

高效液相色谱-电喷雾质谱联用法检测 大豆异黄酮和皂苷

董淮海, 陶冠军, 王林祥, 秦昉, 谷文英
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:应用高效液相色谱-电喷雾质谱联用法,直接对大豆胚芽的 70% 乙醇室温提取液进行检测.根据各色谱峰的质谱特征,在室温提取液中鉴定出 9 种异黄酮,7 种 A 组皂苷,4 种 B 组皂苷和 2 种 E 组皂苷.结果证明对于复杂天然产物的定性定量分析,高效液相色谱-电喷雾质谱(HPLC/ESI-MS)联用分析法是一种方便快捷有效的方法.

关键词:大豆;异黄酮;皂苷;高效液相色谱;电喷雾质谱

中图分类号:Q 503

文献标识码:A

Determination of Soybean Isoflavones and Saponins by HPLC/ESI-MS

DONG Huai-hai, TAO Guan-jun, WANG Lin-xiang, QIN Fang, GU Wen-ying
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Soybean isoflavones and saponins were extracted from soybean germs by 70% alcohol at room temperature, and determined using HPLC/ESI-MS. According to their MS characters, nine kinds of isoflavones, seven types of group A saponins, four types of group B saponins and two types of group E saponins were identified. The results showed that HPLC/ESI-MS was a convenient, rapid and effective method to analyze complicated nature products qualitatively and quantitatively.

Key words: soybean; isoflavones; saponins; HPLC; ESI/MS

在室温下,将大豆胚芽用 70% 乙醇搅拌提取,大豆异黄酮、皂苷、醇溶性蛋白、低聚糖和色素一起被提取出来,提取液是一个多组分复杂体系,大豆异黄酮和皂苷本身也包括多种类型.大豆异黄酮是多酚类化合物,主要包括染料木素(genistein)、大豆黄素(daidzein)和黄豆黄素(glycitein)及 7-O-葡萄糖苷,6"-O-丙二酰葡萄糖苷,6"-O-乙酰葡萄糖苷^[1]

(见表 1).大豆皂苷属齐墩果烷型皂苷.大豆皂苷元一共有 7 种,分别称为大豆皂苷元 A~G,大豆皂苷即是这些皂苷元和单糖(或乙酰化的单糖)形成的糖苷^[2],有 6 种 A 组皂苷、5 种 B 组皂苷和 2 种 E 组皂苷已被分离鉴定^[3](见表 2).B 组皂苷在食用豆中分布广泛,A 组皂苷只存在于大豆胚芽中,E 组皂苷不稳定,是 B 组皂苷的前体^[4].

收稿日期 2002-02-22; 修订日期 2002-04-02.

作者简介:董淮海(1971-)男,湖北宜昌人,粮食、油脂与植物蛋白专业博士研究生.

万方数据

表1 大豆异黄酮类型及其结构

Tab.1 The types and structure of soybean isoflavones

异黄酮类型	R ₁	R ₂	R	R ₃
染料木素	H	OH	H	-
大豆黄素	H	H	H	-
黄豆黄素	CH ₃ O	H	H	-
染料木素糖苷	H	OH	-	H
大豆黄素糖苷	H	H	-	H
黄豆黄素糖苷	CH ₃ O	H	-	H
乙酰染料木素糖苷	H	OH	-	COCH ₃
乙酰大豆黄素糖苷	H	H	-	COCH ₃
乙酰黄豆黄素糖苷	CH ₃ O	H	-	COCH ₃
丙二酰染料木素糖苷	H	OH	-	COCH ₂ COOH
丙二酰大豆黄素糖苷	H	H	-	COCH ₂ COOH
丙二酰黄豆黄素糖苷	CH ₃ O	H	-	COCH ₂ COOH

表2 大豆皂苷的类型及其结构

Tab.2 The types and structure of soybean saponins

皂苷类型	R ₁	R ₂	R ₃
A 组皂苷			
Aa	CH ₂ OH	β -D-glu	H
Ab	CH ₂ OH	β -D-glu	CH ₂ OAc
Ac	CH ₂ OH	α -L-rham	CH ₂ OAc
Ad	H	β -D-glu	CH ₂ OAc
Ae	CH ₂ OH	H	H
Af	CH ₂ OH	H	CH ₂ OAc
Ag	H	H	H
Ah	H	H	CH ₂ OAc
B 组皂苷			
Ba	CH ₂ OH	β -D-glu	
Bb	CH ₂ OH	α -L-rham	
Bc	H	α -L-rham	
Bb'	CH ₂ OH	H	
Bc'	H	H	
E 组皂苷			
Ea	CH ₂ OH	β -D-glu	
Eb	CH ₂ OH	α -L-rham	

用高效液相色谱检测上述乙醇提取液中的大豆异黄酮和皂苷时,若用标准样品定性方法确定色谱图中每个峰的归属,由于大豆异黄酮和皂苷有多

种类型,因此需要多种标准样品.但大豆异黄酮标准样品价格昂贵,大豆皂苷的标准样品目前尚无供应厂商.自行分离或合成标准样品则费时费力,因此给大豆异黄酮和皂苷的高效液相色谱法定性定量分析带来诸多不便.在高效液相色谱-电喷雾质谱(HPLC/ESI-MS)联用法中,色谱柱流出液微量进入质谱仪,质谱仪记录每个峰的质谱数据.根据每个峰的质谱数据特征,就可以确定每个峰的归属,从而不需用多种标准样品来确定每个峰的归属,使定性定量分析变得方便快捷.

Farmakalidis等在分离6"-O-乙酰染料木素和6"-O-乙酰大豆黄素时,将分离所得的单体直接注入质谱仪,在各单体的质谱图中观察到分子离子峰和高丰度的苷元离子峰^[5]. Setchell等用 β -葡萄糖苷酶水解提取样品,得到各种大豆异黄酮苷元,再用HPLC/ESI-MS联用法对其结构进行鉴定,在其质谱图中观察到大豆黄素和染料木素 M + H 准分子离子峰和 m/z 值为 118 的黄酮裂解特征峰^[6]. Shiraiwa等在研究大豆皂苷 A 和 B 时,先用多步柱层析将皂苷 A 和 B 分离成各种单体,再应用FAB-MS确认各种单离皂苷的结构.在各单体的正离子质谱中观察到各种皂苷的 M + H、M + Na 和 M + K 准分子离子峰,在负离子质谱中观察到各种糖基的裂解碎片离子峰,根据这些碎片可以推断糖基的连接次序^[7].以上方法都是先将大豆异黄酮和皂苷分离或水解后,再用质谱进行鉴定.应用 HPLC/ESI-MS 联用分析法,不经分离或其他样品预处理,分别直接检测大豆胚芽提取物中的大豆异黄酮和皂苷,结果证明此方法可以有效地从大豆胚芽提取物中鉴定出各种类型的大豆异黄酮和皂苷,为复杂天然产物的高效液相色谱定性定量分析提供了一个有效的途径.

1 材料与方法

1.1 大豆异黄酮和皂苷的提取

称取 50 g 脱脂胚芽粉,加 500 mL70%的乙醇,100 r/min 搅拌,室温提取 2 h,提取 2 次.抽滤所得提取液用旋转蒸发器挥去溶剂后得黄色糖浆,黄色糖浆于 50 °C 真空干燥 12 h 得黄色粉末.称取 0.5 g 黄色粉末于 100 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇定容,定容后用 0.45 μ m 膜过滤,滤液作为 HPLC/ESI-MS 分析样品.

1.2 实验方法

高效液相色谱仪为 Waters 2690,电喷雾质谱仪为 Waters ZMD 4000,色谱柱为 Symmetry C8

(2.1 mm × 150 mm) 柱温 35 °C 流动相为含 1% 醋酸的甲醇和 1% 醋酸 梯度洗脱.

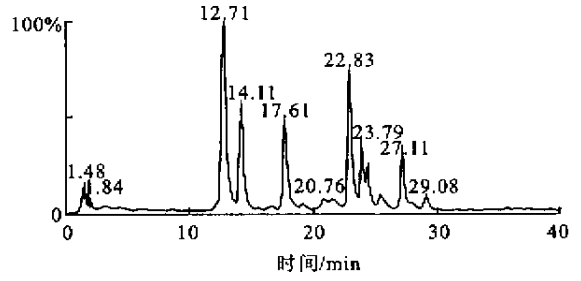
2 结果与讨论

2.1 大豆异黄酮的鉴定

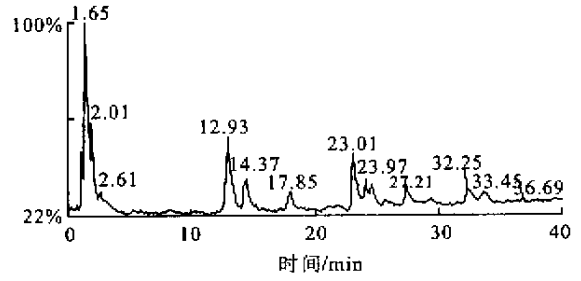
Waters 2690 高效液相色谱仪的检测器配用二极管阵列检测器,对流出液在紫外可见光范围内扫描.检测时可同时得到每个峰的紫外可见光吸收光谱.在检测大豆异黄酮时发现每个峰在 260 nm 附近都有最大吸收,因此在检测大豆异黄酮时选择 260 nm 为检测波长.以 260 nm 为检测波长,以含 1% 醋酸的甲醇和 1% 醋酸为流动相,优化流动相组成和梯度洗脱模式,得到大豆异黄酮的 HPLC 色谱图(见图 1a),在 30 min 内得到 9 个分离度很好的色谱峰.色谱峰分两个区域:20 min 以前的 3 个峰和 20 min 以后的 6 个峰.该 HPLC 方法在 30 min 内能检测到 9 种异黄酮,可以用于大豆异黄酮的定量分析.

Waters ZMD4000 为电喷雾质谱仪,其正离子方式和负离子方式都在 m/z 值为 200 ~ 1 500 内扫描.HPLC 流出液分微量进入质谱仪,得到大豆异黄酮的正离子总离子流图和负离子总离子流图(图 1 中 b 和 c).以正离子总离子流图和负离子总离子流图中各峰的质谱,对 HPLC 各出峰进行鉴定,一共鉴定出 9 种异黄酮(见表 3),按出峰次序依次为:大豆黄素糖苷(daidzin),黄豆黄素糖苷(glycitin),染料木素糖苷(genistin,图 1 中 d 和 e),丙二酰大豆黄素糖苷(6''-O-malonyldaidzin),丙二酰黄豆黄素糖苷(6''-O-malonylglycitin),乙酰大豆黄素糖苷(6''-O-acetyldaidzin),乙酰黄豆黄素糖苷(6''-O-acetylglycitin),丙二酰染料木素糖苷(6''-O-malonylgenistin),乙酰染料木素糖苷(6''-O-acetylgenistin),此结果与 Shigemitsu 等的结果相符^[1].

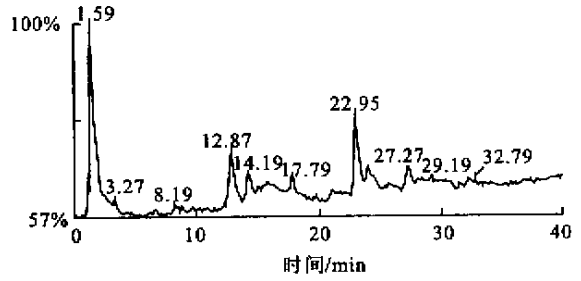
在样品中没有检测到 3 种异黄酮苷元:大豆黄素(daidzein),黄豆黄素(glycitein),染料木素(genistein).异黄酮大部分以丙二酰糖苷和糖苷的形式存在.在天然状态下,异黄酮以丙二酰形式存在,丙二酰形式不稳定.在水存在下加热,丙二酰形式的异黄酮转化为糖苷形式;没有水存在下加热,丙二酰形式的异黄酮转化为乙酰形式^[8].在处理样品时,采用旋转蒸发和真空干燥,目的是为了去除水分,因而是水存在下加热样品.样品中丙二酰形式的异黄酮转化为糖苷形式,所以样品中糖苷形式的异黄酮含量很高.数据



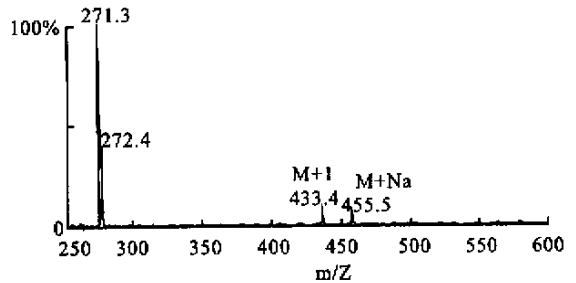
a. HPLC(260 nm) 色谱图



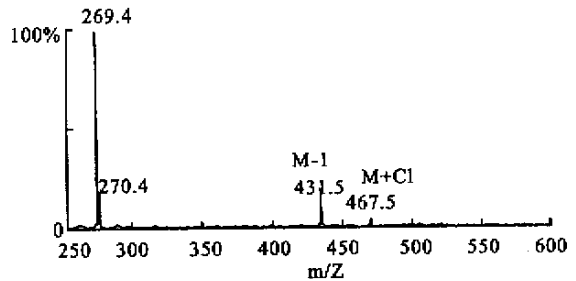
b. 总离子流图(ES+)



c. 总离子流图(ES-)



d. 染料木素糖苷质谱图(ES+)



e. 染料木素糖苷质谱图(ES-)

图 1 大豆异黄酮的色谱图和质谱图

Fig.1 HPLC chromatograms and mass spectra of soybean isoflavones

在ESI/MS质谱中,负离子方式下,大豆黄素、黄豆黄素和染料木素能得到准分子离子峰,其他6种异黄酮没有得到准分子离子峰(见表3)。以染料木素为例,在染料木素质谱中(见图1),正离子方式得到 m/z 值为455.5的 $M + Na$ 离子峰, m/z 值为433.4的 $M + H$ 准分子离子峰和 m/z 值为271.3苷元离子峰,负离子方式得到 m/z 值为467.5的 $M + Cl$ 离子峰, m/z 值为431.5的 $M-H$ 准分子离子峰和 m/z 值为269.4的苷元离子峰。

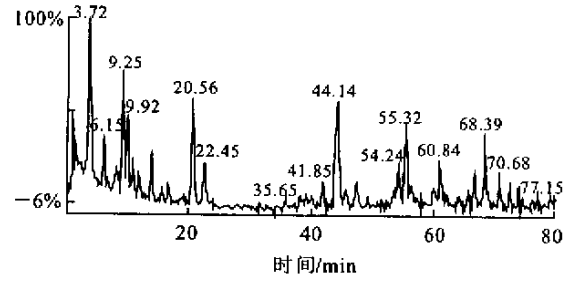
表3 大豆异黄酮 HPLC/ESI-MS 鉴定结果

Tab.3 The identification of soybean isoflavones by HPLC/ESI-MS

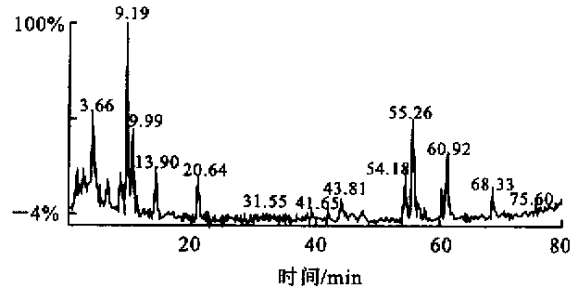
保留时间/ min	M + H	M-H	鉴定结果
12.71	417.3	415.5	大豆黄素糖苷 ($C_{21}H_{20}O_9$)
14.11	447.3	445.6	黄豆黄素糖苷 ($C_{22}H_{22}O_{10}$)
17.61	433.4	431.5	染料木素糖苷 ($C_{21}H_{20}O_{10}$)
22.83	503.6	-	丙二酰大豆黄素糖苷 ($C_{24}H_{22}O_{12}$)
23.79	533.6	-	丙二酰黄豆黄素糖苷 ($C_{25}H_{24}O_{13}$)
24.26	459.4	-	乙酰大豆黄素糖苷 ($C_{23}H_{22}O_{10}$)
25.34	489.6	-	乙酰黄豆黄素糖苷 ($C_{24}H_{24}O_{11}$)
27.11	519.5	-	丙二酰染料木素糖苷 ($C_{24}H_{22}O_{13}$)
29.08	475.3	-	乙酰染料木素糖苷 ($C_{23}H_{22}O_{11}$)

2.2 大豆皂苷的鉴定

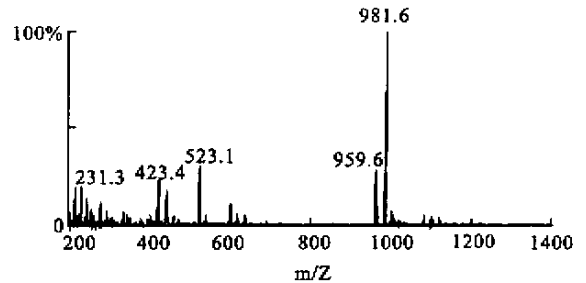
大豆皂苷分子中只有一个双键,最大吸收波长为205 nm。若用紫外检测器检测,流动相的背景吸收大,有时甚至淹没样品的吸收峰,并且不能梯度洗脱。若用质量检测器如蒸发光散射检测器,可排除流动相的干扰,也可以梯度洗脱。质谱就是一种质量检测器,Waters ZMD4000 质谱仪具有很高的分辨率和灵敏度,应用它对HPLC流出液进行检测,得到大豆皂苷的正离子总离子流图和负离子总离子流图(图2a和b)。根据总离子流图中各出峰的质谱对每个峰进行鉴定,共鉴定出7种A组皂苷、4种B组皂苷和2种E组皂苷(见表4)。



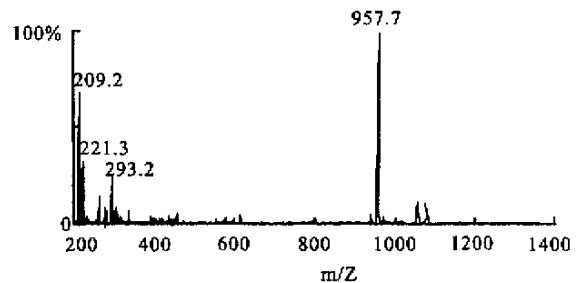
a. 总离子流图(ES+)



b. 总离子流图(ES-)



c. 大豆皂苷 Ba 的质谱图(ES+)



d. 大豆皂苷 Ba 的质谱图(ES-)

图2 大豆皂苷的色谱图和质谱图

Fig.2 HPLC chromatograms and mass spectra of soybean saponins

在总离子流图中,离子峰也分为3组,按出峰次序依次为A组、B组和E组皂苷,每组皂苷的出峰次序和 Shiraiwa 等的结果相同^[7]。其中 Ae、Af 和 Bc、Bb 没有很好地分离,在这两个峰的质谱中,可同时找到它们的 $M + Na$ 离子峰,可进一步改变色谱条件,将它们分开。大豆胚芽在室温提取时,可同时得到A组、B组和E组皂苷,E组皂苷没有全部转化为B组皂苷。

表 4 大豆皂苷的 HPLC/MS 鉴定结果

Tab.4 The identification of soybean saponins by HPLC/MS

保留时间/ min	M	M + Na	M - H	鉴定结果
28.11	1 268.6	1 291.6	1 267.6	去乙酰 Al(C ₅₉ H ₉₆ O ₂₉)
31.61	1 238.6	1 261.6	1 237.6	去乙酰 Aa(C ₅₈ H ₉₄ O ₂₈)
43.73	1 364.6	1 387.6	1 363.6	Aa(C ₆₄ H ₁₀₀ O ₃₁)
44.14	1 436.6	1 459.6	1 435.6	Al(C ₆₇ H ₁₀₄ O ₃₃)
45.60	1 420.7	1 443.7	1 419.7	Ad(C ₆₇ H ₁₀₄ O ₃₂)
47.24	1 202.6	1 225.6	1 201.6	Ad(C ₅₈ H ₉₀ O ₂₆)
47.24	1 274.6	1 297.6	1 273.6	Al(C ₆₁ H ₉₄ O ₂₈)
54.24	958.5	981.6	957.6	Ba(C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉)
55.32	942.5	965.5	941.5	Bl(C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈)
56.26	912.5	935.5	911.5	Bc(C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇)
56.26	796.5	819.5	795.5	Bb(C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄)
60.04	956.5	979.5	955.5	Ea(C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉)
60.84	940.5	963.5	939.5	El(C ₄₈ H ₇₆ O ₁₈)

以皂苷 Ba 为例(见图 2 中 c 和 d),在皂苷 Ba 的质谱中,在正离子方式下, m/z 值为 981.6 时为 $M + Na$ 离子峰, m/z 值为 959.6 时为 $M + H$ 准分子离子峰, m/z 值为 423.4 时为苷元—OH—H₂O 离子峰.在负离子方式下, m/z 值为 957.6 时为 $M - H$ 准分子离子峰.ESI/MS 中,生成的离子碎片与锥孔电压有关,不同的锥孔电压,得到的离子碎片也不同.本实验中采用固定的锥孔电压,此锥孔电压下,皂苷可以得到高丰度的准分子离子峰,便于大豆皂甙的鉴定.

3 结 论

应用 HPLC/MS 联用分析法,在大豆胚芽 70% 乙醇室温提取物中,鉴定出 9 种异黄酮,7 种 A 组皂苷,4 种 B 组皂苷和 2 种 E 组皂苷.此结果证明对于复杂天然产物的定性定量分析,HPLC/MS 联用分析法是一种方便快捷有效的方法.

参考文献:

- [1] SHIGEMITSU KUDOU, YVETTE FLEURY, DIETER WELTI, *et al.* Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycinemax Merrill* [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(9): 2227 - 2233.
- [2] KEITH R PRICE, G ROGER FENWICK, MARIAN JURZYSTA. Soyasapogenols-separation, analysis and interconversions [J]. *J Sci Food Agric*, 1986, 37: 1027 - 1034.
- [3] MASAKAZU SHIRAWA, SHIGEMITSU KUDO, MAKOTO SHIMOYAMADA. Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(2): 315 - 322.
- [4] MASAKAZU SHIRAWA, KYUYA HARADA, KAZUYOSHI OKUBO. Composition and content of saponins in soybean seed according to variety, cultivation year and maturity [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(2): 323 - 331.
- [5] EFI FARMAKALIDIS, PATRICIA A MURPHY. Isolation 6"-O-acetylgenistin and 6"-O-acetylaidizin from toated defatted soyflakes [J]. *J Agric Food Chem*, 1985, 33: 385 - 389.
- [6] SETCHELL K D R, MARY BETH WELSH. High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection [J]. *J of Chromatography*, 1987, (6): 315 - 323.
- [7] SAKAZU SHIRAIWA, KYUYA HARADA, KAZUYOSHI OKUBO. Composition and structure of "group B saponin" in soybean seed [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(4): 911 - 917.
- [8] LORI COWARD, MICHEELE SMITH, MARION KIRK, *et al.* Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing [J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68(suppl): 1486 - 1491.

(责任编辑:李春丽)