

芥蓝未熟种子赤霉素的 GC/MS 定性分析

吴 萍 刘 玲

(北京市农业科学院蔬菜研究中心 100081)

沈川重信 我妻正迪

(日本农水省北海道农业试验场)

[摘要] 本文介绍 GC/MS 法对赤霉素的定性分析方法, 并确认在芥蓝未熟种子中存在 GA_1 、 GA_4 、 GA_9 、 GA_{38} 等 4 种以上赤霉素形式。

关键词: 芥蓝 赤霉素 色谱-质谱

1 前言

赤霉素是植物 5 大类激素之一, 几乎在植物生长、发育的各个方面都起着调节作用。与生长素相似, 它主要在幼嫩叶片、未熟种子中合成, 然后通过筛管或其它途径进行运输。现已发现自由型赤霉素有 84 种, 还有 8 种结合型的赤霉素^[1]。另外还发现一些赤霉素的前体或反应产物也有赤霉素的活性^[2]。目前所发现的赤霉素主要存在于高等植物和微生物中。从结构上可将赤霉素(以下简称 GAs)分为几大类, 在每一类中, 这些 GAs 的结构具有较多的相似之处, 用常规的理化分析方法很难将它们进行有效的分离及定性分析, 因而影响了较深入的工作。色谱-质谱仪的出现解决了这一大难题, 国外已将它广泛应用于 GAs 的定性分析, 并在此基础上, 对其调节作用及自身的代谢进行了研究^[3]。

国内在进行 GAs 研究时, 由于仪器设备的原因, 大都只着重对 GA_3 的研究, 这是一种植物材料较多含有的 GAs, 但并非所有植物材料都含有或起主导调节作用。近年来, 随着质谱仪的应用, 创造了开展此项工作的主要条件, 可以通过对 GAs 的定性分析, 找到特征 GAs, 继而进行更深入的研究工作。本文将质谱法对 GAs 定性分析的方法及在芥蓝分析中的应用结果作一报道。

2 方法

全部过程有以下步骤: 样品初步纯化→制备 HPLC 1→制备 HPLC 2→两次衍生→GC/MS 分析→数据处理。

2.1 样品的初步纯化

将刚采收的芥蓝(*Brassica alboglabra*)未熟种子(去除种荚后)16g 加甲醇匀浆, 过滤后滤渣再次用甲醇匀浆, 共进行 3 次。将合并的滤液用真空浓缩法全部蒸干。加水约 300mL, 尽量溶解内含物。用盐酸调 pH 至 2.5 后, 用乙酸乙酯 100mL 抽提, 共抽提 3 次。合并乙酸乙酯相, 再用饱和 $NaHCO_3$ 100mL 抽提 3 次。合并 $NaHCO_3$ 抽提液, 用盐酸调

1996-04-29 收

pH 至 2.5,再用乙酸乙酯 100mL 抽提 3 次。合并乙酸乙酯相,并在其中加入大量 Na_2SO_4 作脱水处理,4℃放置 1h 以上。过约 10g Na_2SO_4 装成的柱,并用 100mL 乙酸乙酯洗涤,收集流出液,浓缩至干后加少量 0.1M 磷酸缓冲液(pH8.0)溶解,过 4g polystar 柱(已用磷酸缓冲液平衡),用 25mL 磷酸缓冲液洗涤 3 次,得到收集液约 100mL,调 pH2.5,再用乙酸乙酯 35mL 提取 3 次。

乙酸乙酯相用同上方法进行 Na_2SO_4 脱水处理后浓缩至干。加入 0.5mL 甲醇溶解,再加 0.5mL 水,充分溶解后过 Sep-Pak C_{18} 柱(已用甲醇、水先后洗过),再用 80%甲醇 2mL 洗涤 3 次,合并过滤液,浓缩至干,得到初步纯化的 GAs 样品。

2.2 制备 HPLC 1

将上面初步纯化的 GAs 样品,用制备 HPLC 进一步纯化。具体条件:

柱:BONDASPHERE C_{18} 5 μm ~10nm,19mm $\times$ 15cm。

流动相:

时间(min)	0	2	30	60	70
甲醇(%)	30	30	100	100	30
1%乙酸(%)	70	70	0	0	70

(浓度变化均为线性梯度变化)

流速:3mL/min。

将样品尽可能全部溶解上柱,一次进样 225 μL ,并将吸样管内的样品作第 2、3 次上样。三次上样分离,重复收集,每分钟为一样。合并 1~25、60~70min 的样品。收集液全部冷冻真空干燥。按提取植物材料 1 $\mu\text{L/gFW}$ 的量向每个样品中加入甲醇,振荡混匀后进行生物活性分析⁽³⁾。每样重复 6 次,GA₃ 标样重复 12 次。结果如图 1。

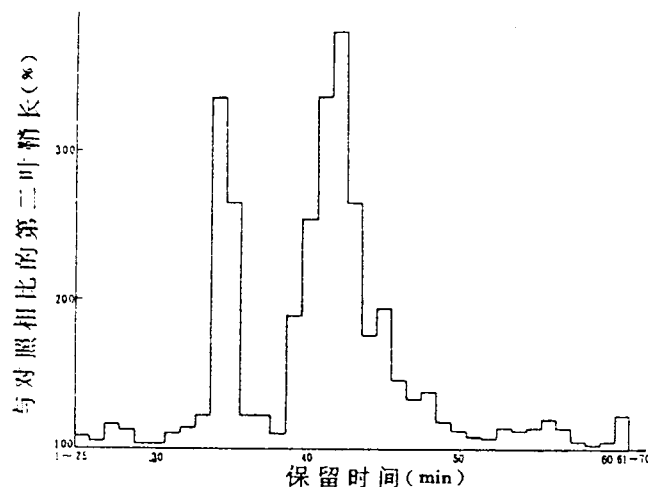


图 1 芥蓝未熟种子的 ODS-HPLC 分离的赤霉素活性

2.3 制备 HPLC 2

将上面 GAs 活性较高的第 34、35、39、40、41、42、43、45min 收集冻干样品用甲醇溶解,分别作第 2 次制备 HPLC 分析。层析条件:

柱: $N(CH_3)_2$ -3151-N, 8×150 mm

流动相:含 0.05% 乙酸的甲醇溶液。

流速:2.0mL/min。

温度:50℃。

收集前 60min 流出液,每 2min 合并为一样。真空干燥后作生物试法。浓度仍为 $1\mu\text{L/gFW}$ (需去除第一生物试法的使用量)。第 1 次 HPLC 的 35min 样品的 HPLC 2 的结果如图 2 (其它略)。

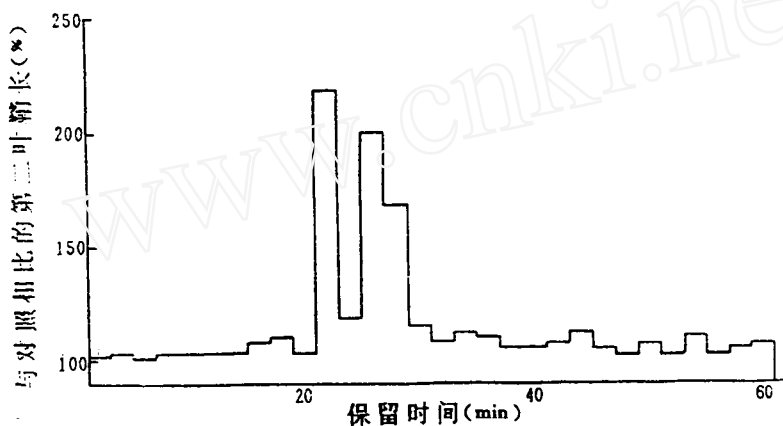


图2 芥蓝未熟种子的 ODS-HPLC $\rightarrow$ $N(CH_3)_2$ -HPLC
分离的赤霉素活性
(ODS-HPLC 的保留时间 35min 的样品)

2.4 衍生

在进行 GC/MS 分析前,必须将经过 2 次 HPLC 分离纯化后有赤霉素活性的样品分别进行衍生处理。

首先进行甲酯化处理。试剂在重氮甲烷发生器内合成^[4]。取刚合成的甲酯化试剂 0.1mL 加入每个第 2 次 HPLC 后有较高生物活性的干燥后的样品中,室温反应 5min 后真空干燥。再各加入 $10\mu\text{L}$ MSTFA, 60°C 水浴保温 20min 进行硅烷化处理。至此样品制备工作完成。

2.5 GC/MS 分析

仪器:JMS-NX505 (日本电子公司)

电离方式:EI, 电子能量 70eV, 离子源温度 230°C 。

He 流速:40mL/min, 扫描范围 0~600。

柱:DB-1, $0.25\text{mm} \times 15\text{m}$, 膜厚 $0.25\mu\text{m}$ 。

柱前压:65kPa。

GC 升温程序:

时间(min)	0	2	8	13	21	25
温度(℃)	120	120	216	216	280	280

前 6min 不进行质谱分析,22min 结束。

图 3 是图 2 的第 21~22min 样品 GC/MS 分析的离子流图。

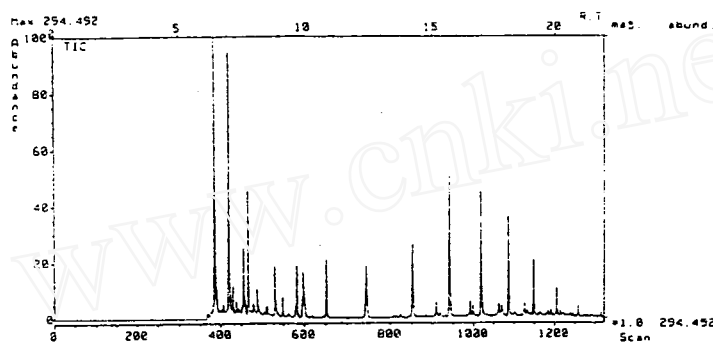


图 3 ODS-HPLC→N(CH₃)₂-HPLC 分离样品的离子流图
(ODS-HPLC 35min 样,N(CH₃)₂-HPLC 21min 样)

2.6 数据处理

GAs 的几种衍生物的离子峰数据可查阅得到^[5]。通过计算机(标准库)及资料^[5]中所列的离子峰相对强度对测定结果进行双相定性分析,必要时可与标样的质谱图进行比较,如完全一致,则基本可以肯定是某种 GAs。

我们一般是先对几个特征离子峰进行检索,得到一个大的范围后,再同时对几个特征离子峰进行检索,直至看到在同一位置都出现离子峰(单离子流图)才能初步确定。

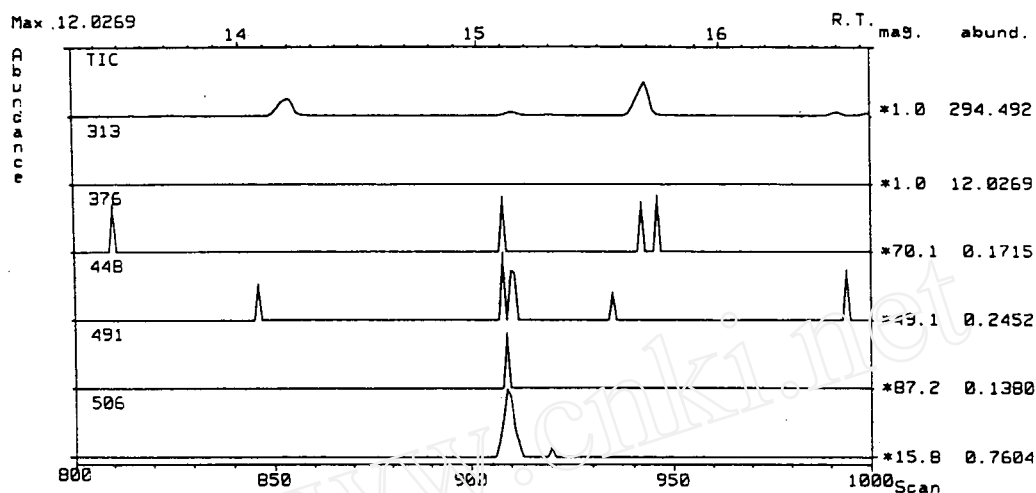
3 结果和讨论

进行 GAs 的定性、定量分析,首先必须对它进行必要的分离纯化。此过程必须借助生物试法来实现。目前应用的生物活性测定方法多是水稻幼苗法,对此有一些需要特别注意之处,否则有可能得到不正确的结果。

生物试法采用的水稻多是一种叫短银坊主的品种,它是一种低 GAs 合成的突变体,为使实验结果更加灵敏可靠,实验中还加入了一种 GAs 生物合成抑制剂对水稻进行处理。对水稻品种的选择及加入样品前的预处理对实验结果非常重要,否则有时会发现同一处理的重复性不好或不同处理的差异不大。

由于相当多的微生物都能生成GAs,故此在处理水稻种子时一定要进行消毒处理,

MASS CHROMATOGRAM Data File: GA02191
 Sample: GA02191
 Scan# 800 to 1000(1323) RT 13'18" to 16'38"(22'01") EI(Pos.) LV 0.00



MASS SPECTRUM Data File: GA02191
 Sample: GA02191
 RT 15'07" EI (Pos.) GC 232.1c BP: m/z 71.0000 Int. 0.3652 LV 0.00
 Scan# (906 to 912) - (914) [coef. 1.00]

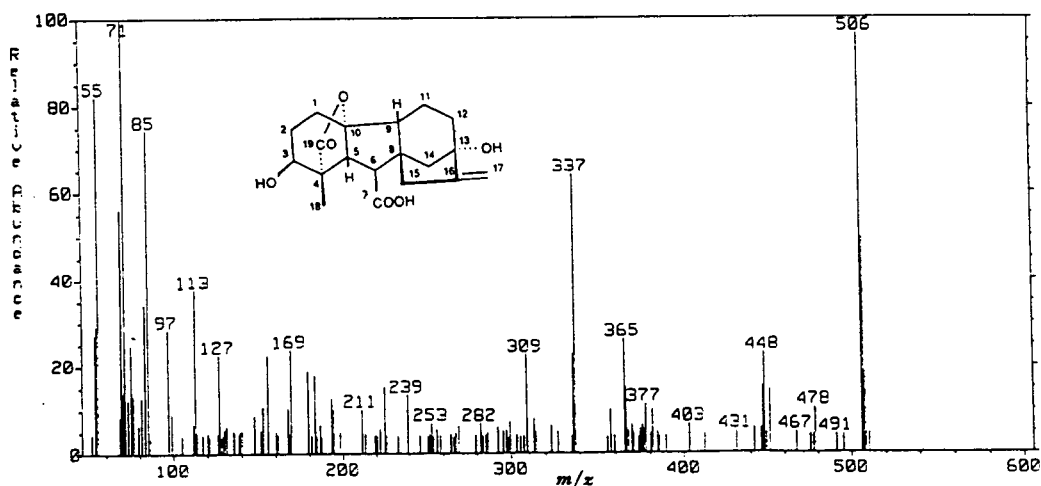
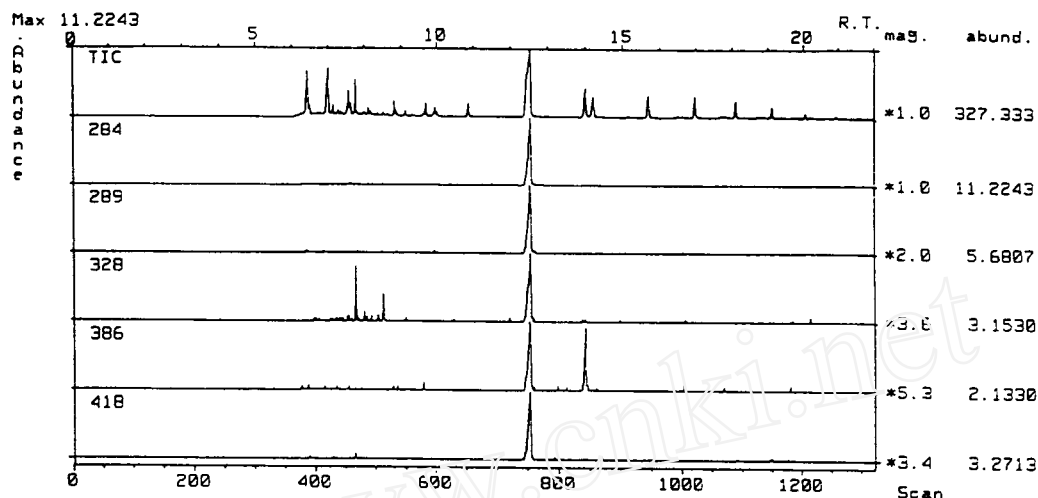


图 4 GA₁-MeTMSi 的单离子流图和质谱图

MASS CHROMATOGRAM Data File: GA0299
 Sample: GA0299
 Scan# 1 to 1323(1323) RT 0'00" to 22'01"(22'01") EI(Pos.) LV 0.00



MASS SPECTRUM Data File: GA0299
 Sample: GA0299
 RT 12'31" EI (Pos.) GC 215.8c BF: m/z 284.0000 Int. 10.9401 LV 0.00
 Scan# (753) - (757) [coef. 1.00]

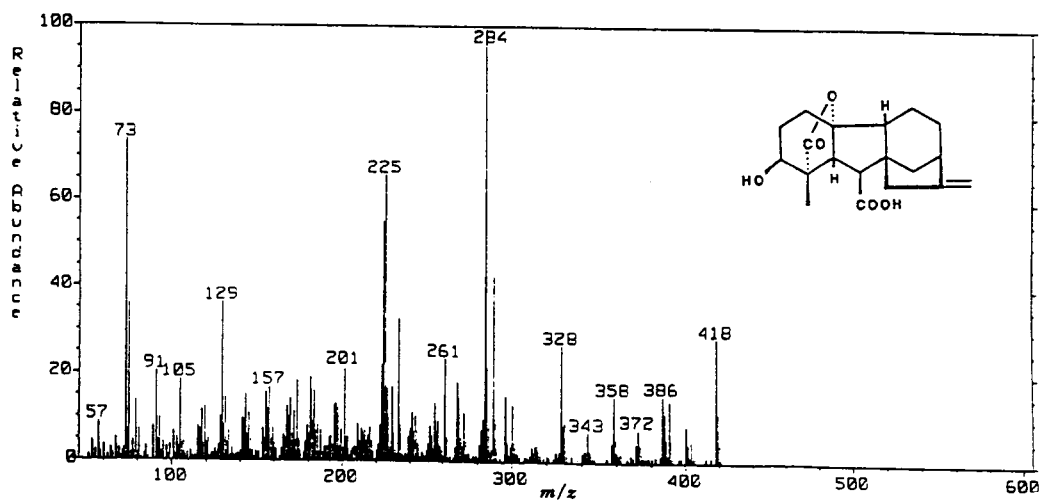
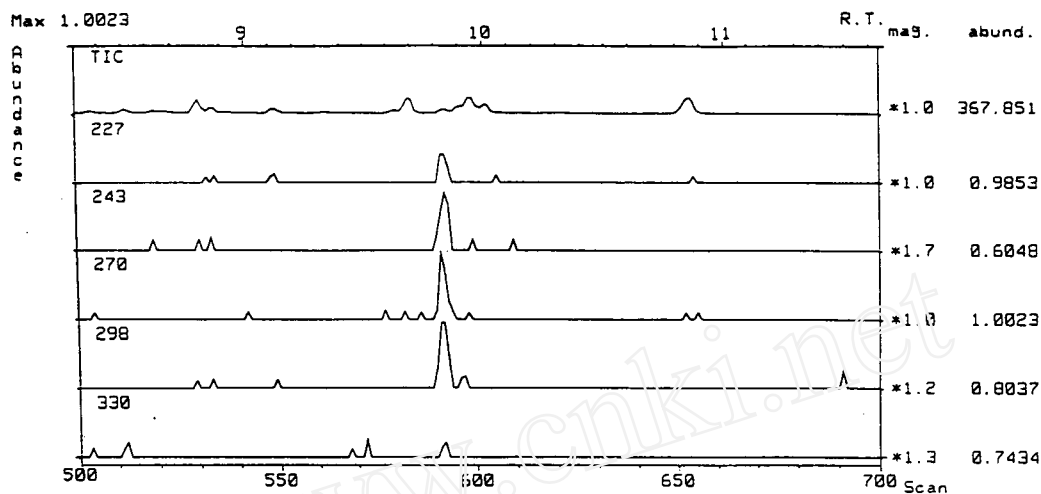


图 5 GA₄-MeTMSi 单离子流图和质谱图

MASS CHROMATOGRAM Data File: GA0243
 Sample: GA0243
 Scan# 500 to 700(1323) RT 8'19" to 11'38"(22'01") EI(Pos.) LV 0.00



MASS SPECTRUM Data File: GA0243
 Sample: GA0243
 RT 9'50" EI (Pos.) GC 215.8c BP: m/z 298.0000 Int. 0.6160 LV 0.00
 Scan# (590 to 592) - (594) [coef. 1.00]

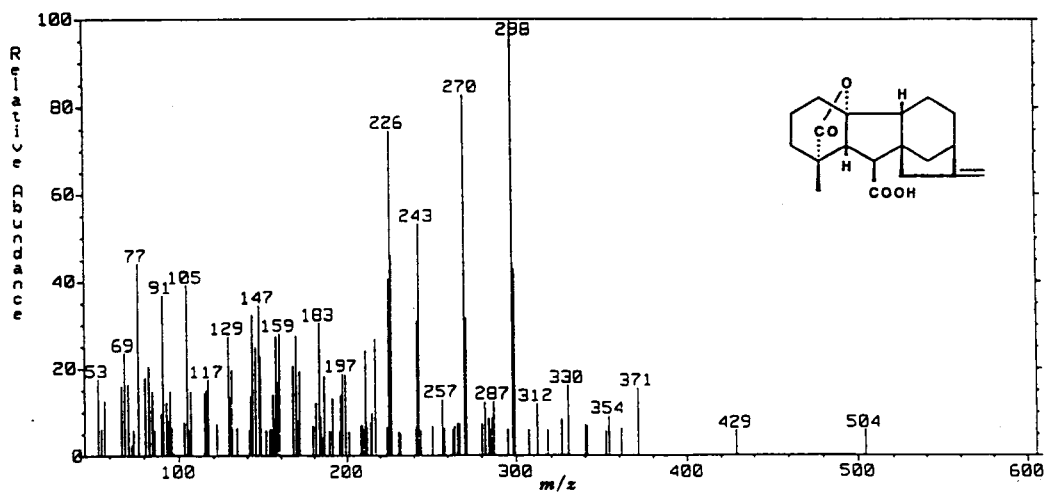
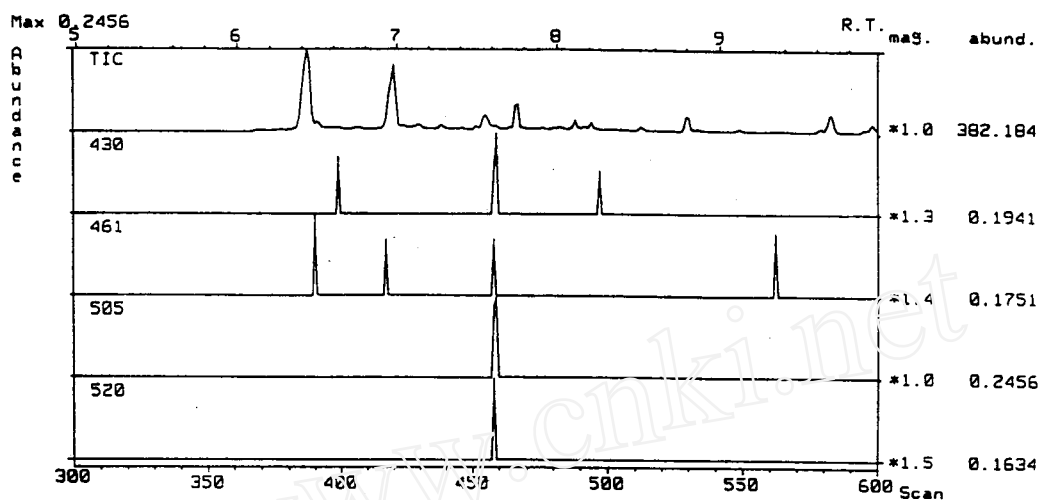


图6 GA₃-MeTMSi 单离子流图和质谱图

MASS CHROMATOGRAM Data File: GA02222.
 Sample: GA02222+223
 Scan# 300 to 600(1323) RT 4'59" to 9'59"(22'01") EI(Pos.) LV 0.00



MASS SPECTRUM Data File: GA02222
 Sample: GA02222+223
 RT 7'37" EI(Pos.) GC 209.5c BP: m/z 281.0000 Int. 0.2795 LV 0.00
 Scan# (458) - (456) [coef. 1.00]

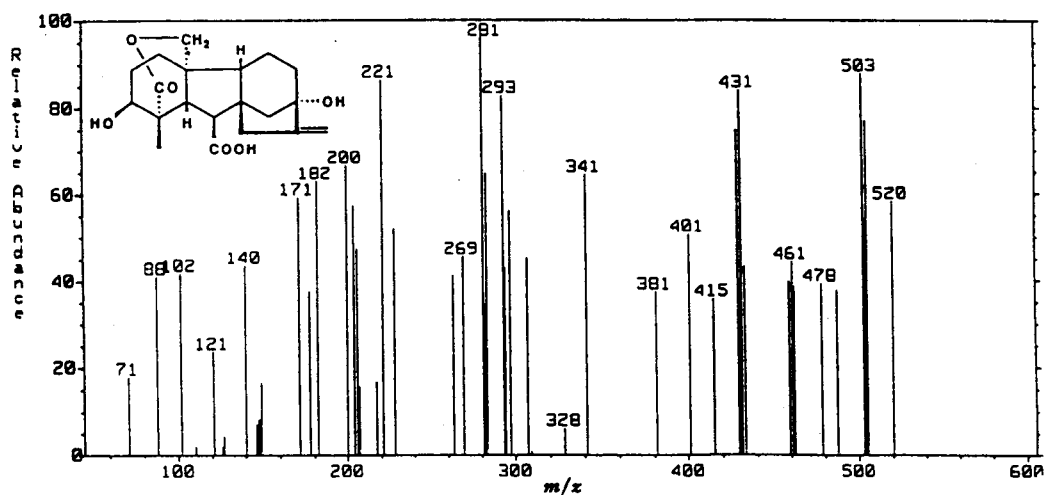


图 7 GA_{11} -MeTMSi 单离子流图和质谱图

消除不必要的实验误差。

在对样品进行衍生处理时,由于甲酯化试剂很容易失效,所以一定要用刚合成的,并能看到明显的黄色试剂。有时由于合成条件的变异,即使是刚合成的试剂也有失败的可能,所以看不到黄色的试剂一定不能使用。

对样品进行衍生处理时,衍生试剂的加入量也是很重要的。有时由于甲酯化处理不太充分,会在质谱分析时找到没有甲酯化和羟基也被硅烷化的 GAs,有关数据也可查阅数据库^[5]得到。

我们已在芥蓝未熟种子中确认有 GA₁(图1第35min样)、GA₄(图1第41、42、45min样)、GA₉(图1第45min样)、GA₃₃(图1第34分min)等4种GAs存在。图4、5、6、7分别是它们的单离子流图和质谱图。另外还有少量生物活性峰没有得到确切答案。

一般认为,GAs 主要在未熟种子中合成。我们分别分析了种子和种荚的 GAs 活性,发现种荚中也有较高的 GAs 活性(虽然从单位重量的材料来看还是低于种子活性),这可能是由于运输的作用。随着种子的成熟,种子中 GAs 活性很快降低,种荚也发生与之相似的变化。从4种已确认的 GAs 看,GA₁和GA₃₃的变化更为快速。

参 考 文 献

- 1 胜见允行。《植物のホルモン》,裳华房,1991. 45~53
- 2 Takahashi Nobutake, Bernard O Phinney, Jake MacMillan. 《Gibberellins》, Springer-Verlag, 1990. 166~263
- 3 Takaaki Nishijima, Naoki Katsura, Hiroko Yamaji. A New Gibberellin Bioassay: A Proposed Method for Its Systematic Analysis, 1990. JARQ 188~194
- 4 G Eisenbrand, C Janzowski, R Preussmann. Gas Chromatographic Determination of N-nitrosoamino Acids by Trimethylsilylation and Single-ion Mass Fragmentography. J Chromatography, 1975, 115: 602~606
- 5 Takahashi Nobutake, Isomaro Yamaguchi, Hisakazu Yamane. Gibberellins. In: Chemistry of Plant Hormones, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986. 108~111

Studies on Identification of Gibberellins in Unmaturated Chinese Kale Seeds by GC/MS

Wu Ping, Liu Ling

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081, China)

Shigenobu Takigawa, Masamichi Agatsuma

(Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Japan)

Received 1996-04-29

Abstract

The analytical method for Gibberellins by GC/MS has been described in this paper. It is confirmed that there are at least 4 kinds of endogenous Gibberellins in unmaturated Chinese Kale (*Brassica alboglabra*) seeds, which are GA_1 , GA_4 , GA_9 and GA_{38} .

Key Words: Chinese Kale, Gibberellin, GC/MS