

УДК 543.064:581.192

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ В НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ЯЧМЕНЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Б. Е. БУМАЖНЫЙ, Г. Л. СОРКИНА, И. К. БЛИНОВСКИЙ
(Межфакультетская лаборатория регуляторов роста и развития с.-х. растений)

Разработана методика определения содержания абсцизовой кислоты в надземной части ячменя при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии. Количественные измерения проводили методом абсолютной калибровки (чувствительность метода — 5 нг на 1 г сырой массы, масса навески—10 г, коэффициент вариации в линейном диапазоне концентраций 5—100 нг/г — 7 %), высокоэффективную жидкостную хроматографию — на колонке, заполненной сорбентом Partisil ODS, с использованием в качестве подвижной фазы полунасыщенного раствора битартрата калия при соотношении метанол : вода = 6 : 4 (по объему).

Для изучения механизма действия экзогенных регуляторов роста, используемых в сельском хозяйстве, важно располагать данными о содержании абсцизовой кислоты (АБК) в различных органах и тканях растений. В этой связи большое значение имеет разработка способов определения количества АБК в растительных образцах.

В последние годы для установления содержания АБК в растительных образцах применяются различные физико-химические методы анализа и прежде всего газо-жидкостная хроматография с электронно-захватным детектором [3, 8], газовая хроматография — масс-спектрометрия (ГХ-МС) [3, 7] и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором [4, 6], причем предпочтение отдается последнему методу, что обусловлено более высокой эффективностью хроматографического процесса и отсутствием необходимости получения летучих производных при определении количества АБК. Чувствительность УФ-детектора ВЭЖХ более низкая, чем электронно-захватных и масс-спектрометрических детекторов в газовой хроматографии, однако это компенсируется большим объемом пробы, вводимой в хроматограф за одно определение. Таким образом, реальная чувствительность указанных методов в отношении АБК в пересчете на 1 г анализируемого образца практически одинаковая (5—10 нг) и вполне достаточна, так как содержание АБК в различных растительных образцах составляет от 20 до 100 нг на 1 г сырой массы [1]. Предлагаемая нами методика определения содержания АБК в образцах ячменя (схема) относительно проста и не требует применения дорогостоящих материалов.

Для фиксации растительных образцов использовали метанол, энергично подавляющий активность ферментов; экстракцию АБК из фиксированной ткани также проводили метанолом, который имеет более низкую температуру кипения, чем этанол, что

важно для отгонки растворителя. Экстракция АБК метанолом или экстрагентами на его основе осуществляется в большинстве (80 %) методик. Для очистки метанольных экстрактов от растительных пигментов использовали гексан. Поскольку растворимость АБК в гексане незначительная при различных значениях рН [4], то потери меньше механических.

После удаления пигментов проводили очистку образца жидкостной экстракцией эфиром при различных значениях рН_{вод}. По литературным данным, 77 % АБК переходит в эфир при рН 2,5 и лишь 1,5 % АБК при рН 9 [4].

Таким образом, при рН 9 эфиром отделяли полярные липофильные вещества нейтральной природы. После подкисления из

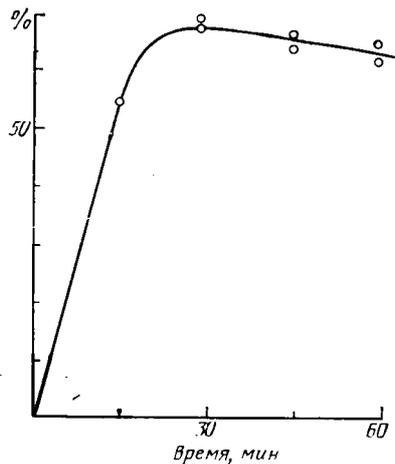
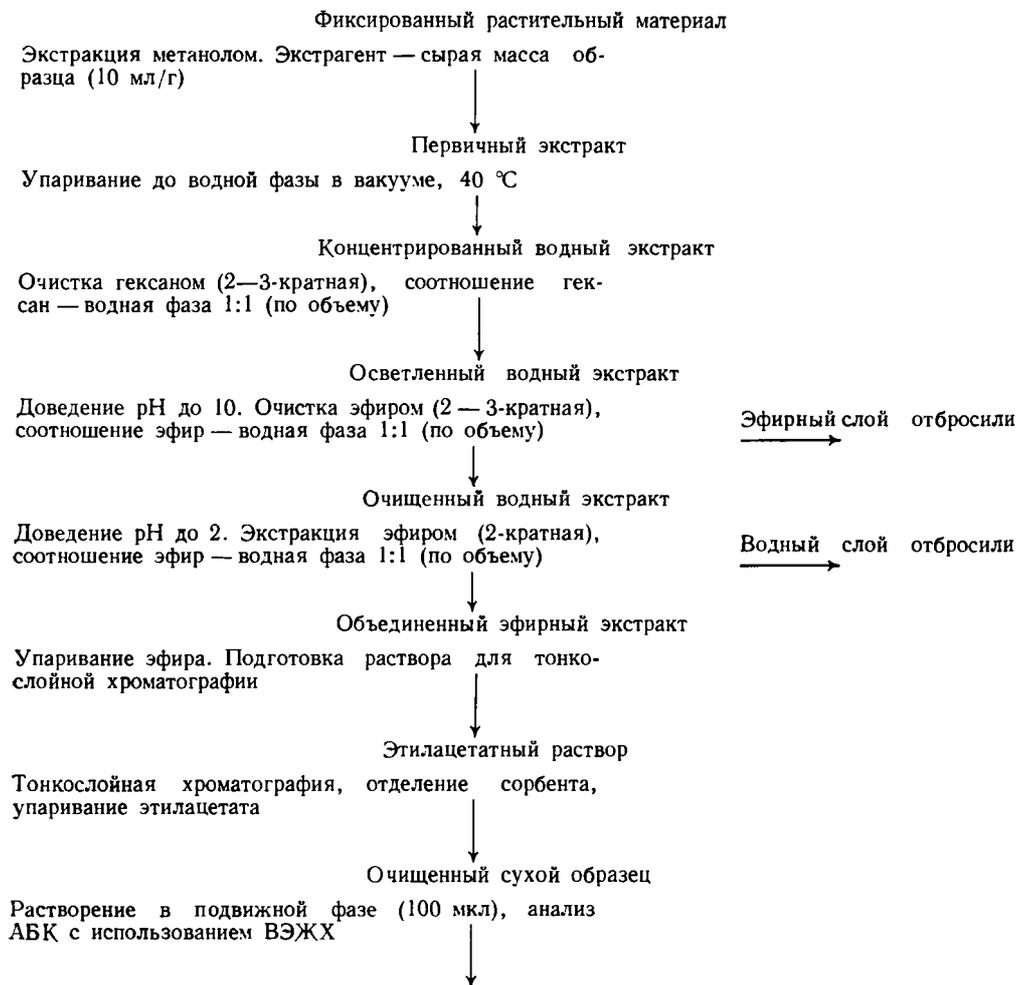


Рис. 1. Зависимость между количеством АБК, перешедшим в диэтиловый эфир при рН 2 (% добавленного количества АБК), и временем экстракции.

Определение содержания АБК в растительных образцах
(схема анализа)



водной фазы экстрагировали (эфиром) АБК и сопутствующие полярные вещества кислой природы; водорастворимые примеси оставались в водном слое.

Экспериментально определено (рис. 1), что при рН 2 около 70 % АБК переходит в эфир при энергичном встряхивании в течение 30 мин (в дальнейшем возможно увеличение потерь из-за неплотности пробок). При 2-кратной экстракции потери АБК не превышают 10—12 %.

Препаративная тонкослойная хроматография (ТСХ) являлась основным этапом предварительной очистки образцов. Изученные нами методы, описанные в литературе, включали по 2—5 этапов очистки (в 60 % работ — 3 этапа), по крайней мере один из которых основан на хроматографии.

Окончательный анализ образцов осуществляли при использовании ВЭЖХ на сорбенте с обращенной фазой, хроматографическую очистку проводили на сорбенте без обращения фаз (силикагель). Эффективность тонкослойной хроматографии, а в случае применения стандартных пластинок и воспроизводимость выше, чем колоночной (традиционной, низкого давления). Для очистки экстрактов из ячменя на пластинках «Silufol UV-254» наиболее подходящей

в качестве элюента оказалась система толуол — этилацетат — уксусная кислота 40 : 5 : 2 [9], значение R_f АБК в наших экспериментах составляло 0,11. Вещество, сильно поглощающее УФ-излучение при 254 нм, в зоне сорбента с данным значением R_f не обнаружено. Этилацетатный раствор (см. схему) наносили на линию старта непрерывной полосой; после элюирования зону сорбента с R_f 0,11 шириной 4—5 мм (контроль по стандарту АБК) счищали, АБК вымывали с сорбента этилацетатом. При выборе длины стартовой линии в процессе проведения ТСХ руководствовались размером взятого для анализа образца, в наших экспериментах длина «старта» составляла 12 см на 10 г сырой массы, потери на стадии ТСХ — 35 % (табл. 1). При низких концентрациях АБК можно добиться удовлетворительной очистки и при длине стартовой линии 5,5 см, в этом случае потери уменьшаются на 10—20 % (табл. 1). При энергичном встряхивании в течение 15 мин АБК с силикагеля вымывалась практически полностью (95—100 %).

Для ВЭЖХ АБК используют сорбенты с обращением фаз [6], прямофазные сорбенты [4] и ионообменники [5, 10]. Согласно данным УФ-спектроскопии (рис. 2), молеку-

Потери АБК при очистке экстрактов из ячменя
методом preparативной тонко слойной хроматографии

Масса АБК, используемой для эксперимента, кг	Средняя высота пиков АБК после ВЭЖХ, приведенная к одинаковой чувствительности детектора, мм			Количество АБК, %, при очистке на ТСХ с длиной фронта, см	
	без очистки на ТСХ	длина фронта при очистке на ТСХ, см		5,5	12
		5.5	12		
10	5	4	—	80	—
30	10	11	—	91	—
60	20	—	14	—	70
100	30	—	22	—	73
500	160	—	120	—	75
1000	330	—	250	—	75

ла АБК в нейтральных водных и водно-метанольных растворах находится в виде аниона ($\lambda_{\max} = 245$ нм — диссоциированное состояние АБК). Для проведения хроматографии этого вещества на обращеннофазных сорбентах добавляют агенты кислотного характера. Нами для этой цели выбрана малорастворимая соль — битартрат калия, полунасыщенный раствор которой при соотношении метанол : вода = 6 : 4 мы использовали в качестве подвижной фазы (фаза «В₁», рН 5,0). АБК в фазе «В₁» находится в основном (84 %) в недиссоциированной форме ($\lambda_{\max} = 259$ нм, $pK_{aa}(\text{АБК}) = 5,76$). При прохождении «В₁» со скоростью 1 мл/мин через колонку 250×6 мм, заполненную обращеннофазным сорбентом Partisil ODS, эффективность по отношению к АБК составила 2900 т. т. (время выхода АБК 5,1 мин); при меньшей скорости эффективность была еще выше, однако время анализа соответственно возрастало. При других соотношениях метанола и воды эффективность работы колонки снижалась. Типичные хроматограммы, полученные после

проведения ВЭЖХ чистой АБК и образца ячменя, очищенного по описанной схеме, приведены на рис. 3. На хроматограмме растительного образца имеется пик (вещество X), время выхода которого соответствует таковому для АБК. Для доказательства соответствия этого пика пику АБК образцы ячменя и АБК хроматографировали в аналогичных условиях, используя УФ-детектор, настроенный на различные длины волн. Отношения высот пиков при различных длинах волн для вещества X и АБК близки. Для более строгого доказательства идентичности АБК и вещества X последнее препаративно собирали, экстрагировали из подвижной фазы эфиром, метилировали эфирным раствором диазометана и подвергали хромато-масс-спектрометрическому анализу (рис. 4).

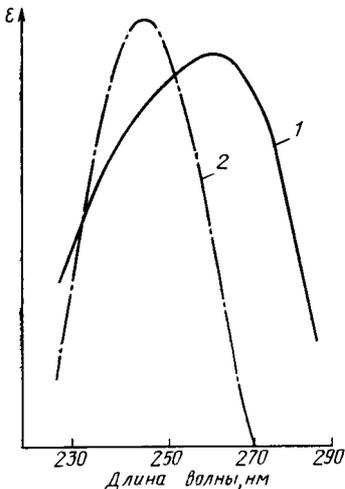


Рис. 2. УФ-спектры АБК (в районе максимумов поглощения) в подвижной фазе В1 (1; $\lambda_{\max} = 259$ нм) и в смеси метанол : вода 6:4 (2; $\lambda_{\max} = 245$ нм).

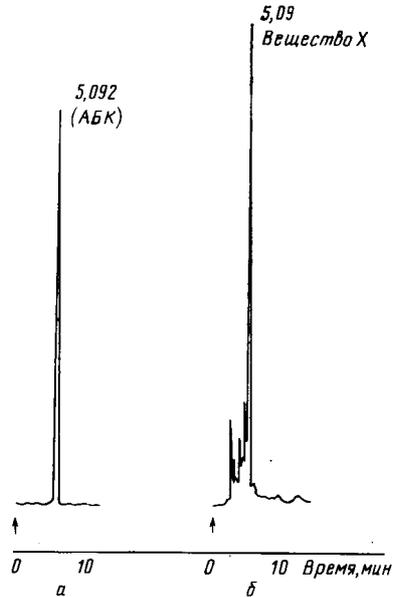


Рис. 3. Хроматограммы (ВЭЖХ) чистого образца АБК (а) и образца, выделенного из ячменя, (б), после очистки по приведенной схеме (колонка Partisil ODS, 250×4,6 мм, скорость подвижной фазы В1 — 1 мл/мин, УФ-детектор при 254 нм; над пиками указано время выхода).

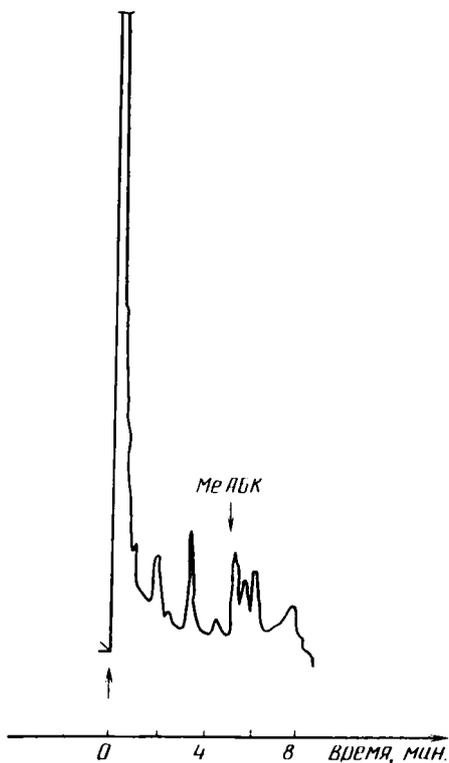


Рис. 4. Хроматограмма (ГХ-МС) по полному ионному току вещества X после метилирования диазометаном (хромато-масс-спектрометр «Hitachi M-80В», стеклянная колонка 3 м × 3 мм с 3 % SE 30 на Gas Crom Q — 100—120 меш; хроматографические условия указаны в тексте).

Вещество X, как оказалось, состоит из смеси веществ, большинство из которых являются жирными кислотами, не поглощающими УФ-излучение при 254 нм и вследствие этого не регистрируемыми УФ-детектором. Однако масс-спектр одного из этих веществ (рис. 5) в точности соответствует масс-спектру метилового эфира АБК [9].

Таким образом, описанный метод позволяет определить содержание АБК в образцах ячменя. Нами достигнуты следующие метрологические характеристики: чувствительность — 5 нг на 1 г сырой массы образца ячменя. Используя метод абсолютной калиб-

ровки, по высоте пиков получили коэффициент вариации в линейном диапазоне концентраций 5—100 нг на 1 г сырой массы — 7 %. Специально поставленные эксперименты показывают, что потери АБК в процессе очистки составляют 45—55 % и приблизительно равны сумме потерь на отдельных стадиях очистки.

Методика

Материалы и реактивы. В процессе анализа применяли перегнанные растворители: этилацетат, толуол, уксусную кислоту, гексан и метанол. Диэтиловый эфир перед перегонкой очищали от перекисных соединений на колонке с Al_2O_3 . В качестве стандарта использовали цис-транс АБК фирмы Sigma.

Фиксирование растительного образца. Свежие растения (ячмень, надземная часть) разрезали на отрезки длиной 1 см и сразу помещали в герметичный сосуд, заполненный метанолом. Для анализа брали образец массой около 10 г (целое число растений); метанол использовали одновременно как фиксатор и как экстрагент АБК. Соотношение объема метанола (в мл) и объема сырого образца (в г) составляло 10 : 1. Закрытый сосуд помещали в холодильник и хранили при 4 °С для следующего этапа анализа.

Экстракция. Экстрагентом служил фиксирующий метанол, который уже находился в сосуде с образцом. Содержимое последнего помещали в гомогенизатор MPW-302 (ПНР) и добавляли гексан, объем которого равнялся половине объема метанола. После гомогенизирования (15 мин) гомогенат фильтровали, гексановый слой фильтрата отделяли и отбрасывали, метанольный слой смешивали со шротом и помещали на 24 ч в холодильник (4 °С, собственно экстракция). После фильтрации получали первичный экстракт.

Получение этилацетатного раствора (схема). Первичный экстракт (схема) упаривали на роторном испарителе до водной фазы при 35—40 °С (концентрированный водный экстракт, объем 15—20 мл при навеске 10 г). Добавляли гексан в соотношении 1 : 1 по объему и после перемешивания отделяли и отбрасывали гексановый слой. Операцию повторяли 2—3 раза в зависимости от количества отделенных таким образом пигментов. Полученный осветленный водный экстракт доводили до pH 9—10 (1 н. раствором Na_2CO_3 , контроль по универсальной индикаторной бумаге), до-

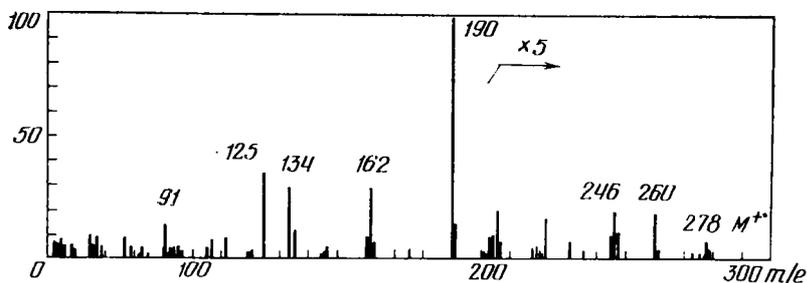


Рис. 5. Масс-спектр одного из компонентов вещества X после метилирования диазометаном, соответствующий масс-спектру метилового эфира АБК.

бавляли эквивалентное по объему количество диэтилового эфира. Эфирный слой после интенсивного встряхивания в течение 15—20 мин отбрасывали, очистку эфиром повторяли. Очищенный водный экстракт доводили до pH 2 (1 н. раствором HCl) и вещества кислот природы, включая АБК, экстрагировали эфиром (2 раза, соотношение эфир: водная фаза=1 : 1, по 30 мин при интенсивном перемешивании).

Эфирные экстракты объединяли, упаривали на роторном испарителе при слабом нагревании, в колбу добавляли 1 мл метанола, обмывали стенки и переносили полученный метанольный раствор автоматической пипеткой в герметично закрывающийся сосуд малого объема. Метанол упаривали в токе азота при слабом нагревании, сухой остаток растворяли в 60 мкл этилацетата (этилацетатный раствор).

Препаративная тонкослойная хроматография. На пластинки «Silufol UV-254» (ЧССР) размером 15x15 см, предварительно промытые метанолом, наносили этилацетатный раствор в виде полосы из расчета 1 см линии старта на 1 г сырой массы образца, взятого для анализа, а на каждую пластинку рядом с образцом также наносили стандарт АБК (3—5 мкг). Пластинки проявляли в системе толуол — этилацетат — уксусная кислота (40 : 5 : 2). Полосу сорбента с R_f 0,11 (контроль при УФ-освещении по нанесенному стандарту АБК) счищали с пластинки в сосуд с герметичной пробкой, добавляли 2 мл этилацетата и экстрагировали АБК с сорбента в течение 15—20 мин при энергичном встряхивании. Сорбент отделяли вакуум-фильтрацией на устройстве Vac Elut (фирма Jones Chromatography Ltd, Англия), слой на фильтре промывали 2 раза этилацетатом (по 1 мл). Объединенный фильтрат упаривали досуха в токе азота при незначительном нагревании (очищенный сухой образец).

ВЭЖХ проводили на оборудовании для жидкостной хроматографии высокого давления фирмы Biotronik ФРГ (насос ВТ 3020, УФ-детектор ВТ 3030). Образцы АБК и очищенные сухие образцы растворяли в

100 мкл подвижной фазы (полунасыщенный раствор битартрата калия в смеси метанол : вода = 6:4 (по объему) и анализировали на колонке 250x4,6 мм, заполненной сорбентом Partisil ODS 10 мкм при скорости подвижной фазы 1 мл/мин (проба 20 мкл). Для количественного определения АБК в образцах (время выхода в описанных условиях 5,1 мин) детектор настраивали на длину волны 254 нм. Для доказательства наличия АБК в экстракте ячменя детектор ВТ 3030 настраивали также на 230 и 280 нм.

УФ-спектроскопия. УФ-спектры снимали на двухлучевом спектрофотометре Спекорд М 40 (ГДР) при ширине оптической щели 0,02 мм и скорости сканирования 83 см⁻¹/с.

Хромато-масс-спектрометр и я. Вещество X препаративно собирали при проведении ВЭЖХ очищенных сухих образцов, экстрагировали из подвижной фазы эфиром (2 раза по 1 мл), который упаривали и добавляли свежеприготовленный раствор диазометана в эфире. Через 20 мин CH₂N₂ и диэтиловый эфир отгоняли, остаток растворяли в 20 мкл этилацетата, 8 мкл этого раствора вкалывали в хроматограф хромато-масс-спектрометра Hitachi M80B (Япония), снабженный стеклянной колонкой 3 м x 4 мм, заполненной 3 % SE 30 на Gas Crom Q (100—120 меш). Реализованы следующие параметры анализа: скорость газаносителя — гелия —15 мл в мин; температура инжектора 230 °С, сепаратора 250 °С; колонка прогревалась по программе 220° — 5 мин, далее до 250 °С со скоростью 20 °С в 1 мин. Масс-спектры снимали при ионизации молекул электронным ударом (энергия электронов 70 эВ).

Разработанная методика позволяет определять содержание АБК и в других злаковых культурах, в частности в пшенице. Однако при использовании ее для каждого нового объекта перед проведением массовых анализов требуется доказывать идентичность анализируемого вещества АБК, например с использованием масс-спектрометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений, т. 2. — М.: Мир, 1986, с. 246. — 2. Клинин Е. Н., Богданов В. А., Щелоков Р. Н., Кefeли В. И. АБК и ИУК в культуре корневых гороха. ГЖХ анализ и ХМС анализ. — Физиология растений, т. 30, вып. 1, с. 187—194. — 3. Чумаковский Н. Н. Высота стеблей и засухоустойчивость растений пшеницы в связи с содержанием АБК и этилена в листьях. — Физиология растений, 1986, т. 33, вып. 3, с. 518—525. — 4. Cина A. J., Brenner M. L., Broun W. — Plant Physiol., 1977, vol. 59, N 5, p. 821—826. — 5. Quinn G., Brummett D. L., Beier R. C. — Plant Physiol., 1986, vol. 81, N 4,

p. 997—1002. — 6. Kozukue N., Kozukue E., Tsay Lung-Ming, Sawano Minoru, Mizuno Susumu. — J. Chromatogr., 1984, vol. 287, N 1, p. 121—127. — 7. Netting A. C., Milborrow B. V., Diefeld A. M. — Phytochemistry, 1982, vol. 21, N 2, p. 385—389. — 8. Per-Christen O'den, Dunberg A. — Planta, 1984, vol. 161, N 2, p. 148—155. — 9. Sann-der s P. F. — In: Isolation of plant growth substansis, 1978, C. Y., p. 115—135. — 10. Sweetner P. B., Vatvars A. — Analyt. Biochem., 1976, vol. 71, N 1, p. 69—78.

Статья поступила 5 июня 1987 г.

SUMMARY

The technique of determining the abscisic acid content in barley above-ground portion with the use of highly efficient solution chromatography is developed. Quantitative measurments were performed by absolute calibration technique (sensitivity of technique — 5 ng per 1 g of dry weight, sample weight—10 g, variation coefficient in linear concentration range of 5—100 ng/g — 7 %), highly efficient solution chromatography — on a column filled with Partisil ODS sorbent, using semisaturated solution of potassium bitartrat (metanol: water = 6 : 4 — in volume) as a mobile phase.