

# 高效液相色谱法测定大豆中的维生素 E 含量 及其与粗脂肪含量的线性回归分析<sup>\*</sup>

王 丽<sup>1</sup> 宋志峰<sup>1</sup> 纪 锋<sup>1</sup> 金卫东<sup>1</sup> 黄 璜<sup>1</sup> 于志晶<sup>2</sup> 唐晓博<sup>3</sup>

(1. 吉林省农业科学院大豆研究中心, 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学研究生院,  
长春 130118; 3. 吉林市农业科学院, 长春 132101)

**摘要** 利用高效液相色谱法测定 1000 份大豆资源中的维生素 E 含量, 使用荧光检测器检测( $E_x=295\text{nm}$ ,  $E_m=330\text{nm}$ ), 以  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚为标准品, 加入母育酚为内标, 计算大豆中维生素 E 各异构体的含量及总含量,  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚的加标回收率分别为 101.10%、97.50%、96.94%和 96.30%, 测得野生大豆资源中维生素 E 含量范围 0.05~0.34mg/g, 栽培资源 0.12~0.38mg/g。同时按国标方法测定粗脂肪含量, 其中野生资源粗脂肪含量范围 3.01%~20.60%, 栽培资源 12.00%~23.59%。通过线性回归分析, 明确了大豆中维生素 E 与粗脂肪含量呈正相关的线性关系。

**关键词** 高效液相色谱法; 大豆; 维生素 E; 粗脂肪; 线性回归分析

**中图分类号** S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)02-0113-05

维生素 E 是一种透明的淡黄色的粘稠油状物, 不溶于水, 溶于有机溶剂, 酸碱氢化过程及高温下稳定。是极有效的抗氧化剂, 具有防止不饱和脂肪酸氧化、防止动脉硬化、降低胆固醇、改善血液循环、防止心脑血管疾病等功效<sup>[1,2]</sup>。

天然维生素 E 与合成的相比, 其生物活性比成品大的多。因此天然维生素 E 在食品、药品、营养品、化妆品上被广泛应用。大豆富含维生素 E, 是天然维生素 E 的主要来源之一, 人们在食用豆制品的同时也摄取了其中的维生素 E。维生素 E 对人体健康至关重要, 因此研究其在大豆中的含量具有重要意义<sup>[3]</sup>。

由于维生素 E 是脂溶性维生素, 所以大豆中的维生素 E 应与粗脂肪含量有密切的联系。因此我们在检测大豆维生素 E 含量的同时也检测了粗脂肪的含量, 从中找出两者之间的内在关系。本研究通过对 200 份野生大豆资源和 800 份栽培大豆资源维生素 E 和粗脂肪含量的检测, 并经统计分析, 明确了大豆维生素 E 含量与粗脂肪含量的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1000 份大豆资源, 其中 200 份野生资源, 800 份栽培资源, 由吉林省农业科学院大豆研究中心资源室提供。

### 1.2 仪器与试剂

美国 Agilent 公司 1100 系列高效液相色谱仪, 配有真空脱气机, 自动进样器, 荧光检测器和色谱工作站。德国 Hettich 公司 EBA 21 型台式离心机(最大转速 14000rpm/min); 中国昆山超声波仪器有限公司 KQ-2500B 超声波清洗器。

$\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚标准品, 每种纯度均 $\geq 95\%$ , 购于美国 Calbiochem 公司; 母育酚, 纯度 99%, 购于美国 Metraya 公司; 正己烷、异丙醇, 均为 HPLC 级, 购于美国 Tedia 公司; 正己烷、乙酸乙酯、无水硫酸钠、氯化钠、氢氧化钠、95%乙醇和焦枋酚, 均为分析纯, 购于北京北化精细化学品有限责任公司; 2,2-甲氧基丙烷(优级纯), 购于美国 Sigma-

\* 收稿日期: 2005-10-14

项目来源: 美国伊利诺斯州瑞利生公司资助项目

作者简介: 王丽(1956-), 女, 副研究员, 主要从事谷物品质分析研究。

通讯作者: 宋志峰, Tel: 0434-6283231 E-mail: szf@cjas.com

Aldrich 公司。

### 1.3 色谱条件

色谱柱, 美国 Agilent 公司 Hypersil SI 200 硅胶柱, 200mm×2.1mm. i. d., 5 $\mu$ m; 流动相, 正己烷 (HPLC 级) / 异丙醇 / 2-甲氧基丙烷=100/0.5/0.1 (V/V/V); 流速, 0.3ml/min; 柱温 25℃; 运行时间, 20min; 荧光检测器波长,  $E_x = 295\text{nm}$ ,  $E_m = 330\text{nm}$ 。

### 1.4 粗脂肪的提取与定量

本实验的粗脂肪提取与定量按照《中华人民共和国国家标准》<sup>[4]</sup> 进行。

### 1.5 维生素 E 的提取

本实验中维生素 E 的提取是参照 G. Panfil<sup>[5]</sup> 和 J. Lee<sup>[6]</sup> 的方法进行的, 略有改动。

#### 1.5.1 样品皂化

准确称取 0.5000g 粉碎后 (40 目) 的大豆样品于水解管中, 加入 10ml 6% 乙醇焦磷酸溶液, 置于超声波清洗器中提取 10min, 加入 2ml 60% 氢氧化钾溶液, 并加入 100 $\mu$ l 1mg/ml 的生育酚溶液, 作为内标, 最终样品测定液中的生育酚含量为 10 $\mu$ g/ml。置于 70℃ 水浴上皂化 30min, 取出后置于冰浴中冷却。

#### 1.5.2 维生素 E 的提取

将冷却后的样品皂化液全部转移到分液漏斗中, 加入 20ml 2% 氯化钠溶液, 然后用 10ml 正己烷

(分析纯) / 乙酸乙酯 (85/15, V/V) 溶液萃取两次。在有机相中加入少量的无水硫酸钠。吸取有机相 1ml 于离心管中, 14000rpm/min 离心 15min, 取上清液 100 $\mu$ l 于 HPLC 小瓶中上机测定。

### 1.6 标准溶液的配制

将质量均为 50mg 的  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚标准品用少量正己烷分别溶解后, 定容至 50、50、10 和 25ml, 充氮, -20℃ 下储存, 临用时再用正己烷稀释至不同浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗脂肪的测定

测定了 1000 份大豆资源的粗脂肪含量。其中野生大豆资源 200 份, 粗脂肪含量从 3.01% ~ 20.60%, 栽培大豆资源 800 份, 粗脂肪含量从 12.00% ~ 23.59%。

### 2.2 维生素 E 含量的测定

#### 2.2.1 色谱测定

在 HPLC 测定大豆样品的同时, 测定标准样品 (标准样品色谱图见 1-a, 样品色谱图见 1-b)。在维生素 E 四种异构体中一般  $\beta$ -生育酚与  $\gamma$ -生育酚较难分离, 使用本研究中的色谱条件, 可使  $\beta$ -、 $\gamma$ -生育酚的分离度  $R$  达到 1.30, 满足准确定量分析 ( $R=1.00$ ) 的要求<sup>[7]</sup>。

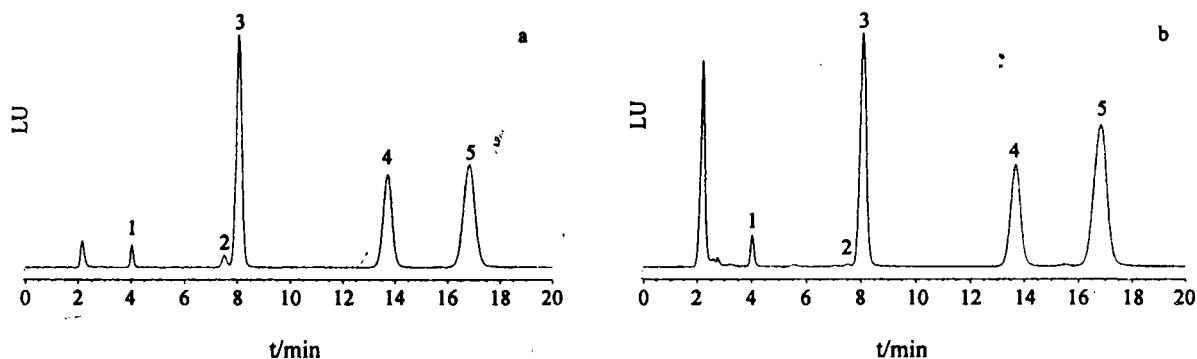


图 1 维生素 E 标准溶液和样品色谱图, a 为标准溶液, b 为大豆样品

1.  $\alpha$ -生育酚; 2.  $\beta$ -生育酚; 3.  $\gamma$ -生育酚; 4.  $\delta$ -生育酚; 5. 生育酚

Fig. 1 Chromatograms of vitamin E of standards and samples a. standard solution; b. soybean sample

1.  $\alpha$ -tocopherol; 2.  $\beta$ -tocopherol; 3.  $\gamma$ -tocopherol; 4.  $\delta$ -tocopherol

#### 2.2.2 线性关系与检出限

配制了五种浓度的生育酚混合标准液 (I、II、III、IV、V),  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚在每种混合标准液中的浓度见表 1。

每种混合标准液平行测定 3 次, 取其平均值, 以各生育酚峰面积  $A$  对其浓度  $C$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) 进行线性回

归分析,  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚的线性回归方程分别为  $A_\alpha = 3712.02C_\alpha + 126.08$ ;  $A_\beta = 2706.46C_\beta + 97.94$ ;  $A_\gamma = 5288.63C_\gamma + 234.01$ ;  $A_\delta = 10518.20C_\delta + 92.36$ , 四个线性方程的回归系数分别为 0.9997、0.9995、0.9997、和 0.9992。

在上述分析条件下, 以信噪比  $S/N=3$  计算, 测

表1 混合标准液中  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚的浓度( $\mu\text{g/ml}$ )  
Table 1 The concentration of  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -tocopherol in mixed standard solution ( $\mu\text{g/ml}$ )

| 生育酚<br>Tocopherol | 混合标准液 Mixed standard solution |     |      |      |      |
|-------------------|-------------------------------|-----|------|------|------|
|                   | I                             | II  | III  | IV   | V    |
| $\alpha$          | 0.12                          | 1.2 | 2.4  | 3.6  | 4.8  |
| $\beta$           | 0.121.2                       | 2.4 | 3.6  |      |      |
| $\gamma$          | 0.80                          | 8.0 | 16.0 | 24.0 | 32.0 |
| $\delta$          | 0.40                          | 4.0 | 8.0  | 12.0 | 16.0 |

表2 精密度试验结果( $n=9$ )  
Table 2 The results of precision test( $n=9$ )

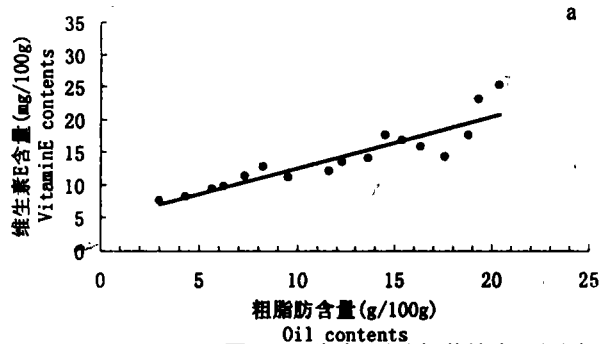
| 生育酚<br>Tocopherol | 标准样品 Standard solution        |            |                 | 大豆样品 Soybean sample           |            |                 |
|-------------------|-------------------------------|------------|-----------------|-------------------------------|------------|-----------------|
|                   | 平均峰面积<br>Average area of peak | 标准偏差<br>SD | 相对标准偏差<br>RSD/% | 平均峰面积<br>Average area of peak | 标准偏差<br>SD | 相对标准偏差<br>RSD/% |
| $\alpha$          | 35.61                         | 0.30       | 0.84            | 38.72                         | 0.87       | 2.25            |
| $\beta$           | 31.22                         | 0.28       | 0.92            | 4.51                          | 0.14       | 3.28            |
| $\gamma$          | 724.47                        | 7.38       | 1.02            | 519.76                        | 8.73       | 1.68            |
| $\delta$          | 459.94                        | 2.53       | 0.55            | 358.76                        | 5.45       | 1.52            |

表3 样品回收率试验结果( $n=7$ )  
Table 3 The results of recovery test( $n=7$ )

| 生育酚<br>tocopherol | 加入量<br>Added/ $\mu\text{g}$ | 测定值<br>Found/ $\mu\text{g}$ | 回收率<br>Recovery/% | 平均回收率<br>Average recovery/% |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|
| $\alpha$          | 1.000                       | 1.051                       | 101.10            | 97.96                       |
| $\beta$           | 1.000                       | 0.975                       | 97.50             |                             |
| $\gamma$          | 5.000                       | 4.847                       | 96.94             |                             |
| $\delta$          | 2.000                       | 1.926                       | 96.30             |                             |

2.2.4 样品回收率测定

准确称取 0.5000g 已知  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚含量的大豆样品作为空白样品,加入浓度分别为 10、10、50、20 $\mu\text{g/ml}$  的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 生育酚标准液各 100 $\mu\text{l}$ ,按上述方法进行皂化提取,平行测定 7 次,取平均值,回收率试验结果见表 3。



得  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚的检出限分别为 0.025、0.023、0.002、0.021 ng/5 $\mu\text{l}$ 。

2.2.3 精密度试验

按上述方法测定了  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚浓度分别为 2.4、2.4、16.8 $\mu\text{g/ml}$  的生育酚混合标准液 9 次,并同时测定大豆样品 9 次,精密度试验结果见表 2。

由表 2 可以看出本方法标准样品和大豆样品中的  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚的峰面积的 RSD 分别在 0.55 和 1.02 之间和 1.52 和 3.28 之间,重复性很好。

由表 3 可以看出本法四种异构体的回收率在 96.30%~101.05% 平均回收率为 97.95%,符合测试要求。

2.3 维生素 E 含量与粗脂肪含量的相关性分析

对 200 份野生和 800 份栽培大豆资源维生素 E 测定数据分别进行分析整理,大豆粗脂肪含量每增加一个百分点,分别计算出该百分点内所有样品粗脂肪含量及相应的维生素 E 含量平均值,得出两组数据(见表 4)。

以粗脂肪含量各个百分点内的维生素 E 平均含量(y)为纵坐标,以粗脂肪平均含量为横坐标(x)作图(见图 2)。并进行线性回归分析,得出野生大豆资源的线性方程为  $y=0.3988x+2.2814$ ,  $r=0.9066$ ;栽培大豆资源的线性方程为  $y=0.6368x+0.8416$ ,  $r=0.9517$ 。

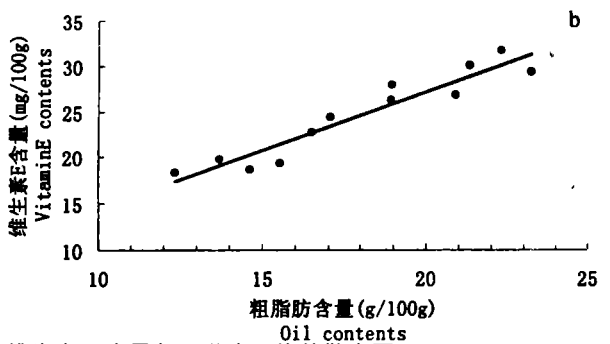


图2 野生大豆(a)与栽培大豆(b)粗脂肪与维生素 E 含量各百分点平均值散点图

Fig.2 The scatter diagram for the average value of oil contents and vitamin E contents in each percentage point of wild soybean(a) and cultural soybean(b)

从以上结果可以看出:大豆中维生素 E 含量与 脂肪含量呈正相关的线性关系。

表 4 大豆粗脂肪含量各个百分点内粗脂肪含量及相应的维生素 E 含量平均值  
Table 4 The average contents of oil and vitamin E in each percentage point of oil contents of soybean

| 粗脂肪含量各百分点<br>The range of the<br>contents of oil<br>( g/100g) | 野生大豆 Wild soybean                                    |                                                                | 栽培大豆 Cultural soybean                                |                                                                |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|                                                               | 粗脂肪含量平均值<br>The average contents<br>of oil ( g/100g) | 维生素 E 含量平均值<br>The average contents<br>of vitamin E ( mg/100g) | 粗脂肪含量平均值<br>The average contents<br>of oil ( g/100g) | 维生素 E 含量平均值<br>The average contents of<br>vitamin E ( mg/100g) |
| 3. 01 – 4. 00                                                 | 3. 03                                                | 7. 56                                                          | –                                                    | –                                                              |
| 4. 01 – 5. 00                                                 | 4. 33                                                | 8. 25                                                          | –                                                    | –                                                              |
| 5. 01 – 6. 00                                                 | 5. 67                                                | 9. 42                                                          | –                                                    | –                                                              |
| 6. 01 – 7. 00                                                 | 6. 27                                                | 9. 87                                                          | –                                                    | –                                                              |
| 7. 01 – 8. 00                                                 | 7. 34                                                | 11. 28                                                         | –                                                    | –                                                              |
| 8. 01 – 9. 00                                                 | 8. 30                                                | 12. 62                                                         | –                                                    | –                                                              |
| 9. 01 – 10. 00                                                | 9. 55                                                | 11. 19                                                         | –                                                    | –                                                              |
| 10. 01 – 11. 00                                               | –                                                    | –                                                              | –                                                    | –                                                              |
| 11. 01 – 12. 00                                               | 11. 62                                               | 12. 09                                                         | –                                                    | –                                                              |
| 12. 01 – 13. 00                                               | 12. 27                                               | 13. 58                                                         | 12. 37                                               | 18. 34                                                         |
| 13. 01 – 14. 00                                               | 13. 62                                               | 14. 03                                                         | 13. 74                                               | 19. 81                                                         |
| 14. 01 – 15. 00                                               | 14. 50                                               | 17. 51                                                         | 14. 65                                               | 18. 72                                                         |
| 15. 01 – 16. 00                                               | 15. 35                                               | 16. 87                                                         | 15. 58                                               | 19. 32                                                         |
| 16. 01 – 17. 00                                               | 16. 28                                               | 15. 77                                                         | 16. 55                                               | 22. 69                                                         |
| 17. 01 – 18. 00                                               | 17. 59                                               | 14. 28                                                         | 17. 10                                               | 24. 37                                                         |
| 18. 01 – 19. 00                                               | 18. 75                                               | 17. 57                                                         | 18. 93                                               | 26. 16                                                         |
| 19. 01 – 20. 00                                               | 19. 31                                               | 23. 14                                                         | 19. 00                                               | 27. 92                                                         |
| 20. 01 – 21. 00                                               | 20. 36                                               | 25. 32                                                         | 20. 89                                               | 26. 77                                                         |
| 21. 01 – 22. 00                                               | –                                                    | –                                                              | 21. 35                                               | 29. 93                                                         |
| 22. 01 – 23. 00                                               | –                                                    | –                                                              | 22. 32                                               | 31. 58                                                         |
| 23. 01 – 24. 00                                               | –                                                    | –                                                              | 23. 24                                               | 29. 34                                                         |

3 结论

实验表明:使用正相高效液相色谱结合荧光检测法测定大豆中维生素 E 的含量,可使四种生育酚异构体( $\alpha$  -  $\beta$  -  $\gamma$  -  $\delta$  - 生育酚)有效分离,测定结果的重现性、精密度良好,平均回收率为 97. 95 %,能够实现维生素 E 的准确定量。

使用该方法测定了 1000 份大豆资源(其中野生大豆 200 份,栽培大豆 800 份)的维生素 E 含量,同时按国标方法测定粗脂肪含量。通过线性回归分析,得出回归方程,相关系数野生大豆为 0. 9066,栽培大豆为 0. 9517,明确了大豆中维生素 E 含量与脂肪含量呈正相关的线性关系。

参 考 文 献

1 郑云兰,李霞辉.大豆营养分析技术[ M] . 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1991,190

2 崔洪斌.大豆生物活性物质的开发与应用[ M] . 北京:中国轻工业出版社,2001,265 – 272

3 李里特.大豆加工与利用[ M] . 北京:化学工业出版社,2003,38

4 中华人民共和国国家标准 – 谷类、油料作物种子粗脂肪测定方法 GB2906 – 82[ S] . 北京:技术标准出版社,1982

5 G. Panfili, P. Manzi, L. Pizzoferrato. High performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tocopherols, carotenes, and retinol and its geometric isomers in Italian Cheeses[ J] . Analyst, No. 7, 1994( 119): 1161 – 1165

6 J. Lee, K. Suknark, Y. Kluitse, et al. Rapid liquid chromatographic assay of vitamin E and retinyl palmitate in extruded weaning foods[ J] . Journal of Food Science, No. 6, 1999( 64): 968 – 972

7 于世林.高效液相色谱方法及应用[ M] . 北京:化学工业出版社,2000,243

## THE DETERMINATION OF VITAMIN E USING HPLC AND THE LINEAR REGRESSION OF THE CONTENTS OF VITAMIN E AND OIL IN SOYBEAN

Wang Li<sup>1</sup> Song Zhifeng<sup>1</sup> Ji Feng<sup>1</sup> Jin Weidong<sup>1</sup> Huang Huang<sup>1</sup>  
Yu Zhijing<sup>2</sup> Tang Xiaobo<sup>3</sup>

(1. Soybean Research Center of Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100;

2. Graduate School of Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

3. Tulin City Academy of Agricultural Science, Charychun 132101)

**Abstract** The contents of the vitamin E in 1000 soybean occessions were determined by high performance liquid chromatography with fluorescence detection ( $E_x=295\text{nm}$ ,  $E_m=330\text{nm}$ ). The isomers of vitamin E were determined by the standards  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherols and the internal standard of the tocol. The vitamin E contents was  $0.05 \sim 0.34\text{g/mg}$  in wild soybean resources,  $0.10 \sim 0.38\text{g/mg}$  in cultivated soybean resources, respectively. The average recoveries of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol were 101.10%, 97.50%, 96.94% and 96.30%, respectively. Meanwhile, the oil contents of soybean resources were determined by national standard method (GB 2906~82). Their range were 3.01%~20.60% in wild soybean resources, 8.00%~23.59% in cultivated soybean resources, respectively. The positive correlation between the contents of vitamin E and oil was confirmed by the analysis of linear regression.

**Key words** HPLC; Soybean; Vitamin E; Oil; Linear regression