

香蕉果实乙烯释放量 GC 的测定方法 及其不同处理下的变化趋势

王甲水¹, 贾彩红², 张建斌², 刘菊华², 金志强¹, 徐碧玉^{2*}

¹ 中国热带农业科学院海口实验站 海南海口 570102
中国热带农业科学院香蕉研究所

² 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南海口 571101
农业部热带作物生物技术重点开放实验室

摘要 采用毛细管柱气相色谱法测定香蕉果实采后成熟期的乙烯释放量, 以外标法峰面积定量, 以保留时间定性, 乙烯测定结果相对标准偏差(RSD)为 1.85%, 检出限为 0.062 $\mu\text{L/L}$ 。该气相色谱法测定香蕉乙烯释放量和生成速率具有快捷高效、灵敏度高、重复性好、结果理想等优点。香蕉果实采后不同成熟处理条件下的乙烯释放量跟踪测量中, 不同成熟度的香蕉乙烯释放量变化趋势明显, 外源乙烯诱导时乙烯释放量提前达到峰值, 1-MCP 处理下的乙烯释放量只维持在很低水平。

关键词 香蕉; 乙烯; 气相色谱

中图分类号 S668.1

文献标识码 A

Determination of Ethylene Release Rate in Banana Fruit Using Gas Chromatography

WANG Jiashui¹, JIA Caihong², ZHANG Jianbin², LIU Juhua², JIN Zhiqiang¹, XU Biyu²

¹ Haikou Experimental Station (Institute of Banana) Chinese Academy of Tropical
Agricultural Science, Haikou, Hainan 570102, China

² Key Laboratory of Topical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture / Institute of Tropical Bioscience and
Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract Ethylene, an important phytohormone, plays a significant role in the regulation of fruit ripening. In our research, the endogenous ethylene production in different stages of postharvest banana ripening was measured using capillary gas chromatography (GC). Their peak areas were determined by the external standard method. The relative standard deviation (RSD) of ethylene determination in latex was 1.85%, with the detectable limit of 0.062 $\mu\text{L/L}$. It was found that the capillary gas chromatography method was not only simple and rapid, but also more accurate and sensitive than other methods in determining the ethylene content and its producing rate in banana fruit. The results showed that the ethylene production of naturally ripening, exogenous ethylene treatment and 1-MCP treatment bananas in the postharvest ripening, showed the similar pattern, in accordance with present research, indicating that this method is a practical and an ideal approach.

Key words Banana; Ethylene; Gas chromatography (GC)

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2013.06.034

香蕉为热带、亚热带地区最重要的水果, 是仅次于水稻、小麦、玉米的世界第四大粮食作物^[1]。香蕉为典型的呼吸跃变型果实, 具有采后乙烯大量产生并启动呼吸跃变的生理学特点。乙烯是重要的植物内源激素, 具有抑制生长、诱发果实成熟、促进衰老等多种生理功能, 在调控果实成熟基因的协同表达中起着非常重要的作用^[2-3]。因此, 测定果实中乙烯含量及其发生量的变化状况, 对研究香蕉呼吸跃变型果实采后成熟的分子生物学和生理学研

究具有重要意义。气相色谱(gas chromatography, GC)测定乙烯被广泛使用^[4-6], 对香蕉果实乙烯释放量的测定十分重要。

本实验根据香蕉果实生理特点并结合相关测试方法, 通过对香蕉果实采后不同成熟期的乙烯释放量的跟踪测量, 建立了一套适合测量香蕉果实乙烯释放量的简便、快速、准确的气相色谱方法以及香蕉采后成熟相关生理生化实验的预处理方法。同时利用外源乙烯和乙烯作用抑制剂 1-甲基环丙烯(1-

收稿日期 2013-04-11

修回日期 2013-06-09

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(No. ITBB130203); 海南省自然科学基金项目(No. 313066)。

作者简介 王甲水(1982年—), 男, 研究实习员; 研究方向: 生物化学与分子生物学。*通讯作者: 徐碧玉, E-mail: biyuxu@126.com。

MCP)处理香蕉果实,分析其内源乙烯释放量变化情况和趋势,为香蕉果实采后贮藏保鲜提供理论基础,是深入研究香蕉果实成熟分子机制的重要前提。

1 材料与方 法

1.1 材料与前期处理

巴西香蕉(*Musa spp.* AAA group)果实从中国热带农业科学院海口实验站海南省澄迈香蕉种植园获得。采收成熟度一致、饱满度约为7~8成、生长期为110 d的果实,将香蕉去轴落梳,分成单个香蕉果指,挑选大小均匀,无病虫害及机械损伤的果实,去掉顶部的干花,并用0.1%次氯酸钠进行表面消毒10 min,然后进行不同成熟处理。

自然成熟处理:将消毒好的香蕉果实晾干18 h,然后置于25℃,相对湿度85%的三洋培养箱(SANYO MRL-350)中成熟。

外源乙烯诱导成熟处理:消毒好的香蕉果实放入密闭保鲜盒中并注射入100 μL/L乙烯,25℃放置18 h后开盖,然后将处理好的香蕉置于25℃,相对湿度85%的三洋培养箱(SANYO MRL-350)中成熟。

1-MCP抑制成熟处理:消毒好的香蕉果实放入密封保鲜盒中按1 μL/L的量称取1-MCP粉末加水,25℃放置18 h后开盖,然后将处理好的香蕉置于25℃,相对湿度85%的三洋培养箱(SANYO MRL-350)中成熟。

1.2 方 法

1.2.1 实验设计及处理 取材:自然成熟的果实分别在0、2、6、10、12、14、16和18 d取样,同时取对应天数1-MCP抑制成熟处理的香蕉果实,每次随机取出3个果实,称其重量。

自然成熟和外源乙烯诱导成熟处理的香蕉果实分别按照成熟度取样^[7],每次随机取出3个果实,称其重量。

闷罐:测定前3 h将果实放入2 L的乐亿多保鲜密封罐(cp053)中,3个果装一个罐,盖紧罐盖。闷罐前,需在盖上钻一取气小孔,并用橡胶塞将其密封,并将塞与盖之间的缝隙用塑料粘合胶带密封,以防漏气。盖间缝隙用凡士林密封,样品放入后迅速盖好。

样品采集:闷罐3 h,轻摇密封罐,将注射器内空气彻底排除,从取气部位将针头插入密封罐。为取得有代表性的气样,应将气密针(安捷伦气密针200 μL)针杆反复推拉4次后再取出100 μL气样,并将气密针针尖迅速插入橡皮塞中,以防气体

泄漏。采用直接进样方式进样测量,每个样品取3针气样测定乙烯。

1.2.2 色谱条件 岛津GC2010型气相色谱仪,安捷伦气密针,色谱柱:rtx-1(毛细管柱)30.0 m×0.25 mm×0.25 μm(restek);进样口(SPL)100.0℃,柱温60℃;氢离子火焰检测器(FID)温度130℃;载气He流速30 mL/min;燃气H₂流速30 mL/min;空气流速400 mL/min,分流比35;压力控制流量,压力113.5 kPa,进样时间1.00 min。

1.2.3 定性定量方法及标准曲线制备 实验采用外标法,以标样保留时间定性,峰面积定量。气相色谱法测定不同体积的乙烯标样,采用峰面积对进样量作乙烯标准曲线图。测量香蕉果实自然成熟的0、2、6、10、12、14、16和18 d的乙烯释放量,绘制香蕉自然成熟乙烯释放量变化曲线。同时,测量自然成熟、外源乙烯诱导以及1-MCP抑制成熟的香蕉果实不同成熟度下的乙烯释放量,绘制乙烯释放量变化曲线。

2 结果与分析

2.1 乙烯气相色谱法测定

取99.9%(W/W)乙烯标样、香蕉样品进行乙烯气相色谱测定,每个样品平行测定3次,结果见图1,乙烯色谱峰的保留时间为1.403 min,由图1可知,标准乙烯、香蕉样品均能检测出来,且色谱峰型良好,出峰较快,基线平。

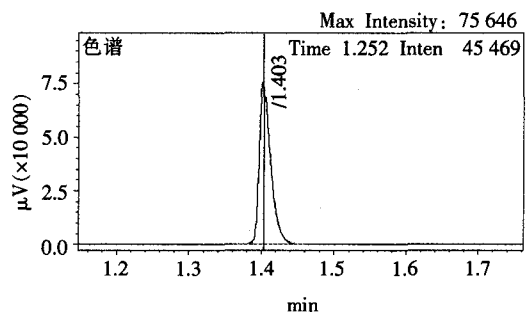


图1 乙烯标样气相色谱图

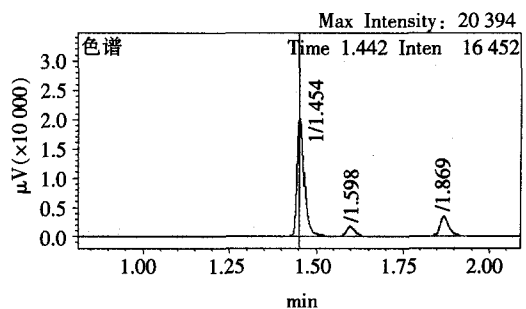


图2 香蕉样品气相色谱图

2.2 标准曲线测定

将乙烯标样(纯度99.9%)分别依次直接进样 1、5、10、50 和 100 μL , 用气相色谱法测定乙烯标样。采用乙烯进样体积对峰面积作乙烯标准曲线, 曲线方程是: $y=0.002\ 78x-0.288\ 04$, $R^2=0.999\ 98$, 其中 y 为浓度, x 为峰面积(图 2)。

2.3 精密度试验

取 5 个不同的香蕉乙烯样品分别平行测定乙烯含量峰面积 6 次, 做精密度实验, 计算标准偏差(SD)及相对标准偏差(RSD)。乙烯的 6 次测定峰面积值依次为 4 654、4 566、4 578、4 701、4 521、4 480, 平均值为 4 595.8, SD 为 85.2, RSD 为 1.85%。根据检出限的计算公式^[9]: $Mt=(2R_N \times V \times d)/(S \times \rho)$, 求得香蕉中乙烯最低检出限浓度为 0.062 $\mu\text{L/L}$ 。

2.4 香蕉的乙烯释放量测定

测量香蕉果实自然成熟的 0、2、6、10、12、14、16 和 18 d 的乙烯释放量为: 0.128、0.165、0.175、2.647、6.562、26.212、4.785 和 2.647 $\text{ng/g}\cdot\text{h}$ 。香蕉自然成熟乙烯释放量变化曲线如图 3:

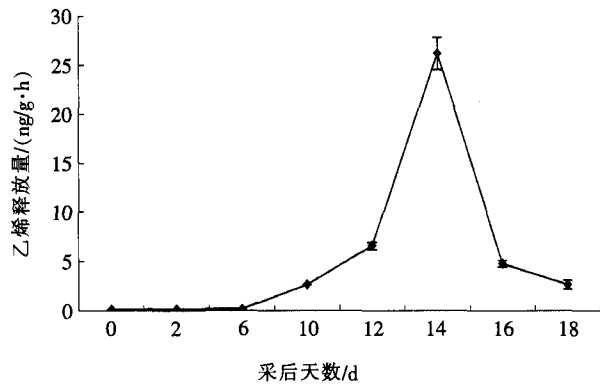


图 3 果实在自然成熟条件下的乙烯变化曲线

香蕉果实自然成熟条件下, 采后早期乙烯的释放量很低, 测定值几乎为零; 采后 10 d 时, 乙烯开始明显增加(即成熟乙烯开始合成); 采后 14 d 达到峰值, 约是采后 8 d 的 20 倍; 然后从采后 14 d 开始释放量呈直线下降, 采后 18 d 降至最低值, 这种变化和已报道的结果基本相同^[9]。

2.5 自然成熟、外源乙烯和 1-MCP 处理香蕉果实的乙烯释放变化曲线

香蕉果实一般分为 7 个不同成熟度: FG(香蕉果皮颜色全为绿色、full green)、TY(香蕉果皮微带黄色、trace yellow)、MG(香蕉果皮绿色部分大于黄色部分、more green than yellow)、MY(香蕉果皮黄色部分大于绿色部分、more yellow than green)、

GT(香蕉果皮全为黄色只有顶端为绿色、green tip)、FY(香蕉果皮全为黄色、full yellow)、YB(香蕉全为黄并带有黑色梅点、yellow-ecked with brown spots)^[7]。

在正常成熟、外源乙烯不同处理条件下, 香蕉果实达到相同的成熟度的时间是不同的(表 1)。

表 1 不同处理条件下果实成熟度对应的天数

果实成熟度	相对应的天数/d	
	自然成熟	乙烯诱导处理
FG	0	0
TY	2	1
MG	6	2
MY	10	3
GT	12	4
FY	14	5
YB	16	6

香蕉果实在外源乙烯诱导成熟时, 成熟乙烯的生物合成在第 1 天(成熟度TY)即开始启动, 逐渐升高, 于处理后第 3 天(成熟度MY)其峰值与正常成熟时的乙烯释放量基本一致, 但其他成熟度下乙烯释放量明显高于正常成熟释放值。同时, 乙烯的释放规律在正常成熟和乙烯处理条件下均为先上升

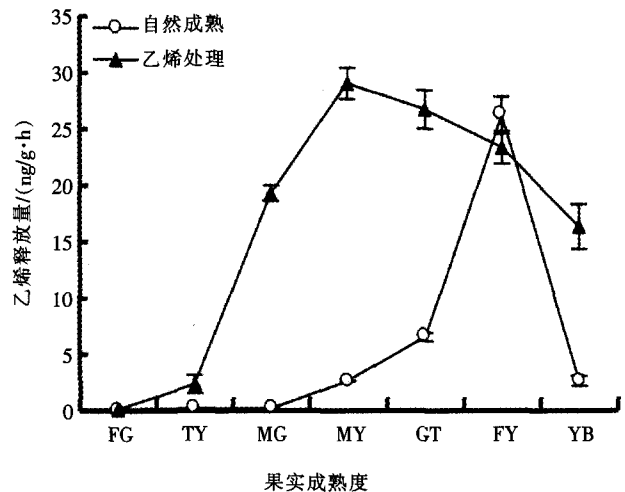


图 4 果实在自然成熟、乙烯处理条件下的乙烯变化曲线

后下降的趋势(图 5)。香蕉果实在正常成熟、1-MCP 处理条件下, 香蕉果实乙烯释放量存在明显差异。香蕉果实在 1-MCP 处理下, 乙烯释放量很低且一直维持在很低值上, 1-MCP 明显抑制了香蕉乙烯合成释放。

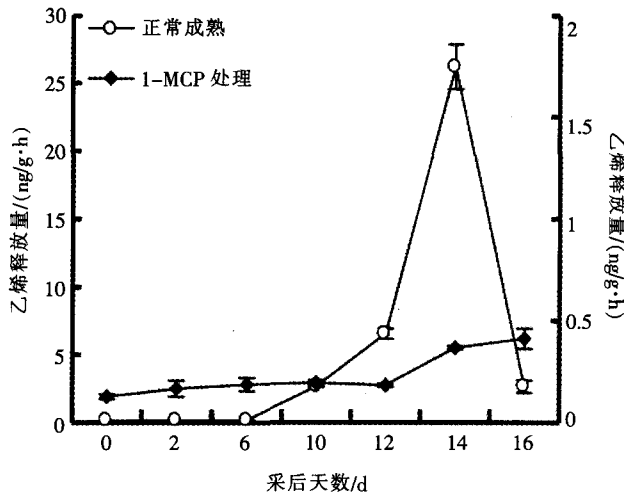


图5 果实在自然成熟、1-MCP处理条件下的乙烯变化曲线

3 讨论

无论在跃变型果实还是非跃变型果实中, 成熟发生时乙烯合成量的增加对许多果实的自然成熟都是必需的, 而香蕉作为一种典型的呼吸跃变型果实, 其成熟过程中的乙烯变化有其独特的规律, 所以快捷、准确地测量香蕉乙烯释放量对其成熟及采后储藏保鲜的研究至关重要。

现代气相色谱大都用柱效高、惰性强、重复性好的毛细管色谱柱来完成^[9]。毛细管气相色谱法测定果实乙烯释放量已应用多年, 经过气相色谱仪与毛细管柱技术的不断更新, 测定方法也相应调整, 力求获得理想的测定方法。而检出限则是评价一个分析方法的重要指标, 相对标准偏差(RSD)则是评价方法重复性的指标。本香蕉乙烯毛细管气相检测方法的检出限为0.062 $\mu\text{L/L}$, 已报道的检测方法一般为1 $\mu\text{L/L}$ 以上^[4,10], 检出限高低直接体现方法的灵敏度高; 本方法的相对标准偏差(RSD)为1.85%, 低于已报道的乙烯气相检测方法的3%^[10-11]; 乙烯峰保留时间为1.403 min, 而现报道的乙烯峰保留时间一般大于1.6 min^[4-5,10], 这可缩短检测时间。与已报道的乙烯气相色谱检测方法的比较, 可发现本香蕉乙烯毛细管气相检测方法具有简便快捷、高效、灵敏度高、重复性好、结果理想等特点。利用该毛细管柱气相色谱方法能有效地将样品峰和杂质峰分离开, 满足香蕉内源乙烯释放量和生成速率的检测, 从而高效检出香蕉采后跃变前期释放量很低的乙烯。同时, 一系列香蕉配套的采后处理方法, 为香蕉果实采后生理研究提供了基础。

从香蕉采后不同处理下乙烯释放量的实验数据看出, 外源乙烯诱导成熟时, 相比正常成熟乙烯释放量迅速增加, 乙烯释放量提前达到峰值, 同时峰

值与正常成熟时的乙烯释放量基本一致, 这可能由于外源乙烯能促进内源乙烯的合成, 提前了乙烯高峰的出现。1-MCP抑制成熟处理下, 乙烯释放量维持在很低水平, 这可能是由于1-MCP能有效竞争乙烯受体, 不可逆地结合到乙烯结合位点上, 降低乙烯的浓度, 抑制乙烯的生成, 延迟了乙烯高峰的出现。香蕉果实在正常成熟和外源乙烯处理条件下, 乙烯的释放规律均为先上升后下降, 这种规律和已报道的结果基本相同^[8]。根据上述所得到的乙烯气相色谱图、精度试验以及测得的不同处理下香蕉果实乙烯变化趋势图等, 说明本试验设计的毛细管柱气相色谱方法准确可行, 并具有简便、准确、快速、灵敏度高和峰形良好等特点。同样, 实验中存在问题如香蕉闷罐的气密性, 气体取样和进样的准确性, 机器和环境不稳定因素, 香蕉果实不同成熟度的判断等人为因素都对实验结果会造成影响。

参考文献

- [1] Penarrubia L, Kim R, Giovannoni J, et al. Production of the sweet protein monellin intransgenic plants[J]. *Bio Technol*, 1992, 19: 561-564.
- [2] 华南农业大学主编. 果树栽培学各论(南方本)[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 1993: 104.
- [3] 朱海生, 潘东明, 温庆放, 等. 反义乙烯受体 FaEtr1 和 FaErs1 基因对草莓的转化[J]. *园艺学报*, 2008, 35(11): 1587-1594.
- [4] 刘志勇, 沈春章, 董元彦. 气相色谱法速测油菜中的乙烯释放量[J]. *化学与生物工程*, 2006, 23(2): 55-56.
- [5] 邓 军, 曹建华, 林秀琴, 等. 热研 88-13 胶乳中乙烯释放量 GC 测定方法及其变化[J]. *热带作物学报*, 2009, 8: 1051-1055.
- [6] 吴 敏, 陈昆松, 贾惠娟, 等. 桃果实采后软化过程中内源 IAA、ABA 和乙烯的变化[J]. *果树学报*, 2003, 20(3): 157-1606(in Chinese).
- [7] Eng C P, Sumana C, Ping H, Pei L. Malate synthase gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Williams)[J]. *J Exp Bot*, 2003, 54: 309-316.
- [8] Liu X, Shiomi S, Nakstsuka A, et al. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit[J]. *Plant Physiol*, 1999, 121: 1257-1265.
- [9] 傅若农. 毛细管气相色谱柱近年来的发展[J]. *分析实验室*, 2009, 28(3): 103-122.
- [10] 邓 军, 林秀琴, 韦焕琦, 等. 毛细管柱气相色谱法测定橡胶树胶乳中的乙烯含量及其变化[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2009, 38(6): 600-602.