

反相高效液相色谱分析赤霉素 GA₃ 含量

朱曙东 赵 琛 赵文君 赵升皓

(徐州医学院生物化学研究室, 徐州 221002)

提要 以 μ Bondapak C₁₈ 柱建立了赤霉素 GA₃ 的 HPLC 分析方法。反相 HPLC 梯度条件可使 GA₃ 与包括双键异构体 GA₁ 在内的其它同系物通过离子配对机制获得分离。此法操作简便, 不需衍生化; 分析快速, 色谱全程仅 15 min; 检测灵敏, 0.5 μ g 即可准确定量; 线性 ($r=0.999, n=5$)、重复性 (RSD < 2%, $n=4$) 均佳; 结果准确。优越性全面超出各传统分析方法, 可望成为赤霉素质量分析的标准方法。

关键词 赤霉素 A₃ (GA₃); 反相高效液相色谱

赤霉素是重要的植物生长激素, 其同系物很多⁽¹⁾, 其中 GA₃ 生理活性最大, 因此 GA₃ 含量多寡被视作赤霉素质量的直接标准。赤霉素含量的检测方法有溴酸钾滴定法⁽²⁾、高锰酸钾目视比色法⁽²⁾、荧光法⁽³⁾、2,4-二硝基苯肼比色法⁽²⁾、钼蓝光度法⁽⁴⁾和福林光度法⁽⁵⁾。这些方法都只能检测同系混合物的总量, 不能分辨各有效成分, 尤其是 GA₃ 含量, 因此不符合检验标准, 特别是不能满足出口检验要求。作者运用 RP-HPLC 成功地将 GA₃ 与其它组分分离, 建立了精确测定 GA₃ 含量的新方法。此法不仅结果准确, 而且步骤简便, 不需衍生化; 灵敏度高, 0.5 μ g 即可准确分析; 分析速度快, 色谱全程仅需 15 min; 重复性、线性均好; 优越性全面超过各传统分析法。此法对赤霉素生产质量监控具有重要的意义。

实 验 部 分

样品、试剂与仪器

GA₃ 标准品购自 Sigma (USA), GA₁ 标准品为 N. Murofushi 教授所赠, 待检样品来自徐州生化厂。甲醇为 HPLC 级。氢氧化钾、磷酸为优级纯。高纯水以 Milli-Q II 系统自制。

UV-200 双光束光度计 (Shimadzu, Japan)。组合高效液相色谱仪 (Waters, USA), 包括 680 型自动梯度控制仪、U6K 型进样器、510 型溶剂输送泵 ($\times 2$)、控温系统、481 型紫外检测器与 740 型数据处理机。色谱柱为 μ Bondapak C₁₈ (8~10 μ m, 3.9 mm \times 30 cm, Millipore, USA)。Milli-Q II 超纯水系统与 Organex-Q Cartridge (Millipore)。AT261 DeltaRange 电子天平 (Mettler, Switzerland)。pH 检测器 (Pharmacia, Sweden)。国产电热恒温真空干燥箱。

色谱分析

流动相 A 为含 20% 甲醇、0.01 mol/L H₃PO₄ 水溶液, pH 2.30。流动相 B 为含 40% 甲醇、0.01 mol/L H₃PO₄ 水溶液, pH 2.50。流动相应用前以 0.45 μ m HA 滤膜 (Millipore) 过滤。

梯度: 0 \rightarrow 15 min, 100% A \rightarrow 100% B, curve 7 (Waters AGC); 15 \rightarrow 20 min, 100% B。流速: 2 ml/min。柱温 25 $^{\circ}$ C。检测波长: 207 nm。进样量: 20 μ l。

赤霉素粉剂试样分析

赤霉素样品分析前45℃加热干燥(加 P₂O₅) 5 h。准确称取6~10 mg 粗品或 GA₃标准品,溶于25 ml 流动相 A 中,混匀。以 Sep-Pak C₁₈ Cartridge 快速滤过,即可上柱分析。以标准品为对照,根据峰面积(S)与称重(W)即可计算出赤霉素产品中 GA₃含量。

$$\text{赤霉素含量(\%)} = \text{标准赤霉素含量(\%)} \times \frac{W_{\text{标准}}}{W_{\text{待测}}} \times \frac{S_{\text{待测}}}{S_{\text{标准}}}$$

结果与讨论

检测波长的选择

以流动相 A 作空白对照,用 UV-200双光速光度计扫描,得到赤霉素 GA₃标准(Sigma)溶液吸收光谱(图1)。结果表明 GA₃在203~218 nm 范围内有显著光吸收,最大吸收波长为207.0 nm,且附近无杂质干扰峰。为提高分析检测灵敏度,我们选用207.0 nm 作为以后的检测波长。

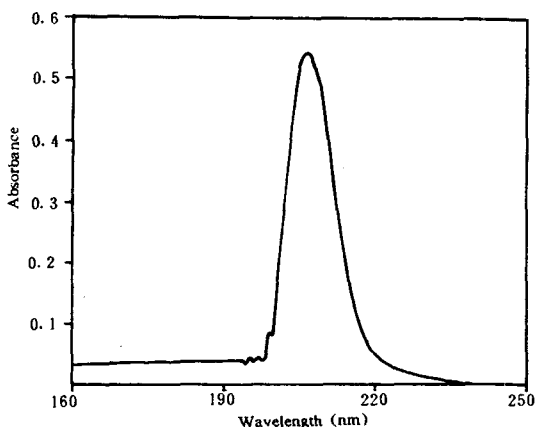


Fig 1 Ultraviolet absorption spectrum of gibberellin A₃.

色谱分离

GA₃与其双键异构体 GA₁在各同系物中疏水性差异最小,因而它们的 RP-HPLC 色谱行为(保留时间 t_R)最相近,因此 GA₃准确分析的关键是使它们相互分离。在我们发展的 pH 梯度洗脱条件下,GA₃与 GA₁可获得充分分离。图2表示含 GA₃, GA₁的样品分析结果。t_R13.88 min 处峰为 GA₃, 14.84 min 处为 GA₁峰。t_R8.36 min 与10.68 min 两峰可能为赤霉素的其它成分。

各 GA 成分均为弱酸,我们通过改变 pH 值的离子配对机制,配合微弱的甲醇梯度,使得不同 GA 分子的解离性质差异增大,从而影响其在反相吸附剂上的色谱行为,最终得到了出色的分离效果。pH 梯度避免了单纯甲醇梯度在207 nm 处检测引起的显著基线位移,可明显提高分析灵敏度与准确度。我们的色谱条件优化过程表明0.01 mol/L H₃PO₄与初始洗脱时较低的 pH 是维持 GA₃与 GA₁分离的重要因素。另外,我们还发现在较低 pH 处的轻微甲醇梯度对 GA₃和 GA₁前后的各赤霉素间保持优良的分辨率也是极其有利的。

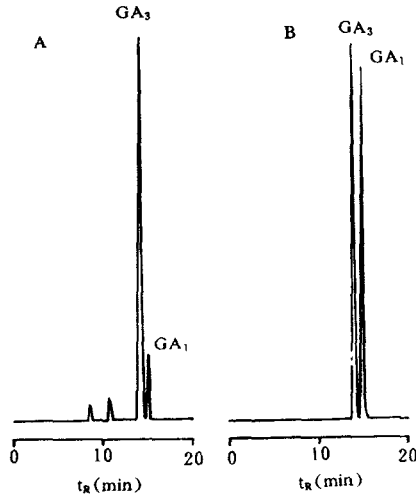


Fig 2 RP-HPLC chromatograms of gibberellins. A. Product from Xuzhou Biochemical Inc. ; B. GA₃ and GA₁ standard.

线性与检测极限

在浓度0.5~50 μg/20 μl 范围内,线性良好,相关系数 $r=0.999$ ($n=5$)。0.5 μg/20 μl 可作为准确分析下限,此时 GA₃面积积分值相对标准偏差为2.3%。

稳定性实验

GA₃甲醇溶液室温放置1月,前后测定 GA₃面积值并无变化,表明样品溶液可放置1月而不影响分析结果。这为生产过程中的长期、全程准确监控提供了可靠依据与方便。

方法的精密度

3个样品含量分析,得到相对标准偏差均在2%内(表1)。

Tab 1 Reproducibility of the method ($n=4$)

Sample	Relative standard deviation of peak area (%)	GA ₃ content (%)
1	1.3	74.8
2	0.7	91.7
3	1.1	93.3

试样1,2,3分别为粗品 GA₃与经过不同纯化步骤的产品,其中产品2及3已销售出口,并通过国外质量检验(GA₃含量>90%),这也佐证本文报道的测定方法是准确可靠的。

致谢 承日本东京大学 Noboru Murofushi 教授寄赠 GA₁标准品。

参 考 文 献

- Jensen E, et al. Analysis of gibberellin and gibberellins conjugates by ion-suppression reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1986;367:377.

- 2 中国科学院植物研究所、遗传研究所“920”编写小组. “920”农药技术资料汇编. 第1集. 北京: 科学出版社, 1970.
- 3 罗国安, 等. 荧光分光光度法测定赤霉素的含量. 中国药科大学学报 1990;21:187.
- 4 沈乃葵, 等. 赤霉素的钼蓝分光光度测定法. 药学报 1981;16:397.
- 5 印天寿, 等. 赤霉素的快速分光光度测定法的研究. 分析化学 1990;18:966.

DETERMINATION OF GIBBERELLIN A₃ BY REVERSED PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

SD Zhu, S Zhao, WJ Zhao and SH Zhao

(Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002)

ABSTRACT The analysis of gibberellin GA₃ by high performance liquid chromatography (HPLC) was carried out with μ Bondapak C₁₈ column. The developed reversed phase HPLC procedure enables the separation of different GAs with high resolution by means of ionic suppression, including the separation of double bond isomers GA₁ and GA₃. This method is convenient (without the necessity of derivatization), rapid (15 min for one overall run), sensitive (0.5 μ g is sufficient for precise assay), and has fine linearity ($r=0.999$, $n=5$) and reproducibility (relative standard deviation $< 2\%$, $n=4$).

Key words Gibberellin A₃(GA₃); Reversed phase high performance liquid chromatography