

盐处理下植物组织中甜菜碱和脯氨酸的 HPLC - ESI - MS 分析

赵 勇¹, 翁跃进¹, 杨春丽²

(1. 中国农科院品种资源研究所, 北京 100081; 2. 中国农科院气象所, 北京 100081)

摘 要: 通过高效液相色谱 - 电喷雾质谱(HPLC - ESI - MS)联用技术, 优化了 pH、流速、温度、鞘气和辅气等相关影响因素, 建立了一个有选择性的、高灵敏度的分析方法, 鉴定盐处理下植物组织提取物中的甜菜碱和脯氨酸, 一次性快速地分析了甘氨酸甜菜碱、 β -丙氨酸甜菜碱、葫芦巴碱、脯氨酸甜菜碱、4-羟脯氨酸甜菜碱和脯氨酸等 6 种化合物。其标准曲线(50~1 000 ng/mL)呈直线, 线性相关系数大于 0.999; 相对标准偏差(RSD)为 0.5%~15%, 回收率在 94.0%~97.0%之间。运用这一方法已经分析了大麦、小麦、大豆、甜菜和碱蓬等植物组织中的甜菜碱和脯氨酸, 获得了较理想的实验数据, 为揭示甜菜碱和脯氨酸与植物的耐盐性生理机制、耐盐品种的鉴定和选育提供了依据。

关键词: 植物组织; 甜菜碱; 脯氨酸; 高效液相色谱 - 电喷雾质谱(HPLC - ESI - MS)

中图分类号: O657.2; O657.63; Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2004)06 - 0083 - 04

Simultaneous Determination of Betaines and Proline in Plant Tissue under Salt Stress by HPLC - ESI - MS

ZHAO Yong¹, WENG Yue-jin¹, YANG Chun-li²

(1. Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China;

2. Institute of Agronomy, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: Glycine betaine (GB), β -alanine betaine (AB), trigonelline (Tig), proline betaine (PB), 4-hydroxyproline betaine (HPB) and proline in plant tissues under salt stress were selectively and sensitively determined by a rapid HPLC - ESI - MS method, after experimental parameters such as pH, flow rate, temperature, and supplementary gases were optimized. The calibration curves equations of six compounds were linear from 50 to 1 000 ng/mL, and the correlation was more than 0.999. The relative standard deviations (RSDs) and the recovery varied from 0.5% to 15% and from 94.0% to 97.0%, respectively. This method was used to assay betaines and proline in the leaf and roots of wheat, barley, soybean, beet and *Suaeda heteroptera*, and satisfactory results were obtained. These results should be helpful for understanding the relationship between betaines and proline and the plant resistance to the salt stress, and provide scientific basis for salt tolerance identification and breeding of varieties.

Key words: Plant tissue; Proline; Betaines; HPLC - ESI - MS

植物在盐分或水分胁迫下积累甜菜碱、游离氨基酸和糖醇类等一种或多种有机物质来抵御这种外界的伤害^[1,2], 其中甜菜碱和脯氨酸是胁迫下积累最多的细胞溶质。因此, 采用快速有效的方法检测这些化合物对于研究逆境胁迫下的生理机制和代谢规律十分实用和有益^[3]。

甜菜碱是一类季铵化合物, 化学名称为 N-甲基代氨基酸, 通式为 $R_4 \cdot N \cdot X$, 分子中都含有一个季铵氮原子和一个羧基, 通常形成分子内盐。脯氨酸是一种游离氨基酸, 与脯氨酸甜菜碱结构相似(图 1)。

早期的分析方法有光谱法、纸层析或薄层层析等方法, 这些方法简捷迅速, 但是灵敏度低, 而且颜色反应只是半定量。随着仪器分析技术的发展, 采用高效液相色谱(HPLC)^[3,4]、核磁共振(¹H - NMR)、气相色谱(GC)、气相色谱 - 质谱(GC - MS)^[5,6]、快原子质谱(FAB - MS)^[7]、毛细管电泳^[8]等技术来分析甜菜碱和脯氨酸的研究均有报道。甜菜碱和脯氨酸都是难气化的化合物, 而且紫外光吸收波长较低, 采用以上技术分析需要衍生化或者需要添加离子对等试剂, 增加了实验的步骤和成本。目前只有 Wood

收稿日期: 2004 - 02 - 14; 修回日期: 2004 - 10 - 12

作者简介: 赵 勇(1977 -), 男, 山东枣庄人, 硕士研究生; 翁跃进, 联系人。

等^[9]运用电喷雾串联质谱(ESI-MS-MS)对甜菜碱进行了定性分析和 Yǒng 等^[10]运用氨基色谱柱液相色谱/质谱定量分析了甘氨酸甜菜碱。

ESI-MS 是分析难气化合物的一种有力工具^[11], 离子交换高效液相色谱能够很好地分离甜菜碱和脯氨酸。本试验运用 HPLC-ESI-MS 联用技术, 探索快速、直接、有效的方法, 分析盐处理下植物组织中甜菜碱和脯氨酸的含量和变化。

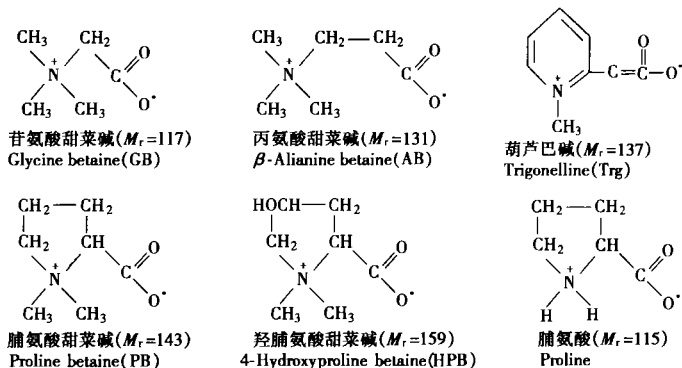


图 1 甜菜碱和脯氨酸的结构图

Fig. 1 Structures of betaines and proline

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

实验中所用超纯水由 Millipore(Bedford, MA, USA) 纯水仪制得; 甲醇为色谱纯, 购至 Fisher(USA) 公司; 甲酸铵(Ammonium formate)、甘氨酸甜菜碱(GB)、葫芦巴碱(Trg)、脯氨酸(Proline)和三甲胺(Trimethylamine)从 Sigma(St. Louis, Mo, USA) 公司购买; 甲酸(Formic acid)和 2-溴丙酸(2-bromopropionic acid)从 Fluka(Buchs, USA) 公司购买。丙氨酸甜菜碱(AB)由 2-溴丙酸和三甲胺合成^[8], 然后经固相萃取提纯。脯氨酸甜菜碱和羟脯氨酸甜菜碱分别由脯氨酸和羟脯氨酸与碘甲烷合成^[9], 然后经固相萃取提纯。

高效液相色谱为 Waters 2695; 质谱系统为 Finnigan LCQ/ Advantage(Thermo Finnigan, CA, USA); 离子源为电喷雾离子源。

1.2 样品制备

标样配制: 用万分之一天平称取每一种标样 20 mg, 用水-甲醇(体积比 1:1)配成 2×10^5 ng/mL 的母液, 然后稀释或取一部分配成混合标样待测。

植物盐处理: 植物种子在培养箱中发芽, 当幼苗生长到 5 cm 时移栽到 Hongland 营养液培养, 一周后用 300 mmol/L 盐溶液处理 10 d 后^[12], 采取植物的叶和根, 用去离子水冲洗干净, -70°C 下保存。按照 Hunt^[13]的方法提取冻干的植物组织, 在液氮冷冻下研碎植物组织并转移到 50 mL 离心管中快速称重(约 1 g), 加入 10 倍体积(约 10 mL)的 0.5% HCl, 4°C 下提取 24 h, 过滤, 滤液经固相萃取(SPE)仪萃取, 萃取小柱为强酸性离子交换柱(SCX), 洗脱液为甲醇-超纯水-浓盐酸(体积比 90:8:2)。随后洗脱液冷冻干燥, 干燥后用 1 mL 甲醇和 1 mL 超纯水溶解, 通过 $0.45 \mu\text{m}$ 针头过滤器, 稀释测量。

1.3 检测方法和步骤

高效液相色谱: 5SCX 交换色谱分析柱($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, Waters Spherisorb)。流动相为水-甲醇(体积比 93:7); 0.01 mol/L 甲酸铵(pH 3.5), 流速为 $1000 \mu\text{L}/\text{min}$, 分流比为 9:1(只有 $100 \mu\text{L}/\text{min}$ 进入到 ESI-MS)。

质谱方法: ESI-MS 正离子检测, 定量采用选择离子扫描方式, 选择离子质量是 $[M+H]^+$ 离子, 即 m/z 160, 116, 118, 132, 138, 144; 离子源电压和毛细管电压分别为 5 kV 和 6 V, 毛细管温度为 260°C ; 进入离子源的流速为 $100 \mu\text{L}/\text{min}$; 鞘气和辅助气都为高于 99.999% 高纯氮气, 流速分别为 35 units/min 和 15 units/min(LCQ 设置的单位)。

用标样调谐质谱仪至理想的测试条件, 并且试验多种类型的色谱分析柱(Waters 公司的液相色谱分析柱 Symmetry C₁₈, XTerraTM MS C₁₈, Nova Park C₁₈, AtlantisTM dC₁₈)和流动相来寻找分析甜菜碱和脯氨酸的最佳分析条件, 最后确定 Waters Spherisorb 5SCX 色谱分析柱对这些化合物分析效果很好, 同时兼具了高效液相色谱和质谱的选择性、特异性和灵敏度。对样品中这些化合物进行了定性和定量分析。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 分离

在 HPLC-ESI-MS 联合体系中, 影响 LC 分离的因素很多, 如柱型、流动相和 pH 等。pH 对液相色谱

的分离和质谱的离子化效应十分明显,当 pH 5.0 时,仅有甘氨酸甜菜碱和脯氨酸甜菜碱分离开,羟脯氨酸甜菜碱、脯氨酸、丙氨酸甜菜碱和葫芦巴碱未能分离开。当 pH 从 5.0 降到 3.5 时,6 种化合物彼此间全部分离开(图 2)。

2.2 ESI-MS 条件选择

甘氨酸甜菜碱、丙氨酸甜菜碱、葫芦巴碱、脯氨酸甜菜碱、羟脯氨酸甜菜碱和脯氨酸的 $[M+H]^+$ 质谱图见图 3, 质荷比分别为: m/z 118、132、138、144、160、116。由于它们是最强峰,因此被用作这些化合物定量离子,并采用二级质谱进行确认,甘氨酸甜菜碱、丙氨酸甜菜碱、葫芦巴碱、脯氨酸甜菜碱、羟脯氨酸甜菜碱和脯氨酸的主要碎片离子的质荷比分别为: m/z 59、60、84、94、142、70。这些结果和 Wood^[9] 的结果是一致的。

ESI 的质谱分析采用选择离子扫描(SIM)方式。虽然全扫描也可以分析这 6 种化合物,但在此情况下噪声较大,灵敏度差,定量效果不好,而选择离子扫描灵敏度较高(如图 2)。

影响 ESI-MS 结果包括 pH 值、毛细管的加热温度、鞘气和辅助气的流量、进入离子源的流动相的流速等参数。在 LC-MS 体系中 pH 是很重要的参数,本实验中, pH 3.5 较为理想;为了液体的气化和样品中化合物的离子化,毛细管的加热温度和鞘气辅助气的流量应随着流动相流速的改变而改变,鞘气和辅助气的流量也相应地改变。例如,当流速从 50 增加到 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,毛细管的温度应从 200 $^{\circ}\text{C}$ 至 275 $^{\circ}\text{C}$,鞘气从 20 至 40 units/min,辅助气不需要,但是加上辅助气可以减少背景中的杂离子。当进入到离子源的流动相流速为

200 $\mu\text{L}/\text{min}$,毛细管温度为 260 $^{\circ}\text{C}$,鞘气为 30 units/min,辅助气为 5 units/min,在此条件下定量曲线线性差、相关系数低。当流速为 100 $\mu\text{L}/\text{min}$,毛细管温度仍为 260 $^{\circ}\text{C}$,保持鞘气和辅助气的流速不变,结果有了很大改善。当鞘气增加到 35 units/min,辅助气设为 15 units/min 时质谱的定量效果好,获得了理想的定量曲线。

2.3 回收率和定量

标准曲线是以峰面积对加入标样量的对应关系生成的。标样配成 50、100、500、800、1 000 ng/mL 等 5 个浓度和 1 个空白(浓度为 0),每一浓度重复 5 次,5 次峰面积的平均值作为这一浓度下的峰面积,这 6 种化合物的标准曲线在 50~1 000 ng/mL 范围内都呈直线,线性相关系数都大于 0.999(见表 1),其标准曲线方程、信噪比为 3 时 6 种化合物的检出限和它们的相对标准偏差(RSD)及回收率列于表 1。

表 1 6 种化合物的线性方程、相关系数、检出限、相对标准偏差以及回收率

Table 1 The linear equation, correlation coefficients, detection limits, relative standard deviations(RSDs) for multiple measurements, and recovery for six target analytes

Compounds	Linear equation	Correlation coefficient	Detection limit ρ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD $s/\bar{x}$ %	Recovery $R/\bar{x}$ %
GB(甘氨酸甜菜碱)	$Y = 170\,832 + 3\,123.37 X$	0.999 5	1	0.5	97.0
AB(丙氨酸甜菜碱)	$Y = 60\,457 + 578.65 X$	0.999 3	1	10.9	94.7
Tro(葫芦巴碱)	$Y = 165\,784 + 2\,987.57 X$	0.999 5	1	3.6	95.2
PB(脯氨酸甜菜碱)	$Y = 135\,672 + 1\,678.35 X$	0.999 1	5	6.7	96.5
HPB(羟脯氨酸甜菜碱)	$Y = 132\,714 + 1\,563.27 X$	0.999 0	5	7.1	96.2
Pro(脯氨酸Pro)	$Y = 34\,337 + 668.35 X$	0.999 0	10	15.0	94.0

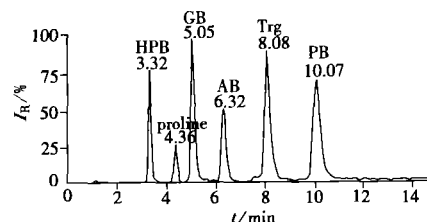


图 2 pH 3.5 下混合标样 LC-ESI-MS 选择离子扫描的总离子流色谱图(标样浓度为 500 ng/mL,进样量为 1 μL , m/z 160, 116, 118, 132, 138, 144)

Fig. 2 LC-ESI-MS selected ion chromatogram(m/z 160, 116, 118, 132, 138 and 144) of a mixed standard solution at pH = 3.5. The standard solution(injection volume of 1 μL) contained test compounds at 500 ng/mL)

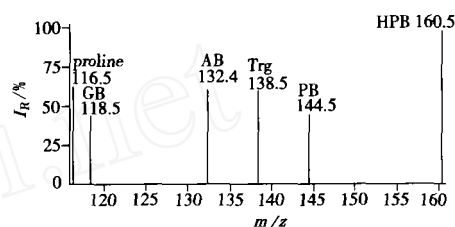


图 3 甜菜碱和脯氨酸混合标样的质谱图

Fig. 3 The positive ion electrospray mass spectra of betaines and proline

3 结 论

甜菜碱(CB, AB, Trg, PB, HPB)和脯氨酸(Proline)是与植物耐盐性密切相关的重要化合物,虽然已有多种分析方法,但都有其局限性。本试验优化了 pH、流速、温度、鞘气和辅气等离子交换高效液相色谱(HPLC)和电喷雾质谱(ESI-MS)的相关条件,建立了 HPLC-ESI-MS 联用的分析方法体系,测定了盐处理下植物组织中甜菜碱和脯氨酸等 6 种化合物的含量和变化。

这一体系的效率和灵敏度较高,标准曲线线性范围从前人的^[11]20~1 000 μg/mL 提高到本实验的在 50~1 000 ng/mL,标样浓度降低了 10³ 倍。分析时间由分析 1 种化合物 15 min,提高到分析 6 种化合物只需要 12 min。充分发挥了液相色谱-质谱联用快速分析的特点。

同时,该体系具有较好的选择性、特异性,对分析甜菜碱和脯氨酸非常适用。已经应用于分析大麦、小麦、大豆、甜菜和碱蓬 5 种植物叶片和根系中甜菜碱和脯氨酸的含量和变化,获得了较为理想的实验数据,为揭示甜菜碱和脯氨酸与植物耐盐性的生理机理和指导耐盐品种的鉴定和选育提供了科学依据。

致谢:感谢中国日本农业可持续发展中心为试验提供仪器设备,感谢北京光华质谱中心老师们对试验的指导和对论文的修改。

参考文献:

- [1] 赵可夫,李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [2] RHODES D, HANSON A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, Annu. Rev. Plant Physiol [J]. Plant Mol Biol, 1993, 44: 357- 384.
- [3] STOREY R, JONES R G W. Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance[J]. Phytochemistry, 1977, 16: 447- 453.
- [4] GORHAM J, MCDONNELL E. High-performance liquid chromatographic method for the separation and estimation of choline, glycinebetaine aldehyde and related compounds[J]. J Chromatogr, 1985, 350: 245- 254.
- [5] FAN T W M, COLMER T D, LANE A N, et al. Determination of metabolites by ¹H NMR and GC: Analysis for organic osmolytes crude tissue extracts[J]. Analytical Biochemistry, 1993, 214: 260- 271.
- [6] EICHENBERGER W, GFELLER H, GREY P, et al. Gas chromatographic - mass spectrometric identification of betaine lipids in *Chroomonas salina*[J]. Phytochemistry, 1996, 42(4): 967- 972.
- [7] BRUNK D G, RICH P J, RHODES D. Genotypic variation for glycinebetaine among public inbreds of maize[J]. Plant Physiol, 1989, 91: 1122- 1125.
- [8] JINGHUA Z, NAOKI N, AKIRA O, et al. Development of an analytical method for the determination of betaines in higher plants by capillary electrophoresis at low pH[J]. Phytochem Anal, 2002, 13: 189- 194.
- [9] WOOD K V, BONHAM C C, MILES D, et al. Characterization of betaines using electrospray MS - MS[J]. Phytochemistry, 2002, 59: 759- 765.
- [10] YONG G S, KYUNG H C, JONG M K, et al. Determination of betaine in *Lycium chinense* fruits by liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry[J]. J Chromatogr, 1999, 857: 331- 335.
- [11] WILLOUGHBY R, SHEEHAN E, MITROVICH S. A global view of LC/MS how to solve your most challenging analytical problems [M]. Pittsburgh, Pennsylvania: Global View Publishing, 1998.
- [12] 翁跃进. 作物耐盐品种及其栽培技术[M]. 北京:农业出版社,2002.
- [13] HUNT J. Dilute hydrochloric acid extraction of plant material for route cation analysis[J]. Commun in Soil Sci Plant Anal, 1982, 13(1): 49- 55.

《分析测试学报》对撰写中英文摘要的几点要求

撰写中英文摘要的要求:(1) 文章表达简洁,能独立成文,勿须背景信息,第一句不要重复题目;(2) 摘要应包含论文的要点(方法、主要过程及结论);(3) 摘要应给出关键数据;(4) 摘要中不要出现图、表、参考文献等;(5) 不要标榜作者的研究成果,不要出现自己的观点及推测,只客观地描述新发现;(6) 摘要中第一次出现英文缩写应有全称。