

高效液相色谱法 测定大豆胚轴中 A 类皂甙的含量

全吉淑¹, 尹学哲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:建立了 A 类大豆皂甙的高效液相色谱-差示折射(HPLC-dRI)检测方法。色谱条件为: ODS-AM-303 色谱柱(YMC, 4.6mm×250mm, 5 μ m), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 含 0.1%三氟乙酸的乙腈-水(40/60)为流动相, 流速 1mL/min。大豆皂甙 A1 和 A2 分别在 1.39~6.96 μ g 和 1.67~8.34 μ g 范围内线性关系良好, 平均回收率为 91.3%和 92.6%, RSD 为 4.63%和 3.48%。方法准确度高, 重现性好, 适用于大豆皂甙样品中 A 类皂甙的测定。

关键词:大豆皂甙, 高效液相色谱法

Abstract: High-performance liquid chromatographic-differential refractive index detective (HPLC-dRI) method was established to determine group A soyasaponins. The chromatographic conditions are as follows: ODS-AM-303 column (YMC, 4.6mm×250mm, 5 μ m) with the temperature of 40 $^{\circ}$ C, acetonitrile-water (40/60) containing 0.1% trifluoroacetic acid as mobile phase with the flow rate of 1mL/min. The method was proved to be linear in the range of 1.39~6.96 μ g and 1.67~8.34 μ g, and the recoveries were 91.3% and 92.6% with RSD of 4.63% and 3.48% for A1 and A2, respectively. The method is accurate and reproducible, suitable for the determination of group A soyasaponins.

Key words: soyasaponins; HPLC

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)02-0209-03

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]。而对大豆及其制品中各类皂甙的定量分析是研究大豆皂甙药理作用的基础。目前关于大豆皂甙的提取、分离及精制主要是采用醇提取物经水和正丁醇两相分配, 液-液萃取法纯化制得, 对于大豆皂甙含量的检测主要采用高效液相色谱法结合 203nm 紫外检测的方法^[5]。但此法由于使用较低的紫外检测波长, 且紫外光谱图为末端吸收, 难以得到满意的结果。本文采用高效液相色谱-差示折射检测法测定大豆皂甙试样中 A 类皂甙的含量, 为大豆皂甙的定量分析提供可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

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。

检测单元为 Waters 高效液相色谱系统 包括 WatersTM717 plus 自动进样器、Waters 600E 控制单元、WatersTM805 数据处理机和 Waters 2410 差示折光仪。

1.2 色谱条件

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

1.3 标样配制

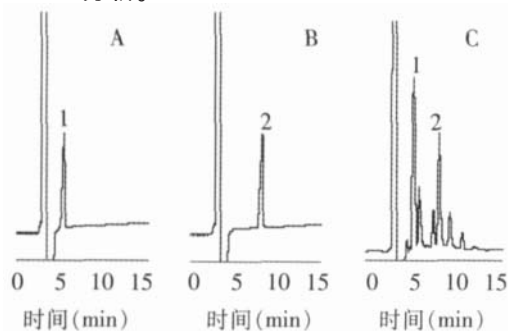
大豆皂甙 A1 和 A2 标准品, 实验室自行制备, 通过 IR、FAS-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定, 高效液相色谱分析为单一峰(见图 1)。称取大豆皂甙 A1 和 A2 标准品 3.48mg 和 4.17mg, 加甲醇溶解定容至 10mL, 分别配成浓度为 0.348mg/mL 和 0.417mg/mL

收稿日期: 2006-07-10

作者简介: 全吉淑(1968-), 女, 副教授, 硕士, 研究方向: 中草药中生物活性物质的分离及其药理作用研究。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30360113)。

的溶液,作为对照品溶液。分别吸取标准品液 10 μ L,供 HPLC 分析。



1.大豆皂甙 A1;2.大豆皂甙 A2

A.大豆皂甙 A1 对照品;B.大豆皂甙 A2 对照品;

C.供试品 SHE

图1 对照品及供试品的高效液相色谱图

1.4 试样制备

大豆胚轴 3kg 用 15L 50%甲醇溶液提取后喷雾干燥得大豆胚轴提取物 (SHE) 562g。准确称取 SHE 200g,用 500mL 10%甲醇溶液溶解,上 C_{18} 反相层析柱 (YMC, ODS-A60-S150, 5cm $\times$ 74cm),依次用 2L 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} 。A 类皂甙主要在 F_{50} 和 F_{80} 中流出。

1.5 测定

称取 SHE 和富含大豆皂甙的 F_{50} 和 F_{80} 各 0.1g,分别用甲醇定容至 50mL,以 Milipore FH Φ 0.5 μ m 过滤膜过滤后作为样品供试液。分别吸取供试液 10 μ L,供 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 流动相和流速的确定

文献中采用乙腈-水以相关配比作为流动相。结果表明,乙腈-水 (40 60, v/v) 的系统效果最好。考虑到 A 类皂甙是酸性皂甙,而 pH 太低会损坏色谱柱,因此在流动相里加 0.1%三氟乙酸,稍改变流动相的 pH 来提高分离度。同时对不同流速条件下的分离情况进行研究。与 1mL/min 相比较,流速为 0.8mL/min

时保留时间增加,分离效果较差;流速为 1.2mL/min 时保留时间缩短,但分离效果改善不明显,最终选用流速为 1mL/min。

2.2 柱温的确定

柱温会影响被测物质在固定相和流动相中的分配系数,因此温度也是影响分离度的重要因素。综合考虑保留时间和分离度,而柱温太高会损坏色谱柱,且温度为 40 $^{\circ}$ C 时分离度已完全达到要求,因此最终确定测定温度为 40 $^{\circ}$ C。

2.3 检测方法的确定

本研究中 A 类皂甙的检测没有采用常规的 205nm 紫外检测法,而是采用差示折射检测法。大豆皂甙的最大吸收波长是 205nm,波长较低,且紫外光谱图为末端吸收,因此采用紫外检测法,基线不稳,重复性较差,难以得到满意的结果。本研究采用差示折射检测法,结果基线稳定,系统平衡快,效果很好。

2.4 线性关系考察

精密吸取大豆皂甙 A1 和 A2 标准品溶液 4、8、12、16、20 μ 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。两组分分别在 1.39~6.96 μ g 和 1.67~8.34 μ g 范围内线性关系良好。用 Excel 软件处理得回归方程,分别为:大豆皂甙 A1: $y=45965x+1794$, $r=0.9954$; 大豆皂甙 A2: $y=53232x+3867$, $r=0.9889$ 。

2.5 精密度实验

精密吸取大豆皂甙 A1 和 A2 标准品溶液 10 μ L,重复进样 5 次。结果大豆皂甙 A1 和 A2 的 RSD 均小于 3%(表 1),符合分析要求。

表1 精密度测定结果

大豆皂甙	测定次数(n)	测定平均值(μ g)	RSD(%)
A1	5	3.41	2.08
A2	5	4.10	2.41

2.6 稳定性实验

大豆皂甙 A1 和 A2 标准品溶液,分别在 0、4、8、12、24h 各测定一次,结果 RSD 分别为 3.47%和 4.18%($n=5$),在 24h 内测定结果稳定。

表2 回收率测定结果

大豆皂甙	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测定值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	平均 RSD(%)
A1	0.242	0.174	0.399	90.2	91.3	4.63
	0.242	0.174	0.398	89.7		
	0.242	0.174	0.388	83.9		
	0.242	0.348	0.581	97.4		
	0.242	0.348	0.571	94.5		
	0.242	0.348	0.563	92.2		
	0.332	0.209	0.524	91.9		
A2	0.332	0.209	0.535	97.1	92.6	3.48
	0.332	0.209	0.515	87.6		
	0.332	0.417	0.729	95.2		
	0.332	0.417	0.708	90.2		
	0.332	0.417	0.723	93.8		
	0.332	0.417	0.723	93.8		

2.7 重现性实验

精确吸取同一 F_{100} 样品供试液 5 份, 重复测定 5 次, 测定结果大豆皂甙 A1 和 A2 的 RSD 分别为 3.51% 和 4.06% ($n=5$)。

2.8 回收率实验

称取已知含量的样品 6 份, 准确加入大豆皂甙 A1 和 A2 标准品液适量, 重复进样 6 次, 计算样品的加样回收率和相对标准偏差, 结果见表 2。

2.9 样品测定

在 C_{18} 柱层析中, 大豆皂甙 A 主要在 50% 和 80% 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、E 类和 DDMP 皂甙, F_{50} 主要成分为 A 类和 B 类皂甙。 F_{50} 、 F_{80} 和 SHE 中 A 类皂甙的含量测定结果见表 3。

表 3 皂甙样品中 A 类皂甙含量测定结果 ($n=3$)

样品	A1 (%)	A2 (%)
F_{50}	13.3	7.15
F_{80}	8.98	5.06
SHE	3.14	2.38

3 结论

本法建立了大豆胚轴中大豆皂甙 A 的高效液相色谱测定方法。本法采用差示折射检测法, 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中优于紫外检测法。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其它大豆皂甙的分析中, 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 fibroblasts[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 aglycone[J]. Planta Med, 1998, 64(3):233-236.
- [5] 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.

(上接第 206 页)

35 的贮藏效果最好, 品质综合评价在整个贮藏期间由 5 级下降到 3 级, 品质劣变较慢。

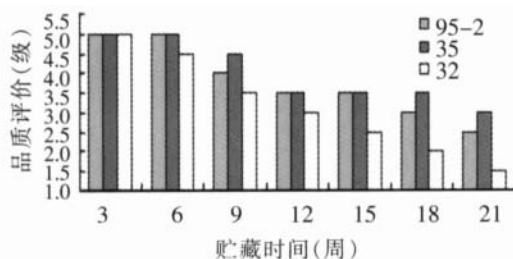


图 5 云南红梨贮藏期间的品质变化评价

3 结论

通过观察研究, 供试云南红梨系列品种在 2 ± 1 、RH 为 85%~95% 贮藏条件下, 其呼吸强度、丙二醛、相对电导率整体呈上升趋势, 果实硬度呈逐渐下降的趋势, 其中品种 32 和 95-2 的丙二醛和相对电导率快速上升期以及呼吸高峰均出现在贮藏的第 9 周, 品种 35 则出现在第 12 周。通过贮藏品质评价表明, 在温度为 2 ± 1 、RH 为 85%~95% 条件下品种 35 贮藏效果最好, 95-2 的贮藏品质其次, 32 品种在这个条件下冷藏品质较差。

参考文献:

- [1] 杨振生, 袁唯. 果蔬呼吸强度测定方法[J]. 保鲜与加工, 2003, 3(2): 24-25.
- [2] 韦兴笃, 胡雪峰, 陈蓉, 等. 10 个良种梨的果实特征调查及品质评价[J]. 山西果树, 2003, 93: 328.
- [3] Huxhan I M, Jarvis M C, Shakespeare L, et al. Electron-energy-loss spectroscopic imaging of calcium and nitrogen in the cell walls of apple fruits[J]. Planta, 1999, 208: 438-443.
- [4] 叶尚红主编. 植物生理生化实验教程[M]. 昆明: 云南农业大学, 2003, 1.
- [5] 中国科学院上海植物研究所, 上海市植物生理学会编. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [6] 王震星, 张磊, 刘玉芹. 利用电导法测定西洋梨的耐寒性[J]. 农业与技术, 2002, 22(3): 94-100.
- [7] Lyons J M. Chilling injury in plants[J]. Ann Rev Plant Physical, 1973, 24: 455-528.
- [8] 张喜焕, 陈敬宜, 辛贺明, 等. 近年我国梨果实内在品质研究进展[J]. 邯郸农业高等专科学校学报, 1999, 16(2): 22-26.
- [9] S Selvarajah, A D Bauchot, P John. Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene[J]. Postharvest biology and technology, 2001, 23: 167-170.