

植物学通报 2001, 18 (1):113~117

Chinese Bulletin of Botany

利用毛细管电泳法分析甜菊糖苷的含量

¹邵寒娟 ²胡涌刚 ¹丁亮 ¹沈明山 ¹陈睦传 ¹张向红

¹(厦门大学生命科学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

²(厦门大学化学系固体表面物理化学国家重点实验室 厦门 361005)

摘要 本文介绍了一种用毛细管区带电泳法筛选甜菊糖苷突变体的有效方法。根据实验结果,优化的电泳条件为:60 mmol/L Tris-硼酸缓冲液(pH 8.0),柱温 30℃,工作电压 25 kV。优化条件下,甜菊苷(Stevioside)迁移时间的 R. S. D. 为 0.45 % (15 次),且在 $7.45 \times 10^{-5} \sim 1.74 \times 10^{-2}$ mol/L 的浓度范围内存在良好的线性关系($r = 0.9994$),甜菊主要糖苷在 5 min 内均可实现分离。在优化条件下,本实验研究了低能离子注入后甜菊主要糖苷含量变化,结果令人满意。

关键词 低能离子注入,毛细管区带电泳法,甜菊,甜菊苷

Analysis of the Content of Stevia Sweeteners by Capillary Zone Electrophoresis

¹SHAO Han-Juan ²HU Yong-Gang ¹DING Liang ¹SHEN Ming-Shan

¹CHEN Mu-Zhuan ¹ZHANG Xiang-Hong

¹(The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

²(State Key Laboratory for Physical Chemical of Solid Surface, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract This paper introduced an effect capillary zone electrophoresis method for screening of stevia mutation. According to the experimental results, the optimum separation conditions were selected as: 60 mmol/L Tris-tetraborate buffer of pH 8.0, 30℃ and 25 KV. Under optimum conditions, the R. S. D. of stevioside migration time for 15 runs was 0.45%. The detector response for stevioside was linear over the range of $7.45 \times 10^{-5} \sim 1.74 \times 10^{-2}$ mol/L ($r = 0.9994$). Stevia main sweeteners could be separated effectively in less than five minutes. This method was applied for determining the variation of stevia main sweeteners after low-energy ions implantation.

Key words Implantation of low-energy ions, Capillary zone electrophoresis, *Stevioside rebaudiana*, Stevioside

甜菊(*Stevioside rebaudiana* Bertoni)是一种重要的糖料作物,具高甜度、低热能、易溶解、耐热、稳定等特点,现已广泛用于食品、医药、日化等行业,成为继蔗糖、甜菜糖之后的第三种天然糖源。其叶片中含有 8 种不同的甜味成分,主要有甜菊苷(Stevioside, SS, 占干叶重 2%~16%),莱包迪苷 A(Rebaudioside A, RA, 占干叶重 0%~12%),莱包迪苷 C(Rebaudioside C, RC, 占干叶重约 0.2%~1.39%),杜尔可苷 A(Dulcoside A, DA, 占干叶重 0.2%)等 8 种(Brandle 等,1998)。

自 70 年代引种至今,我国甜菊品种严重退化,糖苷含量、口感均远远不如日本品种,因此,培育抗逆、高产、优质、高糖苷含量的新品种,就成为一个亟待解决的问题。因甜菊

作者简介:邵寒娟,女,1974 年出生,硕士毕业,助理实验师,现于厦门大学生命科学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室工作。

收稿日期:1999-10-28 接受日期:2000-03-21 责任编辑:姜联合

种子细小,且表皮很薄,低能离子很容易直接作用于种胚 DNA,使其产生变异。舒世珍等人(1994)用从低到高4种组合的氮离子束照射,经两年试验观察发现合理的注入剂量可提高种子发芽率,促进幼苗生长,提高糖苷含量。陆挺等人(1998)发现,碳、氮离子注入甜菊种子对幼苗有一定的损伤作用,而且能诱发一些有益突变,比如矮杆、叶大等。但不同离子注入后甜菊中主要糖苷含量的变化未见报道。本文用毛细管区带电泳检测碳、氮离子注入后甜菊主要糖苷含量的变化,建立了一种快速、简便、准确筛选甜菊糖苷突变体的新方法。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

CE3000型毛细管电泳仪(Bio-Rad, USA);毛细管(Bio-Rad, USA):有效长度45.4 cm,总长50 cm,内径50 μm 的熔硅石英管;甜菊苷标样(SIGMA, USA), Tris、甲醇(A. R., 上海吴泾化工总厂), 硼酸(A. R., 上海吴泾化工总厂)。

1.2 标准样品处理

标准样品 Stevioside 用甲醇:60 mmol/L Tris-硼酸(1:1, V/V)溶解配制浓度为5.6 mg/mL。

1.3 甜菊材料处理:

经能量75 KeV,剂量 10^{14} ions/cm²碳、氮离子注入的济宁甜菊品系干种子,以及未经任何处理的济宁干种子,播种长成植株后(每组各20棵),从不同植株分别称取成熟叶片0.25 g(茎尖下第7~10对叶片),研磨,用三氯甲烷于索氏器中提取3 h,取其残余叶片,用甲醇再提取5 h,最后用100%甲醇定容至25 mL,分别取25 μL 的样品与25 μL 60 mmol/L Tris-硼酸混合作为毛细管电泳的样品。

1.4 毛细管电泳法:

本文用邓延倬和何金兰(1996)毛细管电泳法。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的选择

2.1.1 柱温的影响 随着柱温的升高,SS的出峰时间逐渐变短(表1)。柱温从15~30,SS的信号强度逐渐增强(用SS的峰高表示)。在柱温30~40的条件下,SS的信号强度基本保持不变。实验柱温选择30。

表1 柱温对标准样品中两种主要成分分离分析的影响
(进样量:2 μs ; 缓冲液:50 mmol/L Tris-硼酸(pH 8.5); 电压:25 kV)

Table 1 Influence of capillary temperature on separation of stevioside standard solution

柱温 Capillary Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	SS的迁移时间 Migration Time of SS (Min)	SS和RA的分离度 Resolution of SS and RA	SS的峰高 Height of SS ($\times 10^4$)
15	2.91	3.58	1.40
20	2.82	3.63	1.78
25	2.58	3.65	2.06
30	2.35	4.15	2.32
35	2.27	3.63	2.22
40	2.16	3.23	2.21

2.1.2 工作电压的影响 如表 2 所示:随着电压的增大,SS 的出峰时间逐渐变短,SS 的信号逐渐增强,但在电压为 30 kV 的条件下略有下降,本实验选择工作电压为 25 kV。

表 2 工作电压对标准样品中两种主要成分分离分析的影响(柱温:30 ,其他条件同表 1)

Table 2 Influence of voltage on separation of stevioside standard solution

工作电压 Voltage (kV)	SS 的迁移时间 Migration Time of SS (Min)	SS 和 RA 的分离度 Resolution of SS and RA	SS 的峰高 Height of SS ($\times 10^4$)
10	6.42	0.67	3.33
15	4.26	0.71	3.37
20	2.96	0.72	3.56
25	2.36	0.81	3.57
30	1.94	0.55	3.24

2.1.3 缓冲液浓度的影响 表 3 考察了缓冲液浓度对 SS 和 RA 分离分析的影响。随着缓冲液浓度的增加,SS 的出峰时间逐渐延长,浓度在 10 mmol/L 至 60 mmol/L 的浓度范围内,SS 的信号强度逐渐增强,且 SS 和 RA 之间的分离度也逐渐增大,之后随缓冲液浓度的增加,SS 的信号强度及分离度都逐渐下降。实验选择缓冲液浓度为 60 mmol/L。

表 3 缓冲液浓度对标准样品中两种主要成分分离分析的影响(工作电压:25 kV,其他条件同表 2)

Table 3 Influence of concentration of Tris-tetrate on separation of stevioside standard solution

Tris-硼酸浓度 Concentration of Tris- tetrate (mmol/L)	SS 的迁移时间 Migration Time of SS (Min)	SS 和 RA 的分离度 Resolution of SS and RA	SS 的峰高 Height of SS ($\times 10^4$)
10	2.34	2.38	1.94
20	2.38	2.60	2.27
30	2.53	3.52	2.27
40	2.57	3.70	2.28
50	3.23	4.07	2.52
60	3.44	4.41	2.68
70	3.64	4.10	1.80
80	3.76	3.45	1.78
90	4.21	3.38	0.95

2.1.4 缓冲液 pH 值的影响 SS 的出峰时间随着缓冲液 pH 值的增加而缩短(表 4)。在 pH 值为 7.0 的条件下,RA 基本无信号。在 pH 7.0~8.0 的范围内,SS 和 RA 的分离度逐渐增大,SS 的信号强度也逐渐增强。在 pH 8.5~10.0 的条件下,SS 和 RA 之间的分离度逐渐下降,SS 的信号强度略有下降。缓冲液 pH 值选择为 8.0。

表 4 缓冲液 pH 值对标准样品中两种主要成分分离分析的影响

(缓冲液浓度:60 mmol/L,其他条件同表 3)

Table 4 Influence of pH of Tris-tetrate on separation of stevioside standard solution

Tris-硼酸的 pH 值 pH of Tris- Tetrate	SS 的迁移时间 Migration Time of SS (Min)	SS 和 RA 的分离度 Resolution of SS and RA	SS 的峰高 Height of SS ($\times 10^4$)
7.0	4.11	/	5.36
7.5	3.56	4.90	4.09
8.0	3.46	6.53	4.63
8.5	3.16	6.51	4.18
9.0	3.26	5.98	4.10
9.5	3.70	5.56	4.06
10.0	3.82	3.79	3.57

2.2 定量分析

优化条件下,我们发现 SS 在 $7.45 \times 10^{-5} \sim 1.74 \times 10^{-2}$ mol/L 的浓度范围内具有良好的线性关系。峰面积(A)与浓度(C)之间的线性回归方程为: $A = 36339C + 4541.6$,相关系数为 0.9994。在此条件下我们对同一样品在 3 d 内共进行 15 次实验(每天 5 次),发现 SS 迁移时间的相对标准偏差(RSD)低于 0.45 %。

2.3 碳、氮离子注入后甜菊主要糖苷含量的变化

本实验分别随机选取 9 株碳离子注入株、对照株和氮离子注入株的叶片,提取糖苷后,在相同的毛细管电泳条件下进行区带电泳,具有代表性的碳离子注入株、对照株和氮离子注入株电泳图如图 1 所示,根据电泳图得出主要糖苷成分的峰面积大小(表 5)。所有碳离子注入组的 SS 峰面积及平均值均高于对照组。同 F 检验法比较两组数据的方差 S^2 ,得 $F_{SS} = 5.91 > F_{0.975}(8, 8)$, $F_{RA} = 2.40 > F_{0.80}(8, 8)$ 。可见, C^+ 离子注入组和对照组间主要糖苷成分 SS 和 RA 的量在统计学上均存在显著性差异,即碳离子注入有利于提高甜菊的主要糖苷含量,得出此结论的置信度分别为 97.5 % (SS) 和 80 % (RA)。

氮离子注入后主要糖苷成分 SS 和 RA 的峰面积平均值明显大于对照组。用 F 检验法分别比较两组数据的方差 S^2 ,得 $F_{SS} = 14.05 > F_{0.999}(8, 8)$, 而 $F_{RA} = 1.1 < F_{0.50}(8, 8)$, 所以可得到这样的结论:氮离子注入组和对照组间 SS 成分的峰面积存在显著性差异,即氮离子注入有利于提高甜菊糖苷中 SS 的含量,得此结论的置信度为 99.9 %,虽然氮离子注入后 RA 的平均峰面积虽高于对照组,但不存在统计学上的显著性差异。比较碳、氮离子注入组 SS、RA 峰面积大小,我们发现碳离子注入组 SS 和 RA 的峰面积均大于氮离子注入组。用 F 检验法分别比较两组数据的方差 S^2 ,得 $F_{SS} = 2.37 > F_{0.80}(8, 8)$, 而 $F_{RA} = 1.38 < F_{0.50}(8, 8)$, 由此可见:碳、氮离子注入组 SS 成分的峰面积存在显著性差异,得此结论的置信度为 80 %,而 RA 则无显著性差异,表明碳离子注入效果强于氮离子。

表 5 C^+ 处理组、对照组、 N^+ 处理组主要糖苷成分峰面积大小比较

Table 5 The content of SS and RA of the C^+ implantation, the control and the N^+ implantation

组别	碳离子注入组 The C^+ implantation		对照组 The control		氮离子注入组 The N^+ implantation	
	SS ($\times 10^5$)	RA ($\times 10^4$)	SS ($\times 10^5$)	RA ($\times 10^4$)	SS ($\times 10^5$)	RA ($\times 10^4$)
1	1.31	1.10	1.23	0.94	1.24	0.51
2	1.24	0.56	1.17	0.83	1.09	0.62
3	1.50	1.34	1.12	0.57	1.24	1.09
4	1.29	1.01	0.78	0.22	1.18	0.43
5	1.44	0.98	0.64	1.08	1.20	0.63
6	1.40	1.09	1.07	0.26	1.19	0.72
7	1.28	1.02	1.10	1.12	1.16	1.30
8	1.30	0.90	1.25	0.75	1.16	0.78
9	1.30	0.72	1.13	1.12	1.08	1.49
平均值	1.34 \pm 0.01	0.97 \pm 0.17	1.06 \pm 0.21	0.77 \pm 0.27	1.17 \pm 0.04	0.84 \pm 0.28

3 结论

目前,用于检测糖苷的方法主要有薄层扫描定量法、重量法、比色法和气相、液相色谱

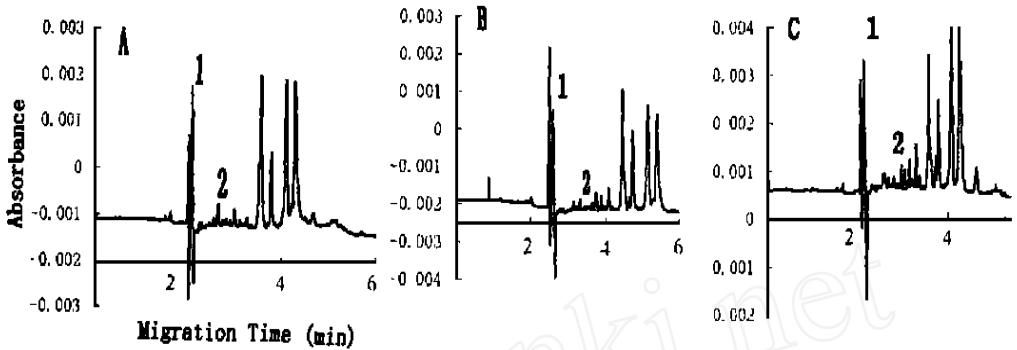


图1 毛细管区带电泳分离甜菊糖苷的电泳图谱(A. 碳酸盐处理组;B. 对照组;C. 铵离子处理组;1:SS,2:RA)
Fig. 1 Capillary Electropherograms of Steviol glycosides.

法,但都存在灵敏度低、时间长、效果差等缺点。用毛细管电泳检测甜菊糖苷在国外已有报道(Liu和Li,1995;Mauri等,1996),但用毛细管区带电泳技术研究低能离子注入后甜菊糖苷含量变化,在国内外都未曾报道。利用本方法可在5 min内实现甜菊糖苷突变体的筛选,具有分析速度快、灵敏度高、重现性好等特点。

参 考 文 献

- 邓延倬,何金兰,1996. 高效毛细管电泳. 北京:科学出版社,1~16
 陆挺,舒世珍,王彩莲,1998. 离子注入甜菊的诱变效应研究. 核农学报,12(6):347~352
 舒世珍,朱凤绥,陆挺,1994. 离子注入甜菊种子效应初报. 安徽农业大学学报,21(3):299~302
 Brandle J E, Starratt A N, Gjaen M, 1998. Stevia rebaudiana: Its agricutural, biological, and chemical properties. *Can J Sci*, 78: 527~536
 Liu J, Li S Y F, 1995. Separation and determination of Stevia sweeteners by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr*, 18(9):1703~1719
 Mauri P, Catalano G, Gardana C, 1996. Analysis of Stevia glycoside by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 17:367~371