

毛竹根系中 5-脱氧独角金醇的超高效液相色谱分析

刘颖坤¹, 李国栋¹, 桂仁意¹, 张 慧², 胡晓伟¹

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省临安市林业局, 浙江 临安 311300)

摘要: 以毛竹 *Phyllostachys edulis* 根为试验材料, 首次建立了竹子根系内源激素——独角金内酯的提取和测定方法。毛竹根经研磨、提取、分离、纯化等获得供试样品, 采用液相色谱仪-PDA 检测器定性和定量分析了 5-脱氧独角金醇(5-deoxystrgol, 5-DS)。结果表明: 应用该方法, 样品制备简便, 分离效果好, 方法的线性范围及精密度、准确度和回收率都能满足毛竹根系中痕量成分定性和定量分析的要求。根据 5-DS 的保留时间以及光谱图对样品中色谱峰定性, 确定毛竹根系中含有 5-DS; 根据 5-DS 的标准曲线采用外标法对毛竹根系提取物中的 5-DS 进行定量测定, 毛竹根系中 5-DS 质量分数为 $(6.62 \pm 0.27) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。图 2 表 2 参 11

关键词: 森林培育学; 超高效液相色谱(UPLC); 毛竹根系; 独角金内酯; 5-脱氧独角金醇(5-DS)

中图分类号: S795.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2013)04-0607-04

Determination of strigolactones extracted from root of *Phyllostachys edulis* by ultra performance liquid chromatography

LIU Yingkun¹, LI Guodong¹, GUI Renyi¹, ZHANG Hui², HU Xiaowei¹

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Forest Enterprise of Lin'an City, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: A simple and highly sensitive method was first developed for the determination of strigolactones extracted from roots of *Phyllostachys edulis* by ultra performance liquid chromatography (UPLC) with ultraviolet (UV) detection; 5-deoxystrgol (5-DS) one kind of strigolactones was conducted qualitative and quantitative analysis. This method presented good recovery (80.5%–95.8%), precision (RSD < 12%), and linear relations $0.5\text{--}40.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). The extract from roots of *Phyllostachys edulis* was determined as 5-deoxystrgo according to the retention time and spectrum of analyses. The content of 5-deoxystrgo in roots of *Phyllostachys edulis* is $(6.62 \pm 0.27) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. [Ch, 2 fig. 2 tab. 11 ref.]

Key words: silviculture; ultra performance liquid chromatography (UPLC); roots of *Phyllostachys edulis*; strigolactones; 5-deoxystrgol

独角金内酯(strigolactones, SLs)是一类新型植物激素或者具有生物活性的激素前体^[1-2], 是由根部和茎的下端通过类胡萝卜素途径形成的倍半萜烯化合物^[3]。最先于 1966 年由 Cook 等^[4]从独脚金的非寄主植物棉花 *Gossypium* spp. 的根际分泌物中分离获得独脚金醇。随着研究的拓宽和深入, 独脚金内酯“家族”也在一步步壮大, 其天然产物有: 5-脱氧独角金醇(5-deoxystrigol), 独角金醇(strigol), 高粱内酯(sorgolactone), 黑蒴醇(alectrol)和列当醇(orobanchol)等 15 种; 人工合成的独角金内酯类似物主要有 GR3, GR7 和 GR24 等^[5]。独脚金内酯与植物的侧枝生长密切相关, 并可诱导寄生植物种子的萌发, 促进丛枝菌菌丝的分枝。有研究表明: 施用氮肥和磷肥能够降低黄独脚金、独脚金的危害^[6], 氮磷饥饿能

收稿日期: 2013-01-23; 修回日期: 2013-03-27

基金项目: 浙江省竹产业创新团队资助项目(2009R50030)

作者简介: 刘颖坤, 实验师, 从事竹林培育与利用研究。E-mail: liuyingkun1@qq.com。通信作者: 桂仁意, 副教授, 博士, 从事竹林培育与利用等研究。E-mail: gry@zafu.edu.cn

够促进独脚金内酯的分泌^[7-8]。目前,已在小麦 *Triticum aestivum*, 玉米 *Zea mays* 等单子叶植物和双子叶植物中检测到了独脚金内酯^[8-9]; Yoneyama 等^[8,10]采用液相-质谱/质谱联用技术(LC-MS/MS)对菊科 Asteraceae 植物中的列当醇、5-脱氧独角金醇、高粱内酯等独角金内酯类化合物进行定性和定量分析。毛竹 *Phyllostachys edulis* 是中国竹类植物中分布面积最广,范围最广,开发利用程度最高的材用、笋用经济竹种^[11]。目前,关于竹类植物中独脚金内酯的研究还未见报道。竹笋产量取决于笋芽萌发数量和大小,而笋芽萌发实质为植物的分枝生长,而独脚金内酯具有抑制植物的分枝和侧芽的生长功能^[1]。因此,研究竹子体内独脚金内酯的代谢,对于探讨竹子笋芽萌发机制,提高竹笋产量和经济效益具有重要意义。著者以毛竹根为材料,以5-脱氧独角金醇(5-deoxystrigol, 5-DS)为检测对象,首次采用反相液相色谱仪-PDA检测器,建立了对竹子根系分泌物中的独角金内酯类化合物进行定性和定量的检测方法。

1 实验材料与方法

1.1 仪器、材料和试剂

ACQUITY Ultra Performance LC 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司),包含二元溶剂管理器,样品管理器,柱温箱和光电二极管阵列检测器, ACQUITY UPLC BHE C18 柱(1.0 mm × 100 mm, 1.7 μm); 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多); Milli-Q 超纯水装置; 旋转蒸发仪(中国上海亚荣生化仪器厂); SH2-C 型循环水式多用真空泵(中国河南巩义市英峪予华仪器厂); 人工气候箱(中国宁波莱福科技有限公司); 高压灭菌锅(日本三洋电器有限公司); 固相萃取柱(Sep-Pak, silica cartridge, 美国 Waters 公司); 氮吹仪; 酸度计; 镊子; 培养皿等。

供试毛竹竹根样本于2012年11月采自浙江省临安市毛竹林,采后密封保存,待处理。主要药品有:5-DS 标准品(纯度>98%,获自日本东京大学); 乙酸乙酯(色谱纯,中国阿拉丁试剂有限公司); 甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司); 丙酮(分析纯,中国杭州大方化学试剂厂); 试验用水为超纯水营养液用水为反渗透的水(RO 水); Yoshida 营养液所用药品均为分析纯。

1.2 样品的准备和处理

检测物的提取方法根据参考文献并进行了一定的改进^[7]。将采得毛竹根用自来水洗净并晾干,将所有根系都用粉碎机粉碎后立即用液氮冷冻研磨,获得的粉末3.0 kg,加入6.0 L 丙酮浸提。抽滤获得丙酮相,用旋转蒸发仪在45℃左右将丙酮蒸去,保留浓缩液(水相),再用重蒸的丙酮返回竹根样中超声浸提4次,超声15 min·次⁻¹,直至浸提液呈无色。向浓缩液中加入与水相体积比为1:1的石油醚萃取,分液保留水相,方法同上,温度为50℃。向水相中加入与水相体积比为1:1的乙酸乙酯浸提,分液获得乙酸乙酯相,用旋转蒸发仪在38℃左右将样品浓缩至400.0 mL左右,获得样品为黄色透明液体,然后定容至500.0 mL。取1.0 mL 液体过固相萃取柱后用氮吹仪吹干后加入300.0 μL 甲醇溶解,转入样品瓶供分析用,平行3次。

1.3 5-DS 标准溶液的配制及标准曲线制作

取2.0 mg 5-DS 溶于50.0 mL 甲醇中得质量浓度为40.0 mg·L⁻¹ 标准品储备液,然后逐级稀释得以下质量浓度的标准溶液:4.0, 20.0, 10.0, 5.0, 2.0, 1.0 mg·L⁻¹。各进样1.0 μL 得不同质量浓度的标准溶液的峰面积,以峰面积(mV·s)积分为纵坐标,标品溶液的质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,制作标准曲线,求得线性回归方程。

1.4 液相色谱条件

在 Yoneyama 等^[10]的液相色谱条件基础上,经过适当改进后得到以下色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C18 柱(1.0 mm × 100.0 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为体积分数0.5%的甲酸水溶液; 流动相 B 为色谱甲醇,流速为0.05 mL·min⁻¹, 分析时间15.0 min, 柱温30℃, 检测波长254 nm, 进样体积1.0 μL。柱温25℃, 进样体积1.0 μL。洗脱条件0~5.0 min 由50% A 变为30% A, 5.0~8.0 min 由30% A 变为0% A, 8.0~12.0 min 持续为0% A, 12.0~15.0 min 由0% A 变为50% A。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱定性分析

如图1和图2所示:在1.4的液相色谱条件下,15 min内目标物可以得到很好的分离,从标准品和样品的色谱图中可以看到,5-DS的相对保留时间为 (8.742 ± 0.021) min;毛竹根提取物的相对保留时间为 (8.721 ± 0.032) min,两者的相对保留时间基本上一致;并且样品与标准品的光谱图显示,两者均是在200 nm和235 nm左右有较强吸收,可以得出两者的光谱图基本一致。综上,我们可以确定竹根提取物中含有5-DS。

2.2 定量分析方法评价指标考察

取2.0 mg 5-DS溶于50 mL甲醇中得质量浓度为 $40.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品储备液,然后逐级稀释得以下质量浓度的标准溶液:40.0, 20.0, 10.0, 5.0, 2.0, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各进样 $1.0 \mu\text{L}$ 得不同质量浓度的标准溶液的峰面积,以峰面积($\text{mV} \cdot \text{s}$)积分值为纵坐标,标品溶液的质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标,制作标准曲线,求得线性回归方程。得出5-DS在质量浓度为 $0.5 \sim 40.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系回归方程为 $y=13\,039x-5\,986.2$, $R_2=0.996\,8$ 。检出限($S/N>3$)为 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;定量限($S/N>10$)为 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

取质量浓度40.0, 10.0, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为标液,分别连续进样6次,通过计算5-DS的相对标准偏差(RSD)检测方法的精密度。结果见表1:发现3种不同质量浓度5-DS的保留时间与峰面积的相对标准偏差值均在2.5%以内,表明方法的精密度比较好。在竹根提取物中分别添加 $300.0 \mu\text{L}$ 的40.0, 10.0, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的5-DS标样,1个添加水平重复4次,经前处理后过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜后在上述色谱条件下进行检测,采用外标法计算其添加回收率,结果见表2。表2表明:添加回收率为80.5%~95.8%,相对标准偏差(RSD)为4.9%~11.5%。表明该分析方法的准确度和精密度均比较好。

表1 方法精密度测定结果

5-DS 加入量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	保留时间相对 标准偏差/%	峰面积相对 标准偏差/%
2.0	1.5	2.2
10.0	1.2	2.5
40.0	1.9	2.6

表2 5-DS 回收率试验结果

5-DS 加入量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	测得平均值	相对标准 偏差/%	回收率/%
2.0	1.85	11.5	92.5
10.0	9.23	8.3	80.5
40.0	38.32	4.9	95.8

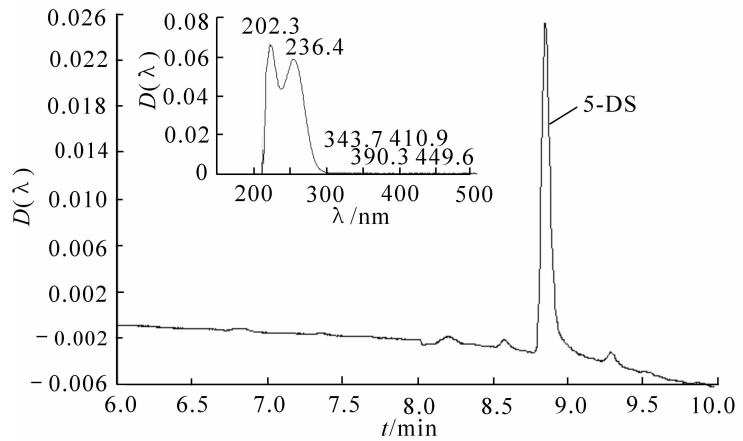


图1 5-DS 标准品色谱图及光谱图

Figure 1 Liquid chromatogram and spectrogram of standard of 5-DS

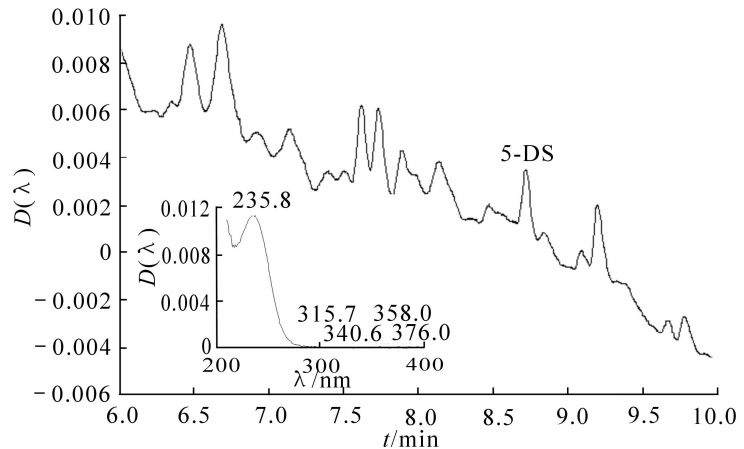


图2 竹根样品提取物色谱图及目标物光谱图

Figure 2 Liquid chromatogram of extract of bamboo-root and spectrogram of standard of object

取竹根提取液,间隔2 h测定1次,结果12 h内稳定,测得5-DS的峰面积平均值为9137,相对

标准偏差为 5.48%，说明方法具有良好的稳定性。平行取竹根提取物 5 份，按照 1.2 中的样品前处理方法进行处理，然后按色谱方法测定，计算 5-DS 的相对标准偏差值为 7.42%，说明方法的重复性良好。

2.3 检测波长的确定

为了考察检测波长对 5-DS 检测灵敏度的影响，用光电二极管阵列检测器对目标物的紫外吸收波长进行全扫描，采集了在 190~400 nm(紫外)下 5-DS 的紫外吸收光谱图，如图 1 所示。结果表明：5-DS 在 237 nm 附近有最大的吸收，但在该波长处，图谱的基线漂移比较严重。后来经过仔细选择，发现在 254 nm 下检测，图谱的基线比较平稳，目标峰的峰形比较好，目标物不易受流动相中其他物质干扰。故本试验均采用 254 nm 波长进行检测。

2.4 样品中 5-DS 的定量测定

竹根样品根据 1.2 的方法前处理后，按照 1.3 色谱方法注入超高效液相色谱仪中进行测定，3 个平行的样品每个重复进样 5 次。根据分析物的保留时间及光谱图对样品中的色谱峰进行定性，可以确定毛竹根系提取物中含有 5-DS。然后根据所制作的 5-DS 的标准曲线采用外标法对毛竹根系提取物中的 5-DS 进行定量测定，毛竹根系中 5-DS 的为 $(1.75 \pm 0.27) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。Yoneyama 等^[10]用液相-质谱-质谱联用技术(LC-MS-MS)从莠苣中检出 5-DS，并测得量为 $0.50 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 左右。该结果从侧面证明本试验所得结果是可靠的。

3 结论

本研究采用固相萃取-超高效液相色谱仪-PDA 检测器，首次检测出竹子体内的独角金内酯——5-脱氧独角金醇(5-DS)。该方法样品制备简便，分离效果好，方法的线性范围及分析结果的精密性、准确度和回收率均能满足毛竹根系中痕量成分定性和定量分析的要求，并且具有样品用量少、分析快速等特点，可应用于竹子体内独角金内酯类激素的检测与研究。

参考文献：

- [1] GOMEZ-ROLDAN V, FERMAS S, BREWER P B, *et al.* Strigolactone inhibition of shoot branching [J]. *Nature*, 2008, **455**: 189 – 194.
- [2] UMEHARA M, HANADA A, YOSHIDA S, *et al.* Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones [J]. *Nature*, 2008, **455**: 195 – 200.
- [3] DUN E A, BREWER P B, BEVERIDGE C A. Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, **14**(7): 364 – 372.
- [4] COOK C E, WHICHARD L P, TURNER B, *et al.* Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant [J]. *Science*, 1966, **154**: 1189 – 1190.
- [5] XIE Xiaonan, YONEYAMA K, YONEYAMA K. The strigolactone story [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 2010, **48**: 93 – 117.
- [6] OSWALD A. Striga control-technologies and their dissemination [J]. *Crop Prot*, 2005, **24**(4): 333 – 342.
- [7] YONEYAMA K, YONEYAMA K, TAKEUCHI Y, *et al.* Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites[J]. *Planta*, 2007, **225**: 1031 – 1038.
- [8] YONEYAMA Y, XIE Xiaonan, KIM H, *et al.* How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? [J]. *Planta*, 2012, **235**: 1197 – 1207.
- [9] AWAD A A, SATO D, KUSUMOTO D, *et al.* Characterization of strigolactones, germination stimulants for the root parasitic plants *Striga* and *Orobanche*, produced by maize, millet and sorghum [J]. *Plant Growth Regul*, 2006, **48**: 221 – 227.
- [10] YONEYAMA Y, XIE Xiaonan, KISUGI T, *et al.* Characterization of strigolactones exuded by Asteraceae plants [J]. *Plant Growth Regul*, 2011, **65**: 495 – 504.
- [11] GUI Renyi, LENG H, ZHUANG S, *et al.* Aluminum tolerance in moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) [J]. *Bot Rev*, 2011, **77**: 214 – 222.