

· 研究简报 ·

葡萄糖苷酸内酯盐的反相离子对色谱分析

邓 芹 英

(化学系)

摘 要

在色谱柱为 Supelcosil SPLC-18-DB (5 μ , 250 \times 10mm), 流动相为含 5mM 四丁基溴化铵的 0.02M 磷酸二氢钾缓冲溶液和乙腈 (75:25, v/v), 流速为 1.0ml/min, 柱温为 30 $^{\circ}$ C 的条件下, 7 种葡萄糖苷酸内酯盐成分得到完全的分离, 其中 4 种主要成分被定量测定。此法具有简便、快速、准确性和重现性好的优点。文中对主要的色谱参数 (流动相的组成、pH 值、柱温) 对保留值和选择性的影响也进行了较详细的讨论。

关键词 葡萄糖苷酸内酯盐, 油菜籽, 反相离子对色谱

葡萄糖苷酸内酯盐 (Glucosinolate, 简称 GS) 普遍存在于十字花科植物及其种子中, 它及其酶解产物腈、异硫氰酸酯、噁唑烷硫酮等会使动物体甲状腺肿大, 体重下降, 甚至产生肝出血或堕蛋^[1]。近年来, 国外已开展从油菜籽渣中除去 GS 成份和提取油菜籽蛋白质的研究^[2,3,4]。

GS 是离子型化合物, 其结构为 $R-C \begin{cases} S-C_6H_{11}O_6 \\ N-O-SO_3^-M^+ \end{cases}$, 根据 R 基团的差异, 已知

可以构成 90 多种不同的物质^[5]。关于 GS 的分析, 过去多采用比色法、重量法测定其水解产物, 或用气相色谱^[6,7]、普通高效液相色谱^[8,9]测定其脱硫产物。这些方法不但在处理样品过程中耗时很长, 也会使一些性质不稳定的成份, 例如含咪唑环的 GS 发生热或光分解, 从而影响测定的准确性。本文采用反相离子对色谱 (RP-IPC) 直接测定原始的 GS 成份, 很好地克服了上述方法的缺点。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂 Hewlett-Packard 1090 型液相色谱仪, 附有 190~400nm 可变波长紫外检测器, 自动进样装置和自动积分仪。色谱操作条件的控制 and 数据处理通过计算机进行。

乙腈为 HPLC 级试剂, 色谱用水为二次蒸馏水再经去离子处理, 二者均经 0.45 μ 醋酸纤维滤纸过滤。磷酸二氢钾、四烷基溴化铵等均为分析纯试剂。

1.2 GS 样品的提取和纯化 称 200mg 的脱脂油菜籽于一干燥试管中, 在沸水浴加热 3 分钟后, 用 2.0, 1.0, 1.0ml 沸水提取三次, 合并萃取液并加入 120 μ l 各 0.5M 醋酸钡和醋酸铅溶液, 离心除去硫酸盐沉淀, 清液通过一支微型阴离子交换树脂柱 (填充高度为

φ7 × 20mm)，用0.5ml × 2体积水洗涤柱子，再用0.5ml × 3体积的0.1M碳酸氢钠溶液洗脱GS，并收集在1.5ml的HPLC进样瓶中，上好盖子备用。

1.3 色谱条件 色谱柱为Supelcosil SPLC-18-DB (5μ, 250 × 10mm)，流动相为含5mM四丁基溴化铵的磷酸二氢钾缓冲溶液和乙腈 (75: 25, v/v)，流速为1.0ml/min，柱温为30°。紫外检测器的检测波长为227nm。

2 结果 和 讨论

2.1 GS的色谱分析 在本实验条件下，色谱柱对油菜籽萃取液中的GS成分及杂质有良好的分离效果(图1)。经紫外光谱和气相色谱-质谱(CI和EI为离子源)鉴定，图中峰1~7是含不同R基团的GS成份，其中峰6是加进去的内标物苜蓿基-GS。其余均为萃取液中的杂质峰。

表1列出了三种油菜籽中主要的GS成份的定量测定结果，每个数据均为三次或四次平行分析的平均值。另二种GS组份(峰2、4)由于含量太低，难以制备足够量的纯样品测定其相对响应值，而未做定量分析。

2.2 离子对试剂的影响 在离子对色谱中离子对试剂与样品之间存在着离子间作用力。这种作用力与离子对试剂的性质及浓度有密切的关系，并影响离子对的生成及其在固定相和流动相之间的分配平衡。图2A表明GS的分配容量随离子对试剂四烷基溴化铵中烷基链长增大而显著增大，选择性提高。离子对试剂浓度增大，也使GS的分配容量线性地增大(图2B)。

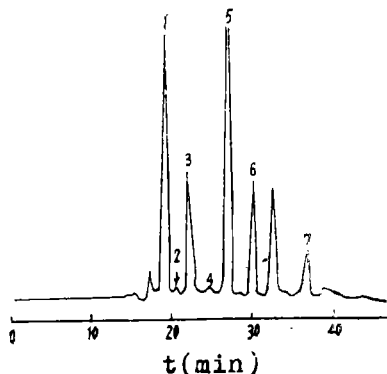


图1 油菜籽中GS成份的色谱分离
Fig. 1 RPIPC Chromatogram of glucosinolates isolated from rapeseed
图中各峰GS的R基为:

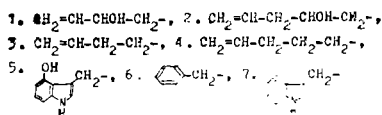


表1 脱脂油菜籽中的GS含量(微摩尔/克)

Tab.1 GS content in defatted rapeseed (μmol/g)

GS*	1	3	5	6	7	GS 总含量
相对摩尔响应值	1.09	0.98	0.48	1.00	0.49	
样品 1						
GS含量	6.34	3.42	10.66		1.44	21.95
标准偏差	0.19	0.17	0.15		0.20	0.57
样品 2						
GS含量	7.80	4.04	9.39		0.89	22.12
标准偏差	0.21	0.08	0.26		0.01	0.26
样品 3						
GS含量	6.71	3.34	10.36		0.86	21.27
标准偏差	0.18	0.02	0.05		0.15	0.44

* 行中数字所代表的R基见图1说明。

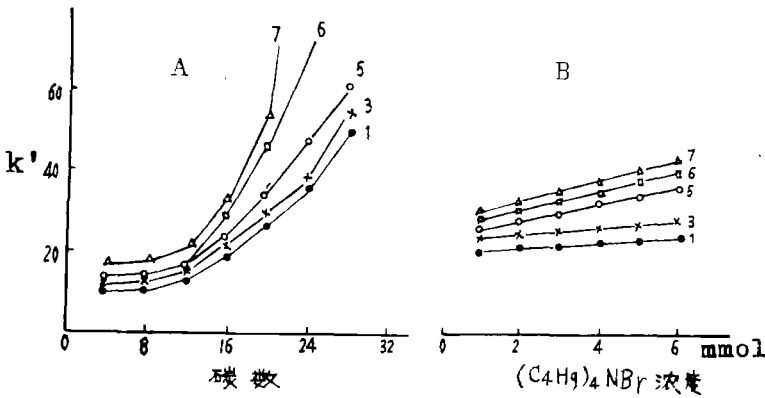


图2 R_4NBr 中烷基碳数和 R_4NBr 浓度对GS的分配容量的影响。各曲线代表的物质见图1

Fig. 2 Influence of R_4NBr carbon number and R_4NBr Concentration on the partition capacity of GS

2.3 流动相溶剂的影响 图3A表明流动相中乙腈浓度对GS保留值的影响。随着乙腈浓度的增大,流动相的溶剂强度也增大,GS的分配容量随之显著减小,GS的分离变坏。这种现象与非离子型化合物在没有离子对试剂的反相色谱中的行为是相似的。

缓冲溶液的浓度增大会导致GS分配容量降低,但这种影响没有上述因素那么显著。磷酸盐中阳离子不同对分离效果不会产生明显的差异。

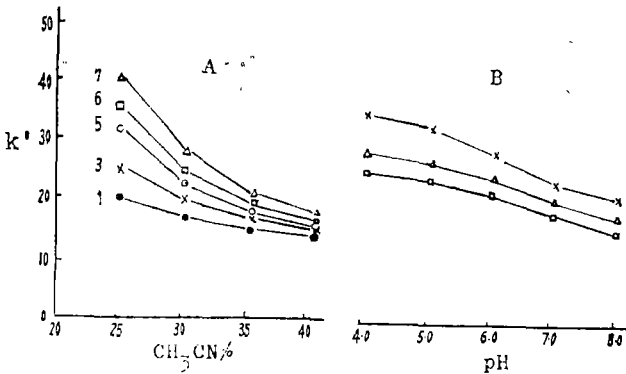


图3 流动相中 CH_3CN 浓度(A)和pH值、柱温(B)对GS分配容量的影响

A图中各曲线代表的物质见图1, B图各曲线分别为: \square 50°C, \blacktriangle 40°C, \times 30°C

Fig.3 Influences of CH_3CN Concentration in mobile phase (A) and pH and temperature (B) on the partition capacity of GS

2.4 缓冲溶液的pH值及柱温的影响 流动相的pH值是影响离子对色谱的重要因素。实验表明,当缓冲溶液的pH值在6.5~7.5时,油菜籽提取液中的GS成份及杂质彼此分离良好,而当pH值大于7.5或小于6.0时,总有某些成份互相重迭。而且,在较低pH值时,分析时间增加,色谱峰形变宽。由于在酸性和碱性条件下,GS的稳定性都降低。因此,本研究的全部实验都选择在中性条件下进行。升高柱温会使流动相粘度降低,加速离子对在两相中的分配平衡,从而使GS的分配容量减小。图3B显示了流动相pH值

及柱温对苜蓿基-GS的分配容量的影响。

上述结果表明,反相离子对色谱对油菜籽中的GS成份具有良好的选择性和广泛的适应性。相对于目前比较广泛采用的气相色谱法来说,由于省去了GS萃取液的脱硫、干燥及硅烷化等步骤,避免了某些不稳定成份的热分解,因而此法对各种GS成份均能得到准确和稳定的分析结果。

参 考 文 献

- [1] McGregor D I et al., *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 66 (1983), 825
- [2] Diosady L L et al., *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 18 (1984), 311
- [3] Diosady L L et al., *Food Chem.*, 18 (1985), 121
- [4] Naczki M et al., *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 19 (1986), 75
- [5] Fenwick G R et al., *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18 (1983), 123
- [6] Daun J K et al., *Method of the Canadian Grain Commission*, Grain Research Laboratory, Winnipeg, 1983
- [7] Sosulski R W et al., *J. Agric. Food Chem.*, 32 (1984), 1172
- [8] Sang J P et al., *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 67 (1984), 829
- [9] ReGregor D I, *Cruciferae Newsletter*, 10 (1985), 132

Analysis of Glucosinolates by Reversed-phase Ion-pair Liquid Chromatography

Deng Qinying *

Abstract

Reversed-phase ion-pair liquid chromatography on Supelcosil SPLC-18-DB was applied to the analysis of intact glucosinolates extracted from rapeseed. The solvent system was consisted of 0.02M KH_2PO_4 buffer containing 5 mM tetrabutylammonium bromide and acetonitrile (75/25, v/v). Seven glucosinolates in rapeseed meal were completely separated from one another. The concentrations of four major glucosinolates in three varieties of rapeseed were determined. The method is fast and reliable. The effects of the nature and concentration of the mobile phase components, the pH of the mobile phase, and the column temperature on the capacity factors of the glucosinolates were studied.

Keywords glucosinolate, rapeseed, reversed-phase ion-pair liquid chromatography

* Department of Chemistry