

高效液相色谱切换波长法测定油菜内源激素

刘志勇 汪军 岳霞丽 董元彦

(华中农业大学理学院 武汉市 430070)

摘 要 采用反相高效液相色谱法(HPLC)切换波长法同时测定油菜中的内源激素赤霉素(GA₃)、3-吲哚乙酸(IAA)和脱落酸(ABA),以甲醇-水-乙腈(20:60:20)为流动相,结果显示其检出限分别为 GA₃: 0.08mg/L; IAA: 0.015mg/L; ABA: 0.025mg/L,比单波长检测的检出限提高了 4—10 倍;相对标准偏差(RSD)分别为 GA₃: 6.3%, IAA: 4.34%, ABA: 7.95%。本实验采用切换波长法,显著减低了各组分的检出限,建立了一种以高灵敏度对多组分体系同时进行检测的方法。同时为快速、准确测定油菜内源激素提供了可靠方法。

关键词 切换波长法, 高效液相色谱, 检出限。

中图分类号: O 657.7⁺2

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2006)02-0285-04

1 引言

植物激素在植物体内,作为执行细胞通讯的化学信息在代谢、生长、形成等植物生理活动的各个方面均起着十分重要的作用^[1,2]。其主要生理功能是调节植物生长发育过程,如细胞的分裂、增长等。了解植物激素的化学性质、作用机理和生理效应等,既有助于深入了解植物的生长发育过程,又可为外源激素在农业上的合理利用提供理论依据。但是内源激素在植物体内的含量很低,一般为组织鲜重的 10^{-9} — 10^{-7} 数量级,按 ng/g 鲜重计 IAA: 1—100, GA₃: 1—1000, 细胞分裂素(CTK): 1—1000, ABA: 10—4000, 同时由于植物体组成复杂,共存的干扰组分很多,因而对植物激素的定量测定非常困难。

目前对植物激素测定的报道很多,从张爱萍等(1994 年)到史作安等(2004 年)都报道了激素的测定方法,如王若仲等(2002 年)“亚种间杂交稻内源激素的高效液相色谱法”采用反相液相色谱,254nm 检测波长,外标法定量测出了三种激素 GA₃、IAA 和 ABA,检出限分别为 GA₃: 0.5mg/L, IAA: 0.1mg/L; ABA: 0.03mg/L,结果比较好;谢君等(2001 年)“植物内源激素的反相高效液相色谱法测定”采用反相液相色谱,254nm 检测波长,测定了 5 种内源激素的含量;陈昆松等(2003 年)“HPLC 法检测果实组织中内源 IAA、ABA 方法的改进”改变了激素的前处理后测定了果实的内源激素 IAA 和 ABA,他们均采用单一波长分别进行检测^[1—10]。植物中激素多组分同时存在,单一波长并不能使每个组分都能够在最佳检测波长下检测。本实验以测定植物内源激素(GA₃、IAA、ABA)为例,采用切换波长法对多组分样品进行了检测分析,提高了检测灵敏度,降低了检出限。本

联系人,电话: (027)87284018; E-mail: yydong@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 刘志勇(1981—),男,湖北省黄冈市人,硕士生,主要从事植物生长调节剂应用和农药残留分析工作。

收稿日期: 2005-10-30; 接受日期: 2005-11-16

实验切变波长法解决了多组分检测时不能同时在高灵敏度下工作的难题,为多组分同时检测降低检出限提供了可靠的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100HPLC 系统(德国 Agilent 公司);色谱柱 Eclipse XDB C₁₈ (5 μ m, 4.6mm $\times$ 280mm) (德国 Agilent 公司);RE52-3 旋转蒸发仪(上海沪西分析仪器厂);ENV F-18 小柱;0.45 μ m 超滤膜;UV-200 型紫外分光光度计(日本岛津公司),pHS-3C 型酸度计(上海雷磁厂),GA₃、IAA、ABA 标准品均为国产标样,石油醚为优级纯,甲醇、乙腈为色谱纯;实验用水均为超纯水。

2.2 实验方法

取油菜叶片 5.0g,3 种激素(GA₃、IAA、ABA)按王若仲等(2002 年)的方法进行提取^[8]。色谱条件:柱温为 20 $^{\circ}$ C;流速为 0.7mL/min;流动相比例:甲醇 乙腈 水=20:20:60;波长由紫外扫描得出 GA₃、IAA 和 ABA 最大吸收波长分别为 206nm、254nm、270nm。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的选择

(1) 流动相强度对各组分保留时间的影响:随流动相中甲醇含量的增加,即流动相强度增加,则 GA₃、IAA 和 ABA 等组分保留时间皆缩短,测定周期缩短,但是降低了分离效果,影响激素含量的测定。实验确定最佳流动相配比为:甲醇 乙腈 水=20:20:60。

(2) 不同流速对分离效果的影响:随着流速的增加,各组分保留时间均缩短,但重叠现象也加剧,而流速太小则会延长测定时间,实验确定最佳流速选择为:0.7mL/min。

(3) 波长的选择:紫外多波长扫描 GA₃、IAA、ABA 的最佳波长分别为:206nm,254nm,270nm;故实验采用切换波长法检测。

3.2 实际测定

3.2.1 标准溶液的测定

精确称取标准 GA₃、IAA 和 ABA 样品各 0.0010g,混合并用甲醇(色谱纯)定容到 100mL 容量瓶中,稀释 10 倍得到 1.00mg/L 三种植物激素标准物质混合溶液。

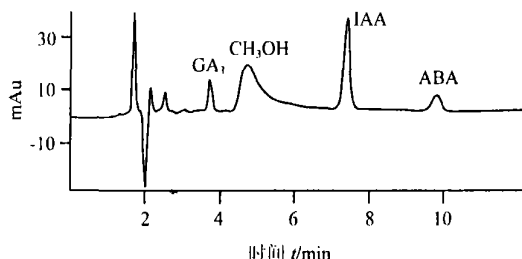


图 1 混合对照品的 HPLC 图(波长为 254nm)

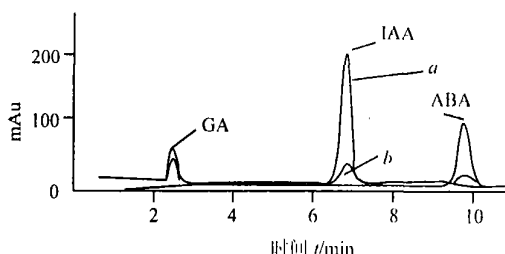


图 2 混合对照品 HPLC 图(切换波长)

a—10mg/L 混合物色谱图;

b—1mg/L 混合物色谱图。

由图 1 和图 2 可以看出,切变波长法消除了溶剂峰和某些杂质峰。当多组分体系样品进行检测

时, 切变波长法检测比单一波长检测减少一些干扰, 更利于待测组分的分析检测。

3 2 2 油菜样品的测定

取 2.2 的供试液, 过 0.45 μ m 的超滤膜, 经 HPLC 检测 (图 3)。

3 3 回收率 相对标准偏差的测定

本实验分别将 10.00mg/L 的 GA₃、10.00mg/L 的 IAA 和 3.00mg/L 的 ABA 标准溶液按照样品的提取方法处理, 采用 HPLC 进行 9 次平行测定, 其回收率分别为 GA₃: 90.27%; IAA: 96.29%; ABA: 98.45%; 相对标准偏差 (RSD) 分别为 6.3%, 4.34%, 7.95%, 符合激素检测定量分析要求。

3 4 线性关系

采用外标峰面积法测定, 配制一系列质量浓度的标准品混合溶液, 用峰面积 (y) 对质量浓度 (x, mg/L) 作线性回归曲线, 得到的回归方程、校准曲线的线性范围和最低检出限如表 1 和表 2 所示。

由表 1 可知, 实验结果显示 GA₃, IAA 和 ABA 的相关系数 (r^2) 分别为 0.9938, 0.9959, 0.9986, 线性相关性较好, 各种激素的检出限均较低, 达到理想效果。

3 5 灵敏度的比较

不同物质有不同的最佳检测波长, 混合样品采用单一波长检测会导致至少有一种待测物质达不到最大吸收, 从而降低了该物质的检测灵敏度; 而切换波长法在不同的时间采用不同的检测波长, 使每种待测物质均达到最高检测灵敏度。实验中 ABA 在 206nm 波长下吸收没有达到最大, 紫外检测器其最大吸收为 270nm, 而采用切换波长法测定使相同浓度 ABA 的色谱峰面积、峰高均增大数倍, 显著提高了 ABA 的检测灵敏度, 相应组分的检出限均明显的降低了 (见表 3), 更有利于微量物质的定量分析。

3 6 切变波长时间的选择

经紫外扫描得 GA₃、IAA、ABA 的最大吸收分别为 206nm、254nm 和 270nm, 单波长检测不能使待测的组分的响应值达到最大, 甚至很多要检测的组分在固定波长下根本检测不出来, 从而影响测定结果。为了更好的检测样品中的植物激素, 减少溶剂等物质的干扰, 本实验采用了切换波长法,

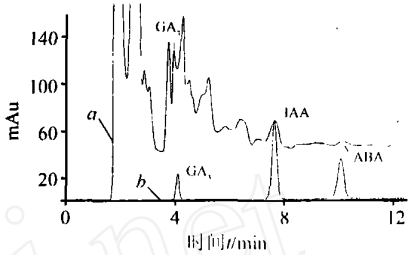


图 3 油菜叶片样品图

a——10mg/L 对照品色谱图;

b——油菜样品色谱图。

表 1 GA₃, IAA 和 ABA 的校准曲线

植物激素	回归方程	相关系数 (r^2)	检出限 (mg/L)
GA ₃	$y = 42.485x - 1.0552$	0.9938	0.080
IAA	$y = 206.73x + 79.066$	0.9959	0.015
ABA	$y = 125.44x + 115.82$	0.9986	0.025

表 2 GA₃, IAA 和 ABA 的检出限对照表

(切换波长法和单波长法)

波长 (nm)	GA ₃ 的检出限 (mg/L)	IAA 的检出限 (mg/L)	ABA 的检出限 (mg/L)
206	0.080	0.100	0.100
254	0.500	0.015	0.030
270	0.600	0.150	0.025
变换波长	0.080	0.015	0.025

表 3 时间和波长之间的切换表

序号	时间 (min)	波长 (nm)
1	0.0	320
2	3.4	206
3	4.6	320
4	6.8	254
5	8.5	270

确定在 206nm 下检测 GA₃, 254nm 下检测 IAA 和 270nm 下检测 ABA。由于溶剂保留时间最小, 最先被检测到, 而且溶剂甲醇在 206nm 下有较大吸收干扰测定, 在 320nm 以上则吸收很小。故首先选择检测波长为 320nm 使溶剂峰最小化; 3.4min, GA₃ 将要出峰时, 将检测器波长切换到 206nm; 当液相色谱运行到 4.6min 时, 溶剂甲醇将要出峰, 将检测器波长切换为 320nm; 待甲醇出峰终止后, 6.8min 时再将检测器波长切换到 254nm, 以检测 IAA; 最后当 8.5min ABA 要出峰时, 将检测器波长切换到 270nm, 共 4 次切换波长。切变波长法的时间变换应该通过各待测组分的保留时间来选择, 每次切换波长都要密切注意各物质响应的开始和终止时间, 所以严格掌握切换时间是切变波长法的关键。

4 结论

液相色谱测定中采用切换波长报道甚少, 运用切换波长法关键是把握好切换时间。切换波长法的优点在于可以使各种待测组分分别选择最佳检测波长, 在高灵敏度下进行检测, 同时可以使不需要的或干扰物质出峰较小, 甚至不出峰。当多组分体系进行检测时, 特别是待测物质组分复杂、含量少时, 切换波长法可以避免一些组分对待测物质测定的干扰, 使待测物质出峰明显, 而且可以显著提高检测灵敏度, 降低检出限, 能够减低多组分体系定量检测的困难, 并为测定油菜体内内源激素提供了可靠、快速、准确的检测方法。

参考文献

- [1] 蔡传杰, 陈善娜 植物激素的研究进展[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2001, (5): 54—56
- [2] 方能虎, 侯树泉 植物激素的反相高效液相色谱法分离和测定[J]. 色谱, 1994, 16(5): 417—420
- [3] 张爱萍, 杨频, 张江涛 植物激素及其金属配合物的生理活性研究[J]. 山西农业大学学报, 1994, 5: 56—58
- [4] 李亚男, 陈大清 近年植物激素检测技术的发展与展望[J]. 湖北农学院学报, 1996, 16(1): 67—74
- [5] 汪建民, 付蕾 植物内源激素 HPLC 分析方法的研究[J]. 山东化工, 1998, 5: 57
- [6] 陈昆松, 陈青俊 HPLC 法检测果实组织中内源 IAA、ABA 方法的改进[J]. 果树学报, 2003, 20(1): 4—7
- [7] Grolanys Castilb, Servando Martinez Reversed-Phase C18 High-Performance Liquid Chromatography of Gibberellins GA₃ and GA₁[J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, 782: 137—139
- [8] 王若仲, 曹庸 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
- [9] 史作安 甜樱桃休眠花芽内源激素的高效液相色谱测定[J]. 落叶果树, 2004, 36(5): 1—3
- [10] 谢君, 张义正 植物内源激素的反相高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2001, 20(1): 60—62

Determination of Plant Hormones in Rape by HPLC with Changing UV-Vis Wavelength

LU Zhi-Yong WANG Jun YUE Xia-Li DONG Yuan-Yan

(College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, P. R. China)

Abstract GA₃, IAA and ABA were determined by reversed-phase HPLC with methyl alcohol-water-acetonitrile (20:60:20) as mobile phase and changing UV-vis wavelength. The detection limit of GA₃, IAA and ABA are 0.08mg/L, 0.015mg/L and 0.025mg/L, respectively. The relative deviations for GA₃, IAA, ABA are 6.3%, 4.34% and 7.95%, respectively. The method can dramatically improve the detection sensitivity compared with the single wave method.

Key words Changing Wave, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Detection Limit