

HPLC 鉴定芥蓝中完形硫代葡萄糖甙

何洪巨 宋曙辉 王文琪 武兴德

(北京市农林科学院蔬菜研究中心 北京 100089)

摘要 本文对芥蓝中硫代葡萄糖甙组成与含量进行研究。结果表明, HPLC 梯度洗脱能很好地分离不同硫甙。二极管阵列(DAD)光谱发现, 脂肪类硫代葡萄糖甙在 225nm 处有一个特征吸收峰, 而吲哚类硫甙除在 225nm 处有吸收峰外, 在 280nm 处还有吸收峰。经鉴定, 芥蓝中的硫代葡萄糖甙有 7 种, 主要的硫甙为 3-丁稀基 GS, 约占总量的 40%~60%。而 4-羟基-3-吲哚基甲基 GS 和 4-甲氧基-3-吲哚基甲基 GS 的含量最低。4-甲基硫氧丁基 GS、3-吲哚基甲基 GS 和 1-甲氧基-3-吲哚基甲基 GS 的含量中等。

关键词 HPLC 芥蓝 硫代葡萄糖甙

硫代葡萄糖甙(Glucosinolates, 简称硫甙 GS)是十字花科蔬菜中重要的次生代谢产物, 它们是一类含硫化合物, 由于侧链基团的不同, 可把硫甙分为三类(脂肪类、芳香类、吲哚类硫甙)。目前已发现的硫甙有 100 多种, 存在于十字花科蔬菜中的约有 15 种。蔬菜在食用或机械破碎时可水解产生异硫氰酸脂(Isothiocyanates), 硫氰酸脂(Thiocyanates)和腈类(Nitriles)等化合物¹。吲哚类硫甙如 3-吲哚基甲基 GS 在酶的水解下会产生吲哚-3-甲醇、吲哚-3-酰胺等化合物, 能降低癌症的发病率。十字花蔬菜可增加机体 II 相酶的活性。特别值得注意的是生物活性物质萝卜硫素, 它是 4-甲基氧丁基硫甙的降解产物, 是迄今为止发现的最强烈的 II 相酶诱导剂, 它能使致癌基因失去作用²。

十字花科蔬菜如甘蓝、菜花中的硫甙分布和含量已有报道¹。芥蓝(*Brassica alboglabra* Bailey)是我国特产的十字花科芸薹属蔬菜, 但对芥蓝的活性成分硫甙的研究还未见报道。本文以 HPLC 梯度洗脱分离完形的硫甙, 对不同硫甙的二极管阵列光谱进行了分析。鉴定出芥蓝中硫甙的组成并比较了不同芥蓝品种硫甙的含量。

1 实验部分

1.1 样品制备 芥蓝花薹(包括嫩茎叶片)收获后, 切成 1cm 长大小, 混匀。200g 鲜样称重后冷冻于-40℃ 冰箱中, 经真空冷冻干燥粉碎后贮存于样品瓶中, 在干燥器中保存。

1.2 硫甙的提取 准确称 1g 冷冻干燥样品于 150mL 三角瓶中, 加入 45mL 煮沸的甲醇(100%), 80℃ 恒温水浴 15min。提取液通过 1.0μm 滤膜过滤, 残留物经 40mL, 80% 甲醇提取 10min。混合两次提取的滤液, 通过旋转蒸发浓缩至 2mL。样品转移至 10mL 容量瓶中定容, 加入 1mL 0.4M 醋酸钡 ($\text{Ba}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, Merck) 以去掉蛋白质。然后 7000rpm 离心 10min。上清液经 0.2μm 滤膜过滤后用于 HPLC 分析。

1.3 HPLC 分析 HPLC 为 Waters 高效液相色谱仪, 包括梯度洗脱泵、自动进样器、紫外检测器, 检测波长为 230nm, 二极管阵列检测器波长扫描范围为 200~400nm。分析柱: Kichosphere RP-18(250×4mm, Merck)。流动相 A: 0.1mol/L 醋酸铵, 流动相 B: 1L 0.1mol 醋酸铵+300mL 甲醇, 按表 1 梯度洗脱在 36min 内可使硫甙全部分离(见图 3)。

表 1 流动相梯度组成

| 时间(min) | 流动相 A(%) | 流动相 B(%) |
|---------|----------|----------|
| 0 | 100 | 0 |
| 6 | 100 | 0 |
| 21 | 30 | 70 |
| 24 | 0 | 100 |
| 28 | 0 | 100 |
| 30 | 100 | 0 |
| 25 | 100 | 0 |

2 结果与讨论

2.1 标准硫代葡萄糖甙 HPLC 图谱 对 8 种硫甙混合标准样品进行了 HPLC 分析, 图谱见图 1。由于极性和分子量大小不同, 8 种硫甙在不同的保留时

间被分离出来。图中1~5和7分别为脂肪类甙,6为芳香类甙,8为吲哚类甙。

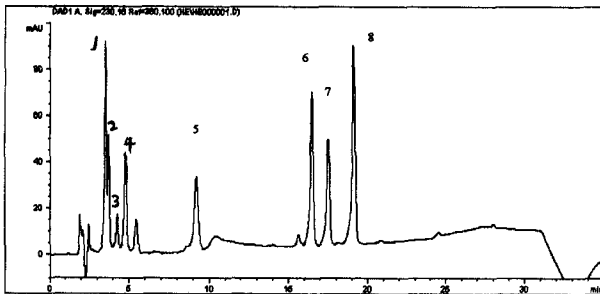


图1 硫甙混合标样的HPLC图谱

1:3-甲基硫氧丙基GS 2:3-甲基磺酰丙基GS 3:2-丙烯基GS
4:epi2-羟基-3-丁烯基GS 5:3-丁烯基GS 6:苯甲基GS 7:4-甲硫基丁基GS 8:3-吲哚基甲基GS

2.2 不同硫代葡萄糖甙二极管阵列(DAD)图谱 对每种硫代葡萄糖甙进行了DAD(200nm~400nm)紫外波长扫描,获得不同种类的硫甙的特征光谱信息,进一步鉴定硫代葡萄糖甙。

如图2所示,2-丙烯基GS在紫外区只在225nm有一个特征吸收峰。其它的脂肪类硫甙如3-甲基硫氧丙基GS(IBE)、3-甲基磺酰丙基GS、3-丁烯基GS也有相同形状的DAD图谱。

3-吲哚基甲基GS除在225nm处有一吸收峰外,在280nm处还有另外一吸收峰,对其它已鉴定出的吲哚类硫甙如4-羟基-3-吲哚基甲基GS、4-甲氧基-3-吲哚基甲基GS和1-甲氧基-3-吲哚基甲基GS也发现有相同形状的DAD图谱。因此可根据DAD图谱鉴定是否为硫甙或者哪一类的硫甙。

2.3 芥蓝中硫甙的HPLC图谱 芥蓝中硫甙的HPLC图谱如图3。根据DAD光谱和标准物质比较,可以鉴定出芥蓝中硫甙。分别为:1:2-羟基-3-丁烯基GS(PRO);2:4-甲基硫氧丁基GS(RAA);3:3-丁烯基GS(NAP);4:4-羟基-3-吲哚基甲基GS(4OH);5:3-吲哚基甲基GS(GBC);6:4-甲氧基-3-吲哚基GS

(4ME);7:1-甲氧基-3-吲哚基甲基GS(NEO)。

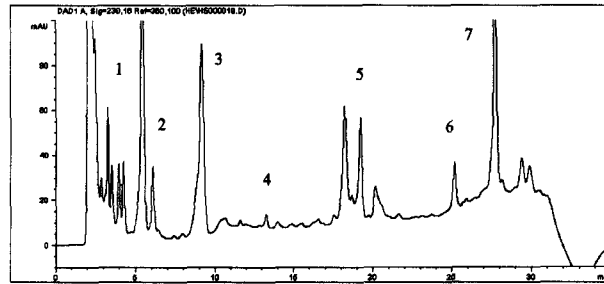


图3 芥蓝硫甙的HPLC图谱

2.4 不同芥蓝品种硫甙的含量 不同芥蓝品种含量见表2。硫甙总量以JL4最高,为83.99 $\mu\text{mol}/100\text{gFW}$,其次为JL5为77.78 $\mu\text{mol}/100\text{gFW}$,最低的为JL1,仅为51.02 $\mu\text{mol}/100\text{gFW}$ 。本实验观察到芥蓝硫甙的总量比以前的实验结果³(285.85 $\mu\text{mol}/100\text{gFW}$)较低,可能是品种和栽培条件的影响所致。

表2 不同芥蓝品种中硫甙的含量($\mu\text{mol}/100\text{gFW}$)

| 硫甙(GS) | PRO | RAA | NAP | 4OH | GBC | 4ME | NEO | GS总量 |
|--------|------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|
| JL1 | 2.97 | 8.62 | 25.62 | 0.35 | 6.59 | 1.55 | 5.32 | 51.02 |
| JL2 | 5.80 | 7.36 | 28.63 | 0.34 | 8.13 | 0.32 | 17.20 | 67.78 |
| JL3 | 3.60 | 5.46 | 39.27 | 0.37 | 8.71 | 1.01 | 12.30 | 70.72 |
| JL4 | 3.88 | 9.53 | 49.31 | 0.31 | 12.81 | 2.08 | 6.07 | 83.99 |
| JL5 | 2.88 | 7.03 | 44.18 | 0.30 | 12.06 | 1.26 | 10.06 | 77.78 |
| JL6 | 1.44 | 6.83 | 43.42 | 0.30 | 10.91 | 1.36 | 9.43 | 73.69 |

在芥蓝品种中3-丁烯基GS(NAP)的含量最高,为芥蓝中主要的硫甙,约占总量的40%~60%。而4-羟基-3-吲哚基甲基GS(4OH)和4-甲氧基-3-吲哚基甲基GS(4ME)的含量最低。

3-吲哚基甲基GS和1-甲氧基-3-吲哚基甲基GS属于吲哚类硫甙,它们的降解产物具有抗癌作用,而2-羟基-3-丁烯基GS(PRO)的降解产物具有致甲状腺肿素的作用,但是由于含量低,不会引起危害。4-甲基硫氧丁基GS(RAA)的降解产物萝卜硫素被证明是最强烈的II相酶单功能诱导剂。本试验发现芥蓝萝卜硫素的含量小于10 $\mu\text{mol}/100\text{gFW}$ 低于以前的报道,

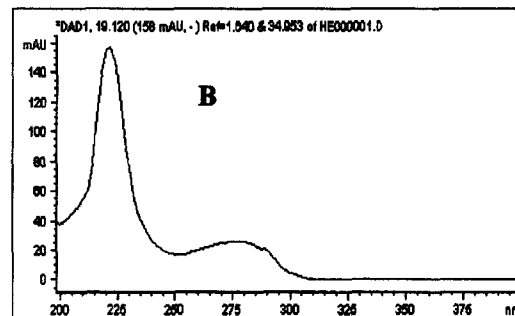
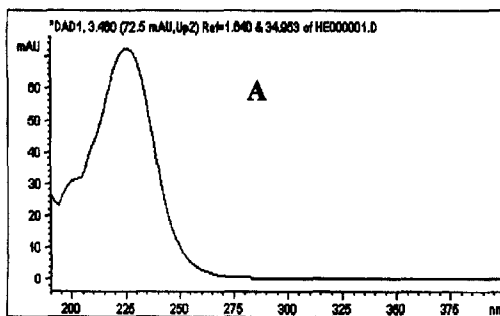


图2 2-丙烯基GS(A)和3-吲哚基甲基GS(B)的DAD图谱

因此选择吡啶类 GS 和 4-甲基硫氧丁基 GS 含量高的品种,对膳食营养保健有重要的意义。

参考文献

1 Rosa, E A S, Heaney R K, Fenwick G R, Portas C A M. Glucosinolates in crop plants. Horticultural reviews, 1997,19:99~215

2 Zhang, Y, Kensler T W, Cho C G, Posner G H, Talalay P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. Proc. Natl. Acad. Sci. 1994,91:3147~3150
3 He, H. Studies for growth adaptation and identification of glucosinolates on Chinese Brassicas. Dissertation, Lehrstuhl fuer Gemuesebau, Technische Universitaet Muenchen 1999:56~69

HPLC identification of intact glucosinolates in Chinese kale

He Hongju Song Shuhui Wang Wenqi Wu Xingde
(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089)

Abstract In this Paper, glucosinolate composition and content in Chinese kale were studied. Glucosinolates could be separated successfully in HPLC system with gradient eluents. Diode array detection (DAD) spectra showed that there was only one absorption peak at 225nm for aliphatic glucosinolates. However, the another absorption peak at 280nm was also observed in indole glucosinolate. 7 kinds of glucosinolates were detected Chinese kale. Gluconapin was the major gluconapin representing about 40%~60% of in the total amount. The content of 4OH glucobrassicin and 4ME glucobrassicin were the lowest and there were moderate contents of glucoraphane, glucobrassicin and neoglucobrassicin in Chinese kale.

Key words HPLC Chinese kale Glucosinolates

(上接第 14 页)

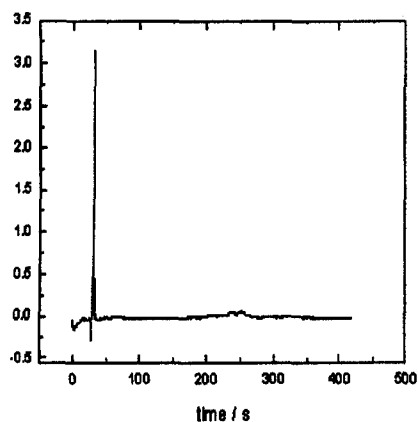


图 3B(2) 反应前混合气体的 GC 峰

4 结论

以上分析得知,用改进进样系统的色谱,能够简单快速准确的测定混合气体中甲醛气体的含量,能很好应用于各个方面中。

参考文献

1 王术皓,杜凌云,张爱梅.分析化学,2000,5:628~630
2 黎源倩,牟文萱,分析化学,1993,21(7):804
3 Miksch R R, Antbon D W, Fanning LZ, Hollowell C D, Revzan K, Glanville J, Anal. Chem, 1981,53:2118
4 张素芬,辛长波,王晰.工业水处理,2000,20(10):27~30

Fast detection of formaldehyde in gases by GC

Li Wei Zhu Yongfa
(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing, 100084)

Abstract GC with injection system improved and using N₂ as carrier gas and FiD as detector was used to determinate formaldehyde. After formaldehyde was demarcated, the concentration of formaldehyde in gases can be got directly. This way was used on concentration of formaldehyde in automobile exhausted gases and photocatalyst reaction well. The veracity was about 1ppm and the lowest detection was about 5ppm.

Key words Formaldehyde GC