

一种根系分泌物中有机酸的前处理和高效液相色谱检测方法

李德华^{1,2,*} 贺立源² 李建生³ 刘武定²

¹孝感学院生物系, 孝感 432100; ²华中农业大学资源环境学院, 武汉 430070; ³中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094

A Method for Pretreatment and Determination of Organic Acid in Root Secretion by High Performance Liquid Chromatography

LI De-Hua^{1,2,*}, HE Li-Yuan², LI Jian-Sheng³, LIU Wu-Ding²

¹Department of Biology, Xiaogan College, Xiaogan 432100; ²College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; ³College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094

摘要 改进了根系分泌有机酸的前处理和高效液相色谱检测方法。将DEAE纤维素层析法直接用于根系分泌物中有机酸的富集浓缩, 并与旋转蒸发浓缩的回收率进行了比较。结果表明, DEAE纤维素柱层析有较高的回收率, 可用于根系分泌物中有机酸的富集浓缩, 特别适用于大批量样品的前处理。确定了反向高效液相色谱同时检测草酸、酒石酸、马来酸、苹果酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸等7种有机酸的条件。玉米根系分泌物样品中可检出苹果酸等5种有机酸。

关键词 根系分泌物; 有机酸; 层析; RP-HPLC

根系分泌物是一个古老而又年轻的研究领域。早在18世纪, 人们就已注意到根系分泌物的作用。尤其是近30年以来, 人们对植物根系分泌物的组成和作用有了更深刻的认识。有关根系分泌物的组成、运转及在土壤结构形成、土壤矿物风化、活化土壤养分、促进养分吸收和根际土壤养分移动及抗毒(AI、酸)害中的作用已多有报道^[1~3]。根系分泌物有200多种, 其种类和数量随植物类型、根际环境而异^[2]。其中, 低分子有机酸是根系分泌物的主要成分, 它是具有1至数个羧基的小分子碳水化合物。常见的主要有柠檬酸、酒石酸、马来酸、苹果酸、甲酸、乙酸、草酸、琥珀酸、富马酸、丙酸等。在特殊情况下, 还分泌特有的有机酸。有机酸的分子结构和荷电特性可影响土壤中的许多过程, 因而其与植物根际营养的关系也是显而易见的。

某些逆境因子胁迫可诱导植物根系大量分泌有机酸, 这是对生态环境的一种适应性反应^[4,5]。分离、纯化和测定根系分泌物中低分子有机酸, 对理解植物抗逆性的机制很有意义。迄今, 这方面的报道甚少。过去常用气相色谱测定有机酸, 但这种方法需要长时间的衍生化作用, 而且高温易使所欲测定的有机酸分解。目前用离子色谱和HPLC方法测定较流行^[6~8]。本文探讨根系分泌物中有机酸样品的收集和浓缩的前处理, 以及反向

高效液相色谱(RP-HPLC)检测根系分泌物样品中草酸、酒石酸、马来酸、苹果酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸等7种有机酸的方法, 并以之研究和比较了不同耐铝性玉米自交系根系分泌有机酸的差异。

材料与amp;方法

1 有机酸HPLC分析条件的选择

用RP-HPLC法测定。仪器: 岛津LC-6A。色谱柱: Hypersil C₁₈, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm。对流动相、流动相pH和流速进行选择, 最后确定对草酸、酒石酸、苹果酸、乙酸、马来酸、柠檬酸和琥珀酸等7种有机酸同时测定的分析条件。各有机酸标样均为分析纯, 其中L-苹果酸为Sigma公司产。有机酸的定量按峰面积计算, 采用外标法(两点标准曲线法)。

2 有机酸的柱层析富集和浓缩

DEAE纤维素柱(1.2 cm × 8 cm, 填充DEAE32约9 mL)和阴离子交换树脂柱(717#, 40~60目,

收稿 2003-05-13 修定 2003-09-22

资助 湖北省教育厅科学基金项目(2001A27003)和“八六三”项目(2001AA241051)。

* E-mail: hbdhli@sohu.com, Tel: 0712-2345590

0.5 cm×7 cm, 内装717强碱型阴离子交换树脂约1.5 g)层析柱进行分离和比较。它们的前处理流程为: 蒸馏水浸洗→1 mol·L⁻¹ HCl浸泡4 h→蒸馏水洗至中性→1 mol·L⁻¹ NaOH浸泡4 h→双蒸水浸洗至中性。

草酸、酒石酸、苹果酸、乙酸、马来酸、柠檬酸和琥珀酸等7种有机酸计13.8 mg(表2)溶于250 mL 蒸馏水, 通过DEAE纤维素或阴离子交换树脂层析柱, 然后用25 mL 双蒸水洗柱, 流速均为0.5~0.6 mL·min⁻¹。有机酸洗脱液为15 mL 1 mol·L⁻¹ HCl, 流速: 0.4~0.5 mL·min⁻¹。对照为相同量的有机酸不过柱。每处理重复3次。收集液和对照用真空旋转蒸发仪蒸发(40℃)至近干, 定容至1~2 mL, 冰冻(-20℃)保存用于有机酸HPLC测定。以对照为100%, 计算各有机酸的回收率。

3 根系分泌有机酸样品的制备

选用本室筛选的耐铝性不同的2个玉米自交系——Z01(耐铝)和Z02(铝敏感)。种子经0.1% HgCl₂表面灭菌15 min, 冲洗后播于沙盘, 出苗后切去胚乳, 移入1/2玉米营养液, 3 d后改用全营养液, 采用Magnavaca的玉米营养液配方^[9], pH 4.3。幼苗培养15 d后, 进行三价铝(营养液中添加0.1 mmol·L⁻¹ AlCl₃)处理, 以不施铝为对照。培养期间每天通气5~10 min并调节pH, 自然光照, 每2 d更换1次营养液。

于处理后24 h收集根系分泌物。每处理随机取3株植株。将植株根系置于300 mL 0.2 mmol·L⁻¹ CaCl₂溶液中, 在自然光下放置5 h, 每处理重复2次。按本文建立的方法制备有机酸分析样品: 根系分泌物收集液通过DEAE纤维素层析柱(1.2 cm×8 cm, 内装DEAE32约9 mL), 然后用25 mL 双蒸水洗柱去除阳离子等杂质, 流速均为0.5~0.6 mL·min⁻¹。用15 mL 1 mol·L⁻¹ HCl洗脱有机酸, 流速: 0.4~0.5 mL·min⁻¹。洗脱液用真空旋转蒸发仪蒸干(40℃), 以少许双蒸水溶解并定容至1~2 mL, 冰冻(-20℃)保存用于有机酸HPLC测定。有机酸样品的测定按本文建立的RP-HPLC测定方法进行: Hypersil C₁₈柱, 5 μm, 4.6 mm×250 mm; 流动相为0.5% (NH₄)₂HPO₄, pH 2.85; 流速为0.6 mL·min⁻¹; 进样量20 μL; 检测波长214 nm。

结果与讨论

1 有机酸HPLC检测方法的建立

在有机酸RP-HPLC测定法中, 流动相浓度、流速和pH是影响有机酸分离和测定的3个因素^[10]。比较0.5% KH₂PO₄和0.5% (NH₄)₂HPO₄ 2种流动相对7种有机酸的分离效果表明, 0.5% (NH₄)₂HPO₄在较高的pH下分离各组分离良好, 故选定0.5% (NH₄)₂HPO₄作为流动相。流速对各有有机酸的保留时间和峰形有明显的影响, 考虑到各组分色谱峰的分离度和样品分析时间, 以0.6 mL·min⁻¹的流速最好。pH对有机酸在流动相中的离解度有影响。由于各有有机酸的pK_a值不同, 所以pH对各有有机酸的影响也不同。根据分析这7种有机酸不同个数组合在pH 2.4~3.0流动相中的分离效果, 我们认为, 虽然较低的pH有利于各有有机酸的分离, 但考虑到分析时间和对色谱柱的保护, 最后选定流动相pH为2.85。

最终选定的有机酸HPLC测定条件为: 柱型为Hypersil C₁₈, 5 μm, 4.6 mm×250 mm; 流动相0.5% (NH₄)₂HPO₄, pH 2.85; 流速为0.6 mL·min⁻¹; 进样量20 μL; 检测波长214 nm。在上述测定条件下, 得到有机酸混合标样和玉米根系分泌物样品的色谱图(图1)。

用各浓度混合标准样品(浓度范围为0.1~200 mg·L⁻¹)进行测定, 除草酸和酒石酸的分离略差外, 其他组分均得到很好分离。以样品质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 得到各有有机酸的线性回归方程, 其线性相关系数 $r > 0.99$ 。在上述测定条件下, 各有有机酸的检测限为0.05~10.8(表1)。

2 两种层析柱的有机酸回收率比较

用上述建立的有机酸RP-HPLC测定方法, 以混合有机酸(浓度0.1~2.5 mg·L⁻¹)标样(不进行层析、蒸发等样品处理过程)为对照(100%), 比较DEAE纤维素和阴离子交换树脂两种层析柱的层析效果表明, DEAE纤维素效果较好, 除酒石酸外(小于90%), 各有有机酸的回收率在93.7%~102.3%之间。阴离子交换树脂对柠檬酸等不易洗脱, 回收率较低(小于80%, 表2)。因此, 我们选择DEAE纤维素层析富集浓缩有机酸。

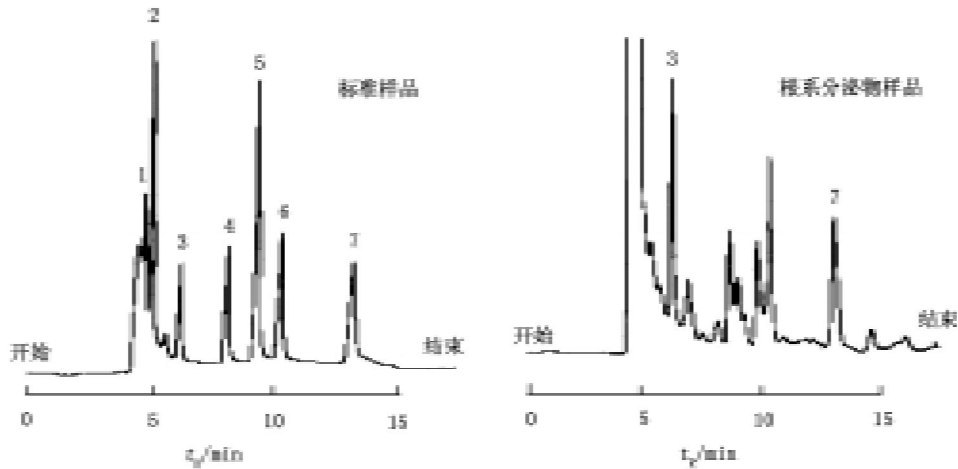


图1 有机酸的RP-HPLC检测

1. 草酸; 2. 酒石酸; 3. 苹果酸; 4. 乙酸; 5. 马来酸; 6. 柠檬酸; 7. 琥珀酸。 t_R 为保留时间。

表1 有机酸的相对响应值和检测限

有机酸	保留时间/min	相关系数(r)	检测限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	回归方程	浓度范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
草酸	4.58	0.9905	0.6	$y = 25737x + 25357$	0~100
酒石酸	4.99	0.9943	3	$y = 3783.6x + 6696.8$	0~100
苹果酸	6.13	0.9942	3.9	$y = 2994.5x + 8758.2$	0~100
乙酸	8.15	0.9929	5.9	$y = 2028.6x + 818.74$	0~100
马来酸	8.94	0.9999	0.05	$y = 229909x - 11915$	0~10
柠檬酸	9.78	0.9987	5.7	$y = 1920.5x + 1567.9$	0~200
琥珀酸	12.88	0.9925	10.8	$y = 995.45x + 3909$	0~200

回归方程中, y 为峰面积, x 为浓度。

表2 两种柱层析的有机酸加标回收率比较

有机酸	加入量/ mg	DEAE纤维素柱		阴离子交换树脂柱	
		回收量/mg	回收率/%	回收量/mg	回收率%
草酸	1.0	0.96±0.01	95.8±0.7	0.97±0.06	97.2±3.2
酒石酸	1.0	0.81±0.04	81.4±2.1	1.00±0.31	100.4±18.0
苹果酸	1.2	1.27±0.06	102.0±5.0	0.96±0.10	87.2±5.3
乙酸	0.5	0.47±0.02	93.7±2.0	0.49±0.01	98.8±0.8
马来酸	0.1	0.10±0.01	95.8±3.0	0.08±0.01	77.5±3.3
柠檬酸	5.0	4.83±0.20	96.5±2.3	3.82±0.23	76.3±2.7
琥珀酸	5.0	5.11±0.60	102.3±6.9	4.41±0.13	88.1±1.5

以较低浓度(0.1~2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)有机酸标样进一步进行DEAE纤维素层析柱的回收试验,并与旋转蒸发浓缩回收率进行比较的结果表明,DEAE纤维素柱层析各有机酸的回收率在92.2%~106.3%之

间,但酒石酸仅87%,原因尚不清楚。有机酸经旋转蒸发浓缩后,除乙酸(低于85%)外,其它各组分的回收率为92.7%~108%(表3)。

另外,研究有机酸混合标样经层析、旋转蒸

表3 DEAE纤维素柱层析及旋转蒸发的有机酸回收率比较

有机酸	加入量/ mg	层析		蒸发		层析+蒸发	
		回收量/mg	回收率/%	回收量/mg	回收率/%	回收量/mg	回收率/%
草酸	0.2	0.19±0.01	94.0±3.0	0.20±0.03	100.4±17	0.19±0.01	94.4±3.0
酒石酸	1.0	0.87±0.09	87.0±9.8	0.94±0.03	94.3±2.8	0.82±0.08	82.1±9.2
苹果酸	1.0	1.02±0.04	102.1±3.5	1.01±0.01	100.6±0.5	1.03±0.04	102.7±3.6
乙酸	1.0	1.06±0.08	106.3±7.8	0.83±0.05	82.8±6.4	0.88±0.06	88.0±6.5
马来酸	0.1	0.09±0	92.4±1.8	0.09±0.01	93.3±8.4	0.09±0.00	86.2±1.7
柠檬酸	2.0	1.84±0.10	92.2±5.4	2.17±0.10	108.6±4.8	2.01±0.12	100.2±5.9
琥珀酸	2.5	2.41±0.12	96.5±4.8	2.32±0.03	92.7±1.5	2.24±0.10	89.5±4.5

发两步后的回收率的结果表明, 经DEAE纤维素柱层析、旋转蒸发处理后, 酒石酸、乙酸和马来酸的回收率有所降低。其中, 酒石酸回收率小于85%, 其他组分在86.2%~100%之间(表3)。

总之, DEAE纤维素柱层析具有较高的回收

率, 可用于根系分泌物中有机酸的富集浓缩, 特别适用于大批量样品的分析。

3 样品分析实例

玉米根系分泌物样品中共检出柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、乙酸、马来酸等5种有机酸(表4)。

表4 不同耐铝性玉米自交系根系分泌物中的有机酸含量比较

自交系	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}(\text{根FW}) \cdot \text{h}^{-1}$											
	苹果酸		乙酸		马来酸		柠檬酸		琥珀酸		总量	
	-Al ³⁺	+Al ³⁺	-Al ³⁺	+Al ³⁺	-Al ³⁺	+Al ³⁺	-Al ³⁺	+Al ³⁺	-Al ³⁺	+Al ³⁺	-Al ³⁺	+Al ³⁺
Z01	4.8	15.2	1.1	0.7	—	0.04	—	—	13.2	5.0	19.2	20.9
Z02	15.0	10.2	3.2	3.0	—	—	—	—	58.9	9.2	77.0	22.4

-Al³⁺: 不加Al³⁺的对照; +Al³⁺: 加0.1 mmol·L⁻¹ Al³⁺; —: 低于检测限。

两个玉米自交系根系分泌有机酸有较大差异。铝处理后, 耐铝自交系Z01的苹果酸分泌量为不作铝处理的3倍, 而敏感自交系Z02琥珀酸分泌量则减少5~6倍。我们以前的研究^[9]表明, 铝胁迫可显著增加耐铝自交系Z01根系中的NADP-苹果酸脱氢酶活性, 以致造成根内苹果酸的积累和分泌量增加。

参考文献

- Jones DL. Organic acid in the rhizosphere — critical review. *Plant Soil*, 1998, 205:25~44
- 涂书新, 孙锦荷, 郭智芬. 植物根系分泌物与根际营养关系评述. *土壤与环境*, 2000, 9(1):64~672
- 常学秀, 段昌群, 王焕章. 根分泌作用与植物对金属毒害的抗性. *应用生态学报*, 2000, 11(2):315~320
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci*, 2001, 6:273~278
- 李德华, 贺立源, 刘武定. 土壤中非生物逆境胁迫与根系有机酸分泌. *武汉植物学研究*, 2001, 19:497~507
- 毕丽君, 顾振宇. 固相萃取-反向HPLC分析色酒中的有机酸. *理化检测——化学分册*, 2000, 36(4):163~165
- 扬红, 黄焕忠, 周立祥等. 植物根系分泌物中有机酸的分析方法. *分析测试学报*, 2001, 20:19~22
- 郇红建, 常江, 张自立等. 研究植物根系分泌物的方法. *植物生理学通讯*, 2003, 39(1):56~60
- 李德华, 贺立源, 刘武定. 耐铝的和对铝敏感的玉米自交系根系的有机酸分泌. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(2):114~120
- 达世祿. 色谱学导论. 武汉: 武汉大学出版社, 1999