

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 分析植物组织中海藻糖的气质联用及毛细管气相色谱法

胡磊<sup>1</sup> 郭蓓<sup>2</sup> 王乐<sup>1</sup> 陆海<sup>1</sup> 陈雪梅<sup>1</sup> 蒋湘宁<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>北京林业大学生物科学与技术学院, 国家林业局树木花卉育种生物工程重点开放实验室, 北京 100083; <sup>2</sup>北京农学院生物技术系, 北京 102206

## Methods of GC-MS and Capillary Gas Chromatography for Determining Trehalose in Plant Tissues

HU Lei<sup>1</sup>, GUO Bei<sup>2</sup>, WANG Le<sup>1</sup>, LU Hai<sup>1</sup>, CHEN Xue-Mei<sup>1</sup>, JIANG Xiang-Ning<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>The Ornamental Plant and Tree Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry Administrative, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083; <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206

**提要** 介绍一种用1-甲基咪唑为溶剂和催化剂、盐酸羟胺和乙酸酐为脎化和乙酰化试剂,对植物样品中海藻糖等糖类物质进行乙酰化衍生化后的气相色谱分离、质谱鉴定的分析方法。以核糖醇为内标,通过校准曲线对植物组织中的海藻糖进行定量分析。此法测定海藻糖的最低量可达 $8.17 \times 10^{-11}$  g,适于植物样品中微量海藻糖的分析测定。

**关键词** 海藻糖;乙酰化;气质联用(GC-MS);毛细管气相色谱(GC)

海藻糖是一种还原性双糖,由2个葡萄糖分子通过半缩醛基结合而成,在藻类、细菌、真菌、昆虫、脊椎动物、高等植物中广泛存在。其分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11}$ ,相对分子量为342.33,通常可以几种固体形式存在,最常见的是二水化合物,熔点为97℃,加热至130℃时失去结晶水而成为无水结晶体,此时熔点为214~216℃<sup>[1]</sup>。海藻糖理化性质稳定,对生物大分子有特殊保护作用<sup>[2]</sup>,广泛应用于食品加工、医药卫生等行业。近年来,众多研究发现,微生物和植物体内的海藻糖具有渗透调节作用<sup>[2,3]</sup>,因而能提高植物抗逆性。利用海藻糖这一特性进行作物和林木基因工程定向改良已成为植物基因工程研究中的热点之一,因而如何快速而准确地检测植物体中海藻糖含量就成了这类研究得以进行的关键问题之一。

一般海藻糖分析的方法有纸层析法、薄层层析法、高效液相色谱法和气相色谱及气相色谱-质谱联用(气质联用,GC-MS)分析法<sup>[4~6]</sup>。前2种方法属定性方法,也可以用于海藻糖的半定量分析,但定量效果不理想,低于 $\mu\text{g}$ 量级就难以检测。在分析植物组织中海藻糖含量时,因其含量极低,这些方法无法准确定量。高效液相色谱法是较理想的海藻糖定量分析方法,但当样品中糖类组分较多时,其分离效果往往不如人意。气相

色谱法分析虽然具有速度快、灵敏度高等优点,但要有两个前提:一是要有合适的衍生化方法,二是要有较高的理论塔板数和良好的柱效。本文建立了以1-甲基咪唑为溶剂和催化剂,以盐酸羟胺和乙酸酐为脎化和乙酰化试剂,对植物组织中的微量糖类物质进行衍生化,以核糖醇为内标,通过毛细管气相色谱法,对样品中各糖类组分和海藻糖衍生化产物进行分离定量检测和气质联用技术定性的分析方法。此法操作简便,灵敏度高,对糖类物质分析专一性较好,干扰较小,适用于少量植物样品中微量海藻糖的定性、定量分析。

## 材料与方法

## 1 材料和仪器

试剂:1-甲基咪唑(Sigma公司)、盐酸羟胺、乙酸酐、无水硫酸钠(R.A);糖和糖醇标准物:核

收稿 2003-09-22 修定 2004-02-16

资助 国家重大基础研究“973”项目课题(G1999016005)和国家自然科学基金项目(30271066)。

致谢 承北京林业大学仪器中心陈华君女士和邹祥旺先生给予热情帮助。

\*通讯作者(jiangxn@bjfu.edu.cn, Tel: 010-62338063)。

糖醇(Rib)、甘露醇(Man)、D-山梨醇(Sor)、D-葡萄糖(Glu)、蔗糖(Suc)、海藻糖(Tre)。以上标准物均为分析纯。

标准溶液: Rib 40 mg·mL<sup>-1</sup>、Man 40 mg·mL<sup>-1</sup>、Sor 40 mg·mL<sup>-1</sup>、Glu 40 mg·mL<sup>-1</sup>、Suc 8 mg·mL<sup>-1</sup>、Tre 25 mg·mL<sup>-1</sup>、盐酸羟胺 100 mg·mL<sup>-1</sup>, 均以 1-甲基咪唑为溶剂。

仪器: Varian CP-3800 型气相色谱仪、VOYAGER 气相色谱-质谱仪、真空浓缩仪等。

## 2 方法

**2.1 毛细管气相色谱和GC-MS分析与检测条件** 美国 Varian 公司 CP-3800 型气相色谱仪, FID 检测器, 检测器温度为 300℃, 进样器温度 250℃, BP-15 柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), N<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>、空气。柱箱温度条件: 初始温度 50℃, 15℃·min<sup>-1</sup> 升温到 220℃, 保留 3 min; 25℃·min<sup>-1</sup> 升温到 280℃, 保留 10 min。

VOYAGER GC/MS 仪, TRACE GC 仪, 检测器温度为 300℃, 进样器温度为 250℃, BP-15 柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 载气 He 0.8 mL·min<sup>-1</sup>。柱箱温度条件: 初始温度 50℃, 20℃·min<sup>-1</sup> 升温到 200℃, 10℃·min<sup>-1</sup> 升温到 280℃, 保留 10 min。

**2.2 海藻糖等糖类物质的乙酰化及校准曲线制作** 分别取 2.5 μL 甘露醇、2.5 μL 山梨醇、4 μL 葡萄糖、20 μL 蔗糖、8 μL 海藻糖母液放入同一反应管中后, 加入 50 μL 盐酸羟胺母液, 充分混匀, 置于 80℃ 水浴中反应 5 min, 取出后加入 40 μL 乙酸酐, 混匀, 于室温反应 5 min 后加入 1 mL 氯仿萃取衍生化产物, 以 2 mL 水洗 3~4 遍, 除去水相后用无水硫酸钠吸收残余水分。同法对 2 μL 核糖醇母液进行衍生化。将糖与糖醇混合衍生物用氯仿逐级稀释成 5 个梯度浓度, 分别封装于毛细管中, 加入核糖醇乙酰化衍生物作为内标, 内标终浓度为 0.01 mg·mL<sup>-1</sup>。将制备好的标准样品用于毛细管气相色谱分析, 为对各组分进行准确定性, 将其中一个样品用于气质联用分析。最后借助 Agilent 公司提供的分析软件, 处理毛细管气相色谱分析结果, 得到海藻糖的校准曲线, 用作样品中海藻糖的定量分析。

**2.3 植物组织中海藻糖的提取与分析** 取 0.02~0.5 g 毛白杨、刺槐等组培苗鲜样(分根、茎、叶), 加入 20 μg(5 μL 4 mg·mL<sup>-1</sup> Rib 水溶液) 内标, 液氮下

研磨成细碎粉末或加少许石英砂, 研磨至匀浆, 加入 1~4 mL 碳水化合物抽提液(甲醇:氯仿:水=12:5:3)<sup>[7,8]</sup>, 随后加入等体积水, 混匀, 静置片刻, 将上清液过滤转入浓缩瓶中, 于 70~80℃ 下抽真空浓缩至干。待其冷却后加少许 1-甲基咪唑溶解浓缩物, 加入 0.1 mL 盐酸羟胺溶液, 混匀后置于 80℃ 水浴中反应 5 min; 取出加入 0.15 mL 乙酸酐, 混匀后于室温下反应 5 min, 再加入 1 mL 氯仿萃取衍生化产物, 然后用 2 倍体积水洗 3~4 遍, 以无水硫酸钠吸去残余水分后, 转移封存于毛细管中, 准备用于毛细管气相色谱分离检测和 GC-MS 结构鉴定分析。结合内标、校准曲线和植物样品的毛细管气相色谱结果, 对样品中海藻糖进行定量分析。

## 实验结果

### 1 质谱鉴定和毛细管气相色谱分离

用于气质联用的气相色谱条件与毛细管气相色谱分析条件相近, 但是二者升温程序稍有出入, 故其保留时间有一定偏差。图 1 是糖和糖醇标准物总离子流图。从各标准物的保留时间和对应的质谱图及其结构鉴定结果可知, 图 1 中各峰依保留时间分别为核糖醇、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、蔗糖和海藻糖的乙酰化产物。海藻糖 GC-MS 保留时间为 19.40 min。图 2 为海藻糖乙酯质谱鉴定图谱。依据各糖和糖醇乙酰基衍生物在 GC-MS 总离子流中的出峰顺序和毛细管气相色谱的分离色谱图, 可以确定各糖和糖醇乙酰衍生化产物在毛细管气相色谱分离结果中各物质的保留时间(图 3)。其中海藻糖乙酯保留时间为 23.093 min。GC-MS 及毛细管气相色谱分析结果表明, 在所用分析条件下, 海藻糖等糖类物质的乙酰化产物能很好地得到分离。甘露醇与山梨醇互为同分异构体, 尽管结构上只有细微的差别, 但二者仍能完全分离。据此认为, 应用此法对海藻糖等糖类物质进行定性分析是准确可靠的。

### 2 海藻糖的校准曲线

将 5 个梯度浓度标准样品混合物用于毛细管气相色谱分析, 调出 5 个气相色谱图, 输入相应的海藻糖浓度和内标量, 借助相应的分析软件, 即可自动生成所要的校准曲线(图 4)。所得海藻糖校准曲线相关系数为 0.994, 可依据该曲线对样品

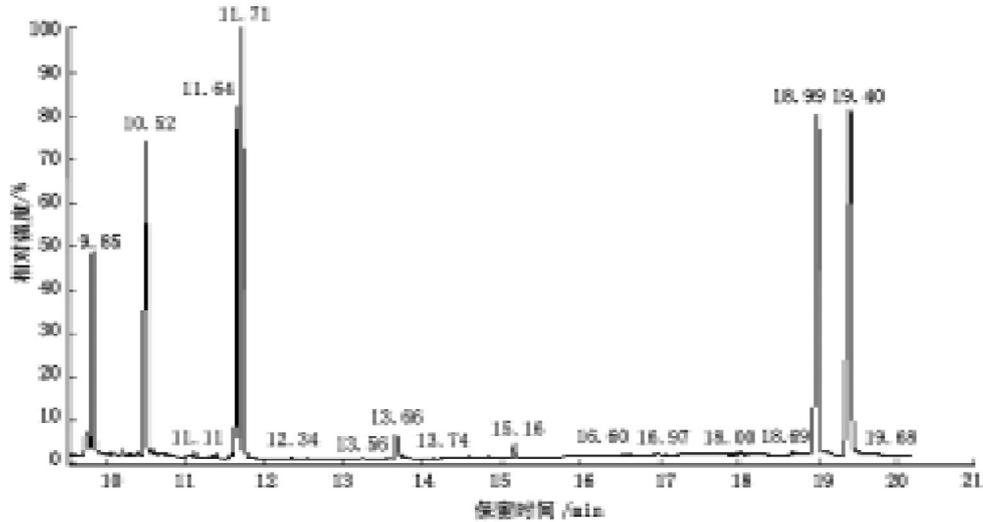


图1 糖与糖醇标准物乙酰化产物总离子流

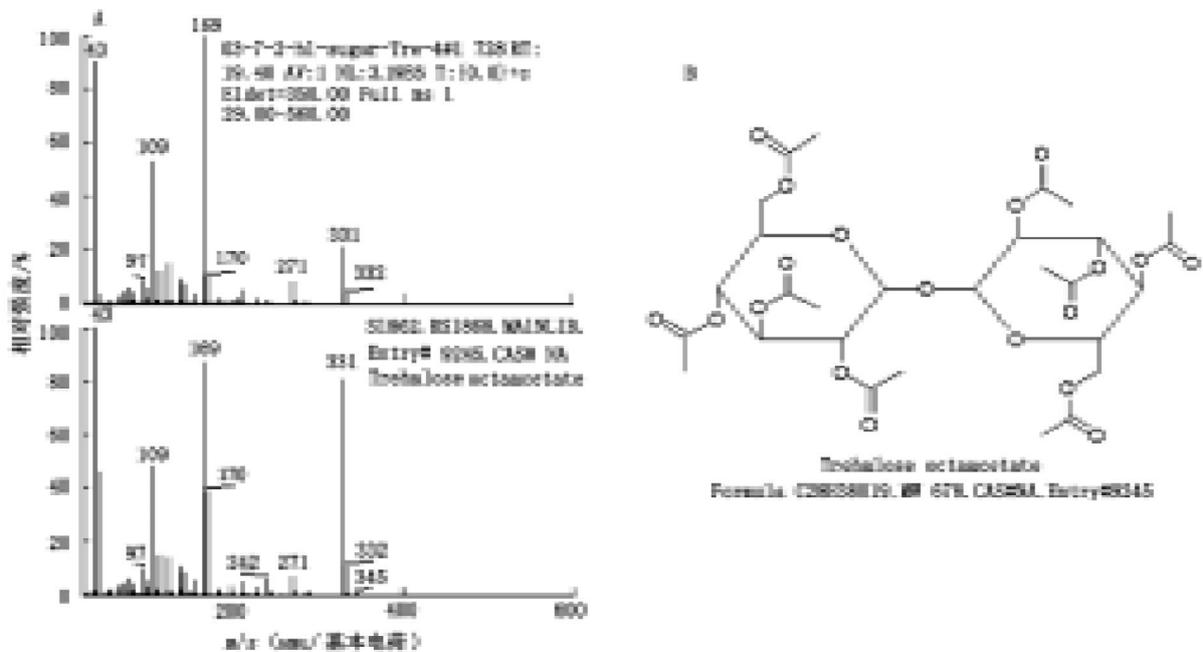


图2 19.40 min处检出物的质谱图与海藻糖乙酯的标准质谱(A)及其结构图(B)

中的海藻糖进行定量分析。

### 3 植物样品中海藻糖的定量分析

植物体内海藻糖的积累与海藻糖合成酶和海藻糖酶有密切关系,海藻糖合成酶负责海藻糖的合成,海藻糖酶降解植物体内的海藻糖。有证据表明,大多数植物体内存在这两类酶的相应基因<sup>[9,10]</sup>,但往往由于海藻糖酶的存在,以致植物体内最终没有海藻糖的积累或者只有微量的海藻糖积累,而且同一种植物可能还会因生长环境不同和季节不同或是组织部位不同,海藻糖含量有一

定差异<sup>[10,11]</sup>。在我们所测定的毛白杨和刺槐样品中,只含有少量海藻糖。图5是毛白杨组培苗根中碳水化合物乙酰化衍生物毛细管气相色谱图,其中海藻糖含量为 $0.0083 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (FW)。实验所用的气相色谱仪噪音峰高为 $14 \mu\text{V}$ ,系统确认3倍峰高为各物质最小检测量。根据最佳衍生化条件下海藻糖所出峰高和样品浓度、进样量和分流比计算出海藻糖的最低检测量为 $8.17 \times 10^{-11} \text{ g}$ 。此法可对植物样品中的微量海藻糖准确定量。

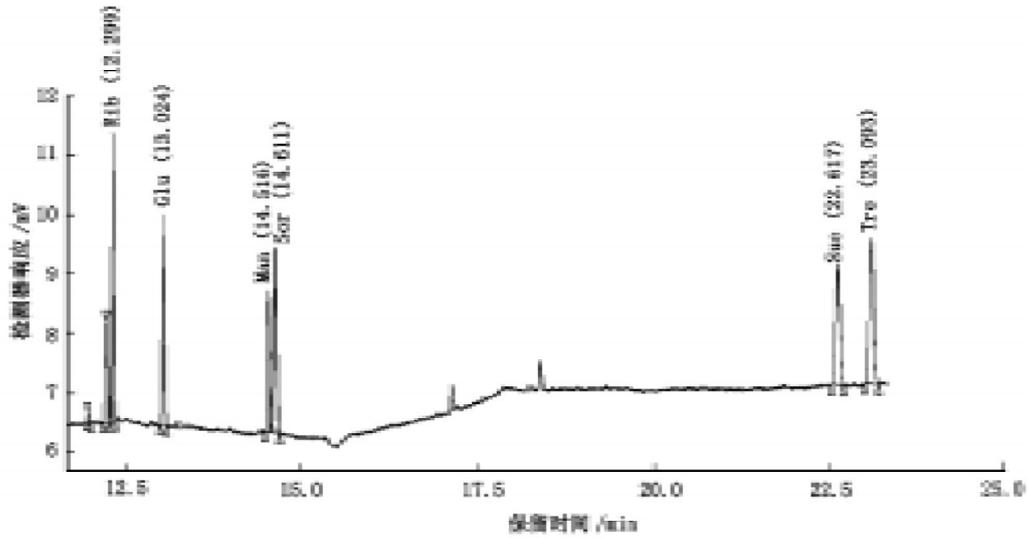


图3 糖与糖醇标准物乙酰化产物毛细管气相色谱分析

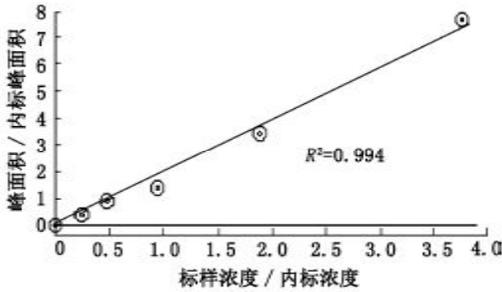


图4 海藻糖的校准曲线

### 讨论

以1-甲基咪唑为溶剂和催化剂对糖醇类物质进行乙酰化具有速度快、生化产物单一等优点, 气质联用技术能对其快速定性。在合适的分

析条件下, 用毛细管气相色谱能得到糖与糖醇乙酰化衍生物理想的分离和定量结果。

已有许多试验证实植物体内积累的海藻糖有利于植物抵御诸如干旱、高盐、寒冷等恶劣环境<sup>[3, 12]</sup>。但目前对其作用机制的研究仍处于探索阶段。植物体内海藻糖与植物抗逆性的关系是一个值得研究的问题, 除了少数几种更苏植物组织中海藻糖含量相对较高以外, 大多数植物体内含量均非常低微<sup>[13]</sup>, 要得到准确的海藻糖含量必须慎重对待从海藻糖的抽提到最后的进样分析整个过程中的每一步操作。加入内标后, 研磨时应尽量避免样品损失。虽然内标法可以降低由于损失引起的误差, 但研磨时样品和内标损失的比例往往不同, 这样就无法保证其定量的准确性。糖醇类物

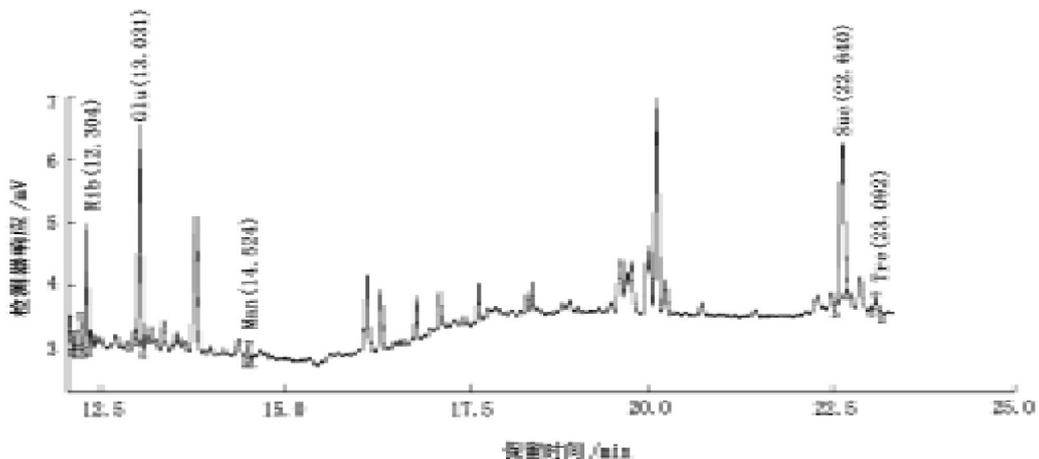


图5 毛白杨组培苗根中糖与糖醇毛细管气相色谱分析

质抽提完毕后, 我们采取过滤方法获得糖醇类物质的混合溶液(也可在 $1\ 000\times g$ 离心5 min后取上清液), 直接浓缩、衍生化, 最后上机分析。对于柱效好的色谱分析来说, 这样做可以得到理想的分离结果。如果用一般的填充柱或理论塔板数低的色谱柱, 有些物质可能会无法完全分离。有人采用增加纯化操作的方法来解决这一问题<sup>[7]</sup>, 虽然繁琐一些, 但也是可取的。

本法应用气相色谱专用分析软件得到海藻糖校准曲线, 也可通过这一分析系统直接得到海藻糖的定量结果。如果这些条件不具备, 根据内标、内标峰面积、海藻糖的梯度浓度和不同浓度海藻糖对应的峰面积, 通过常用的分析软件也一样可以得到理想的校准曲线和定量结果。

总之, 本法操作简单, 衍生化反应迅速, 最低检测量达到了 ng 量级, 适于植物组织中微量海藻糖的分析, 也适于食品营养、医药卫生等行业中海藻糖的定性、定量分析。

### 参考文献

- 1 张树珍. 海藻糖的研究进展及其应用前景. 华南热带农业大学学报, 2000, 6(3): 22~29
- 2 Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose. Science, 1984, 223: 701~703
- 3 Bhandal IS. Trehalose as cryoprotectant for freeze preservation of carrot and tobacco cell. Plant Physiol, 1985, 78: 430~432
- 4 毛忠贵, 朱利丹, 邓绍荣. 用薄层层析法分析海藻糖. 无锡轻工业大学学报, 1997, 16(4): 42~44
- 5 Masao S, Shoichi K. Analyses of  $\alpha$ -linked disaccharides of D-glucose by high performance liquid chromatography. Carbohydr Res, 1991, 215: 203~209
- 6 Fiehn O, Kopka J, Trethewey RN et al. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. Anal Chem, 2000, 72: 3573~3580
- 7 Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ. Expression of a bacterial *mt1D* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 2600~2604
- 8 王慧中, 黄大年, 鲁瑞芳等. 转*mt1D/gutD*双价基因水稻的耐盐性. 科学通报, 2000, 45(7): 724~729
- 9 Vogel G, Aeschbacher RA, Müller J et al. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. Plant J, 1998, 13(5): 673~683
- 10 Goddijn OJM, Verwoerd TC, Voogd E et al. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. Plant Physiol, 1997, 113: 181~190
- 11 Vogel G, Fiehn O, Louis Jean-Richard-dit-Bressel et al. Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. J Exp Bot, 2001, 52(362): 1817~1826
- 12 Garcia AB, Engler JdA, Iyer S et al. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. Plant Physiol, 1997, 115: 159~169
- 13 Goddijn O, Smeekens S. Sensing trehalose biosynthesis in plants. Plant J, 1998, 14(2): 143~146