

## 高效液相色谱法测定毛竹种子萌发过程中 GA<sub>3</sub> 含量的变化

梁晓静<sup>1,2</sup>, 高 健<sup>1\*</sup>, 徐有明<sup>2</sup>

(1. 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

**摘 要:** 通过优化预处理和检测方法, 采用 Waters C<sub>18</sub> 反相色谱柱, 以磷酸缓冲盐和乙腈为流动相, 外标法测定 GA<sub>3</sub> 的回收率为 78.42%, 变异系数 ± 3.9, 保留时间稳定, 首次建立了毛竹种子中植物内源激素 GA<sub>3</sub> 含量的测定方法。运用此法测定毛竹种子萌发过程中 GA<sub>3</sub> 含量的变化, 结果表明, 从浸种到出苗时 GA<sub>3</sub> 的含量在 2.56~14.75 μg·g<sup>-1</sup>, 吸胀阶段含量变化不明显, 而浸种 36 h 后含量大幅升高, 在 72 h 和即将萌出胚根时达到峰值, 随着毛竹种子的萌发进程, GA<sub>3</sub> 含量呈总体上升趋势。

**关键词:** 高效液相色谱; 毛竹种子; 萌发; GA<sub>3</sub>

中图分类号: S795

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)04-0496-04

### Determination of GA<sub>3</sub> content in moso bamboo seed during germination by HPLC

LIANG Xiao-jing<sup>1,2</sup>, GAO Jian<sup>1</sup>, XU You-ming<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Science and Technology, International Centre for Bamboo and Rattan, Beijing 100102;

2. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** The measurement of endogenous GA<sub>3</sub> contents in moso bamboo seed was set up for the first time by optimizing pretreatment and determination method, which was carried out with external standard method on a reverse phase Waters C<sub>18</sub> column using phosphoric acid buffer and acetonitrile as mobile phase. The results showed that recovery rate was 78.42%, the RSD was ± 0.039, and retention time was stable. Changes within the germination of the moso bamboo seed in the content of gibberellins were studied during sprouting. GA<sub>3</sub> level increased from 2.56 μg·g<sup>-1</sup> to 14.75 μg·g<sup>-1</sup> during sprouting process. GA<sub>3</sub> levels were low at the beginning of the soaking, and then increased greatly after 36 h after soaking to the highest peak at 72 h until radicle appeared. The levels of GA<sub>3</sub> were higher in radicle than that in embryo.

**Key words:** HPLC (high performance liquid chromatography); moso bamboo seed; germination; GA<sub>3</sub>

赤霉素最早从水稻恶苗病菌的发酵滤液中分离出来, 发现这种物质能够促进水稻的徒长, 被命名为赤霉素(gibberellin, 简称 GA)<sup>[1]</sup>。赤霉素大多存在于高等植物中, 影响着高等植物生活史的各个阶段, 如种子的发芽、茎秆的伸长、叶片的延展、表皮毛状体的发育、开花时间及花与果实的成熟等<sup>[2]</sup>。目前所知, 赤霉素是一大类植物激素, 其中 GA<sub>3</sub> 最为普遍和重要。

植物内源赤霉素的测定方法主要有免疫分析法、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)和色谱-质谱联用法等。免疫分析法有放射免疫法

(RIA)和酶联免疫法(ELISA), 放射免疫法(RIA)具有较高的灵敏度, 可以检测出 nmol 或 pmol 的微量物质<sup>[3-4]</sup>, 但需要放射性同位素, 由于放射性同位素的不稳定性及对操作者身体的损伤, RIA 法现在已较少使用。酶联免疫法(ELISA)是用某些酶对免疫原进行标记, 避免了使用放射性物质, 但测定结果重复性差, 这些局限导致其在植物激素的定性定量研究中未能得到广泛的应用。GC 法较 HPLC 法灵敏度高, 但在测定除乙烯以外的激素需要经过衍生化处理生成易挥发的衍生物才能进行分析, 衍生化过程繁琐, 而 HPLC 法与之相比, 大大简化了

收稿日期: 2011-03-18

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD19B0203)资助。

作者简介: 梁晓静, 女, 硕士。E-mail: Xj-xj-xj@163.com

\* 通讯作者: 高 健, 女, 研究员, 博士生导师。E-mail: gaojian@icbr.ac.cn

样品的前处理过程。色谱-质谱联用法是测定植物内源激素最准确可靠的方法,但其样品净化过程复杂,设备昂贵,使用和维护成本相对较高。

高效液相色谱法(HPLC)已在很多植物激素的分析中得到应用,90年代末朱智甲等<sup>[5]</sup>利用高效液相色谱测定了小麦幼苗中 GA<sub>3</sub> 的含量,得到小麦幼苗中 GA<sub>3</sub> 的含量为 8.14 μg·g<sup>-1</sup> 和 12.28 μg·g<sup>-1</sup>。2002年,王若仲等<sup>[6]</sup>建立了 PVPP 柱、DEAE 柱、Sep-pak 柱联用的快速净化提取植物内源激素的方法,并测定了杂交稻的 4 种内源激素,其中 GA<sub>3</sub> 得到很好的分离。郑郁善等<sup>[7]</sup>应用高效液相色谱仪对毛竹笋期的竹叶、竹秆、竹鞭和当年正常生长的竹笋中 GA<sub>3</sub> 的含量及其分布规律进行了研究,杨彤宇等<sup>[8]</sup>对利用高效液相色谱法测定毛竹竹笋中 GA<sub>3</sub> 的可靠性进行了研究,但该提取流程用于毛竹种子 GA<sub>3</sub> 的提取分离效果不佳。本研究在前人方法的基础上,对样品提取方法、吸收波长、流动相选择等环节进行改良,旨在更准确的测定出毛竹种子萌发过程中的 GA<sub>3</sub> 含量。近来,已有竹类育种工作者开展利用外源 GA<sub>3</sub> 提高毛竹种子活力的研究,适当浓度外源 GA<sub>3</sub> 处理毛竹种子可以促进种子萌发,提高种子活力。但还没有关于毛竹种子萌发过程中内源 GA<sub>3</sub> 含量变化及变化机理的报道。本试验利用高效液相色谱法就毛竹种子萌发过程中 GA<sub>3</sub> 含量的动态变化进行研究,旨在为阐明 GA<sub>3</sub> 在毛竹种子萌发过程中的作用和毛竹实生苗培育过程中外源激素的应用提供理论依据,也为进一步开展毛竹种子萌发过程中 GA<sub>3</sub> 代谢与调控研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试种子采自广西桂林,采后通风干燥,含水量约为 11%,剥壳后于 4℃ 冰箱中用塑料袋封存。参照蔡春菊和李伟成等<sup>[9-10]</sup>的方法进行浸种处理。

取样:种子浸种 12 h 后开始取样,装入锡纸袋,放入液氮中速冻后于 -80℃ 冰箱冷冻保存,以后每隔 12 h 取 1 次样,直至露白,待胚根、胚芽长度与种子等长取胚根、胚芽样品,以干种子作为对照。

### 1.2 仪器和试剂

Waters2695 高效液相色谱仪, Waters2996 二极管阵列检测器, KQ5200E 型超声波清洗器,赤霉素(GA<sub>3</sub>) 标样为美国 Sigma 产品,纯度 ≥98.5%,乙腈(CH<sub>3</sub>CN)、甲醇(CH<sub>3</sub>OH)为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 标准品的配制

准确称取 GA<sub>3</sub> 标准品 0.01 g,用乙腈定容到 100 mL 棕色容量瓶中,作为母液(100 mg·L<sup>-1</sup>),然后再分别稀释为 20、10、5、2 和 1 mg·L<sup>-1</sup> 浓度。

### 1.4 样品的制备

参照张政等<sup>[11-13]</sup>的提取、分离和纯化方法,按如下方法制备样品:准确称冻干样品,用德国制造的 Retsch 混合球磨仪 MM301 将样品磨成粉末,加入预冷的乙腈,超声波震荡 30 min,放置 4℃ 冰箱过夜,浸提液以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,分离上清液,残渣中分别再加入 8 mL 和 4 mL 的乙腈,超声波震荡 0.5 h 重复浸提 2 次,合并 3 次所得的上清液,全部滤液在 35℃ 浓缩蒸干,分 3 次用 pH8 的磷酸缓冲液冲洗蒸馏瓶,然后加入等体积石油醚萃取脱色 3 次,弃去酯相后,滤液用 2 mol·L<sup>-1</sup> 的柠檬酸调 pH 至 2.5~2.8,再用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并乙酸乙酯相,于 35℃ 减压浓缩至干,然后加 pH3 的磷酸缓冲液复溶,过 Sep-pak C<sub>18</sub> 预处理小柱,小柱使用前先用 5 mL 甲醇活化,再用 5 mL 超纯水平衡柱子,样品过柱后用 5 mL 超纯水清洗,最后用 2 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液,溶液经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

### 1.5 色谱条件

Waters C<sub>18</sub> 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:35℃;流动相:乙腈(CH<sub>3</sub>CN):水(4:6 V/V);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:20 μL;检测波长:210 nm;采用外标法定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 流动相的确定

测定赤霉素的流动相因为色谱柱的不同而有很大的差别,常用的流动相有甲醇-水<sup>[14]</sup>,乙腈-水<sup>[15]</sup>,甲醇-乙腈-水<sup>[16]</sup>,水中常含有少量的酸,可以抑制样品的电离,改善拖尾现象。经过多次实验比较,采用流动相为乙腈(CH<sub>3</sub>CN):水(4:6 V/V),其中水中含有 0.1% 的磷酸,出峰效果最好,可以分离 GA<sub>3</sub>。

### 2.2 波长的选择

GA<sub>3</sub> 在远紫外区域(200 nm 附近)接近其最大吸收波长,一些研究为了避免与溶剂峰重叠,将 GA<sub>3</sub> 的检测波长设定为 254 nm<sup>[17-18]</sup>。但此波长下,GA<sub>3</sub> 的吸收降低造成 GA<sub>3</sub> 的检测灵敏度下降<sup>[19]</sup>。本试验中,GA<sub>3</sub> 在 254 nm 下的吸收峰很小,而在 210 nm 下的吸收峰达到最大,并且没有溶剂峰出现。所以选择 210 nm 为 GA<sub>3</sub> 的检测波长,如图 1 所示。

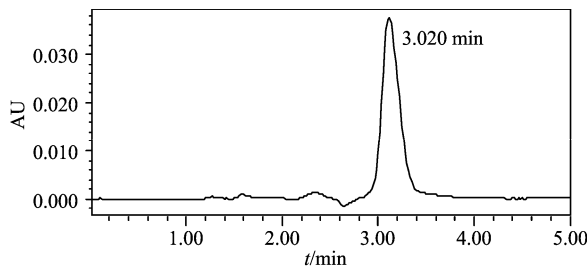


图 1  $GA_3$  标准品色谱图  
Figure 1 Chromatogram of standard  $GA_3$

### 2.3 标准曲线绘制

外标法进行峰面积定量,以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数,如图 2 所示。

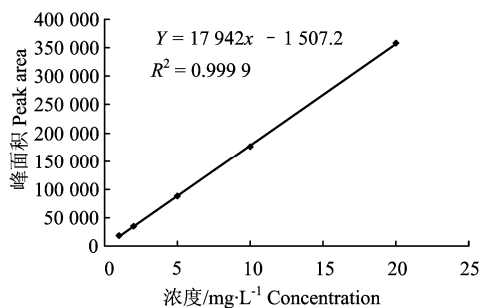


图 2  $GA_3$  的标准曲线  
Figure 2 Standard curve of content of  $GA_3$

$GA_3$  的标准曲线线性方程为  $y=17942x-1507.2$ ,  $R^2=0.9999$ , 线性关系良好,符合分析要求。

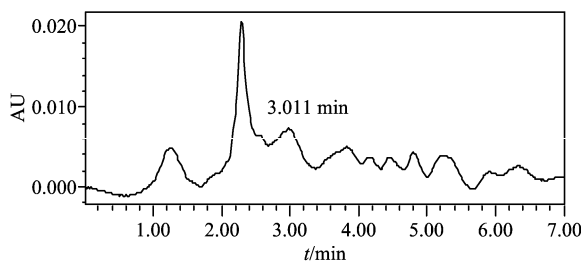


图 3 毛竹种子样品内源  $GA_3$  色谱图  
Figure 3 Chromatogram of endogenous  $GA_3$  in seed of moso bamboo

### 2.4 回收率的计算

采用添加标样法测定回收率,用添加标样的激素峰面积减去未加标样的样品的相应峰面积,所得的差值与相应激素标样的峰面积之比(百分比)为回收率。将干种子样品分为 2 份,其中一份加入已知量的  $GA_3$  标样,另一份不加标样计算本底值, $GA_3$

的回收率为 78.42%, 变异系数 $\pm 3.9$ 。

### 2.5 内源 $GA_3$ 的定性分析

按保留时间确定  $GA_3$  采用上述方法对毛竹种子内源  $GA_3$  进行测定,样品内源  $GA_3$  色谱峰图如图 3。

### 2.6 内源 $GA_3$ 的定量分析

根据测得  $GA_3$  峰面积值和上述回归方程计算得到  $GA_3$  的浓度,得到  $GA_3$  的质量比上所称取种子的质量即得到种子中  $GA_3$  的含量。毛竹种子不同萌发阶段  $GA_3$  的含量的变化如图 4 所示。随着萌发过程内源  $GA_3$  的含量整体上表现出升高的趋势,其中,吸胀阶段  $GA_3$  含量变化不明显,干种子与浸泡 12 h 后种子中  $GA_3$  的含量变化保持在  $2.56\sim 2.92\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 萌发 36 h 后,  $GA_3$  开始大幅度升高,并在 72 h 达到第 1 个峰值,为  $14.45\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 是干种子的 5.64 倍。在胚根中达到第 2 个峰值,为  $14.75\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 是干种子的 5.76 倍,胚芽内  $GA_3$  含量比胚根内略有降低。

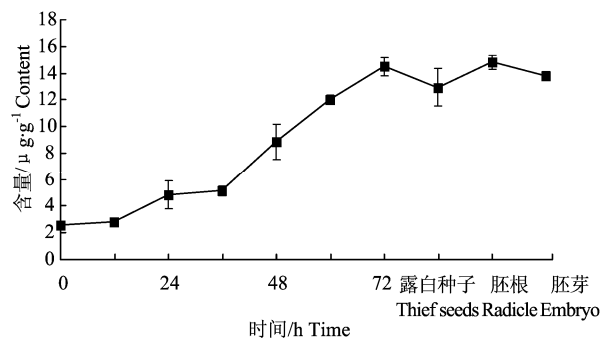


图 4 毛竹种子萌发阶段  $GA_3$  含量变化  
Figure 4  $GA_3$  content during bamboo seed germination

## 3 小结与讨论

建立了毛竹种子内源激素测定的 HPLC 方法,  $GA_3$  的回收率为 78.42%, 变异系数 $\pm 3.9$ , 且保留时间稳定, 重现性好, 符合定量分析要求。

获得了毛竹种子萌发过程中内源  $GA_3$  的变化规律。在毛竹种子萌发过程中, 赤霉素的含量在  $2.56\sim 14.75\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 呈上升趋势。在胚根即将伸出时和浸种 72 h 时  $GA_3$  的含量达到峰值。可能是较高的  $GA_3$  促进胚乳细胞壁降解, 从而有利于胚根伸出<sup>[21]</sup>。

$GA_3$  是一种特殊的植物次生代谢产物, 在植物体内的含量非常低, 且化学性质不稳定, 容易氧化、易受其他组分干扰, 因此有必要建立和优化  $GA_3$  的提取和纯化流程。溶剂提取法是目前最常用的植物激素提取方法<sup>[22]</sup>, 甲醇、乙腈、丙酮及其水溶液和中性、酸性缓冲溶液是常用的提取液, 本试验比较

了甲醇和乙腈提取效果, 结果表明乙腈提取 GA<sub>3</sub> 得到的回收率高于甲醇。在提取的过程中应注意避免光照和高温环境, 本试验在提取剂乙腈中加入 BHT 以保持 GA<sub>3</sub> 在提取过程中的稳定。采用超声波震荡提取可以提高提取效率, 缩短提取时间, 防止可能的分解作用。在纯化 GA<sub>3</sub> 时采用溶剂萃取法和固相萃取法相结合的方法, 虽然不少研究者采用 PVPP 来吸附色素和酚类物质, 起到进一步除杂的效果, 但 PVPP 在除杂的过程中也会带走一部分激素, 本试验发现加入 PVPP, 使提取过程更加繁琐, 提取时间延长, 色谱检测时, GA<sub>3</sub> 的含量较低, 因此本试验中不加 PVPP。为了有效去除对目的物峰型有较大干扰的 GA<sub>3</sub> 类似物、色素、酚类和有机酸等, 采用多次萃取与 Sep-pak C<sub>18</sub> 预处理小柱分离法, 所得回收率稳定在 78% 左右, 效果比使用 PVPP 好。

### 参考文献:

- [1] Wang B S. Plant Physiology[M]. Beijing: Science Press, 2004: 151-156.
- [2] Itoh H, Ueguchi-Tanaka M., Kawaide H, et al. The gene encoding tobacco gibberellin 3-hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower development[J]. Plant J, 1999, 20: 15-24.
- [3] Grayling A, Hake D E. Cytokinins in exudates from leaves and roots of red *Perilla*[J]. Phytochem, 1992, 31: 1863-1868.
- [4] Cook N C, Bellstedt D U, Jacobs G. Endogenous cytokinins distribution patterns at budburst in Granny Smith and Braeburn apple shoots in relation to bud growth[J]. Sci Hort, 2001, 87: 53-63.
- [5] 朱智甲, 郝振芳, 张晓惠, 等. 高效液相色谱紫外检测法测定小麦幼苗中的内源激素[J]. 光谱实验室, 1999, 16(3): 281-283.
- [6] 王若仲, 萧浪涛, 蔺万煌, 等. 亚种间杂交稻内源激素高效液相色谱测定法[J]. 色谱, 2002, 20(2): 148-150.
- [7] 郑郁善, 洪伟, 邱尔发, 等. 毛竹出笋期各器官激素分布特征的研究[J]. 林业科学, 1998, 34(1): 100-104.
- [8] 杨彤, 丁兴萃. 植物组织中赤霉素高效液相色谱测定法可靠性探讨[J]. 竹子研究会刊, 1999(2): 50-53.
- [9] 蔡春菊, 彭镇华, 高健, 等. 毛竹种子萌发特性[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 163-167.
- [10] 李伟成, 盛碧云, 王树东, 等. 毛竹种子萌发对温度和光照的响应[J]. 竹子研究会刊, 2007, 2(4): 26-29.
- [11] 张政, 张强, 王转花, 等. 荞麦幼苗内源激素的高效液相色谱测定法[J]. 色谱, 1994, 20(2): 140-142.
- [12] 唐莉娟, 万益群. 植物激素的分析研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 393-398.
- [13] 闫师杰, 郭李维, 吴彩娥, 等. 高效液相色谱法同时测定鸭梨种子中 3 种内源激素[J]. 分析化学研究简报, 2010, 38(6): 843-847.
- [14] 方能虎, 侯树泉, 邵学广, 等. 植物激素的反相高效液相色谱法分离和测定[J]. 色谱, 1998, 16(5): 417-420.
- [15] 张上隆, 陈昆松, 叶庆富, 等. 柑橘授粉处理和单性结实子房(幼果)内源 IAA, ABA 和 ZT 含量的变化[J]. 园艺学报, 1994, 21(2): 117-123.
- [16] 曹尚银, 张俊昌, 魏立华. 苹果花芽孕育过程中内源激素的变化[J]. 果树科学, 2000, 17(4): 244-248.
- [17] 赵晓菊, 唐中华, 郭晓瑞, 等. 固相萃取富集-高效液相色谱法测定长春花内的 3 种内源激素[J]. 色谱, 2006, 24: 534.
- [18] 陈小鹏, 王秀峰, 孙小镭, 等. 高效液相色谱测定黄瓜条中赤霉素和脱落酸含量[J]. 山东农业科学, 2005(1): 65-67.
- [19] 王洁, 李敏, 张宜辉, 等. HPLC 测定木榄繁殖器官内源 ABA 和 GA<sub>3</sub> 含量[J]. 厦门大学学报, 2008, 47(5): 753-756.
- [20] 谈心, 马欣荣. 赤霉素生物合成途径及相关研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 571-577.
- [21] Nonogaki H, Morohashi Y. An endo-*p*-mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence[J]. Plant Physiol, 1996, 110: 555-559.
- [22] 符继红, 孙晓红, 王吉德, 等. 植物激素定量分析方法研究进展[J]. 科学通报, 2010, 55(33): 3163-3176.