

植 物 激 素

罗 士 章 等 編

上海水產学院

4. 22 1963

圖書館生书章

上海科学技术出版社

植物激素的提取、分离和鉴定

关 颖 谦

引 言

1. 提取和分离
 1. 生长素类植物激素的提取和分离
 - 一、溶媒提取法
 - (1) 乙醚
 - (2) 甲醇
 - (3) 氟仿
 - (4) 水
 - 二、扩散法
 - 三、提纯方法
 - (1) 碳酸氢钠法
 - (2) 乙腈法
 - 四、层析法
 - (1) 纸上层析
 - (2) 柱层析
 2. 赤霉素类植物激素的提取和分离
 - 一、镰刀菌发酵产物中 GA₁、GA₂、GA₃、GA₄、GA₇ 和 GA₉ 的提取和分离
 - (1) 提取
 - (2) 分离提纯
 - 二、高等植物中赤霉素类物质的提取和分离
 - 三、赤霉素类激素的纸上层析法
 3. 激动素类植物激素的提取和分离
- II. 生物鉴定方法
 1. 生长素类植物激素的生物鉴定方法
 - 一、燕麦法
 - 二、豌豆法
 - 三、燕麦切段法
 - 四、燕麦第一节间法
 - 五、豌豆生根法
 - 六、根的伸长法
 2. 赤霉素类植物激素的生物鉴定方法
 - 一、以整株植物为材料的方法
 - (1) 水稻幼苗法
 - (2) 矮性玉米法
 - (3) 矮性豌豆法
 - (4) 其他方法
 - 二、以植物的离体茎或叶子为材料的方法
 - (1) 叶片法
 - (2) 玉米切段法
 3. 激动素类植物激素的生物鉴定方法
- III. 化学和物理鉴定方法
 1. 生长素类的化学和物理鉴定方法
 - 一、比色法
 - 二、荧光法
 2. 赤霉素类的化学和物理鉴定方法
 - 一、荧光法
 - 二、比色法
 - 三、其他
 3. 激动素类的化学和物理鉴定方法

参考文献

引 言

植物激素的提取、分离和鉴定工作，对激素的研究是非常重要的。例如根据在植物体内生长素类激素的分离和鉴定工作，我們已認識到，在最初发现的三个生长素化合物中，只有吲哚乙酸是普遍地存在于各种植物的組織中。此外，許多其他吲哚化合物或复合物以及一些吲哚乙酸的前体也是从植物中提出的。又如在赤霉素的研究方面，由于1955年提純的成功，才得到蓬勃发展的局面。至今不过六年多，但已經得到九种純的赤霉素类的化合物。此外証实了在近八十种植物中(Phinney 和 West, 1960)有赤霉素类似物质的存在，所以赤霉素类物质已与生长素类物质相提并列为植物体内重要的天然激素。至于有关激动素类激素的研究工作，也是由于1956年激动素的提純、分离获得成功，并肯定了它的結構式，从而人工合成的激动素才获得大大的进展，但是关于植物体中有天然激动素物质存在的証据尚不多。

如上所述，激素的提取、分离和鉴定工作已为这門学科的发展提供了不少的宝贵資料，然而在激素的研究中还存在着許多重要問題，有待于在系統、細致和精确的提取、分离和鉴定中来解决，例如：(1)新激素类物质的寻觅；(2)了解各种激素在植物各器官中形成和分布的比例；(3)研究已知和未知激素在植物中的各种轉化形式与它們的生理功能之間的关系。

本章扼要介紹激素的提取、分离和鉴定的方法，以供激素工作者参考。

I. 提取和分离

1. 生长素类植物激素的提取和分离

关于 IAA 类物质与它們的前体以各种形式存在于植物体中的事实，已有很多报导(見 Audus, 1959; Larsen, 1955; Fawcett, 1961)。但是由于它們的性质及生理意义至今仍无定論，所以自植物体中提取任何生长素也沒有标准化的方法。用各种不同方法所提出的 IAA 类物质的形式亦各异。一般可分为两种：一种是游离状态的生长素或称为可扩散的生长素(Audus, 1959)，这是指在 0°C 和不見光的条件下，用乙醚提取两小时所得到的生长素，它在植物体中的运动是有极性的，可以直接利用于植物的生长过程；另外一种是非扩散的生长素，这是指游离生长素提出后，殘留于植物組織中的吲哚化合物或复合物，必須采用較長時間的溶媒法才能从植物中提出，它們在植物体中的运动是沒有极性的，这些复合物在酶解、水解或自溶的过程中能釋放出游离的生长素。

但是游离及結合状态的生长素也不象上述的定义，可以截然分开的。Thimann

和 Skoog (1940) 曾証明, 当把 IAA 加入植物組織中后, 以短時間溶媒提取法, 不能把所加入植物体中的 IAA 完全回收, 因为部分 IAA 已轉化为結合状态, 而必須經過較長時間的抽提才能回收。Siegel、Galston (1953) 与 Galston (1956) 以 IAA 处理离体的植物組織时, 曾观察到外加的 IAA 与体内某些蛋白质結合在一起。此外有不同的結合状态的生长素, 例如某些含色氨酸的蛋白质及抗坏血酸原 (見 Fawcett, 1961) 等, 在不同的提取过程中可能发生轉化而釋放出游离状态的生长素, 因此游离和結合状态的生长素之間的分界是动态的, 很不容易把它們严格的分开。为获得存在于植物材料中游离状态的生长素或生长素前体的实际含量, 則所需要的提取方法, 應該是能避免任何化学或酶的因素而引起的轉化現象。現将由植物体中提出的生长素类物质和它們的前体, 列在下面 (見 Larsen, 1955): 游离的色氨酸, 含色氨酸的蛋白质物质, IAA-蛋白质复合物, 吲哚丙酮酸, 吲哚乙醛, 吲哚乙腈, 吲哚乙酸, 吲哚乙酸乙酯和未証实的前体。茲举例說明在激素提取工作中所用的不同方法, 这些方法都是各人根据研究及实验需要所設計的, 故都各有优点和缺点。

一、溶媒提取法

(1) 乙醚 Boysen-Jensen 早在 1936 年即指出乙醚是进行 IAA 类物质提取的最好溶媒 (見 Leopold, 1955), 但在乙醚中常有自发性的过氧化氢物存在, 这往往是破坏某些易被氧化的 IAA 类物质的一个因子。过氧化氢类物质对于生物及化学鉴定也有干扰作用, 所以应用于生长素提取的乙醚必須先經過处理, 以便将过氧化氢物除去。Larsen (1955) 认为, 以下述方法处理乙醚最好, 具体方法是: 每升乙醚用 2.5 克硫酸亚鉄及 0.5 克氧化鈣处理, 振搖之, 加入 20 毫升蒸餾水, 再用力振搖 3 分钟。分出乙醚层, 重复硫酸亚鉄的处理, 在 50~60°C 水浴中进行蒸餾, 弃去最先蒸出的 50 毫升及最后残余的 50~100 毫升乙醚, 收集中間蒸出的乙醚約 800~900 毫升。冰冻 (2~3 小时) 脫水, 以保証乙醚在貯存期間的质量。

对于生长素类物质的提取, 各工作者均多采用上述处理过的乙醚为溶剂 (Wildman 和 Muir, 1949; Van Overbeek 等, 1945, 1947; Bentley, 1958), 因此对乙醚为溶媒的提取过程中的条件, 也做了不少研究。Gordon 和 Nieva (1949) 在不同的 pH 条件下, 观察了 IAA 在乙醚与水中的相对溶解度, 見图 3-1。該图所示, 在 pH 2.8 时, 乙醚可以最有效的

从含水的植物材料中提出 IAA; 在碱性的条件下, IAA 則自乙醚层轉移至水层中。所以, 我們在 IAA 的分离工作中, 經常应利用乙醚和水在不同的 pH 中对 IAA 的相对溶解度不同的原理, 把 IAA 进一步純化。

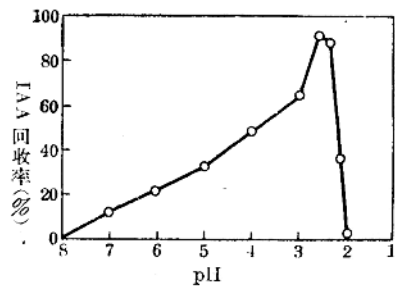


图 3-1 pH 对 IAA 在水和乙醚中分配的影响 (引用 Gordon 和 Nieva, 1949)

此外許多作者(Leopold, 1955)曾指出,用乙醚从植物材料中提取生长素的过程,即使延續一年之久,仍会繼續不断地形成 IAA。

若用完全干燥的乙醚提取烘干的植物材料,就没有这个现象;反之,植物材料必須以含有水分或含水的乙醚为溶剂,IAA 才能在較长的提取時間內不断的形成。加大溶剂的体积,并不能縮短提取的时间,說明不是由于 IAA 在乙醚中的溶解度过小的原因。用煮过的植物为材料,可防止 IAA 持續形成的现象,在煮过的組織中加入蛋白水解酶类又可恢复这个现象(图 3-2)。这些都說明 IAA 在植物組織中,是以結合的形式存在,在提取过程中因酶解作用而释放出游离状态的生长素(Skoog 和 Thimann, 1940)。图 3-3 說明温度可以影响結合状态的 IAA 轉化为游离状态的 IAA 的速度(見 Leopold, 1955)。所以在生长素类物质的提取中,根据研究的目的,应注意温度的控制。此外,IAA 在提取过程中,也可以被另外一些酶类的氧化作用所破坏(Tang 和 Bonner, 1947; Wagenknecht, 1950; Steeves 等, 1953)。

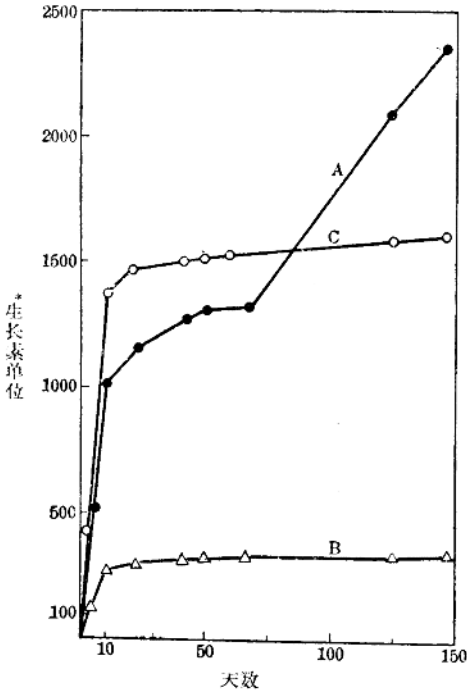


图 3-2 蛋白水解酶与游离的 IAA 形成的关系 (引用 Thimann, Skoog 和 Byer, 1942)

- A. 对照; B. 經煮沸的对照;
- C. 煮沸的对照+糜蛋白酶

* 一个 10 立方毫米的洋菜块引起燕麦芽鞘弯曲度时所含的 IAA 的量

Gustafson 建議,在提取游离的 IAA 之前,将植物用沸水煮 1 分钟,以防止在提取过程中酶所导致的形成或破坏(見 Leopold, 1955)。Thimann 等(1942)指出这个方法的主要缺点是,在加热过程中生长素类物质必定受到一定程度的破坏;此外,某些綠色植物在加热过程中可能释放生长抑制剂,因而干扰了生长素类物质的生物鉴定。例如 Van Overbeek (1945)以甘蔗为提取生长素类物质的材料,煮沸处理致使释放出生长抑制剂,由于此物质也溶于乙醚,它和 IAA 一起存在于植物抽提液中,会与以后燕麦法测定的結果相混淆。

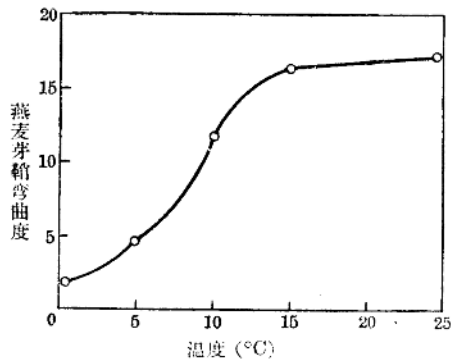


图 3-3 乙醚浸提燕麦子房組織过程中温度对 IAA 形成的影响 (引用 Gordon 和 Nieva, 1949)

Wildman 和 Muir (1949) 根据温度对结合状态的生长素转化为游离状态的生长素的影响(图 3-3), 在 0°C 时进行提取, 可以抑制结合状态的生长素的酶解作用, 因而防止了 IAA 在提取过程中连续形成的现象。具体操作过程是: 把植物放在干冰及丙酮的混合物中, 快速冰冻后, 以冰冻干燥器进行植物组织的干燥, 将干燥后的植物材料磨成粉状并放在不透光的真空干燥器里, 贮于 0°C 的冰箱中待用。进行 IAA 的提取时, 每克材料用乙醚 2~10 毫升 (95%), 在 0°C 时提取 4 次, 每次浸提半小时, 合并乙醚提取液并减压浓缩。Wildman 和 Muir 曾按照上述方法, 从烟草的子房组织中提取 IAA, 试验证明, 用乙醚浸提 4 次, 共 2 小时, 可以准确地将组织中的游离状态的生长素提出。

根据游离状态和结合状态的生长素的性质, 即前者容易自植物中提出, 仅需要较短的提取时间; 而后者要经过酶解等作用才能释放出 IAA 来, 需要较长的提取过程。Van Overbeek 等 (1945) 提出一个较简便的提取方法, 他们把冰冻后的植物材料, 切成薄片后即在 0°C 下, 以处理过的乙醚浸提两次, 每次半小时。这个方法的优点是, 既可防止加热而导致生长素类物质的破坏, 又可避免使用冰冻干燥器的步骤。他们曾应用短时间提取和长时间的提取法, 成功的从各种凤梨组织中分别的提出游离状态的 IAA 及结合状态所释放出的 IAA (Van Overbeek, 1947)。他们并证明, 短时间提取法所提出的游离状态的 IAA 与 Gustafson 的煮沸法所得的结果完全符合。这表明, 此法切实可行(见 Leopold, 1955)。

(2) 甲醇 Nitsch (1956) 比较了一系列溶媒对切伤组织局部所产生的氧化酶类活力的影响。他以菊芋 (*Jerusalem artichoke*) 的切伤组织的变黄程度为测定酶的活力的指标(表 3-1)。

表 3-1 各种有机溶剂防止植物切伤组织局部的氧化作用的比较
(引用 Nitsch, 1956)

有 机 溶 剂	18 小时后, 产生黄色的程度	有 机 溶 剂	18 小时后, 产生黄色的程度
甲醇	0	乙醚	+++++++
乙醇	+	乙醚(95%)+甲醇(5%)	++++
丙酮	+	乙醚(70%)+甲醇(30%)	+++
石油醚(沸程 $30\sim 65^{\circ}\text{C}$)	+++	乙醚(50%)+甲醇(50%)	++
氯仿	+++++	乙醚(70%)+乙醇(30%)	+++
氯仿+8-羟基喹啉	+++++	乙醚+ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1 毫克/毫升)	0
醋酸乙酯	+++++++	醋酸乙酯(50%)+甲醇(50%)	++

从表 3-1 中看出, 以甲醇浸提菊芋的组织, 没有变黄现象, 而以乙醚、醋酸乙酯等为溶媒时, 可使菊芋组织由白色变为深黄色。说明这些溶剂至少具有不能抑制多酚氧化酶系的活力, 同时也部份说明了在以乙醚进行提取生长素类物质时, 不

能防止由酶所导致新的 IAA 的形成的原因,故 Nitsch 认为甲醇优于乙醚。当然对于一个溶媒的选择,不仅是要求没有酶作用产生,而更重要的是应具有良好的抽提效率。Nitsch 在另外一个试验里,比较了乙醚、丙酮、醋酸乙酯和甲醇四种溶媒对于番茄中生长素类物质的抽提效果(图 3-4)。这些溶媒对 IAA 的抽提效率

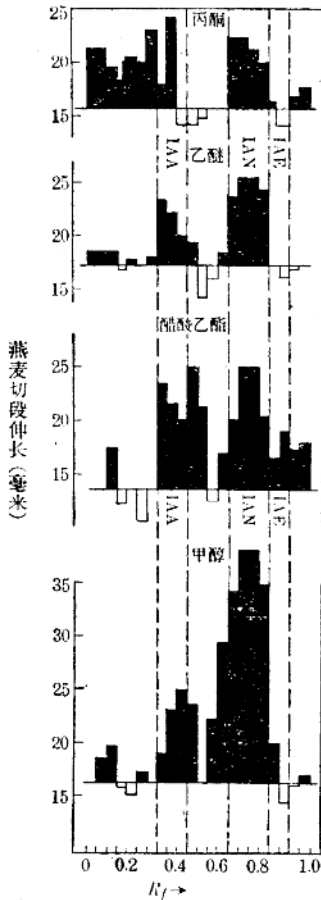


图 3-4 不同溶剂提取的吲哚类化合物
(引用 Nitsch, 1956)

相近,但从所提出的 IAN 的量来判断,甲醇和醋酸乙酯均优于乙醚。所以 Nitsch 等在 1956 年以后的一系列工作中,均采用甲醇进行 IAA 类物质的提取。

(3) 氯仿 Thimann (1934) 曾用氯仿进行生长素类物质的提取,所用之氯仿必须经过处理:把氯仿与同体积之水振摇,重复 3~5 次;继之以浓硫酸与氯仿共振 2 次;再用水振摇 8 次以洗去残余之硫酸,用硫酸钠干燥后,再蒸馏所得之纯化氯仿,存于瓶中待用。Thimann 用以上处理的氯仿 15 毫升和 0.1 N HCl 2 毫升加到鲜重约为 25 克的植物材料中,用研磨将植物磨碎,重复酸性氯仿的抽提,至少 3 次。但 1940 年 Thimann 及 Skoog 指出,以氯仿提取 IAA 类物质,常常在提取过程中累积了某些毒性物质,因而 IAA 之活力受到影响。

(4) 水 早在 1932 年, Gortor 即用水为溶媒,进行生长素类物质的提取 (Leopold, 1955)。此后 Avery 等 (1940, 1945) 自玉米胚乳,卷心菜的叶和甘蓝的茎中; Larsen (1951) 和 Terpstra (1953) 自黄化的燕麦幼苗中均用水为溶媒,提取生长素类物质。水提取液中的干扰物质,较有机溶剂提取液的为多。突出的是,各种酶类使 IAA 或它的前体,在提取过程中遭到破坏或转化。在低温 0~4°C 的条件下,或在水中加 0.1% 二乙基二

硫甲氨酸 (Na-diethyl-dithiocarbamate) 可以在一定的程度上防止酶类的干扰作用 (Terpstra, 1953)。

以上所举四种溶媒对 IAA 类物质的提取各有优缺点(表 3-2)。

许多作者采用数种溶媒,连续地从同一植物材料中提取 IAA 类物质 (Avery 等, 1940, 1941; Haagen-Smit 等, 1946)。一般采用酒精和乙醚两种溶剂。Haagen-Smit (1946) 将未成熟的玉米 100 公斤为材料,用酒精(约 150 升)浸提,减压浓缩成浓浆状(3700 毫升),用盐酸调节 pH 至 2.8~3,继以乙醚自酸性水溶液中再提取 IAA。

表 3-2 几种溶媒的比较

溶 媒	优 点	缺 点
乙 醚	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可应用 IAA 在乙醚和水中不同 pH 值下的相对溶解度将 IAA 提纯 2. 对 IAA 的提取效率高于其他溶剂 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 乙醚中有自发性的过氧化氢类物质存在, 必须经过处理将其除去 2. 完全干燥的乙醚提取率低, 但含水的乙醚不能使各种蛋白质水解酶类完全钝化
甲 醇	<ol style="list-style-type: none"> 1. 较乙醚能更透彻的渗入植物组织中 2. 对 IAN 的提取效率高 3. 对多酚氧化酶系的活力的钝化较强 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 较乙醚和氯仿难于蒸除
氯 仿	<ol style="list-style-type: none"> 1. 过氧化氢类物质被乙醚中少 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 所用氯仿呈酸性, 易使 IAA 类物质水解 2. 在提取过程中易积累某些影响 IAA 活性的毒性物质
水	<ol style="list-style-type: none"> 1. 对 IAA 的前体如色氨酸、抗坏血酸原等提取效率高 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 易把干扰物质如各种酶类与 IAA 类物质同时提出

二、扩 散 法

这是自植物中提取生长素的最原始方法, 即把植物材料, 如顶端、茎部或叶等放在洋菜小块上, 植物中的生长素即扩散而堆积于洋菜小块中。这个方法虽然操作简便但它的局限性较大, 因在扩散过程中, 生长素之活性易被切伤局部所产生之酶类物质如多酚氧化酶和过氧化物酶所破坏; 其次, 所提取出的生长素的量, 随扩散时间的长短而不同, 故不能达到定量的要求。因此, 对于 IAA 类物质的提取, 多采用上述的溶媒法。

三、提 纯 方 法

用以上所介绍的各种溶媒进行提取所得到之粗抽提物, 除了生长素类物质外, 还含有其他杂质。这些杂质虽然没有生长作用, 但往往对生物和化学鉴定有干扰作用, 故用溶媒法所得之粗抽提物, 必须作进一步的提纯。

(1) 碳酸氢钠法 这个方法在生长素类物质的提纯中是最常用的, Boysen-Jensen 认为这是纯化 IAA 的最好方法(见 Nitsch, 1956)。用 0.5 M 的碳酸氢钠(pH 8.6) 与植物的乙醚抽提液共同振荡, 乙醚中的 IAA 即成为钠盐转移至水层; 再以乙醚与此酸化的水溶液部份共振, 则 IAA 可再被抽提至乙醚中(见 Larsen, 1955)。经过如此纯化之生长素类物质, 再经过层析法进一步分离, 即可得到清晰之色谱。

(2) 乙腈法 用乙腈可把中性的生长素类物质纯化, 因为碳酸氢钠法仅能纯化酸性生长素类物质, 但不能将中性生长素类物质提纯。把用溶媒法所得之植物粗抽提液蒸干后, 用等量的乙腈及己烷的混合物提取之。这样则粗抽提物中的油脂及色素等杂质即可为己烷所提走。乙腈部分含有 IAA、IAN 和乙基吲哚乙酯(IAE)①

① IAE 为 Ethyl indole acetate 之缩写。

四、层析法

(1) 紙上层析 自从1944年 Consden 等人首創了紙上层析法后,在1951年德国的植物生理学家 Jerchel 和 Müller 即应用这个新技术于生长素类物质的分离工作(見 Leopold, 1955)。因为所需样品的量极微,操作簡便,生物和化学鉴定可以在同一張濾紙上进行,成为植物激素研究方法中一个得力的工具。有关紙上层析的基本操作技术,中外已有多种专著,在此不贅述。本节仅扼要討論生长素类激素紙上层析所常用之溶剂系統,及其在各溶剂系統中之 R_f 值以及影响层析的因子。

根据 Sen 和 Leopold 与 Stowe 和 Thimann (1954)对 50 余种吲哚类化合物在各种溶剂中展开的系統的研究結果(見表 3-3),指出异丙醇-氨水-水的溶剂系統最为理想,此后均采用此溶剂系統进行生长素类物质的分离。至于溶剂系統三个組成之間的比例,各作者所用略有出入,以异丙醇:氨水:水=10:1:1 的比例最为普遍。Nitsch (1956)用异丁醇:甲醇:水=80:5:15 的溶剂系統,与 Stowe 和 Thimann 的异丙醇溶剂系統做了对比(見表 3-4)。在异丁醇的溶剂系統中所展开

表 3-3 主要生长素类激素在各溶剂系統中展开后之 R_f 值
(引用 Audus, 1958)

生长素类激素 \ 溶剂系統	吲哚乙酸	吲哚乙酸	吲哚乙酸	乙基吲哚乙酸	色氨酸	色氨酸	吲哚乙腈	吲哚丙酮酸	吲哚丙酸	吲哚丁酸	2, 4-D	2, 4, 5-T	NAA	萘氧乙酸
苯酚-水	0.8			0.95					0.8	0.85	0.85	0.75	0.95	0.9
丁醇-丙酸-水	0.95			1.0			0.95		0.95	0.98	0.9	0.95	0.95	0.9
异丙醇-氨水-水	0.25~0.35	0.2		0.8~0.95	0.2	0.65~0.75	0.75	0.1	0.35~0.45	0.45~0.55	0.7	0.8	0.6	0.6
丁醇-乙醇-水	0.7	0.8		0.9	0.3	0.4	0.95		0.8	0.9				
丁醇-乙醇-氨水	0.8			1.0		0.95	1.0		0.85	0.85				
70%乙醇	0.8	0.8	0.45	0.8	0.4	0.7	0.85		0.9	0.85				
水	0.9	0.9		0.6	0.6	0.3	0.4		0.85	0.9				
吡啶-氨水	0.6	0.6		0.97	0.45	0.9	0.95		0.6	0.6				

表 3-4 生长素类物质在异丙醇和异丁醇两个溶剂系統中的 R_f 值
(引用 Nitsch, 1956)

	IAA	IBA	IAN	IAE
Stowe and Thimann's				
异丙醇(80%) + 28% 氨水(10%) + 水(10%)	0.37 (18)*	0.50 (17)	0.75 (17)	0.82 (24)
异丁醇(80%) + 甲醇(5%) + 水(15%)	0.24 (16)	0.45 (18)	0.76 (25)	0.85 (16)

* 括号中之数字表示色斑的长度毫米数。

的 IAA、IAE 色斑小而圆,故 Nitsch 认为这个溶剂优于异丙醇溶剂系统。Nitsch 并指出在异丙醇的溶剂中省去氨水,也同样的可以把主要的酸性生长素类化合物分开(见表 3-5)。这个事实对生长素类的纸上层析是很重要的,因为氨水能导致不稳定的物质分解(表 3-5)。从表 3-5 中还告诉我们,只用水为展开剂亦可把 IAA、IBA、IAN 和 IAE 分开。1954 年 Bitancourt 亦曾以水为展开剂,而在层析缸中放醋酸以饱和气相,上行方向在一小时内即展开达 10 厘米高(见 Bentley, 1958)。一般在有机溶剂中,展开时间较长时,往往导致 IAA 或其他化合物的氧化,在水中展开快,可以避免这个现象,这是以水为展开剂的优点。它的缺点是不能把 IAA 和生长抑制剂分开。此外 Nitsch 指出,环己烷:水=90:10 的溶剂系统对于中性生长素类物质是个较好的展开剂。

表 3-5 生长素类物质在较简单的溶剂系统中的 R_f 值

(引用 Nitsch, 1956)

溶 剂	R_f 值			
	IAA	IBA	IAN	IAE
异丙醇(80%)+水(10%)+28%氨水(10%)	0.35	0.48	0.76	0.83
异丙醇(80%)+水(10%)	0.40	0.50	0.75	0.83
异丙醇(100%)	0	0	損失	0.83
水(100%)	0.65	0.64	0.32	0.47

生长素类物质在溶剂系统中展开后的 R_f 值,可以根据它们的化学性质及生物活力,应用各种显色剂和生物鉴定方法测定。有关这方面的方法,将于本章的 II、III 两节详细介绍,现将主要的吲哚类化合物用物理和化学方法显色的结果列于表 3-6 (Sen 和 Leopold, 1955)。

表 3-6 不同试剂与吲哚类化合物的显色作用

(引用 Sen 和 Leopold, 1954)

化 合 物	紫外光下荧光显色	Ehrlich 试剂	Silkowski 试剂
IAA 吲 哚 乙 酸	灰 色	浅 紫 紅	粉紅* 紫紅
IPA 吲 哚 丙 酸	浅 藍	藍 綠	浅棕* 粉棕
IBA 吲 哚 丁 酸	浅 藍	藍 綠	棕* 桔黃
IAN 吲 哚 乙 腈	綠 藍	黃	綠
IAH 吲 哚 甲 醛	淡 黃	浅 棕	浅 棕
IAM 吲 哚 乙 酰	黃 棕	粉 棕	粉
TNI ₂ 色 胺		藍	暗 棕
Indole 吲 哚	淡 綠	淡 紅	黃 紅

* 不同作者的結果。

(2) 柱层析 仅介绍吸附柱层析和分配柱层析两种方法

A. 吸附柱层析法

a. 氧化铝柱层析: Linser 和 Maschek 在 1953 年应用氧化铝柱层析法, 純

化甘藍 (*Brassica oleracea*) 莖的酒精粗抽提物,其詳細的操作过程如下:

把氧化铝装入 200×20 毫米的柱中,以 50 毫升乙醇(96%)洗氧化铝柱,向柱中注入用 50 毫升乙醇抽提鮮重 50 克的植物材料所得之粗抽提液,继以 50 毫升乙醇(96%)展开柱层。展开后之柱层根据在紫外光下所显色譜,把全柱切为 4~5 段,用 0.5 N 的氫氧化鈉洗脫每一段,继用 0.5 N 的盐酸中和洗脫液。离心除去氫氧化鋁,将上层清液在 70°C 下减压蒸干,用乙醇溶解残余物,进行化学和生物測定(見 Larsen, 1955)。

b. 蔗糖柱层析: Linser 在 1951 年把通过鋁柱层分离后的殘液,再用蔗糖柱层做进一步的純化。首先把殘液蒸干,再以石油醚溶解殘留物,将石油醚溶解的部分注入蔗糖柱中,以石油醚洗脫至无叶綠素为止。以水浸提蔗糖柱层之各切段,继以乙醚抽提 IAA。将乙醚抽提液蒸干,溶于水,做化学和生物測定(見 Larsen, 1955)。Linser 以紫丁香花 (*Syringa*) 叶子的酒精粗抽提液为材料,通过三个鋁柱以吸附 IAA 和其他生长素类化合物,再将殘余滤液用蔗糖柱层析,分离得到两个生长抑制剂。

B. 分配柱层析法 Powell(1960)根据梯度分配层析的原理,用硅胶柱从卷心菜、桃子的子房中分离出一系列的吲哚衍生物。具体过程如下:把 100 篩孔大小的硅酸用蒸馏水冲洗多次,靜置 15 分钟后,除去悬浮不沉的、上层过小的硅酸微粒。因为这些微粒妨碍柱层之順利展开。把所有的微粒都除去后,在 100°C 干燥至恒重。取烘干后的硅酸 8 克,以 0.5 M 的甲酸(5.0 毫升)处理之,使其水化成硅胶,将其悬浮于 0.2% 的正丁醇洗脫剂系統中(表 3-7),装于高 30 厘米、内徑为 1.4 厘米的柱里。这样所得之硅胶柱高約 13 厘米。把磨碎的植物組織或其濃縮的粗抽提液与少量的硅胶混合后放在装好的硅胶柱頂上。用 0.2% 正丁醇(150 毫升)洗脫,流速为每分钟 2~3 毫升,用部分收集器收集,每 10 毫升一管,继以正丁醇組成递增的溶剂系統(表 3-7)按次洗脫。对于实验室中經常用的吲哚化合物的分离所用一系列的溶剂系統,可根据分离目的,省去表中的一些洗脫步驟,

表 3-7 吲哚衍生物的硅胶柱层析
(引用 Powell, 1960)

洗脫次序	組成*	正丁醇 (%)	体 积 (毫 升)	洗 脫 的 吲 哚 衍 生 物
	石油醚:正丁醇			
1	99.8:0.2	0.2	150	吲哚,3-甲基吲哚乙基吲哚乙酸,吲哚乙腈
2	97.0:3.0	3.0	150	IBA, IPA, IAA
3	90.0:10.0	10.0	100	IAM
4	75.0:25.0	25.0	100	—
5	50.0:50.0	50.0	100	—
6	25.0:75.0	75.0	100	色氨酸,色胺
7	0.0:100.0	100.0	100	—

* 所用石油醚的沸程为 30~60°C, 正丁醇是經 0.5 M 甲酸所饱和者, 当二者相混合有多余的水分出現时, 可用离心机除去。

以便縮短层析時間。試管中所收集的各部份的洗脫液減压濃縮后,分別进行生物和化学測定。图 3-5 所示为标准样品的分离結果。

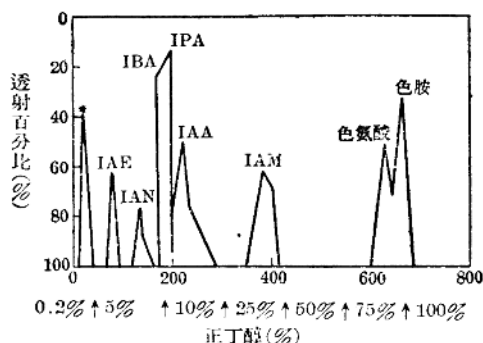


图 3-5 吲哚衍生物的硅胶柱层析結果(引用 Powell, 1960)
= 吲哚及 3-甲基吲哚

2. 赤霉素类植物激素的提取和分离

在日本人黑澤发现镰刀菌代谢产物具有刺激水稻徒长现象之后的 12 年,藪田和住木在 1938 年分离出 2 个結晶状态的有效成份,命名为赤霉素 A 和 B。这是赤霉素提純工作的里程碑。1954~1955 年間,住木諭介、Curtis 和 Stodola 分別得到赤霉素的結晶。不同菌株所产生的赤霉素类型亦不同,住木諭介的菌株产生 GA_1 、 GA_2 和 GA_3 , Curtis 所用菌株主要产生 GA_3 , 而 Stodola 的菌株产生 GA_1 与 GA_3 。这三个类型的赤霉素在化学結構上仅有 2 个氢原子的差异,所以为分离工作带来很大的困难。自从 Stodola (1957) 和住木諭介(1958)用层析法突破了这个难关后 $GA_4 \sim GA_9$ 的分离才被开辟了一条坦途,同时也推动了自植物中提取类似赤霉素物质的工作。事实証明,赤霉素类物质也是一种天然植物激素。茲将自各种植物材料中,所发现的赤霉素和类似赤霉素物质,以及它們的提取分离和鉴定方法,列于表 3-8。本节着重介紹 Ga 类激素的提取和分离方法。有关赤霉素的发酵和生产可参閱 Borrow (1955); Stodola (1955); 中国科学院植物生理研究所生长素工作組(1959); Darken 等(1959)的工作报告。

表 3-8 植物中赤霉素类激素的存在

材 料 来 源	提 取、分 离 和 鉴 定*	作 者
豌豆幼苗(矮型及高型), 椰子的胚乳, 大麦及豌豆的种子, 麦芽	1. 乙醇提取, 紙层析 2. 矮性菜豆及玉米幼苗、叶片法鉴定	Radley (1956, 1958)
鱈梨 (<i>Lycocado</i>) 的胚, 杏, 李种子的胚, 杏仁种子, 胡桃及烟草, 豌豆, 菜豆, 羽扇豆, 玉米(乳状)种子	1. 丙酮提取, 活性炭吸附柱层析, 紙层析 2. 矮性玉米(d-1, d-2, d-3, d-4, d-5)鉴定	West 及 Phinney (1956~1957)

表 3-8(續)

材 料 来 源	提 取、分 离 和 鉴 定*	作 者
芥菜 (<i>Brassica napus</i> L.) 的幼花序	1. 丙酮提取, 紙层析 2. 紫苏幼苗 (<i>Perilla</i>) 鉴定	Lona (1957)
野黄瓜 (<i>Echinocystis macrocarpa greene</i>) 的胚乳	1. 丙酮提取, 活性炭吸附柱层析 2. 二年生天仙子鉴定	Lang (1957)
豌豆莖	1. 醋酸乙酯提取紙层析 2. 矮性豌豆法鉴定	McComb 和 Carr (1958)
玉米、菜豆、李子、牵牛花、山扁豆等 23 种植物的种子	1. 70% 丙酮提取 2. 矮性牵牛花幼苗鉴定	Ogawa (1958)
小麦幼苗	1. 磷酸-檸檬酸盐缓冲液乙醚提取 紙上层析 2. 豌豆幼苗鉴定	Simpson (1958)
龙舌兰 (<i>Agave</i>), 草木犀 (<i>Melilotus</i>), 菜豆, 向日葵等組織培养	1. 丙酮 (50%) 提取 2. 豌豆幼苗鉴定	Nickell (1958)
镰刀菌 (苏联赤霉素 I ₁) [†] 酵母菌, 放线菌 (A ₁ , A ₂ 制剂) [†]	1. 活性炭吸附, 氨化甲醇洗脱, 醋酸乙酯和苯提纯 2. 金菊花, 豌豆和玉米幼苗鉴定	Краевльников (1958)
豆科植物 (Leguminosae) 15 种	1. 乙醚提取, 紙层析 2. 水稻幼苗鉴定	Murakami (1956~1959)
紅葉紫苏叶子、烟草叶子、金光菊叶子	1. 丙酮提取 2. 金光菊 玉米幼苗鉴定	Чайлахян (1959)
山扁豆 (<i>Cassia</i>), 金鸡菊 (<i>Coreopsis</i>), 西番莲 (<i>Passiflora</i>) 等 35 种植物的种子	1. 丙酮提取, 紙层析 2. 矮性玉米 (d-1) 鉴定	Corcoran (1959)
镰刀菌 (<i>Gibberella fugikuroi</i>) No.4	1. 氧化铝柱层析 2. 玉米幼苗, 水稻幼苗鉴定	Takahashi (1957~1959)
菜豆种子 (GA ₁ 和 GA ₆) [†]	1. 乙醇, 醋酸乙酯, c-岩分配柱层析 2. 矮性玉米 (d-1, d-3, d-5) 鉴定	McMillan (1958~1959)
菜豆种子, 豆因子 I (GA ₁) [†] 豆因子 II (GA ₆) [†]	1. 丙酮提取, 硅藻土柱层析 2. 矮性玉米幼苗 (d-1, d-3, d-5) 鉴定	Phinney, West (1958~1959)
柑桔 (<i>Citrus unshui</i>)	1. 丙酮, 醋酸乙酯提取逆流分溶, 紙譜 2. 水稻幼苗鉴定	Kawarada (1959)
李子的种子	1. 甲醇提取紙层析 2. 矮性玉米 (d-1) 鉴定	Ugolik 和 Nitsch (1959)
金菊花和菊花的生长点	1. 甲醇提取 2. 燕麦切段法, 燕麦第一节間法, 叶片法鉴定	Harada 和 Nitsch (1959)

表 3-S(續)

材 料 来 源	提 取、分 离 和 鉴 定*	作 者
蒿苣种子	1. 丙酮提取 2. 矮性玉米幼苗 (d-1, d-3, d-5) 鉴定	Blumenthal-Goldschmidt等 (1960)
天仙子	1. 丙酮提取, 活性炭吸附, 醋酸乙酯、磷酸缓冲液提纯 2. 玉米幼苗 (d-1, d-3, d-5) 鉴定	Lang (1960)
镰刀菌 105 个	1. 水提 2. 矮性玉米 (d-1) 鉴定	Gordon (1960)
镰刀菌 (赤霉素I)†	1. 活性炭吸附, 丙酮浸提, 茶提纯 2. 豌豆茎和玉米第一叶片法鉴定	Schmidt (1961)
马铃薯块茎	1. 醋酸乙酯等数种溶剂提取, 柱和纸层析 2. 矮性玉米, 矮性豌豆, 燕麦第一节间和小麦切段法鉴定	Blumenthal-Goldschmidt等 (1961)
镰刀菌 0072	1. 乙醇丙酮, 甲醇, 水提取 2. 水稻幼苗, 燕麦法, 组织培养, 豌豆法鉴定	关颖谦等 (1962)
大蒜幼芽	1. 乙醇, 乙醚提取纸层析 2. 水稻幼苗鉴定	关颖谦等 (未发表)

* 1. 主要提取分离方法; 2. 生物鉴定方法。

† 提出赤霉素类激素的命名。

一、镰刀菌发酵产物中 GA₁、GA₂、GA₃、GA₄、GA₇ 和 GA₉ 的提取和分离

(1) 提取

A. 吸附 用盐酸将除去菌体后的醱酵液的 pH 调节到 3~4 后, 用 1% 活性炭吸附有效成份, 即每升醱酵液中加入活性炭 10 克, 形成粘浆状, 搅拌并过滤, 把吸附后的活性炭风干至含水量约 20~40%, 为了保证下一步的迅速洗提, 应注意勿使活性炭过干。Borrow 曾指出, 用五氧化二碳干燥活性炭使之不含水份, 则不易把有效成份洗脱下来。

B. 洗脱 各作者用不同溶剂洗脱活性炭所吸附的有效成份; 住木諭介和 Stodola 用氯化甲醇 (甲醇中含 5% 的浓 NH₄OH); Curtis 和 Borrow 用丙酮; 中国科学院植物生理研究所生长素工作组曾用含 3% 氨水的工业用乙醇为洗脱剂。将洗脱液先在 50°C 以下减压浓缩, 使呈酸性 (pH 3~2) 再行洗脱。

C. 结晶 首先用醋酸乙酯提取酸性浓缩液中的有效成份; 再用相当于醋酸乙酯提取液体积的 25%, pH 6.3 的磷酸盐缓冲液提取, 将有效成份提至缓冲液中后, 使呈酸性 (pH 3~4); 再重复醋酸乙酯的提取; 减压浓缩后, 用石油醚和醋酸乙酯反复处理, 即得白色结晶状的赤霉素 (Curtis, 1954)。用沸点高 (90~120°C) 的

石油醚提取,所得赤霉素結晶的产量較高。住木諭介以醋酸丁酯提取濃縮后的酸性洗脫液,分出醋酸丁酯后;用碳酸氫鈉使呈碱性,轉溶于水,再变成酸性,而轉溶于醋酸丁酯;把醋酸丁酯液减压濃縮后,用酒精、石油醚反复处理,得白色結晶。

(2) 分离提純 由以上方法,自日本菌株所获得的結晶并非单纯物质,而是赤霉素 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 等生理作用和化学性质极其相似的数种物质的混合結晶,可用以下方法把各种赤霉素分开。

A. 甲酯化法 首先用重氮甲烷 (CH_2N_2) 把赤霉素的混合結晶变为甲酯化合物,使其通过氧化铝吸附柱,以醋酸乙酯:苯(1:5)溶剂系統洗脫,赤霉素甲酯混合物按 A_4 、 A_1 、 A_3 的順序被洗脫下来。再把醋酸乙酯与苯的比例改变为 1:1,繼續进行洗脫,則赤霉素 A_2 甲酯亦被洗出(住木諭介,1958)。

B. 硅藻土柱层析法 以 pH 6.2 的磷酸緩冲液为定向,处理硅藻土柱,再把赤霉素混合物通过硅藻土吸附柱,以氯仿:醋酸乙酯(1:1)为动向展开柱层,則 A_4 、 A_1 、 A_3 、 A_2 按順序被洗脫出来,用这个方法分离出来的是游离酸(住木諭介,1958)。

C. 溴化法 把赤霉素 A_1 、 A_2 、 A_3 的混合物溴化,仅 A_1 、 A_3 形成溴化物,将溴化后的混合物通过曾以 pH 5.2 磷酸盐处理过的硅胶柱,以丁醇:苯(5:95)洗脫之,則 A_1 和 A_3 的溴化物順序而出;继以丁醇:苯(10:90)洗脫,則获得游离酸赤霉素 A_2 。由此法所得的 A_1 、 A_3 溴化物可用鋅和醋酸法进行脫溴(住木諭介,1958)。

D. 木炭:碳岩柱层析法 Cross 等(1960, 1961)报导,把 GA_3 自 *Gibberella fujikuroi* 的代謝产物中分离后,所剩余的醋酸乙酯蒸干后成一膏状物,把此膏状物吸附于木炭:碳岩(1:2)的柱层上,以丙酮濃度递增的丙酮:水溶剂系統洗脫,在含丙酮 65% 和 80% 的部分中分别获得 GA_7 和 GA_9 。

二、高等植物中赤霉素类物质的提取和分离

高等植物中赤霉素类物质的发现,仅五年的历史,至于从植物中提出結晶的赤霉素还不过是近三年来的新发展。1956 年 Radley 首先以各种豆类、大麦和椰子的胚乳为材料,发现这些植物材料的抽提液,有类似赤霉素的生理活性。其后 West 和 Phinney (1957) 从菜豆及黄瓜的种子,得到部份提純并具有高活性的物质。次年 Radley (1958) 也从菜豆种子中,提出生理活性較高的类似赤霉素物质。MacMillan 和 Suter (1958) 在以上几人的工作基础上,成功的从未成熟的菜豆种子(1 公斤)提出 2 毫克 GA_1 的結晶。这个工作的意义很大,指出在已知的赤霉素类激素中,至少有一个 GA_1 是直接参与植物的生活,并且这个化合物与过去仅有的生长素类激素迥然不同,为植物激素的研究展开了新的局面。同年 West 等人从菜豆中分离出两个純結晶的活性物质,命名为豆因子 I 和豆因子 II,并于次年証明豆因子 I 就是赤霉素 A_1 ,証实了德国人 MacMillan 的工作(West 和 Phinney, 1959)。与此同时,日本人 Kawarada 和 Sumiki (1959) 亦从柑桔中提出赤霉素 A_1 。这一年 MacMillan (1959) 又从菜豆中得到一个新的赤霉素类激素的結晶,經鉴定后証明与 West 和 Phinney 所得到的豆因子 II 为同一物质。有关从菜豆

中提取 GA_1 和 GA_3 的詳細过程如下(MacMillan 等, 1960):把未成熟的菜豆种子(87.3 公斤)冰冻后,放在室温下用乙醇(2×40 升)浸提 24 小时,过滤,在 $40 \sim 45^\circ C$ 用薄膜蒸馏器把滤液濃縮至 3.0 升。以醋酸乙酯(12×1 升)抽提酸化(pH 3.0)后的濃縮液,继以 pH 6.2 的磷酸緩冲液(20×100 毫升)抽提醋酸乙酯部份,合并抽提液及洗脱液并酸化之。以醋酸乙酯提出的酸性有效成份,减压濃縮是为粗抽物。再通过以下一系列的柱层析,可分离到 GA_1 和 GA_3 。

(1) 碳-岩:木炭(60 克:30 克)柱 用硅胶(5.0 克)吸附粗抽提物(1.0~2.0 克)后,轉移至一装有碳-岩和木炭的混合柱(40×3 厘米)上。第一次用 200 毫升水洗脱,继以 5% 递增濃度的丙酮洗脱,每次用量 200 毫升,这样第十二次收集的洗脱液即以 55% 丙酮所洗脱者含有 GA_1 的有效成份,再用醋酸乙酯和石油醚反复处理,得白色結晶(熔点 $256 \sim 260^\circ C$)是为 GA_1 。

(2) 碳-岩(10 克)和硅胶(5 克)的混合柱 合并从(1)柱所洗脱下之各部份,包括已除去 GA_1 的第十二次的收集部份在內(約 195 毫克),减压濃縮蒸去丙酮,用醋酸乙酯(4×50 毫升)抽提,使吸附于硅胶(2.0 克)后轉移至碳-岩和硅胶的柱(18×1.5 厘米)上,用含有醋酸乙酯的氯仿溶剂系統洗脱,醋酸乙酯的濃度以 5% 递增,第一次用 50 毫升氯仿,第二次用含有 5% 醋酸乙酯的溶剂洗脱,继以 10% 醋酸乙酯(4×50 毫升)洗脱柱层上所含之 GA_3 有效成份。再用丙酮:石油醚处理濃縮后的 10% 醋酸乙酯抽出部份,得白色結晶(熔点 $260 \sim 261^\circ$),是为 GA_3 (MacMillan 等, 1960)。

三、赤霉素类激素的紙上层析法

应用以上住木諭介, Stodola 和 MacMillan 等人的柱层析法,虽然可以把 $GA_1 \sim GA_3$ 分开,但操作較复杂;用紙上层析法則較簡便迅速,然而所能分离的样品的量极微(30~100 微克),只局限于分离和純化粗抽提物中的赤霉素类物质,可便于进行更精确可靠的生物和化学鉴定工作。

Bird 和 Pugh(1958)报导 GA_1 和 GA_3 的紙上层析法如下:于苯:冰醋酸:水=10:2.5:5 的溶剂系統中,在 $22 \sim 24^\circ C$ 下行展开至少 36 小时,干后用 0.5% 高錳酸鉀噴洒, GA_1 和 GA_3 呈黄色斑点出現于紫紅色的背景上。用更多的高錳酸鉀噴洒这些斑点,然后立即在流动的自来水中冲洗,以除去过剩未反应的显色剂,在近白色的背景中 GA_1 和 GA_3 呈褐色的斑点,可以持久而不变色。用这个方法所获得的典型色譜(图 3-6),可以把 50~100 微克的 GA_1 和 GA_3

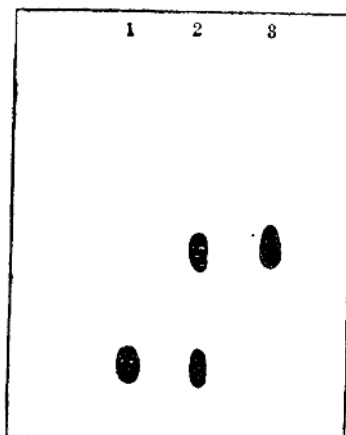


图 3-6 GA_1 和 GA_3 的紙上层析(引用 Bird 和 Pugh, 1958)

1. 赤霉素 A_1 ; 2. 赤霉素 A_1 与赤霉酸的混合物; 3. 赤霉酸(每种赤霉素用量为 100 毫克)

很清晰地分开。

表3-9是GA₁、GA₂、GA₃、GA₄和GA₅在20±2°C于一系列溶剂系统中展开的R_f值(見Brian等,1960)。各溶剂系统之組成是:(1)正丁醇:1.5N氨水=3:1;(2)正戊醇:吡啶:水=7:7:6;(3)正丁醇:醋酸:水=19:1:6;(4)乙醇:3N氨水=4:1;(5)氯仿:乙醇:水:甲酸=20:4:2:1;(6)苯:醋酸:水=4:2:1以及(7)异丙醇:7N氨水=5:1。在这些溶剂系统展开后,A₁、A₄、A₅用0.5%高锰酸钾显色,A₂与高锰酸钾不显色可用溴酚蓝显色,A₃可利用其在荧光下显色的特性与其他GA分开。表中的溶剂(6)即Bird和Pugh所用之溶剂系统,只是組成比例不同而已,下行展开40小时亦可把GA₁和GA₃分开。

表3-9 赤霉素的紙上层析*

赤霉素	1		2		3		4		5		6		7	
	下行 11小时	下行 10小时	下行 10.5小时	下行 8小时	下行 6小时	下行 2小时	上行 24小时	下行 11小时	下行 10小时	下行 10.5小时	下行 8小时	下行 6小时	下行 2小时	上行 24小时
GA ₃ (赤霉酸)	0.31	0.64	0.90	0.75	0.89	0.0	0.64	0.31	0.64	0.89	0.74	0.90	0.0	0.64
GA ₁	0.31	0.64	0.89	0.74	0.90	0.0	0.64	0.32	0.61 ⁽²⁾	0.87**	0.75	0.90	—	—
GA ₂	0.32	0.61 ⁽²⁾	0.87**	0.75	0.90	—	—	0.58	—	—	0.81	0.95	0.74	—
GA ₄	0.58	—	—	0.81	0.95	0.74	—	0.54	—	—	—	—	0.0	0.74
GA ₅	0.54	—	—	—	—	0.0	0.74							

* 溶剂系统組成和显色剂詳見本文。

** 用生物鉴定法測定。

3. 激动素类植物激素的提取和分离

Van Overbeek 从1944年即开始自椰子汁中提取激动素类物质,但遇到很多困难。Miller等从1948年便进行激动素的提純工作,最后在1952年由椰子肉中得到提純4000倍物质。其方法如下:把椰子肉搗碎,加水用匀浆器搖之使呈濃浆状,过滤,再重复用水提取,合并水提取溶液,把飄浮在水面的脂肪类物质除去,減压濃縮約至原体积的一半。調节pH至4.5,煮开30分钟,以沉除部分蛋白质类物质。把上层清液再濃縮,加酒精使最后酒精含量为75%,然后在4°C冰箱內放置12小时,使部份蛋白质沉淀。过滤,滤液再一次減压濃縮至暗黄色糖浆状。以后再經過一系列的分离步骤,应用Neuberg沉淀法、电透析技术和紙上层析,得到純化4000倍的粗物质,进一步的純化遇到困难,于是应用其他材料进行提取、純化的工作。Miller等人发现許多植物制品如麦芽抽出物、酵母抽出物及干酵母中均含有类似激动素活性的物质。但从原来的鮮酵母中,則提不出活性物质。此外,从酵母膏所提出的活性物质,在乙醚中的溶解度較水为大;而从椰子中提出的有效成份则为水溶性。他們并且观察到椰子汁及酵母抽出物中的有效成份都在波长260m μ 时出現吸收高峰。这些积累的綫索使他們想到,活性物质可能为嘧啶类物质。于是激动素的提取工作,轉向以富有嘧啶物质为材料的途徑。最后終