

硬粒小麦类胡萝卜素含量的定量分析^{*}

孙延芳,王成社,杨进荣,刘 俊,邹淑芳

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用紫外分光光度法对 24 份不同类型硬粒小麦的类胡萝卜素含量进行了测定,建立了准确、快速和简便的硬粒小麦类胡萝卜素含量测定方法。结果表明,不同硬粒小麦品种类胡萝卜素光谱都显示 β -胡萝卜素特征吸收光谱峰形,特征吸收峰在 425~478 nm,主峰在 445 nm,确定的测定波长为 445 nm;不同硬粒小麦品种类胡萝卜素含量差异达极显著水平,变异范围在 3.533 3~8.653 3 mg/kg,平均值为 5.886 mg/kg,其中墨西哥 75 类胡萝卜素含量最高,为 8.653 3 mg/kg,其次是 CD85007-15-2、P468、新九师 89-1、M75、中硬 86173、ID84001、85(363)6,含量为 6.573 3~7.480 0 mg/kg,类胡萝卜素含量极低的硬粒小麦品种有可可瑞特和 P163。

[关键词] 硬粒小麦;类胡萝卜素;定量分析

[中图分类号] S512.1⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0102-05

Study on quantitative analysis of total carotenoids content in triticum durum

SUN Yan-fang, WANG Cheng-she, YANG Jin-rong, LIU Jun, ZOU Shu-fang

(College of Agriculture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract : Carotenoids were extracted from triticum durum seeds in this experiment. The content of total carotenoids of different varieties of triticum durum was studied by using the ultraviolet-visible spectrophotometry. The result showed that the UV-visible spectra apexes of β carotene was all showed on the carotenoid spectra of different triticum varieties. The apexes are on 425 - 478 nm and the main peak is on 445 nm, and the identified wavelength is 445 nm. Significant differences in carotenoids content were found among different varieties. The carotenoids content of 24 varieties varied from 3.533 3 - 8.653 3 mg/kg, and the average was 5.886 mg/kg; the highest content variety was Moxikali75 which was 8.653 3 mg/kg. The next content varieties were CD85007-15-2, P468, Xinjiushi 89-1, M75, Zhongying 86173, ID84001, 85(363)6 and the lowest content varieties were Kekeruite and P163.

Key words : triticum durum; carotenoids; quantitative analysis

类胡萝卜素(Carotenoids)是指由 8 个异戊二烯单位组成的碳氢化合物(胡萝卜素)及其氧化衍生物(叶黄素)两大类色素的总称^[1],是自然界广泛存在的天然色素。目前,已发现 600 多种天然类胡萝卜素,其广泛存在于植物、动物及微生物中。从生物体

提取并商业化生产的类胡萝卜素主要来源于植物,植物中的类胡萝卜素经人体吸收后,可以在体内转变为有生理活性的维生素 A,故类胡萝卜素是维生素 A 原,其中起主要作用的是 β -胡萝卜素^[2-3]。类胡萝卜素不仅可以用于食品的着色,改善食品的感

^{*} [收稿日期] 2006-04-03

[基金项目] 农业部“948”项目“优质抗病小麦种质的引进、评价、改良与创新”(2003-Q01);国家“863”项目“优质抗病小麦分子育种技术与应用研究”(2002AA207003);陕西省攻关项目“小麦生物技术育种及产业化开发”(2003K03-G1-01)

[作者简介] 孙延芳(1979-),女,山东枣庄人,在读硕士,主要从事农业生物技术研究。

[通讯作者] 王成社(1960-),男,陕西乾县人,教授,博士生导师,主要从事小麦生物技术育种研究。

E-mail: wangcs2008@126.com

观性能,而且还能够有效清除体内的自由基,预防和修复细胞损伤,抑制 DNA 氧化,预防癌症的发生,同时提高机体的免疫功能^[4-5]。随着类胡萝卜素制品在人们生活、保健、医疗上的重要性逐渐被人们所认识,以及需求量日益增大,开发利用天然类胡萝卜素资源已成为一个发展趋势。

硬粒小麦是制造意大利通心面的优质专用小麦原料,用硬粒小麦磨制成的颗粒粉可以不加任何添加剂,制成上百种不同花色品种的长、短型通心面,其营养价值高,煮熟面筋吸水后膨胀率低、面条不粘连、吃起来爽口、有嚼劲、易消化,克服了普通小麦粉面条煮熟后粘连糊口、无嚼劲的缺陷^[6-8]。与普通小麦相比,硬粒小麦胚乳呈黄色,含有丰富的类胡萝卜素,形成了人们对通心面传统上喜爱的颜色——琥珀色,是通心面重要的质量指标之一,更具有营养和保健功能^[9-10]。在国际贸易和食品科学分类上,以硬粒小麦为专用原料生产的通心面已构成一种独具特色、食用范围广、极受欢迎的面制品。硬粒小麦品质的优劣直接关系到通心面的商品外观、加工品质和蒸煮品质^[11]。传统通心面的外观应是富有光泽、透明状的琥珀色。硬粒小麦的类胡萝卜素含量较普通小麦高 1 倍,类胡萝卜素含量越高,通心面的商品

外观蒸煮品质越好^[12]。因此,在硬粒小麦品质育种中类胡萝卜素含量被列为一个必选的指标。类胡萝卜素常用的测定方法有紫外分光光度法、薄层色谱法和高效液相色谱法^[13]。其中紫外分光光度法较其他两种方法操作简便,不需要昂贵的仪器,更适用于类胡萝卜素总量的测定。

近年来,关于水果、蔬菜中类胡萝卜素的研究报道很多,而有关硬粒小麦类胡萝卜素或者其他谷物类胡萝卜素含量的测定方法尚未见报道。本试验采用紫外分光光度法对 24 份硬粒小麦种质资源中类胡萝卜素含量进行了测定,以期研究硬粒小麦中类胡萝卜素含量的测定方法,同时为硬粒小麦品质改良筛选优质材料提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

硬粒小麦种质资源 24 份,其编号、名称及来源见表 1,种植于西北农林科技大学试验田。田间采用单株点播,双行区,行长 2 m,株距 4 cm,行距 25~30 cm;常规田间管理,成熟时单收单脱,严防混杂,统一收获,晒干库存。

表 1 不同硬粒小麦品种编号、名称及来源

Table 1 Serial number ,name and origin of different varieties of triticum durum

编号 No.	品种名称 Variety name	来 源 Origin	编号 No.	品种名称 Variety name	来 源 Origin
1	墨西哥里 75 Moxikali 75	墨西哥 Mexico	13	硬 3 Ying 3	中国农科院 Chinese Academy of Agriculture Sciences
2	CD85007-15-2	中国科学院 Chinese Academy of Sciences	14	P402	澳大利亚 Australia
3	P468	澳大利亚 Australia	15	0487-91-2	智利 Chile
4	新九师 89-1 Xinjiushi 89-1	新疆 Xinjiang	16	Basamo	美国 America
5	M75	墨西哥 Mexico	17	87(931)4	中国农科院 Chinese Academy of Agriculture Sciences
6	中硬 86173 Zhongying 86173	中国农科院 Chinese Academy of Agriculture Sciences	18	87(981)2	中国农科院 Chinese Academy of Agriculture Sciences
7	ID84001	美国 America	19	91W010	叙利亚 Syria
8	85(363)6	阿根廷 Argentina	20	意大利硬粒小麦 Italian triticum durum	意大利 Italy
9	硬粒小麦 8091 Triticum durum 8019	意大利 Italy	21	ID84011	美国 America
10	DR173	加拿大 Canada	22	中引 799 Zhongyin 799	中国科学院 Chinese Academy of Sciences
11	硬 25 Ying 25	中国农科院 Chinese Academy of Agriculture Sciences	23	可可瑞特 Kekeruite	意大利 Italy
12	87(289)2-4-3	中国农科院 Chinese Academy of Agriculture Sciences	24	P163	澳大利亚 Australia

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 将不同硬粒小麦品种在恒温干燥箱干燥,电动粉碎机磨粉(孔径 0.30 mm),放在冰箱保存待用。由于类胡萝卜素理化性质不稳定,在进行类胡萝卜素提取与光谱分析时,应注意防止样品长期接触光、热、氧等条件,因此应在低温避光室中操作。

1.2.2 硬粒小麦类胡萝卜素溶液的制备 准确称取 1.00 g 硬粒小麦粉,放入具塞棕色试剂瓶中,加入 10 mL 浸提剂,为了达到高效提取类胡萝卜素的目的,溶液中加入 0.6%(以硬粒小麦的质量计)纤维素酶(cellulase)和 4%果胶酶(pectinase),回旋振荡器(45 °C,100 r/min)浸提 1.5 h,浸提 2 次,加入 5 mL 5%无水硫酸钠溶液静置分层,用胶头滴管小心吸取上层液于离心管中,10 000 r/min 离心 10 min,得到的硬粒小麦类胡萝卜素溶液用于光谱分析。

1.2.3 特征吸收光谱的确定 精确称取β胡萝卜素标样(Sigma 公司)5 mg 于 100 mL 容量瓶,用 1 mL 三氯甲烷溶解,并用丙酮-石油醚(体积比 2:1)定容,得到质量浓度 50 μg/mL 标准溶液;紫外分光光度计(UV-2550)进行波谱扫描,应用 SHIMADZU 公司 UVProbe 2.20 软件绘制光谱图像。

将 1.2.2 中得到的硬粒小麦类胡萝卜素溶液在 300~800 nm 进行波谱扫描,并与β胡萝卜素标样特征光谱进行比较,确定试验测定波长。

1.2.4 标准曲线的制作 分别吸取β胡萝卜素标准溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL 于 50 mL 容量瓶,并用丙酮-石油醚(体积比 2:1)定容,得到质量浓度分别为 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 μg/mL 标准溶液,在所选测定波长处用分光光度计测定吸光度,重复 3 次,用 Excel 软件绘制标准曲线。

1.2.5 硬粒小麦类胡萝卜素含量的测定 在选择波长处测定 24 份硬粒小麦品种提取的类胡萝卜素溶液的吸光度值,每品种设置 3 个重复。

类胡萝卜素总量测定参照 GB/12291-90“水果、蔬菜汁类胡萝卜素全量的测定”方法^[14],并按下式计算:

$$X(\text{mg/kg}) = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{A \%_{1\text{cm}} \cdot 1\,000 \cdot g},$$

式中: X 为类胡萝卜素含量, A 为在测定波长处的吸光度值, V 为提取类胡萝卜素溶液的量, $A \%_{1\text{cm}}$ 为胡萝卜素分子比消光系数 2 500, g 为硬粒小麦粉质量。

1.3 数据处理

所得试验数据用 SAS 软件 Duncan 进行差异显著性多重比较。

2 结果与分析

2.1 类胡萝卜素特征吸收光谱及其波长的选择

β胡萝卜素标样在紫外记录光谱仪上进行紫外光扫描,结果见图 1。由图 1 可见,吸收光谱有两个吸收峰,最大吸收峰位置在 445 nm。

硬粒小麦类胡萝卜素溶液的光谱扫描结果如图 2 所示,与图 1 比较发现,在 400~500 nm 内硬粒小麦墨西卡里 75 类胡萝卜素与β胡萝卜素标样特征吸收光谱相似,都有两个明显的吸收峰,说明墨西卡里 75 类胡萝卜素主要为β胡萝卜素。对 24 份硬粒小麦类胡萝卜素分别进行光谱扫描,发现不同硬粒小麦品种类胡萝卜素光谱都显示β胡萝卜素特征吸收光谱峰形,特征吸收峰在 425~478 nm,主峰在 445 nm,肩峰在 465 nm。因此,本试验将测定波长定为 445 nm。

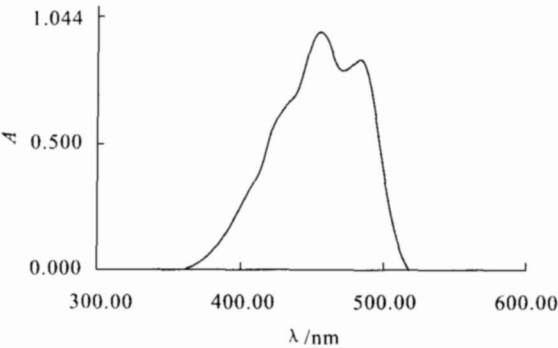


图 1 β胡萝卜素特征吸收光谱
Fig. 1 UV-visible spectra of β carotene

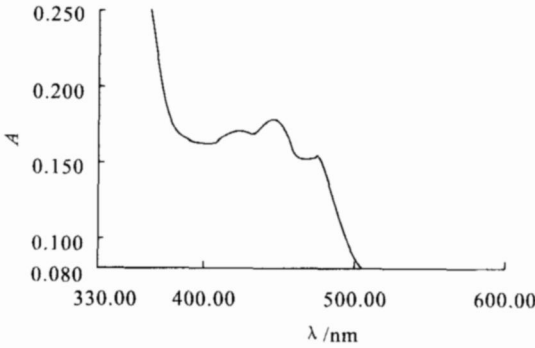


图 2 硬粒小麦墨西卡里 75 特征吸收光谱
Fig. 2 UV-visible spectra of Moxikali 75

2.2 β-胡萝卜素标准曲线

β-胡萝卜素标准曲线见图 3,回归模型为 $Y = 0.2964X - 0.0001$, $R^2 = 0.9999$,说明模型很好地拟合了试验数据,回归方程的线性良好,在 $0.2 \sim 1.2 \mu\text{g/mL}$ 内可用于类胡萝卜素的定量分析测定。

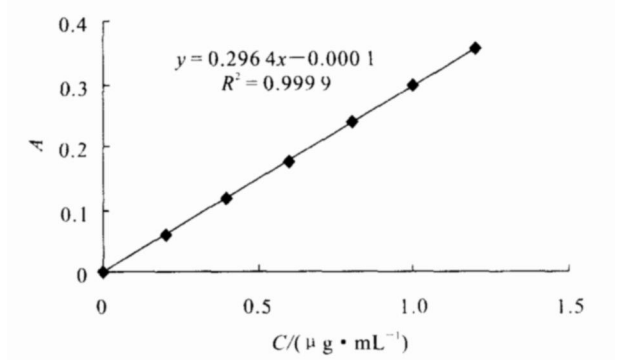


图 3 β-胡萝卜素的标准曲线

Fig.3 Standard curve of sample of β-carotene

2.3 不同硬粒小麦品种的类胡萝卜素含量比较

由表 2 可知,不同硬粒小麦品种类胡萝卜素含量为 $3.5333 \sim 8.6533 \text{ mg/kg}$,差异极显著,平均为 5.886 mg/kg ,其中墨西哥卡里 75 类胡萝卜素含量最高,为 8.6533 mg/kg ,极显著高于其他品种;CD85007-15-2 极显著高于除 P468、新九师 89-1、M75、中硬 86173、ID84001、85(363)6 外的其余品种;CD85007-15-2、P468、新九师 89-1、M75、中硬 86173、ID84001、85(363)6 之间差异不显著,类胡萝卜素含量在 $6.3067 \sim 7.4800 \text{ mg/kg}$,是硬粒小麦种质资源中类胡萝卜素含量高的品种,可以作为硬粒小麦品质改良筛选的优质材料;硬粒小麦 8019、DR173、硬 25、87(289)2-4-3、硬 3、P402、0487-91-2、Basamo、87(931)4、87(981)2、91W010、意大利硬粒小麦、ID84011、中引 799 类胡萝卜素含量较高,为 $5.0267 \sim 6.0000 \text{ mg/kg}$,可可瑞特和 P163 含量最低,为 $3.5333 \sim 4.0933 \text{ mg/kg}$,二者差异不显著。

表 2 不同硬粒小麦品种的类胡萝卜素含量比较

Table 2 Content of carotenoids in different triticum durum		mg/ kg	
品种名称 Variety name	类胡萝卜素含量 Carotenoids content	品种名称 Variety name	类胡萝卜素含量 Carotenoids content
墨西哥卡里 75 Moxikali 75	8.6533 A	硬 3 Ying 3	5.6400 EFG
CD85007-15-2	7.4800 B	P402	5.6000 EFG
P468	7.3600 BC	0487-91-2	5.5333 EFG
新九师 89-1 Xinjiushi 89-1	7.1067 BCD	Basamo	5.3333 FG
M75	7.0933 BCD	87(931)4	5.3200 FG
中硬 86173 Zhongying 86173	6.6267 BCDE	87(981)2	5.2533 FG
ID84001	6.5733 BCDE	91W010	5.1333 FGH
85(363)6	6.3067 BCDE	意大利硬粒小麦 Italian triticum durum	5.1067 FGH
硬粒小麦 8019 Triticum durum 8019	6.0000 DEFG	ID84011	5.0667 GH
DR173	5.9200 EFG	中引 799 Zhongyin 799	5.0267 GH
硬 25 Ying 25	5.7733 EFG	可可瑞特 Kekeruite	4.0933 HI
87(289)2-4-3	5.7333 EFG	P163	3.5333 I

注:同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著 ($P < 0.01$)。
Note:Data in the same column with different letter mean the significant differences ($P < 0.01$)。

3 讨 论

3.1 不同硬粒小麦品种类胡萝卜素的含量分析

本研究结果表明,不同硬粒小麦品种类胡萝卜素含量差异达极显著水平,平均值为 5.886 mg/kg ,变异范围为 $3.5333 \sim 8.6533 \text{ mg/kg}$,墨西哥卡里 75 类胡萝卜素含量极显著高于其他所有品种,其类胡

萝卜素含量为 8.6533 mg/kg ,而 CD85007-15-2 极显著高于除 P468、新九师 89-1、M75、中硬 86173、ID84001、85(363)6 外的其余品种,CD85007-15-2、P468、新九师 89-1、M75、中硬 86173、ID84001、85(363)6 之间差异不显著,是硬粒小麦种质资源中类胡萝卜素含量高的品种,可以作为硬粒小麦品质改良筛选的优质材料。类胡萝卜素含量较高的有硬

粒小麦 8019、DR173、硬 25、87 (289) 2-4-3、硬 3、P402、0487-91-2、Basamo、87 (931) 4、87 (981) 2、91W010、意大利硬粒小麦、ID84011、中引 799,含量极低的有可可瑞特和 P163,在品种资源选育中这些将是不予考虑的材料。

3.2 硬粒小麦类胡萝卜素提取

由于硬粒小麦较蔬菜、水果更难分离提取类胡萝卜素,且类胡萝卜素性质不稳定,故本试验在提取过程中采用复合酶破壁方法,即在溶液中依次加入 0.6%纤维素酶(20 000 U/g)和 4%果胶酶(30 000 U/g),且二者间隔 0.5 h,浸提 2 次,可达到最大的提取效果。这是因为植物细胞壁是一个极其复杂的体系,主要由纤维素搭成骨架,其中填充有大量半纤维素、果胶等物质,还有相当量的木质素,这些物质相互交融构成了极其复杂的结构体系,在提取类胡萝卜素时必须克服细胞壁及细胞间质的双重阻力;而纤维素酶单独使用难以将细胞壁彻底裂解,与果胶酶搭配,则能减小细胞壁、细胞间质等屏障对有效成分的传质阻力,可达到高效提取类胡萝卜素的目的。研究表明,使用复合酶处理的效果较单一酶好,且先经纤维素酶处理再经果胶酶处理的效果优于先经果胶酶处理再经纤维素酶处理^[15-17]。

3.3 硬粒小麦类胡萝卜素的测定方法

提取的硬粒小麦类胡萝卜素通过紫外分光光度计扫描发现,一个主峰在 445 nm,呈典型的类胡萝卜素吸收光谱峰形,只是不同品种硬粒小麦在各峰的吸收值不同,这说明不同品种硬粒小麦含有的类胡萝卜素成分基本相同,但含量有差异。

对墨西哥卡里 75 与 β -胡萝卜素标样特征吸收光谱峰进行比较发现,虽然在 400~500 nm 都有两个明显的吸收峰,但在 425 nm 处墨西哥卡里 75 与 β -胡萝卜素波谱吸收峰有明显不同,且在 330~400 nm 还有一个很大的吸收峰,这种现象说明硬粒小麦墨西哥卡里 75 类胡萝卜素还存在除 β -胡萝卜素外的其他类胡萝卜素。对其他类胡萝卜素进一步定性鉴定可以借助先进的检测仪器,如高效液相色谱(HPLC)的发展为类胡萝卜素定性定量分析提供了快速精确的纯化方法,另外可以借助质谱、核磁或红外光谱等技术进行类胡萝卜素成分的精确鉴定^[18]。

类胡萝卜素提取和分析虽然已经取得了一定的进展,但仍存在许多问题,由于类胡萝卜素成分的多样性及存在形式的复杂性,有时结构近似的两种或

多种类胡萝卜素往往难以分离,在提取方法以及组分分析的研究中,尚待进一步完善和提高。

[参考文献]

- [1] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005:20-36.
- [2] Harald M. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection[J]. Springer Verlag,1997,12(4):88-94.
- [3] Boehm F, Edge R, Land E J, et al. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999,11(9):621-622.
- [4] Howitt, Crispin A, Barry J, et al. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues[J]. Plant Cell & Environment, 2006,29(3):435-445.
- [5] 韩雅珊. 类胡萝卜素的功能研究进展[J]. 中国农业大学学报, 1999,4(1):5-9.
- [6] 肖建国. 我国应大力开发硬粒小麦资源及其加工产品[J]. 麦类作物学报, 2003,23(3):46-48.
- [7] Paolo A, Fadila B. Defining subregions and estimating benefits for a specific-adaptation strategy by breeding programs:a case study crop science madison[J]. Nature, 2005,45(1):1741-1743.
- [8] Pasqualone A, Lotti C, Blanco A. Identification of durum wheat cultivars and monovarietal semolinas by analysis of DNA microsatellites[J]. Springer Berlin/ Heidelberg,1999,210(2):144-147.
- [9] 杨紫薇. 硬粒小麦面筋和黄色素含量早代选择[J]. 麦类作物学报,1999,19(6):8-10.
- [10] Eticha F, Belay G, Bekele E, et al. Species diversity in wheat landrace populations from two regions of Ethiopia[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006,53(2):387-393.
- [11] Marcia W. Calculating the carotenoids in a full favorite[J]. Agricultural Research,2005,53(10):1-2.
- [12] Thomas F, Diana S, Swanhild L, et al. Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots[J]. Springer Berlin/ Heidelberg,2002,216(1):148-154.
- [13] 陈志辉. 胡萝卜中天然胡萝卜素提取工艺的研究[J]. 农产品加工学刊,2005,11(4):13-18.
- [14] GB/12291-90 水果、蔬菜汁类胡萝卜素全量的测定[S].
- [15] 车振明. 酶法提高胡萝卜汁中 β -胡萝卜素含量[J]. 食品科学, 2004,9(6):35-38.
- [16] 徐学万, 张 芳. 纤维素酶的特性及其在食品工业中的应用[J]. 粮食与食品工业,2001,3(4):14-17.
- [17] 梁 靖, 须海荣. 纤维素酶在速溶茶中的应用研究[J]. 中国茶叶,2002,28(1):25-26.
- [18] 王 强, 韩雅珊, 戴蕴青. HPLC 在食物类胡萝卜素分析中的应用[J]. 分析测试学报,1998,17(2):80-83.