

反相高效液相色谱法测定植物组织培养基中的外源激素

陈永波, 赵清华, 降巧龙, 滕建勋

(恩施州农业科学院魔芋研究所, 湖北 恩施 445000)

摘要:建立了高效液相色谱-光电二极管阵列检测器测定植物组织培养基中 6 种外源激素的分析方法。采用 Waters 公司 μ BondaPak C₁₈ 柱 (3.9 mm $\times$ 300 mm, 10 μ m), 用 140 mmol/L 乙酸钠-三乙胺缓冲液 (pH 4.95) 和乙腈作流动相, 以 75:25 的比例等度洗脱, 柱温 37 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, 在波长 285 nm 下检测。在 9 min 内 6 种激素均达到基线分离, 其进样量在 4 ~ 200 ng 之间具有良好的相关性 ($r^2 > 0.9995$)。培养基中的激素在减压烘干后用甲醇提取, 各种激素的回收率均在 85% 以上。该方法可以用于植物组织培养基中外源激素的分析检测, 或对培养基中未知激素的比例和种类进行分析测定。

关键词:反相高效液相色谱法; 外源激素; 植物组织培养基

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713 (2008) 01-0084-04 栏目类别: 研究论文

Determination of exogenous hormones in plant tissue culture media by reversed-phase high performance liquid chromatography

CHEN Yongbo, ZHAO Qinghua, JIANG Qiaolong, TENG Jianxun

(The Konjak Research Institute of Enshi Autonomic State Academy of
Agricultural Sciences, Enshi 445000, China)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector (PAD) was established for the determination of the content ratio and type of 6 exogenous hormones in plant tissue culture media. The column was a μ BondaPak C₁₈ (3.9 mm $\times$ 300 mm, 10 μ m, Waters), the mobile phase was 140 mmol/L sodium acetate in triethyl amine buffer (pH 4.95)-acetonitrile (75:25, v/v), and the flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 37 $^{\circ}$ C, and the detection wavelength was 285 nm. The six hormones reached the baseline separation in 9 minutes. The linear relationship was very good in the range of 4 – 200 ng ($r^2 > 0.9995$). The exogenous hormones in the medium were extracted by methanol after vacuum dried. The average recoveries of the exogenous hormones were more than 85%. The method can be used for the analysis of exogenous hormones of plant tissue culture media, or of unknown hormone ratio and the type of media.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); exogenous hormone; plant tissue culture media

在植物组织培养中, 外源激素虽然用量极少, 但却是促进愈伤组织形成, 调控根、苗等器官分化和生长的主要因素。在组织培养的不同阶段, 植物组织对激素的含量和比例要求不一致, 甚至差异很大。在传统的组织培养研究过程中, 往往需进行大量的试验甚至复杂的正交试验, 以对某种植物某一阶段所需的激素种类和配比进行优化, 调控培养物的生长和分化, 达到组织培养快繁的目的。为此, 广大从

事组织培养研究的科研人员花费了大量的时间和精力, 针对某种或某科、某属作物研究了一系列激素的配方^[1,2]供后来者参考, 给他们的研究带来了方便。

植物组织培养中常用的激素分为生长素和细胞分裂素, 其中生长素主要有吲哚乙酸 (IAA)、吲哚丁酸 (IBA)、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 和 α -萘乙酸 (NAA); 细胞分裂素主要有 6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 和激动素 (KT)。在植物激素的分析检测方面, 以前

收稿日期: 2007-06-27

通讯联系人: 陈永波, 高级农艺师. Tel: (0718) 8416294, E-mail: yongboc@tom.com.

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金项目 (2006GB2D100196)、国家科技支撑计划项目 (2007BAD73B00) 和湖北省农业科技创新中心创新岗位基金资助项目。

的科研工作者多注重于内源激素(如吲哚乙酸、赤霉素(GA3)、脱落酸(ABA)、乙烯等)分析方法的开发^[3-11],关于植物外源激素的分析方法虽有报道^[12,13],但针对组织培养开发的激素分析方法国内还未见报道。

本文基于高效液相色谱-二极管阵列检测方法,开发出植物组织培养中常用的 6-BA,KT,IAA,IBA,NAA 和 2,4-D 等 6 种外源激素的分析方法。在该方法中,还建立了培养基中外源激素的提取方法,同时对分离条件进行了优化。

1 实验部分

1.1 仪器与药品

美国 Waters 2695 高效液相色谱仪,配 Waters 2695 分离单元和 2996 二极管阵列检测器;Milli-Q 超纯水器(美国 Milli-Q 公司);KQ-50B 超声波清洗器;真空干燥箱。

IAA,IBA,2,4-D,NAA,6-BA 和 KT 等均为分析纯或生化试剂,纯度大于 98%;乙腈和甲醇均为色谱纯(天津福晨化学试剂厂),乙酸钠-三乙胺缓冲液(Waters 公司提供,使用时用 10 倍的超纯水稀释,超声波脱气 1 min)。

1.2 色谱条件

流动相 A: 140 mmol/L 乙酸钠-三乙胺缓冲液(pH 4.95);流动相 B: 100% 乙腈;流速 1.0 mL/min。柱温 37 ℃。色谱柱(1): μ BondaPak C₁₈ 柱(3.9 mm $\times$ 300 mm, 10 μ m),等度洗脱: V(A): V(B) = 75: 25;运行时间: 9 min。色谱柱(2): Nova-Pak C₁₈ 柱(3.9 mm $\times$ 300 mm, 4 μ m),梯度洗脱程序: 0 ~ 4 min, 86%A; 4.1 ~ 9 min, 80%A; 9 ~ 15 min, 86%A;运行时间: 15 min。

1.3 样品前处理

1.3.1 标准样品的制备

分别吸取 1 mg/mL 的 6-BA,KT,IAA,IBA,NAA 和 2,4-D 激素溶液各 1 mL 于 25 mL 容量瓶中,加超纯水定容,溶液中各激素均为 40 μ g/mL(用于制作标准曲线)。再稀释 10 倍制成各激素均为 4 μ g/mL 的标准溶液(用于测定检测限)。

1.3.2 培养基的制备

植物组织培养基常用的是 MS 培养基,一般含有糖 30%、琼脂 0.5% ~ 0.8%、无机盐 0.4% ~ 0.5%、有机物(肌醇、甘氨酸、维生素 C、聚乙烯吡咯烷酮、维生素 B1、维生素 B6、维生素 B12 等)2% ~ 3%。根据培养的植物种类和外植体不同,添加的外源激素的种类和用量会有较大的差异,一般为 1 ~ 3 种,其质量浓度在 0.05 ~ 5 mg/L 之间。为了开发通用的

检测方法,该培养基中添加的上述 6 种激素的质量浓度均为 1 μ g/mL,熬制后分装 25 瓶(每瓶 40 mL),高温灭菌后备用。

1.3.3 培养基中激素的提取

取培养基 50 g 于 500 mL 烧杯中,于真空干燥箱中 80 ~ 100 ℃ 条件下减压烘干,取出,加甲醇 20 mL 超声萃取 10 min。将提取液过滤于小烧杯中,残渣再用 10 mL 萃取剂提取 2 次,合并滤液,在水浴上蒸发至近干,加水定容至 25 mL。将该溶液用 0.45 μ m 滤膜过滤,供色谱测定。

1.4 标准曲线的制作

将含激素为 40 μ g/mL 的标准溶液分别进样 1, 5, 10, 20 μ L, 制作标准曲线,即进样质量分别为 40, 200, 400, 800 ng。

1.5 检测限的确定

将含激素为 4 μ g/mL 的标准溶液分别进样 1, 2, 5, 10 μ L, 即进样质量分别为 4, 8, 20, 40 ng, 观察激素峰高与基线噪声的比例,根据其值确定各激素的检测限。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

分别考察了“1.2”节中 μ BondaPak C₁₈ 柱和 Nova-Pak C₁₈ 柱对 6 种激素的分离效果。在优化的色谱条件下,其色谱图见图 1。

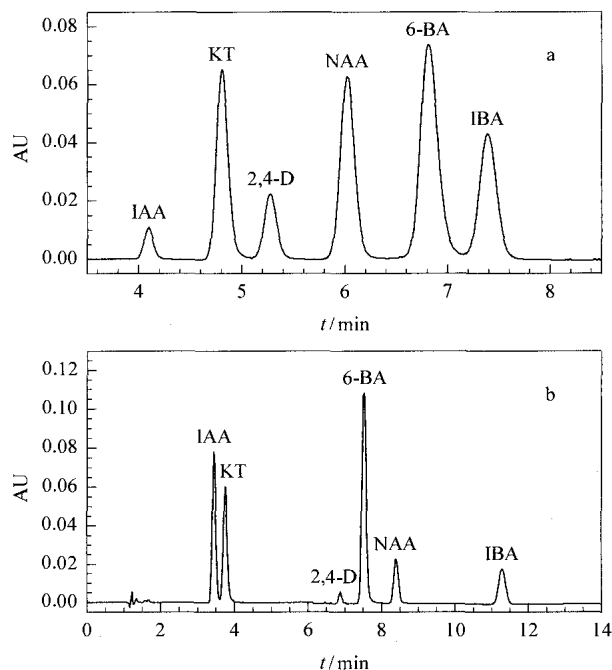


图 1 (a) μ BondaPak C₁₈ 柱和 (b) Nova-Pak C₁₈ 柱

分离植物外源激素标准品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standards of plant exogenous hormones on (a) μ BondaPak C₁₈ column and (b) Nova-Pak C₁₈ column

从上述两种色谱柱的分离结果来看,采用 μ BondaPak C₁₈ 柱进行等度分离时不需重新平衡,测定时间仅为 9 min,且各峰均能达到基线分离; Nova-Pak C₁₈ 色谱柱为 4 μ m 高规格的 C₁₈ 柱,质优价贵,价格比前者约高出 1~2 倍,峰尖而窄,但需采用梯度分离,检测周期平均为 12 min,基线波动较大,在 250 nm 以下会出现较大的梯度峰,影响观察和积分;运行梯度程序后需要一定的平衡时间,检测周期为 15 min,时间较长,如果进样量较大(50 μ L

以上),IAA 和 KT 很难达到基线分离。因此,本文最终选择 μ BondaPak C₁₈ 柱为本方法所用色谱分离柱。

2.2 激素分离特性

2.2.1 激素峰的纯度、最大吸收光谱波长和重现性

选用 μ BondaPak C₁₈ 色谱柱,将 40 μ g/mL 样品重复进样 5 次,每次进样 10 μ L,各峰的保留时间、峰面积、峰高的相对标准偏差(RSD)、纯度角、最大吸收光谱波长见表 1。

表 1 μ BondaPak C₁₈ 柱分离激素峰的纯度角、最大吸收光谱波长和重现性
Table 1 Purity angles, maximum absorbance wavelengths and RSDs of plant exogenous hormones on the μ BondaPak C₁₈ column

Component	Purity threshold	Purity angle	Maximum absorbance wavelength/nm	RSD/%		
				retention time	peak area	peak height
Indole acetic acid (IAA)	6.203	1.149	220.3	0.1	3.5	1.2
Kinetin (KT)	1.681	0.641	267.5	0.1	0.2	0.3
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	4.777	2.882	229.7	0.2	1.7	0.4
Naphthalene acetic acid (NAA)	3.466	1.193	223.8	0.2	0.9	0.3
6-Benzylaminopurine (6-BA)	1.361	0.766	268.7	0.2	0.9	0.2
Indole butyric acid (IBA)	3.266	3.226	222.7	0.2	0.5	0.4

纯度角是利用光电二极管阵列检测器(PAD)确认色谱峰的一致性(纯度)的方法,其计算方式是以峰顶处的光谱为标准,软件自动比较其与色谱峰上每个采样点的光谱之间的差异,比较结果以纯度角(purity angle)表示,若纯度角超过阈值(purity threshold),则此差异不能仅仅归因于噪声,而恰好表明可能有未分离的峰存在,即峰不纯,内含有共流出物。在以上的分离条件下,6 种激素峰的纯度角均小于阈值,说明各组分都没有共有组分流出现。

经实验检测发现,6 种激素组分在 200~400 nm 均有吸收,但最大吸收波长各不相同。若选用检测波长在 260 nm 以下,基线波动较大;若在 250 nm 左右(常用的 248 nm 或 254 nm),2,4-D 吸收很弱。由于以上 6 种激素均带有芳环,均在 280~290 nm 之间有较强的吸收峰,故选用 285 nm 作检测波长,在此波长下可兼顾各组分的检测。

2.2.2 线性关系

按“1.3.4”节所述条件制作标准曲线,6 种激素的线性方程及相关系数见表 2。由表 2 可知,各激素组分的相关系数 r^2 均大于或等于 0.999 3,在 40~800 ng 之间相关性较好。

2.2.3 检测限

以 4 μ g/mL 的标准溶液分别进样 1 μ L,测得检测限结果见表 3。从表 3 列出的检测结果看,1 μ L 进样量的激素峰均大于 5 倍的基线噪声,因此各种激素的检测限范围为 0.5~4.0 ng。

表 2 6 种外源激素的线性方程及相关系数
Table 2 Linear equations and correlative coefficients of 6 plant exogenous hormones

Component	Linear equation	r^2
IAA	$Y = 7.25 \times 10^4 X + 1.68 \times 10^3$	0.9993
KT	$Y = 5.55 \times 10^5 X - 5.85 \times 10^3$	0.9999
2,4-D	$Y = 2.13 \times 10^5 X + 6.25 \times 10^3$	0.9995
NAA	$Y = 6.53 \times 10^5 X + 8.30 \times 10^3$	0.9999
6-BA	$Y = 9.41 \times 10^5 X - 1.30 \times 10^4$	0.9999
IBA	$Y = 5.48 \times 10^5 X - 1.08 \times 10^4$	0.9999

Y: peak area; X: mass, ng. Linear range: 40~800 ng.

表 3 6 种激素的检测限
Table 3 Detection limits of 6 plant exogenous hormones

Component	Peak height/ μ V	Maximum noise/ μ V	S/N	Detection limit/ng
IAA	1953	329	5.94	4.0
KT	6134	329	18.64	1.0
2,4-D	3624	329	11.02	2.0
NAA	11059	329	33.61	0.5
6-BA	7050	329	21.43	1.0
IBA	10066	329	30.60	0.5

2.3 培养基中外源激素的分析结果

将培养基中提取的植物外源激素样品进样 8 μ L,其色谱图见图 2。从图 2 中可以看出,在 IAA 和 KT 之间、KT 与 2,4-D 之间共出现了 3 个小峰,可能是具有紫外吸收的维生素峰;IBA 前有一个尖而窄的小峰,应属于杂质峰,但从提取物中激素峰的纯度角分析,各组分纯度角均小于阈值,因此在实验条件下,培养基中没有其他有机物与激素共同流出。

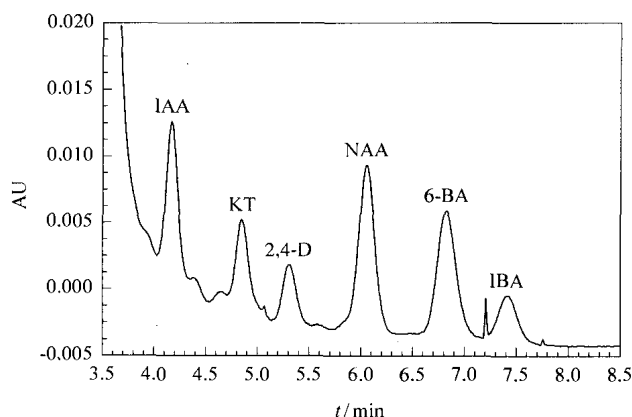


图 2 植物组织培养基样品中的外源激素的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of exogenous hormones in a plant tissue culture medium

参考文献:

- [1] Li J M, Zhu D Y. Tutorial of plant tissue culture. Beijing: China Agricultural University Press (李浚明, 朱登云. 植物组织培养教程. 北京: 中国农业大学出版社), 2000
- [2] Chen Y B, Teng J X. Konj's stock breeding technologies with tissue culture. Beijing: Tai Hai Publisher (陈永波, 滕建勋. 魔芋组织培养良种繁育技术. 北京: 台海出版社), 2006
- [3] Wu S R, Chen W F, Zhou X. Plant Physiology Communications (吴颂如, 陈婉芬, 周曼. 植物生理学通讯), 1988(5): 53
- [4] Ding J, Shen Z D, Fang Y X, et al. Plant Physiology Communication (丁静, 沈镇德, 方亦雄, 等. 植物生理学通讯), 1979(2): 27
- [5] Shang Y, Guo C Y, Du Y M, et al. Tobacco Science & Technology (商耀, 郭承燕, 杜咏梅, 等. 烟草科技), 2000(4): 41
- [6] Xiang X. Fruit Tree Science (向旭. 果树科学), 1993, 10(2): 119
- [7] Fang N H, Hou S Q, Shao X G, et al. Chinese Journal of Chromatography (方能虎, 侯树泉, 邵学广, 等. 色谱), 1998, 16(5): 417
- [8] Qi H Y, Liu Y F, Li D, et al. Plant Physiology Communications (齐红岩, 刘铁飞, 李丹, 等. 植物生理学通讯), 2006, 42(2): 199
- [9] Sun G Y, Li W, Jiang L N, et al. Plant Physiology Communications (孙广玉, 李威, 姜丽娜, 等. 植物生理学通讯), 2006, 42(6): 1153
- [10] Yu X C, Xing Y X, Ma H, et al. Acta Horticulturae Sinica (于贤昌, 邢禹贤, 马红, 等. 园艺学报), 1999, 26(6): 541
- [11] Zhao X J, Tang Z H, Guo X R, et al. Chinese Journal of Chromatography (赵晓菊, 唐中华, 郭晓瑞, 等. 色谱), 2006, 24(5): 534
- [12] Vogel A. Bull Environ Contam Toxicol, 1998, 60(3): 371
- [13] Alnaqdy A, Al-Maskari M. Med Princ Pract, 2005, 14: 209

书 讯

《核磁共振实验 200 例——实用教程(原著第三版)》

[美] 斯蒂芬·勃格、[德] 希格玛·布朗 著, 陶家洵等 译

上市日期: 2008 年 1 月

ISBN: 978-7-122-00643-1, 16 开, 精装

定价: ¥86.00 元

要点: 本书坚持边做边学的原则, 是近年来难得的一本集基础性、实践性、理论性、应用性、教学性和手册性于一身的优秀图书, 原著自 1996 年第一版出版以来即受到相关读者的普遍欢迎。

简介: 本书针对核磁共振(NMR)技术涉及原理复杂、应用领域广泛但实验操作较“难”的特点, 以实验的形式讲解理论和操作。全书涵盖从仪器及其调试到单脉冲、多脉冲、整形脉冲、选择性脉冲和梯度场脉冲等各种脉冲技术, 以及相循环、回波/反回波、保存等价途径、去耦、滤波、极化转移、多量子、抑制水(溶剂)峰、扩散排序、魔角旋转等诸多技术, 从常规的一维实验到二维、三维实验以及固体核磁、蛋白质分析应用, 从氢、碳核测试到多种核磁测试, 从常规的静态结构分析到动态学研究。

本书适于化学、物理、生物、医学、材料等领域从事 NMR 技术研究和应用的相关人员, 也可作为相关专业研究生和高年级本科生的实用教材。

化学工业出版社

购书热线: (010)64518888, 64519686(传真)

地址: 北京市东城区青年湖南街 13 号

电子邮件: goushu999@126.com

邮编: 100011