

高效液相色谱法测定大豆胚轴中单糖链大豆皂甙的含量

尹学哲¹, 沈明花¹, 全吉淑¹, 工藤重光²

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

摘要 大豆皂甙具有多种药理作用, 而对大豆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。采用高效液相色谱-差示折光(HPLC-dRI)检测法测定单糖链大豆皂甙的含量。色谱条件为: ODS-AM-303 色谱柱(YMC, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 40℃, 含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-水(40: 60)为流动相, 流速 1 mL min⁻¹。Ba、Bb、Bd、Be、αg 和 βg 分别在 2.24 ~ 11.2、2.35 ~ 11.8、1.58 ~ 7.92、2.01 ~ 10.1、1.38 ~ 6.88 和 1.62 ~ 8.12 μg 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 92.5%、93.8%、94.1%、95.8%、93.4% 和 94.2%, RSD 为 3.22%、3.18%、4.01%、3.53%、4.07% 和 4.28%。该方法准确度高, 重现性好, 适用于大豆皂甙样品中各类皂甙的测定。

关键词 大豆胚轴; 单糖链大豆皂甙; 高效液相色谱法

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)06-0943-03

DETERMINATION OF MONO-DESMOSIDE SOYASAPONINS FROM SOYBEAN HYPOCOTYL BY HPLC

YIN Xue-zhe¹, SHEN Ming-hua¹, QUAN Ji-shu¹, KUDOU Shigemitsu²

(1. Medical College of Yanbian University, Yanji 133000; 2. Institute of Food Factors Science for Health, Aomori 030-0842, Japan)

Abstract Soyasaponins have many pharmacological effects. The determination of soyasaponins contents is the basis of the pharmacological experiments. In the current experiment mono-desmoside soyasaponins in soybean sample were detected by a high performance liquid chromatographic-differential refractive index detective (HPLC-dRI) method. The chromatographic condition was as fellows: ODS-AM-303 column (YMC, 4.6 mm 250 mm, 5 μm) with the temperature of 40℃, acetonitrile-water (40: 60) containing 0.1% trifluoroacetic acid as mobile phase with the flow rate of 1 mL min⁻¹. The method was proved to be linear in ranges of 2.24 - 11.2, 2.35 - 11.8, 1.58 - 7.92, 2.01 - 10.1, 1.38 - 6.88 and 1.62 - 8.12 μg for Ba, Bb, Bd, Be, αg and βg, respectively; the recoveries were 92.5%, 93.8%, 94.1%, 95.8%, 93.4% and 94.2% with RSD of 3.22%, 3.18%, 4.01%, 3.53%, 4.07% and 4.28% for Ba, Bb, Bd, Be, αg and βg, respectively. The method is accurate and reproducible, and suitable for the determination of mono-desmoside soyasaponins.

收稿日期: 2007-05-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30360113)

作者简介: 尹学哲(1962-), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为中草药活性成分分离及药理作用。

Key words Soybean Hypocotyl; Mono-desmoside Soyasaponins; HPLC

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,主要有A1和A2;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,主要有Ba、Bb和Bd、Be;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,主要有 α g和 β g,目前认为是天然存在的真正大豆皂甙^[1]。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^[2-6]。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203 nm紫外检测的方法^[7-11]。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-差示折光检测法测定大豆皂甙试样中各类单糖链皂甙的含量,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 仪器和试剂

检测单元为Waters高效液相色谱系统,包括Waters™ 717 plus自动进样器;Waters 600E控制单元;Waters™ 805数据处理机和Waters 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 mm×250 mm,5 μ m),柱温40℃,流动相为含0.1%三氟乙酸的乙腈-水(40:60,v/v),流速1 mL min⁻¹,高纯氦气脱气,进样量10 μ L,分析时间为45 min。

1.3 标样配制

大豆皂甙标准品,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。称取Ba和Bb、Bd和Be、 α g和 β g标准品,加甲醇溶解定容至10 mL,分别配成浓度为

0.561和0.588、0.396和0.503、0.344和0.406 mg mL⁻¹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。

1.4 试样制备

大豆冷冻干燥后剥离胚轴。将3 kg大豆胚轴研磨粉碎,用15 L 50%甲醇常温提取,提取液经喷雾干燥得粗粉562 g。将粗粉用等体积正丁醇-水溶液萃取,取正丁醇层,经减压蒸馏、冷冻干燥,得总糖甙223 g。

1.5 测定

称取总糖甙0.1 g,用甲醇定容至50 mL,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

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。考虑到皂甙是酸性皂甙,因此在流动相里加0.1%三氟乙酸来提高分离度。不同流速条件下的分离情况如下:与1 mL min⁻¹相比较,流速为0.8 mL min⁻¹时保留时间增加,分离效果较差;选1.2 mL min⁻¹时,分离效果改善不明显;最终选用流速为1 mL min⁻¹。

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,且在40℃时分离度已完全达到要求,因此最终确定测定温度为40℃。

2.3 检测方法的确定

大豆皂甙的检测没有采用常规的205 nm或改良的210 nm紫外检测法,而是采用差示折光检测法。大豆皂甙的最大吸收波长是205 nm,波长较低,且紫外光谱图为末端吸收,因此基线不稳,重复性差,难以得到满意的结果。210 nm紫外检测法虽有些改善,但重复性仍较差。本研究采用差示折光检测法,结果基线稳定,系统平衡快,效果很好。

2.4 线性关系考察

精密吸取各皂甙标准品溶液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。用Excel软件处理得回归方程,分

别为:大豆皂甙 Ba: $y = 27532x + 2594, r = 0.9738$,线性范围 2.24 ~ 11.2 μg ;大豆皂甙 Bb: $y = 31033x + 6067, r = 0.9814$,线性范围 2.35 ~ 11.8 μg ;大豆皂甙 Bd: $y = 44130x + 3867, r = 0.9889$,线性范围 1.58 ~ 7.92 μg ;大豆皂甙 Be: $y = 40393x + 1794, r = 0.9954$,线性范围 2.01 ~ 10.1 μg ;DDMP 皂甙 αg : $y = 46499x + 1794, r = 0.9954$,线性范围 1.38 ~ 6.88 μg ;DDMP 皂甙 βg : $y = 54674x + 3867, r = 0.9889$,线性范围 1.62 ~ 8.12 μg 。

2.5 精密度试验

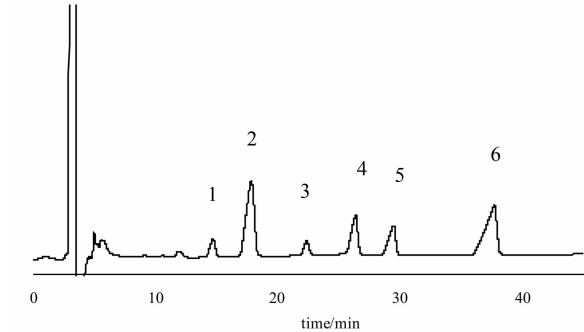
精密吸取皂甙标准品溶液 10 μL ,重复进样 5 次。结果 Ba 和 Bb、Bd 和 Be、 αg 和 βg 的 RSD 分别为 3.02% 和 3.36%、2.69% 和 3.05%、1.74% 和 2.68% ($n = 5$),RSD 均小于 4%,符合分析要求。

2.6 稳定性试验

大豆皂甙标准品溶液,分别在 0、4、8、12、24 h 测定,结果 Ba 和 Bb、Bd 和 Be、 αg 和 βg 的 RSD 分别为 3.15% 和 3.98%、3.75% 和 3.92%、4.52% 和 4.83% ($n = 5$),在 24 h 内测定结果稳定。

2.7 回收率试验

称取已知含量的样品 6 份,准确加入皂甙标准品液适量,重复进样 6 次,计算样品的加样回收率和相对标准偏差。Ba 和 Bb、Bd 和 Be、 αg 和 βg 的平均回收率分别为 92.5%、93.8%、94.1%、95.8%、93.4%、94.2%,均大于 90%;RSD 为 3.22%、3.18%、4.01%、3.53%、4.07% 和 4.28%,均小于 5%,符合分析要求。



1. Ba; 2. Bb; 3. Bd; 4. Be; 5. αg ; 6. βg

图1 样品 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of sample

2.8 样品测定

按上述色谱条件,对待测样品进行测定,样品色谱图见图 1,按公式计算得出 Ba、Bb、Bd、Be、 αg 和 βg 的含量,分别为 0.84%、7.60%、0.77%、4.16%、

3 结论

建立了大豆胚轴中单糖链大豆皂甙的高效液相色谱测定方法。采用差示折光检测法,结果峰面积值和进样量之间呈良好的线性关系,用于单糖链大豆皂甙的分析中优于紫外检测法。所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。

参 考 文 献

[1] 杨光,顾雪峰,韩俊. 大豆皂甙的提取、生理功能及应用进展[J]. 大豆通报,2005,6;23-26.

[2] Rodrigues H G,Diniz Y S,Faine L A,et al. Antioxidant effect of saponin;potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition,2005,56;79-85.

[3] Ishii Y,Tanizawa H. Effects of Soyasaponins on lipid peroxidation

through the secretion of thyroid hormone[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin,2006,29;1759-1763.

[4] Yoshikoshi M,Yoshiki Y,Okubo K,et al. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts [J]. Planta Medica,1996,62(3);252-255.

[5] Kinjo J,Imagire M,Udayama M,et al. Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone [J]. Planta Medica,1998,64(3);233-236.

[6] 袁晓洁,郭英,孙维琦,等. 大豆异黄酮与大豆皂甙抗疲劳作用[J]. 中国公共卫生,2007,23(3);327-328.

[7] 茹湘波,谷克仁,耿敏,等. 大豆皂甙分析检测方法研究进展[J]. 粮食与油脂,2006,12;40-42.

[8] Kudou S,Tonomura M,Tsukamoto C,et al. Isolation and structural elucidation of the major genuine soybean saponin[J]. Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry,1992,56(1);142-143.

[9] 田晶,翟滨. 脱脂大豆中B组大豆皂甙V的HPLC-MS检测[J]. 食品科学,2002,23(12);101-103.

[10] 魏静,张春红,刘长江. 比色法测定大豆总皂甙的研究[J]. 粮油加工,2006,10;60-62.

[11] 薛锦峰,闫子鹏,郭丰盛. 紫外分光光度法测定大豆中的总皂甙[J]. 中国油脂,2006,31(10);77-78.