

# 高效液相色谱法测定龙眼胚芽中的细胞分裂素

吴红京<sup>1</sup>, 张春玲<sup>2</sup>, 赖钟雄<sup>2</sup>

(1. 中国科学院福建物质结构研究所技术测试中心, 福建, 福州 350002;

2. 福建农林大学园艺学院园艺系, 福建, 福州 350002)

**摘要** 用高效液相色谱法测定从龙眼胚芽中纯化提取的 4 种植物细胞分裂素 ZT、KT、6-BA、2ip, 并介绍了植物组织内细胞分裂素的提取和纯化过程, 实验以 C<sub>18</sub>柱为分离柱, 甲醇-1%冰醋酸=42:58(v/v)为流动相, 采用流速梯度洗脱欲测组分, 在 254nm 处检测了 4 种植物细胞分裂素。被测组分的浓度与其峰面积有良好的线性关系 ( $r=0.9995 \sim 1.000$ ), 加标回收率在 93.81%~98.23%, 4 种植物细胞分裂素的最小检出限均在纳克级。

**关键词** 高效液相色谱; 龙眼; 胚芽; 细胞分裂素

## High performance liquid chromatographic (HPLC) determination of cytokinins in embryo of longan

Wu Hongjing<sup>1</sup>, Zhang Chunling<sup>2</sup>, Lai Zhongxiong<sup>2</sup>

(1. Center of Technology and Test, Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, The Chinese Academy of Sciences, Fuzhou, Fujian, 350002; 2. The College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, 350002)

**Abstract** This paper describes the application of reversed-phase HPLC to determination of cytokinins in embryo of Longan [trans-zeatin (ZT), 6-furfurylaminopurine (KT), 6-benzylaminopurine (6-BA) and 6-(*r,r*-dimethylallylamino)purine (2ip)] in purified extracts of embryo of Longan, and also gives an extraction and purification procedure useful for the routine analysis of the cytokinins in plant tissue. A C<sub>18</sub> column was used and gradient elution with MeOH-1% HAC=42:58(v/v) at a flow rate of 1.0~1.2 mL/min, was performed with a UV monitor at 254 nm. The average recovery of four plant cytokinins were 93.81%~98.23% (n=5) and correlation coefficients were 0.9995~1.000. The lowest detectable limit for four plant cytokinins were in nanogram level.

**Key words** High performance liquid chromatography; Longan; Embryo; Cytokinin

细胞分裂素 (CTK) 是植物激素中的一类, 在植物体内含量甚微, 但它们对植物的生长发育具有显著的影响, 其主要作用是促进细胞的分裂和扩大, 促进侧芽的发育, 抑制衰老等。用高效液相色谱法测定植物中的细胞分裂素已有报道<sup>[1]</sup>, 但测定胚芽中的细胞分裂素则不多见。对于植物内源激素的分离和测定, 我们曾做过一些工作<sup>[2,3]</sup>, 但所测激素仅限于 2~3 种, 现在建立了同时测定 4 种植物细胞分裂素: 反玉米素 (ZT)、6-糠基氨基嘌呤 (KT)、6-苄氨基嘌呤 (6-BA)、N<sup>6</sup>-2-异戊烯基腺苷 (2ip) 的方法。本法采用流速梯度来分离 4 种细胞分裂素, 外标法定量, 并选择龙眼胚芽作为研究对象, 分离和测定了其中的细胞分裂素, 方法简便, 灵敏度高, 也适合于其它植物中的细胞分裂素的检

测。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和主要试剂

LC-4A 高效率液相色谱仪, SPD-2AS 紫外检测器, C-R2AX 积分仪 (日本岛津), UV-1100 紫外可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司), 旋转蒸发器 (上医械专机厂)。

甲醇 (色谱纯), 冰醋酸 (分析纯), 反玉米素 (上海丽珠东风生物技术有限公司), 6-糠基氨基嘌呤 (上海生物化学研究所), 6-苄氨基嘌呤 (上海农学院经销), N<sup>6</sup>-2-异戊烯基腺苷 (上海伯奥生物科技有限公司), 水 (二次蒸馏)。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: Supelcosi LC - 18 - DB (4.6 × 250mm, 5μm); 流动相: 甲醇: 1% 冰醋酸 = 42: 58 (v/v); 梯度流速: 0.01 ~ 12.00 min, 1mL/min, 12.01 ~ 25.00 min, 1.2mL/min; 25.01 min, 1mL/min. 检测波长: 254nm, 柱温: 40。

### 1.3 标准溶液的配制

4种细胞分裂素的对照品甲醇溶解后, 配制成含4种细胞分裂素均为50mg/L的标准贮备液。

### 1.4 样品溶液的制备

称取龙眼胚芽5.0g, 加入冷却的体积分数为80%的甲醇溶液50mL, 低温下研磨匀浆, 于-20浸提取21h, 浸提液离心过滤, 残渣用上述甲醇20mL重提2次, 离心后合并滤液。滤液于40减压浓缩至水相, 用1mol/L柠檬酸调节pH为3.0, 加入等体积石油醚: 乙酸乙酯(1:1v/v), 萃取脱色3次, 弃去酯醚相, 加入0.5g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)吸附酚类物质, 低温振荡30min, 过滤弃去PVP, 滤液用1mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>调节pH 8.0, 再用等体积乙酸乙酯: 正丁醇(1:1v/v)萃取3次, 合并酯相, 于40减压蒸干后, 用5mL流动相溶解残质, 溶液经0.45μm滤膜过滤后进行HPLC分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测波长的选择

4种细胞分裂素的甲醇溶液分别在UV-1100紫外可见分光光度计上进行光谱扫描, 4种细胞分裂素在250~270nm之间均有最大吸收, 本实验选择常用的245nm作为检测波长测定4种组分。

### 2.2 流动相中甲醇的比例和流速的选择

采用恒流洗脱, 流动相中甲醇的体积分数为50%时, 4种组分就能完全分离, 但在提取的实际样品中杂质较多, 影响检测的准确性, 实验中又分别选用了甲醇与醋酸体积比为45/55、42/58、40/60来分离样品中的4种组分, 结果表明, 流动相中甲醇体积分数为45%时, ZT与样品中的杂质分离较差, 使ZT测定结果偏高, 而流动相中甲醇体积分数为40%时, 6-BA和2ip的保留时间迅速增加, 当甲醇体积分数为42%时, ZT虽能与杂质很好地分离, 但一次分析时间仍需要35min以上, 为了缩短分析时间又不影响欲测组分与杂质的分离, 最终采用流速梯度来完成分析, 其效果比采用梯度洗脱方便, 避免了梯度洗脱以后需用流动相将柱子恢复到最初平衡的状态所花费的时间。

### 2.3 线性回归方程和最小检测限

将“1.2节的混合标准溶液用流动相配制成一系列不同质量浓度的标准溶液, 进行分析, 以峰面积(Y)对质量浓度(X, mg/L)作图, 4种组分的线性范围均在0.5~50mg/L之内, 通过回归计算, 得到回归方程、相关系数和最小检出限见表1。

表1 线性回归方程、相关系数和最小检出限

欲测物	回归方程	相关系数	最低检测限 (ng)
ZT	$Y = 3.0 \times 10^6 X - 5.083 \times 10^2$	1.000	1.25
KT	$Y = 3.0 \times 10^6 X - 3.861 \times 10^2$	0.9995	2.50
6-BA	$Y = 2.0 \times 10^6 X - 7.2430 \times 10^2$	0.9969	5.00
2ip	$Y = 3.0 \times 10^6 X - 4.9220 \times 10^2$	0.9970	2.50

### 2.4 样品分析

将按“1.4节方法提取的样品进行HPLC分析, 样品采用加标峰面积增高法定性, 外标法定量, 典型谱图见图1, 从图中可见龙眼胚芽中不含有2ip, 样品测定结果见表2。

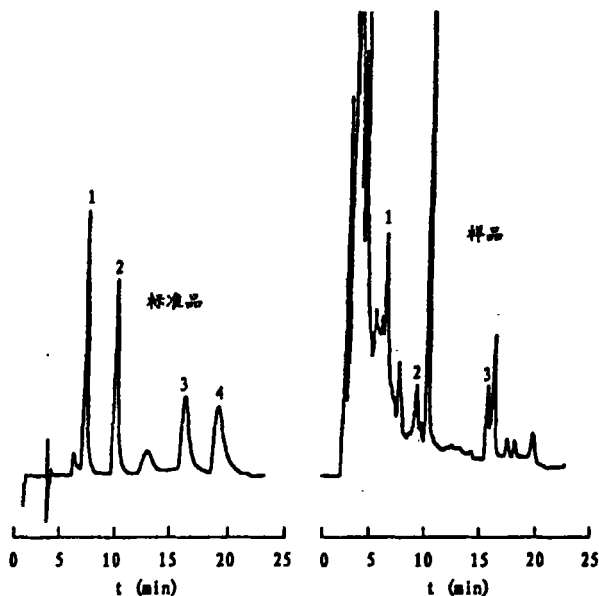


图1 4种细胞分裂素的色谱图

1. ZT, 2. KT, 3. 6-BA, 4. 2ip

### 2.5 回收率和重现性测定

试验中按200μg/G·FW的比例将4种标准对照品加入到样品中(已测得此样品的细胞分裂素含量本底值为空白), 经提取后, 采用HPLC进行5次平行测定, 其回收率分别为93.81%、95.63%、98.23%和96.98%。相对标准偏差(RSD)(下转第2100页)

### 2.3 共存离子的影响

对于测定  $1\mu\text{g}$  的亚砷酸根, 在反应体系中加入不同量的干扰离子, 当荧光测定值相对误差不大于  $\pm 5\%$  时, 各种共存离子的容许量列于表 1 中。

表 1 干扰离子的容许含量 ( $1\mu\text{g}$  亚砷酸根)

干扰离子	容许含量 (W/W)
$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{HPO}_4^-$ , $\text{HCO}_3^-$	1000
$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Al}^{3+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ba}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{SCN}^-$	500
$\text{W}(\text{O})$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{As}(\text{V})$	250
$\text{Pb}^{2+}$	150
$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Cr}^{3+}$	100
$\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$	50
$\text{Fe}^{3+}$	15

### 2.4 工作曲线和检测限的测定

实验表明, 亚砷酸根含量在  $4 \sim 180\text{ng/mL}$  范围内, 荧光强度差值与亚砷酸根含量成正比。线性回归方程 ( $F = 312.8C + 0.76$ , 相关系数  $r = 0.9991$ )。对六份试剂空白进行平行测定, 根据  $3S_0/K$  ( $S_0$  为空白测定值的标准偏差,  $K$  为工作曲线的斜率) 进行计算, 得到检测限为  $0.6\text{ng/mL}$ 。

## 3 样品分析

由共存离子实验结果可知, 本法干扰较小, 可直接用于天然水样的测定。分别吸取适量自来水和经过过滤后的池塘水样加入  $26\text{mL}$  容量瓶, 按照上述优化好的实验条件进行测定, 同时对的分析的水样加入不同量的亚砷酸根进行回收实验 ( $n = 6$ ) 如表 2 和表 3 所示, 回收率均在  $96\% \sim 105\%$  之间, 总砷浓度的测定值与标准参考物的浓度基本一致, 可信度为  $96\%$ , 结果令人满意。

(上接第 2097 页) 分别为  $5.31\%$ ,  $5.01\%$ ,  $4.73\%$  和  $4.13\%$  符合定量分析要求。

表 2 样品测定结果 ( $n = 5$ )

样品含量 (ng/G FW)				
序号	ZT	KT	6-BA	2ip
1	664.36	140.25	684.64	ND
2	1124.20	213.89	1356	ND
3	592.96	152.44	428.93	ND
4	302.57	190.56	291.92	ND

注: ND 表示检出。

表 2 自来水中  $\text{AsO}_3^{3-}$  的测定 ( $\mu\text{g/L}$ ,  $n = 6$ )

样品	加入量		测得平均值		标准值
	$\text{As}(\text{O})$	$\text{As}(\text{V})$	$\text{As}(\text{O})$	$\text{As}(\text{V})$	
1	2.50	1.50	$2.54 \pm 0.11$	$1.68 \pm 0.08$	-
2	1.50	2.50	$1.55 \pm 0.06$	$2.61 \pm 0.13$	-
3	0.00	4.00	$0.00 \pm 0.04$	$4.13 \pm 0.11$	-
SRM	-	-	$13.24 \pm 1.21$	$40.36 \pm 1.86$	$56.02 \pm 0.73$

表 3 池塘水中  $\text{As}(\text{O})$  和  $\text{As}(\text{V})$  的测定 ( $\mu\text{g}$ ,  $n = 6$ )

NO.	取样 (mL)	加入量		$\text{As}(\text{O})$	$\text{As}(\text{V})$	回收率 (%)
		$\text{As}(\text{O})$	$\text{As}(\text{V})$			
1	10.00	0.58	0.45	1.00	0.00	103.4
2	10.00	0.63	0.41	2.00	0.00	102.1
3	10.00	0.67	0.49	0.00	1.00	101.6
4	10.00	0.59	0.44	0.00	2.00	98.8

## 参考文献

- [1] Batley GE. Trace Elements Speciation; Analytical Methods and Problems CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, 350.
- [2] Verduyck A (Ed). Hazardous Metals in Human Toxicology. Elsevier, New York, 1984, 337.
- [3] Chana BS, Smith JN. Anal. Chim. Acta, 1987, 197, 177 - 186.
- [4] Rozebon D, Dressier VL, Gomes Neto JA, et al. Talanta, 1998, 45, 1167 - 1175.
- [5] Woller A, Mester Z, Fodor P. Anal. AL. Spectrom, 1995, 10, 609 - 613.
- [6] Nielsen S, Sloth JJ, Hansen EH. Talanta, 1996, 43, 867 - 880.
- [7] Xu XG, Ali A, Lu XH, et al. Environmental Pollution and Protection, 1998, 20, 35 - 37.
- [8] Wang J, Tomlinson MJ, Caruso JA, et al. Spectrom, 1995, 10, 601 - 607.
- [9] Costa - Fernandez Jm, Junzer F, Pereira - Garcia R, et al. At. Spectrom, 1995, 10, 1019 - 1025.

## 3 结束语

配制好的标准溶液不宜放置太长时间, 最多不要超过两个星期, 否则峰面积有变化。

## 参考文献

- [1] 谈锋. 色谱, 1988, 6(1): 27 - 30.
- [2] 唐根源, 吴红京. 色谱, 1993, 11(5): 321 - 323.
- [3] 唐根源, 吴红京. 分析试验室, 1997, 16(5): 66 - 69.