



孟宪明,田梦飞,冯昌寅,等. HPLC 法同时测定核桃楸枝皮中四种植物激素[J]. 黑龙江农业科学,2021(4):104-107.

HPLC 法同时测定核桃楸枝皮中四种植物激素

孟宪明,田梦飞,冯昌寅,牟璠松,罗 猛,李春英

(东北林业大学 化学化工与资源利用学院/森林植物生态学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为建立同时测定核桃楸枝皮中 4 种内源激素 3-吲哚乙酸(IAA)、3-吲哚丁酸(IBA)、萆乙酸(NAA)和脱落酸(ABA)含量的高效液相色谱法方法,本文对供试样品制备方法和高效液相色谱条件进行了优化,并对其进行了验证。结果表明:最优的测定样品制备方法是超声提取法;色谱条件为 HIQ Sil C₁₈ W 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);以 0.06% 甲酸水为流动相 A,甲醇为流动相 B,进行梯度洗脱;检测波长为 280 nm;流速为 1.0 mL·min⁻¹;柱温为 25 ℃;进样量 20 μL。方法学验证结果表明,利用高效液相色谱法同时测定核桃楸枝皮中 IAA、IBA、NAA 和 ABA 四种内源激素的方法是可行的。测得核桃楸枝皮中 IAA、IBA、NAA 和 ABA 的含量分别为 39.87,32.50,34.60 和 65.23 ng·g⁻¹。该方法操作快捷、重现性好、灵敏度高,适用于核桃楸枝皮中激素含量分析。

关键词:核桃楸;高效液相;内源激素

核桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim.)为胡桃科(Juglandaceae)胡桃属(*Juglans*)植物,属于落叶乔木,别称楸子、山核桃和胡桃楸。胡桃楸不仅是珍贵用木材,而且还有一定的药用价值^[1-2],它的果、叶、皮多可入药^[3]。醌类、黄酮类、萜类、多酚类是其常见的药用成分^[4],现代医学研究表明其具有丰富的生物活性,不仅可降糖,还具有定喘止咳、解毒清热、润肠补肾等功效^[5]。

植物内源激素即植物激素,又被称作植物天然激素,是指植物体内产生的一些微量而能调节(促进、抑制)自身生理过程的有机化合物^[6]。目前,激素测定手段多种多样,涉及生物鉴定、化学鉴定和化学鉴定细胞等。其中最常用且最方便易行的激素测定方法是 HPLC 法^[7]。

核桃楸生长发育的各个阶段受多种激素的调节。张建瑛等^[8]发现适当的激素组合可以促进核桃楸苗木茎秆粗壮、提升木质化程度。葛文志等^[9]研究显示,对胡桃楸的插穗进行混合激素处理能大幅提高其生根率,同时有效改善其根系质量。

高效液相色谱具有效率高、应用范围广和灵敏度高优点。现在已经在定性定量分析领域被广泛应用。肖爱华等^[10]同时测定红花玉兰中 4 种植物激素(GA₃、IAA、ABA 和 ZT);周荧等^[11]利用高效液相色谱法测定蓝莓叶片中 3 种内源激素(IAA、ABA 和 GA₃)。但到目前为止,尚未见对核桃楸中 IAA、IBA、NAA 和 ABA 同时测定的报道。

本研究优化了高效液相色谱条件,以梯度洗脱的方法,对样品中的 IAA、IBA、NAA 和 ABA 进行了定性定量分析,以期对核桃楸内源激素的代谢调控研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

核桃楸枝皮采自东北林业大学帽儿山实验林场太河村林场,置于 40 ℃恒温干燥箱中干燥至恒重,粉碎后过 60 目筛备用。IAA、IBA、NAA 和 ABA 对照品购自上海晶纯生化科技股份有限公司;甲醇、甲酸为色谱纯试剂,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。仪器主要有高效液相色谱仪(Agilent 1260 Infinity,美国 Agilent Technologies, Inc.);电子分析天平(北京赛多利斯天平);高速多功能粉碎机(CS-2000,武义海纳电器有限公司);超声波清洗器(JP-040S,深圳市洁盟清洗设备有限公司)。

收稿日期:2020-12-12

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0600605-02)。

第一作者:孟宪明(1995-),男,在读硕士,从事植物资源学研究。E-mail:klp18ls@nefu.edu.cn。

通信作者:李春英(1976-),女,博士,副教授,从事植物资源学研究。E-mail:lcy@nefu.edu.cn。

1.2 方法

1.2.1 四种内源激素的测定方法 色谱柱: HIQ Sil C₁₈ W 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 以 0.06% 甲酸水为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 梯度洗脱条件: 0 ~ 15 min, 51.3% A; 15 ~ 22 min, 51.3% ~ 49.3% A; 22 ~ 26 min, 49.3% ~ 49.2% A; 26 ~ 30 min, 49.2% ~ 44.2% A; 30 ~ 34 min, 44.2% ~ 43.4% A; 34 ~ 36 min, 43.4% ~ 45.0% A; 36 ~ 40 min, 45.0% ~ 70% A; 检测波长: 280 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。

1.2.2 溶液制备 对照品溶液的配制: 分别精确称取 0.001 0 g IAA、IBA、NAA 和 ABA 对照品, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解定容至刻度线, 配制成 10 μg · mL⁻¹ 的母液, 低温避光保存。

供试溶液制备: 核桃楸枝皮分别采用下面 3 种方法处理, 以制备用于高效液相色谱法分析的溶液。

浸渍提取法: 精确称取粉碎后的核桃楸枝皮粉末 2.0 g 置于三角瓶中, 并加入浓度为 60% 的甲醇溶液以固液比 1:20 均匀混合。将三角瓶置于室温下静置 12 h 后过滤, 滤液定容至 25 mL, 取上清液 1 mL 离心, 离心后用 0.45 μm 有机滤膜过滤, 待用。

热回流提取法: 精确称取粉碎后的核桃楸枝皮粉末 2.0 g 置于三角瓶中, 并加入浓度为 60% 的甲醇溶液以固液比 1:20 均匀混合。在 40 °C 条件下热回流 6 h, 冷却后过滤, 滤液定容至 25 mL, 取上清液 1 mL 离心, 离心后用 0.45 μm 有机滤膜过滤, 待用。

超声提取法: 精确称取粉碎后的核桃楸枝皮粉末 2.0 g 置于三角瓶中, 并加入浓度为 60% 的甲醇溶液以固液比 1:20 均匀混合。超声处理 40 min 后过滤, 滤液定容至 25 mL, 取上清液 1.0 mL 离心, 离心后用 0.45 μm 有机滤膜过滤, 待用。

1.2.3 方法学验证 标准曲线的制备: 精密量取 1.2.2 对照品溶液适量, 梯度稀释成 6 种不同浓度的对照品溶液。按照 1.2.1 的色谱条件对 IAA、IBA、NAA 和 ABA 进行测定, 分别记录各自峰面积, 以对照品溶液浓度 X 为横坐标, 以峰

面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 求得各自的回归方程及相关系数 R²。

精密度试验: 精密量取 IAA、IBA、NAA 和 ABA 对照品溶液, 按照 1.2.1 中的色谱条件重复测定 6 次。计算 6 次进样峰面积的 RSD 值, 考察仪器的精密程度。

重复性试验: 按照 1.2.2 中的超声提取法制备供试品溶液, 并按照 1.2.1 中的色谱条件重复测定 6 次。计算 6 次进样峰面积的 RSD 值, 考察方法精密程度。

稳定性试验: 精密量取供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 和 24 h 按 1.2.1 中的方法进行测定。记录不同时间点进样峰面积, 计算 RSD 值, 考察供试品溶液的稳定性。

检出限与定量限: 将按 1.2.2 中的方法配制对照品溶液, 逐步稀释, 按 S/N=10 计算定量限, 按 S/N=3 计算检测限。

回收率试验: 精确称取粉碎后的 2.0 g 核桃楸枝皮粉末若干份, 分别加入 1.2.2 中的 4 种对照品溶液 1.0, 1.5 和 2.0 mL, 3 次重复。然后按照 1.2.2 中的超声提取法制备供试品溶液, 并分析各提取液中 IAA、IBA、NAA 和 ABA 含量, 进而计算出 4 种激素的加样回收率。

1.2.4 数据分析 试验数据由 Origin 2020 软件作图, 由 Excel 2013 软件辅助做表。

2 结果与分析

2.1 受试溶液制备方法考察

由图 1 可知, 超声提取法对 IAA、IBA、NAA 和 ABA 的提取率分别为 39.87, 32.50, 34.60 和 65.23 ng · g⁻¹, 对 4 种激素提取率均大于浸渍提取法和热回流提取法。此外, 超声提取法所用提取时间要小于热回流提取法和浸渍提取法, 所以选择超声提取法作为受试溶液的制备方法。

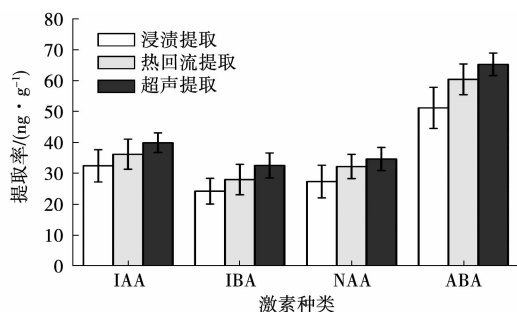


图 1 不同提取方法对四种激素提取率的影响

2.2 四种激素的定性分析

由图 2 激素 IAA、IBA、NAA 和 ABA 对照品混合溶液与超声提取法制备的核桃楸枝皮提取液样品色谱图可知,在给定色谱条件下,4 种激素均

可达到基线分离,各激素的保留时间依次为:IAA 22. 23 min, ABA 29. 17 min, IBA 36. 50 min, NAA 41. 74 min。因此,可以用各激素对应色谱峰的保留时间进行定性。

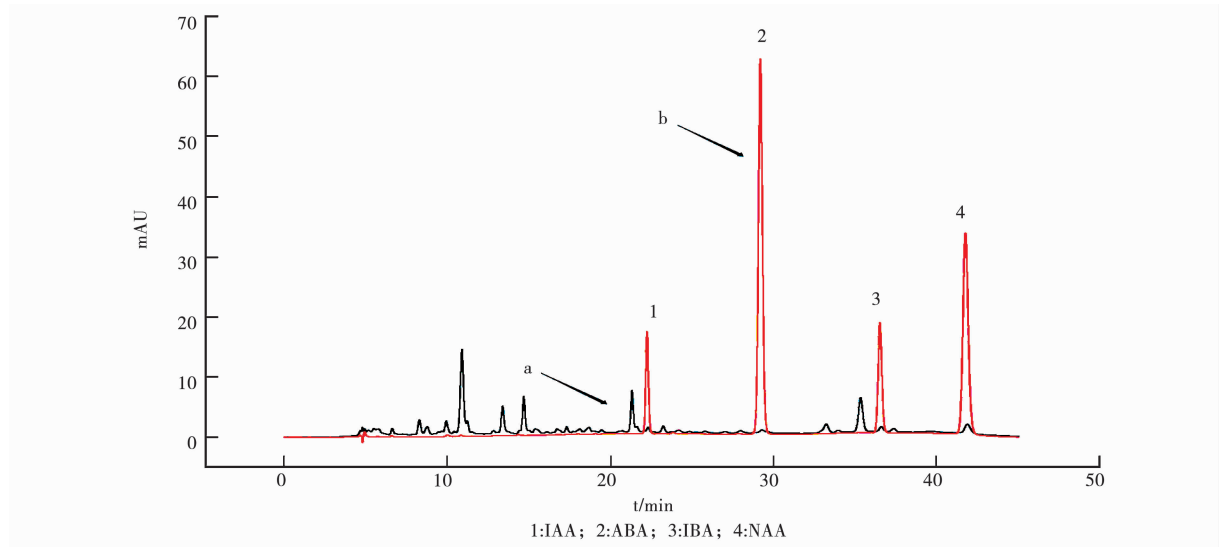


图 2 供试品(a)和对照品(b)色谱图

2.3 线性范围

由表 1 可知,4 种激素 IAA、IBA、NAA 和 ABA 在各自浓度范围内,均与其对应峰面积呈良好线性关系,相关系数(R²)均大于 0. 999 0,能够满足测试工作需要。

表 1 四种激素标准曲线

测定成分	标准曲线	范围/ (ng·mL ⁻¹)	相关系数
IAA	Y=27. 422X-6. 037 8	0. 782~25. 000	0. 9999
IBA	Y=24. 118X+0. 006 5	0. 782~25. 000	0. 9994
NAA	Y=30. 461X-4. 073 1	0. 782~25. 000	0. 9997
ABA	Y=48. 969X-44. 467	1. 563~50. 000	0. 9991

2.4 精密度试验

如表 2 所示,IAA、IBA、NAA 和 ABA 的 RSD 分别为 0. 62%、0. 71%、0. 66%和 0. 75%,说明此方法能够满足精密度要求。

表 2 各测定成分精密度实验结果(n=6)

测定成分	平均峰面积	RSD/%
IAA	77. 4	0. 62
IBA	71. 8	0. 71
NAA	87. 2	0. 66
ABA	122. 4	0. 75

2.5 重复性和稳定性试验

如表 3 所示,重复性试验中 IAA、IBA、NAA 和 ABA 峰面积的 RSD 分别为 0. 32%、0. 30%、0. 38%和 0. 42%,表明供试溶液的制备和分析方法重现性良好;稳定性试验中 IAA、IBA、NAA 和 ABA 峰面积的 RSD 分别为 0. 27%、0. 31%、0. 36%和 0. 43%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

表 3 各测定成分重复性和稳定性实验结果(n=6)

测定成分	重复性		稳定性	
	平均峰面积	RSD/%	平均峰面积	RSD/%
IAA	223. 5	0. 32	204. 7	0. 27
IBA	243. 7	0. 30	299. 0	0. 31
NAA	714. 3	0. 38	782. 7	0. 36
ABA	974. 6	0. 42	1107. 6	0. 43

2.6 检出限和定量限

经测定和计算,IAA、IBA、NAA 和 ABA 的检出限(S/N=3)分别为 1. 21, 0. 96, 1. 49 和 2. 03 ng·mL⁻¹;定量限(S/N=10)分别为 3. 67, 2. 92, 4. 50 和 6. 16 ng·mL⁻¹,表明此分析方法具有较好的灵敏度。

2.7 加样回收试验

对 4 种不同浓度的对照品溶液中激素回收率进行测算, IAA、IBA、NAA 和 ABA 的平均回收率分别为 96.58%、97.19%、96.46% 和 96.30%, RSD 分别为 1.21%、1.17%、1.25% 和 1.31%, 说明本分析方法的测定结果准确可靠。

3 结论

内源激素对核桃楸的生长发育等生命活动起到直接或间接的调节、调控作用, 本文建立的高效液相色谱法同时测定核桃楸枝皮中 IAA、IBA、NAA 和 ABA 的方法, 分析时间不超过 50 min, 且 4 种激素出峰时间稳定, 分离良好; 方法学验证表明, 该方法简便、灵敏度高、准确性和重现性好, 可有效用于核桃楸枝皮中 4 种内源激素的同时分析测定。

参考文献:

[1] 邹品文, 赵春景, 尹小燕. 核桃楸树皮提取物的抗肿瘤作用[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(4): 308-310.
[2] 张丽敏, 刘欢, 张超群, 等. 胡桃楸叶片 POD 同工酶表达特点的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2013(9): 14-16.

[3] 沈广志, 邹桂华, 梁婷, 等. 核桃楸的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 219-224.
[4] 曹治家, 蔡小燕, 方薇, 等. 核桃楸皮化学成分的鉴定及其抗肝癌活性成分筛选[J]. 山东医药, 2014, 54(29): 1-3.
[5] 常乐, 孟楠, 雷涛, 等. 核桃楸皮药理作用的研究概述[J]. 中国医药导报, 2013, 10(1): 23-24.
[6] 刘思洁, 方赤光, 崔勇, 等. 植物生长调节剂在植物源性食品中残留量检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 8-13.
[7] Celia S P, Mercader J V, Agulló C, et al. Hapten synthesis and polyclonal antibody-based immunoassay development for the analysis of forchlorfenuron in kiwifruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (15): 8502-8511.
[8] 张建瑛, 祁永会, 吕跃东, 等. 核桃楸腋芽再生体系研究[J]. 植物研究, 2015, 35(1): 22-26.
[9] 葛文志, 刘建明, 李业娟, 等. 胡桃楸嫩枝扦插技术及营养物质含量变化研究[J]. 森林工程, 2016, 32(5): 13-15.
[10] 肖爱华, 陈发菊, 贾忠奎, 等. 梯度洗脱高效液相色谱法测定红花玉兰中 4 种植物激素[J]. 分析试验室, 2020, 39(3): 249-254.
[11] 周炎, 武玉祥, 李永霞, 等. 高效液相色谱测定蓝莓叶片内源激素的方法研究[J]. 中国果树, 2018(3): 88-91, 94.

Simultaneous Determination of Four Phytohormones in the Bark of *Juglans mandshurica* by HPLC

MENG Xian-ming, TIAN Meng-fei, FENG Chang-yin, MU Fan-song, LUO Meng, LI Chun-ying

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In order to establish an HPLC method for the simultaneous determination of four endogenous hormones in the bark of *Juglans mandshurica*, including 3-indoleacetic acid (IAA), 3-indolebutyric acid (IBA), naphthylacetic acid (NAA) and abscisic acid (ABA), the sample preparation method and HPLC conditions were optimized. The results showed that the optimal sample preparation method was ultrasonic extraction; chromatographic conditions: HiQ SIL C₁₈W column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase: 0.06% formic acid water as mobile phase A, methanol as mobile phase B, gradient elution; detection wavelength: 280 nm; flow rate: 1.0 mL·min⁻¹; column temperature: 25 °C; injection volume: 20 μL. The results showed that the method was feasible for the simultaneous determination of IAA, IBA, NAA and ABA in the bark of *Juglans mandshurica*. The contents of IAA, IBA, NAA and ABA were 39.87, 32.50, 34.60 and 65.23 ng·g⁻¹, respectively. The method is rapid, reproducible and sensitive, which is suitable for the analysis of hormone content in bark of *Juglans mandshurica*.

Keywords: *Juglans mandshurica*; high performance liquid chromatography; endogenous hormones