[应用纪要]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用UPLC-PDA和SQD质谱检测器分析保健食品中的大豆异黄酮

Antonietta Gledhill
沃特世公司，曼彻斯特，英国

前言

大豆异黄酮被称为是植物性雌激素，许多研究表明食用含大豆异黄酮的保健食品如豆奶和豆粉可以预防乳腺癌和前列腺癌，预防心血管疾病和降低糖尿病和绝经后骨质疏松的发生。已经发现的十二种大豆异黄酮分别为大豆甙元(De)，黄豆黄素(Gle),染料木素(Ge)和它们各自的丙二酰基(6”-O-丙二酰基-β-配糖体-)，乙酰基(6”-O-乙酰基-β-配糖体-)和葡萄糖基(β-葡萄糖苷)构型[1]。它们的结构见图 1。

许多研究已经表明食用含大豆异黄酮的保健食品如豆奶和豆粉，对身体各方面都有好处，包括预防乳腺癌和前列腺癌，预防心血管疾病和降低糖尿病和绝经后骨质疏松的发生[2-6]。

美国 FDA 在 1999 年批准针对心脏健康推销大豆蛋白[7]，食品行业以大豆异黄酮含量为主题进行产品宣传，此类保健食品的销售额逐年增加。

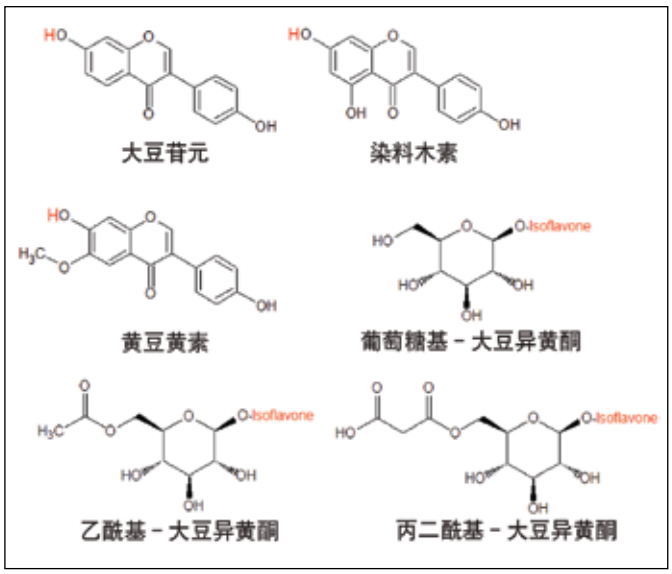

图 1. 三种大豆异黄酮的结构：大豆苷元、染料木素、黄豆黄素和它们的共轭体。

本应用介绍了使用反相 UPLC® - PDA 和 MS 检测器快速检测和鉴定大豆类营养品中大豆异黄酮葡萄糖基共轭体的方法。

实验条件

将大豆胶囊用甲醇：水溶液(9:1)超声处理 10 分钟以提取出大豆异黄酮，提取物经 0.45 µm 滤膜过滤。

质谱检测采用两种模式：全扫描(m/z:50-550)和选择离子监测(SIR)模式。

液相条件

液相系统:	沃特世 (Waters®) ACQUITY UPLC®系统
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C_8 色谱柱 2.1 x 100 mm, 1.7 µm
柱温:	35 °C
流速:	500 µL/min
流动相 A:	含 0.2% 甲酸水溶液
流动相 B:	甲醇
梯度:	0.4 min 内达到 25% B，25-40%/1.1 min，维持 0.8 min

PDA 条件

PDA:	ACQUITY UPLC PDA
波长范围:	205-450 nm
分离度:	1.2 nm
采集速度:	20 spectra/s

质谱条件

质谱系统: SQ 检测器
电离模式: ESI (+)
毛细管电压: 2000 V

去溶剂温度: 400 °C
去溶剂气体: 1000 L/Hr
源温度: 130 °C

全扫描设置

锥孔电压: 37 V
采集范围: m/z 50 - 550

SIR 设置

每个 SIR 驻留时间为 10 ms，延迟时间 5 ms。

SIR 1 (大豆苷元)		SIR 2 (染料木素)		SIR 3 (黄豆黄素)	
m/z	锥孔电压(v)	m/z	锥孔电压(v)	m/z	锥孔电压(v)
137	90	153	90	167	90
255	60	271	70	285	70
471	30	433	25	447	25
459	30	475	35	489	25
503	30	519	35	533	45

表 1. 相应每个质荷比锥孔电压的 SIR 设置。

保留时间 (min)	化合物	$[M+H]^+$
1.59	黄豆甙元葡萄糖甙	417
1.70	黄豆黄素葡萄糖甙	447
2.20	异黄酮葡萄糖甙	433
2.69	黄豆甙元丙二酰葡萄糖甙	503
2.86	黄豆黄素丙二酰葡萄糖甙	533
3.23	黄豆甙元乙酰葡萄糖甙	459
3.41	黄豆黄素乙酰葡萄糖甙	489
3.98	黄豆甙元	255
4.00	异黄酮乙酰葡萄糖甙	489
4.13	黄豆黄素	285
3.21	异黄酮丙二酰葡萄糖甙	519
4.72	异黄酮	271

表 2. 大豆异黄酮和它们共轭体的保留时间。

结果

分析物相应洗脱顺序为：葡萄糖基、丙二酰基、乙酰基和大豆异黄酮，保留时间见表 2。ACQUITY UPLC C_8 与 C_{18} 柱相比，C_8 柱在本流动相系统中有更好的分离。

本工作中两个方法分别采用全扫描方式和目标化合物选择性离子检测(SIR)的方式。

全扫描含碎片信息的质谱图(图 2)可帮助进行结构确定和鉴定未知化合物。

采用全扫描方法得到的大豆苷元 MS 谱见图 2。对于共轭的大豆异黄酮系统，列出共轭体的母离子($[M+H]^+$: m/z 417)和大豆异黄酮母离子($[M+H]^+$: m/z 255)。它们的钠加和物 $[M+Na]^+$ 分别为 m/z 439 和 m/z 277。

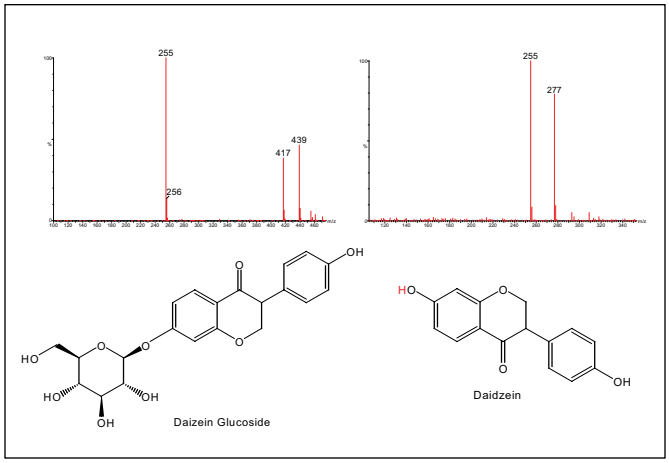

图 2. 大豆苷葡萄糖苷(大豆苷元)和大豆苷的谱图, ESI(+)母离子分别为 417 和 255。

从全扫描数据中可以提取所需要离子的信息, 图 3A 显示了 m/z 分别为 255, 271 和 285的选择离子色谱图。相同的程序也可以由 PDA 检测器在 260 nm 实现。

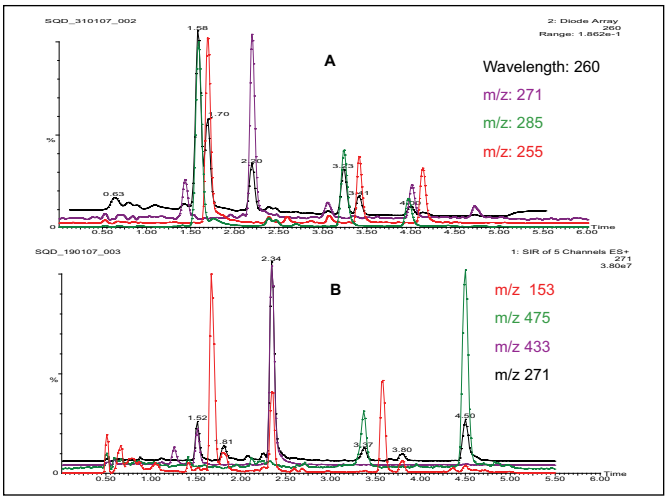

图 3. A:选择波长 260 nm, 由 TIC 提取得到的全扫描大豆苷元、染料木素和黄豆黄素 m/z 离子 MS 数据。B:SIR 方法和大豆食品中染料木素的各个离子。

图 3B 显示的是染料木素和染料木素共轭体的选择离子色谱图。m/z 153 是大豆异黄酮结构的碎片离子之一(见讨论)。

相对于全扫描, SIR 可以提供更高的灵敏度(图4), 更适合用于定量实验。

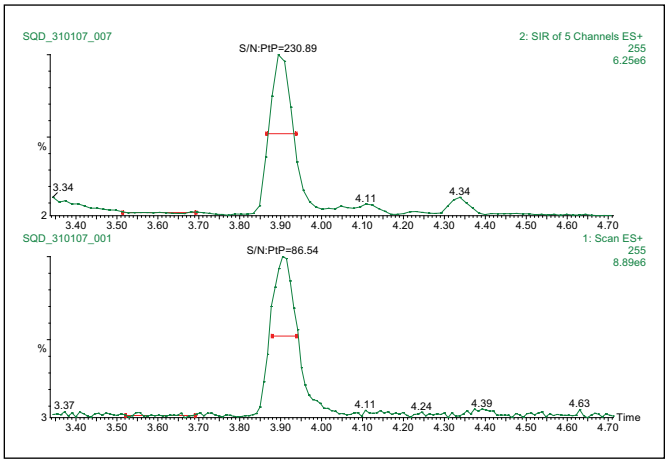

图 4. 用 SIR(上图)和全扫描提取离子模式(下图)得到的数据的信噪比。

讨论

目前对大豆异黄酮的研究主要集中于染料木素[8-10]和大豆苷元的各种生物性质，临床研究也支持它们对健康的有益作用[12,13]。

串联四级杆 MS 的研究显示大豆异黄酮和它们的葡萄糖基共轭物除了大豆异黄酮的 $[M+H]^+$ 以外还有共同的子离子。反应路径(图 5)显示子离子可能为[a+1]：对大豆苷元、染料木素和黄豆黄素而言，[a+1] m/z 分别为 137，153 和 167。

我们运用 SIR 模式做 [a+1] 离子检测。SIR 方法建立时允许对三个检测离子分别运用其各自所需的高锥孔电压(如表 1 所示)。

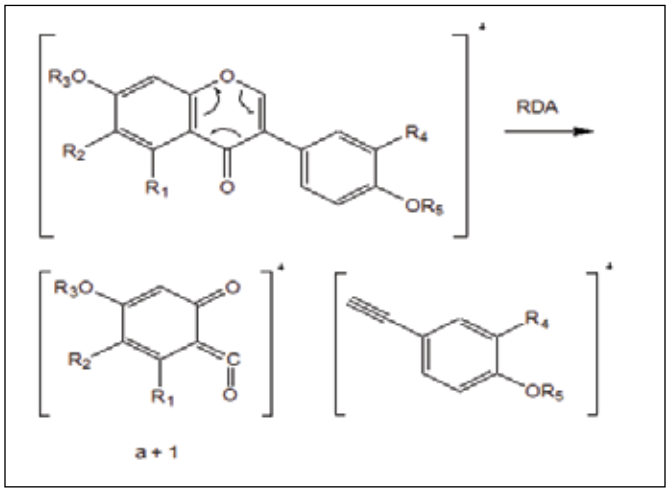

图 5. 大豆苷元的碎裂途径。

色谱数据点

用质谱做定量分析时，每个色谱峰至少要有 10 个数据点。这样才可以得到重现性好的峰。因 UPLC 的峰宽比常规 HPLC 峰要窄得多，质谱采集速度必须很快才可以实现每峰 10 个数据点的采集。图 6 显示在 SIR 模式下，当 SIR 驻留时间改变后的时间点的比较。

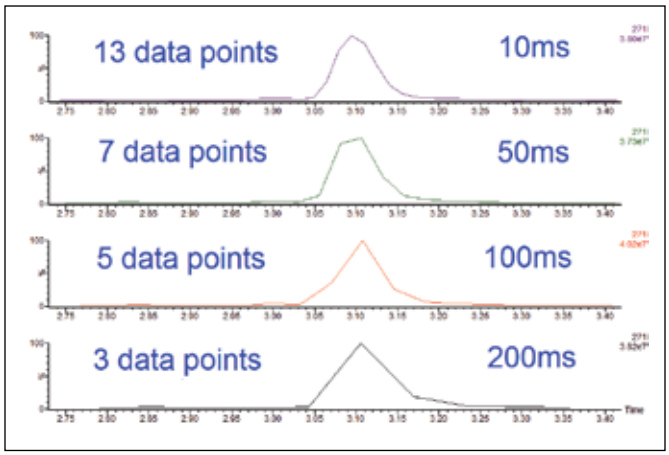

图 6. SIR 驻留时间和数据点的比较。

在本应用指南中的 SIR 实验，每个化合物分析采用 10 ms 的驻留时间可使每个色谱峰获得所需要的数据点。

结论

本应用介绍了保健食品中大豆异黄酮的分析方法。随着对保健食品研究的不断深入，此方法对于分析有效成份在人体内的生物利用度也具有非常重要的参考价值。

本文中的结果使用 UV 和 MS 做检测器建立了一个 5.5 分钟的分析方法。我们利用 MS 全扫描得到化合物的结构信息，用 SIR 方法获得更好的灵敏度从而更适合用于定量。

参考文献

1.P.A. Murphy, T. Song, G. Buseman, K. Barua, G.R. Beecher, D. Trainer, J. Holden, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 2697

2. (2) Lamartiniere, C. A. Protection against breast cancer with genistein, a component of soy. Am. J. Clin. Nutr. 2000, 71, 1705S-1707S

3. Santiba´n˜ez, J. F.; Navarro, A.; Martinez, J. Genistein inhibits proliferation and in vitro invasive potential of human prostatic cancer cell lines. Anticancer Res. 1997, 17, 1199-1204

4. Anderson, J. W.; Johnstone, B. M.; Cook-Newell, M. E. Metaanalysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. N. Engl. J. Med. 1995, 333, 276-282

5. Mezei, O.; Banz, W. J.; Steger, R. W.; Peluso, M. R.; Winters, T. A.; Shay, N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. J. Nutr. 2003, 133, 1238-1243

6. Picherit, C.; Coxam, V.; Bennetau-Pelissero, C.; Kati-Coulibaly, S.; Davicco, M.; Lebecque, P.; Barlet, J. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. J. Nutr. 2000, 130, 1675-1681

7. US Food and Drug Administration. Food labeling, health claims, soy protein and coronary heart disease. Fed Regist 1999;57:699–733

8. Setchell KDR, Adlercreutz H. Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: Rowland IR, ed. Role of the gut flora in toxicity and cancer. London: Academic Press, 1988:315–34.

9. Adlercreutz H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. Environ Health Perspect 1995;7(suppl):103–12.

11.Kim H, Peterson TG, Barnes S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor signaling pathways. Am J Clin Nutr 1998;68(suppl): 1418S–25S.

12.Setchell KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. Am J Clin Nutr 1998;68(suppl):1333S–46S.

13.Setchell KDR, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. J Nutr 1999;129(suppl):758S–67S.

50 YEAR LEGACY
VISION ■ CONTRIBUTION ■ ADVANCEMENT

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY UPLC 和 UPLC 是沃特世公司的注册商标。The Science of What's Possible 是沃特世公司的商标。所有其他商标属于各自所有者。

©2008 沃特世公司 中国印刷
2008 年 8 月 720002101 ZH

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 8586 8899
上海：021 - 6879 5888
广州：020 - 8626 6678
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com www.waterschina.com

LLOYD'S REGISTER QUALITY ASSURANCE ISO9001
UKAS QUALITY MANAGEMENT 001
VIT