

柱前衍生高效液相色谱-荧光检测法测定水稻中 7 种巯基化合物

周 蓉, 曹赵云, 牟仁祥, 李正翔, 陈铭学*

(中国水稻研究所, 农业部稻米产品质量安全风险实验室(杭州), 浙江 杭州 310006)

摘要:建立了水稻中半胱氨酸(Cys)、谷胱甘肽(GSH)和植物螯合肽(phytochelatin, PC;PC₂、PC₃、PC₄、PC₅、PC₆) 7 种巯基化合物的柱前衍生高效液相色谱-荧光检测分析方法。样品经 0.1% 三氟乙酸(TFA)(含 6.3 mmol/L 二乙烯三胺五乙酸(DTPA))超声提取,然后以单溴二胺(mBrB)为衍生剂在 pH 8.0 的 4-羟乙基哌嗪丙磺酸(HEP-PS)缓冲溶液中衍生化。采用的色谱分离柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈柱,流动相为 0.1% TFA(pH 2.5)和 100% 乙腈(ACN),梯度洗脱,流速为 0.8 mL/min。荧光检测的激发波长和发射波长分别为 380 nm 和 470 nm。结果表明,7 种巯基化合物在 0.7~100.0 mg/L 范围内,峰面积与质量浓度之间的线性关系良好($r^2 \geq 0.9991$);检出限为 0.03~0.20 mg/L;加标回收率为 89.26%~99.42%,相对标准偏差为 2.05%~5.87%。该方法准确、灵敏度高、重现性好,为水稻中巯基化合物的研究提供了检测手段。

关键词:柱前衍生;高效液相色谱法;巯基化合物;水稻

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2015)01-0035-05

Determination of seven biothiols in rice by high performance liquid chromatography-fluorescence detection with pre-column derivatization

ZHOU Rong, CAO Zhaoyun, MOU Renxiang, LI Zhengxiang, CHEN Mingxue*

(Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Rice (Hangzhou), Ministry of Agriculture, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection and pre-column derivatization (HPLC-FLD) has been developed for the determination of seven biothiols including Cys, GSH, and phytochelatin (PCs: PC₂, PC₃, PC₄, PC₅ and PC₆) in rice. The samples were ultrasonically extracted with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) containing 6.3 mmol/L diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), and then the seven biothiols were derivatized with monobromobimane (mBrB) as derivatization agent in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine propanesulfonic acid (HEPPS) buffer solution (pH 8.0). The separation was performed on an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (50 mm×4.6 mm, 5 μm) with gradient elution of 0.1% TFA solution (the pH value was adjusted to 2.5 with hydrochloric acid) and acetonitrile as mobile phases at a flow rate of 0.8 mL/min. The detection was performed at 380 nm for excitation and 470 nm for emission. The calibration curves of the seven biothiols showed good linearity in the concentration range of 0.7–100.0 mg/L with the correlation coefficients (r^2) ≥ 0.9991 . The limits of detection were 0.03–0.20 mg/L. The recoveries of standard addition were in the range of 89.26%–99.42% with the relative standard deviations (RSDs, $n=6$) of 2.05%–5.87%. The method is sensitive, accurate, reproducible and suitable for the simultaneous determination of Cys, GSH, PC₂, PC₃, PC₄, PC₅ and PC₆ in rice.

Key words: pre-column derivatization; high performance liquid chromatography (HPLC); biothiols; rice

* 通讯联系人.Tel: (0571) 63376275, E-mail: cmingxue@163.com.
基金项目: 国家粮油作物产品质量安全风险项目 (GJFP2014006).
收稿日期: 2014-09-16

巯基化合物在自然界中广泛存在,且在生物体内参与多种重要的生理过程。巯基化合物在植物对重金属抗性机制中的作用研究进行得较为深入、广泛,其中植物螯合肽(PCs)被认为是起主要作用的能与金属结合的蛋白^[1]。植物螯合肽是植物体内在重金属诱导下产生、由酶催化以谷胱甘肽(GSH)为底物合成的一类低相对分子质量巯基多肽,包含共同的结构特征($\gamma\text{Glu-Cys}$)_n-X($n=2\sim 11$, X是三肽的C-端氨基酸, Glu为葡萄糖, Cys为半胱氨酸)^[2,3]。PCs含有丰富的Cys残基,能通过Cys的巯基(-SH)结合细胞内的游离金属离子,降低细胞内可扩散的金属离子浓度,从而增强植物抵抗重金属胁迫的能力,因此PCs可以作为重金属毒害效应标记物^[4-6]。水稻是人类主要的粮食作物,镉污染已成为部分水稻产区不容忽视的食品安全问题,而巯基化合物的研究是水稻重金属防御机制研究中较为重要的一个方面。因此对水稻中巯基化合物进行快速、准确的测定,将为探明水稻中重金属耐性机制的研究提供重要的技术手段。

由于巯基化合物的极性较强,易氧化、难保留,且在紫外光区无吸收、无荧光特性,因此柱前或柱后衍生技术成为目前巯基化合物分析的常用手段^[7-11]。其中最经典的方法是Ellman试剂(5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸),DTNB)柱后衍生紫外检测法^[12],但该方法需要特殊的柱后反应器,且存在分析时间长、灵敏度不够高(检出限为nmol量级)等缺点。柱前衍生液相色谱-质谱联用技术虽具有较高的灵敏度(检出限可达pmol量级),但仪器设备昂贵,分析费时^[13,14]。目前虽然也有不经衍生直接采用液相色谱-质谱联用方法测定水稻中巯基化合物的报道^[15],但其金属复合物容易在色谱柱上发生吸附、解离和交换,导致分辨率和选择性较低,因而该方法未得到很好的应用。柱前衍生高效液相色谱-荧光检测法因灵敏度高、选择性高和重现性好的优点成为巯基化合物测定的一种较有效的手段。常用的柱前衍生试剂有单溴二胺(monobromobimane, mBrB)^[16]、7-苯并咪唑-4-磺酸铵(ammounium 7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole-4-sulfonate, SBD-F)^[17]和o-苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPT)^[18]等。其中mBrB柱前衍生测定法因其衍生化过程快、分离效果较好、灵敏度较高、检出限可达pmol量级,在巯基化合物的测定中获得广泛应用。目前关于拟南芥、土豆、血液等^[2,16,17]基质中巯基化合物的提取、分离、测定方法的研究相对较多,且多集中于PC₂₋₄的测定,而针对水稻中7种巯基化合物同时分析的报道较少。因此,本实验通过优化前

处理及检测条件,建立了一种同时分析水稻中Cys、GSH以及PC₂₋₆等7种巯基化合物的柱前衍生高效液相色谱-荧光检测法。该方法过程简便、分离度好、灵敏度高、重现性好,为巯基化合物在水稻重金属抗性机制中的作用研究提供了技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

1100型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),配有G1321A型荧光检测器;冷冻离心机(美国ThermoFisher公司);PHS-3C精密pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);电热恒温振荡水槽XMTD-8222(上海精宏实验设备有限公司)。

PC₂(H-($\gamma\text{Glu-Cys}$)₂-Gly-OH)、PC₃(H-($\gamma\text{Glu-Cys}$)₃-Gly-OH)、PC₄(H-($\gamma\text{Glu-Cys}$)₄-Gly-OH)、PC₅(H-($\gamma\text{Glu-Cys}$)₅-Gly-OH)、PC₆(H-($\gamma\text{Glu-Cys}$)₆-Gly-OH)标准品(纯度>98%,美国AnaSpec公司);谷胱甘肽(GSH,纯度>98%)、Cys(纯度>98%)、衍生试剂mBrB(纯度>95%)、4-羟乙基哌嗪丙磺酸(HEPPS,纯度>99.5%)、三氟乙酸(TFA,纯度99%)(美国Sigma公司);甲磺酸(MSA,纯度>99%)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA,纯度>99%)(美国Fluka公司);乙腈(ACN,色谱纯,美国Fisher公司);去离子水(由Milli-Q纯化水系统制得)。

1.2 标准品溶液的配制

分别称取适量各巯基化合物标准品,用0.1%TFA溶液(含6.3mmol/LDTPA)配制成质量浓度均为100mg/L的单标准储备液,置于4℃下保存。使用时,根据需要逐级稀释成不同质量浓度的混合标准工作液。

1.3 水稻植株的培养与处理

水稻植株(日本晴,由中国水稻研究所提供)参照李鹏等^[19]的水培方法,待水稻4叶期时进行Cd²⁺胁迫处理,处理浓度为50μmol/L(以CdCl₂形态加入),同时以不加Cd²⁺处理为对照(CK),Cd²⁺胁迫处理1周后结束并取样。水稻根部用自来水反复冲洗干净,置于预冷的10mmol/LCaCl₂溶液中静置10min,以去除根表面吸附的Cd²⁺,然后用去离子水冲洗干净,最后用吸水纸将其表面水分吸干。将新鲜样品分成叶片、茎和根3部分,分别称取一定的鲜样组织用液氮(-196℃)迅速冷冻,再置于-80℃冰箱中储存。

1.4 植物组织中PCs等巯基化合物的提取及其柱前衍生化反应

参照Sneller等^[20]的方法,取上述水稻植物鲜样放入研钵中,加入液氮并研磨至粉末状;称取0.5

g,加入 2 mL 0.1% TFA(含 6.3 mmol/L DTPA, pH 1.0)充分混匀,冰浴超声 30 min 后于 12 000 r/min、4 ℃下离心 10 min,收集上清液。为避免巯基化合物接触空气而氧化损失,立即进行柱前衍生化反应,即向 250 μ L 7 种巯基化合物标准液或植物组织上清液中加入 450 μ L 200 mmol/L HEPPS(含 6.3 mmol/L MDTA, pH 8.2)和 10 μ L 25 mmol/L mBrB 充分混合,于 50 ℃下反应 30 min,然后加入 300 μ L 1 mmol/L MSA 终止反应,摇匀,过 0.45 μ m 滤膜后,转移至 Agilent 棕色顶空瓶内,4 ℃下保存至 HPLC 分析测定。同时作试剂空白衍生化反应,确定试剂空白杂质峰。

1.5 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse plus C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:A 为 0.1% TFA 水溶液(pH 2.5),B 为 100% ACN;流速:0.8 mL/min。梯度洗脱程序:0~3 min, 10% B; 3~15 min, 10% B~20% B; 15~25 min, 20% B~35% B; 25~30 min, 35% B~100% B; 30~35 min, 100% B; 35~45 min, 10% B。柱温:30 ℃;进样量:10 μ L;荧光检测波长:激发波长为 380 nm,发射波长为 470 nm。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

采用水和乙腈进行二元洗脱时,发现目标物保留较弱且不稳定,峰拖尾;而且基质干扰较为严重,目标物难以定量。参照 Qiu 等^[14]的方法,在水相中添加 0.1% TFA 时,上述现象得到极大改善,目标物保留相对较强,且能够实现与杂质的分离。

实验考察了流动相 A 的 pH 值(1.0~4.0)对各色谱峰的出峰时间、峰形、灵敏度与噪声的影响。结果表明:pH 值从 4.0 降低至 2.5 时,7 种巯基化合物的灵敏度均增加,各色谱峰的保留时间明显缩短;pH 为 2.5 时,GSH 和杂峰达到基线分离;pH 值继续降低,5 种植物整合肽 PC₂、PC₃、PC₄、PC₅ 和 PC₆ 的灵敏度仍随之增加,而 Cys 的灵敏度、GSH 与杂峰的分离选择性均降低。兼顾分离度和灵敏度的要求,实验选择流动相 A 的 pH 值为 2.5。

改变 0.1% TFA(A)-乙腈(B)的比例,各种巯基化合物的保留时间会发生明显变化,特别是 GSH 和 PC₆ 容易受溶剂峰的干扰,有机相的比例以及洗脱时间对这两个物质的分离至关重要。为调整 7 种巯基化合物出峰时间以获得更好的峰形,并尽量减少杂质峰干扰,本实验采用梯度洗脱方法。

在优化的色谱条件下,对混合标准溶液进行测

定。从图 1 中可以看出,7 种巯基化合物能够较好地分离和检出。

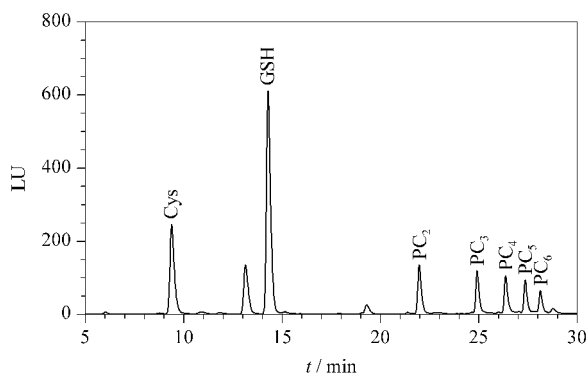


图 1 7 种巯基化合物混合标准溶液(10 mg/L)的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of the mixed standard solution of the seven biothiols (10 mg/L)

2.2 样品处理条件的优化

植物中具有还原性的巯基化合物大多分布在细胞质内,采用在冰浴中超声提取方式有利于提高提取效率;同时,在碱性条件下,还原态的巯基很容易被氧化成氧化态的二硫键,因此提取过程中提取液的 pH 值对巯基化合物的提取回收率有较大的影响。本研究考察了酸度调节剂的种类、提取液的 pH 值、提取方式及时间对待测物提取效率的影响(以 PC₂ 为例,结果见图 2)。当分别使用硫酸、盐酸和

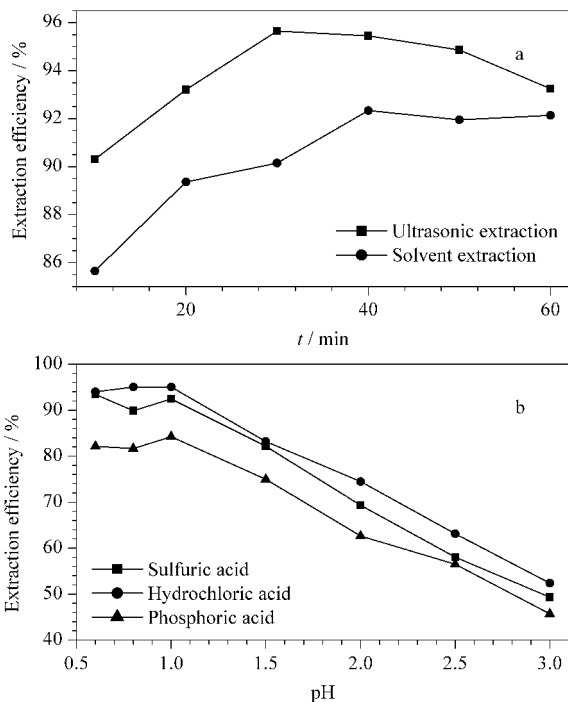


图 2 (a) 提取方式和提取时间、(b) 酸度调节剂对 PC₂ 提取效率的影响

Fig. 2 Effects of (a) extraction method and extraction time, (b) acidity adjuster on the extraction efficiency of PC₂

磷酸 3 种酸度调节剂调节提取液 pH 值为 1.0 时, PC₂ 的提取效率均达到最高, 分别为 92.45%、95.02%、84.23%, 其中盐酸对 PC₂ 的提取效率更好。然后考察了简单的溶剂提取和超声提取对水稻巯基化合物提取效率的影响。结果表明, 超声提取法有利于巯基化合物从细胞质中溶出, 提取效率较高。提取效率随着提取时间的延长而增加, 至 30 min 时最高, 30 min 以后巯基化合物因接触空气氧化损失导致提取效率逐渐下降。因此, 实验选择盐酸作为酸度调节剂, pH 1.0 的 0.1% TFA (含 6.3 mmol/L DTPA) 为提取液, 超声浸提时间 30 min。

2.3 衍生条件的优化

2.3.1 缓冲溶液的 pH 值

mBrB 的衍生化反应与环境 pH 值密切相关, pH 值过低或者过高时均会影响反应进行, 甚至不能反应, 因此本文比较了 HEPPS 缓冲液的 pH 值 (7.6~8.4) 对衍生效率的影响。结果显示, pH 值从 7.6 升高到 8.0 时, Cys、GSH 和 PC_{2~6} 7 种巯基化合物的衍生效率分别提高了 6.24%、7.21%、7.74%、6.74%、6.96%、6.75% 和 4.89%; pH 增大到 8.4 时, GSH 和 Cys 衍生效率无显著变化, 但 PC_{2~6} 的衍生效率下降了 1.94%~4.45%。故选用 pH 8.0 的 HEPPS 溶液 (200 mmol/L) 为衍生缓冲液。

2.3.2 反应温度和时间

本文分别考察了不同温度 (35、40、45、50、55、60 ℃) 衍生 30 min 对 7 种巯基化合物衍生效率的影响。结果显示, 温度变化对 Cys 和 GSH 的转化率影响不明显, 而 PC_{2~6} 的转化率随着温度的升高而增加, 在 50 ℃ 时衍生效率最大, 分别为 96.14%、95.46%、94.89%、94.21% 和 93.38%; 温度高于 50 ℃ 后呈下降趋势, 故本文选择衍生温度为 50 ℃。在 50 ℃ 下, 分别衍生 10、20、30、40、50、60 min, 考察反应时间对衍生化效率的影响。衍生化时间从 10 min 增加到 30 min, 7 种巯基化合物衍生效率提高了 16.17%~29.54%; 从 30 min 增加到 60 min, 衍生化效率趋于稳定, 故衍生时间选择为 30 min。

2.4 线性范围及检出限

将 7 种巯基化合物的混合标准溶液逐级稀释成系列标准工作溶液, 在优化的色谱条件下分析。以峰面积 (*Y*) 为纵坐标, 质量浓度 (*X*, mg/L) 为横坐标, 计算各巯基化合物的回归方程、相关系数和线性范围。由表 1 可见, 在 0.7~100.0 mg/L 范围内, 7 种巯基化合物呈良好的线性关系, 线性相关系数均大于 0.999 1。按 3 倍信噪比得到各化合物的检出限, 检出限为 0.03~0.20 mg/L (见表 1)。

表 1 7 种巯基化合物的线性关系和检出限
Table 1 Linear relationships and LODs of the seven biothiols

Compound	Regression equation	Correlation coefficient	Linear range/(mg/L)	LOD/(mg/L)
Cys	$Y=39.581X-30.000$	0.9997	0.3–100	0.07
GSH	$Y=88.799X-16.763$	0.9997	0.1–100	0.03
PC ₂	$Y=17.488X-9.500$	0.9997	0.4–100	0.10
PC ₃	$Y=13.978X-5.349$	0.9993	0.4–100	0.12
PC ₄	$Y=12.416X-7.672$	0.9994	0.5–100	0.15
PC ₅	$Y=9.852X-6.303$	0.9996	0.5–100	0.15
PC ₆	$Y=6.253X-7.955$	0.9991	0.7–100	0.20

Y: peak area; *X*: mass concentration, mg/L.

2.5 回收率和精密度

取对照植株根部进行加标回收试验, 添加水平分别为 1.0、5.0 和 10.0 mg/kg, 每个添加水平平行测定 6 次, 加标回收率为 89.26%~99.42%, 相对标准偏差为 2.05%~5.87% (见表 2)。

表 2 各巯基化合物的加标回收率 (*n*=6)
Table 2 Spiked recoveries of the biothiols (*n*=6)

Compound	Background/(mg/kg)	Added/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/%
Cys	1.985	1	99.42	2.48
		5	98.24	3.19
		10	97.26	3.56
GSH	3.628	1	98.21	4.12
		5	96.11	5.87
		10	96.87	3.46
PC ₂	–	1	95.48	1.68
		5	94.43	2.63
		10	94.06	2.33
PC ₃	–	1	95.31	3.46
		5	93.68	2.39
		10	93.11	2.05
PC ₄	–	1	95.34	3.16
		5	94.37	3.54
		10	94.26	2.49
PC ₅	–	1	94.63	3.44
		5	92.89	3.97
		10	91.89	5.26
PC ₆	–	1	92.33	4.16
		5	90.47	4.39
		10	89.26	5.38

–: not detected.

2.6 实际样品测定

按照上述优化方法对不同处理条件下水稻不同部位中巯基化合物的含量进行测定, 结果见表 3, 其中空白对照以及 Cd²⁺ 处理后的水稻根样品的色谱图见图 3。由表 3 可知, 未经 Cd²⁺ 处理的水稻叶片、茎和根中只检出 Cys 和 GSH, 而经 50 μmol/L Cd²⁺ 处理 7 d 后, 除了 Cys 和 GSH, 还检测到 PC₂ 和 PC₃, 其中叶片、茎和根中 PC₂ 含量分别为 0.986、

0.543、1.169 mg/kg, PC₃ 含量分别为 5.170、3.176、7.689 mg/kg;在各部位含量分布规律均表现为根>叶片>茎,且 PC₃ 的含量均高于 PC₂。这说

明水稻在 Cd²⁺暴露下,可诱导合成 PCs。另一方面,高 Cd²⁺处理水平下 GSH 含量相比空白对照有显著降低,原因是 GSH 作为底物被用于合成 PCs。

表 3 Cd²⁺胁迫下水稻体内巯基化合物的含量(n=3)
Table 3 Contents of biothiols in rice under Cd²⁺ stress (n=3)

Organ	Cd ²⁺ treatment/(μmol/L)	Cys±SD/(mg/kg)	GSH±SD/(mg/kg)	PC ₂ ±SD/(mg/kg)	PC ₃ ±SD/(mg/kg)
Leave	0	2.135±0.235	2.989±0.368	—	—
	50	5.385±0.536	0.569±0.053	0.986±0.134	5.170±0.356
Stem	0	1.356±0.203	2.278±0.237	—	—
	50	4.756±0.463	0.345±0.033	0.543±0.045	3.176±0.256
Root	0	1.985±0.347	3.628±0.356	—	—
	50	6.522±0.246	0.412±0.206	1.169±0.126	7.689±0.564

The contents were calculated as fresh weights.

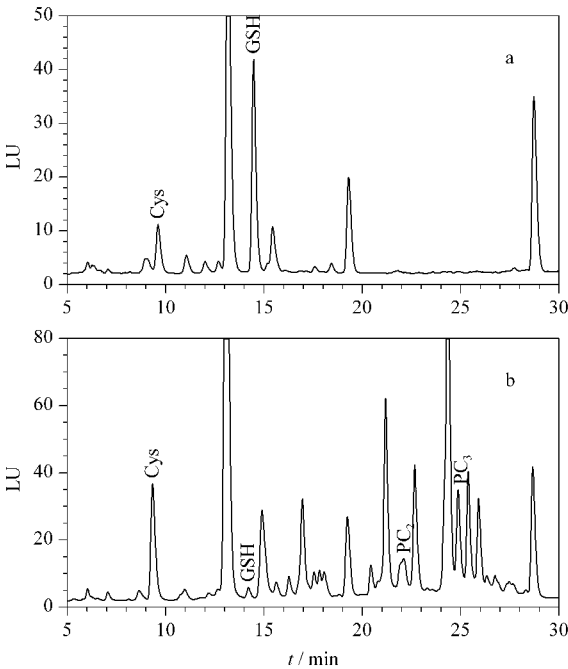


图 3 (a)空白对照和(b)50 μmol/L Cd²⁺处理 7 d 后的水稻根中巯基化合物衍生色谱图
Fig. 3 HPLC chromatograms of the biothiols in roots of rice exposed to (a) 0 (CK) and (b) 50 μmol/L Cd²⁺ stress for 7 days

3 结论

本文建立了柱前衍生高效液相色谱测定水稻中 7 种巯基化合物的分析方法。通过优化水稻中 7 种巯基化合物的柱前衍生及色谱条件,进一步提高了衍生效率,改善了巯基化合物在反相 C₁₈ 柱上的保留。该方法分离效果理想,灵敏度高,满足巯基化合物定量分析的测定要求,为进一步检测水稻生长过程中 PCs 的合成、转运与介导重金属脱毒害的分子机理等相关研究提供了技术支持。

参考文献:

[1] Li A M, Li D H, Deng Q Y, et al. Plant Physiology Journal

(李安明,李德华,邓青云,等.植物生理学报),2011,47(1):27
[2] Schmögner M E V, Oven M, Grill E. Plant Physiol, 2000, 122: 793
[3] Lee S, Moon J S, Ko T S, et al. Plant Physiol, 2003, 131: 656
[4] Wu F B, Zhang G P. Chinese Journal of Applied Ecology (郭飞波,张国平.应用生态学报),2003,14(4):632
[5] Feng B M, Ma M. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology (冯保民,麻密.应用与环境生物学报),2003,9(4):657
[6] Cai B S, Lei M, Chen T B, et al. Acta Ecologica Sinica (蔡保松,雷梅,陈同斌,等.生态学报),2003,23(10):2125
[7] Guo X F, Zhu H, Wang H, et al. J Sep Sci, 2013, 36: 658
[8] Figueira E, Freitas R, Guasch H, et al. Ecotoxicology, 2014, 23: 285
[9] Tang D G, Wen L S, Santschi P H. Anal Chim Acta, 2000, 408: 299
[10] Sun Y C, Xu X Z, Xu Y L, et al. Chinese Journal of Chromatography (孙言春,许宪祝,徐衍岭,等.色谱),2013,31(3):275
[11] Li H L, Zhao C X, Zhang J J, et al. Chinese Journal of Chromatography (李好丽,赵春霞,张俊杰,等.色谱),2013,31(12):1182
[12] Xu Q Q, Guo X S, Xiao K Y, et al. Environ Sci Pollut Res, 2014, 21: 8315
[13] Mendoza-Cózatl D G, Butko E, Springer F, et al. Plant J, 2008, 54: 249
[14] Qiu B Y, Zeng F R, Cai S G, et al. J Plant Physiol, 2013, 170: 772
[15] Batista B L, Nigar M, Mestrot A, et al. J Exp Bot, 2014, 65(6):1467
[16] Nakamura M, Ochiai T, Noji M, et al. Plant Biotechnol, 2014, 31: 141
[17] Isokawa M, Funatsu T, Tsunode M. Analyst, 2013, 138: 3802
[18] Böhmer A, Jordan J, Tsikas D. Anal Biochem, 2011, 410: 296
[19] Li P, Ge Y, Wu L H, et al. Chinese Journal of Rice Science (李鹏,葛滢,吴龙华,等.中国水稻科学),2011,25(3):291
[20] Sneller F E C, van Heerwaarden L M, Koevoets P L M, et al. J Agric Food Chem, 2000, 48: 4014