

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610163277.1

[51] Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月27日

[11] 公开号 CN 1987450A

[22] 申请日 2006.12.18

[21] 申请号 200610163277.1

[71] 申请人 中国科学院东北地理与农业生态研究所

地址 150040 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路138号

[72] 发明人 潘相文 王国栋 李艳华 兰志华
梁桂荣 邢海军 张士春

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司
代理人 杨恕平

权利要求书1页 说明书4页

[54] 发明名称

一种大豆籽粒维生素E的检测方法

[57] 摘要

本发明属于农业生产技术领域。是一种大豆籽粒维生素E含量超声萃取、定性定量检测方法。本发明在传统维生素E检测方法的基础上,改进了维生素E的提取方法和液谱检测的流动相等,同时结合大豆籽粒的微量取样方法,实现了单个大豆籽粒维生素E含量的微量测定,在高维生素E大豆育种和品种改良上具有极其重要的现实意义。

1. 一种大豆维生素 E 的检测方法, 其特征在于先对大豆籽粒中的维生素 E 总量进行超声萃取, 再把得到的四种不同结构的维生素 E 混合物离心后, 取上清液在液相色谱以上进行定性和定量检测, 提取和检测程序如下:

a. 样品准备

单个籽粒编号后, 用壁纸刀片在豆粒的远脐端多次切取薄薄的碎片(注意不要超过籽粒的1/3), 用天平称取10-12毫克, 放入编好号的带盖塑料试管中;

b. 维生素E的提取

每个样品中加入1ml母育酚乙醇溶液→匀质器混匀10秒→超声波萃取15分钟→室温静止15分钟→匀质器混匀10秒→超声波萃取15分钟→用离心机以13000转/分钟离心15分钟→将上清液移入ep管→用离心机以13000转/分钟离心5分钟→吸取500 μ l于2ml顶空瓶中, 准备分析;

c. 维生素E的检测

高效液相色谱(HPLC)的检测条件: 用长2m, 直径3mm的填充柱, 检测波长295nm, 柱温40℃; 流动相为乙氰和甲醇, 分流比为9: 1; 流速为0.5ml/min; 进样量为30 μ l; 重复次数为3次, 检测时间为25-30分钟; 在检测中α、β、γ、δ-维生素E的保留时间分别在18-19、14-15、15-16和12-13分钟之间, 实现了维生素E的定性检测; 本发明采用内标法对各种维生素E组分进行定量, 大豆籽粒中各种维生素E组分含量由对应的峰面积与内标物的峰面积的比值求得。

一种大豆籽粒维生素 E 的检测方法

技术领域

本发明属于农业生产技术领域。是一种大豆籽粒维生素 E 含量超声萃取、定性定量检测方法。

技术背景

维生素E是大豆种子中的重要功能性成分之一，其含量与组成随品种和生长环境的不同而存在差异。据报道，作物种子中维生素E不仅是人类获得天然维生素E的重要来源，在对人体抗衰老、抗疾病等方面也具有显著作用，故而引起人们广泛的关注。测定种子中的维生素E不仅关系到衡量营养指标，而且关系到资源的开发利用。当代农作物的育种已进入了生化工程时代，依靠正确的生化测定来筛选现有种质资源中品质状况，具有非常重要的现实意义。

由于维生素E结构复杂，异构体种类多，分析测定困难，多年来许多科学家致力于其分析测定的研究，取得了很大的进展，主要分析方法包括双波电压法、示波法、薄层色谱法、气相色谱法、紫外分光光度法、荧光分光光度法、高效液相色谱法等。从近年发展看，利用荧光分光光度法测定各类作物中维生素E较多见。它能直观地测出各类作物种子中维生素E的含量，还在于免除了一般分光光度法干扰因素较多、准确性稍差的缺点，又比色谱法步骤简便。可是，目前应用仍不够广泛，主要原因在于试样分离提取时需要通入高纯氨气保护维生素E免受氧化破坏，因而装置复杂，费用较贵。并且，分离提取过程耗时长达16-18小时，使种子中的维生素E难免

有所损失，因此在大批量样品的分析测试时，困难较大、经费较多，影响了普遍运用。

高效液相色谱法(HPLC)是近三十年迅速发展的一种分离分析技术，用来分析维生素E能极大地简化样品预处理步骤，与其它方法相比具有干扰小，灵敏度高、快速等优点，是目前较为理想的检测技术。但是，该方法目前只能测定大豆油中的维生素E组分含量，而且不能实现单个籽粒维生素E组分含量的检测，在大豆资源筛选和品种改良上仍存在一定的不足。

为此，我们针对上述缺陷，对大豆籽粒维生素E提取方法、色谱检测流动相等进行改进，同时结合大豆籽粒的微量取样方法，研究出本发明。

发明内容

本发明从以上技术背景出发，对大豆籽粒中的维生素E总量进行超声萃取，把得到的四种不同结构的维生素E混合物离心后，取上清液在液相色谱上进行定性和定量检测。具体提取和检测程序如下：

a. 前期准备

药品准备：80%乙醇；1 μ g/ml 母育酚的80%乙醇溶液；

样品准备：单个籽粒编号后，用壁纸刀片在豆粒的远脐端多次切取薄薄的碎片（注意不要超过籽粒的1/3），用天平称取10-12毫克，放入编好号的带盖的塑料试管中；

b. 维生素E的提取

每个样品中加入1ml母育酚乙醇溶液——>匀质器混匀10秒——>超声波萃取15分钟——>室温静止15分钟——>匀质器混匀10秒——>超声波萃取15分钟——>用离心机以13000转/分钟离心15分钟——>将上清液移入ep

管 → 用离心机以13000转/分钟离心5分钟 → 吸取500 μ l于2ml顶空瓶中,准备分析;

c. 维生素E的检测

高效液相色谱 (HPLC) 的检测条件: 用长2m, 直径3mm的填充柱, 检测波长295nm, 柱温40℃; 流动相为乙腈和甲醇, 分流比为9: 1; 流速为0.5ml/min; 进样量为30 μ l; 重复次数为3次, 检测时间为25-30分钟;

维生素E的定性方法:

根据文献报道的各组分保留时间与实验所得的保留时间判定。在本检测中 α 、 β 、 γ 、 δ -维生素E的保留时间分别在18-19、14-15、15-16和12-13分钟之间;

维生素E的定量方法:

本检测采用内标法对各种维生素E组分进行定量, 大豆籽粒中各种维生素E组分含量由对应的峰面积与内标物的峰面积的比值求得。

本发明的优点是可以实现单个籽粒样品 (10-12毫克左右) 的检测, 不影响大豆籽粒的继续生长和发育, 可以在资源筛选及品种改良的任意阶段进行鉴定和评价, 对高维生素E大豆育种和改良提供了有利的技术支撑。

具体实施方式

本发明在中国科学院东北地理与农业生态研究所的“大豆功能营养资源拓宽与改良”课题中得到了应用。在课题实施过程中采用本发明对200多份东北大豆资源进行了分析和评价, 得到了2份 α -维生素E和3份总维生素E含量较高的大豆遗传材料, 对于本课题的完成和高维生素E大豆育种都起到了有效的技术支撑。下面列出了部分大豆资源籽粒中维生素E含量的检测结

果:

部分大豆资源籽粒中维生素E含量的检测结果 (mg/100g)

资源序号	α -维生素E	β -维生素E	γ -维生素E	δ -维生素E	总含量
1	3.84±0.18	1.26±0.31	5.81±0.25	3.25±0.11	14.16±0.86
2	4.32±0.34	1.44±0.28	2.74±0.10	1.98±0.15	10.48±0.94
3	4.66±0.41	1.61±0.25	4.31±0.17	1.21±0.08	10.99±0.59
4	3.11±0.21	1.04±0.21	6.05±0.22	3.34±0.18	13.54±1.01
5	3.36±0.18	1.12±0.29	5.98±0.14	2.24±0.09	12.70±0.73
6	2.89±0.13	0.98±0.22	6.14±0.16	4.72±0.16	14.73±1.15
7	0.96±0.11	0.73±0.19	6.44±0.19	5.36±0.19	13.49±0.82
8	4.12±0.35	1.22±0.34	5.54±0.22	1.68±0.12	12.56±1.21
9	0.59±0.31	0.56±0.23	6.95±0.15	6.01±0.21	14.11±1.18
10	2.56±0.26	0.85±0.32	6.22±0.21	4.58±0.23	14.21±1.34

根据检测结果可以看出,东北大豆资源在维生素E组分含量及总量上都存在很大的遗传变异。比较而言, γ -维生素E和 δ -维生素E含量较多,而 α -维生素E含量较少, β -维生素E含量更少。这些检测结果与文献报道的基本上是一致的,可见本方法不仅是可行的,而且还在高维生素E大豆育种和改良上具有绝对的优势。