

DLLME-HPLC 测定锡金微孔草内源 激素脱落酸的含量^①

皮立^{a,b,c} 胡凤祖^a 韩涛^{a,b,c} 李以康^{a,b,c} 赵晓辉^{a,b,c} 韩发^{②a,c}

^a(中国科学院西北高原生物研究所 西宁市西关大街 59 号 810008)

^b(中国科学院大学 北京市玉泉路 19 号甲 100049)

^c(中国科学院高原生物适应与进化重点实验室 西宁市新宁路 23 号 810008)

摘要 建立分散液液微萃取-高效液相色谱法测定锡金微孔草内源激素脱落酸含量的分析方法。分散液液微萃取条件为:100 μ L 萃取剂(氯仿),1.0mL 分散剂(乙酸乙酯),pH 3.0;方法的线性范围:0.0285—1.14 μ g/mL, $r=0.9995$,检出限 0.0008 μ g/mL($S/N=3$);锡金微孔草中脱落酸的加标回收率为 90.99%—93.12%,RSD 为 0.99%—1.57%($n=3$)。本方法具有检出限低、操作简便、环境友好等优点,适于检测微孔草中痕量的脱落酸。

关键词 分散液液微萃取;锡金微孔草;植物激素;脱落酸;高效液相色谱

中图分类号:O657.7⁺²

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2013)05-2094-05

1 引言

锡金微孔草(*Microula sikkimensis*)系紫草科微孔草属两年生草本植物,主要分布于我国的青藏高原及其毗邻地区,是微孔草中分布最广泛的品种之一^[1]。微孔草的 γ -亚麻酸含量高,降血脂功能显著而备受世人的关注^[2]。是一种很有开发前景的食药兼用植物^[3]。

脱落酸(ABA)是一种有倍半萜结构的植物激素,是一种重要的植物激素,虽然含量很低,但对调节植物体的生长、成熟和植物逆境条件的适应有着重要的作用^[4]。准确高效的测定痕量脱落酸含量,深入研究其变化规律,对于探索微孔草的抗逆生理及适宜生境具有重要的研究意义。

分散液液微萃取(DLLME)是 2006 年由 Assadi^[5]等提出的一种新型样品前处理技术,该技术基于三组分溶剂系统:萃取剂、分散剂和水溶液。集分离与富集于一体,有机溶剂用量少,预处理时间短,可以达到很高的萃取效率和富集倍数^[6]。DLLME 方法结合各种分离检测技术已成功应用于植物样品中的植物激素含量测定^[7]。植物适应环境变化过程中起到调节和转化的主要物质是植物激素。在低温胁迫条件下,脱落酸的作用尤为重要^[8]。内源激素脱落酸由于含量甚微,测定相对困难。现有的检测方法存在检测设备昂贵,前处理步骤繁琐,检测灵敏度低等缺点。本文将分散液液微萃取与高效液相色谱法结合,首次用于对锡金微孔草脱落酸的含量测定。方法具有样品前处理简便、提取效率高、检测时间短、灵敏度高等优点。

① 国家基金项目(31070475);中科院院地合作项目(Y12B041211);中科院支撑服务国家战略性新兴产业科技行动计划项目(Y12B491211)

② 联系人,电话:(0971)6143896;传真:(0971)6143282;E-mail:hanfa@nwipb.ac.cn

作者简介:皮立(1972—),男,江西省樟树市人,助理研究员,在读博士,主要从事植物生理生态和药物分析研究工作。

收稿日期:2012-12-21;接受日期:2013-03-19

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 安捷伦液相色谱系统化学工作站(美国 Agilent 公司); RE-52 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); TGL-16B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); PL203 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。脱落酸对照品(批号: 20120220148)购自北京鑫方程生物技术有限公司; 乙腈(色谱纯, 山东禹王), 其余试剂均为分析纯。实验用水为纯净水。微孔草样品采自青海省湟中县和门源县, 经中科院西北高原生物研究所卢学峰副教授鉴定为紫草科锡金微孔草 (*Microula sikkimensis*)。

2.2 实验方法与结果

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 柱(4.6mm×250mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-1.2% 乙酸水溶液(B)=60:40(V/V); 流速: 1.0mL·min⁻¹; 柱温: 25℃; 进样量 10 μ L。在此条件下, 样品中脱落酸与周围物质的峰分离较完全, 见图 1。

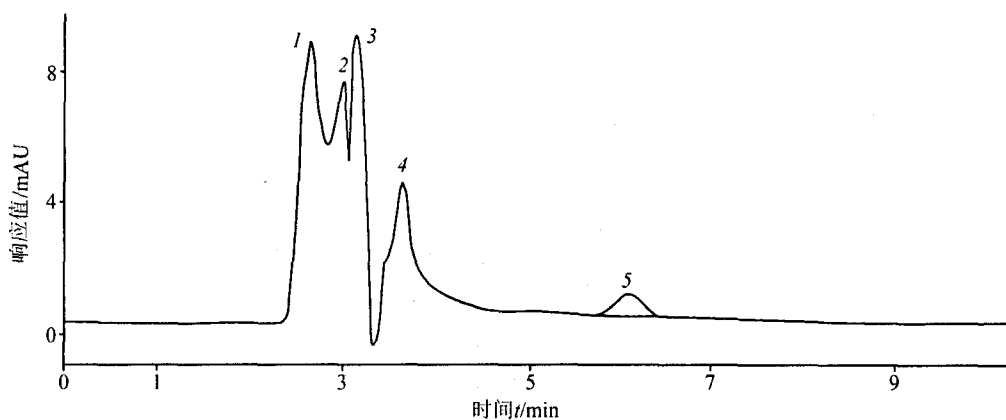


图 1 锡金微孔草样品的液相色谱图

1,3,4——未知物; 2——甲醇溶剂峰; 5——脱落酸($t_r=5.96\text{min}$)

2.2.2 对照品溶液的制备

准确称取 5.0mg 脱落酸标准品, 用甲醇溶解并定容于 50mL 容量瓶中, 即得 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备母液。取标准品储备母液 1mL, 移入 100mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 即得 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。标准品储备母液和储备液于 4℃ 冰箱中保存。

2.2.3 供试品溶液的制备

液液萃取法(LLE法): 快速称取约 2.000g 微孔草新鲜茎叶, 加入预冷的研钵中, 倒入适量的液氮研磨, 快速反复进行几次得到粉末; 将粉末移入烧杯中, 加入预冷的 80% 甲醇 20mL, 4℃ 冰箱中避光浸提 12h, 抽滤, 得滤液; 滤渣用 20mL 80% 甲醇 4℃ 浸提 2h, 抽滤, 合并滤液; 将滤液减压浓缩至水相, 加 5% 盐酸酸化 pH 为 2.8—3.0, 加入同体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 得乙酸乙酯相; 将乙酸乙酯减压浓缩至干, 再用甲醇溶解定容在 10mL 容量瓶中。经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤到进样瓶中即得, 保存于 4℃ 冰箱中。

分散液液微萃取法(DLLME法): 快速称取约 2.000g 微孔草新鲜茎叶, 加入预冷的研钵中, 倒入适量的液氮研磨, 快速反复进行几次得到粉末; 将粉末移入烧杯中, 加入预冷的 80% 甲醇 20mL,

4℃冰箱中避光浸提 12h,将样品转入离心管中,4000r/min 离心 5min,取出上清液,沉淀物用 20mL 80%甲醇 4℃浸提 2h,4000r/min 离心 5min,合并上清液。取 2mL 上清液(pH3)于离心管中,快速加入 1mL 乙酸乙酯(含有 100 μ L 氯仿)立即振摇 3min 乳化,以 5000r/min 离心 5min,溶液分层,取下层溶液 10 μ L 进样。

3 结果与讨论

3.1 线性关系和检出限考察

分别准确移取 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0mL 的脱落酸(ABA)标准品储备液于 6 个 100mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,得到浓度分别为 2.0、5.0、10、20、50、100ng \cdot mL⁻¹的标准系列溶液,分别准确吸取 2mL 标准系列溶液,按 2.2.3 项中的 DLLME 法进行样品的前处理,进样 10 μ L,按 2.2.1 项下确定的色谱条件进行测定,并记录峰面积。以浓度(μ g/mL)为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),得回归方程为: $y=0.04379x-42.7675$, $r=0.9995$,表明脱落酸在 0.0285—1.14 μ g/mL,浓度与峰面积呈良好的线性关系。检出限为 0.0008 μ g/mL($S/N=3$)。标准品的图谱见图 2。

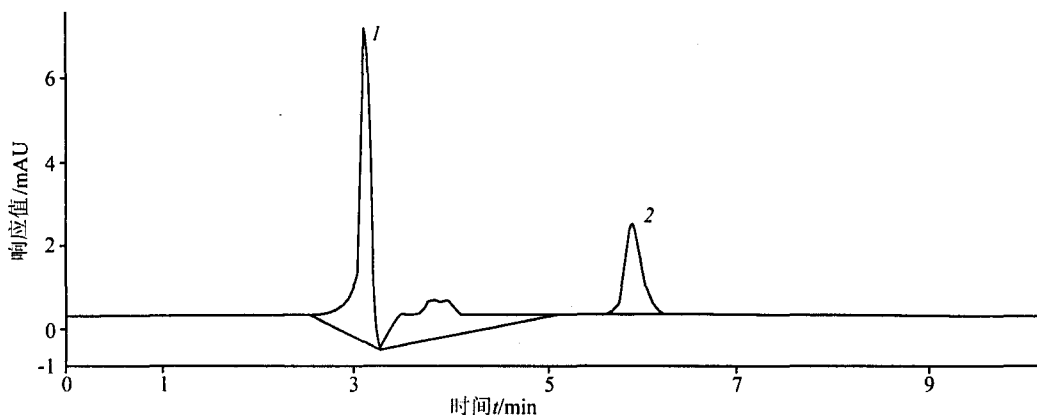


图 2 脱落酸标准(570ng/mL)液相色谱图

1—甲醇溶剂峰;2—脱落酸($t_r=5.96$ min)。

3.2 精密度实验

取浓度为 20ng \cdot mL⁻¹的标准溶液 2mL,按 2.2.3 项中的 DLLME 法进行样品的前处理,进样 10 μ L,连续进样 5 次,按 2.2.1 项下确定的色谱条件进行测定,结果脱落酸峰面积面积的 RSD 为 0.259%,进样精密度符合要求。

3.3 重复性实验

取同一批样品 5 份,精密称量 2.0g,按 2.2.3 项中的 DLLME 法操作,制得 5 份供试品溶液,进样 10 μ L,按 2.2.1 项下确定的色谱条件进行测定,结果表明脱落酸峰面积的 RSD 为 1.07%,说明重复性好。

3.4 稳定性实验

准确称取样品 2.0g,按 2.2.3 项中的 DLLME 法操作,制得供试品溶液后于 0,2,4,6,8h,进样 10 μ L,按 2.2.1 项下确定的色谱条件进行测定,结果表明脱落酸峰面积的 RSD 为 1.53%,说明供试品溶液在 8h 内稳定。

3.5 加标回收实验

以重复性实验所得脱落酸平均含量为该批次样品中脱落酸的含量(0.2950 μ g \cdot g⁻¹),准确称取

样品 9 份, 每份约 1.0g, 分别加入脱落酸标准品储备液 0.1、0.2、1.0mL (含脱落酸 0.144 μ g、0.288 μ g、1.44 μ g) (每个浓度 3 份), 按 2.2.3 项中的 DLLME 法进行样品的前处理操作, 制得 9 份供试品溶液, 进样 10 μ L, 按 2.2.1 项下确定的色谱条件进行测定, 加样回收试验结果见表 1。测得脱落酸低浓度加入样品的平均回收率 ($n=3$) 为 93.12%, RSD 为 1.47%; 脱落酸中浓度加入样品的平均回收率 ($n=3$) 为 91.35%, RSD 为 0.99%; 脱落酸高浓度加入样品的平均回收率 ($n=3$) 为 90.99%, RSD 为 1.58%。

表 1 加标回收实验结果

	取样量 (g)	样品中量 (μ g)	加入量 (μ g)	测得量 (μ g)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	1.0029	0.2958	0.114	0.388	94.6803		
2	1.0087	0.2976	0.114	0.381	92.5656	93.1181	1.4735
3	1.0009	0.2953	0.114	0.377	92.1085		
4	1.0036	0.2961	0.228	0.483	92.1579		
5	1.0014	0.2954	0.228	0.479	91.5170	91.3493	0.9899
6	1.0089	0.2976	0.228	0.475	90.3729		
7	1.0007	0.2952	1.140	1.300	90.5797		
8	1.0011	0.2953	1.140	1.329	92.5939	90.9977	1.5754
9	1.0004	0.2951	1.140	1.289	89.8195		

3.6 样品的测定

取不同样品 6 份, 准确称量 1.0g, 按 2.2.3 项中的 DLLME 法进行样品的前处理, 制得 6 份供试品溶液, 进样 10 μ L, 按 2.2.1 项下确定的色谱条件进行测定, 样品中脱落酸的含量见表 2。测得微孔草样品的脱落酸含量为 0.2045—0.4425 μ g/g。

表 2 样品中脱落酸含量测定值

样品编号	1	2	3	4	5	6
含量(μ g \cdot g ⁻¹)	0.2045	0.2596	0.2974	0.3397	0.4317	0.4425

3.7 提取方法的研究

比较经典的液液萃取法 (LLE) 和分散液液微萃取法 (DLLME) 的差别。液液萃取法, 测定结果脱落酸与周围物质分离效果一般, 而且脱落酸峰很小, 前处理时间长, 消耗有机溶剂量大。表明液液萃取法只适合于植物样品中脱落酸含量较高, 样品量较大的样品。分散液液微萃取法 (DLLME), 整个提取过程时间短, 有机溶剂用量少, 提取效率高, 富集倍数显著 (50—500 倍), 样品溶液中有明显的脱落酸峰, 避免了被样品中的杂质峰误判现象的发生。适合于检测植物样品中脱落酸含量相对低的样品和生长阶段, 为研究脱落酸的植物生理变化规律提供了更好的检测方法。

3.8 萃取剂和分散剂种类及用量的选择

用丙酮、乙酸乙酯和甲醇作分散剂, 用氯仿、四氯化碳和氯苯作萃取剂, 进行试验, 结果表明: 选用乙酸乙酯作分散剂、氯仿作萃取剂时效果最好。在乙酸乙酯 1.0mL 的条件下, 分别考察氯仿加入量为 50、75、100、150 μ L 时对萃取效率的影响。结果表明: 当氯仿加入 100 μ L 时, 萃取效率达到最大值, 试验选择氯仿用量为 100 μ L。在氯仿 100 μ L 条件下, 分别考察了乙酸乙酯加入量为 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5mL 时对萃取效率的影响。结果表明: 当乙酸乙酯加入量为 1.0mL 时, 萃取效率达到最大值, 试验选择乙酸乙酯的加入量为 1.0mL。

3.9 pH 的选择

溶液的 pH 决定酸性或碱性物质的存在状态, 对提取效率有很大影响。本试验考察了 pH 3—7

范围内提取效率的变化,结果显示 pH 为 3 时提取回收率最高。

4 结论

微孔草作为青藏高原高寒草原常见植物,脱落酸在微孔草植物体内的积累反映其在低温,高紫外辐射,低氧条件适应能力的强弱,与不饱和脂肪酸等次生代谢产物的合成可能存在密切的关系。本实验建立的微孔草植物体内源性脱落酸的含量测定方法,有助于进一步开展微孔草耐低温胁迫与有效成分积累相关机制的研究,有很好的植物生理生态学研究意义,为进一步揭示高原植物的低温胁迫适应机理和抗逆条件下的植物适应研究提供了更有效的研究方法。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 151—175.
- [2] 李京民, 王静萍, 于凤兰. 微孔草油中脂肪酸的分离和鉴定[J]. 植物学报, 1989, 31(1): 50—53.
- [3] 韩发, 程大志, 师生波等. 我国优质野生植物微孔草资源的研究与开发利用进展[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(5): 5—9.
- [4] 姚春鹏, 李娜. 植物激素脱落酸受体的研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(6): 718—724.
- [5] Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M R M *et al.* Determination of Organic Compounds in Water Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1116(1—2): 1—9.
- [6] Tani H F, Kamidate T, Watanabe H. Micelle-mediated Extraction[J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, 780(1—2): 229—241.
- [7] 陈丽惠, 卢巧梅, 张兰等. 分散液液微萃取-高效液相色谱-荧光检测法分析植物生长素[J]. 分析化学, 2009, 37(A02): 299.
- [8] 郝格格, 孙忠富, 张录强等. 脱落酸在植物逆境胁迫研究中的进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(18): 212—215.

Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography for Determination of Endogenous Hormone Abscisic Acid in *Microula sikkimensis*

PI Li^{a,b,c} HU Feng-Zu^a HAN Tao^{a,b,c} LI Yi-Kang^{a,b,c} ZHAO Xiao-Hui^{a,b,c} HAN Fa^{a,c}

^a(Northwest Institute of Plateau Biology, CAS Qinghai, Xining 810008, P. R. China)

^b(Graduate University Chinese Academy of Science Beijing 100049, P. R. China)

^c(Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, CAS Qinghai, Xining 810008, P. R. China)

Abstract An dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)-HPLC method for the determination of endogenous hormone abscisic acid in *Microula sikkimensis* was established. The optimized dispersive liquid-liquid microextraction conditions were as follows: the volume of extractant (chloroform) was 100 μL , the volume of dispersive solvent (Ethyl acetate) was 1.0 mL, and the value of pH was fixed at 3.0. Under the optimum condition, good linearity was obtained in the range of 0.0285—1.14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ abscisic acid and the limit of detection was 0.0008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at $S/N=3$, respectively, with the correlation coefficient (0.9995). The relative recovery varied from 90.99% to 93.12%, and the RSD was in the range of 0.99%—1.57% ($n=3$). The method was simple, sensitive, low environmental pollution and can be used to determine the trace level of abscisic acid in *Microula sikkimensis*.

Key words Dispersive Liquid-Liquid Microextraction; *Microula sikkimensis*; Phytohormone; Abscisic Acid; HPLC