

大豆胚芽中 $\alpha - V_E$ 含量的 HPLC 测定^{*}

刘云^{1, 2} 朱丹华¹

(1. 浙江省农业科学院杭州国家大豆改良分中心, 杭州 310021;

2. 浙江大学食品学院, 杭州 310029)

摘要 用反相高效液相色谱法测定了大豆胚芽中的 $\alpha - V_E$ 含量, 比较了两种不同前处理方法对样品中 $\alpha - V_E$ 含量的影响。结果表明, 大豆胚芽中 $\alpha - V_E$ 含量为 36.60~46.10 mg/100g 样品; 样品预处理时, 超声离心法比皂化离心法处理, 测得样品中 $\alpha - V_E$ 含量高出 8.29%~15.39%; 样品预处理过程中加入抗坏血酸比不加抗坏血酸, 测得 $\alpha - V_E$ 含量要高出 2.21%~9.16%。

关键词 大豆胚芽; $\alpha - V_E$; 测定; 高效液相色谱法

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)04-0320-03

自上世纪 80 年代以来, 国外对大豆胚芽的研究与开发日渐深入, 尤其是美国和日本在这方面的研究就更为活跃, 如日本开发了大豆胚芽茶^[1]、美国 Soyhealth 和 Schouten 公司开发出富含大豆异黄酮的大豆胚芽食品^[2]。国内对大豆胚芽的研究起步较晚, 目前也已逐渐呈现出日趋白热化的态势^[3]。至今, 国内外对大豆胚芽的研究与开发均主要集中在大豆胚芽中的异黄酮和皂甙等活性成分^[4], 对大豆胚芽中 V_E 的快速检测却鲜见报道。以往对植物中 V_E 的含量测定, 大都是先皂化后再用有机溶剂提取不皂化物部分, 利用分光光度计、气相色谱和高效液相色谱来检测其中 V_E 的含量^[4]。这一处理样品的方法比较繁琐, 在空气中 V_E 易被氧化分解。为此, 本文在前人研究的基础上, 改善了样品预处理方法, 利用超声离心法来提取大豆胚芽中 V_E , 并将这一处理方法与皂化法进行了比较, 为快速检测大豆胚芽中 V_E 含量提供了实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆胚芽: 购买于山东省德州油厂。原料中大豆胚芽纯度约为 88.49%, 另含有约 4.14% 的豆皮、6.99% 的子叶碎片和 0.37% 的小石头及泥土等其它杂质。纯大豆胚芽千粒重为 4.75 g/1000 粒胚

芽, 自然堆积密度为 0.7523 g/L。大豆胚芽粉在 95% 乙醇中的溶胀体积为 1.9 倍。

氢氧化钾: 纯度 $\geq 82.0\%$, A. R 级

正己烷: 纯度 $\geq 99.0\%$, A. R 级

无水乙醇: 纯度 $\geq 99.7\%$, A. R 级

抗坏血酸: 纯度 $\geq 99.7\%$, A. R 级

82 O/H 型超声波清洗器: 德国 B. M. H. 仪器有限公司制造

1-15K 型高速离心机: 德国 B. M. H. 仪器有限公司制造

Agilent 1100 型高效液相色谱仪: 美国安捷伦科技公司制造

$\alpha - V_E$ 标样: HPLC 检测纯度为 98%

甲醇: 纯度 $\geq 99.9\%$, HPLC 一级

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理

1)、皂化离心法: 参考 GB/T 12388-1990。精确称取干燥过 60 目筛的大豆胚芽粉 0.5 g, 置入 100 mL 具塞试管中, 加入 10 mL 无水乙醇和 50% 氢氧化钾溶液 5 mL, 入 70~80℃ 水浴中皂化 30 min, 并不时摇动。皂化完全后, 迅速冷却至室温。准确加入 15 mL 正己烷萃取液, 振摇 3 min, 再加入 10 mL 蒸馏水, 加塞, 倒置试管 10 次, 然后离心 10 min, 仔细吸取上层有机相 1 mL, 通氮气吹干后, 迅速加入

* 收稿日期: 2005-03-25

作者简介: 刘云(1972-), 男, 博士后, 主要从事大豆深加工技术与开发利用。电话: 0571-86404247, E-mail: liuyunprivate@sina.

无水乙醇定容至 1mL, 备用。2)、超声离心法: 精确称取干燥过 60 目筛的大豆胚芽粉 0.5g, 准确加入 10mL 正己烷萃取液, 超声提取 30min, 然后离心 10min, 仔细吸取上层清液 1mL, 通氮气吹干后, 迅速加入无水乙醇定容至 1mL, 备用。

1.2.2 HPLC 色谱测定条件

HPLC 色谱仪: Agelint 1100 型自动进样高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 色谱柱: Hypersil ODS $5\mu\text{m}$ 4.0 \times 125mm; 流动相: 95% 甲醇, 流速为 1.0mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测器: DAD 检测器, 检测波长为 292nm, 检测温度为室温(20 $^{\circ}\text{C}$); 进样量: 20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 方法线性关系与最低检出浓度

在 $\alpha - V_E$ 标准浓度为 2mg/mL 进样, 改变进样体积, 以峰面积为纵坐标 Y, 以绝对进样量为横坐标 X, 对所测得数据进行直线回归, 得回归方程, 图 1。结果表明, 被测 $\alpha - V_E$ 进样量为 1~6ng 范围内与其峰面积线性关系良好, 线性方程为 $Y=61.975X-14.361$, $R^2=0.9998$ 。

最低检出浓度以 3 倍信噪比计, 本法最低检出浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 。

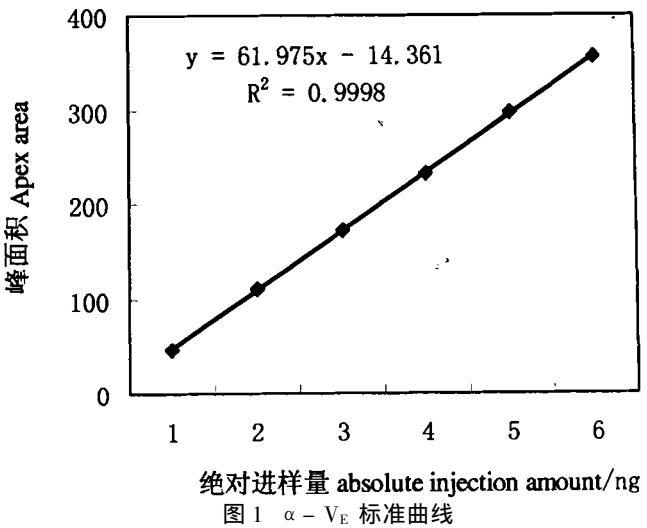


图 1 $\alpha - V_E$ 标准曲线

Fig. 1 The calibration curve of $\alpha - V_E$

2.2 方法回收率实验

称取已知含量的 $\alpha - V_E$ 样品, 加入高、中、低含量的 $\alpha - V_E$ 标准品, 分三个水平测定其中的 $\alpha - V_E$ 含量, 并计算回收率, 结果见表 1。 $\alpha - V_E$ 的平均回收率为 104.78%。

表 1 回收率实验

Table 1 Recovery rate experiments

No.	样品中 $\alpha - V_E$ 的含量 The content of $\alpha - V_E$ in sample(μg)	添加量 Adding amount(μg)	测定总量 Total amount measurement(μg)	回收率 Reclaiming rate(%)
1	2.85	200	201.60	99.38
2	7.49	50	56.34	98.00
3	7.26	2	10.83	116.95
平均值 Mean				104.78

2.3 方法精密度实验

将含 $\alpha - V_E$ 浓度为 21.0 $\mu\text{g/mL}$ 左右的样品, 按照设定的色谱条件进行测定, 计算一天内七次进样时的色谱峰峰面积和 RSD 值, 平均峰面积为 11.96, RSD 值为 0.81%。

2.4 大豆胚芽中 $\alpha - V_E$ 含量的测定

按 1.2.1 方法对大豆胚芽原料进行不同预处理, 并考察预处理过程中加入抗坏血酸对样品中 $\alpha - V_E$ 含量测定的影响, 结果见表 2。

表 2 不同前处理方法对样品中 $\alpha - V_E$ 含量的影响(mg/100g)

Table 2 The effect of different pretreatment methods on the content of $\alpha - V_E$ in sample

处理方法 Pretreatment methods	皂化离心法 Saponification centrifuge		超声离心法 Ultrasonic centrifuge		
	不加抗坏血酸 Not adding	加 0.5g 抗坏血酸 Adding 0.5g	不加抗坏血酸 Not adding	加 0.5g 抗坏血酸 Adding 0.5g	加 1.0g 抗坏血酸 Adding 1.0g
	L - Ascorbic acid	L - Ascorbic acid	L - A scorbic acid	L - A sco rbic	L - A scorbic
$\alpha - V_E$ 含量 The content of $\alpha - V_E$ /(mg/100g 样品)	36.60	39.95	43.26	45.72	46.10

从表 2 中可以看出, 不加抗血坏酸条件下, 超声离心法提取大豆胚芽样品中的 $\alpha - V_E$, 其 HPLC 含

量测定比皂化离心法高出 8.29%。样品预处理过程中,加入 0.5g 抗坏血酸比不加时,皂化离心法和超声离心法提取大豆胚芽中 $\alpha - V_E$,其 HPLC 含量测定分别增加了 9.15%和 5.69%。预处理过程中,加入 0.5g 抗坏血酸条件下,超声离心法提取大豆胚芽中 $\alpha - V_E$,其 HPLC 含量测定比皂化离心法要高出 14.44%。出现上述现象的原因,可能是由于 $\alpha - V_E$ 是一种热敏性、易被氧化的物质,置于高温和空气条件下极易被破坏和损失。皂化离心法中皂化过程需要一定的温度,而超声离心法提取却在室温下进行;其次,操作过程是在实验室条件进行的,70~80℃条件下皂化时加速了 V_E 与空气之间的接触,部分 V_E 被破坏;第三,加入抗坏血酸,可以避免 V_E 的氧化分解,抗坏血酸起到了“保护剂”的作用。因此,GB/T 12388-1990 测定食品中 V_E 的含量,除对所需溶剂进行提纯外,操作过程中最好避光或在暗室中或充氮气条件下进行,这样才能比较真实地反映食品中 V_E 的含量。

另外,超声离心法提取大豆胚芽中 $\alpha - V_E$ 时,我们还考察了加入不同量的抗坏血酸对测定结果的影响,结果表明,本实验只需加入 0.5g 抗坏血酸就能满足测定要求。

用超声离心法三次平行提取大豆胚芽中 $\alpha - V_E$,然后进行 HPLC 含量测定,来考察此法的提取率。结果表明,平均提取率为 92.99%。因此,大豆

胚芽中 $\alpha - V_E$ 含量的 HPLC 测定,超声离心法是一种比较快速、方便、简单的预处理方法。

3 结论

3.1 超声离心法提取大豆胚芽中 $\alpha - V_E$,样品处理不需皂化、萃取等繁琐步骤,样品中 $\alpha - V_E$ 受破坏程度轻,并且提取率高。样品处理方法简单、快速、方便,适于大批量、多品种样品的同时分析处理,结果准确、可靠。

3.2 大豆胚芽中 $\alpha - V_E$ 含量为 36.60~46.10mg/100g 样品。样品经超声离心法处理与皂化离心法处理相比较,前者测得样品中 $\alpha - V_E$ 含量高出 8.29%~15.39%,样品预处理过程中加入抗坏血酸有利于保护样品中的 $\alpha - V_E$ 免受氧化破坏。

参 考 文 献

- 1 周秀琴.日本大豆胚芽保健食品制法[J].粮食与油脂,2003,8:26.
- 2 叶克恭.美国开发和综合利用大豆现状[J].粮食与油脂,1994,2:48-49.
- 3 刘云,朱丹华.大豆胚芽开发利用的研究现状与发展趋势[J].中国食品添加剂,2004(6):50-53.
- 4 郝征红,李桂凤,董淑敏,等.野生蔬菜中 $\alpha - V_E$ 的含量测定[J].特产研究,2000(1):43-44.

HPLC DETERMINATION OF $\alpha - V_E$ IN SOYBEAN GERM

Liu Yun^{1,2} Zhu Danhua¹

(1. National Soybean Improvement Sub-center, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou, 310021; 2. College of Food Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou, 310029)

Abstract The content of $\alpha - V_E$ in soybean germ determined by RF-HPLC the effect of two different pretreatment methods on the content of $\alpha - V_E$ in sample was studied. The results showed that the content of $\alpha - V_E$ in soybean germ was 36.60~46.10mg/100g germ. Sample was prepared through ultrasonic wave enhancing extraction, the content of $\alpha - V_E$ was 8.29%~15.39% higher than that through saponification extraction. The effect of L-Ascorbic acid on the experimental results of $\alpha - V_E$ was also obvious.

Key words Soybean germ; Vitamin E; determination; HPLC