

超高效液相色谱测定铝胁迫下水培毛竹根系分泌物中有机酸

刘颖坤¹, 蔡莎艺¹, 喻卫武¹, 冷华南², 桂仁意¹

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省湖州市林业局, 浙江 湖州 313000)

摘要: 以毛竹 *Phyllostachys pubescens* 种子作为实验材料, 建立毛竹根系分泌物中有机酸的提取和测定方法, 并测定铝胁迫下毛竹根系分泌物中有机酸。以毛竹水培法收集根系分泌物, 分别以 0, 100, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 等 5 种不同浓度氯化铝溶液作为培养液进行培养, 旋转蒸发浓缩、定容; 使用 ACQUITY™ Ultra Performance LC 超高效液相色谱系统, 以体积分数为 3% 的甲醇-磷酸二氢钾 ($0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (pH 2.6) 溶液作流动相, 经 HSS T3 C18 柱分离, 考察检测波长、色谱柱、流动相的 pH 值及分离温度等因素对 4 种有机酸分离效果的影响。结果表明: 样品制备简便, 分离效果好, 方法的线性范围及精密度、准确度和回收率都能满足毛竹根系分泌物中痕量有机酸定性和定量分析的要求。根据分析物的保留时间以及光谱图对样品色谱峰定性, 水培毛竹根系分泌物中可以检出的有机酸为草酸和苹果酸; 铝离子的存在对毛竹根系有机酸的分泌有促进作用, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化铝溶液对有机酸分泌的促进作用最强。图 2 表 2 参 14

关键词: 植物学; 超高效液相色谱; 铝胁迫; 毛竹; 有机酸

中图分类号: S718.4 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2011)04-0533-05

Organic acid exudates from roots of *Phyllostachys pubescens* with aluminum stress

LIU Ying-kun¹, CAI Sha-yi¹, YU Wei-wu¹, LENG Hua-nan², GUI Ren-yi¹

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Forest Enterprise of Huzhou City, Huzhou 313000, Zhejiang, China)

Abstract: To develop a simple method to determine the organic acids exuded from roots of *Phyllostachys pubescens*, root exudates were obtained using a water culture method with treatments of 0, 100, 500, 1 000, and 2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 as the culture solution and analyzed through ultra performance liquid chromatography (UPLC) with ultraviolet (UV) detection. The exudate was concentrated in a rotary evaporator, and separation was performed on an ACQUITY® UPLC high-strength silica (HSS) T3 C18 column with 3% $\text{CH}_3\text{OH}\text{-KH}_2\text{PO}_4$ ($0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (pH 2.6) (V/V) as the mobile phase of an ACQUITY™ UPLC system. Analysis included the effect on separation of 4 organic acids (oxalic acid, malic acid, citric acid and succinic acid) using UV detection wavelength, chromatographic column, and the pH of the mobile phase. Results showed favorable recovery (95%–105%), satisfactory precision (RSD < 2%), and a good linear relationship (0.022–1.100 μg for the 4 organic acids). According to the retention time and the spectrum of the analytes, the organic acids exuded were an oxalic acid and malic acid. The Al^{3+} ions interacted with organic acid exudates with the strongest interaction when the concentration of AlCl_3 was 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. [Ch, 2 fig. 2 tab. 14 ref.]

Key words: botany; ultra performance liquid chromatography (UPLC); aluminum stress; *Phyllostachys pubescens*; organic acid

收稿日期: 2010-11-09; 修回日期: 2011-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40871116); 浙江省竹产业创新团队资助项目(2009R50030)

作者简介: 刘颖坤, 助理实验师, 硕士, 从事竹林培育研究。E-mail: liuyingkun1@qq.com。通信作者: 桂仁意, 副教授, 博士, 从事竹林培育与利用研究。E-mail: gry@zafu.edu.cn

毛竹 *Phyllostachys pubescens* 可以隔年连续采伐及永续利用, 生长速度快, 经济用途非常广泛, 是当地农民经济收入的重要来源^[1]。铝不是植物必需的营养元素, 微量的铝($3 \sim 13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)可以刺激一些植物的生长, 质量浓度偏高便会发生毒害作用^[2]。铝的毒害是酸性土壤限制作物产量的主要因子之一^[3]。土壤中的铝多数通常以硅酸盐态或氧化态存在, 对植物没有毒害作用^[4]。当土壤的酸碱度低于 pH 5.0 时, 铝的可溶性状态便会增强, 形成 Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 和 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 等离子, 对植物产生毒害作用^[5]。现行的集约经营方式使得浙江省的毛竹林地酸碱度低至 pH 4.8 左右^[6], 已有明显导致土壤铝活化的趋势^[7]。因此, 对毛竹铝胁迫方面的研究在当前具有较强的实际意义。在植物根系分泌物中最常见的有机酸有: 柠檬酸、草酸、琥珀酸、酒石酸、苹果酸、乙酸和丙二酸等, 它们的测定方法通常有高效液相色谱法^[8]和毛细管电泳法^[9]等。这类物质在植物中具有调节细胞代谢的功效, 能活化和固定植物根际潜在的养分^[10], 并且植物根系在铝胁迫下分泌有机酸被认为是植物重要的耐铝机制之一^[11]。小麦 *Triticum aestivum*, 水稻 *Oryza sativa* 等植物的根系分泌有机酸的研究比较详细^[10, 12-14], 但毛竹根系分泌物中有机酸方面的研究未见报道。本实验采用水培法培养毛竹种子 2 ~ 3 周; 用 ACQUITY™ Ultra Performance LC 超高效液相色谱系统, 以体积分数为 3% 的甲醇-磷酸二氢钾 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (pH 2.6) 溶液作流动相, 经 HSS T3 C18 柱分离, 选取前述植物根系分泌物中最常见的 4 种有机酸为研究组分, 考察流动相的 pH 值及分离温度等因素对草酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸 4 种有机酸分离效果的影响。本研究所建立的方法精密度、准确度和再现性均符合痕量组分测定的要求, 并且具有样品用量少, 分析速度快等特点, 用于铝胁迫时植物根系分泌物中有机酸的分析与研究, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

ACQUITY™ Ultra Performance LC 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司), 包含二元溶剂管理器、样品管理器、柱温箱和光电二极管阵列检测器, ACQUITY UPLC HSS T3 C18 柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$); 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多); Milli-Q 超纯水装置; 循环水式真空泵(中国河南巩义市峪华仪器厂); 旋转蒸发仪(中国上海亚荣生化仪器厂), 人工气候箱(中国宁波莱福科技有限公司), 高压灭菌锅(日本三洋电器有限公司), 酸度计, 镊子, 培养皿等。

供试的毛竹种子于 2006 年采自广西桂林市; 采后存放于密封袋, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。草酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸对照品(色谱纯, 中国上海君创生物科技有限公司), 甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司), 试验用水为超纯水, 氢氧化钠, 盐酸等试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 C18 柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$), 流动相为体积分数为 3% 的甲醇-磷酸二氢钾 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (pH 2.6) 流速为 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的等度洗脱, 分析时间为 6 min, 柱温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长为 210 nm, 进样体积为 $5.0 \mu\text{L}$ 。

1.3 有机酸标准溶液及试验中其他溶液的配制

精确称量草酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸对照品各 11 mg, 用超纯水溶于 5 mL 容量瓶得质量浓度 $2.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 草酸溶液为作为对照品母液, 然后稀释 10 倍得 $0.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 种有机酸的标准溶液, 分别进样 5.0, 2.5, 1.0, 0.5, $0.1 \mu\text{L}$ 做 4 种有机酸的标准曲线。

配制 0, 100, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化铝溶液(用氢氧化钠溶液或盐酸调酸碱度至 pH 4.5); $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的高锰酸钾, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸, 体积分数为 75% 乙醇水溶液等。

1.4 样品的准备和处理

①在 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的高锰酸钾中消毒 0.5 h, 常温下在温水中浸泡 24 h。②分别采用 0, 100, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 种不同浓度氯化铝溶液作为培养液, 各浓度下采用 5 个培养皿(内置滤纸 2 片·培养皿⁻¹, 并高温灭菌), 加培养液 $20 \text{ mL} \cdot \text{培养皿}^{-1}$, 用镊子(经体积分数为 75% 乙醇消毒)分散放入 30 颗饱满的种子。然后将培养皿放入人工气候箱中 ($28 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右, 湿度 80% 左右)。③隔 3 d 更换 1 次培养液, 培养 2 周, 合并同一试验单元下 5 个培养皿中培养液, 在旋转蒸发仪上浓缩至 2 mL 左右, 用超纯水定容至 5 mL, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜后作为供试品溶液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的确定 为了考察检测波长对有机酸检测灵敏度的影响，用光电二极管阵列检测器在 190 ~ 400 nm (紫外)下采集 4 种有机酸的紫外吸收光谱图，4 种有机酸均在 210 nm 附近有较大的吸收，重复性好，不易受流动相中其他物质的干扰，故以下实验均采用 210 nm 波长进行检测。

2.1.2 色谱柱的选择 本实验所用的色谱柱在美国 Waters 公司的 BEH C₁₈ 色谱柱、BEH Shield C₁₈ 色谱柱、HSS T3 C₁₈ 色谱柱，小分子有机酸极性比较大，多数做小分子有机酸的文献都是用纯水相作为流动相。前 2 种 UPLC 柱都不可以用纯水相洗脱，且无法将 4 种有机酸分离。因此，我们选择专门用于做极性较大的成分，可以用纯水相洗脱的 HSS T3 C₁₈ 色谱柱。

2.1.3 流动相的选择 有机酸为弱酸，在水系流动相易解离，故采用抑制电离的方法，使它们变为分子态的酸在柱子上保留而得到分离。本实验流动相在硫酸、甲酸、磷酸二氢钾之间选择。硫酸是强酸，不适合作流动相的改性剂；用 2.0 g·kg⁻¹ 的甲酸作为流动相时，基线漂移，且在目标峰附近出现倒峰。磷酸盐缓冲溶液作为一种弱酸电离抑制剂在紫外区几乎无吸收，用其作为测定有机酸的流动相有利于有机酸的分离而不影响检测。由于较高浓度的盐缓冲溶液对泵和柱子都有影响，而较低浓度的盐缓冲溶液又对分离有影响，故选择 0.01 mol·L⁻¹ 的磷酸二氢钾缓冲溶液作流动相的主要成分。

2.1.4 流动相 pH 值的选择 以不同 pH 值(用磷酸调节)的 0.01 mol·L⁻¹ 的磷酸二氢钾溶液作流动相，测定各有机酸的保留时间。结果显示，流动相 pH 值对有机酸的分离影响很大。当 pH 2.0 时，琥珀酸和柠檬酸不能完全分离；逐步提高 pH 值，4 种有机酸逐渐得到分离，但草酸和酒石酸、苹果酸的分离度却逐渐减小；当 pH > 3.0 时，柠檬酸和酒石酸不能有效分离；当 pH 3.2 时，部分有机酸的出峰顺序发生变化。由于 pH < 2.5 的溶液会影响色谱柱的寿命，经综合考虑，最后选择 pH 2.6 磷酸盐缓冲溶液。

2.1.5 流动相中甲醇质量分数的选择 在流动相中加入少量甲醇，能有效地改善峰形。以 0.01 mol·L⁻¹ 的 K₂HPO₄(pH 2.6)溶液作流动相，对不同质量分数的甲醇(0, 10, 20, 30, 40, 50 g·kg⁻¹)对色谱分离的影响进行了比较。结果表明：随着流动相中甲醇质量分数增加，有机酸的疏水端基与固定相的相互作用减弱，保留时间变短，30 g·kg⁻¹ 的甲醇-缓冲溶液分离度和峰形较好。

2.1.6 其他条件选择 以体积分数为 3% 的甲醇-磷酸二氢钾(pH 2.6)溶液作流动相比较了流速、柱温对保留时间的影响。结果发现：流速 0.2 mL·min⁻¹ 时，分离度降低，草酸和酒石酸不能有效分离，流速 0.1 mL·min⁻¹ 时，由于流速太小，当进样量较大时，影响分离效果；而柱温增高则会加快传质过程，缩小分离度。因此，选择在 0.15 mL·min⁻¹ 流速下及室温(30 °C)进行测定。

2.2 超高效液相色谱分析

用 HSS T3 C₁₈ 柱，体积分数为 3% 的甲醇-磷酸二氢钾(pH 2.6)缓冲溶液作为混合流动相，分析物可以在 6 min 内得到很好的分离。草酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸的保留时间分别为：1.507 ± 0.089, 2.310 ± 0.078, 3.900 ± 0.46, 5.243 ± 0.065 min，标品的色谱图如图 1 所示。

2.3 标准曲线、精密度及回收率

取 500 μmol·L⁻¹ 氯化铝的培养液 4 份，其中 1 份作本底(样品色谱图见图 1)，另 3 份各添加不同量的有机酸标品溶液按 1.4(3)中的处理样品方法处理后测定各成分，平行测定 5 次·样品⁻¹，考察方法的回收率和精密度。根据 3.3 中所述的方法将混合标准溶液进样，以峰面积(mV·s)积分值为纵坐标，标品溶液的浓度(μg)为横坐标，求得线性回归方程，结果见表 1。4 种分析物的峰面积相对标准偏差(RSD)均小于 2%；回收率均为 95% ~ 105%，表明该分析方法有很好的精密度和准确度。

2.4 样品的测定

样品预处理后，按照已优化的色谱方法注入超高效液相色谱仪中，根据分析物的保留时间及光谱图对样品中的色谱峰进行定性，水培毛竹根系分泌物中可以检出的有机酸为草酸和苹果酸，另外 2 种有机酸未检出。样品色谱图见图 2。结果表明：本方法测定不同浓度铝处理的毛竹根系分泌物中的草酸和苹果酸含量，结果如表 2 所示。

表1 有机酸的标准曲线

Table 1 Calibration curve of organic acids

有机酸	线性范围/ μg	回归方程	相关系数	标准偏差/%	回收率/%
草酸	0.022~1.100	$y=4.66\times 10^6x-4.43\times 10^4$	0.999 8	0.95	101.8
苹果酸	0.022~1.100	$y=2.54\times 10^5x-2.20\times 10^4$	0.999 3	1.28	97.6
柠檬酸	0.022~1.100	$y=8.94\times 10^6x+5.51\times 10^3$	0.998 5	1.43	98.3
琥珀酸	0.022~1.100	$y=2.46\times 10^5x+6.08\times 10^4$	0.999 2	0.84	103.4

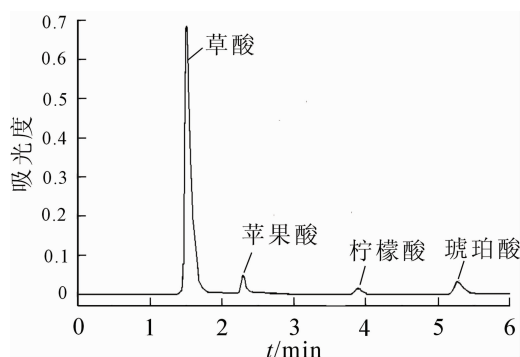


图1 4种有机酸标准品色谱图

Figure 1 Liquid chromatogram of standard of 4 organic acids

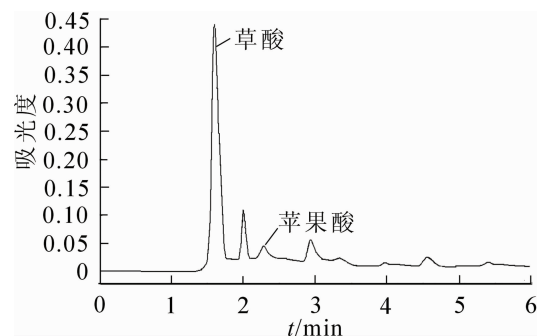
图2 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化铝处理毛竹培养液中有机酸色谱图Figure 2 Liquid chromatogram of organic acids in culture solution containing $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{AlCl}_3$

表2 不同浓度氯化铝处理毛竹分根系泌出有机酸的量

Table 2 Content of organic acids of culture solution containing different concentrations of AlCl_3

氯化铝浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	草酸/ $(\mu\text{g}\cdot\text{株}^{-1})$	苹果酸/ $(\mu\text{g}\cdot\text{株}^{-1})$
0	6.52 ± 0.17	4.2 ± 0.21
100	7.76 ± 0.32	5.64 ± 0.16
500	17.59 ± 0.28	9.54 ± 0.26
1 000	14.03 ± 0.37	5.89 ± 0.14
2 000	12.48 ± 0.25	3.15 ± 0.10

3 结论

采用超高效液相色谱法测定毛竹根系分泌物中的痕量有机酸, 样品制备简便, 分离效果好, 方法的线性范围及分析结果的精密度、准确度和回收率都能满足毛竹根系分泌物中痕量有机酸定性和定量分析的要求, 并且具有样品用量少, 分析快速等特点, 为植物根系分泌物中痕量有机酸的研究, 以及植物根际环境中有机酸作用机理的探寻提供了重要的实验手段。结果表明: 毛竹根系分泌的有机酸只有草酸和苹果酸, 并且草酸和苹果酸的含量与铝离子的浓度有一定的相关性, 铝离子的存在对毛竹根系有机酸的分泌有促进作用。特别是当氯化铝浓度在 $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 促进作用最明显, 在 $1\ 000\sim 2\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 促进作用相对减弱。

参考文献:

- [1] 高志勤, 傅懋毅. 毛竹林凋落物养分状况的林型变异特征[J]. 林业科学, 2007, 43(增刊1): 95-100.
GAO Zhiqin, FU Maoyi. Variation characteristics of nutrient status of litter in different *Phyllostachys pubescens* stand types [J]. *Sci Silv Sin*, 2007, 43(supp 1): 95-100.
- [2] 张福锁. 环境胁迫与植物育种[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 384-390.

- [3] 田仁生, 刘厚田. 酸化土壤中铝及其植物毒性[J]. 环境科学, 1989, **11**(6): 41 – 45.
TIAN Rensheng, LIU Houtian. Aluminum of the acid soil and the toxicity to plants [J]. *Environ Sci*, 1989, **11**(6) : 41 – 45.
- [4] 刘拥海, 俞乐. 植物解铝毒机理的研究进展[J]. 肇庆学院学报, 2004, **25** (5): 51 – 53.
LIU Yonghai, YU Le. Study of detoxification of aluminum plant for plants [J]. *J Zhaoqing Univ*, 2004, **25** (5): 51 – 53.
- [5] RINCON M, GONZALES R A. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars [J]. *Plant Physiol*, 1992, **99** (3): 1021 – 1028.
- [6] 徐筱雯, 崔会平, 吴家胜, 等. 毛竹林模式施肥生态效应评价[J]. 浙江林业科技, 2008, **25** (1): 38 – 42.
XU Xiaowen, CUI Huiping, WU Jiasheng, *et al.* Evaluation of ecology impact of bamboo forest with model fertilizing [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2008, **25** (1): 38 – 42.
- [7] GUI Renyi, LI Guodong, FANG Wei, *et al.* Iron and aluminum forms of the soil in moso-bamboo stands under the extensive and integrated culture managements [J]. *Bamb J*, 2008, **25**: 26 – 31.
- [8] 张利, 何新华, 陈虎, 等. 铅胁迫下杨梅根系分泌有机酸的研究[J]. 浙江林学院学报, 2009, **26** (5): 663 – 666.
ZHANG Li, HE Xinhua, CHEN Hu, *et al.* Organic acid exudates from *Myrica rubra* roots with lead stress [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2009, **26** (5): 663 – 666.
- [9] 杨若明, 张经华, 山崎素直. 毛细电泳法分离测定小麦根中的有机酸[J]. 分析测试学报, 2005, **24** (5): 86 – 88.
YANG Ruoming, ZHANG Jinghua, YAMAZAKI Sunao. Capillary electrophoretic determination of organic acids in root of cultured wheat [J]. *J Insru Anal*, 2005, **24** (5): 86 – 88.
- [10] 王平, 周荣. 高效液相色谱法测定植物根系分泌物中的有机酸[J]. 色谱, 2006, **24** (3): 239 – 242.
WANG Ping, ZHOU Rong. Determination of organic acids exuded from plant roots by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2006, **24** (3): 239 – 242.
- [11] LIGABA A, SHEN H, SHIBATA K, *et al.* The role of phosphorus in aluminium-induced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*) [J]. *Physiol Plant*, 2004, **120** (4): 575 – 584.
- [12] DELHAIZE E, RYAN P R, RANDALL P J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) (II) aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices [J]. *Plant Physiol*, 1993, **103**: 695 – 702.
- [13] 刘拥海, 俞乐, 陈秀云, 等. 外源草酸对水稻幼苗铝毒害的缓解作用 [J]. 湖南农业大学学报, 2008, **34** (3): 281 – 340.
LIU Yonghai, YU Le, CHEN Xiuyun, *et al.* Alleviation of aluminum toxicity in rice seedlings by exogenous oxalic acid [J]. *J Hunan Agric Univ*, 2008, **34** (3): 281 – 340.
- [14] 王水良, 王平, 王趁义. 铝胁迫下马尾松幼苗有机酸分泌和根际 pH 值的变化[J]. 生态与农村环境学报, 2010, **26** (1): 87 – 91.
WANG Shuilang, WANG Ping, WANG Chenyi. Changes in rhizosphere pH and exudation of organic acids of masson pine (*Pinus massoniana*) seedlings under aluminum stress [J]. *J Ecol Rural Environ*, 2010, **26** (1): 87 – 91.