

HPLC法测定洋葱中异蒜氨酸

郭娟,唐辉*,芮鸣,代友彪,关丽

(石河子大学药学院,省部共建新疆特种植物药资源教育部重点实验室,新疆石河子 832002)

摘要:目的:建立 HPLC 法测定洋葱中异蒜氨酸的含量。方法:色谱条件: C_{18} 色谱柱 (250mm $\times$ 4.6mm), 流动相: 100% 水; 流速: 0.8mL/min; 检测波长: 230nm; 柱温: 25℃; 进样量: 20 μ L。结果: 红皮、黄皮、白皮洋葱中异蒜氨酸含量分别为 0.876、0.839、0.377mg/g ($n=3$); 加样回收率为 102.9%, RSD% = 2.3% ($n=3$), 异蒜氨酸浓度在 23~420 μ g/mL 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$)。结论: 本 HPLC 法操作简单, 结果准确, 重复性好。

关键词: 洋葱, 异蒜氨酸, HPLC

Determination of isoalliin in onion by HPLC

GUO Juan, TANG Hui*, RUI Ming, DAI You-biao, GUAN Li

(College of Pharmacy, Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources, Shihezi 832002, China)

Abstract: Objective: To establish an HPLC method for determination of isoalliin in onion. Method: We use microwave to destroy the enzyme in onions and determine in the following terms of chromatography: Agilent C_{18} column (250mm $\times$ 4.6mm), mobile phase: 100% water; flow rate: 0.8mL/min; the UV detection wavelength: 230nm; temperature: 25℃; Sample volume: 20 μ L. Results: The content of isoalliin in red, yellow, white onions was 0.876, 0.839, 0.377mg/g ($n=3$); recovery was 102.9%, RSD% = 2.3% ($n=3$), the standard curve of isoalliin showed good linearity in the concentration range of 23~420 μ g/mL ($r=0.9999$); Conclusion: The method was found to be simple, sensitive and accurate, it can meet the needs of day-to-day test.

Key words: onion; isoalliin; HPLC

中图分类号: TS255.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)06-0341-03

洋葱 (*Alliumcepa*.L) 为百合科 (*Liliaceae*) 葱属 (*Allium*) 植物, 又名圆葱、葱头、玉葱, 为二年生草本植物。洋葱是世界范围内最为广泛食用的葱属植物, 更是新疆极具民族特色的传统食物, 地位尤其突出。目前, 国外对洋葱的研究主要集中在美国、日本等一些国家。洋葱中含有的有机硫化物是研究的焦点, 也是国际公认的功效成分^[1]。这些硫化物大都是 L-半胱氨酸亚砷及其衍生物, 主要形式是异蒜氨酸 (S-丙烯基-L-半胱氨酸亚砷, isoalliin)^[2]。当这些有机硫化物遇到蒜酶时, 在磷酸吡多醛的协同作用下水解成硫代亚磺酸酯, 硫代亚磺酸酯是关键分子, 它使洋葱具有降血糖、降血脂等重要的生理功效^[3]。因为硫代亚磺酸酯非常不稳定, 所以研究洋葱功效前体物质异蒜氨酸成为了开发洋葱制品的关键。目前, 国内外关于洋葱中异蒜氨酸检测方法的报道极为少见, 然而与其结构极其相似的蒜氨酸在国内外研究较广泛, 检测方法也较成熟, 所以我们在研究中主要参考关于蒜氨酸检测的相关文献 (蒜氨酸含量

的测定文献大多是采用 HPLC 法), 因此本实验主要研究用 HPLC 法测定异蒜氨酸。另外, 洋葱中主要前体物质是 L(+) 异蒜氨酸, 而合成品为异构体混合物^[4]。因此本实验使用天然植物制备的异蒜氨酸为对照品, 不用合成品。本实验目的在于建立测定洋葱中异蒜氨酸含量的 HPLC 法, 为今后洋葱制品的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

洋葱 (红皮、黄皮、白皮) 市售; 732 型阳离子交换树脂 南开大学化工厂; 其它试剂 均为分析纯。

Waters600E 高效液相色谱仪 包括 DAD 检测器, 四元泵; Agilent C_{18} 色谱柱 (250mm $\times$ 4.6mm), J220 微波炉 广东顺德惠而浦公司; 超声提取器 天鹏电子新技术有限公司; 食物搅碎机 广州凌风赛尼 LEJ2-F4; Anke TDL-408 低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 异蒜氨酸对照品的制备 称取新鲜洋葱 1.5kg, 微波灭酶 20min, 打浆, 超声提取 10min, 用脱脂棉抽滤至澄清; 滤液用盐酸调至 pH 为 2 后, 上处理好的 732 阳离子交换树脂柱 (150g); 先用水洗净

收稿日期: 2008-10-06 * 通讯联系人

作者简介: 郭娟 (1982-) 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析与制剂学的研究。

基金项目: 石河子大学科学技术研究发展计划资助项目 (ZRKX2006-Y12)。

多糖(Molish 反应呈阴性),然后换用氨水解吸,收集流份,至 pH 为 9 时停止收集;合并异蒜氨酸含量较高的流分,经制备液相分离纯化,得到高纯度的异蒜氨酸。

1.2.2 测定方法的建立

1.2.2.1 色谱条件 Waters600E 液相色谱仪,Agilent C₁₈ 色谱柱(250mm × 4.6mm);流动相:100% 水;流速:0.8mL/min;检测波长:230nm;柱温:25℃;进样量:20μL。

1.2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取异蒜氨酸对照品 12mg 置于 10mL 容量瓶中,用适量水溶解后定容,作为储备液备用;精密移取该溶液 0.1、0.2、0.6、1.0、1.4、1.8mL 分别置于 5mL 容量瓶中,用水定容,按照上述色谱条件进 HPLC 测定。

1.2.2.3 精密度实验 取制备液相纯化后得到的异蒜氨酸溶液进行 HPLC 测定,连续进样 6 次,计算精密度。

1.2.2.4 重复性实验 取一头新鲜洋葱,称取鲜重;微波灭酶后,再次称重,计算 1g 新鲜洋葱与多少克灭酶后洋葱质量相当,打浆;称取洋葱浆 1.0g,平行六份,加水 10mL,超声提取 3min,过滤后进行 HPLC 测定。

1.2.2.5 加样回收率实验 准确称取上述洋葱浆,加入不同量的对照品,按上述色谱条件测定。

1.2.3 不同品种洋葱中异蒜氨酸含量测定 取新鲜洋葱红皮、黄皮、白皮各一头,按照 1.2.2.4 方法处理(n=3),计算新鲜洋葱中异蒜氨酸含量。

2 结果与分析

2.1 异蒜氨酸对照品的制备

取适量高纯度异蒜氨酸结晶用水溶解后进行 HPLC 检测,用面积归一化法计算纯度为 93.6%,结果见图 1(a),洋葱样品的色谱图见图(b)。

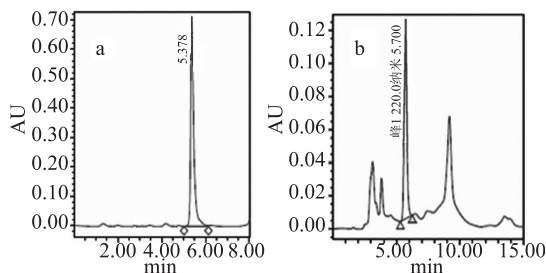


图1 异蒜氨酸对照品(a)和洋葱样品(b)色谱图

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线 求得回归方程为: $A = 11513c - 96.073$, $r = 0.9999$,线性范围:23~420μg/mL。

2.2.2 精密度实验 异蒜氨酸对照品溶液重复进样 6 次,测得 RSD% = 0.85%,精密度良好。

2.2.3 重复性实验 平行制备 6 份样品进行分析,测得 RSD% = 1.7%,该方法重复性较好。

2.2.4 加样回收率实验 加样回收率为 102.9%,RSD% = 2.3%,结果见表 1。

2.3 不同品种洋葱中异蒜氨酸含量的测定

白皮洋葱中异蒜氨酸含量最少,仅为其他品种含量的 40% 左右;黄皮品种含量最高,结果见表 2。

表1 加样回收率实验

初始含量 (μg)	加入量 (μg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
624.0	467.4	1.100	101.3		
631.4	467.4	1.117	102.9		
635.6	467.4	1.125	103.5		
634.1	584.3	1.221	100.4		
633.3	584.3	1.255	105.9	102.9	2.3
629.4	584.3	1.259	107.3		
636.1	701.1	1.352	102.3		
634.2	701.1	1.347	101.8		
632.9	701.1	1.338	100.6		

表2 不同品种洋葱中异蒜氨酸含量的测定

品种	黄皮	红皮	白皮
含量 (mg/g)	0.867 ± 0.015	0.839 ± 0.006	0.377 ± 0.004

3 讨论

有报道称,天然产物中以 L(+) 异蒜氨酸为主,而合成品为异构体混合物。本次实验将合成的异蒜氨酸和天然产物中提取的异蒜氨酸交替进样,发现二者出峰时间相差 0.2min^[5]。因为对应异构体与生理活性有密切的关系,因此本实验采用天然植物中制备的异蒜氨酸作为对照品,不用合成品。

本实验室前期人员比较了衍生化法和直接测定法测定蒜氨酸含量,二者在统计学上没有显著差异($t < t_{0.05}$)。并且,衍生化法测定蒜氨酸存在定量转化的问题,需要用缓冲盐控制 pH 使反应充分^[6],该方法繁琐且分离度也较低,不利于含量测定。本实验采用直接测定法测定洋葱中的异蒜氨酸,取得了较好的结果。

在此实验中发现,洋葱存放时间越长异蒜氨酸含量降低较明显。越冬存放的洋葱中异蒜氨酸含量仅为新收洋葱的 70% 左右,这与文献报道结果一致^[7]。这可能是因为异蒜氨酸容易被空气中的氧气氧化所致。另外,不同品种洋葱中异蒜氨酸含量差别很大,含量在 0.35~0.87mg/g 之间。

参考文献

- [1] 王辉,李景明,马钊,等. 洋葱中含硫化合物的生理功效[J]. 食品工业科技,2005,26(5):187~189.
- [2] Yoo KS, Pike LM. Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in Allium species [J]. Scientia Horticulturae, 1998, 10(1):1~10.
- [3] Marta CM, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic [J]. Food Science & Technology, 2007, 18(12):609~625.
- [4] Hughes J, Tregova A, Tomsett AB, et al. Synthesis of the flavour precursor, alliin, in garlic tissue cultures [J]. Phytochemistry, 2005, 66(2):187~194.
- [5] 崔利娜. 蒜氨酸及其同系物的分析[D]. 石河子大学硕士学位论文,2008.
- [6] Eghbal MA, Moridani MY, Pennefather PS, et al. A protective role towards atherosclerosis by hydrogen sulfide and natural organosulfur compounds derived from garlic and onion [J].

红外傅立叶转换光谱研究 金丝小枣多糖的酯化度

李进伟¹, 范柳萍¹, 李苹苹², 张连富¹

(1. 江南大学食品学院食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122;

2. 山东商务职业学院食品工程系, 山东烟台 264670)

摘要:报道了研究多糖酯化度(DE)的新方法,以金丝小枣为原料,从其水溶性提取物中分离得到金丝小枣粗多糖,经DEAE-Sephadex CL-6B、Sephadex CL-6B和Sephadex G-200柱层析,得到一个均一的金丝小枣多糖组分(ZSP3c)。红外傅立叶转换光谱(FT-IR)测定ZSP3c的DE为41.9%,与化学滴定法测定结果之间没有显著性差异($P > 0.05$),说明FT-IR测定多糖的DE是准确可行的。

关键词:金丝小枣, 多糖, 分离纯化, 酯化度

Study on degree of esterification of polysaccharide ZSP3c from *Zizyphus jujuba cv. Jinsixiaozao* by fourier transform infrared spectrophotometer

LI Jin-wei¹, FAN Liu-ping¹, LI Ping-ping², ZHANG Lian-fu¹

(1. School of Food Science and Technology, State Key laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Department of Food Engineer, Shangdong Business Insistute, Yantai 264670, China)

Abstract: A new method was applied for the study of the degree of esterification (DE) of polysaccharide. A crude polysaccharide was isolated from the water-soluble extracts of *Zizyphus Jujuba cv. Jinsixiaozao*, and a water-soluble polysaccharide (ZSP3c) was purified by DEAE-Sephadex CL-6B, Sephadex CL-6B and Sephadex G-200 column chromatography. The degree of esterification (DE) value of ZSP3c was 41.9% by fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR), no significant differences ($P > 0.05$) were found between the result of FT-IR and chemistry titration. The method was accurate and feasibility.

Key words: *Zizyphus Jujuba cv. Jinsixiaozao*; polysaccharide; isolation and purification; degree of esterification

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)06-0343-03

红枣(*Zizyphus Jujuba cv.*)作为药食同源植物,在我国有悠久的食用和药用历史,其资源十分丰富,总量占世界资源的90%以上。医学研究发现,红枣具有健脾养胃、补中益气、滋肺强肾、缓解药毒、抑制癌细胞增殖的保健功效。近年来,对红枣的研究开发日益深入,结果表明,红枣除含有丰富的维生素及

Ca、P、Fe等矿物质元素外,还含有生理活性极高的多糖。目前,测定多糖的酯化度的方法有很多种,如化学滴定法^[1]、GC法^[2]、HPLC法^[3]、H-NMR法^[4]。但这些方法测定时,存在测定过程比较繁琐,测定时间过长等缺点。红外光谱是研究分子运动的吸收光谱,由于每一种分子中各个原子之间的振动形式十分复杂,即使是简单的化合物,其红外光谱也是复杂而有其特征的,因此可以通过分析化合物的红外谱图获得许多反映分子结构的信息,用于鉴定化合物的分子结构。近年来,红外光谱越来越多地用来分析多糖的结构,其主要优点在于简便、快速、低消耗

收稿日期: 2008-09-19

作者简介: 李进伟(1972-),男,副教授,博士,主要从事天然产物提取及功能食品方面研究。

基金项目: 江南大学食品学院青年博士科研创新开放基金(FS-200801)和食品科学与技术国家重点实验室资助。

Atherosclerosis Supplements, 2006, 7(3): 445~446.

[7] Moreno FJ, Marta CM, Castillo MD, et al. Changes in

antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage [J]. Food Research International, 2006, 8(3): 891~897.