

HPLC-ESI-MS_n 法鉴定大豆中 12 种大豆异黄酮的结构

瞿德敬¹, 王俊英², 王俊平¹, 王硕¹

(1. 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

(2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 为了鉴定大豆异黄酮的结构, 采用高效液相色谱-电喷雾离子源-离子阱多级质谱联用仪(HPLC-ESI-MS_n)法分离鉴定大豆粉乙醇提取物, 通过多级质谱提供的准分子离子峰和多级碎片离子信息, 分析得到了 12 种大豆异黄酮的相对分子量、保留时间并推断了它们异黄酮糖苷的组成结构、异黄酮糖苷中糖的类型等, 这 12 种大豆异黄酮分别是大豆苷元、大豆黄素、染料木素、大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、乙酰基大豆苷、乙酰基大豆黄苷、乙酰基染料木苷、丙二酰基大豆苷、丙二酰基大豆黄苷、丙二酰基染料木苷。

关键词: 大豆粉; 大豆异黄酮; 高效液相色谱-电喷雾离子源-离子阱多级质谱联用仪

文章编号: 1673-9078(2013)4-863-866

Identification of 12 Soybean Isoflavones in Soybean Meal by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Multi-stage Tandem Mass Spectrometry

QU De-jing, WANG Jun-ying, WANG Jun-ping, WANG Shuo

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education of China, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (2. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: To determine the construction of soybean isoflavone, high performance liquid chromatography-electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS_n) was successfully applied to analysis and determine ethanol extracts of soybean meal. Though this method, the accurate molecular ion peak and multistage fragment ion information were provided. Relative molecular mass, retention time and constructions of flavoneid aglycones of 12 kinds of soybean isoflavones were analyzed. The types of glycoside in isoflavone were also discussed. The 12 kinds of soybean isoflavone glycosides were identified as daidzein, glycitein, genistein, daidzin, glycitin, genistin, 6"-o-acetyldaidzin, 6"-o-acetylglycitin, 6"-o-acetylgenistin, 6"-o-malonyldaidzin, 6"-o-malonylglycitin and 6"-o-malonylgenistin.

Key word: soy bean meal; soybean isoflavone; liquid chromatography electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry

大豆异黄酮是一类主要存在于大豆、具有重要生物活性的多酚类次生代谢产物。许多研究表明, 异黄酮具有抗氧化、抗真菌和雌激素样活性以及通过抑制酪氨酸蛋白酶或 DNA 拓扑异构酶的抗癌功效^[1]。大豆异黄酮的基本骨架为 3-苯基苯吡喃酮, 是由 15 个碳原子构成的 C₆-C₃-C₆ 结构。迄今为止, 人们已从大豆中分离出 9 种大豆异黄酮葡萄糖苷和 3 种相应的糖苷配基^[2]。离子阱质谱是目前较成熟的小型质谱仪之一, 其主要优点是能够方便地进行多级串联质谱 MS_n 检测^[3]。质谱是具有高灵敏度的广谱检测器, 不仅可以

收稿日期: 2012-12-14

基金项目: 农业部转基因专项 (2011ZX08012-001), “863” 计划课题 (2012AA101604), 天津市食品营养与安全重点实验室建设 (12TXSYJC33600)

作者简介: 瞿德敬 (1988-), 女, 研究生, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 王硕 (1969-), 男, 教授, 研究方向: 食品安全和免疫学检测

获得物质的相对分子量, 而且还可以利用碎片离子获得一些结构信息^[4-5], 尤其是借助多级串联质谱 (MS/MS) 可获得更为详细而系统的结构信息, 从而实现黄酮等天然产物的在线结构鉴定^[6]。

本实验利用高效液相色谱-二极管阵列-离子阱多级质谱 (HPLC-PDA-MS_n) 联用技术, 建立大豆乙醇提取物中的大豆异黄酮的分析鉴定方法并对提取物中黄酮的成分进行分析, 为大豆异黄酮的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆苷元、大豆黄素、染料木素标准品 (纯度均 >95%): Sigma 公司; 乙腈、甲醇 (色谱纯): 美国 Merck 公司; 甲酸、无水乙醇 (分析纯): 天津市光复

精细化工研究所产品；水为经 Millipore 超纯水系统处理过的超纯水。

LCQ 液相色谱-质谱联用仪：配有自动进样器、电喷雾离子源 (ESI)、LCQ 离子阱 (ion trap) 及 Xcalibur1.4 数据处理系统，美国 Finnigan 公司；ZORBAX SB-C18 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm; Agilent)；Centrifuge5804R 台式冷冻离心机：德国 eppendorf 公司；Millipore 超纯水系统：美国 Millipore 公司产品；KH-300DB 型数控超声清洗器：昆山禾创超声仪器有限公司产品。DFT-100 型 100 g 手提式高速万能粉碎机：温岭市林大机械有限公司产品。

1.2 样品处理方法

大豆样品磨粉过60目筛，准确称取0.3000 g大豆粉，加入12 mL 70%乙醇水溶液，30 °C超声辅助提取50 min，在25 °C下，5000 r/min离心分离15 min，重复提取2次，收集滤液，备用。取2.5 mL提取液，置于25 mL的容量瓶中，甲醇定容，将提取液稀释10倍。取1 mL上述溶液，经0.22 μm的微孔有机滤膜过滤后进样。

1.3 实验测定条件

1.3.1 质谱条件

电喷雾 (ESI) 离子源；毛细管温度 270 °C；鞘气流速 9.0 L/min；辅助气流速 1.5 L/min；电喷雾电压 4.5 kV；扫描方式采用正离子模式下全扫描；质量扫描范围： m/z 200-670；离子阱多级串联质谱，选取各组分苷元为母离子，多级质谱分析采用50%的碰撞归一化能量。

1.3.2 色谱条件

色谱柱：ZORBAX SB-C18 色谱柱(2.1×150 mm, 3.5 μm; Agilent)；柱温：35 °C；流动相：乙腈(A)和含0.025%甲酸的水 (pH 2.8) (B)；梯度洗脱：0 min, 10% A、10 min, 20% A、13 min, 20% A、20 min, 45% A、25 min, 55% A、30 min, 10% A；流速：0.2 mL/min；进样量：10 μL；检测波长：260 nm。

2 结果与讨论

2.1 标准品的结构分析

标准品大豆苷元，相对分子质量为 254，在正离子模式下容易得到一个 H，得到 m/z 255 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ ，如图 1(a)；在 MS2 中准分子离子峰 $[M+H]^+255$ 若失去一个中性小分子 $H_2O[M+H-18]^+$ ，得到 m/z 237 的碎片离子，若失去一个中性小分子 $CO[M+H-28]^+$ ，得到 m/z 227 的碎片离子；若失去一个中性小分子 $C_2O_2[M+H-56]^+$ ，得到 m/z 199 的碎片离子，同时 MS2 中准分子离子峰 $[M+H]^+255$ 的 C 环发生 RAD 裂解^[7]，易产生 $A^{1,3+}$ 和 $B^{1,3+}$ 离子，1/3 两个化学键

发生断裂，产生 $A^{1,3+}$ 或者 $B^{1,3+}$ 离子，其中 $A^{1,3+}m/z$ 137 如图 1(b)，其断裂方式如图 4(a)。

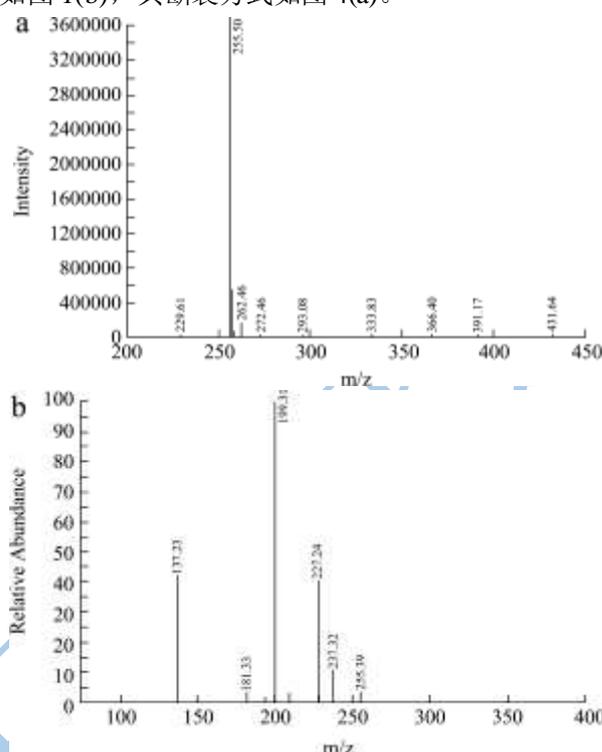


图1 标准品大豆苷元在正离子模式下的电喷雾质谱图(a)及其二级质谱图(b)

Fig.1 ESI-MS spectrum of standard daidzein(a) and its MS2 spectrum(b) in positive ion mode

标准品大豆黄素，相对分子质量为 284，在正离子模式下容易得到一个 H，得到 m/z 285 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ ，如图 2(a)；在 MS2 中准分子离子峰 $[M+H]^+285$ 在 A 环上有甲基易失去一个中性小分子 $CH_3[M+H-15]^+$ ，得到 m/z 270 的碎片离子，若失去一个中性小分子 $CO[M+H-28]^+$ ，得到 m/z 257 的碎片离子；若失去一个中性小分子 $C_2O_2[M+H-56]^+$ ，得到 m/z 229 的碎片离子，同时 MS2 中准分子离子峰 $[M+H]^+285$ 的 C 环发生 RAD 裂解，易产生 $A^{1,3+}m/z$ 167 的碎片离子如图 2(b)，其断裂方式如图 4(a)。

标准品染料木素，相对分子质量为 270，在正离子模式下容易得到一个 H，得到 m/z 271 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ ，如图 3(a)；在 MS2 中准分子离子峰 $[M+H]^+271$ 若失去一个中性小分子 $H_2O[M+H-18]^+$ ，得到 m/z 253 的碎片离子，若失去一个中性小分子 $CO[M+H-28]^+$ ，得到 m/z 243 的碎片离子；若失去一个中性小分子 $C_2O_2[M+H-56]^+$ ，得到 m/z 215 的碎片离子，同时 MS2 中准分子离子峰 $[M+H]^+271$ 的 C 环发生 RAD 裂解，易产生 $A^{1,3+}m/z$ 153 的碎片离子如图 3(b)，其断裂方式如图 4(a)。

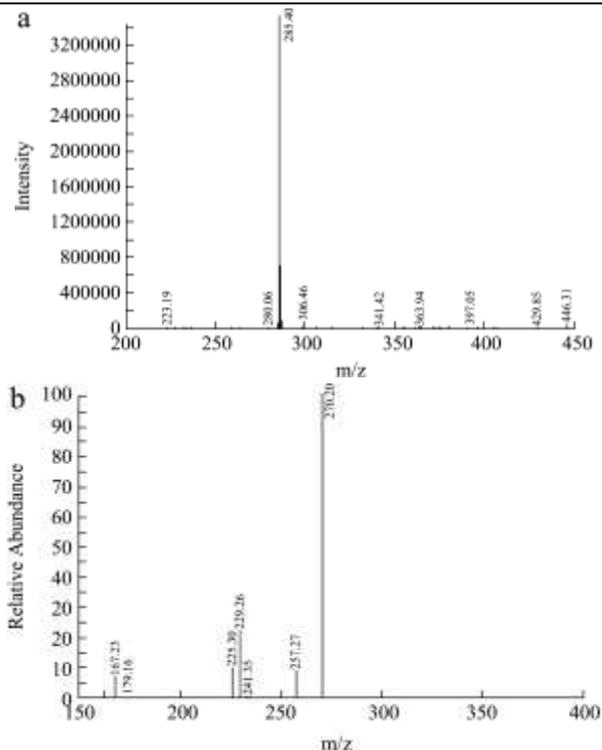


图2 标准品大豆黄素在正离子模式下的电喷雾质谱图(a)及其二级质谱图(b)

Fig.2 ESI-MS spectrum of standard glycitein(a) and its MS2 spectrum(b) in positive ion mode

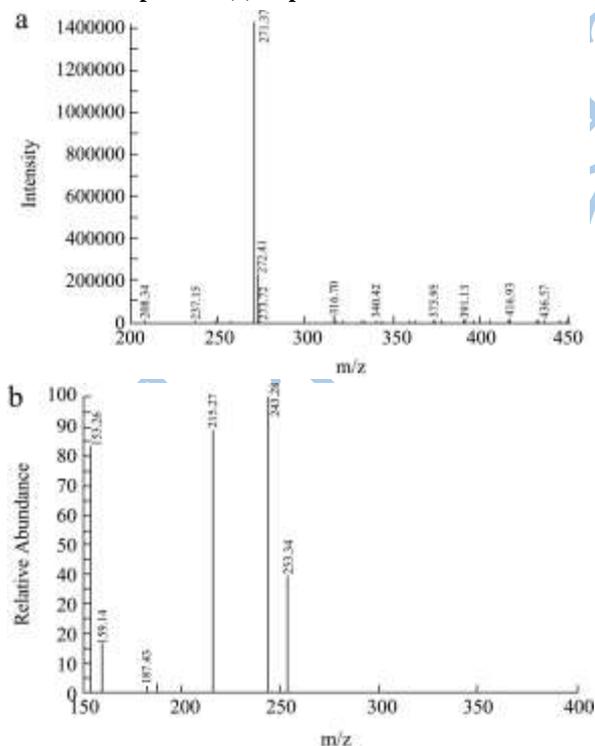


图3 标准品染料木素在正离子模式下的电喷雾质谱图(a)及其二级质谱图(b)

Fig.3 ESI-MS spectrum of standard genistein(a) and its MS2 spectrum(b) in positive ion mode

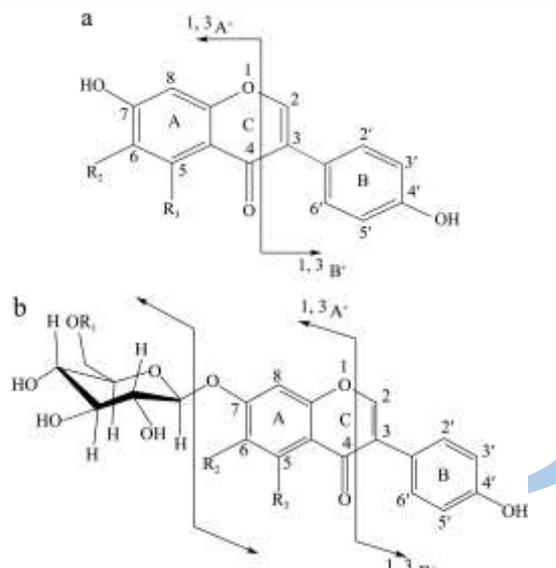


图4 异黄酮苷元(a)和异黄酮糖苷(b)的断裂方式

Fig.4 Fragmentation of isoflavone aglucon (a) and isoflavone glycoside (b)

2.2 提取物中目标物的结构分析

对大豆粉的乙醇提取物在上述条件下进行分析,共发现12种大豆异黄酮,其液相色谱图和质谱图总离子流(TIC)图,如图5和图6。

把这12种物质作为母离子,碰撞归一化能量为50%,进行二级、三级串联质谱分析,得到多级质谱碎片信息,列于表1。在MS2中异黄酮苷的糖苷键键能较低,它在电场中被加速和电离的过程中容易发生断裂,而断裂得到的苷元较稳定,形成特征峰^[8],这也是异黄酮结构的主要鉴定依据;MS2得到的分子离子峰在MS3中继续被碰撞,失去一些中性小分子碎片同时伴随RAD裂解,其断裂方式如图4(b)。通过对12种物质的多级质谱碎片信息分析,可以推测出这些物质是由大豆苷元、大豆黄素、染料木素衍生化的异黄酮葡萄糖苷类化合物。其中其中9、11、12号峰与三种标准品的质谱信息完全一致,因此推断9、11、12号峰分别是大豆苷元、大豆黄素、染料木素。

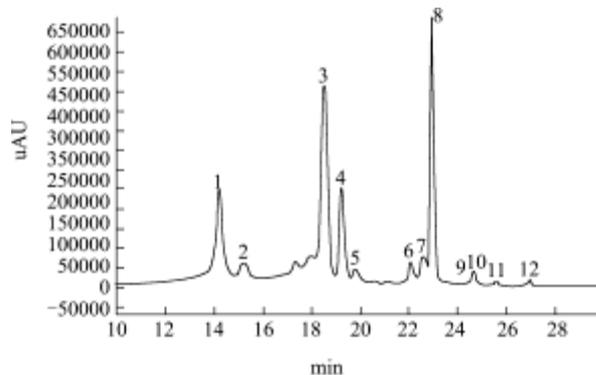


图5 大豆粉提取物的液相色谱图

Fig.5 The HPLC of extracts of soybean meal

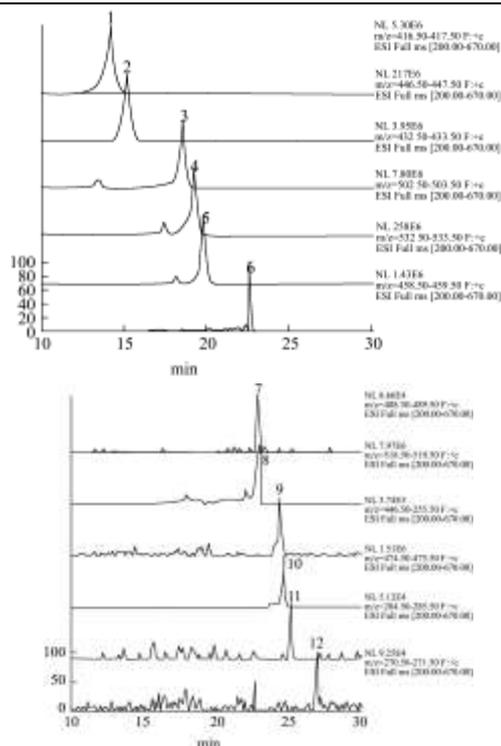


图6 大豆中12种异黄酮的提取离子流图

Fig.6 Extracted ion chromatograms of 12 soybean isoflavones in soybean meal

1号峰 m/z 为 417, 即[M+H]⁺为 417, 4号峰 m/z 为 503, 即[M+H]⁺为 503, 6号峰 m/z 为 459, 即[M+H]⁺为 459, 它们在 MS2 中, 分别丢失一个 m/z162、m/z248、m/z204 的碎片, 产生 m/z255 的碎片离子, 且在 MS3 中 m/z255 的碎片离子为 137、199、227、237, 因此推断 1、4、6 号峰对应的都是含有大豆苷元的异黄酮

糖苷, 1、4、6 号峰对应的物质相对分子质量分别为 416、502、458, 同时推断丢失的 m/z162 的残基为葡萄糖糖, m/z248 的残基为丙二酰基化的葡萄糖糖, m/z204 的残基为乙酰基化的葡萄糖糖, 因此 1、4、6 号峰分别为大豆苷、丙二酰基大豆苷、乙酰基大豆苷。

2号峰 m/z 为 447, 即[M+H]⁺为 447, 5号峰 m/z 为 533, 即[M+H]⁺为 533, 7号峰 m/z 为 489, 即[M+H]⁺为 489, 它们在 MS2 中, 分别丢失一个 m/z162、m/z248、m/z204 的碎片, 产生 m/z285 的碎片离子, 且在 MS3 中 m/z285 的碎片离子为 167、229、257、270, 因此推断 2、5、7 号峰对应的都是含有大豆黄酮的异黄酮糖苷, 2、5、7 号峰对应的物质相对分子质量分别为 446、532、488, 同时推断丢失的 m/z162 的残基为葡萄糖糖, m/z248 的残基为丙二酰基化的葡萄糖糖, m/z204 的残基为乙酰基化的葡萄糖糖, 因此 2、5、7 号峰分别为大豆黄酮苷、丙二酰基大豆黄酮苷、乙酰基大豆黄酮苷。

3号峰 m/z 为 433, 即[M+H]⁺为 433, 8号峰 m/z 为 519, 即[M+H]⁺为 519, 10号峰 m/z 为 475, 即[M+H]⁺为 475, 它们在 MS2 中, 分别丢失一个 m/z162、m/z248、m/z204 的碎片, 产生 m/z271 的碎片离子, 且在 MS3 中 m/z271 的碎片离子为 153、215、243、253, 因此推断 3、8、10 号峰对应的都是含有染料木素的异黄酮糖苷, 3、8、10 号峰对应的物质相对分子质量分别为 432、518、474, 同时推断丢失的 m/z162 的残基为葡萄糖糖, m/z248 的残基为丙二酰基化的葡萄糖糖, m/z204 的残基为乙酰基化的葡萄糖糖, 因此 3、8、10 号峰分别为染料木苷、丙二酰基染料木苷、乙酰基染料木苷。

表1 大豆粉的乙醇粗提取物中12种异黄酮保留时间、多级质谱碎片及结构推断信息

Table 1 Retention time, fragment ions and constructions of 12 isoflavones in soybean meal

峰号	名称	一级质谱	二级质谱 MS2	三级质谱 MS3	保留时间/min	R ₁	R ₂	R ₃
1	大豆苷	417	255	137, 199, 227, 237	14.38	H	H	H
2	大豆黄酮	447	285	167,229,257,270	15.34	H	OCH ₃	H
3	染料木苷	433	271	153,215,243,253	18.66	H	H	OH
4	丙二酰大豆苷	503	255	137, 199, 227, 237	19.51	COCH ₂ COOH	H	H
5	丙二酰大豆黄酮	533	285	167,229,257,270	19.96	COCH ₂ COOH	OCH ₃	H
6	乙酰大豆苷	459	255	137, 199, 227, 237	22.68	COCH ₃	H	H
7	乙酰大豆黄酮	489	285	167,229,257,270	22.94	COCH ₃	OCH ₃	H
8	丙二酰染料木苷	519	271	153,215,243,253	23.24	COCH ₂ COOH	H	OH
9	大豆苷元	255	137, 199, 227, 237	-	24.47	-	H	H
10	乙酰染料木苷	475	271	153,215,243,253	24.90	COCH ₃	H	OH
11	大豆黄酮	285	167,229,257,270	-	24.98	-	H	OH
12	染料木黄酮	271	153,215,243,253	-	27.01	-	OCH ₃	H

本实验建立了对大豆中异黄酮的 LC-MSn 分析方法, 并且检测出 12 种大豆异黄酮, 并通过一级二级三

级质谱分析对它们的结构进行了初步分析,得到它们特征性的裂解规律,这为快速利用质谱信息鉴定大豆异黄酮奠定了基础。

参考文献

- [1] 靳朝东,梁锦荣.大豆异黄酮检测方法的研究进展[J].天津药学,2008,20(2):63-64
- [2] Kudou S, Fleury, Y. et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds [J]. Agric.Biol. Chem, 1991, 55(9): 2227-2233
- [3] 李燕,梁汉东,韦妙,等.离子阱质谱计的研究现状及其进展[J].质谱学报,2006,27(4):250-251
- [4] 王艳萍,薛兴亚,张秀莉,等.HPLC/ESI-MS 法鉴定半枝莲乙酸乙酯组分中黄酮苷元类化合物[J].质谱学报,2009,30(3): 129-138
- [5] GENG P, SUN J H, ZHANG R P, et al. An investigation of the fragmentation differences of isomeric flavol-O-glycosides under different collision-induced dissociation based mass spectrometry [J]. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2009, 23(10): 1519-1524
- [6] 鲁林,石莹,宋凤瑞,等.山奈甲黄素-3,7-二-O-多取代糖苷的串联质谱研究[J].化学学报,2010,68(17):1735-1740
- [7] 徐英,董静,王弘,等.电喷雾-离子阱-飞行时间质谱联用研究黄酮和异黄酮苷元 C 环上的裂解规律[J].高等学校化学学报,2009,30:46-50
- [8] 谷立伟,谷文英,陶冠军,等.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)[J].中草药,2000, 31(11):821-823
- [9] 张喜梅,李琳,陈玲,等.葛根总黄酮提取工艺研究[J].现代食品科技,2008, 24(1):42-45
- [10] 冯家望,蔡勤仁,柳训才,等.高效液相色谱-电喷雾串联技术测定奶及奶制品中三聚氰胺和环丙氨嗪[J].现代食品科技,2008,24,10:1058-1060
- [11] 游见明.大孔树脂分离鱼腥草总黄酮的研究[J].现代食品科技,2005,21(2):66-68