

豌豆光系统 I 中脂类物质的分离及反相高效液相色谱分析

姚洪军¹ 石玉杰² 徐秉玖² 高荣孚¹

(1 北京林业大学林木花卉遗传育种教育部重点实验室 2 北京大学药学院)

摘要:为进一步探讨脂类物质在类囊体膜及其蛋白复合物中的分布及作用,该研究提取了经 DOC-PAGE 分离的豌豆光系统 I 中的脂类物质,采用 RP-HPLC-UV 梯度洗脱分析方法,以乙腈与水为流动相组成,在 25 min 内进行了较好的分离. 所得的色谱图基线平稳、分离度高. RP-HPLC-UV 分析图上有 6 个主要色谱峰,通过所对应的紫外吸收光谱图,确认它们均属于脂类化合物.

关键词: 类囊体膜, 蛋白复合物, 脂, 反相高效液相色谱

中图分类号: Q945.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1522(2006)05-0095-04

YAO Hong-jun¹; SHI Yu-jie²; XU Bing-jiu²; GAO Rong-fu¹. **Isolation of lipids from photosystem I complex in *Pisum sativum* L. and its characterization with RP-HPLC.** *Journal of Beijing Forestry University* (2006)28(5) 95-98 [Ch, 17 ref.]

¹ Key Laboratory for Genetic and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Beijing Forestry University, 100083, P.R. China;

² School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing, 100083, P.R. China.

In order to discuss the distribution and function of lipids in thylakoid membranes and its protein complex, lipids were extracted from photosystem I separated by DOC-PAGE from thylakoid membranes in the leaves of *Pisum sativum* L. An RP-HPLC-UV method with gradient elution was established for the separation of lipids obtained from thylakoid membranes, and baseline separation of the sample components could be realized in 25 min with this method. From the UV spectrum extracted from the DAD 3D graph, the main components separated in HPLC can be characterized preliminarily as lipids.

Key words thylakoid membrane, protein complex, lipids, RP-HPLC

高等植物中进行光合作用的光合膜(类囊体膜)具有独特的膜脂组成^[1]. 一般动物细胞膜脂的主要成分为磷脂,而植物类囊体膜脂主要由糖脂组成,仅含少量的磷脂. 在植物类囊体膜的糖脂中主要成分为单半乳糖甘油二酯(MGDG),其次为双半乳糖甘油二酯(DGDG)和硫代异鼠李糖甘油二酯(SQDG),在类囊体膜的磷脂中含量最多的是磷脂酰甘油(PG),而磷脂酰胆碱(PC)含量较少^[2],几种类囊体膜脂的结构见图 1.

近年来对于脂类物质的研究逐步展开,在磷脂分析方面,建立了大量的薄层色谱(TLC)和高效液相色谱(HPLC)的分析方法^[3-9]. 反相色谱柱 HPLC

法用于对磷脂的分离,已经被学者广泛采纳并逐步取代了 TLC^[10]. HPLC 法用于糖脂的分离研究较少. Christie 等^[11-14]尝试了糖脂 HPLC 分离的方法并对其进行了系统的研究. 目前,色谱柱利用 ODS 柱,流动相采用甲醇、乙腈、水的混合洗脱系统的 HPLC 法已经成为未知样品中脂类物质分离和定性的最有效方法. 但应用反相-HPLC 技术对植物类囊体膜脂的研究报道较少. 本文提取经 DOC-PAGE 分离的类囊体膜蛋白中的脂类物质,通过大量的试验研究,初步建立了类囊体膜脂的反相-HPLC 分析方法,为深入研究膜脂在类囊体膜蛋白复合物形成过程中的作用,以及膜脂在膜蛋白和类囊体膜中的分布提供有效方法.

收稿日期:2005-05-22

http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(20175001).

第一作者:姚洪军,博士,讲师. 主要研究方向:光合生理. 电话:010-62338013 Email:hongjuny@bjfu.edu.cn 地址:100083 北京林业大学生物科学与技术学院.

责任作者:高荣孚,教授. 主要研究方向:光合生理. 电话:010-62338013 Email:Gaof@bjfu.edu.cn 地址:同上.

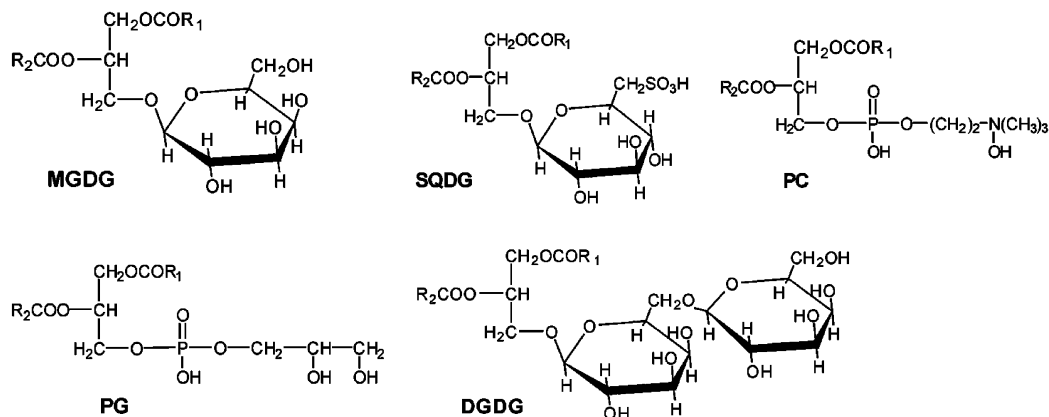


图1 类囊体膜中的脂类物质的结构

FIGURE 1 Structure of lipids of thylakoid membranes

1 材料与方法

1.1 材料

豌豆 (*Pisum sativum* L.) 水培于温室, 摘取其生长 20 d 的新鲜成熟叶片, 冲洗干净, 去表面水之后置 4℃ 冰箱中预冷待用。

1.2 方法

1.2.1 脂类物质提取材料的制备

类囊体膜的提取按照高荣孚等^[15]的方法。膜蛋白复合物的制备和 DOC-PAGE 分离按照郑彩霞等的方法^[16]。

1.2.2 类脂的提取

按照 Bligh 等^[17]的方法进行少量修改。准确切取 5 倍洋地黄皂苷处理的绿色 DOC-PAGE 分离条带, 切碎, 放入 4 mL 水中, 加入 15 mL V(氯仿): V(甲醇) 为 1:2 的混合液。充分混匀后放置 30 min, 然后加入 5 mL 氯仿混匀, 继续提取 1 min, 加入 5 mL 水继续混匀 1 min。过滤, 滤液萃取分离, 弃去上相, 收集下相。过滤后的胶粒重复以上操作。将两次萃取所得的下相合并, 用 0.45 μm 的有机滤膜过滤, 滤液用氮气吹干。加入 3 mL 乙醚溶解, 用 0.45 μm 的有机滤膜过滤, 滤液用氮气吹干, 于 -20℃ 贮存。临用前, 用甲醇适量溶解, 用 0.45 μm 的有机滤膜过滤后即可进样。

1.2.3 类脂 RP-HPLC 色谱条件的筛选

1.2.3.1 紫外检测波长的选择

仪器选用 Agilent Series HP1100 型高效液相色谱仪和 Waters 反相 C18 色谱柱。根据文献中脂类物质的紫外吸收特性, 选择 205 nm 为检测波长。

1.2.3.2 溶剂系统的选择

根据 Bradley 等^[5-9]方法, 初步选择甲醇与水组成的二元溶剂系统。按下述的色谱条件, 对类脂样品进行 HPLC 等度洗脱, 根据分离结果调整流动相组成, 筛选溶剂系统。流动相: 体积比为 95:5 或 99:1 的甲醇与水混合溶剂系统, 流速: 1.0 mL/min; 检测

波长: 205 nm; 柱温: 室温 (25±3)℃; 进样体积: 10 μL。

分别采用不同梯度的甲醇与水混合溶剂系统, 进行 HPLC 梯度洗脱, 共尝试了 5 种甲醇(A)与水(B)组成的梯度如下:

90%A (5%/3 min) → 95%A (3→10 min) (梯度 1)

90%A (5%/5 min) → 95%A (5→15 min) (梯度 2)

90%A (5%/10 min) → 95%A (10→20 min) (梯度 3)

85%A (10%/10 min) → 95%A (10→20 min) (梯度 4)

80%A (15%/10 min) → 95%A (10→20 min) (梯度 5)

其他的色谱条件同上, 流动相选用乙腈(C)与水组成的溶剂系统, 进行梯度洗脱, 根据上一步梯度洗脱的结果, 进一步设置下一步的试验方案, 共尝试了 4 种梯度系统。

80%C (15%/10 min) → 95%C (10→20 min) (梯度 6)

50%C (45%/10 min) → 95%C (10→25 min) (梯度 7)

65%C (30%/10 min) → 95%C (10→25 min) (梯度 8)

5%C (60%/8 min) → 65%C (30%/7 min) → 95%C (15→25 min) (梯度 9)。

各梯度下流动相流速均为 1.0 mL/min。

2 结果与分析

2.1 甲醇与水的等度洗脱

甲醇与水(体积比为 95:5)等度洗脱结果见图 2, 由图可知样品的流出时间较快, 但分离不好。其他色谱条件不变, 将流动相改为体积比为 99:1 的甲醇与水混合溶剂, 进行 HPLC 等度洗脱, 分离没有改善。由于类囊体膜蛋白中脂类物质的组分复杂, 是一个极性范围较宽的混合物, 采用等度洗脱体系很难将其各个组分完全分离。为了提高分离效果, 在后

面的试验中将采用梯度洗脱系统进行分离.

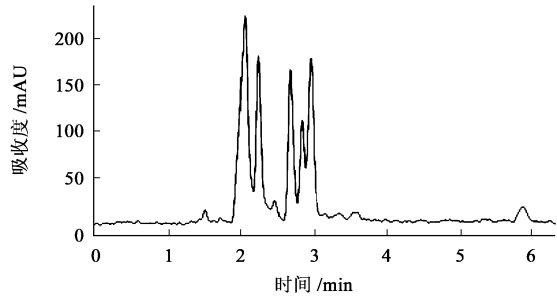


图 2 甲醇与水(体积比为 95:5)等度洗脱 HPLC-UV 图
FIGURE 2 RP-HPLC spectrum of lipids eluted by methanol and water

2.2 甲醇与水的梯度洗脱系统

以甲醇与水组成的二元溶剂系统,按照梯度 1~5 进行色谱试验,结果梯度 1 脂类物质的出峰时间集中在 4 min 之内,比较紧凑,但没有分开,原因可能是梯度设置中将甲醇的含量在 3 min 内由 90% 变到 95%,变化太快. 梯度 2 中将甲醇的含量由 90%变到 95%的梯度时间调整为 5 min,完成整个分离的时间也增长为 15 min,类脂的分离得到改善,但是基线漂移比较严重. 继续调整梯度及变化的时间,直至在梯度 5 中调低甲醇含量的起点至 80%,梯度为在 10 min 内甲醇的含量由 80%变化至 95%,其结果由图 3 可知,分离效果得到明显改善,几种主要的类脂均得到了分离,但是基线漂移仍然严重.

由以上的分离结果可以看出,用甲醇与水的梯度洗脱可以分离我们获得的脂类物质,但是基线严重漂移,原因可能是由于甲醇在紫外区域吸收的影响. 因此在下面的试验中尝试用紫外吸收较弱的乙

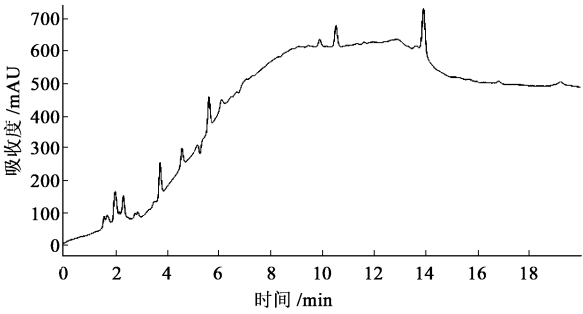
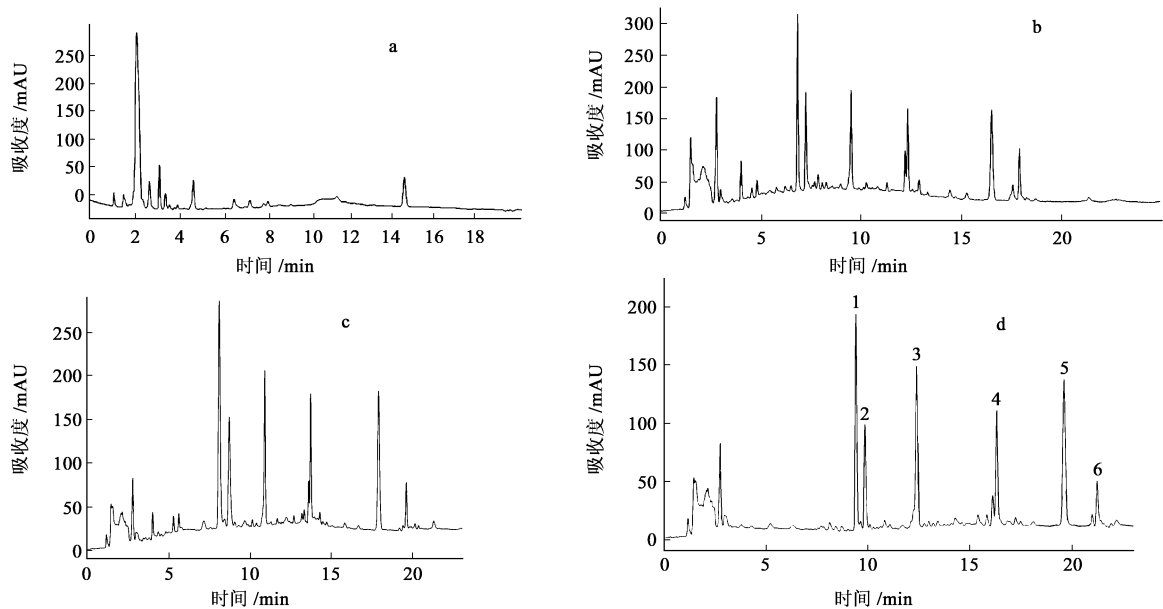


图 3 甲醇与水梯度 5 HPLC-UV 图
FIGURE 3 RP-HPLC spectrum of lipids eluted by methanol and water gradient 5

腈与水梯度洗脱系统进行优化分离.

2.3 乙腈与水的梯度洗脱系统

以乙腈与水组成的二元溶剂系统,按照 6~9 的梯度进行色谱试验,结果见图 4a~d. 由图 4a 可知在色谱图的前半部分,出峰时间比较集中,为多种不同的极性脂类物质,分离结果不理想,但是基线与甲醇-水溶剂系统相比有较大改善,比较平稳. 在此基础上继续调整梯度变化的起点,以改善分离效果. 在梯度 7 中,将乙腈的含量在 10 min 内由 80%变到 95%,调整为由 50%变化到 95%,而且分离总体时间延长为 25 min,分离结果见图 4b,由图可知,分离得到改善,多种脂类得到较好的分离,但是基线与图 4a 相比,变的不稳定,可能是由于梯度的变化太陡的缘故. 因此在梯度 8 中,将乙腈的含量在 10 min 内由 50%变到 95%,调整为由 65%变化到 95%,分离结果见图 4c,由图可知,基线得到了改善,变得趋于平稳,几种主要脂类的出峰时间后移,分离效果得



a~d 分别为水梯度 6~9

图 4 乙腈与水梯度 HPLC-UV 图

FIGURE 4 RP-HPLC spectrum of lipids eluted by acetonitrile and water gradient

到改善. 继续调整梯度, 按照梯度 9 所设计的变化, 将乙腈的含量先在 8 min 内由 5% 变到 65%, 再在 7 min 内由 65% 调整到 95%, 而总分离时间仍为 25 min, 分离结果见图 4d, 由图可知, 几种主要的脂类都得到了很好的分离, 出峰时间分别为 9.52、12.52、16.48、19.63 和 21.21 min, 而且, 色谱图的基线平稳, 分离效果比较理想.

对于图 4d 中 1~6 号色谱峰, 由 DAD 检测器给出的谱图中提取其紫外吸收光谱图, 将这些紫外图谱与文献中脂类的图谱做比较, 可以看出其紫外吸收图谱均属于脂类化合物. 对于各个色谱峰的归属我们进一步用液相色谱-质谱联用技术进行了鉴定.

3 结 论

甲醇与水组成的二元溶剂系统等度洗脱不能实现类囊体膜蛋白复合物中提取的脂类物质的有效分离. 而在改变甲醇与水的梯度后分离度较好, 但是基线严重漂移. 因此甲醇与水系统不适合类囊体膜脂类物质的分离. 当采用乙腈与水的梯度洗脱系统时, 分离的效果和基线都得到了极大的改善.

本研究提取了经 DOC-PAGE 分离的豌豆苗叶片光系统 I 中的类脂, 经过大量的研究确定了其 HPLC 分离的最佳流动相组成为乙腈与水的二元梯度系统, 初步建立了类囊体膜脂的 RP-HPLC-UV 梯度洗脱分析方法, 所提取的脂类物质在 25 min 内得到了较好的分离. 在这个色谱条件下, 在所得的 RP-HPLC-UV 分析图上有 6 个主要色谱峰, 通过它们所对应的紫外吸收光谱图可知, 这 6 个色谱峰均属于脂类化合物. 这个方法为进一步研究脂在类囊体膜中的分布以及脂在类囊体膜蛋白中的作用奠定了良好的技术基础.

致谢 本研究得到北京林业大学教育振兴人才培养计划专题(200302014)资助, 特致谢忱.

参 考 文 献

- [1] MELO N, TAVARES R M, MORAIS F, *et al.* Lipid composition of thylakoid membranes from leaves and regreened spathes of *Zantedeschia aethiopica* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(5): 1 367-1 371.
- [2] MURATA N, HIGASHI S I, FUJIMURA Y. Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplast[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1990, 1 019(3): 261-268.
- [3] BRANEN J K, SHINTANI D K, ENGESETH N J, *et al.* Expression of antisense acyl carrier protein⁻⁴ reduces lipid content in arabidopsis leaf tissue[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 748-756.
- [4] 王智华, 卢学清, 洪敬坤. 反相离子对高效液相色谱法分离不同种类的磷脂酰胆碱[J]. *色谱*, 2002, 20(3): 249-252.
- WANG Z H, LU X Q, HONG X K. Separation of different phosphatidylcholines by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2002, 20(3): 249-252.
- [5] BRADLEY J S, JENNIFER H, PATRICK A, *et al.* Quantification of major classes of xenopus phospholipids by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *Journal of Lipid Research*, 2000, 41(9): 1 448-1 454.
- [6] GRUNEWALD K, HIRSCHBERG J, HAGEN C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(8): 6 023-6 029.
- [7] 夏海涛, 安红, 刘郁芬, 等. 大豆磷脂的高效液相色谱分析 [J]. *分析化学*, 2001, 29(9): 1 046-1 048.
- XIA H T, AN H, LIU Y F, *et al.* Analysis of soybean phospholipids by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 29(9): 1 046-1 048.
- [8] HETTEL H, DERMANN P, BENNING C. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in arabidopsis [J]. *PNAS*, 2000, 97(9): 10 649-10 654.
- [9] 刘静, 宋航, 付超, 等. 卵磷脂中 PE 及不同种类 PC 的高效液相色谱分析 [J]. *化学研究与应用*, 2005, 17(1): 134-136.
- LIU J, SONG H, FU C, *et al.* Analysis of phosphatidylethanolamine and different phosphatidylcholines in the lecithin by HPLC [J]. *Chemical Research and Application*, 2005, 17(1): 134-136.
- [10] GARGANO L, RESCIGNO A A, NORDBACK J, *et al.* Separation of lipid classes from marine particulate material by HPLC on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase using dual-channel evaporative light-scattering detection [J]. *Marine Chemistry*, 1998, 60(3): 165-175.
- [11] CHRISTIE W W, MORRISON W R. Separation of complex lipids of cereals by high-performance liquid chromatography with mass detection [J]. *Journal of Chromatography*, 1988, 436(3): 510-513.
- [12] CONFORTI F D, HARRIS C H, RINEHART J T. HPLC analysis of wheat flour lipids using an evaporative light-scattering detector [J]. *Journal of Chromatography*, 1993, 645(1): 83-88.
- [13] XUE C H, HU Y Q, HIROAKI S. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis* [J]. *Food Chemistry*, 2002, 77(1): 9-13.
- [14] 杨勤萍, 徐国梁, 施邑屏, 等. 高效液相色谱及薄层色谱分析蔗糖脂肪酯 [J]. *分析测试学报*, 1999, 18(1): 28-30.
- YANG Q P, XU G L, SHI Y P, *et al.* Determination of sucrose fatty acid esters by HPLC and TLC [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 1999, 18(1): 28-30.
- [15] 高荣孚, 郑彩霞, 童年, 等. 高等植物光系统 I 的研究 (I)——叶绿体中存在两种光系统 I [J]. *北京林业大学学报*, 1999, 19(1): 13-20.
- GAO R F, ZHENG C X, TONG N, *et al.* Photosystem I of high plant (I): Two populations of PSI in chloroplasts [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 1999, 19(1): 13-20.
- [16] 郑彩霞, 高荣孚. 高等植物光系统 I 的研究 (II)——豌豆 PSI 复合物的类脂及脂肪酸组成 [J]. *北京林业大学学报*, 2000, 22(1): 7-11.
- ZHENG C X, GAO R F. Photosystem I of high plant (II): The composition of glycerolipids and fat acids in the PSI complex of pea [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2000, 22(1): 7-11.
- [17] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canada Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911-917.

(责任编辑 赵 勃)