

反相高效液相色谱法测定 PEG 胁迫下 小麦幼苗中甜菜碱的含量变化

马 钰, 蒋 斌, 王庆俐, 张林生*

(西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 采用胁迫及复水处理不同品种小麦幼苗, 甜菜碱提取液经浓缩后分别在阴阳离子交换树脂上纯化, 样品用 C^{18} 反相色谱柱进行分离, 流动相为 50 mmol/L 的 NaH_2PO_4 溶液 (pH 4.45), 流速为 0.6 mL/min, 192 nm 波长测定。实验优化了提取温度、时间、色谱离子对相关影响因素, 测定了水分胁迫下小麦幼苗叶片中甜菜碱含量的变化。研究结果发现: 在 PEG 胁迫和复水过程中, 随着时间的延长, 小麦幼苗中的甜菜碱的含量均呈现先增后降趋势, 抗旱型小麦能在较短时间内迅速积累大量甜菜碱; 甜菜碱的合成与植物抗旱有着密切关系。反相高效液相色谱法测定小麦甜菜碱含量具有准确、灵敏、简便等特点。

关键词: 小麦幼苗; 水分胁迫; 甜菜碱; 反相高效液相色谱法

中图分类号: S512.101 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)01-0190-05

甜菜碱是一种季铵型水溶性生物碱, 植物中甜菜碱主要有 12 种, 最简单也是最早被发现和研究得最多的是甘氨酸甜菜碱 (glycinebetaine), 简称甜菜碱 (betaine, BET)^[1]。干旱引起植物脱水, 植物感受到外界水分胁迫信号后积累甜菜碱等渗透调节物质, 增加抗脱水能力^[2]。甜菜碱作为一种渗透调节物质, 在细胞质中积累, 不仅可以保持细胞内外的渗透平衡, 而且能够有效地维持蛋白质分子和生物膜的结构与功能, 参与维持细胞正常的生理功能, 在植物抗旱过程中起到重要的渗透调节作用^[3]。此外, 甜菜碱还可稳定光合放氧系统和光系统^[4], 如保护三羧酸循环的主要酶类, 外周多肽等多种生理功能, 对植物细胞在干旱条件下维持正常的生理生化代谢过程有重要意义^[5]。

如何快速、准确检测甜菜碱含量是研究甜菜碱的重要基础。参考许多分析方法, 其中高效液相色谱 (HPLC) 法是较为合适的方法, 与分光光度法^[6]、比色法^[7]、碘量法^[8]、核磁共振^[9]、质谱法^[10] 等比较, 具有操作简单、快捷和准确度较高等特点。分光光度法、比色法虽快速简便但误差较大, 准确性受到限制, 也有研究采用高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术测定 BET^[11], 该法虽然准确度高, 但影响因素较多, 条件较难控制。本研究采用反相 HPLC 技术测定了两个小麦品种在水分胁迫下体内甜菜碱含量的变化, 通过优化实验条件, 获得了较为满意的效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

采用 Waters 510 型高效液相色谱仪, 481 型紫外-可见波长检测器, 7725i 六通进样器, HW2000 型色谱工作站。Hypersil BDS (250 mm × 4.6 mm 5 μ m) C^{18} 反相色谱柱 (irregular-H 填料)。

甜菜碱标准品 (sigma, 分析纯), 辛烷磺酸 PIC B-8 (TOKYO), NaH_2PO_4 (分析纯), Dowex 阴、阳离子交换树脂 (100 目、200 目, sigma)。

1.2 材料培养与处理

选用两种抗旱性不同的小麦品种: 抗旱型陕合 6 号和非抗旱型郑引 1 号, 种子经消毒浸泡后, 置于光照培养箱中 (25 $^{\circ}C$), 光照 14 h/d, 光强为 300 μ mol/(m²·s)。当小麦幼苗生长至二叶期时, 用含 PEG 6000 (-0.8 MPa) 的溶液进行胁迫处理, 对照组仍正常补水。从胁迫处理开始每隔 12 h 取一次叶样 (12 h, 24 h, 36 h, 48 h), 至 48 h 幼苗明显萎蔫, 给培养皿换清水做复水处理, 仍然隔 12 h 取样 (60 h, 72 h, 84 h, 96 h), 取至 96 h 结束, 采集的叶片保存于 -80 $^{\circ}C$ 下待用。

取 1.5 g 小麦叶片, 在液氮冷冻下研碎成粉末, 转移到 10 mL 离心管中, 加入 5 mL 去离子水, 90 $^{\circ}C$ 水浴 1 h, 然后在 4 $^{\circ}C$ 下浸提过夜, 抽滤收集滤液, 滤渣再用水于 4 $^{\circ}C$ 浸提过夜后, 抽滤两次, 合并滤液,

收稿日期: 2008-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671253); 中国博士后科学基金资助项目

作者简介: 马 钰 (1983-), 陕西宝鸡人, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: mayu.u@163.com。

通讯作者: 张林生, 教授, 主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail: linszhang@yahoo.com.cn。

80℃水浴浓缩至 2 mL。

1.3 分析样品的制备

取 1.5 g 小麦叶片,在液氮冷冻下研碎成粉末,转移到 10 mL 离心管中,加入 5 mL 去离子水,90℃水浴 1 h,然后在 4℃下浸提过夜,抽滤收集滤液,滤渣再用水于 4℃浸提过夜后,抽滤两次,合并滤液,80℃水浴浓缩至 2 mL。每个样品做 3 个重复。

将粗提的样品浓缩液依次通过 5 mL Dowex (1×8)阴离子交换树脂柱和 5 mL Dowex (50W×2)阳离子交换树脂柱,用 10 mL 去离子水淋洗层析柱,再用 10 mL 2 mol/L 的 NH₄OH 洗脱 Dowex (50W×2)阳离子交换树脂柱^[12],并收集洗脱液于 80℃水浴蒸干。用 1 mL 流动相溶解样品,经 0.25 μm 微孔滤膜过滤,取 20 μL 上样分析。

1.4 色谱条件

流动相为 50 μmol/L NaH₂PO₄ (pH4.45)。流

速为 0.6 mL/min。192 nm 波长扫描。进样量为 20 μL,柱温 30℃。

2 结果与分析

2.1 实验条件的优化

2.1.1 浓缩方法 根据甜菜碱物理性质的稳定性,对热、酸、碱有较强的耐受性等特点,在样品提取过程中采用 80℃水浴蒸发浓缩,比减压蒸干法简便、易操作、并减少样品在处理过程中的损失。

2.1.2 提取条件的正交试验 甜菜碱易溶于水,通常用去离子水作为提取溶剂,本实验采用正交试验优化提取过程中的各项因素(表 1),采用 L₉(3⁴)正交实验设计,以 HPLC 测定甜菜碱含量为指标,测定结果见表 2^[13]。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors of orthogonal experimental

项目 Items	加水体积(mL) Water volume	水浴时间(min) Bath time	水浴温度(℃) Bath temp.	浸提温度(℃) Extraction temp.
1	5	30	70	2
2	8	60	80	4
3	10	90	90	0

表 2 甜菜碱提取条件优化的正交实验结果[L₉(3⁴)]

Table 2 Results of optimizing the conditions of extraction [L₉(3⁴)]

项目 Items	加水体积(mL) Water volume	水浴时间(min) Bath time	水浴温度(℃) Bath temp.	浸提温度(℃) Extraction temp.	平均 BET 含量(μg/mL) Average BET content
1	5	30	80	2	0.01016
2	8	30	90	4	0.01876
3	10	30	70	0	0.00854
4	5	60	70	0	0.00612
5	8	60	80	2	0.01765
6	10	60	90	4	0.02176
7	5	90	90	4	0.01931
8	8	90	80	0	0.01178
9	10	90	70	2	0.01543
Σ ₁	0.01268	0.012013	0.014717	0.014563	—
Σ ₂	0.015177	0.016063	0.013437	0.019943	—
Σ ₃	0.015507	0.015317	0.015287	0.008887	—
极差 R	0.002827	0.00405	0.00185	0.001056	—

从表 2 中可以看出,提取甜菜碱的最佳条件是:水浴温度 90℃,水浴时间 60 min,浸提温度 4℃,加去离子水体积 10 mL。在此条件下,分析陕合 6 号幼苗在胁迫 12 h 时甜菜碱含量为 0.02176 μg/mL。

从极差 R 可以看出,在四个因素水平中,极差 R 最大的是水浴时间,说明该因素对甜菜碱的提取影响较大。

2.1.3 检测波长的选择 将一定浓度的甜菜碱标

准品溶液,在设定的波长区间 150~550 nm 进行扫描,选择其适宜的波长,检测结果认为,甜菜碱在 192 nm 波长处有最大光吸收,该波长检测灵敏度高,杂质吸收峰少、干扰小,效果理想,因此设定 192 nm 为 HPLC 的检测波长。

2.1.4 柱温的选择 柱温是色谱分离条件的选择条件之一,它直接影响被分离物质的分辨率、色谱峰的形状等。选择合适的柱温可以提高检测物质的分离度。实验设定不同的温度考察柱温对分析结果的影响,结果见表 3。

表 3 不同柱温下分离 BET 的保留时间与峰面积

Table 3 The reserve time and wave area under different column temp

柱温(°C) Column temp.	保留时间(min) Reserve time	峰面积(mV·min) Wave area
20	6.346	70134
25	6.016	64331
30	4.546	61947
35	4.493	61052

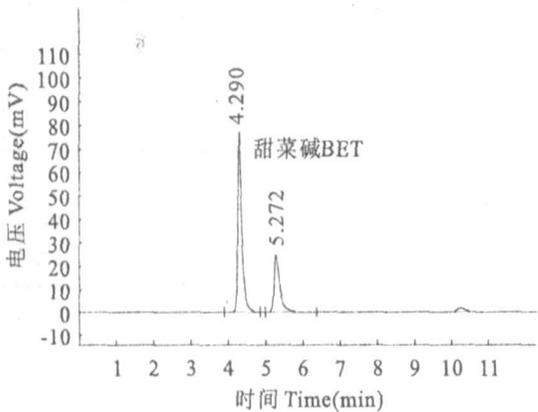


图 1 50 μmol/L KH₂PO₄(pH4.45)+0.1%PIC B-8
Fig. 1 50 μmol/L KH₂PO₄(pH4.45)+0.1%PIC B-8

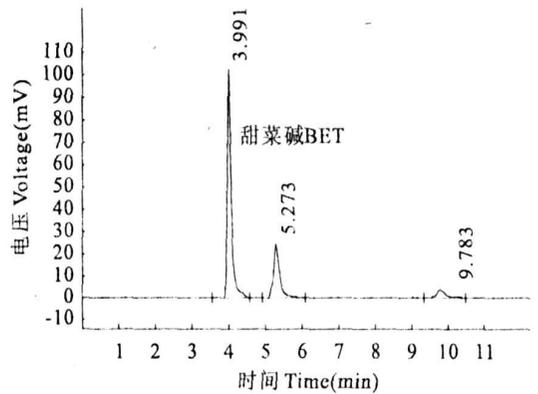


图 2 50 μmol/L KH₂PO₄(pH4.45)
Fig. 2 50 μmol/L KH₂PO₄(pH4.45)

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 取甜菜碱标准品溶液(0.06 mg/mL),连续进样 5 次,每次上样量 20 μL,按 1.4 中所述色谱条件进行色谱分析,测定甜菜碱峰面积。根据结果计算,RSD 值为 1.24%,表明精密度良好。

2.4.2 重现性实验 取同一种样品溶液,制备供试品溶液,按 1.4 中所述色谱条件进行色谱分析,计算甜菜碱峰面积的 RSD 值为 1.76%,表明该方法重现性较好。

2.4.3 稳定性实验 取同一种供试样品溶液,分别在 0、1、3、6、12、24 h 测定峰面积,计算 RSD 为 2.3%,表明供试样品在 24 h 内稳定。

2.4.4 回收率实验 称取已知含量的样品 3 份,分

由表 3 可以看出,随色谱柱温的升高,保留时间前移,峰面积减少,峰分离效果较好,但在 30°C~35°C 之间,保留时间变化不大。考虑到本实验重在分离,且高温对柱子损耗较大,故选用 28°C~30°C 为宜。

2.2 流动相的选择

在流动相中加入离子有助于提高甜菜碱的分离效果,本实验对在流动相中进行了添加离子对试剂的对比实验(如图 1,图 2 所示)。结果表明,在流动相(NaH₂PO₄/pH4.45)中不加离子对试剂也能取得较好效果,但有少量杂峰生成。加入离子对试剂 PIC B-8 后,减少杂峰的生成,提高分离效果。

2.3 标准曲线

准确称取甜菜碱标准品,用流动相配置浓度为 0.006、0.03、0.06、0.3 mg/L 和 0.6 mg/L,分析结果,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为: $Y = 8762 + 3.154e + 006 X$ 。

实验表明:在 1~500 μmol/mL 范围内,甜菜碱浓度与峰面积有良好的线性关系,检出限 5 ng (S/N=3)。

别加甜菜碱标准品适量,制备样品溶液进样分析,测定甜菜碱平均回收率为 98.2%,RSD 值为 1.64%。

2.5 样品测定结果

用 PEG6000 胁迫小麦幼苗 36 h 后,两个品种都出现了一定程度的萎蔫现象,郑引 1 号程度较重,陕合 6 号较轻,但都能维持生长。同时,小麦叶片出现卷曲,但未发生枯黄。48 h 后胁迫结束,开始复水,随复水程度的加深,小麦叶片又重新恢复自然状态,两个品种恢复快慢差异不明显。

采用本实验方法对水分胁迫下小麦幼苗进行甜菜碱含量分析,图 3 列出了水分胁迫下和对照组中甜菜碱含量的变化。在正常水分条件(对照)下生长的陕合 6 号(S6)和郑引 1 号(Z1)叶片,其甜菜碱含量

无较大变化。而在处理组中,抗旱型陕合 6 号幼苗的甜菜碱含量变化趋势为:在胁迫初期(0~12 h),随胁迫程度加深,甜菜碱含量增加,在胁迫 12 h 达到较高(0.02951 $\mu\text{g}/\text{mL}$),随后 48 h 降到低点(0.004842 $\mu\text{g}/\text{mL}$),仍高于正常值(0.002626 $\mu\text{g}/\text{mL}$);在 48 h 后进行复水,甜菜碱含量又开始增加,直到 60 h 达到最大(0.032357 $\mu\text{g}/\text{mL}$),随后持续降低,在 84 h 降到 0.002481 $\mu\text{g}/\text{mL}$,恢复正常(见图 3)。

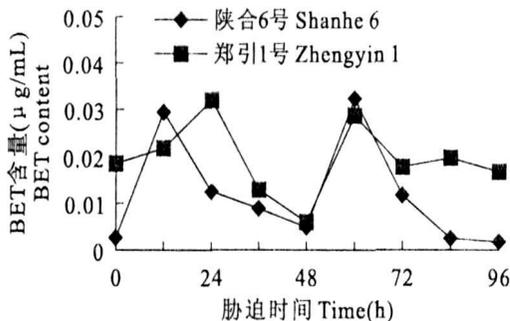


图 3 水分胁迫 48 h 及复水 48 h 小麦幼苗体内 BET 含量变化
Fig. 3 The BET content in Shanhe 6 and Zhengyin 1 during 48 h drought stress and 48 h water resupply

从图 3 可以看出,耐旱性弱的郑引 1 号小麦体内甜菜碱含量变化趋势与陕合 6 号相似,但在水分胁迫期间甜菜碱含量的增长幅度低于 S6,并在时间上略有迟缓,此外,Z1 在水分胁迫最严重时期(48 h),甜菜碱含量(0.006028 $\mu\text{g}/\text{mL}$)降到正常水平以下。

不同小麦品种的初始甜菜碱含量有较大差异,(Z1>S6),但随胁迫过程的进行,BET 含量变化趋势相似,随水分胁迫时间的延长先增加后降低,随复水时间的延续同样先增后减。不同品种在干旱胁迫下合成 BET 的增加量与品种的抗旱性成正比。

3 讨论与结论

正交实验设计法是统计学中的重要方法之一。能充分利用标准化的正交表设计实验方案,并对实验结果进行计算分析,最终达到减少实验次数,缩短实验周期、优化实验方案的一种科学计算方法^[14]。本研究采用正交法优化提取甜菜碱中水浴温度、水浴时间、浸提温度、加水体积这四项相关联的基本条件,从而保证小麦叶片中的 BET 提取完全,测定结果准确可靠。

以往的 HPLC 分析中需要加入离子对试剂^[15],以确保待分离组分有较好的分离效果,但在此分析中,选用了合适的流动相 NaH_2PO_4 (pH4.5)。相对 HPLC 测定 BET 中常用的流动相 KH_2PO_4 ,不衍生、

不加离子对试剂也能得到较好分离效果。

甜菜碱 HPLC 分析的出峰时间为 5~6 min,分析时间快,适用于大量样品的检测。此外,测得的标准曲线的线性范围宽,为 1~500 $\mu\text{mol}/\text{mL}$,适用于各种动、植物及微生物体内甜菜碱含量的测定,与其他方法相比,该法具有操作简便,分析速度快,投入成本低,准确性高等特点。因此,此方法在科学研究及检验检测中可广泛应用。

通过正交实验设计优化提取条件,建立了一套甜菜碱的定量分析方法。测得水浴温度为 90℃,水浴时间 60 min,浸提温度 4℃,加去离子水体积 10 mL,在此条件下小麦叶样中甜菜碱被充分提取。在对小麦幼苗进行甜菜碱含量的 HPLC 分析时,流动相选用($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{pH}4.5$),色谱分离时不加离子对试剂也能取得较好效果,该方法具有检测灵敏度高,分析时间短等优点,普遍适用于农业生产及科学研究。

运用此方法检测两种小麦幼苗在水分胁迫及复水过程中,甜菜碱含量均呈先增后减的变化。抗旱型小麦(S6)在正常水分条件下体内甜菜碱含量不高,但在水分胁迫时,迅速积累大量甜菜碱以满足作物抗旱的需要;而非抗旱型(Z1),正常状态下甜菜碱含量虽较高,但在缺水时,合成甜菜碱的量较少,时间上较晚,所以无法满足作物在干旱条件下积累大量渗透调节物质来维持正常生理生化反应的需要,可见甜菜碱的合成与小麦抗旱性有着重要的关系。

参考文献:

- [1] Ishitani M, Nakamura T, Han S Y, et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 307-315.
- [2] 梁建生, 张建华. 根系逆境信号 ABA 的产生和运输及其生理作用[J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(5): 329-338.
- [3] 于同泉, 谷建田. 逆境中植物体内甜菜碱的积累及其生物学意义[J]. *北京农学院学报*, 1994, 9(2): 161-167.
- [4] Haj Ibagheri M A, Yeo A R, Flowers T J, et al. Salinity resistance in zea mays: fluxes of potassium, sodium and chloride, cytoplasmic concentrations and microsomal membrane lipids [J]. *Plant Cell Environ*, 1989, 12: 753-757.
- [5] 李新梅, 孙丙耀, 谈建中. 甜菜碱与植物抗性关系的研究进展[J]. *农业科学研究*, 2006, 27(3): 66-70.
- [6] 朱桂花, 杨高文, 陈晓光. 应用分光光度法测定枸杞半成品饮料中的甜菜碱含量[J]. *冷饮与速冻食品工业*, 1998, (1): 22-24.
- [7] Pearce R B, Strange R N, Smith H. Glycinebetaine and choline in wheat: distribution and relation to infection by fusarium graminearum [J]. *Phytochemistry*, 1976, (15): 953-954.
- [8] 王金贺, 王丽丽, 吴玉梅. 比色法测定饲料甜菜中甜菜碱含量 [J]. *中国甜菜糖业*, 2008, (3): 1.
- [9] Robinson S P, Jones G P. Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress [J].

- Aust J Plant Physiol, 1986, 13, 659—668.
- [10] Wood K V, Stringham K J, Smith D L, et al. Betaines of alfalfa: characterization by fast atom bombardment and desorption chemical ionization mass spectrometry[J]. Plant Physiol, 1991, 96, 892—897.
- [11] 赵勇, 翁跃进, 杨春丽. 盐处理下植物组织中甜菜碱和脯氨酸的 HPLC—ESI—MS 分析[J]. 分析测试学报, 2004, 23(6): 83—86.
- [12] 高雁, 李春, 娄恺. 阳离子交换树脂对甜菜碱的吸附特性研究[J]. 生物技术, 2007, 10(5): 42—45.
- [13] 上海市科学技术交流站. 正交试验设计法[M]. 上海: 上海人民出版社, 1975.
- [14] 徐仲安, 王天宝, 李常英. 正交试验设计法简介[J]. 科技情报开发与经济, 2002, 5: 149—151.
- [15] 陈少良, 毕望富, 李金克. 反相 HPLC 离子对色谱法测定植物组织中的甜菜碱[J]. 植物学报, 2000, 42(10): 1014—1018.

The determination of Betaines in wheat seedings under drought stress by RP—HPLC

MA Yu, JIANG Bin, WANG Qing-li, ZHANG Lin-sheng*

(College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: We used the different wheat seedings which were planted on the condition that water is restricted and resupply. The concentrated betain samples were purified by passing through the ion-exchange resin. We used the Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography technology to determine the change of betaine content. In the HPLC system, the buffer is 0.05 M sodium phosphate (pH 4.45), the column was kept at 28°C and the flow rate was 0.6 mL/min, the samples was determined at 192 nm wavelength. Besides, we optimized the factors, such as temperature, time and ion pair. During both the PEG-induced drought stress and water resupplied process, the amount of betaine increased at first and reduced latter. A great deal of Betaine accumulated in the anti-drought type wheat in a short time. This result showed that the synthesis of betaine have close connection with anti-drought plant. This method was exact, sensitive and convenient, as well provided a basis for anti-drought mechanism and the wheat breeding work.

Key words: wheat seedings; drought stress; betaine; reverse phase HPLC

(上接第 177 页)

Study on physiological characteristics of different genotypes soybean leaf

LI Yong-ping¹, WANG Chang-fa¹, ZHAO Li², QIN Xiao-wei¹, REN Xue-min¹

(1. Collage of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Collage of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to find out whether difference exists in canopy temperature of soybean of different genotypes, infrared radiation thermometer was used to determine the soybeans canopy temperatures of five varieties for a long time, at the same time, determination was also made of percentage of green leaf, soluble protein content, SOD activity, CAT activity and MDA content of the functional leaves of soybean caulis in the periods of duration. The results showed that there were soybean germplasm of low canopy temperature and soybean germplasm of high canopy temperature, the cold soybean Fendou 55 and Ji NF 58, the warm soybean Dongda 2 and Weidou 20, for examples. During the whole seed filling-time, the percentage of green leaf, soluble protein content, SOD activity, CAT activity of cold soybean were superior to warm soybeans and the accumulation of MDA content was obvious slower with process of period of duration. According to these it is thought that difference phenomenon exists in canopy temperature of different genotype soybeans and the relation between temperature type and quality of senescence characters of leaf function was close, which could offer academic base for high yielding and dependable cropping of soybean.

Key words: canopy temperature; cold type soybean; warm type soybean; senescence characteristics