

基于 GC-MS 技术测定砀山酥梨果实 主要品质特征成分的代谢物谱

解敏¹, 黄瑛¹, 王馨¹, 王秀梅², 唐娟娟¹, 方从兵^{1,2*}

(1. 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术教育部重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 糖、有机酸和芳香物质的组分及其含量是组成果实品质的重要经济生物学性状, 对果实的口感和风味有重要影响。采用气相色谱-质谱联用技术, 对砀山酥梨成熟期果实主要品质特征成分进行检测和分析, 探索并建立酥梨果实代谢谱分析中样品制备、检测以及数据处理的相关技术和方法。方法学考察结果表明, 该方法具有良好的精密度、稳定性和重现性。酥梨有机相提取物的定性分析结果显示, 其主要代谢物包括碳氢化合物、醇类、醛类、酮类、挥发酸类、酯类等; 水相提取物的主要代谢物为糖类、糖醇、有机酸类等。本研究建立的酥梨果实主要品质特征成分的代谢谱分析技术平台, 将为进一步开展酥梨果实品质相关的代谢组学研究提供实验依据。

关键词: 品质成分; GC-MS; 代谢谱; 代谢组学; 砀山酥梨

中图分类号: S661.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0692-05

Metabolomic analysis on the major quality components in pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Dangshansuli) fruits by gas chromatography-mass spectrometry

XIE Min¹, HUANG Ying¹, WANG Xin¹, WANG Xiu-mei², TANG Juan-juan¹, Fang Cong-bing^{1,2}

(1. School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036;

2. Key Laboratory of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The contents of sugars, organic acids and volatiles are the main biological characters which affect the quality and the taste of pear fruits. The metabolites in mature pear fruits were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry which aimed to explore and establish the metabolomic methods including sample preparation, examination and data processing. The method showed perfect accuracy, stability and reproducibility on the basis of the methodological analysis. The quantitative analysis suggested the major metabolites in organic phase extract of mature pear fruits were carbohydrates, alcohols, aldehydes, ketones, volatile acids, esters, etc., and those in polar phase extract of mature pear fruits were sugars, sugar alcohols, organic acids, etc. The platform of metabolic profiling analysis on the major quality components established in this experiment will provide the experimental foundation for the metabolomic analysis on the quality formation of pear fruits.

Key words: Quality components; GC-MS; Metabolic profiling; Metabolomics; *Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Dangshansuli

砀山酥梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Dangshansuli) 分类上介于白梨和砂梨之间, 在我国和安徽省砀山地区具有悠久的栽培历史。果实品质组成十分复杂, 其中, 糖、有机酸和芳香物质是主要品质特征成分。梨果实的糖分主要由果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨糖醇组成, 且以果糖含量最高^[1-2]。

同时, 糖类是形成果实其他品质成分和风味物质如色素、芳香物质和维生素等合成的基础原料^[3-4]。有机酸不仅是果实品质的重要组成成分, 而且在果实生长发育过程中参与酚类、氨基酸、酯类和芳香物质的合成代谢^[5]。梨果实中芳香物质是由不同挥发性物质组成的混合物, 主要包括碳氢化合物、醇类、

收稿日期: 2012-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071756) 资助。

作者简介: 解敏, 男, 博士, 讲师。

* 通讯作者: 方从兵, 男, 博士, 教授。E-mail: fcb_ah@ahau.edu.cn

醛类、酮类和酯类等, 其组成和含量是衡量果实风味品质的重要指标之一^[6]。

代谢组学是二十世纪 90 年代中期发展起来的一门对某一生物或细胞在某一特定生理时期内所有低分子量代谢产物同时进行定性和定量分析的一门新学科^[7], 作为功能基因组学研究的重要方法之一, 现已成为解决诸多复杂生物学问题有效手段^[8-10]。本试验拟以砀山酥梨成熟期果实样品为试材, 摸索并建立样品制备和 GC-MS 检测的方法, 并对其精密度、稳定性和重现性进行方法学考察, 构建果实主要品质特征成分的代谢谱分析技术平台, 为开展酥梨果实品质相关的代谢组学研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验选择“砀山酥梨”成熟期果实为供试材料, 取自安徽省砀山县园艺场酥梨生产基地。用蒸馏水冲洗干净后吸干果表水分, 立即用液氮处理并储存于 -80°C 超低温冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 岛津 QP2010S 气相色谱-质谱联用仪(日本 SHIMADZU 公司), 毛细管柱(0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μm) 购于美国 J&W Scientific 公司, NIST 2002 质谱数据库; DC-12 氮吹仪(上海安谱科学仪器有限公司); 载气为氦气(99.999%); 衍生化试剂包括 *N*, *O*-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)和三甲基氯硅烷(TMCS), 均购于 Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2.2 有机相提取物的代谢物谱分析 (1) 供试样品的制备。选取若干个酥梨的典型果实样品, 去掉果心, 均分果实, 称取 5 g 样品, 液氮充分研磨, 加入 40 mL 重蒸过的二氯甲烷, 磁力搅拌 1 h, 仔细收集上层二氯甲烷相, 分两次向果渣中再加入二氯甲烷 60 mL, 每次 30 mL; 合并二氯甲烷相, 过滤后氮吹浓缩二氯甲烷相至 1 mL。三次重复。

(2) GC-MS 分析条件。气相条件: 进样口温度 250°C , 进样体积 $1\ \mu\text{L}$, 升温程序: 初始温度 60°C , 保持 1 min, $4^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 130°C , 保持 1 min, $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 280°C , 保持 15 min, 载气: 99.999% 氦气, 流速 $1.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 质谱条件: 接口温度: 250°C ; 离子源温度: 200°C ; 扫描模式, Scan, 扫描范围 40~600 amu, 溶剂切除时间: 9 min。

1.2.3 水相提取物的代谢物谱分析 (1) 供试样品的制备。称取 0.5 g 酥梨典型果实样品, 加入液氮, 研磨匀浆, 加入 20 mL 30% 的甲醇溶液(含有 0.6

$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三氯乙酸), 磁力搅拌 3 h。继续向萃取液中加入 30% 甲醇溶液定容至 25 mL; 摇匀, 取 1 mL 提取物, $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 100 μL , 充分干燥, 加入 $25\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 羟胺吡啶溶液 100 μL , 70°C 条件下处理 50 min, 再加衍生化试剂 60 μL , 70°C 处理 2 h, 取出后自然冷却至室温。三次重复。

(2) GC-MS 分析条件。气相条件: 进样口温度 250°C , 进样体积 $1\ \mu\text{L}$, 升温程序: 初始温度 100°C , 保持 2 min, $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 184°C , $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 192°C , 保持 2 min, $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 280°C , 载气: 99.999% 氦气, 流速 $1.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 质谱条件: 接口温度: 250°C ; 离子源温度: 200°C ; 扫描模式, Scan, 扫描范围 40~600 amu, 溶剂切除时间: 9 min。

1.2.4 方法学考察 (1) 精密度试验。取同一供试样品, 连续进样 3 次, 检测供试样品的 GC-MS 分析图谱, 根据各色谱峰的保留时间和峰面积计算各色谱峰间的相对标准偏差 RSD(%)。

(2) 稳定性试验。取同一供试样品, 分别在 0、4、8、16、24 h 检测 GC-MS 分析图谱, 计算相对标准偏差 RSD(%)。

(3) 重现性试验。取酥梨果实样品 3 份, 按照供试样品溶液的制备和检测方法制备样品并进行检测, 根据各色谱峰的保留时间和峰面积计算各供试样品间的相似度及其 RSD(%)。

1.2.5 数据处理与软件 取有机相和水相提取物供试样品溶液, 分别按照方法 1.2.2 和 1.2.3 进样分析, 记录色谱图; 采用 Shimadzu GCMS (version 2.30) 工作软件, 获取谱图中各色谱峰的保留时间和峰面积数值。分别以正十七烷(*n*-Heptadecane)和核糖醇(Ribitol)为有机相和水相提取物的内标, 用相对峰面积(与内标峰的比值)表示代谢物的含量; 取三次重复试验数据的平均值。

2 结果与分析

2.1 分析方法的方法学考察

精密度试验结果表明, 有机相各组份色谱峰面积的相对标准偏差 RSD(%)为 1.96%~8.69%, 水相各组分为 0.90%~2.80%, 表明仪器精密度良好。稳定性试验结果显示, 各色谱峰的相对保留时间和峰面积未发生显著变化, 因此, 低温保存下的酥梨果实有机相和水相样品稳定性较好。重现性试验结果表明, 有机相各组份色谱峰面积的相对标准偏差 RSD(%)为 2.13%~9.14%, 水相各组分为 0.92%~3.45%, 说明此法重现性良好。

2.2 酥梨果实有机相提取物中代谢物谱分析

按照方法 1.2.2, 对酥梨果实有机相提取物进行了 GC-MS 分析; 利用 NIST 数据库对谱图中的代谢物逐一进行检索, 鉴定出主要代谢物组分 28 种 (见表 1), 包括碳氢化合物、醇类、醛类、酮类、挥发酸类、酯类等; 以相对峰面积计, 其中, 2, 2'-亚

甲基双(4-甲基-6-叔丁基苯酚)(16.50%)、正二十九烷(6.73%)、 γ -谷甾醇(3.49%)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(3.01%)、棕榈酸(2.98%)、棕榈醛(2.50%)、二十一烷(2.11%)、1-十六烷醇酯(1.77%)、正二十三烷(1.77%)、二十四烷(1.62%)、正二十醇(1.58%)、二十八烷(1.57%)等含量较高。

表 1 酥梨成熟期果实有机相提取物中代谢物鉴定

Table 1 Metabolite identification in organic phase extract from mature *P. bretschneideri* fruits

保留时间/min Retention time	库中最匹配的物质 Description from best library fit	可能的代谢物 Possible metabolites	相对含量/% Relative content	匹配度/% Similarity
16.600	<i>n</i> -Tetradecane	正十四烷	0.55	94
18.176	<i>n</i> -Octadecane	正十八烷	0.37	92
24.540	<i>n</i> -Nonadecane	正十九烷	0.44	90
24.707	Methyl-2-oxooctadecanoate	甲基-2-氧代十八烷酸甲酯	0.30	80
25.328	4-Methyl-2, 6-di-tert-butylphenol	4-甲基-2, 6-二-叔丁基苯酚	0.76	95
32.266	9-Octyl-heptadecane	9-辛基-十七烷	0.55	92
32.479	2, 6, 10-Trimethyldodecane	2, 6, 10-三甲基十二烷	0.46	83
35.884	<i>n</i> -Heptacosane	正二十七烷	0.57	92
39.365	<i>n</i> -Pentatriacontane	正三十五烷	1.21	90
41.762	<i>n</i> -Hexadecanoic acid	棕榈酸	2.98	93
42.707	Tetracosane	二十四烷	1.62	95
45.910	Heneicosane	二十一烷	2.11	97
47.067	9, 12-Octadecadienoic acid	9, 12-十八碳二烯酸	0.64	91
48.015	9-Octadecanoic acid	9-十八烷酸	0.92	92
48.966	<i>n</i> -Tricosane	正二十三烷	1.77	96
49.298	1-Hexadecanol acetate	1-十六烷醇酯	1.77	95
50.723	2-Nonadecanone	2-十九烷酮	0.64	85
51.893	Octacosane	二十八烷	1.57	95
54.741	<i>n</i> -Heptacosane	正二十七烷	1.11	94
55.152	Acetic acid, octadecyl ester	十八烷基乙酸酯	0.59	94
55.659	2, 2'-Methylene bis(4-methyl-6-tert-butylphenol)	2, 2'-亚甲基双(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	16.5	94
57.217	<i>n</i> -Eicosanol	正二十醇	1.58	96
57.407	Heneicosane	二十一烷	1.16	94
58.831	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯	3.01	96
60.002	Tetratriacontane	三十四烷	0.73	96
62.509	Tetratriacontane	三十四烷	1.50	95
64.912	Tetratriacontane	三十四烷	0.58	95
67.252	<i>n</i> -Nonacosane	正二十九烷	6.73	96
70.495	Hexadecanal	棕榈醛	2.50	94
76.251	Octadecanal	十八烷醛	0.99	93
79.284	γ -Sitosterol	γ -谷甾醇	3.49	96
82.494	Lupeol	羽扇豆醇	1.48	92

2.3 酥梨果实水相提取物中代谢物谱分析

按照方法 1.2.3, 对酥梨果实水相提取物进行了 GC-MS 分析, 利用 NIST 数据库对谱图中的代谢物逐一进行检索, 鉴定出主要代谢物组分共 21 种 (见表 2), 包括糖类、糖醇、有机酸类等; 以相对峰

面积计, 其中果糖(26.25%)、山梨醇(10.51%)、葡萄糖(13.24%)、氨基甲酸(1.92%)、蔗糖(1.61%)、3-氨基丙酸(1.12%)、苹果酸(0.70%)、苯丙酸(0.43%)等含量较高。

表 2 砀山酥梨成熟期果实水相提取物中代谢物鉴定

Table 2 Metabolite identification in polar phase extract from mature *P. bretschneideri* fruits

保留时间/min Retention time	库中最匹配的物质 Description from best library fit	可能的代谢物 Possible metabolites	相对含量% Relative content	匹配度% Similarity
8.104	Carbamic acid	氨基甲酸	1.92	89
8.608	2-Methyl-2-pentenoic acid	2-甲基-2-戊烯酸	0.10	78
9.183	Benzenepropanoic acid	苯丙酸	0.43	73
11.915	2-Methyl-propanoic acid	2-甲基-2-戊烯酸	0.12	69
14.927	Glycerol	甘油	0.29	78
16.883	Malic acid	苹果酸	0.70	96
17.987	L-Aspartic acid	L-天冬氨酸	0.11	96
18.550	Hexanoic acid	己酸	0.34	87
19.607	3-Amino-propanoic acid	3-氨基丙酸	1.12	71
20.655	Asparagine	天冬酰胺	0.12	89
21.584	Phenylethanolamine	苯乙醇胺	0.36	78
22.128	Uracil	尿嘧啶	0.04	71
27.891	Uridine	尿苷	0.37	79
28.570	Mannonic acid	甘露糖醛酸	0.35	77
30.926	Ethanesulfonic acid	乙磺酸	0.24	66
34.409	Glucitol	山梨醇	10.51	96
34.805	Fructose	果糖	12.36	92
35.146	Fructose	果糖	12.11	92
35.349	Fructose	果糖	1.65	87
37.684	Glucose	葡萄糖	10.04	95
38.384	Glucose	葡萄糖	3.20	94
42.142	Inositol	肌醇	0.30	92
57.911	Sucrose	蔗糖	1.61	95
59.496	Turanose	松二糖	0.18	81
59.651	Fructose	果糖	0.13	81
59.909	Palatinose	帕拉金糖	0.08	81

3 小结与讨论

本试验以砀山酥梨成熟期果实为试材, 摸索并建立果实代谢谱分析中样品制备、GC-MS 检测以及数据处理的技术和方法; 方法学考察结果显示, 实验方法具有良好的精密度、稳定性和重现性。利用 NIST 质谱数据库快速鉴定代谢物, 结果表明, 酥梨果实有机相提取物中主要代谢物组分包括碳氢化合物、醇类、醛类、酮类、挥发酸类、酯类等; 水相提取物中主要组分包括糖类、糖醇、有机酸类等。本试验建立的酥梨果实代谢谱分析技术平台, 将为进一步研究酥梨果实品质特征成分的形成机理和相互联系提供实验依据。

糖和有机酸通常为非挥发性物质, 必须采用合适的方法将其衍生为挥发性物质, 在 GC-MS 分析中才能达到较好的分离效果。在本试验中, 糖类先被盐酸羟胺转化为肟, 而后, 肟和非挥发性有机酸

与衍生化试剂(BSTFA 和 TMCS)发生硅烷化反应, 组分中的活泼氢被硅烷基取代后, 生成极性低、挥发性高和热稳定性好的硅烷基化合物, 从而可以实现果实中糖和有机酸的同时测定^[1]。同时, 在衍生化过程中, 由于肟与 BSTFA 和 TMCS 发生了硅烷化反应, 避免了变旋作用 and 多重峰的出现, 得到一种或少数几种衍生化产物, 从而有利于果实中各代谢物组分的定量分析^[1]; 但是, 在本试验中, 果实水相提取物中部分代谢物组分虽经衍生化处理后, 仍然表现为多个色谱峰, 如果糖和葡萄糖(表 2)。

参考文献:

- [1] Martens, M. Quality and quality evolution [J]. Acta Horticulturae, 1984, 163: 15-30.
- [2] 姚改芳, 张绍铃, 曹玉芬, 等. 不同栽培种梨果实中可溶性糖组分及含量特征[J]. 中国农业科学, 2010, 43(20): 4229-4237.
- [3] 胡红菊, 陈启亮, 王友平, 等. 4 个沙梨品种果实发育过程中主要糖酸含量的变化[J]. 华中农业大学学报, 2007,

- 26(2): 251-255.
- [4] Teixeira R T, Knorr C, Glimelius K. Modified sucrose, starch, and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(414): 1245-1253.
- [5] 陈发兴, 刘星辉, 陈立松. 果实有机酸代谢研究进展 [J]. *果树学报*, 2005, 22(5): 526-531.
- [6] Gary R, Takeoka, Ron G. Volatile Constituents of Asian Pear [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1992, 40: 1925-1929.
- [7] Fiehn O. Metabolomics- the link between genotypes and phenotypes[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48: 155- 171.
- [8] Bino R J, Hall R D, Fiehn O. Potential of metabolomics as a functional genomics tool [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(9): 418-425.
- [9] Saito K, Matsuda F. Metabolomics for Functional Genomics, Systems Biology, and Biotechnology [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 463-489.
- [10] 陈晓亚, 漆小泉, 段礼新. 概述 [M]//漆小泉, 王玉兰, 陈晓亚. *植物代谢组学(方法与应用)*. 北京: 化学工业出版社, 2011: 3-4.
- [11] Adams M A, Chen Z L, Landman P, et al. Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives [J]. *Analytical Biochemistry*, 1999, 266(1): 77-84.

本刊顾问 李家洋院士

李家洋, 植物分子遗传学家, 中国科学院院士, 研究员。1956年7月出生于安徽肥西。1982年毕业于安徽农学院(现安徽农业大学), 1991年获美国布兰代斯(Brandeis)大学博士学位, 1991-1994年在美国康乃尔大学汤普逊(Boyce Thompson)植物研究所进行博士后研究工作。历任中国科学院遗传研究所所长助理、所长, 遗传与发育生物学研究所所长。

李家洋主要从事植物分子遗传学研究, 他利用模式植物拟南芥与重要粮食作物水稻探索植物生长发育的调控机理。近年来的主要研究工作包括: 采用图位法克隆了水稻分蘖控制基因 MOC1, 开拓了水稻分蘖控制分子机理研究的新领域; 利用水稻脆秆突变体分离了 BC1 基因, 阐述了水稻机械强度的控制机理; 通过获得的拟南芥胆碱生物合成突变体, 初步明确了胆碱合成与植物温度敏感雄性不育性的关系; 通过图位克隆法分离出导致细胞死亡的基因 MOD1, 明确了初级代谢途径的缺陷会导致植物细胞凋亡; 利用转基因技术, 创制出色氨酸与吲哚乙酸合成量改变的转基因植物, 从而提出植物生长素吲哚乙酸生物合成途径的新模式; 建立了一种简易的基因芯片体系, 鉴定出一批油菜素内酯的应答基因, 并证实了油菜素内酯对植物细胞分裂的促进作用; 发展了系统鉴定植物功能基因的植物表达文库转化法, 分离出一批株型与育性等生长发育性状改变的拟南芥突变体, 克隆了相关的基因。

自1999年担任遗传研究所所长以来, 通过加强与所领导班子成员、积极引进和培养优秀科研人才、强化规章制度建设与行政管理工作的公开公平公正、创造出一种宽松和谐与人人奋发进取的科研环境, 促进了研究所的迅速发展。

2004年1月, 李家洋任中国科学院副院长、党组成员。

2011年5月, 李家洋被增选为美国国家科学院(NAS)外籍院士。

2011年10月, 李家洋任农业部党组成员、副部长和中国农业科学院院长。