

高效液相色谱法测定大豆胚轴中 DDMP 皂甙 α_g 和 β_g

全吉淑¹ 工藤重光²

(1. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133000; 2. 日本东北食效科学研究所, 青森 030-0842)

摘要:为检测大豆中的 α_g 和 β_g 含量,应用高效液相色谱-差示折射法(HPLC-dRI)测定大豆皂甙样品中 DDMP 皂甙 α_g 和 β_g 含量,色谱柱为 ODS-AM-303 柱(YMC, 4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),流动相为含 0.1% 三氟乙酸的乙腈+水(40+60)。DDMP 皂甙 α_g 和 β_g 分别在 1.38~6.88 μ g 和 1.62~8.12 μ g 范围内线性关系良好,平均回收率为 93.4% 和 94.2%,RSD 为 4.07% 和 4.28%。方法准确度高,重现性好,适用于大豆皂甙样品中 DDMP 皂甙以及其它大豆皂甙的含量测定。

关键词: 色谱法, 高压液相, 豆科, 皂甙

Analysis of DDMP-saponin α_g and β_g in soybean hypocotyl by high-performance liquid chromatography

Quan Jishu, et al.

(Medical College of Yanbian University, Jilin Yanji 133000, China)

Abstract: DDMP-saponin α_g and β_g in soyasaponin samples were detected by a high-performance liquid chromatography-differential refractive index detector(HPLC-dRI) with a ODS-AM-303 column(YMC, 4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) and using acetonitrile + water(40 + 60) containing 0.1% trifluoroacetic acid as a mobile phase. The method was proved to be linear in the range of 1.38~6.88 μ g and 1.62~8.12 μ g, and the recoveries were 93.4% and 94.2% with RSD of 4.07% and 4.28% for α_g and β_g , respectively. The method is accurate and reproducible, suitable for the determination of DDMP-saponins and other soyasaponins.

Key Words: Chromatography, High Pressure Liquid; Legumes; SAPONINS

大豆皂甙是近年来受到食品科学界广泛关注的非营养成分,是一类五环三萜的糖甙,主要分为 A 类、B 类、E 类和 DDMP 皂甙。A 类皂甙是以 soyasapogenol A 为配基的双糖链皂甙,B 类和 E 类皂甙是分别以 soyasapogenol B 和 soyasapogenol E 为配基的单糖链皂甙,DDMP 皂甙则是以 soyasapogenol B 作为配基,C-22 位上结合有 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one(DDMP)的单糖链皂甙,目前认为是天然存在的真正大豆皂甙。研究表明大豆皂甙具有多种药理作用,如抗癌、防治心血管疾病、抗病毒、保肝以及抗血栓等作用。^[1~4]而不同种类的大豆皂甙生理作用有所区别,如具有抗癌以及抗病毒活性的主要为单糖链皂甙 B 类、E 类和 DDMP 皂甙。^[5]其中 DDMP 皂甙在 DDMP 结构中含有烯醇基和酮基两个活性基团,具有独特的活

性氧清除作用。^[2]因此,对大豆及其制品中各类皂甙,尤其对单糖链皂甙的定量分析是研究大豆皂甙药理作用的基础。目前,常规 HPLC 法主要以大豆皂甙 Bb 单体作为标准品测定大豆总皂甙。但由于使用较低的紫外检测波长,且紫外光谱图为末端吸收,所以反相高效液相色谱-紫外检测的方法测定大豆皂甙有一定的难度,难以得到满意的结果。本文采用高效液相色谱-差示折射法测定大豆皂甙样品中 DDMP 皂甙的含量,为 DDMP 皂甙以及其它大豆皂甙的定量分析提供一种可靠的方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂 检测单元为 Waters 高效液相色谱系统,包括 WatersTM 717 plus 自动进样器;Waters 600E 控制单元;WatersTM 805 数据处理机和 Waters

基金项目: 延边大学科研项目(延大科合字(2002)第 1 号)

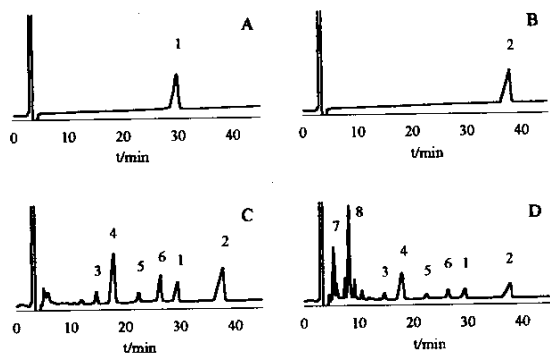
作者简介: 全吉淑 女 硕士

This work was supported by the Research Funds of Medical College of Yanbian University, China.

2410 差示折光仪。高效液相色谱用试剂为色谱纯 (WAKO 公司),其余试剂均为日本试药特级。

1.2 色谱条件 色谱柱为 ODS - AM - 303 柱 (YMC $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$),柱温 40°C ,流动相为含 0.1% 三氟乙酸的乙腈 + 水 ($40 + 60$),流速 $1 \text{ mL}/\text{min}$,高纯氦气脱气,进样量 $10 \mu\text{L}$,分析时间为 45 min 。

1.3 标样配制 DDMP 皂甙 αg 和 βg 标准品,实验室自行制备,通过 IR、FAS - MS、 ^1H - NMR 和 ^{13}C - NMR 鉴定,高效液相色谱分析为单一峰(见图 1)。称取 DDMP 皂甙 αg 和 βg 标准品 3.44 mg 和 4.06 mg ,加甲醇溶解定容至 10 mL ,分别配成浓度为 $0.344 \text{ mg}/\text{mL}$ 和 $0.406 \text{ mg}/\text{mL}$ 的溶液,作为对照品溶液。分别吸取标准品液 $10 \mu\text{L}$,供 HPLC 分析。



1. DDMP 皂甙 αg ; 2. DDMP 皂甙 βg ; 3. 大豆皂甙 Ba; 4. 大豆皂甙 Bb; 5. 大豆皂甙 Bd; 6. 大豆皂甙 Be; 7. 大豆皂甙 A1; 8. 大豆皂甙 A2。

A. DDMP 皂甙 αg 标准品; B. DDMP 皂甙 βg 标准品; C. 试样 F_{100} ; D. 试样 F_{80} 。

图 1 标准品及试样的高效液相色谱图

1.4 试样制备 大豆胚轴 3 kg 用 15 L 50% 甲醇溶液提取后喷雾干燥得大豆胚轴提取物 (SHE) 562 g 。准确称取 SHE 200 g ,用 500 mL 10% 甲醇溶液溶解,上 C_{18} 反相层析柱 (YMC, ODS - A60 - S150, $5 \text{ cm} \times 74 \text{ cm}$),依次用 2 L 10% 、 30% 、 50% 、 80% 、 100% 甲醇进行梯度洗脱,收集各流出部分,经减压蒸馏、冷冻干燥得干品,分别称为 F_{10} 、 F_{30} 、 F_{50} 、 F_{80} 和 F_{100} 。单糖链皂甙主要在 F_{80} 和 F_{100} 中流出。

1.5 测定 称取富含大豆皂甙的 F_{80} 和 F_{100} 各 0.1 g ,分别用甲醇定容至 50 mL ,以 Milipore FH $\Phi 0.5 \mu\text{m}$ 过滤膜过滤后作为试样供试液。分别吸取 F_{80} 和 F_{100} 供试液 $10 \mu\text{L}$,供 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 线性关系考察 精密吸取 DDMP 皂甙 αg 和 βg 标准品溶液 4 、 8 、 12 、 16 、 $20 \mu\text{L}$,重复进样测定,以色

谱峰峰面积对进样量进行线性回归分析。用 Excel 软件处理得回归方程,分别为:DDMP 皂甙 αg : $y = 46499x + 1794$, $r = 0.9954$; DDMP 皂甙 βg : $y = 54674x + 3867$, $r = 0.9889$ 。两组分的最小检出量分别为 $1.38 \mu\text{g}$ 和 $1.62 \mu\text{g}$ 。

2.2 精密度试验 精密吸取 αg 和 βg 标准品溶液 $10 \mu\text{L}$,重复进样 5 次。结果大豆皂甙 αg 和 βg 的 RSD 均小于 3% (表 1)符合分析要求。

表 1 精密度测定结果

DDMP 皂甙	测定次数 n	\bar{x}	RSD %
αg	5	3.40	1.74
βg	5	4.01	2.68

2.3 回收率试验 称取已知含量的试样 6 份,准确加入 DDMP 皂甙 αg 和 βg 标准品液适量,重复进样 6 次,计算试样的加样回收率和相对标准偏差。结果见表 2。

表 2 回收率测定结果

大豆皂甙	试样中含量	加入量	测定值	回收率 %	平均回收率 %	平均 RSD %
αg	0.235	0.172	0.392	91.3	93.4	4.07
	0.235	0.172	0.394	92.4		
	0.235	0.172	0.388	89.0		
	0.235	0.344	0.581	100.6		
	0.235	0.344	0.551	91.9		
	0.235	0.344	0.563	95.3		
βg	0.318	0.203	0.498	88.7	94.2	4.28
	0.318	0.203	0.504	91.6		
	0.318	0.203	0.507	93.1		
	0.318	0.406	0.729	101.2		
	0.318	0.406	0.708	96.1		
	0.318	0.406	0.702	94.6		

2.4 试样测定 在 C_{18} 柱层析中,DDMP 皂甙主要在 80% 和 100% 甲醇溶液中流出。HPLC 色谱结果表明, F_{80} 主要成分为 A 类、B 类和 E 类和 DDMP 皂甙, F_{100} 主要成分为 B 类、E 类和 DDMP 皂甙。大豆胚轴中 A 类皂甙主要有 A1 和 A2; B 类皂甙主要有 Ba 和 Bb; E 类皂甙主要有 Bd 和 Be; DDMP 皂甙主要有 αg 和 βg 。 F_{80} 、 F_{100} 和大豆胚轴提取物 (SHE) 中 DDMP 皂甙的含量测定结果见表 3, HPLC 色谱图见图 1。

表 3 皂甙试样中 DDMP 皂甙含量测定结果 $n = 3$

试样	αg %	βg %
F_{80}	3.14	7.62
F_{100}	8.98	27.6
SHE	0.42	1.11

3 结论

本法建立了大豆胚轴中 DDMP 皂甙 αg 和 βg 的高效液相色谱测定方法。大豆皂甙的最大吸收波长

(203 nm) 较低,且紫外光谱图为末端吸收,对所用流动相的纯度要求很高,因此采用紫外检测法容易造成基线不稳,重复性较差,难以得到满意的结果。本法采用差示折射法检测大豆皂甙,结果峰面积值和进样量之间呈良好的线性关系,用于大豆皂甙的分析优于紫外检测法。本文建立的检测方法灵敏度、重现性均能满足一般分析要求,可用于大豆皂甙样品中 DDMP 皂甙的含量分析,也可用于其它大豆皂甙的分析,具有普遍意义。

参考文献:

[1] 王银萍,吴家祥,王心蕊,等. 大豆皂甙和人参茎叶皂甙的抗糖尿病动脉粥样硬化作用[J]. 白求恩医科大学学报,1994,20(6):551—554.
[2] Yoshiki Y, Okubo K. Active oxygen scavenging activity of

DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59(8):1556—1557.
[3] Yoshikoshi M, Yoshiki Y, Okubo K, et al. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblast [J]. Planta Med, 1996, 62(3):252—255.
[4] Kinjo J, Imagire M, Udayama M, et al. Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycon [J]. Planta Med, 1998, 64(3):233—236.
[5] 吉诚由美子,大久保一郎. 大豆サポニンの機能性 [J]. 食品と開発, 1999, 34(7):8—11.
[6] Kudou S, Tonomura M, Tsukamoto C, et al. Isolation and structural elucidation of the major genuine soybean saponin [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1992, 56(1):142—143.

[收稿日期 2003-01-06]

中图分类号:R15;O657.72 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2004)01-0030-03

单扫描极谱法测定猪肉中克伦特罗残留量

汤晓勤¹ 向仕学¹ 龚志华² 何扬²

(1.四川省卫生防疫站,四川 成都 610031;2.四川大学华西公共卫生学院,四川 成都 610041)

摘要:为研制一个适用于基层实验室测定猪肉中克伦特罗的极谱分析方法,将试样用75%乙醇和正己烷二种不同极性溶剂提取和纯化,用拟定的极谱分析方法进行定性和定量测定。在盐酸-高锰酸钾-草酸介质中,克伦特罗峰电位为-840 mV(vs.SCE)。克伦特罗浓度在0.5~4.0 μg/mL之间线性关系良好,相关系数 $r=0.9994$,回归方程 $y=9.563x-32.15$ 。最低检出量为1.2 μg。平均相对标准偏差(RSD)为7.7%($n=7$),加标平均回收率为85.2%。该法准确、快速、简便、仪器价廉,适于基层实验室检测猪肉中克伦特罗残留量。

关键词:极谱法;猪;克伦特罗

Determination of clenbuterol residues in pork by the single-sweep polarography

Tang Xiaojin, et al.

(Health and Anti-epidemic Station of Sichuan Province, Sichuan Chengdu 610031, China)

Abstract: A method using single-sweep polarography for determining the clenbuterol residues in pork was established for middle and small sized laboratories. Clenbuterol in samples were extracted and purified with 75% alcohol and *n*-Hexane and then determined qualitatively and quantitatively by polarography. Peak potential of clenbuterol was found at -840 mV(vs. SCE) in the mediums of HCl KMnO₄-H₂C₂O₄. The linear relation was well to the standard contents of clenbuterol within the range of 0.5~4.0 μg/mL. The coefficient of correlation was $r=0.9994$ ($n=7$), regression equation was $y=9.563x-32.15$. The detectability of the method was 1.2 μg. Its relative standard deviation (RSD) was 7.7% ($n=7$) and average recovery was 85.2% ($n=5$). The method is accurate, rapid and simple, and the instrument is cheap. It is fit for middle and small sized laboratories to determine clenbuterol residues in pork.

作者简介:汤晓勤 女 副主任技师