

HPLC-ESI/MS法分析大豆胚芽中的异黄酮

——大豆异黄酮和皂苷的研究(III)

无锡轻工业大学食品学院(214036) 谷利伟* 谷文英
无锡轻工业大学分析中心 陶冠军 秦

摘要 以 HPLC-ESI/MS 对大豆胚芽中的异黄酮进行了定量和定性分析,表明 ESI/MS 能够灵敏而准确地反应色谱峰成分的结构特征,解决了 HPLC 分析过程微量和不稳定的异黄酮的色谱峰的定性难题,以少数的标样即可对所有结构的异黄酮进行定量。

关键词 大豆 异黄酮 HPLC-ESI/MS

HPLC-ESI/MS Analysis of Isoflavones from Soy Hypocotyl (III)

School of Food, Wuxi University of Light Industry (Wuxi 214036) Gu Liwei and Gu Wenying

Analytical Center, Wuxi University of Light Industry Tao Guanjun and Qin Fang

Abstract Various isoflavones from soybean hypocotyl were analyzed quantitatively and qualitatively by HPLC-ESI/MS. It revealed that ESI/MS could identify the unstable and minor isoflavone isomer peaks with high sensitivity and accuracy. All isoflavones could be quantitatively analyzed with the aid of ESI/MS. The components of isoflavone in different parts of soybean and its difference caused by treatments were analyzed and compared by means of this method.

Key words soybean isoflavones HPLC-ESI/MS

大豆异黄酮能降低乳腺癌、前列腺癌等的发病率;缓解更年期因雌激素分泌减少而引起的更年期障碍和骨质疏松症;是大豆食品使血液胆固醇下降的关键物质^[1],对大豆食品中异黄酮的准确定性定量分析是研究异黄酮生理作用的基础。

以常规的反相 HPLC 结合 260 nm 紫外检测的方法测定大豆中的异黄酮有一定的难度。大豆中的异黄酮有 12 种,其中约 68% 以丙二酰化的糖苷形式存在,但这种形式极不稳定,5℃ 贮存 5 d 即自动水解为糖苷^[2]。丙二酰糖苷干热处理后分解得到天然大豆中不存在的乙酰化的糖苷。以上异黄酮成分或不稳定或含量极少,不易得到标样进行定性。大豆中异黄酮的组成成分因品种、加工方法的差异变化极大,以紫外吸收检测时存在酚酸等化合物的干扰,使紫外检测不易对微量的或不稳定异黄酮的色谱峰作准确定性,可能使分析出现较大的误差。液质联用技术解决了色谱峰的定性问题。电喷雾电离(ESI)是一种新的液质联用接口技术,色谱流动相通过一个带电荷的毛细管喷入质谱的入口锥孔处,同向吹入的氮气流将挥发的溶剂带走,带电荷的液滴在静

电力的作用下最终分散成单个分子进入质谱的下一级入口锥孔中。ESI 是一种温和的“冷”电离方式,适合分析热不稳定的化合物^[3]。

大豆胚芽是大豆的生殖器官,占大豆总重量的 2%~2.5%,组成成分独特,其中异黄酮的含量是子叶中的 8~10 倍,其中 glycitin 和 soyasaponin A 仅分布于大豆的胚芽中^[4]。本文以 ESI/MS 做 HPLC 色谱峰的定性鉴定,对大豆胚芽中的异黄酮进行定量分析。

1 实验方法与材料

1.1 标样配制: daidzin, genistin, glycitin, daidzein 和 genistein 为 Sigma 公司产品。取标样溶于适量的 95% 乙醇中,取少量的标样溶液稀释到吸光度 0.3~0.8 之间,标样的浓度按最大吸收波长处的摩尔消光系数计算(daidzein & daidzin $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$ $\epsilon = 10^{4.45}$; glycitin $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ $\epsilon = 10^{4.42}$; genisten & genistin $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ $\epsilon = 10^{4.51}$),标样的纯度以各自最大吸收波长处的 HPLC 峰面积除以总峰面积得到,标样的最终浓度根据其纯度校正。丙二酰及乙二酰基异黄酮糖苷以相应的糖苷为标样定量,以分

* Address: Gu Liwei, School of Food, Wuxi University of Light Industry, Wuxi

谷利伟 男,1972年生,博士研究生,研究方向为中草药与功能食品。参加一项国家自然科学基金研究(抗氧化中草药的筛选与成分研究),目前的研究题目是大豆异黄酮和皂苷,已在国内外发表论文 10 余篇。

子量差异校正峰面积的响应因子^[5]。

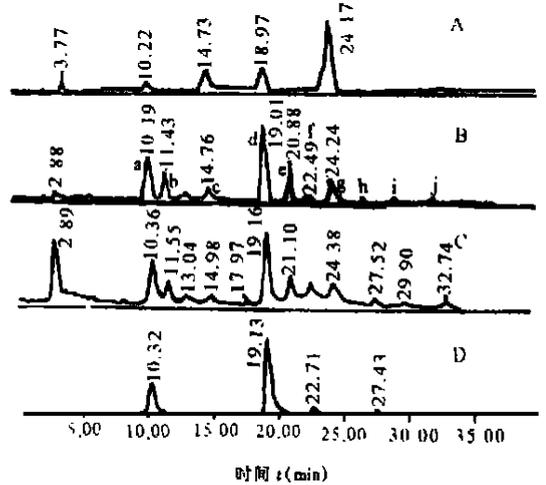
1.2 样品提取:单一品种东北大豆的胚芽粉碎后过 80 目筛,准确称取胚芽约 250 mg 3份。第一份放入 25 mL容量瓶中,加 80%乙醇到接近刻度,80℃保温热浸 6 h;第二份直接放入 25 mL容量瓶中超声波发生器中冷浸 6 h;第三份胚芽样品 120℃烘 2 h 后放入 25 mL容量瓶中超声提取 6 h 全部 3份样品提取后,冷到室温定容,静置过夜,取上清液以 0.45 μm膜过滤后做 HPLC分析。来自同一品种大豆的子叶、豆皮的提取方法同胚芽的冷浸法。

1.3 仪器与方法:分离单元为 Waters 2690 separation module Supelcosil C₁₈色谱柱 25 cm× 4.6 mm, 30%~60%的甲醇直线梯度(流动相中含乙酸 0.5%)洗脱,分析时间 40 min,进样量 20 μL 使用 Waters 996二极管阵列检测器,扫描波长 200~450 nm Micromass 电喷雾质谱仪作柱后检测,分流三通分流比 1/10 ESI/MS: capillary voltage 4.05 kV, cone 110 V, extractor 5 V, source block temperature 120℃, desolvation temperature 250℃。ESI/MS capillary voltage 3.7 kV, cone 90 V。分析系统: Masslynx chromatography analytic system on Digital personal workstation

2 结果与讨论

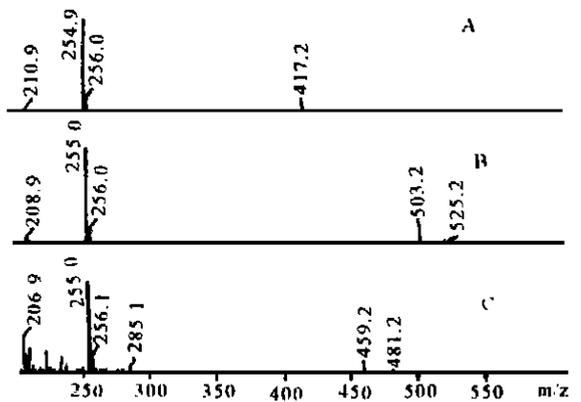
2.1 异黄酮的 HPLC分离与 ESI/MS特征:大豆子叶与胚芽中异黄酮以 260 nm 紫外检测的 HPLC 分离结果如图-1A, B所示,冷浸大豆子叶的异黄酮组成比较简单,而胚芽的异黄酮组成相对复杂。胚芽 HPLC谱中保留时间最长的 3个微量组分是 3种异黄酮的苷元、异黄酮的糖苷、丙二酰化及乙酰化糖苷的极性相当,比例受样品处理方法的影响大,微量的乙酰化异黄酮糖苷的色谱峰常混杂在丙二酰化异黄酮之间,在没有糖苷标样或标样种类有限的情况下很难对它们的色谱峰进行定性。冷浸大豆胚芽异黄酮的总离子流色谱图(图-1C)与 260 nm 检测的 HPLC图相似,以 ESI/MS的 m/z 255.3为选择离子检测色谱峰中以 daidzein(分子量为 254.3)为苷元的异黄酮色谱峰位置,得到 4个色谱峰(图 1-D)。图 2是图 1-D中前 3个非苷元异黄酮色谱峰相对应的 ESI/MS图谱,这三种组分的 [M+ H]⁺ 的准分子离子峰分别为 m/z 417.2, 503.2和 450.2,很容易地判断其结构是 daidzin, 6''-malonyldaidzin 和 6''-acetyldaidzin 二极管阵列检测显示它们的紫外吸收光谱相同,最大吸收为 254 nm,与 daidzein的标样相同。它们的分子式与结构变化关系如图 3 以上 3

种糖苷型异黄酮组分的 ESI/MS都以苷元 daidzein 的 [M+ H]⁺ 离子 m/z 255.3为基峰,表明异黄酮苷的糖苷键键能较低,在电场中被加速和电离的过程中容易发生断裂,而断裂得到的苷元很稳定,形成基峰。在质谱中未观察到 6''-malonyldaidzin脱羧形成的 [M-44]⁺ 峰,表明在电喷雾电离过程中样品受热不明显,未发生脱羧反应。以 m/z 285.3和 271.3为选择离子可以鉴别出以 glycitein和 genistein为苷元的异黄酮的色谱峰,它们的乙酰化糖苷含量少,在本实验中未检出。



A冷浸大豆子叶异黄酮 B冷浸胚芽异黄酮 C冷浸胚芽异黄酮 ESI/MS总离子流谱 D冷浸胚芽异黄酮的 m/z 255.3的选择离子谱 峰 a b c d e f g h i j见表 1

图 1 样品检测图谱



A为 daidzin B为 6''-malonyldaidzin C为 6''-acetyldaidzin 图 2 以 daidzin为苷元的 3种糖苷型异黄酮的 ESI/MS图

异黄酮的紫外吸收是由苷元部分决定的,受糖苷的影响不大,所以在能确定各个异黄酮色谱峰的位置后,可以以容易分离的 3种异黄酮苷元为标样对所有结构的异黄酮进行定量。

2.2 不同处理方法对胚芽中异黄酮组成的影响:大

豆子叶与胚芽的异黄酮组成差异明显,子叶中不含以 glycitein 为苷元的异黄酮(表 1),主要组分以 daidzein 和 genistein 计算的比例约为 35: 65 胚芽中异黄酮的含量达 3. 33%,是子叶含量的 6 倍,主要

成分以 daidzein, glycitein 和 genistein 计算的比例约为 55: 30: 15, Kudou(1991)报道 3 种成分的比例为 4: 5: 1,这种差异可能是由于所分析的大豆的品种不同^[4]。豆皮的提取物中未检出异黄酮的存在

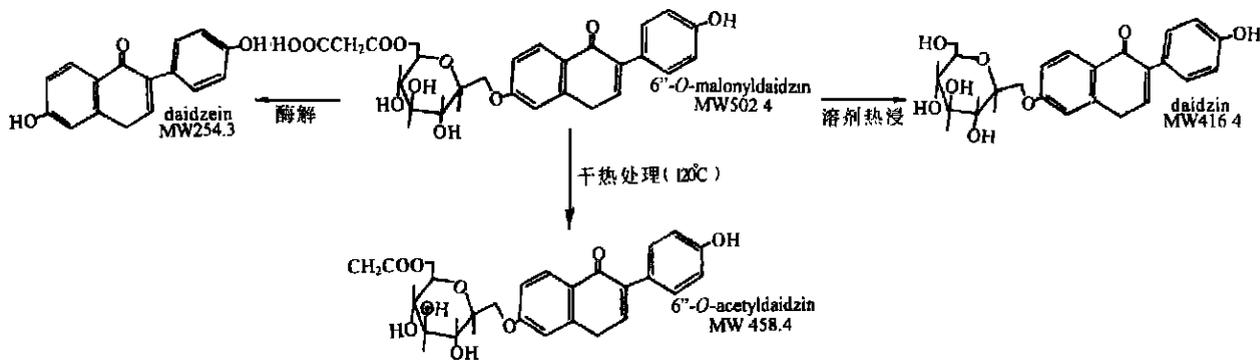


图 3 以 daidzein 为苷元的 4 种异黄酮的结构变化

表 1 不同处理方式对胚芽中异黄酮组成的影响 (单位 mg/100 g)

成分	冷浸胚芽	热浸胚芽	干热处理胚芽	冷浸大豆子叶
daidzin(a)	368	1210	239	43.1
glycitein(b)	249	656	252	-
genistein(c)	154	201	256	63.8
malonyldaidzin(d)	145	280	452	121
malonylglycitein(e)	534	430	194	-
acetyldaidzin(f)	82.4	278	941	-
malonylgenistein(g)	475	228	516	237
daidzein(h)	59.5	31.0	65.2	4.8
glycitein(i)	10.4	11.5	24.1	-
genistein(j)	0.6	14.6	30.6	-
Total	3331	3341	2971	469

冷浸的大豆胚芽中丙二酰型异黄酮的含量为 73%,乙酰型糖苷和苷元的含量仅为 2.5%和 0.5%。胚芽以溶剂热浸后丙二酰糖苷型异黄酮的比例下降到 28%,而相应糖苷的含量由 23% 升高到 62%,表明丙二酰糖苷型异黄酮是天然异黄酮的主要存在形式,在溶剂中受热后分解成糖苷。胚芽干热

处理后丙二酰糖苷型异黄酮的含量下降 34%,乙酰化糖苷的量上升 28%,显然乙酰糖苷型异黄酮是由丙二酰干热处理后脱羧的产物。

大豆异黄酮结构的变化使不同豆类食品中的异黄酮的组成差异较大,豆浆和醇法浓缩大豆蛋白中以异黄酮糖苷为主,在膨化大豆制品和烘烤的小食品中乙酰化糖苷的比例较大,发酵大豆食品中的异黄酮几乎全部是苷元^[2]。这种组成的差异可能会影响到食品的风味^[6]及异黄酮的生物利用度^[7]。

参考文献

- 1 Kenneth P R. Am J Clin Nutr, 1998, 68(suppl): 1338s
- 2 Wang H J, Murphy P A. J Agric Food Chem, 1994, 42 1666
- 3 Barnes S. Proc Soc Exper Bion Med, 1998, 217 254
- 4 Shigemitsu Kudo, Fleury Y, Weltle D, et al. Agric Biol Chem, 1991, 55(9): 2227
- 5 Song T T, Murphy P A. Am J Clin Nutr, 1998, 68(suppl): 1711s
- 6 Seo A, Morr C V. J Agric Food Chem, 1984, 32 530
- 7 Xu X, Wang H J, Murphy P A, et al. J Nutr, 1994, 124 825
- 8 大久保一良,吉城由美子,吉越昌树,等. 食品开发(日), 1991, 18 16

(1999-12-29收稿)

2001年《解放军药学报》征订启事

《解放军药学报》为国家级药学术性期刊,由中国人民解放军总后勤部卫生部主管,总后勤部卫生部药品仪器检验所主办,出版,向国内、外公开发刊。国内统一刊号 CN81- 1149 /R,国际标准刊号 ISSN 1008- 9926,邮发代号 82- 974,广告许可证号京丰工商广字第 0024号。

本刊主要报道军队和国内、外各医、药院校,医药科研院所,各医疗卫生等单位的专家、教授和中、高级专业技术人员及硕士、博士研究生药学专业的研究论文与科研成果;设有论著、综述、述评、研究简报、工作与技术研究等栏目,内容包括药物化学、药剂学、药物分析、药理学、临床药学、医院药学、军事药学、药学教育、中药与天然药物、药事管理学等学科。

本刊已被国家中国科技论文统计源期刊数据库、中国生物医学期刊引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中文期刊数据库、《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》全文收录数据库作为来源期刊,并获得其来源期刊(即核心期刊)证书。

订阅方式:全国各地邮局订阅,每期定价:7.5元,全年 45.0元。

编辑部地址:北京市丰台西路 17号。邮编:100071 电话:(010) 66949020,66949021 传真:010- 63858411 E-mail

JFJYXB@ netease.com 和 JFJN@ China journal. net. cn