

文章编号:1674-7054(2011)02-0101-06

利用高效液相色谱法测定转基因甘蔗中的低聚果糖

武媛丽^{1,2}, 杨本鹏², 蔡文伟², 张树珍²

(1. 海南大学 农学院, 海南 儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究, 海南 海口 571101)

摘要: 为了检测蔗糖-1-果糖基转移酶(1-SST)转化甘蔗的果聚糖种类和含量, 本研究使用高效液相色谱(HPLC)建立了测定果糖、葡萄糖、蔗糖和3种低聚果糖(蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖)含量的两个体系。甘蔗糖类提取采用超声波辅助水浸提法, 实验以乙腈和水配比($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=87:13$; $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=75:25$)作为流动相, Hyderrisir NH_2 柱作为分析柱, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 30°C , 检测器为示差折光检测器。结果表明, 糖类质量浓度在 $0.625 \sim 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内呈现良好的线性关系, 相关系数在 0.999 3 以上, 在转化 1-SST 的甘蔗中能够检测到蔗糖: 蔗糖-1-果糖基转移酶的催化产物蔗果三糖(GF_2), 用此方法也可以较为准确地检测甘蔗茎秆节间其他糖类的组分及含量, 可以用于甘蔗中糖类的定性和定量检测。

关键词: 高效液相色谱法; 低聚果糖; 果糖; 葡萄糖; 蔗糖

中图分类号: Q 534

文献标志码: A

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)是最重要的糖料作物。甘蔗中所含的水溶性糖, 尤其是非还原糖, 与甘蔗的风味、产糖量密切相关。蔗糖-1-果糖基转移酶(1-SST)是果聚糖合成代谢中的关键酶。催化果聚糖合成的第一步反应是以蔗糖为底物合成 1-蔗果三糖, 也可催化生成蔗果四糖和蔗果五糖, 但蔗果四糖和蔗果五糖的产量很低^[1]。果聚糖(fructan)是自然界中分布最广泛的生物高分子, 大约 15% 的被子植物是以果聚糖作为主要贮藏性碳水化合物。果聚糖是由 $\beta-2,6$ -键和 $\beta-2,1$ -键连接的呋喃果糖基组成的同多糖。低聚果糖是优良的水溶性膳食纤维, 是完全符合益生元标准的典型双歧因子, 对人类健康具有很好的促进作用^[2]。植物中的果聚糖代谢是植物调节环境胁迫的一种重要手段, 它的积累可使植物的抗逆性增强^[3]。本实验室用农杆菌介导法成功地将 1-SST 基因转入甘蔗中^[4], 以期获得具有产果聚糖能力并且具有较强抗逆性的甘蔗植株。

目前, 糖类的测定方法有硫酸-蒽酮法^[5]、气相色谱法^[6]、液相色谱法^[7]、液相色谱-质谱联用技术^[8]等。普通化学方法适合测定糖总量, 却很难测定糖的组分, 且灵敏度低; 由于糖类难以气化, 需经过特殊衍生反应生成气态烃类产物才可进行气相色谱法检测, 但有机化学反应产生的中间产物较多, 样品处理的繁琐给气相色谱法检测带来很大的不便; 液相色谱-质谱联用技术所需的仪器设备价格不菲, 很多生产部门和科研单位难以承受。高效液相色谱法能有效准确地测定样品中各种糖的组分, 但通常采用的糖分析柱, 价格也较为昂贵^[9]。基于以上原因, 本实验室采用价格低廉的 Hyderrisir NH_2 柱作为分析柱, 乙腈和水配比作为流动相, 通过示差折光检测器, 建立高效液相色谱法(HPLC)测定果糖、葡萄糖、蔗糖及低聚果糖含量的方法。该方法操作简便, 成本较低, 且结果准确。笔者使用该法对转 1-SST 基因甘蔗成熟茎秆提取样品进行糖类定性定量检测, 检测转基因甘蔗中的蔗糖-1-果糖基转移酶(1-SST)转化甘蔗的果聚糖种类和含量, 同时验证该法在甘蔗糖类检测中的实用性。

1 材料与方法

1.1 实验材料 ROC22 号甘蔗及转 1-SST 基因甘蔗^[4]的成熟植株均为本实验室的试验田里种植的。

收稿日期: 2010-04-21

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费(ITBBZD0724)

作者简介: 武媛丽(1982-), 女, 山西大同人, 海南大学农学院 2008 级硕士研究生。

通信作者: 杨本鹏, y-bp@163.com

1.2 仪器与试剂 DIONEX 3000 型高效液相色谱仪, P680 系列的四元低压梯度泵 P680A LPG, Ulti-Mate3000 Autosampler 进样器; Ultimate-3000-RI101 型示差折光检测器; 色谱柱为 Hyderris NH₂ 柱(大连依利特产品, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 纯水系统为厦门锐思捷科学仪器有限公司生产的 RODI-50-RE。

D-葡萄糖为蔗糖标准品(Supelco 公司产品); D-果糖标准品(Sigma 公司产品); 蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖标准品(Wako Pure Chemical 公司产品), 色谱纯甲醇、乙腈(Fisher 公司产品); 实验用水为 18 MΩ · cm 超纯水。

1.3 色谱条件的选择 设计 5 个不同比例的乙腈水溶液作为流动相, 即: $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=70:30$; $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=75:25$; $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=80:20$; $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=85:15$; $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=90:10$ 。设计色谱柱温度范围为 25 ~ 35 °C。设计色谱柱流速范围为 0.5 ~ 1.5 mL · min⁻¹。通过比较实验结果, 确定最佳色谱条件。

1.4 标准品配制 称取果糖、葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖各 500 mg, 分别溶于 10 mL 水中, 配制质量浓度为 50 g · L⁻¹ 母液, 将母液逐级稀释为 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 g · L⁻¹ 标准液, 用一次性注射器抽取各质量浓度的标准液经 $\Phi=0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 备用。

1.5 标准曲线的制作 在选定的最佳色谱条件下对 6 种糖的标准品(按 1.4 项配制的各质量浓度的标准液)进行分析, 确定 6 种糖的保留时间。进行样品与标准品比对时, 根据保留时间对样品进行定性, 根据色谱峰面积对样品进行定量。由于液相色谱法操作中有相关规定: 信噪比(S/N) 达 3 倍时的浓度为检出限, 信噪比达 10 倍时的浓度可为定量限。为了验证已在线性范围内的最低标准液质量浓度是否合理, 将 0.625 g · L⁻¹ 的标准液逐级进行了一系列稀释, 并依次进样 20 μL。结果表明, 质量浓度为 0.625 g · L⁻¹ 的标准液符合液相色谱法操作中的相关规定, 具有合理性。

1.6 样品处理 甘蔗中的糖类提取, 采用在文献 [1] 的方法上略有改进的超声波辅助水浸法提取。挑选 5 株经 PCR(Polymerase Chain Reaction) 检测呈阳性的转 1-SST 基因甘蔗及 1 株未经转化的对照 ROC22 号甘蔗, 分别截取其茎秆节间的成熟部位作为实验材料, 将材料采回实验室后, 迅速洗净, 去皮, 准确称取材料 5.00 g, 用液氮将其研磨至粉末状, 转入 50 mL 大离心管中, 加 8 mL $\varphi=75\%$ 的乙醇, 震荡混匀后于 75 °C 水浴加热 20 min 使酶失活。8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液。在残渣中加入 5 mL 的 ddH₂O, 震荡提取, 8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液。在残渣中加入 8 mL 的 ddH₂O, 超声波辅助浸提 30 min, 8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液。在残渣中再加入 5 mL 的 ddH₂O, 震荡提取, 8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液。合并各次提取的上清液, 并混合均匀。于 -70 °C 中冷冻, 冷冻干燥机冻干, 冻干粉末用 2 mL 超纯水溶解制成样液。用一次性注射器抽取样液, 经 $\Phi=0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 待上机分析。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择 采用不同比例的乙腈水溶液作为流动相的检测结果表明, 随着乙腈在流动相中所占比例的增大, 虽然有利于各组分的基线分离, 但不利于糖的溶解, 且保留时间增加; 反之, 增加水在流动相中的比例, 分离度则降低。在 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=70:30$ 时, 果糖峰和葡萄糖峰完全重叠, 蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖也不能实现很好的分离, 基线噪声大; 在 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=75:25$ 时, 果糖峰和葡萄糖峰仍然完全重叠, 但蔗糖与蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖能很好的分离, 峰形良好; 在 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=80:20$ 时, 果糖峰和葡萄糖峰形重叠过半, 蔗糖峰形良好, 蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖峰形差, 且保留时间增加; 在 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=85:15$ 时, 果糖和葡萄糖的分离度低; 蔗糖峰形良好; 在 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=90:10$ 时, 果糖和葡萄糖可实现基线分离, 但蔗糖峰形差且保留时间增加。依据上述各流动相的检测情况, 将检测体系划分为 2 个: ①蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖的检测流动相使用 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=75:25$ 。②果糖和葡萄糖最好的分离流动相是 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=90:10$, 但此时蔗糖峰形差; 如果选择 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=85:15$ 流动相, 则果糖和葡萄糖又不能很好的分离, 为此, 本实验选择检测果糖、葡萄糖以及蔗糖的流动相为 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=87:13$ 。

2.2 色谱柱温度的选择 在色谱柱温度为 25 ~ 35 °C 条件下, 比较 6 种糖混合标准品中各糖分的分离情况, 结果表明, 随温度升高, 分离速度加快, 分离度降低; 当温度降低时, 分离度提高, 但保留时间较长。因此, 笔者认为本实验的色谱柱温度宜为 30 °C。

2.3 流速的选择 流速选择实验结果表明, 流速降低时保留时间延长, 随着流速升高, 保留时间缩短, 但

分离度降低;流速在 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,6 种糖的出峰时间合适,峰形较好,分离度也较高。

2.4 标准曲线的制作 对 6 种糖的标准品进行分析的结果表明,在 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=87:13$ 的体系中,果糖、葡萄糖、蔗糖的保留时间分别为 7.1,8.0,13.3 min;在 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=75:25$ 的体系中,蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖的保留时间分别为 7.1,8.5,9.8 min。将质量浓度为 $0.625\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准液逐级稀释,再依次进样 $20\text{ }\mu\text{L}$,观察信噪比(S/N)。根据信噪比(S/N)的结果以及结合实验的检测需要,经验证,确定了 6 种糖分的线性范围为 $0.625\sim50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 线性方程及相关系数

组分	线性方程	相关系数/ R^2	线性范围/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	检出限/ μg
果糖	$y=3.085x+0.007\ 9$	0.999\ 4	0.625~50	1.35
葡萄糖	$y=3.297\ 8x+0.034\ 4$	0.999\ 8	0.625~50	1.50
蔗糖	$y=3.242\ 7x+0.002$	0.999\ 9	0.625~50	1.20
蔗果三糖	$y=3.086\ 2x+0.025\ 9$	0.999\ 8	0.625~50	1.20
蔗果四糖	$y=2.991\ 2x+0.057\ 1$	0.999\ 8	0.625~50	1.65
蔗果五糖	$y=2.880\ 8x+0.049\ 5$	0.999\ 3	0.625~50	1.50

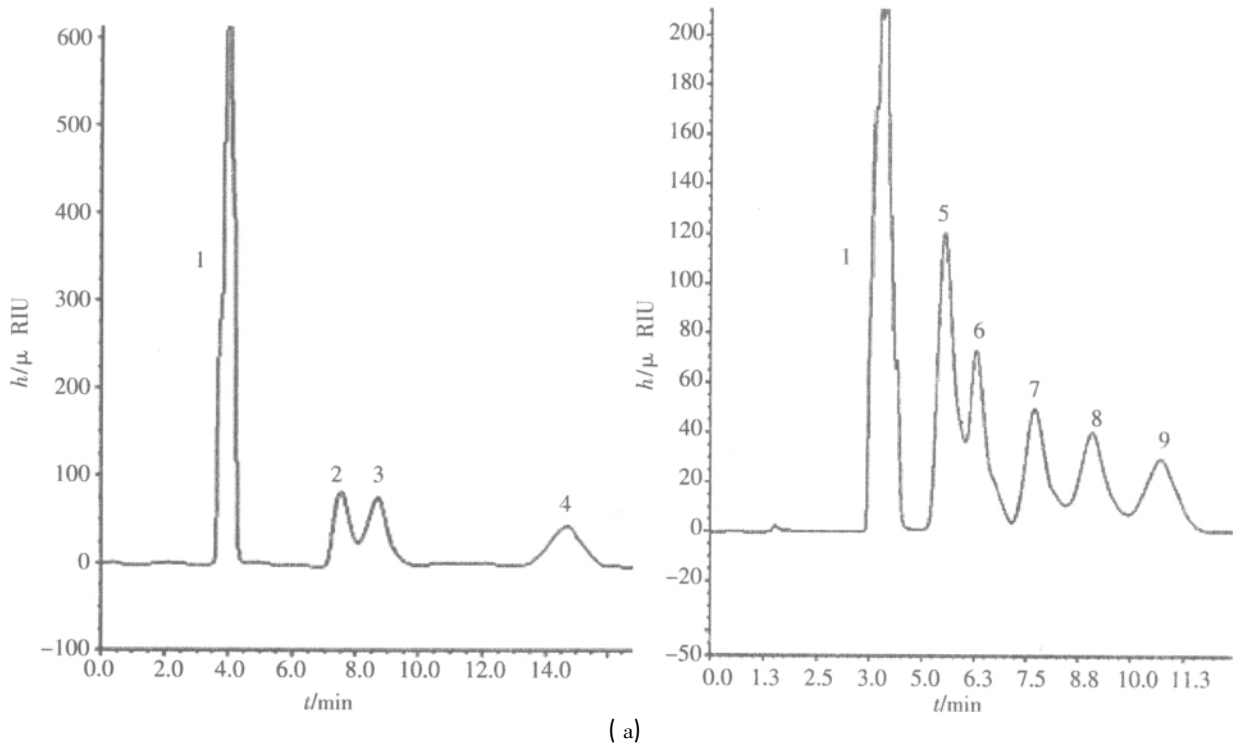
说明: y 表示出峰面积; x 表示响应的糖浓度。

由表 1 可知,所得的线性方程相关系数较高,均在 0.999 3 以上,这说明在线性范围 $0.625\sim50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,出峰面积(y)与响应浓度(x)呈现良好的线性关系,可较精确地定量样品,满足检测分析实验的要求。

2.5 样品分析 (1) 色谱条件:流动相为 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=87:13$,色谱柱流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,色谱柱温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取部分样品原液稀释 5 倍后进样,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$,分析果糖、葡萄糖和蔗糖;

(2) 色谱条件:流动相为 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=75:25$,色谱柱流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,色谱柱温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取样品原液进样,进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$,分析目标产物低聚果糖。

图 1 为蔗果标准品、转 1-SST 基因甘蔗茎秆提取液及对照 ROC22 号甘蔗茎秆提取液在乙腈和水配比($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=87:13$; $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=75:25$)体系中的色谱图。由图 1 可见,转基因甘蔗茎秆的糖提取液中含有一定量的蔗果三糖,对照株系(CK)则没有此糖;对照株系与转基因株系中均无蔗果四糖和蔗果五糖。各种糖组分及其含量见表 2。



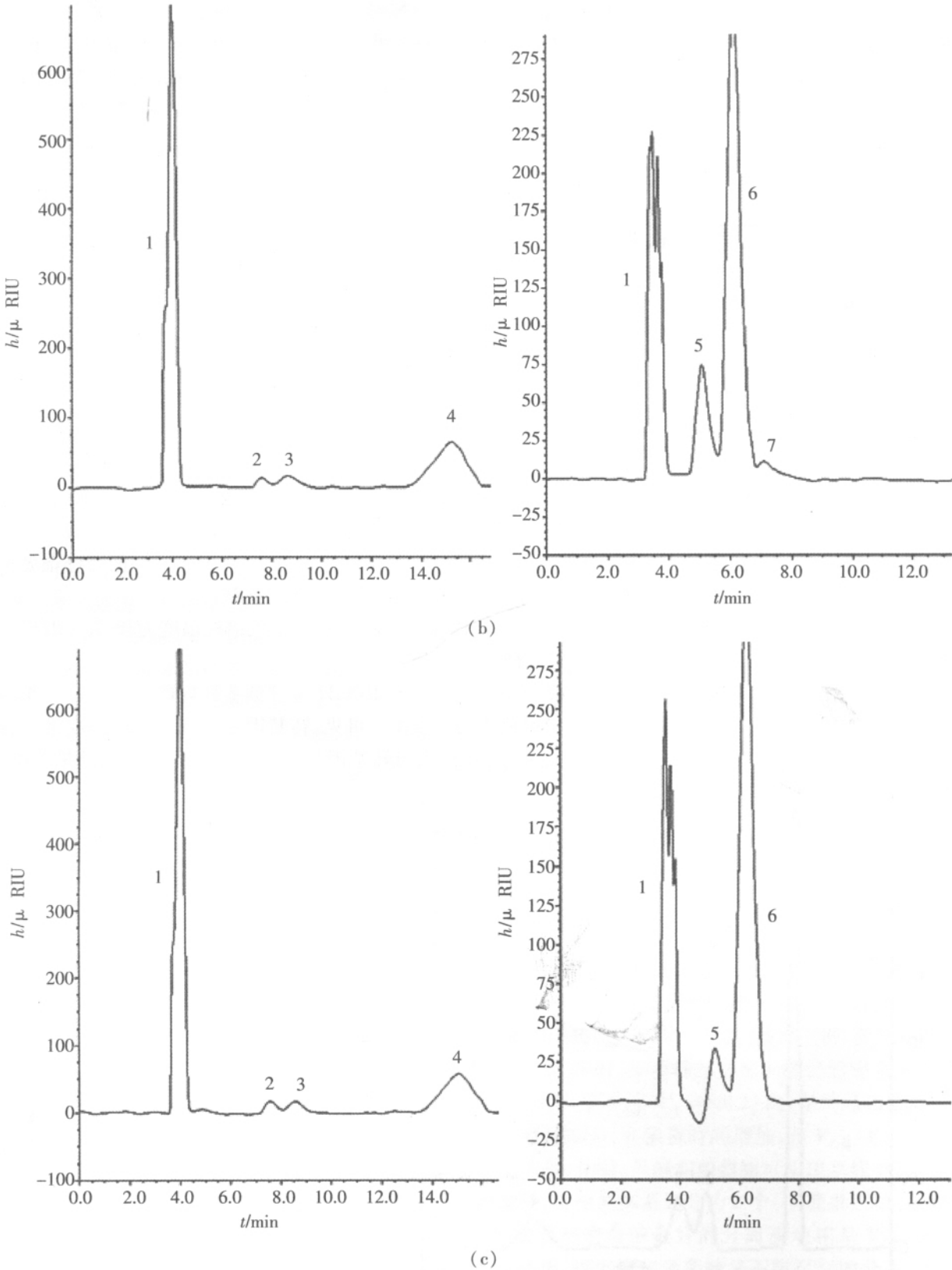


图1 糖提取液的 HPLC 分析

(a) 标准品色谱图,1. 溶剂(H_2O);2. 果糖;3. 葡萄糖;4. 蔗糖;5. 果糖和葡萄糖;6. 蔗糖;7. 蔗果三糖;8. 蔗果四糖;9. 蔗果五糖。(b) 转基因甘蔗茎秆糖提取液色谱图,1. 溶剂(H_2O);2. 果糖;3. 葡萄糖;4. 蔗糖;5. 果糖和葡萄糖;6. 蔗糖;7. 蔗果三糖。(c) 非转基因甘蔗茎秆糖提取液色谱图,1. 溶剂(H_2O);2. 果糖;3. 葡萄糖;4. 蔗糖;5. 果糖和葡萄糖;6. 蔗糖。

表 2 每克样品中各种糖含量

样品	组分/mg					
	果糖	葡萄糖	蔗糖	蔗果三糖	蔗果四糖	蔗果五糖
1	4.97	7.98	181.95	0.49	0	0
2	6.32	9.59	176.23	0.57	0	0
3	4.53	9.35	154.24	0.71	0	0
4	6.81	10.59	172.59	0.65	0	0
5	5.78	11.52	135.24	0.75	0	0
CK	5.25	8.96	146.30	0	0	0

从表 2 可见,在供试的 5 株转 1 - SST 基因的甘蔗的茎杆提取液中均含有一定量的蔗果三糖,对照株系则没有;对照与转基因株系中均无蔗果四糖和蔗果五糖。这说明目的基因 1 - SST 已整合到甘蔗基因组中,且能稳定表达;转基因株系中未见有蔗果四糖和蔗果五糖的原因,也许是由于转基因株系中 1 - SST 表达量较低,而导致无较高聚合度的果聚糖生成。

2.6 精密度 由于供试样品中没有检测到蔗果四糖和蔗果五糖,所以才用 6 种标准样品对本实验进行精密度分析,每个标准样品随机选择 1 个浓度,进样量 20 μL,平行进样 6 次,重复进样 6 次,按确定的最佳色谱条件,测定峰面积及糖含量,并计算相对标准偏差(RSD,%)。结果为蔗糖、葡萄糖、果糖、蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖的 RSD 分别为 0.95% ,0.88% ,0.86% ,0.94% ,0.79% ,0.99% ,这说明本试验方法精密度良好。

2.7 回收率 选取同一株转 1 - SST 基因甘蔗的成熟茎杆样品 2 份,每份样品准确称取 5.00 g,其中一份加入蔗糖、葡萄糖、果糖、蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖标准样品,另一份不加标准样品,均用 1.6 项中样品处理的方法提取。2 份提取液分别平行测定 5 次,计算回收率。结果为蔗糖、葡萄糖、果糖、蔗果三糖、蔗果四糖,蔗果五糖的平均回收率分别为 89.11% ,92.54% ,98.32% ,89.7% ,86.34% ,85.25% ,这说明本实验方法具有较高的准确度。

3 讨 论

目前,糖分的提取方法有水提法^[1]和醇提法^[1],本实验选择超声波辅助水浸提法,此法在提取过程中糖分损失较少,避开了醇提法所需的长时间水浴加热蒸发过程,使样品中的双糖及低聚果糖不易在高温中水解,减少了实验误差,Hydersir NH₂ 柱在糖类分析中具有准确、快捷的优点而被一度认为是分离糖分的较佳方法。

在本实验中,以 Hydersir NH₂ 柱作为分析柱,乙腈和水配比(V_{乙腈}: V_水 = 75: 25; V_{乙腈}: V_水 = 87: 13) 作为流动相,分析柱温 30 ℃,分析柱流速 1mL · min⁻¹,采用示差折光检测器,分析转 1 - SST 基因甘蔗节间的果糖、葡萄糖、蔗糖及低聚果糖,保留时间重现性好,糖分的含量和峰面积之间呈现良好的线性关系。相对标准偏差较低,在 0.79% ~0.99% 之间;加标准样品回收率较高,在 85.25% ~98.32% 之间。笔者建立的这种方法,可以用于转 1 - SST 基因甘蔗节间的低聚果糖和其他糖的组分及含量的测定,也可以用于非转基因甘蔗中的糖组分的定性及定量检测。

参考文献:

[1] 胡翠. 果糖基转移酶融合基因转化玉米胚乳中果聚糖的积累 [J]. 雅安: 四川农业大学,2009.
[2] 唐建平,王正鹏,张树珍,等. 高等植物果聚糖分类和功能的研究进展 [J]. 海南大学学报: 自然科学版,2009,27(3): 308 - 312.
[3] 高翔. 小麦族植物果聚糖合成酶基因克隆及功能验证 [J]. 北京: 中国农业科学院,2010.
[4] 唐建平,蔡文伟,王俊刚,等. 农杆菌介导蔗糖: 蔗糖果糖基转移酶基因转化甘蔗 [J]. 分子植物育种,2009,7(3): 579 - 582.

- [6] 汤章城. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 127 – 128.
- [7] 周欣, 王庆彪, 刘锡均, 等. 气相色谱法检测葡萄糖、麦芽糖、果糖和蔗糖 [J]. 海峡药学, 2001, 13(4): 48 – 49.
- [8] 葛亮. HPLC 测定哈密瓜汁中的单糖含量 [J]. 检测分析, 2010, 31(8): 103 – 105.
- [9] 王浩, 刘艳琴, 杨红梅, 等. 液相色谱 – 质谱联用技术测定无糖食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖 [J]. 分析化学, 2010, 38(6): 873 – 876.
- [10] 方宏, 曾键智, 陈海珊, 等. 高效液相色谱法检测蔗渣半纤维素水解物中的单糖 [J]. 广西科学院学报, 2000, 16(3): 124 – 126.
- [11] 李云康, 潘思秩. 高效液相色谱法测定柑橘汁糖的组成 [J]. 食品科学, 2006, 27(4): 190 – 192.
- [12] 刘胜辉, 臧小平, 魏长宾, 等. 高效液相色谱法测定台农 19 号菠萝糖分 [J]. 广东农业科学, 2008(12): 133 – 134.

Determination of Froctooligosaccharides in Transgenic Sugarcane with 1-SST using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

WU Yuan-hi^{1,2}, YANG Ben-peng², CAI Wen-wei², ZHANG Shu-zhen²

(1. College of Agriculture, Hainan University, Danzhou 571737, China;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou 571101, China)

Abstract: In order to determine varieties and contents of froctooligosaccharides in transgenic sugarcane transformed with 1-SST. Two saccharides determination methods using HPLC were established, one for determining the fructose, glucose and sucrose, the other for determining three Froctooligosaccharides (GF₂, GF₃ and GF₄). Saccharides of sugarcane were extracted with water, using a mobile phase composed of acetonitrile and water (87/13 V/V; 75/25 V/V) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹ for separating, Hyderr NH₂ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) temperature was 30 °C, the differential refraction detector was used to detect samples. The results indicated that the linear ranges of the six saccharides were 0.625—50 mg · mL⁻¹, with a correlation coefficient exceeding 0.999 3. kestose GF₂ in sugarcane transformed with the 1-SST gene were detected. Our methods can be used for accurate qualitative and quantitative determination of fructose, glucose and sucrose in sugarcane.

Key words: HPLC; FOS (froctooligosaccharides); fructose; glucose; sucrose