

张一名,刘玲玲,谢韞泽,等. 应用高效液相色谱-二极管阵列检测器优化棉花体内多胺的测定方法[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):328-331.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.095

应用高效液相色谱-二极管阵列检测器 优化棉花体内多胺的测定方法

张一名¹, 刘玲玲¹, 谢韞泽², 孙艳香¹, 冯雪¹, 贾永红¹

(1. 廊坊师范学院生命科学学院, 河北廊坊 065000; 2. 南京农业大学资源与环境学院, 江苏南京 210095)

摘要:应用高效液相色谱-二极管阵列检测器法(HPLC-DAD)对棉花体内多胺测定时的流动相比例及流速、多胺全光谱信息等进行分析,重点比较2种常用检测波长230、254 nm下的测定参数。最终确定检测波长为230 nm、流动相体积比 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=80:20$ 、流速为0.6 mL/min为最佳色谱条件。该方法有较好的准确度、灵敏度,腐胺、亚精胺、精胺的回收率分别为98.58%、96.98%、99.62%,且非常稳定。以此色谱条件为基础测定棉花幼苗不同组织中多胺水平发现,叶片中3种多胺的含量明显高于根、茎组织;此外,不同组织内亚精胺含量最高。

关键词:棉花;幼苗组织;多胺含量;高效液相色谱;二极管阵列检测器

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0328-04

多胺(polyamines, PAs)是一类含有多个氨基的长链脂肪族化合物,广泛存在于生物体内。在植物代谢途径中,目前比较清楚的多胺形式主要有腐胺(putrescine, Put)、亚精胺(spermidine, Spd)、精胺(spermine, Spm)^[1-2]。研究表明,多胺在植物体内是一类重要的生长调节因子,参与植物的细胞分裂^[3-4]、性别分化^[5]、果实成熟与衰老^[6]、逆境适应^[7-10]等重要生理过程。在分子水平的研究中还发现,多胺参与DNA的复制、转录、膜稳定、RNA和蛋白质的翻译^[11]、DNA凝聚及激素的调控^[12]等过程。另外,在人体中也存在大量多胺类物质,并与人类健康息息相关^[13]。由于植物性食物是人体多胺的重要来源之一^[14],因此,如何准确而快速地检测植物组织中的多胺技术越来越受到人们的重视。

多胺的测定以前主要用氨基酸分析仪、纸电泳等方法^[15-16],这2种检测方法样品回收率低,检测灵敏度也不高。目前多用衍生化的方法,即将多胺的一、二级氨基接在卤素原子上,另外还有接在荧光基团或对紫外有吸收的基团上,再通过气相(GC)或液相(HPLC)方法进行分离检测。其中,气相色谱刚刚应用在植物多胺的研究方向,虽然分析时间短,但是对试样要求高,前处理过程比较复杂^[17],并且应用质谱检测设备价格昂贵,且分离检测效果没有显著提高。自从1979年Redmond等采用苯甲酰化的方法以来,随着不断改进,高效液相色谱法已经成为较为成熟的检测植物体内多胺的方法^[18-21]。目前主要应用荧光检测器(FLD)、紫外吸收检测器(UV)。其中,FLD法检测多胺的主要优势在于灵敏度高^[22],但要用到有毒流动相乙腈。另外,由于瑞利散射、拉曼散射的

干扰,使荧光检测方法的条件构建和优化过程较为复杂,没有一定的专业基础较难完成。而紫外吸收法虽然灵敏度并不突出,但是可以用于植物体内多胺含量的测定,加上流动相中的甲醇毒性较低、仪器成本较低等优点,使得紫外吸收法成为当今国内用于测定植物多胺最常用的一种方法。

目前对于紫外吸收法检测波长的选择主要是苯甲酰氨基特征峰230 nm处、苯基特征峰254 nm处^[15-16,18,23]。以上2种选择对于多胺的检测虽然都有一定的根据,但是对于检测效果尚缺乏科学的比较。本研究应用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)广谱记录光谱信息,同时针对棉花幼苗组织样本特点比较230、254 nm 2种检测波长的操作性、可靠性,最终优化建立了可应用于UV检测器的棉花幼苗组织样本中3种多胺的检测方法,并依据该方法比较棉花幼苗根、茎、叶组织内多胺含量的差异。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试棉花种子由廊坊师范学院生命科学学院遗传与育种研究所提供,为农大棉7号。

1.2 试验方法

1.2.1 棉花幼苗组织中多胺的提取 取1.0~2.0 g棉花3叶期幼苗的不同新鲜组织,液氮研磨后加入4 mL预冷的5%高氯酸溶液,冰浴浸提1 h后离心(12 000 r/min, 30 min, 4 ℃);取上清液为样液,4 ℃保存备用。

1.2.2 样品的苯甲酰化 取500 μL样液,加入10 mL离心管中,先后加入14 μL苯甲酰氯、1 mL 2 mol/L氢氧化钠溶液,振荡混匀后于37 ℃水浴反应20 min;加入2 mL饱和氯化钠溶液,混匀后用2 mL乙醚萃取,离心(1 500 r/min, 5 ℃, 5 min)后取1 mL乙醚相真空干燥,用100 μL甲醇溶解后,用0.22 μm孔径有机相滤膜过滤,即可进样^[21]。

1.2.3 色谱条件的优化 色谱仪:Agilent 1260 Infinity;色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ Stable Bond Analytical

收稿日期:2015-06-30

基金项目:河北省自然科学基金(编号:C2010001804);廊坊师范学院青年基金(编号:LSZQ201302)。

作者简介:张一名(1984—),男,河北定州人,硕士研究生,实验师,研究方向为植物生化与分子生物学。E-mail:290272908@qq.com。

通信作者:孙艳香,博士,教授,研究方向为植物遗传育种。E-mail:yx_sun70@163.com。

4.6 mm×150 mm。

流动相与流速:综合华永有等方法^[22,24],以甲醇、水混合物为流动相,测试甲醇体积分数为 50%~90% 时不同流动相的色谱性能,每变化 10% 进样测定 1 次,确定最佳流动相比例。通过比较流动相流速为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL/min 的检测效果,确定最佳流速。

检测波长:以二极管阵列检测器收集 190~900 nm 区间内的吸光度数据,重点比较多胺在 230、254 nm 下标准曲线质量、回收率、标准偏差(RSD,%)、峰型,再结合 3 种多胺的光谱信息确定适合的检测波长。

柱温:30 ℃^[21]。
时间:不限制。根据分析中杂质的具体洗脱情况,设定合理的分析时间。

1.2.4 标准曲线的制作 精确配制 0.2 μmol/mL 多胺标准溶液,苯甲酰化衍生后,将标准液稀释为 0.3、0.6、1.2、2.5、5.0、7.5、10.0 nmol/mL,取 10 μL 进样;用安捷伦化学工作站(Agilent ChemStation)对 230、254 nm 信号数据进行分析,分别建立校正曲线。

1.2.5 棉花叶片多胺回收率的测定 取棉花叶片,抽提得到测定样液,苯甲酰化衍生后取 10 μL 进样测定,在 230、254 nm 2 个检测波长和标准曲线下各自得到样品中 3 种多胺的含量数据。再分别将 3 种不同浓度苯甲酰化后的多胺标准样品加入到已知浓度的样品多胺提取液中,并测定回收值^[23]。根据样品含量、加标量和所测得回收值分别计算回收率及其标准偏差。

1.2.6 棉花幼苗不同组织中多胺含量测定 按照“1.2.1”“1.2.2”节中的相应方法得到棉花幼苗根、茎、叶组织样液,并进行衍生化。按照试验最终确定的检测条件,对棉花幼苗不同组织内的 3 种多胺含量进行检测,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 流动相条件的优化

通过比较不同比例的流动相以及不同流速下多胺的检测效果,发现流动相体积比 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=80:20$ 、流速为 0.6 mL/min 时,多胺的分离度、信号峰型较好,且棉花叶片样品中目标峰信号与其他杂峰无明显叠加;在此条件下,Put、Spd、Spm 的保留时间分别约为 5.09、9.30、17.75 min;并且,检测样液中存在的残留苯甲酰氯峰(7 min 左右)对检测整体无影响(图 1)。

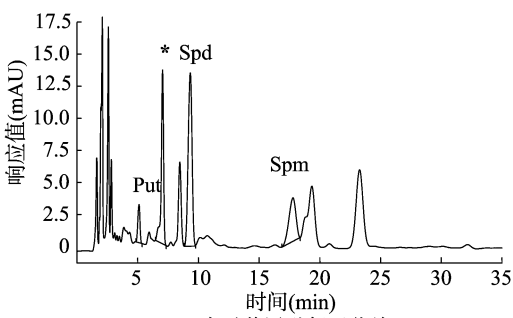


图1 棉花幼叶多胺色谱分析标准示意

2.2 检测波长的确定

2.2.1 2 种检测波长下标准曲线的建立与比较 标准曲线的制作在流动相体积比 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=80:20$ 、流速为 0.6 mL/min,检测波长分别为 230、254 nm 的色谱条件下进行。数据由安捷伦化学工作站(Agilent ChemStation)处理并分别建立校正表,回归方程见表 1。从试验结果可知,230、254 nm 检测波长下多胺 Put、Spd、Spm 回归方程的决定系数(r^2)均大于 0.99,说明 2 种波长均能够应用于棉花幼苗组织

表 1 230、254 nm 波长下 3 种多胺检测回归方程与 r^2

多胺	230 nm		254 nm	
	回归方程	r^2	回归方程	r^2
Put	$y = 7.8247x - 0.2221$	0.9992	$y = 2.0261x + 0.1860$	0.9982
Spd	$y = 10.371x - 0.0263$	0.9990	$y = 2.6285x + 0.0614$	0.9987
Spm	$y = 29.396x - 4.0842$	0.9962	$y = 7.6161x - 0.7567$	0.9954

注:y 为峰面积;x 为样液中所测物质的浓度,nmol/mL;线性范围为 0.3~10.0 nmol/mL。

内多胺含量的测定;但是通过比较可以看出,波长为 230 nm 时回归方程的 r^2 均高于波长为 254 nm 下的 r^2 。因此本研究表明,从标准曲线决定系数的角度考量,检测波长为 230 nm 要优于 254 nm。

2.2.2 2 种检测波长下回收率标准偏差的测定 由表 2 可以看出,在 230 nm 检测波长下,Put、Spd、Spm 的平均回收率均在 95% 以上,分别为 98.58%、96.98%、99.62%,RSD 分别为 1.56%、0.78%、0.95%。当检测波长为 254 nm 时,回收率均超过 100.00%,且该检测波长下 RSD 较高,分别为 5.40%、9.49%、2.93%。说明当检测波长为 254 nm 时,尽管有较高的回收率,但是检测数据的稳定性下降,检测误差增大。因此,从回收率 RSD 的角度评价可知:230 nm 较 254 nm 更适合作为检测波长测定棉花样品中的多胺含量。

2.2.3 2 种检测波长下的峰型比较 如图 2 所示,比较 230、

254 nm 下棉花幼叶等量程色谱图可以发现:检测波长为 230 nm 时,3 种多胺的响应值较大,虽然同时也增大了部分杂质及副反应的响应峰值,但是目标峰仍然明显;254 nm 作为检测波长时,虽然杂质响应较小,但是 3 种多胺的信号响应值同样较低。

2.2.4 3 种多胺的吸收光谱信息 用二极管阵列检测器(DAD)分别收集 3 种多胺信号峰在波长 190~900 nm 的光谱信息。由图 3 可见,3 种多胺在 200 nm 处有最高吸收峰,230 nm 左右均有明显的第 2 吸收峰。由于多种物质在 200 nm 处均存在光谱吸收峰,可使基线漂移严重,而在 230 nm 的第 2 吸收峰附近杂质相应明显减少(图 4)。因此根据 3 种多胺各自的光谱信息分析可知:选择检测波长在 230 nm 左右的第 2 吸收峰要优于其他波长。

综上所述,棉花幼苗组织内 3 种多胺含量的色谱检测应

表 2 棉花幼苗叶片组织中多胺加标回收率结果

检测波长 (nm)	10μL 样品量(nmol)			10μL 加标量(nmol)			10μL 测定回收值(nmol)			平均回收率(%)			RSD(%)		
	Put	Spd	Spm	Put	Spd	Spm	Put	Spd	Spm	Put	Spd	Spm	Put	Spd	Spm
230	0.476	3.298	0.598	0.121	0.171	0.123	0.589	3.333	0.725	98.58	96.98	99.62	1.56	0.78	0.95
				0.252	0.355	0.267	0.706	3.556	0.862						
				0.503	0.709	0.511	0.980	3.907	1.094						
254	0.485	3.471	0.612	0.121	0.171	0.123	0.625	3.557	0.779	100.35	103.79	102.62	5.40	9.49	2.93
				0.252	0.355	0.267	0.765	3.470	0.890						
				0.503	0.709	0.511	0.930	4.562	1.130						

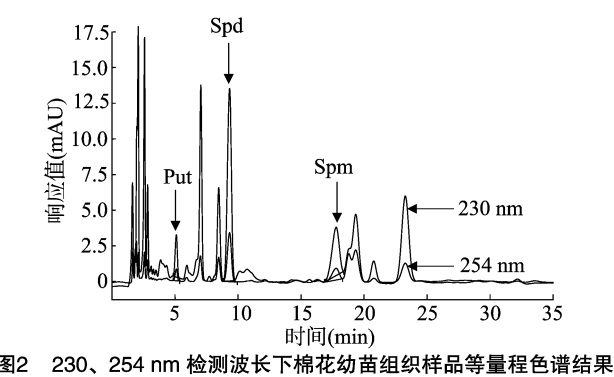


图2 230、254 nm 检测波长下棉花幼苗组织样品等量程色谱结果

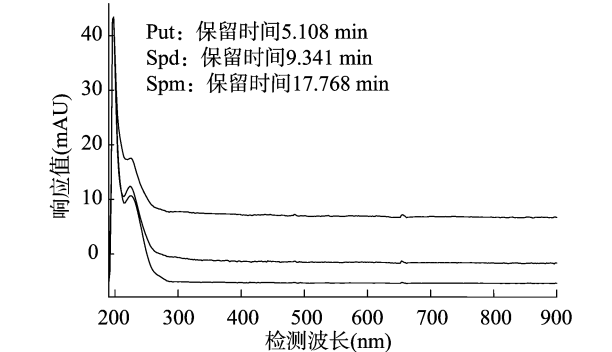
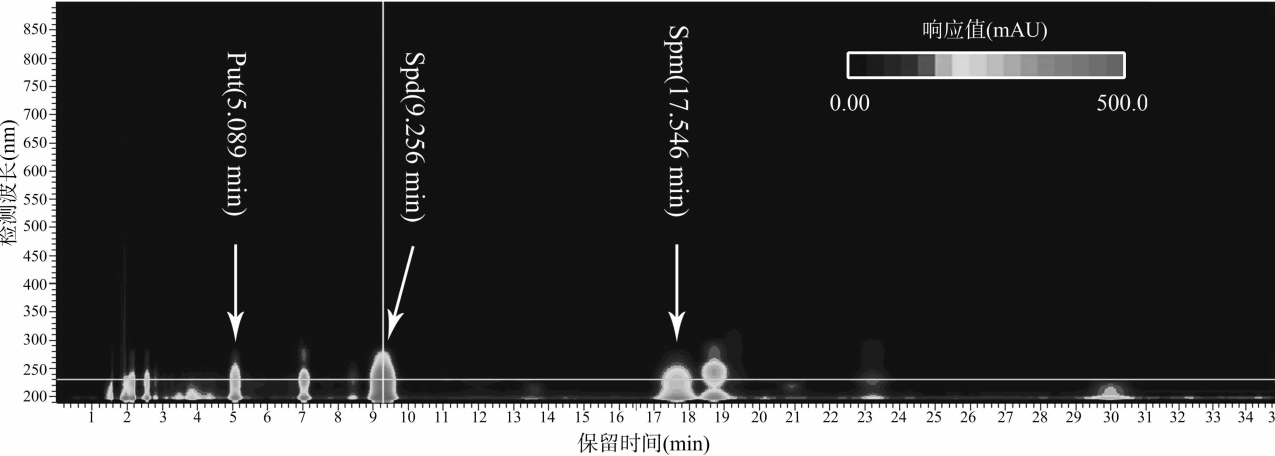


图3 3 种多胺各自满量程光谱结果



比色卡显示为色谱分析响应值；箭头所指为 3 种多胺所在位置

图4 棉花幼苗组织样品 190~900 nm 的吸收光谱

选择 230 nm 为检测波长。

2.3 分析时间的确定

在棉花幼叶样品的不限时检测中,保留时间在 30 ~ 32 min 仍有不规则杂峰(图 2、图 4),而 32 min 后信号基本回归基线。因此,为洗脱杂质的同时保留完整数据,设定单针样品的分析时间为 35 min,且无后运行为宜。

2.4 棉花幼苗不同组织的多胺含量比较

依据前期试验结果得出:流动相体积比为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=80:20$ 、流速为 0.6 mL/min、检测波长为 230 nm 为最适合的色谱条件。对棉花根、茎、叶组织进行 3 种多胺含量的测定,结果表明,多胺在棉花幼苗组织中含普遍偏少,响应值较低,均在 nmol/g 水平。如表 3 所示,所测组织中 Spd 含量最高,在不同组织内的含量均高于 Put、Spm 含量;另外,棉花幼苗叶片组织中的 3 种多胺总含量为 (41.90 ± 1.56) nmol/g,远远高于根的 (18.18 ± 2.61) nmol/g、茎的 (12.97 ± 2.52) nmol/g。

表 3 棉花幼苗组织中多胺的含量

组织	含量(nmol/g)			
	Put	Spd	Spm	总量
根	3.71 ± 1.83	11.23 ± 0.24	3.23 ± 0.55	18.18 ± 2.61
茎	1.59 ± 0.88	9.53 ± 0.73	1.85 ± 0.91	12.97 ± 2.52
叶	5.00 ± 0.26	31.85 ± 0.31	5.05 ± 1.01	41.90 ± 1.56

3 结论与讨论

3.1 色谱条件的优化

以往研究表明,多胺的次级胺基与柱子硅羟基的相互作用,可引起在不同的流动相条件下,保留时间会产生较大变化^[23]。本研究选择流动相体积比 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=80:20$,可以减少洗脱时间、降低分析时间。采用流速为 0.6 mL/min,即可将样品中各个组分比较清晰地分离开来。以上结果优化了之前报道的相关方法^[15,22,24],得出了专门针对棉花幼苗组织内多胺含量检测的可靠色谱条件。

有报道显示,衍生化过程中的苯甲酰氯残留会对多胺色谱分析产生一定影响^[24]。本试验表明,Put、Spd、Spm 的保留时间分别为 5.09、9.61、17.75 min,苯甲酰氯的保留时间约为 7.21 min,避免了苯甲酰氯、腐胺的峰重叠现象,并且 3 种多胺信号与组织样品中其他杂峰信号互不干扰。

3.2 检测波长的比较

对于目前检测多胺含量常用的 2 种检测波长 230、254 nm,笔者所在实验室以二极管阵列检测器收集 190 ~ 900 nm 区间内吸光度数据发现:3 种多胺检测波长约为 230 nm 时,均为第 2 高吸收峰,且苯甲酰氨基的显色受多胺脂肪链及其他副反应杂质的影响不大;而以 254 nm 作为检测波长时,虽然杂质响应较小,但 3 种主要多胺的信号响应值同样较小,使标准曲线的线性相关性等降低。因此,在多胺本底水平比较低的棉花幼苗上不适用 254 nm 波长,选择 230 nm 波长为宜。

3.3 优化的方法以及所得检测结果分析

如前文所述,最终确定最佳色谱条件:检测波长为 230 nm,流动相体积比为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=80:20$,流速为 0.6 mL/min。

按照以上方法,棉花幼苗组织多胺含量检测结果显示,幼苗期棉花组织内 Spd 含量在 3 种多胺中最高。该结果可能表明,在植株的快速生长期,Spd 起一些重要的作用^[25-26]。在棉花组培苗组织内多胺的研究中,Spd 在球形胚形成期含量显著升高,明显高于 Put、Spm,报道中对这些现象的解释是高水平 Spd 可能有助于细胞分化^[27-28],但是具体的代谢以及调控方式正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 沈佐君,杨树德. 多胺的测定方法及其临床应用[J]. 国际检验医学杂志,1994,15(5):226-230.
- [2] Gerner E W, Meyskens F L. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding[J]. Nature Reviews Cancer, 2004, 4(10): 781-792.
- [3] 赵福庚,刘友良. 高等植物体内特殊形态多胺的代谢及调节[J]. 植物生理学通讯,2000,36(1):1-6.
- [4] 黄作喜,谢寅峰,胥伟,等. 黄瓜去根苗离体培养条件下多胺对雌花形成的影响[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2008,32(4):147-150.
- [5] Luo H, Zheng Z, Lin S, et al. Changes in endogenous hormones and polyamine during sexual differentiation of lychee flower[J]. Acta Horticulturae, 2005; 665: 203-208.
- [6] Xu C L, Jin Z Y, Yang S Q. Polyamines induced by heat treatment before cold-storage reduce mealiness and decay in peach fruit[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2005, 80(5): 557-560.
- [7] Liu H P, Dong B H, Zhang Y Y, et al. Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings[J]. Plant Science, 2004, 166(5): 1261-1267.
- [8] Groppa M D, Ianuzzo M P, Tomaro M L, et al. Polyamine metabolism in sunflower plants under long-term cadmium or copper stress[J]. Amino Acids, 2007, 32(2): 265-275.
- [9] 袁祖丽,刘秀敏,李华鑫. 多胺与环境胁迫关系研究进展[J]. 西北植物学报,2008,28(9):1912-1919.
- [10] Drolet G, Dumbroff E B, Legge R L, et al. Radical scavenging properties of polyamines[J]. Phytochemistry, 1986; 25(2): 367-371.
- [11] Childs A C, Mehta D J, Gerner E W. Polyamine-dependent gene expression[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60(7): 1394-1406.
- [12] 赵福庚,刘友良. 高等植物体内特殊形态多胺的代谢及调节[J]. 植物生理学报,2000,36(1):1-6.
- [13] Tiburcio A F, Altabella T, Flores D, et al. Polyamines in health and nutrition[M]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1999: 161-176.
- [14] 吉晓佳,张大栋,刘友良,等. 植物源食品多胺的作用及其含量调节[J]. 植物学通报,2002,19(4):504-509.
- [15] 程文翰,朱华国,李鹏飞,等. 棉花多胺 HPLC 的测定方法优化及其在体细胞胚胎发生过程中的变化规律[J]. 棉花学报, 2014, 26(2): 138-144.
- [16] Nikolaus S. Polyamines[M]. New York: Academic Press, 1983: 3-9.
- [17] Chen G G, Turecki G, Mamer O A. A quantitative GC-MS method for three major polyamines in postmortem brain cortex[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2009, 44(8): 1203-1210.
- [18] Redmond J W, Tseng A. High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine[J]. Journal of Chromatography A, 1979; 170(2): 479-481.
- [19] Flores H E, Galston A W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography 1[J]. Plant Physiol, 1982; 69(3): 701-706.
- [20] 吴少伯,郭枫. 水稻胚和胚乳中多胺高效液相色谱分离[J]. 色谱, 1989, 7(6): 389-391.
- [21] 杜军英,孙秉庸,陈兆珍,等. OPA-巯基乙醇柱前衍生反相高效液相色谱法测定生物组织中多胺含量[J]. 解放军医学高等专科学校学报, 1997, 25(1): 50-53.
- [22] 华永有,周芬霞,林宏琳,等. HPLC-FLD 法检测黄酒中 9 种生物胺[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(6): 761-764.
- [23] 马宝龙,屈旭斌. 高效液相色谱法测定枸杞叶中精胺和亚精胺[J]. 宁夏工程技术, 2011, 10(1): 48-50.
- [24] 刘俊,吉晓佳,刘友良. 检测植物组织中多胺含量的高效液相色谱法[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 596-598.
- [25] 鲁莹,束胜,朱为民,等. 多胺缓解硝酸钙对小白菜幼苗生长抑制的作用[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 422-428.
- [26] 杨立飞,魏国平,朱月林. 外源亚精胺对 NaCl 胁迫下菜用大豆多胺合成及膜脂过氧化的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 114-117.
- [27] 杜玉梁,陈叶,刘彩虹,等. 植物维管组织形态建成的分子调控机制[J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(3): 142-150.
- [28] 刘华英,萧浪涛,鲁旭东,等. 伏令夏愈伤组织体细胞胚发生中多胺水平的变化[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(3): 275-280.

更正:《江苏农业科学》2016 年第 44 卷第 6 期 338-340 页所刊论文《不同组合尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的繁育比较》,第一作者应该为黄培铃,特此更正。

《江苏农业科学》编辑部