

JAROSŁAW NESTOROWICZ, GRAŻYNA PIERZYNOWSKA-KORNIK,  
RYSZARD ZADERNOWSKI

## ZASTOSOWANIE METODY HPLC DO OZNACZANIA ZMIAN ZAWARTOŚCI GLIKOPIRANOZYDÓW PODCZAS DOJRZEWANIA NASION BOBIKU

APPLICATION OF THE HPLC METHOD TO THE DETERMINATION OF  
GLUCOPIRANOSIDES DURING RIPENING OF FABA BEAN SEEDS.

Katedra Technologii Produktów Roślinnych, Wydział Technologii Żywności,  
Akademia Rolniczo-Techniczna  
Kierownik: prof. dr hab. R. Zadernowski

*Zmodyfikowano metodę HPLC oznaczania glikopiranozydów (wicyny i konwicyny) poprzez zastosowanie dostępnej w handlu urydyny jako standardu wewnętrznego. Wyznaczone doświadczalnie współczynniki korekcyjne wynosiły dla wicyny i konwicyny odpowiednio 1,12 i 0,79. Prześledzono zmiany zawartości wicyny i konwicyny w czasie dojrzewania nasion bobiku stwierdzając ponad 90% redukcję ich zawartości w nasionach bobiku w czasie potrzebnym do osiągnięcia dojrzałości przemysłowej.*

### WSTĘP

Nasiona roślin strączkowych, w tym również bobiku, niezmiennie znajdują się w kręgu zainteresowań wielu ośrodków badawczych. W nasionach bobiku znajduje się 24–40% skrobi oraz 28–35% białka. Dlatego też nasiona bobiku stanowią alternatywę wobec drogich białek soi w mieszankach paszowych dla drobiu i zwierząt hodowlanych. Możliwości wykorzystania bobiku w diecie człowieka ogranicza występowanie w nasionach czynników antyżywnościowych. Według Bjerga i wsp. [1] nasiona bobiku charakteryzuje wysoka zawartość glikopiranozydów i tanin, średni poziom zawartości  $\alpha$ -galaktozydów z grupy rafinoz oraz względnie niskie stężenia inhibitorów trypsyny, hemaglutynin i fitynianów. Większość spośród wymienionych czynników antyżywnościowych to związki ulegające całkowitej lub częściowej inaktywacji pod wpływem hydrotermicznej w procesach parowania lub gotowania. Istotny problem stanowi obecność termostabilnych glikopiranozydów wicyny i konwicyny, które nie ulegają degradacji pod wpływem zabiegów kulinarnych. Stwierdzono występowanie związku przyczynowego pomiędzy spożywaniem nasion zawierających glikopiranozydy i zachorowaniami na chorobę hemolityczną, określaną jako fawizm [3, 6]. Osoby ze skłonnością do fawizmu wykazują genetyczny niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G-6PD) i towarzyszący temu niski poziom glutationu (GSH) w erytrocytach. Związkami niszczącymi glutation erytrocytów u ludzi z niedoborem G-6PD są dwa aglikony dwuwi-

cyna i izouramil, które wchodzą w skład wicyny i konwicyny. Wiele badań dotyczy eliminacji glikopiranozydów poprzez genetyczny dobór materiału siewnego lub zastosowanie odpowiednich zabiegów technologicznych [4, 5, 6]. Łączy się to z koniecznością opracowania standardowej metody ilościowego oznaczania wicyny i konwicyny w badanym materiale siewnym oraz nasionach i produktach białkowych z bobiku. Obecnie wykonywanie badań rutynowych zawartości glikopiranozydów jest utrudnione z uwagi na niedostępność handlowych wzorców wicyny i konwicyny [5, 7, 10]. Dlatego w niniejszej pracy podjęto próbę zastosowania urydyny jako standardu wewnętrznego do oznaczania wicyny i konwicyny metodą HPLC.

Celem podjętych badań była modyfikacja metody oznaczania wicyny i konwicyny techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), poprzez zastosowanie dostępnej w handlu urydyny jako standardu wewnętrznego (IS) oraz wykorzystanie opracowanej metody do prześledzenia zmian zawartości glikopiranozydów podczas dojrzewania nasion bobiku.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły nasiona bobiku odmiany Dino, pochodzące z upraw 1993 roku z plantacji Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie. Próby nasion pobierano od momentu ich wykształcenia się aż do uzyskania pełnej dojrzałości, w odstępach co 12 dni.

Wzorce wicyny i konwicyny otrzymano z Department of Crop Science, University of Saskatchewan. W badaniach stosowano: urydynę ( $C_9H_{12}N_2O_6$ ) firmy Sigma, USA; acetonitryl do analiz HPLC firmy Merck, Niemcy; pozostałe odczynniki pochodziły z PPH POCh Gliwice.

### Ekstrakcja

Ekstrakcję wicyny i konwicyny z nasion bobiku wykonywano metodą podaną przez *Quemenera* i in. oraz *Quemenera* [8, 9] z niewielkimi zmianami. Odważka nasion bobiku poddana ekstrakcji wynosiła od 1 do 2,5 g. Wielkość odważki zależała od suchej masy nasion, którą oznaczono metodą suszenia w temperaturze 105°C. Nasiona bobiku rozdrabniano przy użyciu homogenizatora laboratoryjnego (nasiona suche uprzednio mielono) i poddawano dwukrotnej ekstrakcji 0,1 mol/l NaOH przez 10 minut. Homogenną masę przenoszono ilościowo do probówek wirówkowych i wirowano (10 min; 4000 × g). Następnie pobierano 15 ml supernatantu i przy użyciu około 1,5 ml 1 mol/l HCL obniżano pH w celu wytrącenia białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4.2). Całość próby ponownie wirowano (10 min; 4000 × g), oddzielano supernatant, a osad białka przemywano 30 ml wody destylowanej zakwaszonej do pH = 4,2 i sączono. Supernatant i przesącz łączono i rozcieńczano wodą destylowaną do uzyskania objętości 50 ml. Z tak przygotowanej próby wyjściowej pobierano 1 ml, dodawano standard wewnętrzny (IS) i uzupełniano wodą destylowaną do stałej objętości (około 10-krotne rozcieńczenie). Stężenie urydyny w rozcieńczonej próbce wynosiło 0,04 mg/l. Rozcieńczenie próby wodą destylowaną jest konieczne w celu ochrony kolumny analitycznej przed wytrąceniem się glikopiranozydów. Próbę sączono przy użyciu filtra Millipore (0,45 μm) i наносzono na kolumnę HPLC w ilości 20 μl.

### Przygotowanie roztworów wzorcowych

Wzorce glikopiranozydów: wicyny i konwicyny oraz standardu wewnętrznego – urydyny rozpuszczono w 0,1 mol/l NaOH, pH roztworów doprowadzano do 4,2 za pomocą 0,1 mol/l HCl i sporządzano rozcieńczenia w zakresie 0,01 – 0,05 mg/ml. Roztwory wzorcowe przed naniesieniem na kolumnę HPLC sączono podobnie jak ekstrakty z nasion bobiku. Roztwory wicyny, konwicyny i urydyny oraz mieszaninę wzorców rozpuszczonych w 0,1 mol/l NaOH poddawano analizie spektralnej w ultrafiolecie ( $\lambda = 220 - 340$  nm) w celu wyznaczenia widm

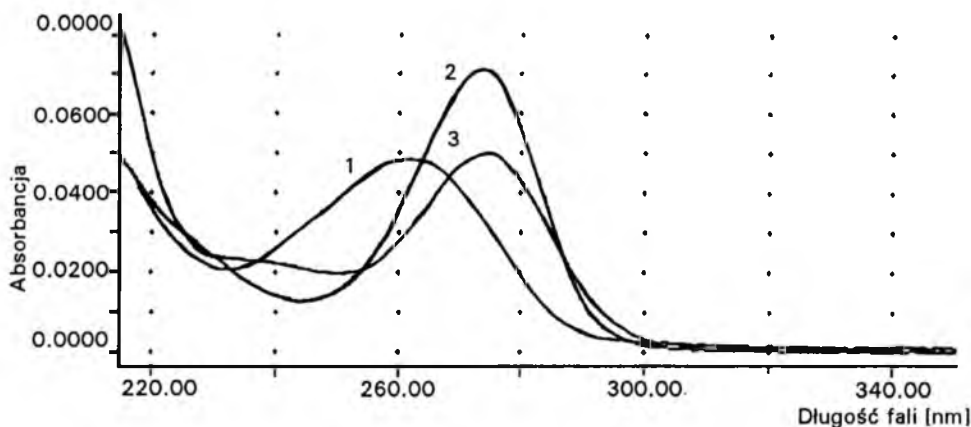
absorpcji tych związków. Pomiarów dokonano przy użyciu spektrofotometru CARY 3E firmy Varian z systemem analizy wizyjnej.

#### Warunki rozdzielania metodą HPLC

Warunki rozdzielania wicyny i konwicyny metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej zmodyfikowano w oparciu o dane opublikowane przez *Quemenera* [9] i *Quemenera* i wsp. [8]. W badaniach korzystano z systemu HPLC firmy Unicam, składającego się z pompy LC3-XP, detektora LC-UV (Pye Unicam), rejestratora PM 82-51 (Philips) i integratora CI-100 (Tesla). Do rozdzielania użyto kolumny szklanej firmy Tessek o wymiarach  $3.3 \times 150$  mm z wypełnieniem Separon SGX<sub>2</sub> ( $5\mu\text{m}$ ). Fazę ruchomą stanowił acetonitryl-woda (70:30; v/v), a przepływ wynosił 1 ml/min. Oznaczenia badanych związków wykonano przy długości fali 273 nm i czułości odczytu 0.01 jednostki absorbancji (AUFs). Liniowe zależności pomiędzy polem powierzchni pików i stężeniem glikopiranozydów i urydyny w zakresie stężeń obliczono matematycznie [2].

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

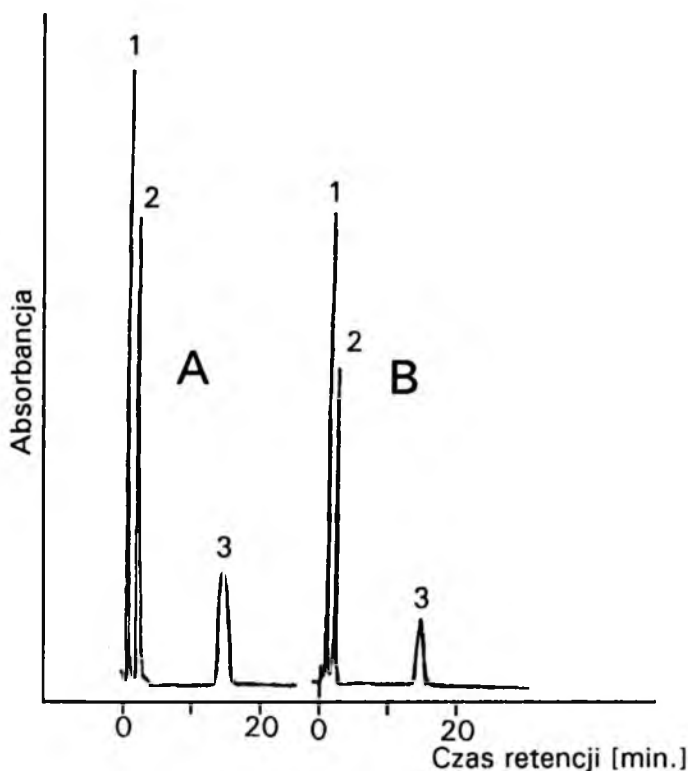
Maksima absorpcji ( $\lambda_{\text{max}}$ ) wzorcowych roztworów glikopiranozydów: wicyny i konwicyny oraz standardu wewnętrznego – urydyny określono za pomocą systemu analizy obrazu (Ryc. 1). Wynoszą one odpowiednio: dla urydyny 262 nm, konwicyny 273 nm i wicyny 276 nm. W oparciu o wyniki analizy widmowej i dane z piśmiennictwa [9], w metodzie HPLC przyjęto odczyt detekcji przy 273 nm. Wybrana długość fali stanowi maksimum absorpcji konwicyny, a urydyna i wicina wykazują przy niej wysoką absorbancję.



Ryc. 1. Widmo UV standardów: urydyna (1), konwicyna (2), wicina (3).  
UV spectrum of uridine (1), convicine (2), vicine (3).

Piki wicyny, konwicyny i urydyny w mieszaninie wzorców rozdzielonych metodą HPLC, w warunkach podanych w części metodycznej, zidentyfikowano w oparciu o czasy retencji roztworów wzorców nanoszonych pojedynczo na kolumnę. Chromatogramy mieszaniny wzorców zawierały trzy dokładnie rozdzielone, nie nakładające się na siebie piki. Kolejność rozdzielania i czasy retencji kształtowały się następująco: urydyna 1,6 min., wicina 2,7 min. i konwicyna 13 min. (Ryc. 2). Chromatogramy otrzymane w wyniku rozdzielania metodą HPLC prób przygotowanych z ekstraktów nasion bobiku

zawierały również trzy dokładnie rozdzielone piki, odpowiadające czasom retencji oznaczanych związków. Na chromatogramach nie stwierdzono obecności żadnych dodatkowych pików w czasie 20 minut rozdziału (Ryc. 2).

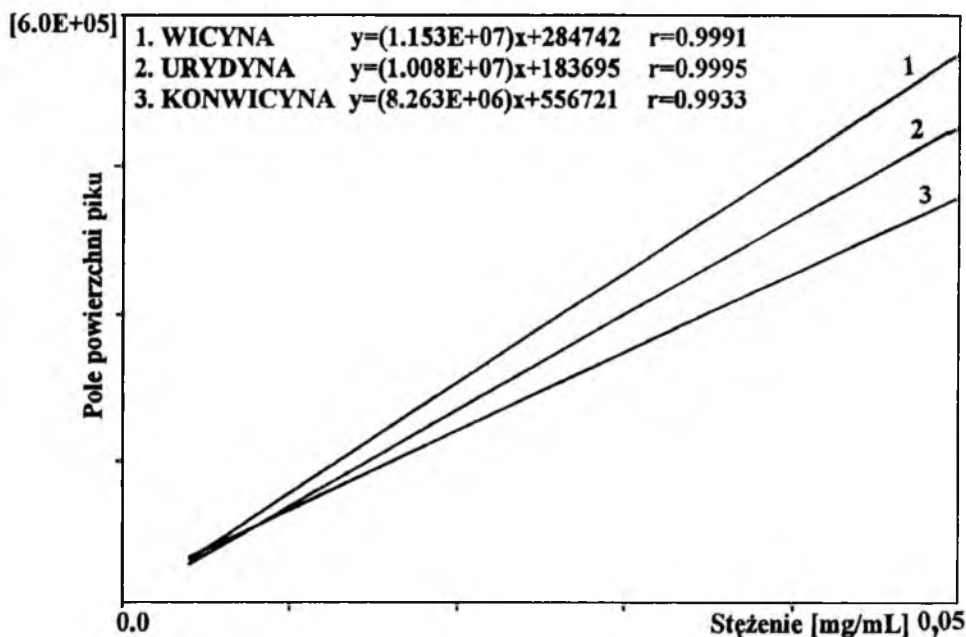


Ryc. 2. Chromatogramy HPLC rozdzielających standardy (A) i próby (B): 1-urydyna, 2-wicyna, 3-konwicyna.

Chromatograms of separation of standards and sample: 1-uridine, 3-viceine, 3-convicine

Roztwory pojedynczych wzorców o stężeniach w zakresie od 0,01 do 0,05 mg/ml posłużyły do wyznaczenia kalibracyjnych wicyny, konwicyny i urydyny w opisanych warunkach rozdziału metodą chromatografii cieczowej. Odczytane z integratora wartości pola powierzchni pików wykazywały zależność liniową w zakresie badanych stężeń (współczynniki korelacji powyżej 0,99) (Ryc. 3).

Na podstawie krzywych kalibracyjnych roztworów wzorców obliczono współczynniki korekcyjne. W tym celu, dla każdego stężenia (w badanym zakresie stężeń) obliczono stosunek pola powierzchni pików wicyny lub konwicyny do urydyny. Wartość współczynników w zakresie stężeń od 0,01 do 0,05 mg/ml była stała i wynosiła odpowiednio: wicyna 1,12 i konwicyna 0,79. Współczynniki korekcyjne uwzględniają różnice maksymów absorpcji wzorców. Obliczenia zawartości wicyny lub konwicyny w ekstraktach nasion bobiku dokonano w oparciu o znane stężenie standardu wewnętrznego – ury-

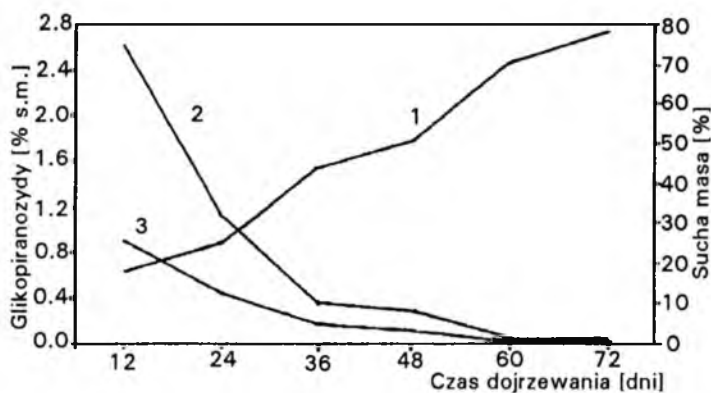


Ryc. 3. Krzywe kalibracyjne rozdziłu HPLC dla urydyny (1), wicyny (2) i konwicyny (3).  
Calibration curve of separation of uridine (1), vicine (2) and convicine (3).

dyny (0,04 mg/ml) w analizowanych próbach. Końcowy wynik uwzględnia wielkość naważki i stosowane rozcieńczenia.

#### APLIKACJA METODY

Opracowaną metodę oznaczania glikopiranozydów zastosowano do prześledzenia zmian zawartości wicyny i konwicyny podczas dojrzewania nasion bobiku. Prześledzono zmiany zawartości wicyny i konwicyny w przeliczeniu na zawartość suchej masy nasion bobiku w okresie od wykształcenia się nasion do uzyskania przez nie dojrzałości zbiorczej (Ryc. 4). Zawartość wicyny we wczesnej fazie wykształcenia nasion wynosiła 26,2 g/kg, a konwicyny 9,1 g/kg suchej masy nasion. W tym czasie sucha masa nasion bobiku kształtowała się na poziomie 18,0%. W końcowej fazie dojrzewania bobiku, która w warunkach doświadczenia przypadała około 72 dnia od momentu wykształcenia się nasion, zawartość suchej masy wynosiła 78,0%. Nasiona zawierały wówczas 0,24 g/kg s.m. wicyny oraz zaledwie 0.01 g/kg s.m. konwicyny. Ze wzrostem suchej masy do około 50%, (po 36 dniach) zaobserwowano znaczny spadek zawartości glikopiranozydów o około 89,4% w przypadku wicyny i 88,5% konwicyny. Dalsze obniżenie zawartości glikopiranozydów przebiegało znacznie łagodniej. W momencie zbioru nasion bobiku stwierdzono ponad 90% redukcję zawartości glikopiranozydów w przeliczeniu na suchą masę nasion. Osiągnięcie dojrzałości przez nasiona bobiku uwarunkowane jest wieloma czynnikami.



Ryc. 4. Zmiany zawartości suchej masy (1) oraz wicyny (2) i konwicyny (3) w czasie dojrzewania nasion bobiku.

Changes in the dry matter (1), vicine (2) and convicine (3) during ripening of faba bean seeds

Wyróżnikiem przydatności nasion do zbioru jest zawartość suchej masy, która powinna wynosić około 80%. Istotna jest też koncentracja czynników antyżywniowych, a stwierdzony w dojrzałych nasionach bobiku poziom glikopiranozydów wydaje się być bezpieczny.

#### WNIOSKI

1. Urydyna spełnia wymogi standardu wewnętrznego (IS) w modyfikacji ilościowej metody oznaczania glikopiranozydów techniką HPLC. Handlowa dostępność urydyny pozwoli na rutynowe oznaczanie tych związków.

2. Zawartość glikopiranozydów w nasionach bobiku ulega znacznemu obniżeniu podczas dojrzewania. W momencie osiągnięcia dojrzałości zbiorczej zawartość wicyny i konwicyny w suchej masie nasion była o ponad 90% niższa niż w nasionach w początkowym okresie dojrzewania.

J. Nestorowicz, G. Pierzynowska-Kornik, R. Zadernowski

#### APPLICATION OF THE HPLC METHOD TO THE DETERMINATION OF GLUCOPIRANOSIDES DURING RIPENING OF FABA BEAN SEEDS

#### Summary

Uridine ( $C_9H_{12}N_2O_6$ ) was applied as an internal standard for the determination of glucopiranosides in faba bean seeds by the HPLC method. The relative UV response factors of vicine or convicine to uridine were determined (1.12 and 0.79, respectively). The changes in the content of vicine and convicine during ripening of faba bean seeds were followed. It was observed that with the increase in the seed dry matter content from 0.18 kg/kg to 0.78 kg/kg, the dry matter based content of vicine decreased from 26.225 g/kg to 0.243 g/kg, and that of convicine from 9.051 g/kg to 0.094 g/kg.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bjerg B., Eggum B.O., Sorensen H., 1988, *Antinutritional Factors in Pea and Faba Beans. Required Information Levels, Biochemical Studies and Analytical Methods*, 1° Intern Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds, Wageningen, the Netherland 1988, Pudoc Wageningen, 351. – 2. Graph PAD InStat wersja 1.14, 1990, (program statystyczny). – 3. Marquardt R.R., Muduuli D.S., Frohlich A.A., Purification and Some Properties of Vicine and Convicine Isolated from Faba Bean (*Vicia Faba L.*) Protein Concentrate. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31, 839. – 4. Marquardt R.R., Dietary Effects of Tannins, Vicine and Convicine, 1989, in: Recent advances of research in antinutritional factors in legume Seeds. 1° Intern Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds, Wageningen, the Netherland 1988, Pudoc Wageningen, 141. – 5. Meijer M.M.T., Muuse B.G., Optimization of Dehulling Technique and Enzymatic Hydrolysis of Vicine, Convicine to Eliminate ANF's of Faba Beans. *Ibid.*, 268. – 6. Olsen H.S., Andersen J.H., The Estimation of Vicine and Convicine in Faba Beans and Isolated Faba Bean Proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 1979, 29, 323. – 7. Pitz W.J., Sosulski F.W., 1979, Determination of Vicine and Convicine in Faba Bean Cultivars by Gas-Liquid Chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1979, 12, 93. – 8. Quemener B., Gueguen J., Mercier C., Determination of Vicine and Convicine in Faba Beans by High Pressure Liquid Chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1982, 15, 2, 109. – 9. Quemener B., Improvements in the High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Amino Sugars and  $\alpha$ -Galactosides in Faba Bean, Lupine and Pea. *J. Agric. Food Chem.* 1988, 36, 754. – 10. Ramsay G., Griffiths D.W., A Rapid Method for Screening Green and Mature Seed of *Vicia Faba* For Variation in Vicine and Convicine Content, 1992, in: Proc. 1° Conference Europeenne Sur Les Proteagineux, ANGERS, France, 419.

Otrzymano: 1995.01.13