

HPLC 法测定谷子籽粒叶酸含量及种质资源评价^①

侯思宇, 宋 敏, 闫陆飞, 孙朝霞, 韩渊怀*, 李红英

(山西农业大学农学院, 山西太谷 030801)

摘 要: 谷子籽粒中富含叶酸, 作为一种功能性食品深受北方人民的喜爱, 而作物籽粒, 如小米叶酸测定方法及含量分析存在较大差异, 为小米品质鉴定及高叶酸谷子种质筛选造成了一定困难。本研究通过“三酶法”提取小米中的叶酸, 建立了一种基于高效液相色谱技术(HPLC)高效化、规模化且稳定适用于测定谷子籽粒叶酸含量的方法, 对 2016 年和 2017 年种植的 45 个谷子种质进行叶酸含量测定和分类评价。结果表明: 叶酸标准品梯度曲线呈线性方程相关, 相关系数为 0.99; 小米样品叶酸测定过程中精密性、稳定性和重复性的相对标准偏差(RSD)分别为 0.81%、1.19% 和 1.65%, 各项指标符合精密测定标准, 准确度高, 重复性好; 45 个谷子种质籽粒叶酸含量分布范围为 0.26 ~ 2.56 $\mu\text{g/g}$ (2016 年度)和 0.53 ~ 2.86 $\mu\text{g/g}$ (2017 年度), 含量均值分别为 1.19 和 1.84 $\mu\text{g/g}$, 标准差 0.47 和 0.51 $\mu\text{g/g}$, 变异系数 39.5% 和 27.7%; 对上述种质进行正态分布曲线分析, 发现叶酸含量整体呈现偏度分布; 从中筛选出 9 个高叶酸(含量 $\geq 1.91 \mu\text{g/g}$)和 3 个低叶酸(含量 $\leq 1.15 \mu\text{g/g}$)的谷子种质。上述结论为小米叶酸含量提供了测定标准和评价体系, 也为高叶酸谷子种质创新与利用奠定了基础。

关键词: 谷子; 高效液相色谱法; 叶酸; 种质资源

中图分类号: S515; S326

文献标识码: A

叶酸(folic acid), 又称维生素 B₉, 参与生物的一碳代谢^[1]。在植物中, 叶酸所介导的一碳代谢反应涉及生物体内核酸、氨基酸和泛酸盐等代谢功能, 还促进植物木质素合成和光呼吸, 具有广泛的生物学意义^[2-3]。叶酸对人类营养和健康有着不容忽视的作用, 尤其是预防新生儿先天疾病方面具有重要意义^[4]。另外, 最新的研究表明, 叶酸在抑郁症^[5]、阿兹海默症^[6]、慢性胃酸性胃炎^[7]等疾病的治疗和预防方面都有一定的功效。植物、真菌和大多数细菌都具备从头合成叶酸的能力, 但是高等动物包括人类却无法自身合成叶酸, 其来源完全依赖日常饮食摄入, 从而完成体内生理生化代谢过程^[8]。为了弥补叶酸缺乏, 我国自 1998 年起开始了叶酸强化政策, 规定在小麦面粉中添加量为 1 ~ 3 mg/kg^[9]。尽管当前市场能够提供多种富含叶酸食品, 且多个国家(包括中国)也制定了免费发放叶酸片剂以满足叶酸缺乏人群的相关政策, 但对于多数发展中国家, 尤其是偏远地区, 由于饮食习惯等原因导致部分人群仍然严重缺乏叶酸。

谷子(*Setaria italica* (L.) P. Beauvois)是重要的杂

粮作物, 也是“老少边穷”地区重要作物, 其籽粒脱壳后称之为“小米”, 富含多种营养物质。在山西、陕西、河北、内蒙、东北等地, 一直有种植谷子的传统, 尤其深受孕妇和老人喜爱。随着“健康中国”理念的深入人心, 人们日常摄入食物的多样性日益增加, 谷子作为叶酸强化食品原料也越来越被普通大众认可^[10]。尤其是种植于山西地区的小米本身具有高叶酸含量这一独特品质, 越来越受到人们的喜爱。目前, 在植物叶酸提取工艺优化^[11]、营养价值评价^[12]及作物转基因叶酸育种^[13-17]等研究方面已取得一些成果。尽管已报道了一些植物叶酸提取方法, 如单酶法^[18]、水浴浸提法^[19]、超声提取法^[20]和三酶法^[21]等, 但有关谷子籽粒叶酸测定的报道较少。本试验优化了一种适用于谷子籽粒叶酸提取的三酶法, 同时建立了高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定叶酸的方法, 并基于这种稳定可靠和规模化提取-测定叶酸的最优方法, 对 45 份谷子种质进行了叶酸分类评价, 为评价优异谷子种质, 尤其是评价高叶酸谷子种质提供了方案及标准。

^①基金项目: 山西省农谷建设科研专项项目(SXNGJSKYZX201702)资助。

* 通讯作者(swgetd@163.com)

作者简介: 侯思宇(1980—), 男, 山西陵川人, 博士, 副教授, 主要从事谷子营养品质研究。E-mail: 18635068055@163.com

1 材料和方法

1.1 试验材料及种植情况

收集了 45 个谷子种质资源,于 2016 年和 2017 年种植于山西农业大学农学院试验站 2 个不同地块中(37°42'N, 112°58'E),成熟期收获谷子单穗,并脱粒作为试验材料。供试土壤为黄壤土,参考董建江

等^[22]和刘钊等^[23]方法,测定了 2 个试验地原始土壤肥力特性(表 1)。

1.2 谷子籽粒叶酸提取方法

参考孟繁磊等^[24]采用三酶法提取大豆籽粒叶酸方法,针对小米叶酸提取略有改动。如:将小米研成粉末过 100 目筛子;叶酸提取液依次加入 8 μ l α -淀粉酶、70 μ l 蛋白酶和 2%大鼠血清(活性炭过滤)。

表 1 试验土壤主要肥力特性

试验点	pH	有机质(g/kg)	全盐量(g/kg)	碱解氮(mg/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)
试验地 I (2016 年)	8.01	19.73	0.393	54.18	8.23	128.2
试验地 II (2017 年)	8.05	26.23	0.419	72.24	7.08	195.1

1.3 HPLC 法测定叶酸标准品及样品

精确称取 0.01 g 叶酸标准品,用 0.1 mol/L KH_2PO_4 (pH 7.0, 1% 抗坏血酸, 0.1% β -巯基乙醇)溶解定容至 10 ml,得到浓度为 1 μ g/ μ l 的叶酸标准品母液,从中吸取 1 μ l 定容至 1 ml,即叶酸标准液浓度为 1 ng/ μ l;分别吸取叶酸标准液 1、2、4、6、8、10、16、20、30、50 μ l 定容至 1 ml,分别即为 1、2、4、6、8、10、16、20、30、50 ng/ μ l;经 0.45 μ m 滤膜过滤后放于棕色进样瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置备用,得到浓度为 1 ~ 50 ng/ μ l 叶酸标准品溶液,设置 3 次重复并记录峰面积平均值。横坐标为进样叶酸含量,纵坐标峰为面积绘制标准曲线。

叶酸测定色谱条件:配置的流动相为 0.01 mol/L KH_2PO_4 : CH_3OH (89:11, pH 6.3);液相色谱仪设定柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;流速为 1.0 ml/min;进样量为 20 μ l;紫外检验波长 280 nm;使用 C_{18} 色谱柱(4.6 nm $\times$ 150 nm $\times$ 5 μ m)进行分析。

以‘晋谷 21’为检测样品,针对叶酸的精密度的稳定性和重复性进行分析。

1.4 数据统计分析

所有测定样品的数据采用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 20.0 软件进行处理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 叶酸标准曲线建立及色谱图分析

以叶酸标准品含量为横坐标,所对应峰面积为纵坐标绘制叶酸标准曲线,并计算得到线性回归方程为 $y=0.7212x+0.5611$,其绝对系数 $R^2=0.9988$ 。结果表明,谷子叶酸标准品的含量与峰面积呈线性对应关系,叶酸在 1 ~ 50 ng/ μ l 范围内线性关系良好。对比叶酸标准品及谷子籽粒提取样品色谱图(图 1A 和 1B),结果表明,叶酸标准品峰型保留时间在 3.24

min,其峰型单一,峰尖锐利,结果表明标准品纯度较高,无杂质残留。相比标准品测定色谱图,小米样品,保留时间 1 ~ 3 min 存在杂峰,在 3.24 min 可检测到峰型,其峰型与叶酸标准品一致,且峰形锐利。以上结果表明,采用高效液相色谱的方法可以准确检测到谷子叶酸组分,并进行相对定量,并为后续测定谷子叶酸含量试验奠定基础。

2.2 叶酸样品精密度的稳定性及重复性检测

对 30 ng/ μ l 的叶酸溶液和晋谷 21 浸提液分别平行进样 5 次,记录峰面积,测得标品和样品的叶酸峰面积平均值分别为 22.34 mAU 和 18.75 mAU,相对标准偏差 RSD 值分别为 0.79% 和 0.81%,均 $<1\%$ (表 2),表明本试验仪器精密度较好,可用于进行相关测定试验。

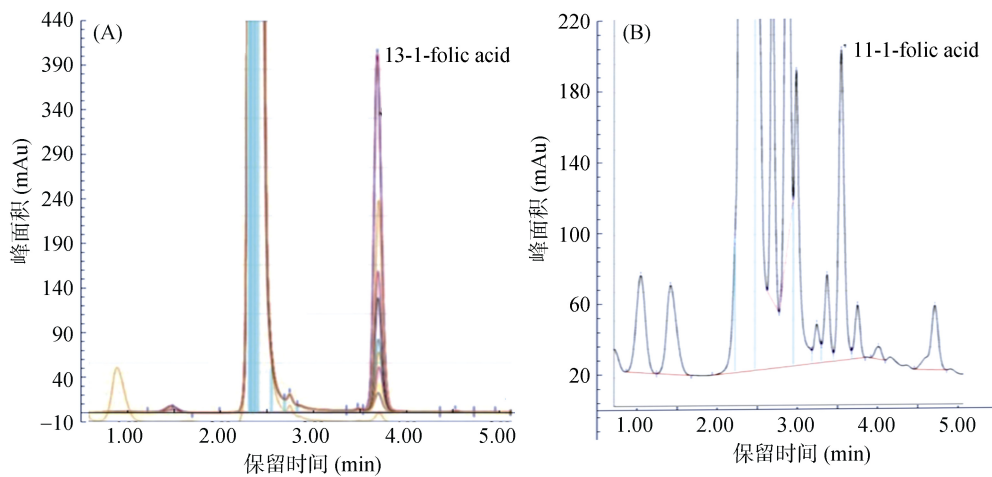
在测定的 12 h 内,样品浸提液每隔 2 h 进样一次并记录峰面积,测得 RSD 为 1.19%, $<2\%$ (表 3),符合中华人民共和国药典中重现性 RSD $<2\%$ 的要求;5 次样品浸提液峰面积的平均值为 18.71 mAU, RSD 为 1.65%(表 4),说明样品提取的重复性较好,数据重现性较好,稳定性高。

2.3 谷子叶酸含量差异分析与种质评价

如表 5 和图 2 所示,2016 年种植于试验田 I 的小米叶酸含量整体呈正态分布,变化幅度为 0.26 ~ 2.56 μ g/g,中位值为 1.25 μ g/g,平均含量为 1.19 μ g/g,变异系数为 39.5%;该年不同谷子种质叶酸含量正态分布曲线显示,其偏度系数为 0.2(>0),叶酸含量测定值重尾在右侧为右偏态,峰度系数为 0.28,说明多数品种的叶酸含量大于平均值。同样的,2017 年小米叶酸含量也呈正态分布,变化幅度为 0.53 ~ 2.86 μ g/g,中位值为 1.92 μ g/g,平均含量为 1.84 μ g/g,变异系数为 27.7%,较上一年高。而 2017 年谷子叶酸偏度系数和峰度系数分别为 -0.26 和 -0.36(均 <0),

说明叶酸含量正态分布曲线重尾在左侧为左偏态,且多数品种的叶酸含量小于平均值 1.84 $\mu\text{g/g}$ 。通过比较 2016 年和 2017 年种植的小米叶酸含量的各项统计

值,发现这两年的叶酸含量差异较大。



(A. 叶酸标准品; B. 谷子籽粒提取样品)

图 1 高效液相色谱测定叶酸分析图

表 2 精密度试验结果

检测项目	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均值	RSD(%)
标品峰面积(mAU)	22.25	22.34	22.10	22.45	22.56	22.34	0.79
样品峰面积(mAU)	18.71	18.93	18.57	18.88	18.56	18.75	0.81

表 3 稳定性试验结果

检测项目	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	平均值	RSD(%)
样品峰面积(mAU)	18.71	18.54	18.30	18.21	18.14	18.25	18.35	1.19

表 4 重复性试验结果

检测项目	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均值	RSD(%)
样品峰面积(mAU)	18.71	19.12	18.29	18.53	18.94	18.71	1.65

表 5 谷子叶酸含量统计($\mu\text{g/g}$)

年份	极小值	极大值	中位数	均值	标准差	变异系数(%)	偏度系数	峰度系数
2016	0.26	2.56	1.25	1.19	0.47	39.5	0.20	0.28
2017	0.53	2.86	1.92	1.84	0.51	27.7	-0.26	-0.36

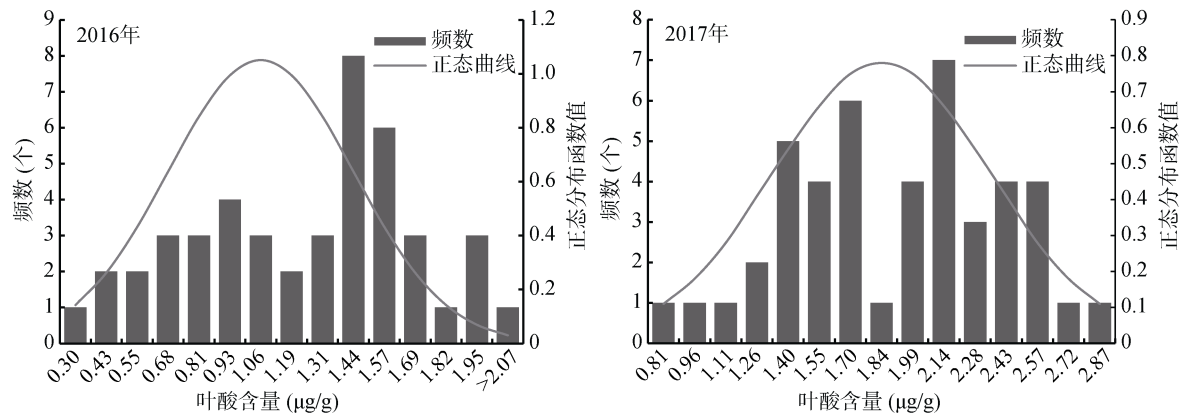


图 2 2016 年和 2017 年 45 份谷子品种叶酸含量整体分布

以平均值和标准差为判断依据,将含量 $\geq 1.91 \mu\text{g/g}$ 的定为高叶酸品种, $\leq 1.15 \mu\text{g/g}$ 的定为低叶酸品种,其中高叶酸谷子种质有:B360、SX32、豫谷1号、晋汾52、晋谷29、B387、晋谷35、长生08和晋谷21等;低叶酸谷子种质主要有:平定大谷、SX39和B185(表6)。

表 6 部分高、低叶酸含量谷子种质($\mu\text{g/g}$)

谷子种质	2016 年	2017 年	原产地
B360	2.01 ± 0.04	2.68 ± 0.12	河北
SX32	2.34 ± 0.12	2.44 ± 0.15	山西
豫谷 1 号	1.65 ± 0.24	2.38 ± 0.12	河南
晋汾 52	1.49 ± 0.18	2.26 ± 0.22	山西
晋谷 29	1.65 ± 0.23	2.25 ± 0.25	山西
B387	1.41 ± 0.16	2.13 ± 0.29	辽宁
晋谷 35	1.51 ± 0.03	2.10 ± 0.31	山西
长生 08	1.60 ± 0.12	2.04 ± 0.24	山西
晋谷 21	1.46 ± 0.15	2.00 ± 0.02	山西
平定大谷	1.13 ± 0.12	1.15 ± 0.22	山西
B185	0.79 ± 0.29	1.10 ± 0.11	河北
SX39	0.79 ± 0.12	1.09 ± 0.08	山西

3 讨论

本试验首次采用三酶法对小米的叶酸进行提取,与前人曾采用的水浴浸提法相比^[25],二者都选用磷酸缓冲溶液作提取液,不同点是水浴浸提法采用化学方法,用活性炭吸附叶酸后再依次洗脱;而本文采取较温和的生物酶解法,先用 α -淀粉酶去糊化,再用蛋白酶去蛋白,最后采用大鼠血清将多聚谷氨酸叶酸水解成单谷氨酸叶酸。由于叶酸提取过程中很容易被氧化降解,而三酶法反应温和,相比其他化学方法可以较好保护叶酸,防止其被氧化,并且被很多学者应用于其他作物的叶酸提取。孟繁磊等^[24]和董薇^[26]研究采用各自优化的体系分别对大豆种子和大米籽粒进行总叶酸提取,可见三酶法是目前作物叶酸提取的首选方法。另外,目前测定叶酸的主要方法有高效液相色谱法、微生物检测法以及间接荧光法。邵丽华和王莉^[25]采用间接荧光法测定小米叶酸虽然能测定出叶酸总含量,但相对标准偏差为1.68%,本试验为0.30%,因此高效液相色谱法测定叶酸精确度更高。此外前人报道微生物检测法的重复性较差,而本研究中采用高效液相色谱法测定叶酸的重复性和精密度都较好。

酵母、肝脏等动物类食品中富含较多叶酸,而绿

叶蔬菜和豆类等植物类食品也富含叶酸,相比之下,谷类作物其叶酸含量较低。本研究对45份谷子种质资源籽粒进行总叶酸含量测定,综合两年测定数据,分析表明小米叶酸含量变幅为 $0.23 \sim 2.86 \mu\text{g/g}$,平均叶酸含量为 $1.52 \mu\text{g/g}$ 。相关研究表明,不同品种糙米和精米的叶酸含量,其变化幅度分别为 $0.133 \sim 1.114 \mu\text{g/g}$ 和 $0.103 \sim 0.777 \mu\text{g/g}$ ^[26]。大豆籽粒叶酸含量为 $1.436 \sim 3.096 \mu\text{g/g}$ ^[24]。主要粮食的叶酸含量在 $0.39 \sim 2.63 \mu\text{g/g}$ 范围内,其中大豆>花生>绿豆>小米>燕麦>玉米>苦荞>黍米>面粉>薏米>大米^[25]。同时研究发现豆类远远大于谷物或玉米,最少的是糙米和大米^[26]。由此可见,在主要的作物中,小米叶酸含量仅次于大豆,为满足成年人日均叶酸最佳摄入量 $400 \mu\text{g}$ 以及孕妇 $600 \mu\text{g}$ 的需求量,建议要均衡饮食,平时要多摄入豆类以及蔬菜等富含叶酸的食物,尤其是青少年、老人以及孕妇等容易缺乏叶酸的人群。

此外,谷子不宜重茬,因此本试验选用不同地块种植,45份谷子资源叶酸含量测定,发现两年间谷子籽粒叶酸含量差异较大。其原因可能为谷子籽粒叶酸含量与土壤条件有一定关系,同一品种的谷子因为种植土壤的条件不同,叶酸含量也存在较大差异,如晋谷21在2017年的叶酸含量为 $2.00 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$,而2016年的叶酸含量却为 $1.46 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$,两者叶酸含量存在明显差异。前人研究发现不同生态条件下,小米叶酸含量有明显差异,这表明小米的叶酸含量不仅与品种差异有关,还可能与土壤条件、气候、生态环境等因素有关,同时研究发现小米叶酸含量与米色差异有关^[27],因此我们下一步计划探究米色色泽与叶酸以及类胡萝卜素之间的分子机理,为以后打造山西功能性小米的发展做铺垫。

参考文献:

- [1] Bekaert S, Storozhenko S, Mehrshahl P, et al. Folate biofortification in food plants[J]. Trends Plant Science, 2008, 13(1): 28–35
- [2] Hanson A D, Gage D A, Hill Y S. Plant one-carbon metabolism and its engineering[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(5): 206–213
- [3] Ravanel S, Block M A, Rippert P, et al. Methionine metabolism in plants: Chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(21): 22548–22557
- [4] 马爱勤, 汪之瑛. 叶酸营养与孕期保健[J]. 环境卫生学杂志, 2009(6): 390–392
- [5] 刘朝, 宁艳玲, 贾占玲, 等. 叶酸对抑郁症的辅助治疗[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2004, 13(2): 169–170

- [6] Ramos M I, Allen L H, Mungas D M, et al. Low folate status is associated with impaired cognitive function and dementia in the Sacramento Area Latino Study on Aging[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 82(6): 1346–1352
- [7] Blancquaert D, Storozhenko S, Loizeau K, et al. Folate and folic acid: From fundamental research toward sustainable health[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2010, 29(1): 14–35
- [8] Iyer R, Tomar S K. Folate: A functional food constituent[J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(9): 114–122
- [9] 都薇, 蔺娜, 王彩琴, 等. 高效液相色谱法测定小麦粉中烟酸、叶酸含量的探讨[C]. 中国粮油标准质量年会暨中国粮油学会粮油质检研究分会第一次代表大会. 2009: 64–69
- [10] He L, Zhang B, Han Y H. Foxtail millet: Nutritional and eating quality, and prospects for genetic improvement[J]. *Frontiers of Agricultural Science & Engineering*, 2015, 2(2): 124–130
- [11] 任文芳, 杨润强, 顾振新, 等. 植物源食品中叶酸的生物合成与调控及其提取与检测技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(9): 335–341
- [12] Bali S, Robinson B R, Sathuvalli V, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers associated with high folate content in wild potato species[J]. *Plos One*, 2018, 13(2): e0193415
- [13] Roci Garza A D L, Quinlivan E P, et al. Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(38): 13720
- [14] Nunes A C S, Kalkmann D C, Aragão F J L. Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene[J]. *Transgenic Research*, 2009, 18(5): 661–667
- [15] Gorelova V, Ambach L, Rébeillé F, et al. Folate in plants: Research advances and progress in crop biofortification[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2017, 5: 21
- [16] 常娜宁, 姜凌, 蒲训, 等. 作物叶酸检测方法的研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(2): 44–49
- [17] 梁业红, Arnaud B, 范云六. 异源表达细菌二氢喋呤合成酶基因提高拟南芥叶酸含量的研究[J]. *作物学报*, 2006, 32(2): 164–168
- [18] Iwatani Y, Arcot J, Shrestha A K. Determination of folate contents in some Australian vegetables[J]. *J. Food Comp Anal.*, 2003, 16(1): 37–48
- [19] 张毅. 叶菜中叶酸含量的 HPLC 测定条件及不同处理方式对叶酸保留效果研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016
- [20] 郭健, 李敏, 孟妍, 等. 荧光分光光度法测定食品中叶酸的含量[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(10): 1259
- [21] Zhang H, Jha A B, Warkentin T D, et al. Folate stability and method optimization for folate extraction from seeds of pulse crops using LC-SRM MS[J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2018, 71: 44–55
- [22] 董建江, 邵伏文, 张林, 等. 不同耕作模式对稻田土壤理化性质及经济效益的影响[J]. *土壤*, 2015, 47(3): 509–514
- [23] 刘钊, 魏天兴, 朱清科, 等. 黄土丘陵沟壑区典型林地土壤微生物、酶活性和养分特征[J]. *土壤*, 2016, 48(4): 705–713
- [24] 孟繁磊, 张玲, 张原宇, 等. 大豆叶酸的三酶法提取及微生物检测技术研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2016, 12(12): 56–59
- [25] 邵丽华, 王莉. 粮食及果蔬中叶酸含量分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 290–294
- [26] 董薇. 水稻籽粒叶酸含量 QTL 分析及生物强化[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011
- [27] 邵丽华, 王莉, 白文文, 等. 山西谷子资源叶酸含量分析及评价[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(7): 1265–1272

Evaluation and Detection of Folic Acid Content of Seeds Among Foxtail Millet Accessions by HPLC Method

HOU Siyu, SONG Min, YAN Lufei, SUN Zhaoxia, HAN Yuanhuai*, LI Hongying

(College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: Foxtail millet is a kind of functional food rich in folic acid, and it is popular in the northern China. However, there are significant differences in folic acid contents in crop grains, such as the determination method and content analysis of folate in Foxtail millet, which make it difficult to identify the quality of millet and select the germplasm with high folate content. In this study, 'triple-enzymes method' was used to isolate folic acid from foxtail millet grains and construct a large-scale detection method by HPLC for folic acid content. Meantime, the folic acid contents were assessed among 45 accessions of foxtail millet in 2016 and 2017. The results showed that: based on HPLC, a folic acid content determination method for foxtail millet was successfully established. Folic acid standard curve showed the linear correlation between folic acid standard and peak area value, the correlation coefficient was 0.99. The relative standard deviation (RSD) was used to evaluate the precision, stability and repeatability in the detection process of folic acid content, and they were 0.81%, 1.19% and 1.65%, respectively. The range of grain folic acid content of 45 millet varieties were 0.26 ~ 2.56 $\mu\text{g/g}$ in 2016 and 0.53 ~ 2.86 $\mu\text{g/g}$ in 2017, with average values of 1.19 and 1.84 $\mu\text{g/g}$, standard deviation of 0.47 and 0.51 $\mu\text{g/g}$, and variation coefficient of 39.5% and 27.7%, respectively. The gaussian distribution had a little skewness. Finally, 9 high folic acid (folate content $\geq 1.91 \mu\text{g/g}$) and 3 low folic acid (folate content $\leq 1.15 \mu\text{g/g}$) accessions were screened from 45 millet accessions, respectively. This study not only provided the standard determination and evaluation system of folate in foxtail millet, and also laied a foundation for the innovation and utilization of high folate germplasm of foxtail millet.

Key words: Foxtail millet; HPLC; Folic acid; Germplasm resource