

马晓颖, 杨 镇, 宋艳雨, 等. 高效毛细管电泳-二极管阵列检测法测定微生物代谢产物中的植物激素含量[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 169-172.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.048

# 高效毛细管电泳-二极管阵列检测法测定微生物代谢产物中的植物激素含量

马晓颖, 杨 镇, 宋艳雨, 祝永刚, 杨 涛

(辽宁省农业科学院微生物工程中心, 辽宁沈阳 110161)

**摘要:**建立同时分离测定微生物代谢产物中吲哚乙酸、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸的毛细管电泳-二极管阵列检测器新方法。研究检测波长、缓冲体系、缓冲体系的 pH 值及浓度、分离电压、进样时间等因素。结果表明, 在运行缓冲液 75 mmol/L 硼砂缓冲液 (pH 值为 9.0)、75 mmol/L 硼酸缓冲液、检测波长 218 nm、分离电压 20 kV、温度 25 ℃ 的条件下, 吲哚乙酸、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸在 0.1 ~ 5.0 mg/mL 内呈较好的线性关系。测得微生物代谢产物中含有细胞分裂素和脱落酸, 利用标准曲线获得回归方程测得含量为 60.93、22.62  $\mu\text{g/mL}$ 。细胞分裂素和脱落酸迁移时间的相对偏差 RSD 分别为 0.13%、0.126%; 迁移峰面积 RSD (%) 分别为 1.01%、1.92%, 回收率分别为 90.1% ~ 94.8%、95.8% ~ 96.2%。因此, 该方法适用于微生物代谢产物中植物激素的测定。

**关键词:**高效毛细管电泳; 二极管阵列检测; 植物激素; 微生物代谢产物

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0169-03

为了实现农业部在扎实推进的“到 2020 年化肥使用量零增长行动”和“到 2020 年农药使用量零增长行动”, 重点研发高效缓释肥料、高效低毒低残留农药、生物肥料农药等新型产品是十分必要的, 而植物激素是被公认的用量少、效果好的植物生长调节剂。微生物天然代谢产物拥有来源安全、对土地环境友好等特点, 在未来具有极大的发展潜力。

传统的生物鉴定法对植物激素的测定难以满足准确定量分析的要求, 文献报道的高效液相色谱法等虽可获得较准确的结果, 但存在操作繁琐、灵敏度差、费用较高的缺点。毛细管电泳技术 (HPCE) 源自传统电泳技术, 具有微量、准确、成本低、污染少、分析时间短、自动化程度高的优点<sup>[1]</sup>。二极管阵列检测器可以同时检测在 190 ~ 300 nm 波长下样品的出峰情况, 并带有 3D 效果的检测峰形, 可以更加直观地判断样品的真实情况, 判断出是否为非正常样品的出峰情况。本研究以微生物代谢产物为测定目标, 利用高效毛细管-二极管阵列同时测定其中的 4 种植物激素, 并建立了高效快速的植物激素含量测定方法。该方法简单可靠、重复性好, 不仅可用于微生物代谢产物中植物激素含量的测定, 对其他样品中的植物激素的定性、定量检测都有一定的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器: P/ACE MDQ 毛细管电泳仪 (美国贝克曼公司);

收稿日期: 2016-02-16

基金项目: 辽宁省科学事业公益研究基金 (编号: 2014002003)。

作者简介: 马晓颖 (1985—), 女, 辽宁沈阳人, 硕士, 研究实习员, 主要从事微生物资源方向的研究。Tel: (024) 31025877; E-mail: mxy851001@126.com。

通信作者: 杨 涛, 博士, 研究员, 主要从事微生物资源方向的研究。

Tel: (024) 31025877; E-mail: 383440126@qq.com。

未涂层石英毛细管 (75  $\mu\text{m} \times 57$  cm, 有效检测长度 48 cm) (美国贝克曼公司); 精密 pH 计 (北京泰亚赛福科技发展有限公司); 高速台式冷冻型离心机 (德国 Sigma 公司); 超声波清洗器 (江苏昆山市超声仪器有限公司); 紫外分光光度计 [尤尼柯 (上海) 仪器有限公司]; HZQ-QX 全温振荡器 (黑龙江省哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 干热消毒箱 (上海精宏实验设备有限公司); DOA-P504-BN 真空泵 (IDEX 公司); ETS-D5 磁力搅拌器、A11 高速粉碎机 (德国 IKA 集团)。Cascada™ 实验室超纯水系统 (Pall corporation)。

试剂: 微生物菌种来源于辽宁省农业科学院微生物工程中心; 吲哚乙酸 (IAA) 标样, 赤霉素 (GA), 细胞分裂素 (6BA), 脱落酸 (ABA) (北京奥博星生物技术有限责任公司); 试验过程用的试剂均为分析纯和色谱纯; 试验用水为超纯水。

### 1.2 试验方法

新毛细管用甲醇冲洗 3 min, 1 mol/L 的 HCl 冲洗 2 min, 0.1 mol/L NaOH 冲洗 1 min, 去离子水冲洗 0.5 min。活化好的毛细管使用前用 0.1 mol/L 的 NaOH、水、电泳缓冲液分别冲洗 1、2、3 min; 每次进样之间, 用缓冲液冲洗 2 min, 冲洗压力为 20 psi。所有溶液在进入毛细管前, 均用 0.22  $\mu\text{m}$  的水系微孔滤膜过滤。

样品处理: 将发酵后的微生物用双层纱布过滤, 用蒸馏水冲洗 3 次后 60 ℃ 下烘干, 称质量。然后采用高速粉碎机粉碎, 用 10 倍体积乙醇浸提 24 h, 用磁力搅拌器将其混匀, 超声波振荡 1 h, 真空抽滤, 用以上方法再提取 2 次, 收集 3 次滤液备用。将处理好的微生物代谢产物 1 mg/mL 用 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的有机滤膜过滤, 收集滤液加同体积的运行缓冲液作为样品溶液。

对照品的配制: 将吲哚乙酸、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸分别配成 1 mg/mL 的母液, 用甲醇溶解。上述溶液均用

0.22  $\mu\text{m}$  孔径的有机滤膜过滤,超声除气,置于冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 电泳条件

未涂层石英毛细管 (75  $\mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$ , 有效检测长度 48 cm); 运行缓冲液为 75 mmol/L 硼砂缓冲液 (pH 值为 9.0); 75 mmol/L 硼酸缓冲液; 检测波长 218 nm; 分离电压 20 kV; 温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 压力 0.5 psi 进样 10 s, 样品运行时间为 20 min, 4 种植物激素运行时间为 15 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效毛细管电泳-二极管阵列检测法条件的优化

选用 pH 值为 9.0 的 75 mmol/L 硼砂缓冲液、75 mmol/L 硼酸缓冲液作为运行缓冲液及分离缓冲液。压力 0.5 psi 进样 10 s, 并在此条件下进行波长优化及电压优化。为选取适当的检测波长, 采用 PDA 检测器对 4 种激素标准品溶液在波长为 190~300 nm 范围内进行扫描, 发现 4 种植物激素具有不同的最适分离波长, 但在 218 nm 处能够达到同时出峰且分离效果较好, 故选取此波长作为检测波长。

在确定进样时间方面, 进行 5、10、20 s 进样时间的测定, 结果表明, 进样 5 s 峰形不完整, 20 s 浓度太高, 连峰情况增多, 故选用 10 s 为样品的进样时间。

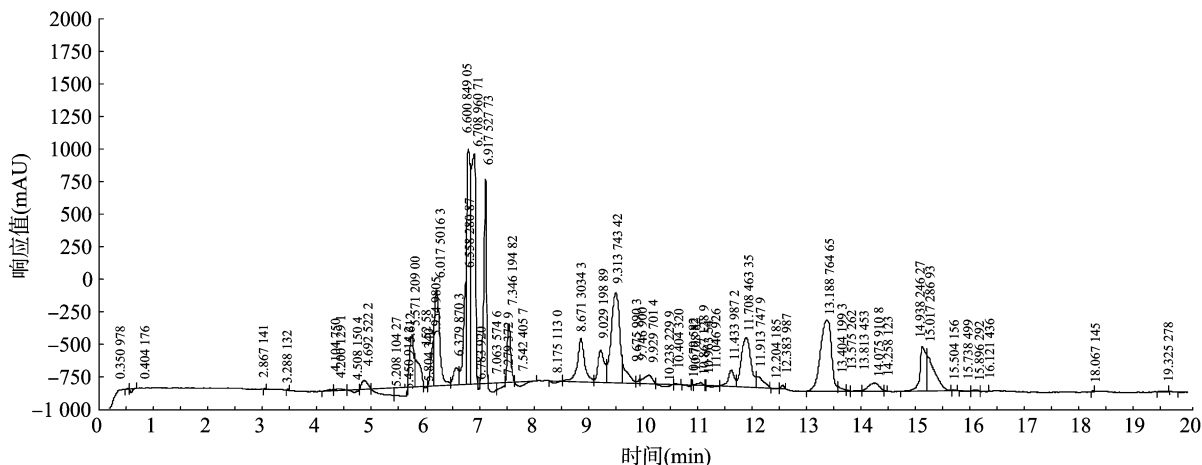
在优化分离电压时, 比较分析 15、20、30 kV 3 个不同电压下 4 种植物激素迁移与分离情况。发现在 15 kV 时, 基线不好; 30 kV 时出峰延迟, 峰形拖尾, 故最终选择 20 kV 作为电泳测定的运行电压。

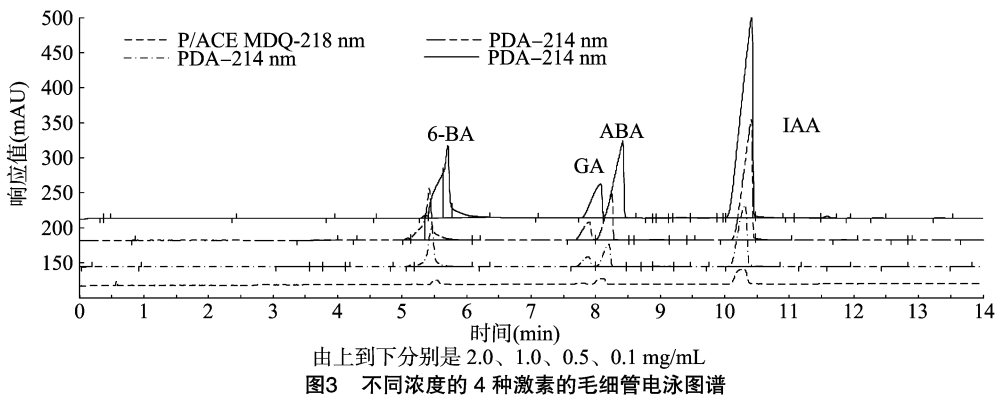
试验常用磷酸盐、硼砂等缓冲体系对 4 种植物激素的分离进行考察, 以选取合适的缓冲体系。通过磷酸盐缓冲液不同的 pH 值, 确定分离样品的最适分离 pH 值, 通过试验比较发现, 用 pH 值为 9.0 的磷盐溶液分离时, 样品的分离效果较好, 故选择碱性缓冲液硼砂溶液进一步进行优化。

选择 10、20、50、75 mmol/mL 硼砂缓冲液对 4 种植物激素进行分离。结果发现, 当硼砂缓冲液浓度达到 75 mmol/mL 时, 样品和对照品的分离效果最佳, 分离度和峰形都达到了相对最好的情况, 故选择 75 mmol/mL 及 pH 值为 9.0 的硼砂、75 mmol/L 硼酸缓冲液缓冲体系作为最终运行缓冲液。

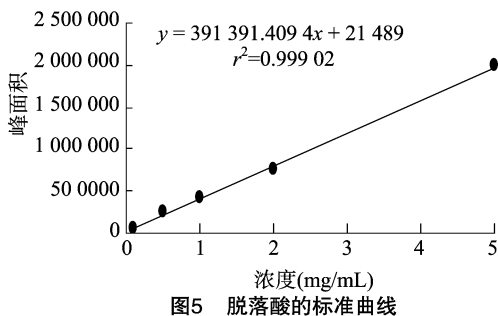
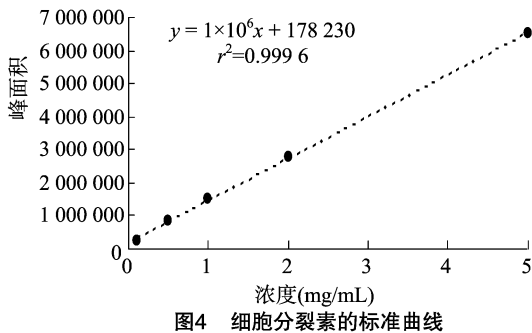
### 2.2 高效毛细管电泳-二极管阵列检测法对微生物代谢产物中 4 种激素的测定

**2.2.1 定性测定** 根据图 1、图 2 可知, 微生物代谢产物指纹图谱中含有与细胞分裂素 (6-BA) 和脱落酸 (ABA) 保留时间相同的物质, 与赤霉素 (GA) 和吲哚乙酸 (IAA) 的图谱没有重合峰, 说明微生物代谢产物中含有细胞分裂素和脱落酸, 不含有吲哚乙酸和赤霉素。





根据毛细管电泳中的定量计算方法,将植物激素标准品配成浓度为 0.1、1.0、2.0、5.0 mg/mL,分别进行进样,以浓度( $x$ )为横坐标,峰面积( $y$ )为纵坐标建立标准曲线方程(图4、图5)。



毛细管电泳仪最佳条件下,细胞分裂素电泳峰面积与浓度在 0.1 ~ 5.0 mg/mL 范围内呈现良好的线性关系,回归方程为  $y = 715\,236.440\,4x - 22\,680$ ,相关系数  $r^2 = 0.999\,23$ ,最低检测限(LOD)为 0.14  $\mu\text{g/mL}$ 。脱落酸回归方程为  $y = 391\,391.409\,4x + 21\,489$ ,相关系数  $r^2 = 0.999\,02$ ,最低检测限(LOD)为 0.28  $\mu\text{g/mL}$ 。将目的峰的峰面积带入方程,得细胞分裂素的含量为 60.93  $\mu\text{g/mL}$ ,脱落酸含量为 22.62  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.2.2 重复性和精密性试验 取同一浓度的细胞分裂素标准样品和脱落酸标准品连续进样 5 次。测细胞分裂素迁移时间的相对偏差  $RSD$  为 0.13%,迁移峰面积  $RSD$  为 1.01%。脱落酸迁移时间的相对偏差  $RSD$  为 0.126%,迁移峰面积  $RSD$  为 1.92%。准确度验证采用回收率法进行试验。量取 3 份样品,分别加入不同量的标准溶液进行测定,实测添加量与标准添加量之比为回收率。通过试验,测得细胞分裂素的回收率在 90.1% ~ 94.8% (表 1),脱落酸的回收率为 95.8% ~ 96.2%。

表 1 样品中添加细胞分裂素回收率试验结果

待测组分	原有量 ( $\mu\text{g/L}$ )	加入量 ( $\mu\text{g/L}$ )	测得量 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收率 (%)
6-BA	60 930	20 465	73 533	90.3
6-BA	60 930	60 930	109 777	90.1
6-BA	60 930	182 790	231 150	94.8
ABA	22 620	11 310	32 576	96.0
ABA	22 620	22 620	43 533	96.2
ABA	22 620	67 860	86 671	95.8

### 3 讨论

测定植物激素前该微生物代谢产物进行过玉米种子的催芽,稀释 10 000 倍的效果显著,而 500 倍的提取物对玉米生长起到了抑制作用,这与植物激素的作用相一致,利用高效毛细管电泳对其中的植物激素进行测定,测得其含有细胞分裂素和脱落酸。但细胞分裂素和脱落酸在植物体内的作用机理尚不明确,产生的植物促生长是联合作用还是有某一单独成分起作用还有待深入研究。

传统的生物鉴定法对植物激素的测定难以满足准确定量分析的要求,文献报道的高效液相色谱法等虽可获得较准确的结果,但存在操作繁琐、灵敏度差、费用较高的缺点。毛细管电泳技术(HPCE)源自传统电泳技术,具有微量、准确、成本低、污染少、分析时间短、自动化程度高的优点。本研究以人参内生真菌菌丝为测定目标,利用高效毛细管法来测定其中的植物激素,通过不同种、不同 pH 值缓冲液、不同分离电压及不同进样时间等条件优化后,确定了本试验的电泳条件,在建立分离效果较好的真菌代谢产物的指纹图谱的同时,也将各种激素的出峰时间控制在 15 min 以内,节省了工作时间和成本,可以实现替代高效液相法测定植物激素,避免有机溶剂对人和环境的伤害,为植物激素的测定方法提供了一定的参考价值。

### 参考文献:

[1] 马晓颖,贾东贝,李冰宇,等. 利用高效毛细管电泳测定真菌代谢产物吡啶乙酸含量[J]. 江苏农业科学,2011,39(3):439-441.

[2] 饶钦雄,童敬,郭平,等. 高效毛细管电泳测定鸡蛋中三聚氰胺[J]. 分析化学,2009,37(9):1341-1344.

[3] 郭芳芳,冯锋,白云峰,等. 高效毛细管电泳-紫外检测法同时检测雪糕中多种添加剂[J]. 食品科学,2015,36(8):206-210.

师仁丽,于文龙,梁娜,等.大孔吸附树脂分离纯化金丝小枣总黄酮工艺研究[J].江苏农业科学,2017,45(8):172-175.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.049

# 大孔吸附树脂分离纯化金丝小枣总黄酮工艺研究

师仁丽,于文龙,梁娜,张群,王向红

(河北农业大学食品科技学院,河北保定 071001)

**摘要:**以静态吸附与解吸率为指标,考察了6种大孔吸附树脂对金丝小枣总黄酮的分离纯化效果,从而筛选出1种效果最佳的大孔吸附树脂。采用正交优化的方法确定出纯化金丝小枣总黄酮的工艺参数。确定AB-8树脂对金丝小枣总黄酮的分离纯化效果最好,其对金丝小枣总黄酮的吸附率可达88.57%,解吸率为99.71%。最佳工艺条件为上样液pH值为3、吸附流速3 mL/min、上样浓度0.35 mg/mL、洗脱剂为70%乙醇,此时总黄酮收率可达到93.39%。同时,绘制了泄露曲线与解吸曲线,确定了最佳上样体积与洗脱剂用量分别为40、70 mL。

**关键词:**金丝小枣;黄酮;大孔吸附树脂;纯化

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0172-04

枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)是鼠李科(Rhamnaceae)枣属植物的成熟果实,原产于中国,栽培已有4 000年的历史<sup>[1]</sup>。红枣营养价值高,且有很高的药用价值,是营养和医疗保健的优质滋补果品,是很重要的食用材料和经济产品,享有“营养保健丸、木本粮食”的美誉<sup>[2]</sup>。由于其具有抗氧化、抗炎、抗癌、保护心肌等功能而被用作营养食品和传统药品<sup>[3]</sup>。金丝小枣广泛分布在河北沧州一带,果核细小、可食率达97%、含可溶性固形物40%~45%、制干率约55%、质脆细嫩、品质优良等特点<sup>[4]</sup>。

黄酮类化合物是植物产生的一类次生代谢产物,是一类重要的天然化合物,对人体健康起着重要的作用。大量研究表明黄酮类物质具有降血压、降血脂、增大心脏血流量、增强心脏收缩、减少心脏搏动数、止咳祛痰、抗菌消炎的功效<sup>[5]</sup>。

在提取的粗黄酮中一般含有多种杂质,如糖类、色素、蛋白质、氨基酸等。为了提高黄酮纯度,需要对粗提物进行进一步的分离纯化,从而提高黄酮含量。目前,使用的黄酮类化合物纯化方法很多,主要有柱层析、薄层层析、气相层析、溶剂萃取、沉淀法等方法,在工业生产中均存在一定的缺点。大孔吸

附树脂纯化法是目前使用最为广泛的纯化方法<sup>[6-7]</sup>。该技术具有生产成本低、周期短、效率高、可再生等优点,所以在天然产物有效成分的分离技术中有较好的应用发展趋势。

本试验选取6种在黄酮类化合物纯化中应用较为广泛的大孔吸附树脂,通过研究金丝小枣黄酮类化合物在不同树脂上的静态吸附、解吸效果,从而选择出1种精制金丝小枣黄酮较理想的吸附树脂,并采用正交优化法对该树脂的各种纯化工艺参数进行研究,以期对金丝小枣黄酮的分离纯化提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

金丝小枣,购自河北省沧州市;芸香苷对照品(≥99%),购自上海源叶生物科技有限公司;石油醚(60~90℃)、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、盐酸,购自天津市天力试剂;AB-8树脂、D-101树脂、HPD-600树脂、ADS-17树脂、HPD-826树脂、聚酰胺树脂,购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司;101-OAB电热鼓风干燥箱,购自天津市泰斯特仪器有限公司;UV-2008H型紫外可见分光光度计,购自上海UNIC公司;HT-300BQ型数控超声提取器,购自天津市瑞普电子仪器公司;DZWK-C型恒温水浴锅,购自北京市光明医疗仪器厂;BS-214D型电子分析天平,购自Sartorius公司;TGL-16M快速离心机,购自浙江金坛市杰瑞尔电器有限公司;层析柱,购自华美仪器公司;RE-52A型旋转蒸发仪,购自上海亚荣生化仪器厂;真空恒流泵,购自上海沪粤明科学仪

收稿日期:2016-02-23

基金项目:国家林业局公益性行业科研专项(编号:201304708)。

作者简介:师仁丽(1990—),女,硕士,主要研究方向为食品工程。

E-mail:15231228206@163.com。

通信作者:王向红,女,教授,博士生导师,主要研究方向为食品营养与安全。E-mail:wangxianghong73@sina.com。

[4]李利军,冯军,黄文艺,等.高效毛细管电泳同时分离测定栀子苷、芍药苷及丹皮酚的研究[J].分析试验室,2007,26(5):38-41.

[5]彭进进,罗泽娇,李龙媛.高效毛细管电泳-二极管阵列检测法测定土壤中的苯酚[J].分析科学学报,2012,28(1):98-100.

[6]张泽宇,李林志.高效毛细管电泳法测定地榆中没食子酸的含量[J].中国药师,2015,18(7):1233-1235.

[7]张云伟,万勇平,鄢兵,等.超高效液相色谱法测定水果中3种外源植物激素[J].中国卫生检验杂志,2015,25(14):2277-

2279,2283.

[8]刘宏程,林涛,邵金良,等.高效液相色谱测定水果中外源植物激素的快速前处理方法研究[J].分析科学学报,2014,30(4):497-500.

[9]牟艳莉,郭德华,丁卓平,等.高效液相色谱-串联质谱法测定瓜果中11种植物生长调节剂的残留量[J].分析化学,2013,41(11):1640-1646.

[10]钟宁,侯彩云.高效毛细管电泳测定液态乳中乳糖[J].中国乳品工业,2011,39(10):44-47.