

反相高效液相色谱法分离和测定 亚麻植株中植物激素^{*}

雷 蕾¹, 康庆华², 张晓波¹, 陈国友¹, 李 辉¹, 王玉富²

(1. 黑龙江省农科院谷物品质研究中心, 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农科院经济作物所, 呼兰 150518)

摘要: 探讨了用反相高效液相色谱法分离和测定经不同除草剂处理的亚麻植株中两种生长激素吲哚乙酸(IAA)与赤霉素(GA₃)的方法。以甲醇、乙腈和水为流动相, 5 分钟可将两种激素快速分离和定量测定, 线性关系良好, 回收率较高。

关键词: 亚麻植株; 吲哚乙酸(IAA); 赤霉素(GA₃); 液相色谱法; 分离和测定

中图分类号: S 563.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2001)06-0021-02

Separation and Determination of Plants Hormones in FLax Plant With Reversed—phase High Efficient Liquid Chromatography

LEI Lei¹, KANG Qing-hua², ZHANG Xiao-bo¹, CHEN Guo-you¹, LI Hui¹, WANG Yu-fu²

(Gains and Quality Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In this paper, reversed—phase high efficient liquid chromatography was used for the separation and determination of plant hormones indole—3—acetic acid(IAA) and gibberellic acid(GA₃) in flax plant treated with different herbicides. Methanol, acetonitril and water system was chosen as the mobile phase. Within 5 minutes two plant hormones can be separated and determined. The calibration curves for the two compounds had a lineal relation. The rete of recycle was very high.

Key words: flax plants; indole—3—acetic acid(IAA); gibberellic acid(GA₃); liquid chromatography; separation and determined

IAA、GA₃ 作为内源激素可在生长的亚麻植株体内自然合成, 其主要功能是调解植物的生长发育。如细胞分裂、节间伸长等。由于某些除草剂(尤其是激素类除草剂)进入亚麻植株体内, 会打破其原有的激素平衡, 使其生长发育受到严重影响乃至发生不同的生理、生化及形态上的变化。因此, 对用除草剂处理的亚麻植株进行激素精确提取测定是相当必要的, 不仅有助于了解除草剂对亚麻作用机理。而且, 能为亚麻高效合理使用除草剂提高产品质量提供科学理论依据。

IAA、GA₃ 在植物体内的含量很低, 同时, 由于植物体内的组成复杂, 相互共存的干扰组分多, 对温

度等条件敏感, 因而对植物激素的测定非常困难, 定量分析的精度也较低。随着分析测试仪器的快速发展, 分析痕量的有机物质已经不再是难题, 关键是寻找一种快速、灵敏度高, 成本低的方法, 以期能在短时间内处理大批量的田间试验样品, 为农业生产和课题研究提供指导。

植物激素的 HPLC 测定已有报道, 但因生物体内激素的复杂性、特殊性和有效成分的分离提取是极为关键的一步, 而且是直接影响其精密度、回收率的重要因素, 本文研究的方法快速、简便, 可操作性很强。

1 材料和方法

* 收稿日期: 2001—05—28

作者简介: 雷蕾(1968—), 女, 哈尔滨市人, 工程师, 现从事化学分析工作。

1. 1 试验材料

材料采自黑龙江省农科院经济作物研究所试验地用 2, 4—D 丁酯、广灭灵、豆磺隆、都尔、清水处理的黑亚 11 亚麻幼苗植株。

1. 2 仪器设备

LC—10A_{VP}高效液相色谱仪, ODS 柱(250×4. 6 mm), SPD—10A_{VP}紫外检测器, C—R6A 数据处理机(岛津公司产品)。流动相: 甲醇: 乙腈: 水= 20 :20 :60, 用磷酸调至 pH 值 3. 5, 检测器: 波长 254 nm, AUFS 0. 1, 柱箱温度: 20 ℃, 以标样出峰时间定性, 外标法峰高定量。

1. 3 试剂及标准溶液的配制

IAA、GA3 试剂(上海伯奥生物科技有限公司), 标准溶液的配制: 称取一定量标样, 以流动相作溶剂溶解, 根据进单峰高的情况, 确定各混标的浓度, 本试验标准溶液浓度为标准液浓度 GA3: 52. 9 μg/mL、IAA: 9. 36 μg/mL, 所有样品需低温避光保存。

水为超纯水, 流动相和所有样品在使用前均经过 0. 45 μm 的滤膜过滤。

1. 4 样品处理

首先精密称取 510 g 样品, 放入冰浴的研钵中剪细并加 80%的冷甲醇 50 mL 研细, 转至 150 mL 锥形瓶中, 加塞后放在超声波内超声 4 ℃以下振荡 1 h 后过滤, 滤渣中再加 80%冰甲醇 30 mL, 放置冰箱过夜后再过滤, 合并滤液定容(如果样品不能及时测定, 此前的几步均可以暂停, 在冰甲醇中, 放在冰箱中冷藏数天)再取 10 mL 滤液(或全部), 通过 C₁₈ 富集柱(100 mg/2 mL), 用 4 mL 乙腈(或稍多的洗脱液)淋洗液洗出, 过 0. 45 μm 滤膜后待上机分析, 进样量为 20 mL。

2 结果与讨论

2. 1 IAA 和 DA3 测定结果(见表)

2. 2 液谱分析条件的讨论

2. 2. 1 为了研究流动相中甲醇含量对各组分保留

时间的影响, 我们试验了含不同比例甲醇流动相的分离结果, 随流动相中甲醇含量的增加, 即流动相强度增加, 则各组分保留时间皆缩短, 但重叠现象也加剧, 因 IAA、GA3 出峰时间很近, 试验确定最佳流动相配比为: 甲醇: 乙腈: 水= 20 :20 :60。

2. 2. 2 试验不同流速对分离效果的影响随着流速的增加, 扩散加剧, 各组分保留时间缩短, 重叠程度增加。经试验确定最佳流速选择为: 0. 7 mL/min。

表 生长素和赤霉素测定结果 mg/kg

项目	生长素	赤霉素
清水处理 CK	10. 461	65. 12
广灭灵	11. 25	36. 16
豆磺隆	11. 61	30. 90
2, 4—D 丁酯	17. 27	37. 37
都尔	23. 99	64. 58

2. 2. 3 在用 H₃PO₄ 调其 pH 值的过程中发现, 虽然这两种组分中都含有酸性基团, 但酸度在 pH 值 3. 33. 8 之间变化对各组分的保留时间基本没影响, 只是峰形有所改善, 减少了拖尾程度。其原因可能是在此范围内流动相酸度的变化对各组分的离解平衡未产生多大的影响, 抑制了其它杂质离子与组分之间竞争、平衡及一些不可逆化学吸附, 从而使峰的形状得到了改善。经试验验证选择 pH 值 3. 5 为最佳酸度。

2. 2. 4 回收率试验表明此测定过程, 尤其因采用了富集小柱的方法, 前处理过程损失很少, 回收率为 95%以上。

3 结论

反相高效液相色谱法, 选择 ODS 柱分离, 流动相比比例甲醇: 乙腈: 水= 20 :20 :60, 0. 7 mL/min 流速和 pH3. 5 酸度, 能够取得快速分离和定量测定效果。

参考文献:

[1] 吴桐. 生物化学[M] . 北京: 人民教育出版社, 1987.

欢迎订阅 2002 年度各种农业科技期刊

刊名	刊期	邮发代号	期定价(元)	订阅办法	地址	邮编
科技富友	双月	52—151	3. 800	全国各地邮局	广东省珠海市吉大 838 信箱	519015
北方瓜菜报	旬刊	15—28	36. 00(年)	全国各地邮局	江苏省丰县中阳大道	221700
果农信息专刊				(专刊自办发行)		