

东北大豆与北美大豆维生素 E 含量的分析

刘焕成, 韩英鹏, 滕卫丽, 李文滨

(东北农业大学大豆研究所, 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:采用超声波法从大豆籽粒中萃取维生素 E, 以 DIKMA 公司生产的反相柱作为固定相, 以甲醇作为流动相, 流速为 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 并采用荧光检测器 ($\text{Ex} = 295\text{ nm}$, $\text{Em} = 330\text{ nm}$) 的高效液相色谱技术, 测定了我国东北与北美大豆品种 (系) 中的 α -、 γ -、 δ -生育酚和维生素 E (VE) 总含量, 并进行比较及聚类分析。结果表明: 供试 144 份大豆材料基于 α -、 γ -、 δ -生育酚和维生素 E 总含量均可聚成高、中、低 3 类, 我国东北大豆维生素 E 含量明显高于北美大豆, 是丰富的大豆维生素 E 资源, 为大豆高维生素 E 育种提供参考。

关键词:大豆; 维生素 E; 高效液相色谱; 聚类分析

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841 (2008) 06-0925-04

Analysis of Vitamin E Content in Soybeans Derived from Northeast China and North America

LIU Huan-cheng, HAN Ying-peng, TENG Wei-li, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The vitamin E content in soybean from Northeast China and North America that were harvested in the same place and same year were extracted by the method of ultrasonic wave, and the contents of α -、 γ -、 δ -tocopherol and total vitamin E were analyzed by HPLC with C18-reverse phase HPLC column as solid phase, and methanol as mobile phase ($\text{Flow} = 1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). The fluorescence detector ($\text{Ex} = 295\text{ nm}$, $\text{Em} = 330\text{ nm}$) was used as detector. The results showed that 144 soybean materials based on the contents of α -、 γ -、 δ -tocopherol and total vitamin E were all classified in to three class of high, middle and low by cluster analysis. The contents of α -、 γ -、 δ -tocopherol and total vitamin E in soybeans from Northeast China were obviously higher than those from North America.

Key words: Soybean; Vitamin E; HPLC; Cluster analysis

维生素 E, 简称生育酚, 不溶于水, 溶于有机溶剂, 主要存在植物油中, 尤其是在谷物种籽的胚芽油及大豆油等油脂中含量比较丰富^[1]。维生素 E 已发现有 8 种异构体, 分别为 α -、 β -、 γ -、 δ 生育酚 (tocopherol) 及相应的生育三烯酚 (tocotrienol)。生育酚研究较早, 目前所说的维生素 E 就是指生育酚, 国家标准中规定的维生素 E 含量也以 α -生育酚为标准^[2-4]。因为 α -生育酚更容易被稳定吸收并保留在身体细胞中, 所以它具有最高的营养价值^[5], 其生物活性是 $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, 抗氧化性是 $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ 。维生素 E 除了具有抗氧化作用外, 还可以延缓衰老, 对抗和年龄相关的免疫学指标的衰退, 降低心

脏病发病率等^[6]。研究表明, 维生素 E 摄入量与冠心病危险性呈负相关^[7]。所以, 维生素 E 被广泛应用于食品、保健、医药、化妆品和饲料等工业上。但是, 维生素 E 在光和氧气下不稳定, 易分解, 这对维生素 E 含量的精确检测带来一定的困难。

目前, 大豆的维生素 E 的提取基本采用索氏提取法, 不仅萃取剂用量大, 耗时长, 而且分析人员劳动强度大, 回收率及精度不够好^[8]。采用超声波提 (萃) 取技术, 其步骤简单易操作, 整个维生素 E 提 (萃) 取过程停留在空气和光下时间较短, 能够更大限度的降低维生素 E 萃取过程中的分解, 从而更好的提高回收率, 提高检测精确度。采用该方法检测

收稿日期: 2008-04-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 目标导向资助项目 (2006AA10Z1F1); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 重点资助项目 (2006AA100104-4)。

作者简介: 刘焕成 (1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向大豆生物技术。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

了 144 份中国东北和北美大豆品种(系),对其 α -、 γ -、 δ -生育酚含量及 VE 含量进行了对比和聚类分析。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

采用 DIONEX 公司生产的高效液相色谱仪,具 P680 HPLC 泵,ASI-100 自动进样器,RF2000 型荧光检测器。大豆种子处理采用超声波清洗器和 BECKMAN 离心机。

标准样选用 SUPELCO 公司的 α -、 γ -、 δ -生育酚标准品,纯度均大于 99%。甲醇为色谱纯,购于美国 Baker 公司;抗坏血酸、无水乙醇、正己烷均为分析纯,购于国内。上述试剂主要用于样品的前处理。

利用 144 份不同积温带的东北大豆栽培品种和品系,主要来源于黑龙江省和吉林省;同时利用 8 份北美栽培大豆品种和品系,主要来源于美国和加拿大。所有测试材料均为 2007 年 10 月收获于东北农业大学香坊农场,并置于 4℃ 下保存。

1.2 色谱条件

色谱柱为 DIKMA 公司产品,色谱柱填料为 Diamonsil(TM) 钻石 C18,5 μm ,柱规格为 250 \times 4.6 mm;荧光检测器激发波长 295 nm,发射波长 330 nm;流动相为甲醇,流速 1.5 mL \cdot min⁻¹;柱温 40℃;进样量为 20 μL ;检测时间长度为 10 min。

1.3 样品的提取和萃取方法

称取大豆粉 0.1000 g,加入 0.0500 g 抗坏血酸,加入 3 mL 80% 乙醇,震荡混匀 10 s 后置于超声波清洗器中提取 15 min,加入 6 mL 正己烷,震荡混匀 20 s 后再置于超声波清洗器中萃取 10 min,取出后在 13 000 r \cdot min⁻¹ 下离心 15 min,上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后在设定色谱条件下测定。

1.4 维生素 E 定性和定量方法

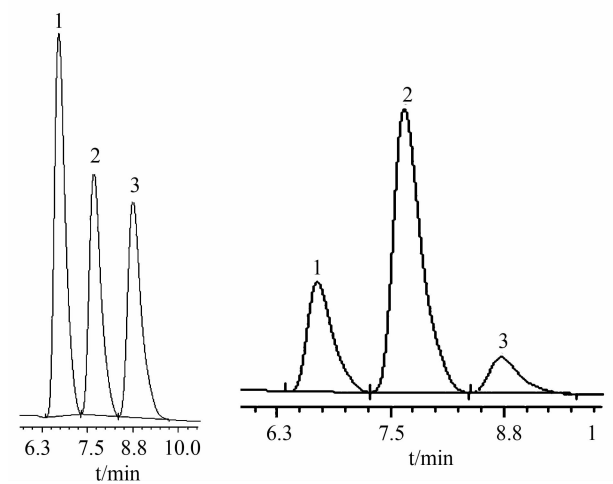
采用外标法对生育酚各异构体进行定性和定量分析。以 α -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚标样的保留时间定性,以样品生育酚峰面积代入回归方程定量。

2 结果与分析

2.1 色谱条件确定

根据研究结果^[9-10],确定荧光检测器激发波长 295 nm,发射波长 330 nm 检测灵敏度最好。在甲醇作为流动相条件下,完全可以分离 α -、 γ -、 δ -生育

酚。在一定流速下,柱温越高,单一样品检测时间越短,最终确定柱温 40℃、流速 1.5 mL \cdot min⁻¹ 作为标准实验条件,其生育酚可以达到预期分离效果,而且测定时间较短。标准样和大豆粉样的 HPLC 色谱图见图 1。



A 为生育酚标准品;B 为大豆样品;1. δ -生育酚,2. γ -生育酚,3. α -生育酚
A; standard sample, B; soybean sample, 1. δ -tocopherol, 2. γ -tocopherol, 3. α -tocopherol

图 1 生育酚 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of soybean vitamin E

另外,根据相关研究,反相 HPLC 柱不能分离 β -和 γ -生育酚,而只能通过正相 HPLC 柱才能分离^[9]。虽然研究采用的生育酚测定方法,在大豆 γ -生育酚峰中包含少量 β -生育酚,但基本都是 γ -生育酚^[9]。研究中把 β/γ 峰视为 γ -生育酚。

2.2 标准曲线和回归方程的建立

将 α -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚标准品用甲醇溶解后,再分别稀释至不同浓度,经 0.45 μm 滤膜过滤,在设定的色谱条件下平行测定 3 次,以浓度 C($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和峰面积 X 做图得到相应的标准曲线和回归方程。回归方程见表 1。

表 1 生育酚标准品的保留时间和回归方程

Table 1 The retention time and curves of standard(n=3)			
标准品 Standard	保留时间 Retention time/min	回归方程 Standard curves	R^2
α -生育酚 α -tocopherol	6.648	$C=0.137X+0.0388$	0.9996
γ -生育酚 γ -tocopherol	7.610	$C=0.0709X+0.037$	0.9990
δ -生育酚 δ -tocopherol	8.606	$C=0.0895X+0.0977$	0.9999

2.3 精密度试验

在相同设定的色谱条件下平行测定 α -生育酚、

γ -生育酚、 δ -生育酚混合标样 8 次,平行测定大豆样品 8 次。结果如表 2 所示。

表 2 精密度实验结果

Table 2 The results of precision test(n = 8)

生育酚 Tocopherol	标准样品 Standard sample			大豆样品 Soybean sample		
	平均峰面积 Average area of peak	标准偏差 SD	相对标准偏差 RSD/%	平均峰面积 Average area of peak	标准偏差 SD	相对标准偏差 RSD/%
α -生育酚 α -tocopherol	5.943238	0.029157	0.49	8.478338	0.05355	0.63
γ -生育酚 γ -tocopherol	23.70713	0.04658	0.20	65.27793	0.596574	0.91
δ -生育酚 δ -tocopherol	15.25545	0.048531	0.32	28.57286	0.327907	1.15

由表 2 可知,标准品的相对标准偏差(RSD)在 0.20 ~0.49 之间,大豆样品相对标准偏差(RSD)在 0.63 ~1.15 之间,测定重复性较好。

2.4 回收率测定

称取已知生育酚含量大豆粉 0.1000 g,加入浓度分别为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 α -、 γ -、 δ -生育酚标准品各 200 μL ,按上述方法提取,平行测定 5 次,回收率分析结果见表 3。

由表 3 可以看出,该方法各生育酚异构体的回收率均在 96% 以上,符合大豆维生素 E 测定要求。

表 3 回收率分析结果

Table 3 The results of recovery test(n = 5)

生育酚 Tocopherol	加入量 Added/ μg	测定值 Found/ μg	回收率 Recovery/%
α -生育酚 α -tocopherol	2.000	1.985	99.25
γ -生育酚 γ -tocopherol	5.000	4.817	96.34
δ -生育酚 δ -tocopherol	2.000	1.922	96.10

2.5 大豆样品中各生育酚异构体测定和比较

对我国东北大豆和北美大豆品种和品系维生素 E 含量的分析对比结果见表 4。

表 4 大豆样品中 α -、 γ -、 δ -生育酚含量及总量统计分析结果

Table 4 The statistical analytic results of contents of α -、 γ -、 δ -tocopherol and total vitamin E / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

样品来源 Sample source	统计项目 Statistics projects	α -生育酚 α -tocopherol	γ -生育酚 γ -tocopherol	δ -生育酚 δ -tocopherol	总 量 Total VE
中国东北大豆 Northeast China soybean	平均值 Mean	29.2840	160.9661	64.0914	254.3415
(n = 136)	最小值 Min	13.1349	109.7605	37.9889	184.7265
	最大值 Max	65.0635	231.5043	120.2720	350.9497
北美大豆 North American soybean	平均值 Mean	16.6084	118.1410	63.5504	198.2998
(n = 8)	最小值 Min	9.7525	86.3191	34.5732	132.5199
	最大值 Max	30.9242	153.6556	92.9451	250.6107

表 4 数据表明:无论维生素 E 总量,还是某个生育酚异构体的含量,在同样的生态栽培条件下,我国东北大豆远高于北美大豆,其中,东北大豆的维生素 E 平均总量是北美大豆的 1.28 倍,对于应用价值最高的 α -生育酚含量,东北大豆是北美大豆的 1.76 倍,说明我国东北大豆维生素 E 资源非常丰富。

2.6 基于大豆样品中 α -、 γ -、 δ -生育酚含量及 VE 含量的聚类分析

根据 α -、 γ -、 δ -生育酚含量及 VE 含量,采用最长距离法,分别对 144 份大豆材料进行聚类分析,所有供试材料均可聚成 3 类。

基于 α -生育酚含量聚类结果表明,98 份大豆材料聚为第一类,占有所有材料的 68.06%,其中 8 份为北美大豆材料,含量分布范围为 7.02 ~ 34.60 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,均值为 25.12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,此类 α -生育酚含量最低;40 份材料聚为第二类,占有所有材料的 27.78%,含量分布范围为 32.73 ~ 49.78 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,均值为 40.46 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;8 份材料 α -生育酚含量最高,聚为第三类,占有所有材料的 5.55%,含量分布范围为 51.88 ~ 72.78 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,均值为 59.01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。总体来看,供试大豆材料 α -生育酚含量主要分布于低含量水平,高含量较少。

基于 γ -生育酚含量聚类结果表明,46 份大豆材

料聚为第一类, 占有所有材料的 31.94%, 其中 2 份为北美材料, 含量分布范围为 120.93 ~ 166.64 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 142.24 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 89 份大豆材料聚为第二类, 占有所有材料的 61.81%, 有 5 份北美材料聚为此类, 含量分布范围为 86.32 ~ 218.90 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 180.31 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 9 份大豆材料聚为第三类, 占有所有材料的 6.25%, 其中有 1 份北美材料, 为 Charles, 此类 γ -生育酚含量最高, 含量分布范围为 215.72 ~ 259.53 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 230.57 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。总体来看, 供试大豆材料 γ -生育酚含量主要分布于中等水平, 高含量较少。

基于 δ -生育酚含量聚类结果表明, 40 份大豆材料聚为第一类, 其中包括 4 份北美材料, 占全部材料的 27.78%, 含量分布范围为 34.57 ~ 61.13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 53.70 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 99 份大豆材料聚为第二类, 其中包括 3 份北美材料, 占有所有材料的 68.75%, 含量分布范围为 59.01 ~ 97.46 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 73.19 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 5 份大豆材料聚为第三类, 占有所有材料的 3.47%, 其中有 1 份北美材料, 为 Charles, 含量范围为 98.75 ~ 153.63 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 116.85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。供试大豆材料 δ -生育酚含量主要分布于中等水平, 高含量较少。

基于维生素 E 总含量聚类结果表明, 31 份大豆材料聚为第一类, 占有所有供试材料的 21.53%, 6 份北美材料归为此类, 含量分布范围为 132.52 ~ 231.07 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 211.73 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 85 份大豆材料聚为第二类, 占有所有材料的 59.03%, 包括 1 份北美材料, 含量范围为 233.49 ~ 307.49 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 269.79 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 28 份材料聚为第三类, 占有所有材料的 19.44%, 其中有 1 份北美材料, 为 Charles, 含量范围为 309.52 ~ 414.24 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 均值为 336.74 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。总体来看, 供试大豆材料维生素 E 含量主要分布在中等水平, 高含量与低含量所占份额基本持平。

3 结论与讨论

从总体聚类分析结果看, α -、 γ -、 δ -生育酚高含量水平较少, 尤其应用最广泛的 α -生育酚。这为大豆高生育酚育种和研究带来一定难度, 以后也将成为该领域研究的重点。从中国东北大豆与北美大豆比较分析, 在我国东北筛选各种形式生育酚和维生素 E 总含量的大豆材料资源比北美丰富。其中, 生物活性最高的 α -生育酚含量是北美大豆的 1.76 倍, 在将来的研究中应该着重关注。黑龙江省是大

豆的原产地, 大豆资源丰富多样, 理论上筛选高生育酚大豆资源也更加丰富。

从聚类分析结果来看, 我国东北和北美大豆品种(系)的 α -、 γ -、 δ -生育酚高含量水平所占比例均较少, 尤其 α -生育酚含量普遍处于较低水平, 在高 α -、 γ -、 δ -生育酚大豆育种和工业利用上资源相对稀少。与北美大豆相比较, 我国东北大豆比较容易筛选出高 α -、 γ -、 δ -生育酚大豆品种(系), 特别是 α -生育酚。虽然北美大豆也存在高含量 γ -、 δ -生育酚, 但是只局限在个别品种(系)。我国东北大豆维生素 E 含量远高于北美大豆, 平均维生素 E 总含量是北美大豆的 1.28 倍, α -生育酚含量是北美大豆的 1.76 倍。与北美大豆比较, 中国北方大豆维生素 E 资源丰富, 具有很高的开发价值。

参考文献

[1] 宋晓燕, 杨天奎. 天然维生素 E 的功能及应用[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 45-47. (Song X Y, Yang T K. Function and application of natural vitamin E[J]. China Oil, 2000, 25(6): 45-47.)

[2] GB/T 5009.82-2003, 食品中 VA 和 VE 的测定[S]. (GB/T 5009.82-2003, Analysis of Vitamin A and Vitamin E in Food[S].)

[3] GB/T 117182-1999, 饲料中维生素 E 的测定——高效液相色谱法[S]. (GB/T 117182-1999, Analysis of Vitamin E in Feed——HPLC[S].)

[4] GB/T 5413.9-1997, 婴幼儿配方食品和乳粉维生素 A、D、E 的测定[S]. (GB/T 5413.9-1997, Analysis of Vitamin A, D, E in Infant Formula Food and Milk Powder[S].)

[5] Kamal-Eldin A, Appelqvist L A. The chemistry and antioxidant properties tocopherols and tocotrienols [J]. Lipids, 1996, 31: 671-701.

[6] Abbey M. The importance of vitamin E in reducing cardiovascular risk[J]. Nutrition Reviews, 1995, 53(supp.): 28-32.

[7] GISSI Prevenaione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI Prevenaione trial[J]. Lancet, 1999, 354, 447-556.

[8] 谢振伟, 但德忠, 赵艳, 等. 超声波辅助萃取技术在样品预处理中的应用[J]. 化学通报, 2005, 68: 1-11. (Xie Z W, Dan Z D, Zhao Y, et al. Application of Ultrasound-assisted extraction technology in the sample preparation[J]. Chemical Communications, 2005, 68: 1-11.)

[9] Hunter S C, Cahoon E B. Enhancing Vitamin E in oilseed: Unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis[J]. Lipids, 2007, 42: 97-108.

[10] Sanagi M M, See H H, Ibrahim W A W, et al. High temperature liquid chromatography of tocol-derivatives on polybutadiene-coated zirconia stationary phases [J]. Chromatographia, 2005, 61, 567-571.