

技术与方法 Techniques and Methods

一种用高效液相色谱-电喷雾/串联质谱(HPLC-ESI/MSn)定量检测植物组织中微量 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)含量的方法

马莹莹, 盖颖, 陈伟奇, 蒋湘宁*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

Quantitative Determination of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) Content in Trace of Plant Tissues by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI/MSn)

MA Ying-Ying, GAI Ying, CHEN Wei-Qi, JIANG Xiang-Ning*

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

摘要: 介绍一种用高效液相色谱碳 18 柱(HPLC-C18)分离、电喷雾串联质谱(ESI-MSn)鉴定和定量检测植物组织中微量 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)含量的方法, 其最低检测限达 0.7 pmol, 标准曲线线性符合系数为 0.9992。建立了从 20~100 mg 微量植物样品中提取 ACC 和固相萃取(SPE)预纯化的方法, 加样回收率为 95.1%±4.2%。此种提取方法结合 HPLC-ESI/MSn 分析与定性定量检测苹果‘2001 富士’中 ACC 含量为 306.6 ng·g⁻¹ (FW), 表明此法适合于定性定量检测植物样品中的微量 ACC。

关键词: 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC); 固相萃取; 高效液相色谱-电喷雾/串联质谱(HPLC-ESI/MSn)

乙烯是五大类植物激素中唯一的以气体形态存在的化合物, 对植物生长发育有广泛影响。1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)是乙烯生物合成的直接前体, 也是乙烯生物合成途径中一个中间代谢物。植物组织中 ACC 含量一般随着乙烯生成量的增加而增加, 乙烯生成受到抑制时 ACC 的含量即随之下降(张满效等 2000)。一般来说, 它与植物体内一系列生理生化反应关系密切。

测定植物组织中 ACC 含量的方法很多, 大多是采用间接的方法, 即将 ACC 转化为乙烯或是将 ACC 衍生化再用气相色谱仪(gas chromatography, GC) (韦军 1994; 金昌海等 2006; Park 等 2006; Hermann 等 2007; Seo 等 2007)、毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE) (Smets 等 2003; Liu 等 2004; Castro-Puyana 等 2007)和液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)与 GC 联用的方法(Hall 等 1989); 也有人采用直接检测 ACC 的方法, 即用 CE (Kazmierczak 和 Kazmierczak 2007)和高效液相色谱-电喷雾/串联质谱(high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass

spectrometry, HPLC-ESI/MS-MS) (Petritis 等 2000, 2003)的方法。前者都存在着 ACC 转化率和衍生化率的问题, 不能准确定量植物样品中 ACC 的含量, 后者则存在提取方法复杂和植物样品需用量大的缺点, 不便于大量样品的同时操作, 浪费大量的有机试剂。植物体内 ACC 含量较低, 且易破坏, 因此, 本文以 HPLC-MS 为基础, 建立了一种简便、快速和直接测定植物组织中微量 ACC 含量的方法, 对精准、灵敏地测定 ACC 的含量、深入研究 ACC 在植物生长发育中的作用都有意义。

材料与方法

1 仪器、试剂和材料

仪器有美国 Thermo Finnigan LCQ DECA XP MAX 电喷雾离子阱多级质谱仪、Surveyor 四元梯度泵、Surveyor 自动进样器、高速离心机、超

收稿 2008-02-25 修定 2008-06-23

资助 国家自然科学基金(30571512)和国家自然科学基金重点项目(30630053)。

* 通讯作者(E-mail: jiangxn@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62338063)。

声仪、Thermo FastPrep Bio101 微量样品破碎仪、离心管及常用玻璃器皿等。

试剂有乙酸(色谱纯, Baker 公司)、甲醇(色谱纯, Merck 公司)、水(市售乐百氏纯净水)、ACC (Sigma 公司)。

实验材料为市售苹果(*Malus pumila* Mill) ‘2001 富士’, MCX 固相萃取小柱(3cc 60 mg, Waters 公司)。

2 方法

2.1 ACC 的 HPLC-ESI/MS_n 分离检测条件 色谱条件: Zorbax Eclipse XDB-C18 分离柱(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm, Agilent Technologies), 柱温为 28 °C, 流动相为甲醇和 0.1% 乙酸水溶液(比例为 1:9)等梯度洗脱, 流速为 165 μL·min⁻¹。ESI/MS_n 条件: 电喷雾离子源(ESI), 阳离子模式, MS/MS 全扫描, 鞘气(sheath gas, N₂)流速为 50 arb, 辅助气(N₂)流速为 10 arb, 喷雾电压为 3.5 kV, 传输毛细管温度为 300 °C, 传输毛细管电压为 3.0 V, 碰撞能量为 22.5 eV。

2.2 ACC 标准曲线的系列浓度溶液配制 准确取 ACC 固体样品, 用容量瓶定容, 将其配制为母液, 母液再进行逐级稀释, 分别配制成 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.2、15.6、7.8、3.9 和 0 pg·μL⁻¹ 共 11 个浓度标样。

2.3 最低检测限 色谱仪器的检测限不仅反映了仪器的灵敏度, 还间接地影响样品的检测。仪器的检测限越低, 检测植物样品中痕量物质成分就更准确, 所以要尽可能降低仪器的检测限。在测定标准曲线的同时, 还测定了 ACC 的最低检测限。

2.4 植物组织中 ACC 的提取和预纯化 准确称取植物样品, 以 Thermo FastPrep Bio101 微量样品破碎仪破碎或于液氮中研磨, 以 10 倍体积去离子水超声提取 30 min, 12 000×g 离心 20 min, 取上清液并调 pH 值小于 4, 用等体积氯仿洗涤一次, 取水相, 过 MCX 固相萃取小柱, 分别用 2 mL 甲醇和 1 mL 水洗柱, 最后用 1 mL 1 mol·L⁻¹ 氨水(溶剂为甲醇)洗脱, 收集并用氮气吹干, 以流动相复溶后用 HPLC-MS 检测。

2.5 加样回收率 标准样品、植物样品和植物样品中添加标准样品分别经过提取后以仪器检测得到色谱峰的峰面积, 用标准曲线公式分别计算这些峰面积对应的进样量, 分别记为 S_0 、 S_1 和 S_2 , 回收率 = $(S_2 - S_1)/S_0 \times 100\%$ 。

结果与讨论

1 ACC 的 ESI 裂解行为和碰撞能量的优化

在 ESI/MS_n 阳离子模式下, ACC 的母离子 $[M+H]^+$ 质荷比(m/z)为 102, 在二级 MS 中母离子发生断裂生成子离子 $[H_2N = CH - R]^+$ (R 为氨基酸残基) m/z 为 56 (Petritis 等 2000; 王一红等 2006) (图 1)。子离子是 ACC 的特征离子, 下面实验均采用子离子做定性定量分析。另外, 碰撞能量会严重影响母离子和子离子的离子丰度(Petritis 等 2000)。随着碰撞能量的增加, 母离子逐渐减少, 子离子逐渐增加, 子离子在最大值之后即随着碰撞能量的增加又逐渐减少, 碰撞能量为 22.5 eV 时, 子离子相对丰度最高(图 2)。

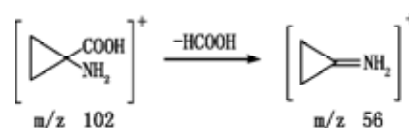


图 1 ACC 的裂解

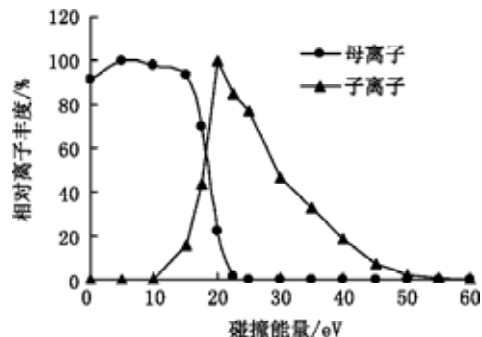


图 2 相对离子丰度与碰撞能量之间的关系

2 ACC 的 HPLC 分离和 MS 检测鉴定

Thermo Finnigan LCQ DECA XP MAX 电喷雾离子阱多级质谱仪在低质量范围内, m/z 扫描范围可从 25~2 000, ACC 的碎片离子完全可以检测到。对于流动相的选择, 甲醇和乙腈对 ACC 分离效果差异不大, 乙酸水溶液的 pH 值应尽可能低一些, 但一定要在仪器的承受范围内, 这样对 ACC 峰形的改善有很大帮助。ACC 是一个环状小分子, 亲水性极强, 流动相流速为 165 μL·min⁻¹ 时, ACC 的保留时间为 2.20 min, 在 MS/MS 全扫描条件下得到 MS 图(图 3)。

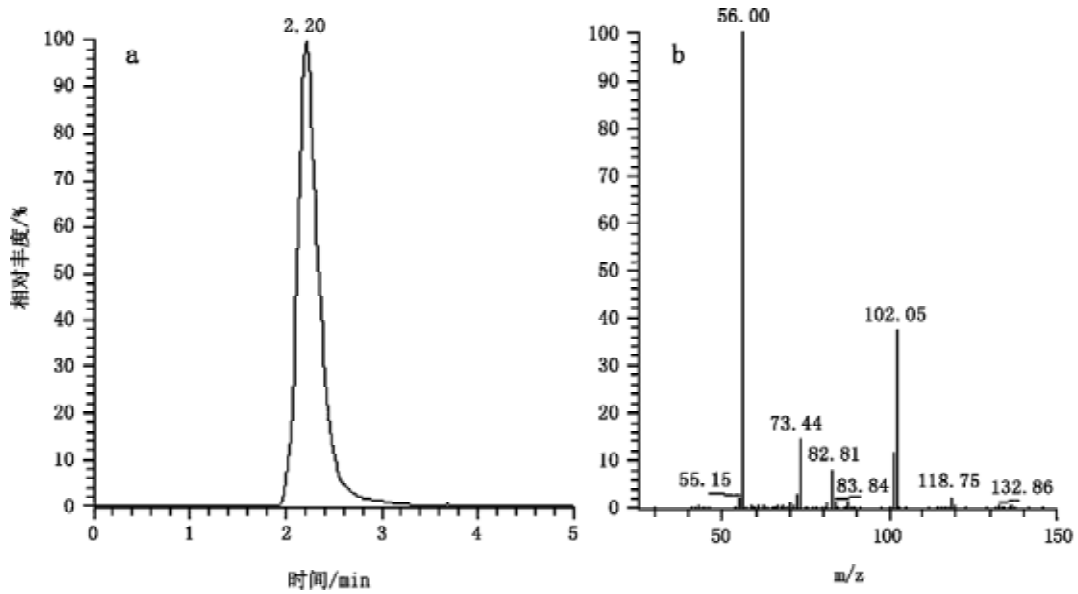


图3 ACC HPLC分离离子流图(a)和ACC MS图(b)

a: 子离子 m/z 为 56 离子峰; b: 母离子 m/z 为 102, 子离子 m/z 为 56。

3 标准曲线的绘制和最低检测限

用 Surveyor 自动进样器将配好的 11 个浓度的 ACC 标样分别进样 10 μ L, 每个浓度重复 3 次, HPLC-ESI/MSⁿ 记录总离子流图。根据 ACC 母离子与子离子的 m/z 分别为 102 和 56、保留时间为 2.2 min 和信噪比大于 3 这几个条件, 测得该仪器对 ACC 的最低检测限为 0.7 pmol。用仪器所带的专业软件计算得到色谱峰的峰面积, 绘制进样量-峰面积标准曲线(图 4), 标准曲线公式为 $y=0.8445x-0.2464$, 线性符合系数为 0.9992, 可以根据该曲线对植物样品中的 ACC 进行定量分析。

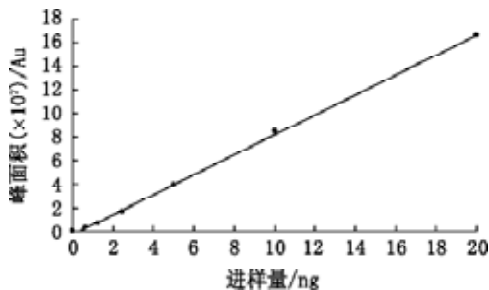


图4 ACC 标准曲线

纵坐标表示特征碎片 m/z 为 56 的离子峰面积, 横坐标表示 ACC 的进样量。

4 加样回收率

取 50 mg 苹果果肉 4 份, 其中 1 份不加 ACC 标

样, 另外 3 份分别加入 25、50 和 100 ng ACC 标样, 再取 25、50 和 100 ng ACC 标样, 共 7 个样品。每个样品重复 3 次, 分别按照 2.4 节中 ACC 的提取和预纯化流程提取 ACC, 氮气吹干后用 100 μ L 流动相复溶, 取 10 μ L 上样进行 HPLC-MS 检测, 重复 3 次, 得到相应的色谱峰。用仪器所带的专业软件计算这些色谱峰的峰面积, 根据标准曲线计算这些峰面积所对应的进样量, 最后根据 2.5 节中回收率的计算公式计算 ACC 的平均加样回收率为 $95.1\% \pm 4.2\%$ (表 1), 以后再依据此种提取预纯化方法提取植物样品中的 ACC。

表1 加样回收率

添加质量/ng	加样回收率/%
25	99.3 \pm 4.44
50	92.0 \pm 2.08
100	93.9 \pm 2.06

$n=3$ 。

5 植物样品中的 ACC 检测

取 50 mg 苹果果肉按照 2.4 节中 ACC 的提取和预纯化流程, 经 HPLC-MS 检测得到苹果果肉中 ACC 的色谱图和 MS 图(图 5)。其中保留时间为 2.20 min 的峰就是从苹果中提取的 ACC 的特征离子峰, 其 MS 图与标准样品中 ACC 的 MS 图(图 3)

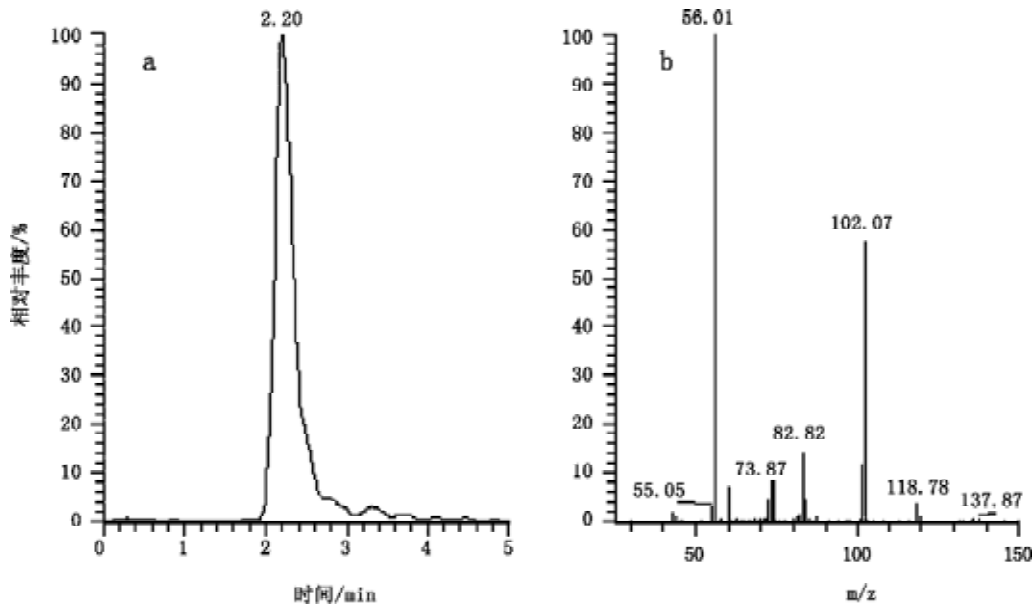


图5 苹果中ACC的色谱图(a)和MS图(b)

完全一致。用仪器所带的专业软件计算峰面积, 根据标准曲线公式得到该峰面积对应的进样量, 再根据平均加样回收率计算 50 mg 样品中的 ACC 含量, 进而得出苹果果肉中的 ACC 含量为 $306.6 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW)。

总之, 样品的提取和预纯化是检测 ACC 含量的核心内容, 在样品提取时, 常受到不同程度的色素干扰, 为了除去这些色素, 我们分别采用石油醚、氯仿和乙酸乙酯进行萃取, 三者之中样品 pH 小于 4 的条件下用氯仿为萃取剂的萃取效率最高, ACC 几乎没有损失。此外, 植物样品中许多杂质也会直接影响 ACC 的色谱分离和 ACC 的定性定量检测, 为了减少这些杂质的干扰, 我们又对 MCX 阳离子交换柱、DEA 阴离子交换柱和 SEP-PEK 柱的纯化效率和回收率进行比较的结果表明, 以 MCX 阳离子交换柱提取的样品在液相色谱中杂峰少, 回收率高, 其他两种方法杂峰则多, 很难对 ACC 进行定性, 且回收率很低(分别为 1% 和 50%)。还有, 分析中应采用旋转浓缩的方法浓缩样品, 但在提取 ACC 的过程中应避免于 40 °C 以上的高温条件下浓缩, 因为 ACC 在此种条件下极不稳定, 为此, 我们采用了室温氮气吹干的方法。

测定加样回收率和植物样品中 ACC 含量的结果表明, 本文方法有一定的可行性, 毋需将 ACC 转化或衍生化, 操作简单, 植物样品用量少, ACC 的

最低检测限可以达到 pmol 量级, 完全适合于植物组织中微量 ACC 的分析, 可能也适用于食品营养和医药卫生行业中 ACC 的定性定量分析。

参考文献

- 金昌海, 阚娟, 索标, 汪志君, 陆兆新, 郁志芳(2006). 桃果实成熟软化过程中 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性和乙烯合成相关因子的变化. 食品科学, 27 (1): 61~64
- 王一红, 冯家力, 潘振球, 方学新, 李帮锐(2006). 液相色谱-质谱/质谱联用技术分析 18 种游离氨基酸. 中国卫生检验杂志, 16 (2): 161~163
- 韦军(1994). 植物组织内 ACC 含量测定的一些问题探讨. 植物生理学通讯, 30 (4): 281~283
- 张满效, 王辉, 黄久常, 王邦锡(2000). 渗透胁迫和 D-Arg 对小麦幼苗内源多胺、ACC 和 MACC 含量及乙烯产生的影响. 兰州大学学报(自然科学版), 36 (6): 87~92
- Castro-Puyana M, Crego AL, Marina ML, Garcia-Ruiz C (2007). CE methods for the determination of non-protein amino acids in foods. Electrophoresis, 28: 4031~4045
- Hall KC, Pearce DME, Jackson MB (1989). A simplified method for determining 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plant tissues using a mass selective detector. Plant Growth Regul, 8: 297~307
- Hermann K, Meinhard J, Dobrev P, Linkies A, Pesek B, Heß B, Macháčková I, Fischer U, Leubner-Metzger G (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): a comparative study of fruits and seeds. J Exp Bot, 58 (11): 3047~3060
- Kazmierczak A, Kazmierczak JM (2007). The level of endogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in gameto-

- phytes of *Anemia phyllitidis* is increased during GA₃-induced antheridia formation. *Acta Physiol Plant*, 29: 211~216
- Liu X, Li DF, Wang Y, Lu YT (2004). Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in apple extracts by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 1061: 99~104
- Park YS, Jung ST, Gorinstein S (2006). Ethylene treatment of 'Hayward' kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) during ripening and its influence on ethylene biosynthesis and antioxidant activity. *Sci Hortic*, 108: 22~28
- Petritis K, Dourtoglou V, Elfakir C, Dreux M (2000). Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its structural analogue by liquid chromatography and ion spray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 896: 335~341
- Petritis K, Koukaki G, Koussissi E, Elfakir C, Dreux M, Dourtoglou V (2003). The simultaneous determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and cyclopropane-1,1-dicarboxylic acid in *Lycopersicon esculentum* by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 14: 347~351
- Seo SG, Shim IS, Usui K, Fujihara S (2007). Analysis of polyamines, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and their conjugated forms in floral organs of *Hibiscus syriacus* L. *J Jpn Soc Hortic Sci*, 76 (2): 149~156
- Smets R, Claes V, Van Onckelen HA, Prinsen E (2003). Extraction and quantitative analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissue by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 993: 79~87