

采用高效液相色谱技术分析烟草体内的维生素 B₆ 化合物

曾海彬¹, 张剑韵², 黄龙全^{1*}

(1. 安徽农业大学 茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学 生命科学学院, 合肥 230036)

摘要: 维生素 B₆(VB₆)是一类化合物的总称。近年来研究发现 VB₆ 在植物体内发挥抗逆作用。烟草作为模式植物其体内 VB₆ 的存在形态还未见报道。本研究采用高效液相色谱结合荧光检测技术对烟草体内 VB₆ 的存在形态进行了分析。结果表明:土壤栽培烟草叶、茎和根中 VB₆ 的含量依次为 2.9、1.7、3.0 μg/g 鲜重;组培烟草叶片的 VB₆ 含量为 3.9 μg/g 鲜重,构成比为磷酸吡哆胺(PMP)7%、吡哆胺(PM)14%、磷酸吡哆醛(PLP)19%、吡哆醛(PL)29%、吡哆醇(PN)30%;组培烟草在连续 3 周的检测过程中,PLP 和 PL 含量下降、PN 含量上升,VB₆ 总量保持相对稳定。研究结果有助于以烟草为材料,进一步开展植物体内 VB₆ 代谢机制和特殊生理机制的研究。

关键词: 烟草; 高效液相色谱; 维生素 B₆; 存在形态

中图分类号: Q945.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)05-0695-04

Analysis of vitamin B₆ vitamers in tobacco plants by high performance liquid chromatography

ZENG Hai-Bin¹, ZHANG Jian-Yun², HUANG Long-Quan^{1*}

(1. College of Tea and Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Vitamin B₆(VB₆) is the general term for a kind of chemical compounds. VB₆ exists in several forms, and has been linked to stress responses in plants. Until now no reports about the distribution of B₆ vitamers in tobacco plants have been observed. In our experiment, the determination of VB₆ vitamers in tobacco plants was described by using HPLC with fluorescence detector. The results indicated that, the contents of VB₆ in leaves, tender stem and roots were 2.9, 1.7 and 3.0 μg/g fresh weight, respectively. Leaves of tobacco plants grown on MS basal media exhibited a high content of 3.9 μg/g fresh weight. The constituent ratio of B₆ vitamers were as follows: pyridoxamine 5'-phosphate(PMP) 7%, pyridoxamine (PM) 14%, pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 19%, pyridoxal (PL) 29% and pyridoxine(PN) 30%. During the determination period of three weeks, the contents of PLP and PL decreased, and that of PN increased. The amount of VB₆ was relatively constant. Our results would be favorable for further study on the metabolic mechanism and special physiological mechanism in tobacco plants.

Key words: tobacco plants; high performance liquid chromatography; vitamin B₆; existing forms

维生素 B₆(VB₆)是一类吡啶化合物的总称,2-甲基-3-羟基-5-羟甲基吡啶是其共同的母体,吡啶环第四碳位被羟甲基、氨甲基、甲酰基取代后分别形成吡

哆醇(pyridoxine, PN)、吡哆胺(pyridoxine, PM)和吡哆醛(pyridoxal, PL),三者相应磷酸酯型为磷酸吡哆醇(pyridoxine 5'-phosphate, PNP)、磷酸吡哆胺(pyri-

收稿日期: 2010-10-25 修回日期: 2011-03-07

基金项目: 安徽省自然科学基金重点项目(KJ2010A116)[Support by Key Research Projects of Natural Science of Anhui Province(KJ2010A116)]

作者简介: 曾海彬(1985-),男,湖北孝感人,硕士研究生,从事烟草 VB₆ 代谢方面的研究。(E-mail)zenghaibinbin@126.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: lqhuang218@yahoo.com.cn)

doxine 5'-phosphate, PMP) 和磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP), 其中 PLP 是 VB₆ 的主要辅酶形式, 参与氨基酸代谢的各种反应和其它多种代谢过程。近年研究发现 VB₆ 还是一种很强的生物抗氧化剂, 可有效淬灭单线态氧分子和超氧化物负离子 (Bil-ski 等, 2000); PLP 或其同系物作为细胞信号传导的调节分子, 对一些细胞膜上的离子通道具有调节作用 (Ehrenshaft 等, 1998, 1999); PLP 可保护植物免受高盐、紫外线、渗透压等环境胁迫因子的影响 (Sakai 等, 2002)。微生物和植物拥有 VB₆ 从头合成途径 (de novo pathway), 动物从食物中获取 VB₆, 通过补救途径 (salvage pathway) 合成 PLP。

虽然植物是自然界 VB₆ 的主要制造者, 但植物体内 VB₆ 的研究开展较晚, VB₆ 代谢机制和特殊生理机制还有待研究。烟草作为一种模式植物, 也成为 VB₆ 研究的实验材料。2005 年 Denslow 等率先从烟草克隆出编码 PLP 合成酶的 PDX1 和 PDX2 基因, 还发现烟草遭遇病原体侵染后体内的 VB₆ 含量增加 (Sakai 等, 2005)。另一方面, 烟草体内 VB₆ 的存在形态还未见报道。本文通过高氯酸法提取 VB₆, 采用高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 分离和荧光检测技术分析烟草根、茎、叶组织中 VB₆ 的存在形态和主要存在型的含量变化, 为进一步以烟草为材料, 研究植物体内 VB₆ 代谢机制和特殊生理机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

烟草品种为云烟 21。盐酸吡哆醇 (PN-HCl)、盐酸吡哆醛 (PL-HCl)、盐酸吡哆胺 (PM-2HCl)、磷酸吡哆胺盐酸盐 (PMP-HCl) 和 PLP 购于美国 Sigma 公司。高氯酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸和 MS 培养基的构成试剂 2, 4-D、6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA)、萘乙酸 (NAA)、蔗糖、琼脂粉等均为国产分析纯。乙腈采用 HPLC 级, 水为超纯净水。

1.2 烟草植物的栽培

采用组培的方式培育烟草幼苗。愈伤组织诱导培养基、幼芽增殖培养基、生根培养基分别为: MS+2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L、MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L、MS+NAA 0.2 mg/L。上述培养基均添加 3% 蔗糖和 0.8% 琼脂, pH5.8。培养温度 (25±2) °C, 光照 14 h/d, 光照强度 36

μmol·m⁻²·s⁻¹ (施和平等, 2003)。

取烟草幼嫩叶片用自来水充分洗净, 经 75% 酒精消毒 30 s、0.1% 升汞溶液浸泡 8 min、无菌水冲洗 5~6 次后, 将叶片切成 1.0~1.5 cm² 的小方块转接到愈伤组织诱导培养基中。10 d 后, 叶片外植体卷曲、增厚、膨胀, 20 d 后外植体脱分化形成疏松絮状浅黄绿色的愈伤组织, 30 d 后从叶片外植体产生的疏松愈伤组织上分化出许多浅黄绿色芽点。将带芽点的愈伤组织转接到幼芽增殖培养基上培养 25 d 后, 从愈伤组织上分化出幼芽; 当芽长为 2~3 cm 时切取幼芽转接至生根培养基上, 继续培养 35 d 长出约 2 cm 的根。将茎高约 5 cm 的幼苗转移至不含 PN 的 MS 培养基和营养土泥炭藓: 蛭石: 珍珠岩 = 1: 1: 1 上开始实验。试验时间为 3 周, 每隔 7 d 抽样分析烟草体内的 VB₆。

1.3 VB₆ 的 HPLC 分析方法

参照张剑韵等 (2004) 的方法, 加以改进。精确称取 VB₆ 标准品: PMP 1.4 mg, PM 1.4 mg, PLP 14.1 mg, PL 1.6 mg, PN 1.7 mg; 用不含乙腈的流动相 A 溶解定容 50 mL 后稀释成各级使用浓度。称取 0.5 g 样品用液氮充分研磨后转入 5 mL 离心管, 按 1/3 的比例加入 1 mol/L 的高氯酸后涡旋, 离心 (8 000 r/min, 4 °C) 20 min 去除蛋白质; 取上清加入等体积的 1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH5.5) 后再次离心 (8 000 r/min, 4 °C) 10 min 去盐。所得上清经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用于 HPLC 分析。为避免 VB₆ 的光分解, 以上操作均在暗室中进行。

分析装置为 Waters 600 高效液相色谱仪, 配有 2475 荧光检测仪。色谱柱为 H & E 公司的 XP ODS-A 5 μm 120 A (250×4.6 mm), 柱温保持 30 °C。流动相 A (分析用): 1% (V/V) CH₃CN-25 mmol/L KH₂PO₄-25 mmol/L NaClO₄ (pH2.5); 流动 B (色谱柱清洗用): 10% (V/V) CH₃CN-25 mmol/L KH₂PO₄-25 mmol/L NaClO₄ (pH2.5); 流速均为 0.5 mL/min。荧光检测器调整激发波长 290 nm, 荧光波长 395 nm。进样量均为 5 μL。

2 结果与分析

2.1 设定条件下标准 VB₆ 化合物的检出

在所述的 HPLC 装置和分析条件下, 标准 VB₆ 化合物的保留时间依次为: PMP 6.0 min、PM 7.3 min、PLP 12.2 min、PL 16.4 min 和 PN 24.9 min

(图 1)。配制系列浓度的 5 种 VB₆ 标品混合液, 分别以峰面积为横坐标、注入量为纵坐标计算回归方程, 相关系数分别为: PMP 0.9998、PM 0.9995、PLP 0.9997、PL 0.9995、PN 0.9995, 可作为定量分析的依据(图 2)。VB₆ 各型的最低检测量分别为 PMP 2.9×10^{-4} ng/ μ L、PM 1.3×10^{-4} ng/ μ L、PL 6.5×10^{-3} ng/ μ L、PN 2.0×10^{-3} ng/ μ L 和 PLP 4.3×10^{-2} ng/ μ L。VB₆ 化合物 5 种形式的保留时间相对标准偏差为 0.01%~0.3%; 峰面积的相对偏差为 0.37%~2.95%。重现性和稳定性良好。取已知含量的烟草样品 3 份, 分别加入 VB₆ 五种形式标准品的混合液, 每个添加水平测 3 次, 根据样品含量和加标后测定值计算加标回收率, VB₆ 五种形式的回收率范围分别为: PMP 87%~112%、PM 89%~115%、PLP 107%~118%、PL 95~107%、PN 100%~103% 之间, 回收率最高为 118%, 最低为 87%, 表明此方法能较好地分析 VB₆。

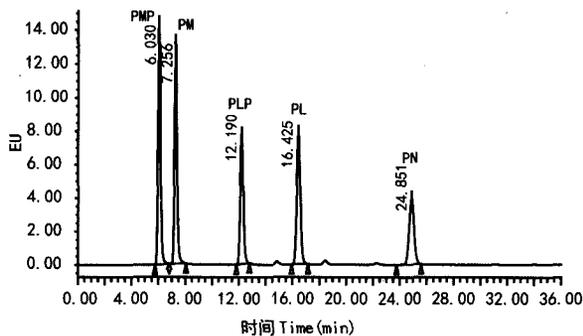


图 1 标准维生素 B₆ 化合物的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC pattern of standard VB₆ compounds

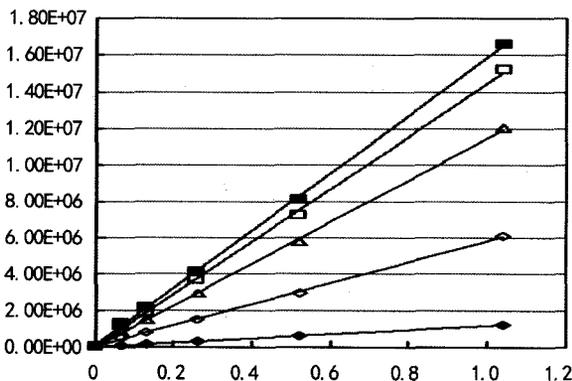


图 2 标准维生素 B₆ 化合物检量线
Fig. 2 Standard curves for determination of each B₆ vitamers

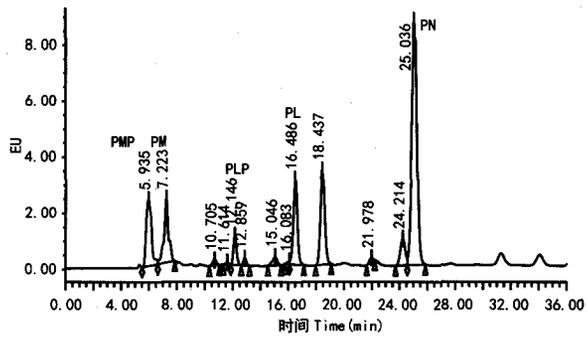


图 3 烟草叶片组织 VB₆ 提取液的 HPLC 图谱
Fig. 3 HPLC pattern of VB₆ extract from tobacco leaves

2.2 采用所述方法对烟草植物组织的分析结果

烟草叶片组织 VB₆ 提取液经 HPLC 分析, 在 PMP、PM、PLP、PL 和 PN 的洗脱位置上均出现了相应的洗脱峰(图 3)。在烟草叶片组织 VB₆ 提取液中加入标准 VB₆ 化合物后, 无论是否改变分析条件, 洗脱峰均未出现分离, 可以认为所检出的物质确实是相应的 VB₆ 化合物。此外, 整个检测过程没有出现明显的干扰物质。

表 1 为烟草不同组织 VB₆ 化合物 HPLC 定量分析结果。烟草叶片组织中的 VB₆ 的平均值为 $(3.0 \pm 0.4) \mu\text{g/g}$ FW; 构成为 PMP 7%、PM 14%、PLP 19%、PL 29%、PN 30%; 其中 PLP、PL 和 PN 为 VB₆ 的主要存在型。烟草不同部位 VB₆ 的含量依次为根>叶>茎。实验还发现生长在 MS 培养基上烟草的 VB₆ 含量高于种植在土壤中的同龄植株。

因为 PLP、PL 和 PN 是烟草 VB₆ 的主要存在型, 连续 3 周对生长在 MS 培养基上烟草叶片组织中的 PLP、PL 和 PN 含量进行了测定, 结果发现在连续 3 周的检测过程中, 叶片组织中的 PLP 和 PL 含量下降, PN 含量上升, VB₆ 总量基本稳定(表 2)。

3 讨论

高效液相色谱结合荧光检测器检测是分析生物体内 VB₆ 存在形态的有效方法, 具有灵敏度高、选择性强、重复性好和分析速度高的优点, 但在检测时间段内干扰峰的出现仍然是难以解决的问题。一般来说, 植物材料检测时出现的干扰峰多于动物材料, 以致许多植物难以采用 HPLC 对其 VB₆ 的存在形

态进行分析。从烟草植物组织 VB₆ 提取液的 HPLC 分析结果来看,没有出现明确的干扰峰,所分析的 5 种 VB₆ 化合物都能分别定量,结果表示烟草可作为试验模型,用以开展植物体内 VB₆ 代谢机制和特殊生理机制的研究。

食品材料中 VB₆ 的定量目前仍然采用微生物法,该方法虽然不能对不同 VB₆ 进行分别定量,但检测过程中干扰因素少,仍具有权威性。采用 HPLC 方法测得烟草叶片组织中的 VB₆ 含量为 (3.0±0.4) μg/g FW,与多数蔬菜植物的 VB₆ 含量

表 1 烟草叶片等组织维生素 B₆ 化合物含量的 HPLC 分析

Table 1 VB₆ contents determined by HPLC in tobacco plants (μg/g fresh weight)

样品 Sample	PMP	PM	PLP	PL	PN	总量 Total amounts
叶 Leaf*	0.40±0.01	0.49±0.11	0.87±0.08	0.63±0.04	0.64±0.04	2.91±0.14
茎 Stem*	0.17±0.02	0.30±0.28	0.43±0.11	0.31±0.05	0.45±0.08	1.67±0.27
根 Root*	0.17±0.03	0.67±0.31	0.60±0.09	0.39±0.05	1.21±0.01	3.04±0.26
叶 Leaf**	0.28±0.04	0.56±0.07	0.74±0.20	1.13±0.08	1.17±0.03	3.90±0.05

注: *土壤栽培; **组织培养。* Grown in soil; ** Grown on MS basal media.

表 2 烟草叶片组织中 PLP、PL、PN 和 VB₆ 总量的变化

Table 2 Changes of PLP, PL, PN and VB₆ total contents in tobacco leaves (μg/g fresh weight)

分析 Determination	PLP	PL	PN	VB ₆ 总量 Total amounts
第一周 First week	0.74±0.19	1.14±0.08	1.18±0.03	3.89±0.05
第二周 Second week	0.68±0.28	1.07±0.02	1.25±0.13	3.82±0.52
第三周 Third week	0.33±0.05	0.53±0.26	1.81±0.24	3.39±0.48

接近(孙远明等,2002)。温其标(1997)的研究结果发现小麦、大麦、玉米、小米和高粱等谷物中所含 VB₆ 的主要形式是游离吡哆醇和吡哆醇葡萄糖苷, PLP 和 PMP 含量甚微,其中小麦和小米的 VB₆ 含量为 3.0 mg/kg,高粱只有 0.5 mg/kg;另外,大麦中 PN 的比例达到了 85%,其他谷物中则以生理活性小的吡哆醇葡萄糖苷为主(比 VB₆ 的非糖苷形式较难被人体吸收利用)。吕岱竹等(2008)对热带水果中 VB₆ 的含量进行分析,结果在龙眼和莲雾中未检测出 VB₆。

目前已经明确细菌首先合成 PNP,在 PNP/PMP 氧化酶的作用下,PNP 进一步被氧化成 PLP (Notheis 等,1995;Zhao 等,1995)。植物和真菌相类似,拥有直接合成 PLP 的酶系(Ehrenshaft 等,1999)。PLP 含有强活泼性的醛基,极易和细胞中的亲核物质和蛋白质形成复合体。因此,生物体体内游离存在的 PLP 一般维持在一个较低的水平,过量生成的 PLP 受磷酸酶的作用迅速水解为 PL,PL 受 PL 还原酶的作用可以转变为 PN(Mitsuhiro 等,1999)。实验所观察到的叶片组织中 PLP、PL 和 PN 含量的变化,可能反映了烟草体内 VB₆ 的主体代谢流向。

由于 PNP 无标准品出售,本文未对烟草植物组

织中的 PNP 进行分析。在我们的早期研究中,采用相同的 HPLC 方法,由 PLP 衍生化得到的 PNP 的洗脱位置在 PM 和 PLP 之间(张剑韵等,2004)。在整个烟草组织 VB₆ 的 HPLC 分析过程中,PM 和 PLP 位置之间始终没有出现有意义的洗脱峰。因此,可以认为烟草体内的 PNP 含量很低。

参考文献:

- 孙远明,余群力. 2002. 食品营养学[M]. 中国农业大学出版社:84-86
- Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, et al. 2000. Vitamin B₆ (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants[J]. *Photochem Photobiol*, **71**:129-134
- Ehrenshaft M, Daub ME. 2001. Isolation of *pdx2*, a second novel gene in the pyridoxine biosynthesis pathway of eukaryotes, archaeobacteria, and a subset of eubacteria[J]. *J Bacteriol*, **183**:3 383-3 390
- Ehrenshaft M, Jenns AE, Chung KR, et al. 1998. *Sor1*, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora fungi* is highly conserved in divergent organisms[J]. *Mol Cell*, **1**:603-609
- Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, et al. 1999. A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B₆ biosynthesis[J]. *Dokl Biochem*, **96**:9 374-9 378
- Ehrenshaft M, Chung KR, Jenns AE, et al. 1999. Functional characterization of *sor1*, a gene required for resistance to photosensitizing toxins in the fungus *Cercospora nicotianae*[J]. *Curr Genet*, (下转第 710 页 Continue on page 710)

明多种疾病的发生和发展与自由基对组织细胞的损伤关系密切,本文也为进一步对其小叶红叶藤挥发油进行抗衰老、抗老年痴呆等老年退行性疾病相关药理作用的研究奠定基础,其抗氧化机理有待进一步研究。

参考文献:

- 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 1999. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社:2 922
- 国家药典委员会. 2010. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社:63
- Erich S, Leopold J, Gerhard B, et al. 2006. Composition and antioxidant activities of the essential oil of *Cinnamon*(*Cinnamomum zeylanicum*)leaves from Sri Lanka[J]. *Jeop*, **9**(2):170-182
- éva SB, Mária HT, Attila H, et al. 2003. Antioxidant effect of various rosemary(*Rosmarinus officinalis*) clones[J]. *Acta Biologica Szegediensis*, **47**(1-4):111-113
- Kim D, Lee KW, Lee HJ, et al. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity(Vc EAC) of phenolic phytochemicals[J]. *J Agric Food Chem*, **50**(13):3 713-3 717
- Kong L(孔磊), Zhang KM(张科明), Jiang JQ(蒋建勤). 2009.

- Chemical constituents from *Rourea microphylla*(小叶红叶藤的化学成分)[J]. *Pharm Clin Res*(药学与临床研究), **17**(1):34-36
- Liang CY(梁呈元), Li WL(李维林), Zhang H(张涵), et al. 2003. The advance on the research of chemical constituents and pharmacological activities of *Mentha haplocalyx*(薄荷化学成分及其药理作用研究进展)[J]. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源), **22**(3):9-12
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. *Jpn J Nutr*, **44**:307-315
- Re R, Pellegrini N, Anna PA. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radical Biol Med*, **26**(9/10):1 231-1 237
- Syed AR, Azizur R, Ahmad A, et al. 2009. Comparison of antioxidant activity of essential oil of *Centella asiatica* and *Butylated hydroxyanisole* in sunflower oil at ambient conditions[J]. *Biharean Biologist*, **3**(1):71-75
- Yang Y(杨洋), Wei XY(韦小英), Ruan Z(阮征). 2002. Development of natural food antioxidant research at home and abroad(国内外天然食品抗氧化剂的研究进展)[J]. *Food Sci*(食品科学), **23**(10):137-140

(上接第 698 页 Continue from page 698)

- 34**:478-485
- Lü DZ(吕岱竹), Yan XP(闫新萍). 2008. Determination of vitamin B₆ in tropical fruit by high performance liquid chromatography with fluorescence detection(高效液相色谱法测热带水果中 VB₆)[J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), **29**(5):668-671
- Mitsuhiro N, Tomotake M, Tomokazu Y, et al. 1999. Purification, molecular cloning, and catalytic activity of schizosaccharomyces pombe pyridoxal reductase[J]. *JBC*, **33**:23 185-23 190
- Notheis C, Drewke C, Leistner E. 1995. Purification and characterization of the pyridoxol-5'-phosphate: pyridoxol-5'-phosphate: oxygen oxidoreductase from *Escherichia coli* [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, **1247**:265-271
- Sakai A, Kita M, Katsuragi T, et al. 2002. Yaad and yaae are involved in vitamin B₆ biosynthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *J Biosci*, **93**:309-312
- Sakai A, Denslow, Amanda A, et al. 2005. Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B₆ during plant defense responses[J]. *PMPP*, **66**:244-255
- She HP(施和平), Huang QP(黄群声). 2003. Tissue culture and plantlet regeneration from leaves of *Nicotiana tabacum*(烟草叶片组织培养及植株再生)[J]. *Subtrop Plant Sci*(亚热带植物科学), **32**:63
- Wen QB(温其标). 1997. Analysis of B₆ vitamers in cereals by high performance liquid chromatography(应用高效液相色谱技术分析谷物中的 VB₆)[J]. *J South Univ Tech*(华南理工大学学报), **25**(11):99-102
- Zhang JY(张剑韵), Huang LQ(黄龙全), HAYAKAWA Takashi(早川孝志). et al. 2004. Analysis of vitamin B₆ derivatives in biological samples with high performance liquid chromatography(采用高效液相色谱技术分析生物体内维生素 B₆ 化合物)[J]. *Chem J Chin Univ*(高等学校化学学报), **25**:638-640
- Zhao G, Winkler ME. 1995. Kinetic limitation and cellular amount of pyridoxine(pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase of *Escherichia coli* k-12[J]. *J Bacteriol*, **177**:883-891