

文章编号: 1000-5692(2005)04-0390-06

## 香榧雌花芽部分内源激素的 HPLC 分析及动态变化

黄华宏<sup>1</sup>, 童再康<sup>1</sup>, 廖望仪<sup>2</sup>, 毕春晖<sup>3</sup>, 楼雄珍<sup>1</sup>

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江森禾种业股份有限公司, 浙江 杭州 310020; 3. 沃特斯中国有限公司, 上海 200001)

**摘要:** 以香榧 *Torreya grandis* 'Merrillii' 雌花芽为材料, 研究了芽体中内源吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)和赤霉素(GA<sub>3</sub>)的提取、纯化方法和色谱测定条件。结果发现以石油醚作萃取剂, 并结合添加水不溶性聚乙烯吡咯烷酮和过 Sep-Pak C<sub>18</sub>小柱处理可达到较好的提纯效果。采用 ODS-C<sub>18</sub>反相柱和 Waters 486 型紫外检测器。用甲醇-水(体积比为 50:50, 用乙酸调节 pH 为 3.0)作流动相, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温设为 25 °C, 进样量 20 μL, 分离 IAA 和 ABA 时紫外检测波长为 280 nm。分析 GA<sub>3</sub> 时紫外检测波长为 210 nm, 选用外标法进行定量。测定结果显示: 该方法回收率高, 重现性好, 符合痕量分析要求。从 2004 年 2 月 21 日至 4 月 29 日的香榧雌花芽分化过程中, 芽体中 IAA 和 GA<sub>3</sub> 的质量分数呈现先上升后下降的变化趋势, 而 ABA 的质量分数表现出“上升—略下降—再明显上升”的变化。图 4 表 4 参 11

**关键词:** 植物生理学; 香榧; 雌花芽; 高效液相色谱法; 内源激素

**中图分类号:** S718.43      **文献标识码:** A

香榧 *Torreya grandis* 'Merrillii' 属红豆杉科 Taxaceae 植树属 *Torreya* 常绿乔木, 是我国特有的珍稀干果树种, 其种仁炒制食用, 清香松脆可口, 且营养丰富, 驰名中外。但香榧童期长, 人工栽培投产迟, 新品种选育周期更长, 从而影响其人工林的可持续发展和栽培效益的提高。因此, 研究阐明香榧花芽分化的机理, 并由此研究开发能促进香榧早成花的新技术将具有重要现实意义。植物激素是一类具特殊生理功能的小分子化合物, 它们在极低的浓度下便可调控植物生长发育。Evans 等<sup>[1]</sup>认为, 植物任何器官的发育都依赖于激素平衡和有效激素之间的相互作用。香榧的花芽分化过程也受控于各类内源激素的相互作用, 研究不同激素在花芽分化期的变化规律, 探讨有效激素的平衡关系将有助于阐明香榧的花芽分化调控机理及研发调控技术。

自 20 世纪 70 年代中期开始用高效液相色谱法(HPLC)测定植物内源激素以来, HPLC 在植物激素和生长调节剂的研究领域中得到了广泛的应用。苹果 *Malus pumila*<sup>[2,3]</sup>, 柑橘 *Citrus reticulata*<sup>[4,5]</sup>, 杉木 *Cunninghamia lanceolata*<sup>[6]</sup> 和银杏 *Ginkgo biloba*<sup>[7]</sup> 等木本植物枝、叶和芽等组织或器官的内源激素测定多采用该方法, 并取得了良好的检测效果。然而, 迄今为止有关香榧内源激素 HPLC 检测和分析的研究尚未见报道。本文通过研究香榧雌花芽内源激素提取方法, 探讨了外标反相 HPLC 测定吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)和赤霉素(GA<sub>3</sub>)等 3 种内源激素的色谱条件, 分析了雌花芽分化过程中 3 种激

收稿日期: 2004-09-30; 修回日期: 2005-05-19

基金项目: 浙江省科学技术厅重大项目(021102537)

作者简介: 黄华宏, 讲师, 硕士, 从事植物遗传育种研究。E-mail: huanghh@zjfc.edu.cn

素的动态变化及其规律。为与园艺学名词相对应, 本文把香榧雌性生殖器官——胚珠称为花, 而把结实基枝顶端孕育花的混合芽, 称为雌花芽。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

试验所用植物材料均为不同时期采自浙江省诸暨市枫桥镇的 1 株成年香榧树的雌花芽, 采样时间分别为 2004 年 2 月 21 日、3 月 17 日、4 月 7 日、4 月 17 日和 4 月 29 日; 样品采后立即贮于  $-35^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中待测。

### 1.2 主要仪器与试剂

本试验所用仪器为 Waters 600 高效液相色谱分析仪, Waters 486 型紫外检测器, HS 2000 色谱数据处理软件; 材料前处理所用仪器主要有减压旋转浓缩器、真空泵、离心机、pH 计和 Sep-PakC<sub>18</sub>小柱等; 甲醇为色谱纯, 激素标样 IAA、ABA 和 GA<sub>3</sub> 皆购自 SIGMA 公司。

### 1.3 内源 IAA、ABA 和 GA<sub>3</sub> 的提取和纯化方法

准确称取样品 1.5 g (精确到 0.1 mg), 液氮研磨, 加入预冷的体积分数为 80% 甲醇 15 mL,  $4^{\circ}\text{C}$  下浸提 16 h (注意避光), 并不断搅拌。随后, 在  $4^{\circ}\text{C}$  下  $6\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 倒出上清液, 重复 2 次, 合并上清液,  $38^{\circ}\text{C}$  下减压浓缩至水相, 石油醚等体积萃取 2 次, 弃石油醚相。用  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 将水相调 pH 为 8.0, 添加水不溶性的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 0.4 g 左右去杂, 抽滤弃去 PVP。用  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 将水相 pH 调为 3.0, 乙酸乙酯等体积萃取 2 次, 合并乙酸乙酯相在  $38^{\circ}\text{C}$  下减压浓缩至干。加入 0.5 mL 甲醇溶解残留物, 过 Sep-PakC<sub>18</sub>预处理柱, 用体积分数为 100% 甲醇洗脱。Sep-PakC<sub>18</sub>小柱使用前先用 5 mL 体积分数为 100% 甲醇疏松, 再用体积分数为 70% 甲醇 8 mL 平衡。

### 1.4 色谱条件

试验所用色谱柱为 Intersil ODS-C<sub>18</sub>柱 (4.6 mm  $\times$  150 mm, 粒径 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为甲醇和水 (含一定量的醋酸), 流速为  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 检测波长设为 280 nm 和 210 nm, 柱温为  $25^{\circ}\text{C}$ , 保留时间定性, 外标法定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 内源 IAA、ABA 和 GA<sub>3</sub> 的提取和纯化

植物样品中干扰内源激素测定的物质主要包括待测激素的类似物、色素、酚类和有机酸等。在进行 HPLC 分析前, 除去样品中的干扰物质是必要的, 通常采用溶剂萃取法、层析法和 Sep-PakC<sub>18</sub>小柱预处理法去除色素等干扰物质。本实验比较了石油醚、正己烷、三氯甲烷作萃取剂去除亲脂性色素及其他物质的效果, 发现石油醚最好。而以多次少量添加水不溶性 PVP, 结合搅拌抽滤, 可以较好地去除多酚类和色素类等物质。Sep-PakC<sub>18</sub>小柱仅吸附分子态 IAA、ABA 和 GA<sub>3</sub>, 可去除多种呈离子态的杂质。实验中结合这 3 种方法进行提取和纯化, 使 3 种待测激素在样液中获得了较高的纯度。

### 2.2 检测波长的选择

表 1 所列为 3 种检测激素在不同波长紫外光下的吸光度。在实验所分析的波长范围内, IAA 和 ABA 的最大吸收波长为 270~285 nm, GA<sub>3</sub> 的最大吸收波长在 200~220 nm。相比之下, 前者的吸收范围较窄。因此, 本项研究选择 IAA 和 ABA 的检测波长为 280 nm, GA<sub>3</sub> 的检测波长为 210 nm。因采用单波长紫外检测器, 每个样品 3 种激素的测定分 2 次进行。

### 2.3 流动相组成的选择

前人的研究多采用甲醇-水-醋酸<sup>[8]</sup>、乙腈-水-醋酸<sup>[4,5,9]</sup> 或乙腈-甲醇-水-醋酸<sup>[2,3,10]</sup> 体系作为流动相。考虑到乙腈本身的毒性较大, 且价格较昂贵, 为此本试验采用甲醇-水-醋酸体系作流动相。

为了研究流动相中甲醇含量对各组分保留时间的影响, 实验比较了不同比例甲醇流动相的分离效果。图 1 显示流动相中不同甲醇体积分数时 IAA 和 ABA 的分离情况。从图中可以看出, 随流动相中

甲醇体积分数增加, 也即流动相的溶剂强度提高, 这2种激素的保留时间均缩短。当甲醇体积分数提高到600 mL·L<sup>-1</sup>时, 色谱峰开始出现重叠。同样从图2可知, 对于单个GA<sub>3</sub>的分离, 保留时间也随流动相中甲醇含量的增加而减少, 如当甲醇体积分数为750 mL·L<sup>-1</sup>时, GA<sub>3</sub>的保留时间仅有2.082 min, 且开始与前面的溶剂峰发生重叠。提取的植物激素样品中含有一些酚类物质和色素, 其出峰时间往往较早, 干扰内源激素的准确定性和定量。因增加提纯步骤会降低内源激素的提取率, 因此, 本项研究采用降低流动相的溶剂强度, 以延迟目标内源激素出峰, 减少干扰, 获得较高的测定精度。

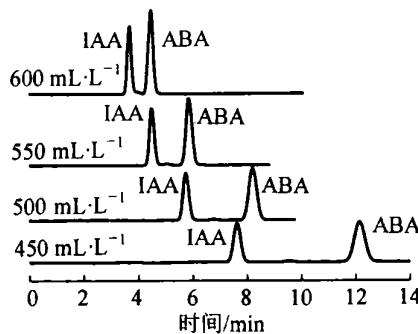


图1 不同比例流动相对IAA和ABA保留时间的影响

Figure 1 Influence of mobile phase of different proportions on retention time of IAA and ABA

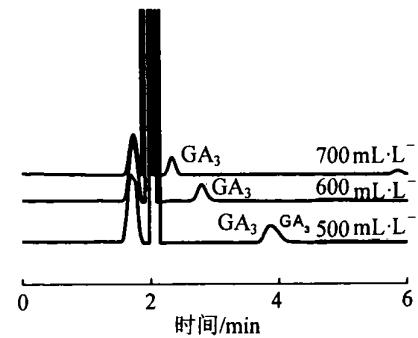


图2 不同比例流动相对GA<sub>3</sub>保留时间的影响

Figure 2 Influence of mobile phase of different proportions on retention time of GA<sub>3</sub>

## 2.4 流动相酸度对分离的影响

实验发现, 流动相中不加醋酸, IAA, ABA 和 GA<sub>3</sub> 皆不能得到较好的分离。为此, 表2列出了流动相中醋酸含量的变化对分离效果的影响。结果表明, 虽然这3种激素都含有酸性基团, 但是酸度pH为3.0~4.6, 对其保留时间基本没有影响。但从表2

表2 不同酸度下3种内源激素的拖尾因子和分离度

Table 2 Tailing factors and resolutions of three hormones at different pH

pH	IAA		ABA		GA <sub>3</sub>	
	拖尾因子	分离度	拖尾因子	分离度	拖尾因子	分离度
4.6	1.863	5.040	2.177	1.368	0.743	1.407
4.0	1.091	2.760	1.063	2.958	1.292	4.684
3.6	1.031	6.519	1.005	2.581	0.903	3.149
3.0	1.002	4.973	1.022	4.973	1.043	5.491

说明:  $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}} = 50:50$

所列的不同酸度下3种激素的拖尾因子和分离度数值可看出, 随酸度升高, 3种激素的峰形有所改善, 降低了拖尾程度。该研究结果与方能虎等<sup>[8]</sup>的报道相一致。这可能是由于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影响, 但抑制了其他杂质离子与组分之间的竞争平衡及一些不可逆的化学吸附, 从而使峰形更好。在本实验酸度范围内, IAA 和 ABA 在 pH 为 3.6 和 3.0 时均得到较好的分离, 而 GA<sub>3</sub> 在 pH 为 3.0 时的分离效果更好。

## 2.5 柱温对分离的影响

柱温对HPLC分析所需要的时间有显著影响。随着柱温的升高, 样品的分析时间将减少。当柱温为20 °C时, 分离一个样品的IAA, ABA和GA<sub>3</sub>分别需14.5 min和9.0 min, 而当柱温升高至30 °C时, 分离一个样品的IAA, ABA和GA<sub>3</sub>分别只需6.5 min和3.0 min。综合考虑激素的热稳定性和测定时的室内环境, 认为测定这3种激素选择柱温为25 °C是比较合适的。

## 2.6 线性关系的测定

综合上述研究结果, 可以确定3种激素的检测色谱条件为: 体积分数为50%且pH为3的甲醇作流动相, 流速为1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温设为25 °C, 灵敏度0.100 AUFS, 分离IAA和ABA时紫外检测波长设为280 nm, 而分析GA<sub>3</sub>时紫外检测波长段为210 nm。图3为3种激素的色谱分离图谱。测定过程中用外标峰面积法定量。配制一系列质量浓度的激素标准品混合溶液, 用峰面积(y)对质量浓度(x, mg·L<sup>-1</sup>)作线性回归曲线, 结果如表3所示。由表3可知, 3种激素的检出限皆较低, 且线性关系良好。

## 2.7 回收率与重现性的测定

本实验分别将50 μg的IAA, ABA和GA<sub>3</sub>标准品加入到样品(已测得此样品的内源激素含量本底值为空白)中, 经该法提取后, 采用HPLC进行5次平行测定, 其平均回收率分别为97.81%, 98.64%和102.07%。3种激素平行测定的变异系数分别为3.32%, 2.97%和6.54%, 符合定量分析的要求。

## 2.8 香榧雌花芽内源IAA, ABA和GA<sub>3</sub>的动态变化

采用本实验的IAA, ABA和GA<sub>3</sub>提取流程, 对香榧结实基枝顶端雌花芽中的内源IAA, ABA和GA<sub>3</sub>进行了分离的测定, 所得到的HPLC图谱如图4, 分离效果清晰。从表4可看出, 在各个时期香

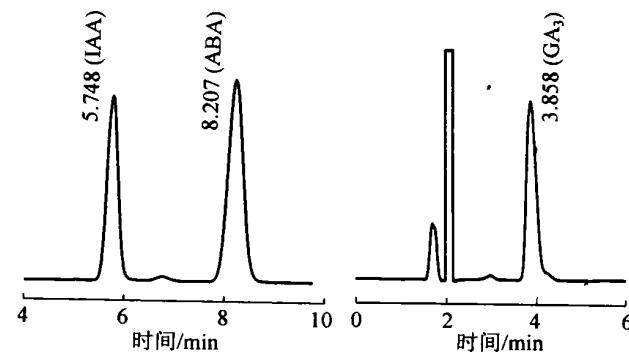


图3 3种内源激素标样的色谱图

Figure 3 Chromatogram of three standard hormones

表3 3种内源激素的工作曲线

Table 3 Calibration curves of three endogenesis hormones

激素	回归方程	相关系数	线性范围/(mg·L <sup>-1</sup> )	检测限/(mg·L <sup>-1</sup> )
IAA	$y = 2.92 \times 10^{-5}x + 8.46 \times 10^{-2}$	0.999 82	0.09~20.00	0.042
ABA	$y = 2.25 \times 10^{-5}x + 7.98 \times 10^{-2}$	0.999 93	0.08~20.00	0.032
GA <sub>3</sub>	$y = 8.07 \times 10^{-5}x - 8.24 \times 10^{-1}$	0.999 07	0.70~30.00	0.433

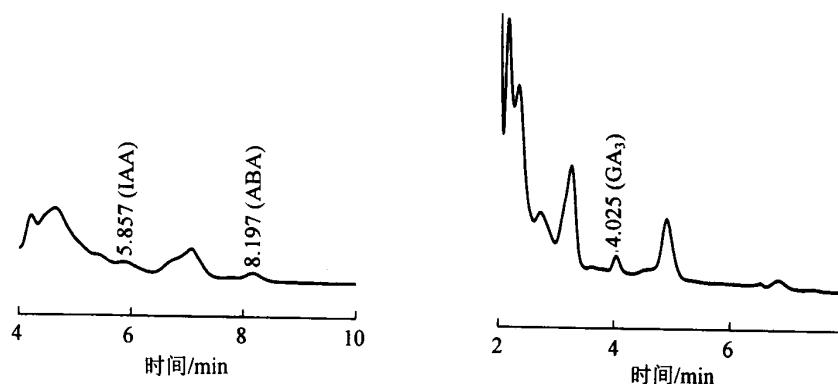


图4 香榧雌花芽中的内源IAA, ABA和GA<sub>3</sub>色谱图

Figure 4 Chromatogram of endogenous IAA, ABA and GA<sub>3</sub> from *Torreya grandis* 'Merrillii'. 1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

榧雌花芽中  $GA_3$  的质量分数最高, IAA 最低。从 2004 年 2 月 21 日至 4 月 29 日, 芽体中  $GA_3$  呈先上升后下降的变化趋势; IAA 的变化规律与  $GA_3$  相似; ABA 的质量分数表现出“上升—略下降—再明显上升”的变化。

### 3 讨论

鉴于植物组织中仅含微量的生理活性内源激素, 测定前须用有机溶剂从中提取游离态激素。然而, 因激素常以各种结合态存在, 且含量较高, 即提取过程中必须防止结合态激素的水解。因此, 样品采集后应立即置  $-30^{\circ}\text{C}$  以下低温贮存, 有条件时应以冷冻干燥, 整个提取过程应在弱光条件下进行, 且在冰浴条件下研磨。在样品前处理和色谱

分析时, pH 值的调节是另一个主要问题, IAA, ABA 和  $GA_3$  均为酸性激素, 溶液碱性时易分解呈离子状态, 溶液为酸性时则呈分子状态。即添加水不溶性 PVP 前应调节 pH 为 8.0 使其呈离子状态, 减少被 PVP 吸附; 而在乙酸乙酯萃取时则调节 pH 为 3.0 使其呈分子状态, 减少在水相中的分配。

植物样品组成成分十分复杂, 利用 HPLC 检测某一种成分的含量, 关键在于前处理和色谱条件的选择。前处理操作应简单快速, 能够得到纯度较高的目标物, 并尽量降低待测物质损耗, 取得较高的得率。然而, 在无法通过前处理去除检测干扰物质时, 可以通过选择良好分离目标物的色谱条件以达到准确检测之目的。本研究在明确不同色谱条件对 IAA, ABA 和  $GA_3$  分离效果影响的基础上, 建立了香榧芽体这 3 种内源激素的 HPLC 检测方法。结果显示该方法检测效果好, 稳定可靠。

通过对不同时期香榧雌花芽部分内源激素的 HPLC 分析发现, 从 2004 年 2 月 21 日至 4 月 29 日的香榧雌花芽发育过程中, 促进生长的 IAA 和  $GA_3$  质量分数先上升后下降, 而抑制生长的 ABA 质量分数呈现先上升略下降后又上升的趋势。从外部形态变化看, 此时期香榧结实基枝顶端混合芽正处于膨大和伸长时期。汤仲埙等<sup>[11]</sup>通过芽体解剖观察认为, 从 2 月到 5 月香榧雌花芽处于珠心分化和大孢子母细胞阶段。因此, IAA 和  $GA_3$  质量分数的上升可能与细胞数目和体积快速增加有关。而 ABA 的复杂变化可能与混合芽内叶芽分化和芽鳞脱落有关。当然, 有关内源激素变化与香榧雌花芽分化及其调控的关系有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Evans V. Flower induction and the florigen concept [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1971, **22**: 365—394.
- [2] 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.
- [3] 徐继忠, 陈海江, 袁小乱, 等. 苹果花诱导和孕育期短枝顶芽内源激素的变化 [J]. 河北果树, 1998, (3): 6—7.
- [4] 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.
- [5] Koshita Y, Takahara T, Ogata T, et al. Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA,  $GA_3$ ) in leaves and flower bud formation of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc) [J]. *Sci Hortic*, 1999, **79**: 185—194.
- [6] 管康林, 严逸伦, 郑炳松. 杉木花芽分化过程中含氮化合物和内源激素的作用 [J]. 浙江林学院学报, 1996, **13** (3): 248—254.
- [7] 王白坡, 程晓建, 戴文圣. 银杏实生树不同发育阶段个体内源激素含量的变化 [J]. 果树学报, 2002, **19** (6): 395—398.
- [8] 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.
- [9] 陈昆松, 徐昌杰, 李方, 等. HPLC 法检测果实组织中内源 IAA, ABA 方法的改进 [J]. 果树学报, 2003, **20** (1): 4—7.
- [10] 谢君, 张义正. 植物内源激素的反相高效液相色谱法测定 [J]. 分析测试学报, 2001, **20** (1): 60—62.
- [11] 汤仲埙, 陈祖铿, 王伏雄. 香榧有性生殖周期的研究 [J]. 植物分类学报, 1986, **24** (6): 447—453.

表 4 香榧雌花芽发育期间 3 种内源激素的变化

Table 4 Change of three endogenous hormones from mixed buds during

*Torreya grandis* 'Merrillii' growth

取样日期	IAA/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	ABA/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	$GA_3/$ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
02-21	0.10	0.28	0.93
03-17	0.14	0.47	1.47
04-07	0.14	0.40	1.59
04-17	0.19	0.51	1.81
04-29	0.15	0.74	1.69

# High performance liquid chromatographic analysis and changes of endogenous hormones in female floral buds of *Torreya grandis* 'Merrillii'

HUANG Hua-hong<sup>1</sup>, TONG Zai-kang<sup>1</sup>, LIAO Wang-yi<sup>2</sup>, BI Chun-hui<sup>3</sup>, LOU Xiong-zhen<sup>1</sup>

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300 Zhejiang, China; 2. Zhejiang Senhe Seed Co., Ltd Hangzhou 310020 Zhejiang, China; 3. Water China Co., Ltd Shanghai 200001, China)

**Abstract:** Extraction, purification and chromatographic conditions of endogenous IAA, ABA and GA<sub>3</sub> in the buds were studied, with female floral buds of *Torreya grandis* 'Merrillii' during the differentiation as materials. The results showed that endogenous hormones could be better purified after treating with petroleum ether, water-insoluble PVP and Sep-PakC<sub>18</sub> column. The chromatographic conditions were as follows: ODS-C<sub>18</sub> reversed-phase column, Water 486 ultraviolet detector, the mobile phase was a mixture of methanol, water and acetic acid (methanol:water = 50:50, volume ratio, pH 3.0), velocity of flow was set at 1 mL·min<sup>-1</sup>, temperature of column and injection volume was 25 °C and 20 μL respectively, detecting wavelength of IAA and ABA was set at 280 nm, while that of GA<sub>3</sub> was set at 210nm. The determining results showed that the method could be apply to trace analysis. In addition, it was found that from February 21 to April 29 the contents of IAA and GA<sub>3</sub> in the female floral buds increased then decreased, while that of ABA increased, slightly decreased then increased obviously. [Ch, 4 fig. 4 tab. 11 ref.]

**Key words:** plant physiology; *Torreya grandis* 'Merrillii'; female floral buds; high performance liquid chromatographic analysis; endogenous hormones

## 竹醋液(BV)有机液体原料复配制剂

张齐生院士领衔的项目组经过多年潜心研究, 研制成功一种以竹醋液(bamboo vinegar)为主要原料的复配制剂——BV 有机液体肥料。研究表明, 这种绿色环保液体肥料具有提高植物抗逆性, 抑菌杀菌, 驱虫杀虫和调节植物生长的作用, 不仅增产效果明显, 而且还能改善农产品品质, 如果品颜色、口感、单果质量及含糖量等。

目前该成果已获浙江省农业科技成果转化资金资助。2005 年 7 月 4 日“BV 有机液体肥料的推广应用与产业化项目”协作会在浙江林学院召开, 来自浙江省 6 县(市)共 20 多位政府领导及一线专业技术试验推广人员参加了会议。为确保该项目的顺利完成, 协作会上还成立了水稻、水果、蔬菜和茶叶等 4 个专业小组。