plaper I, Špacapan A (1993). Jasmonic acid stimulates shoot and bulb formation of garlic *in vitro*. *J Plant Growth Regul*, 12: 73~77