

硫代葡萄糖苷的 HPLC - MS 分离鉴定研究

袁丽凤, 王志刚, 郭伟强

(浙江大学 西溪校区化学系, 浙江 杭州 310028)

摘 要:从菜籽中提取硫苷,经弱阴离子交换剂 DEAE Sephadex A-25 做预处理,得到硫苷提取液。经反相离子对液相色谱确定分离条件,采用液相色谱-电喷雾接口-质谱联用,再经紫外扫描进一步确证,同时分离鉴定了菜籽中三种类型的硫苷。

关键词:硫苷;反相离子对色谱;液相色谱-质谱联用;DEAE Sephadex A-25

中图分类号:0658 **文献标识号:**A **文章编号:**1671-8798(2003)S0-0087-03

硫代葡萄糖苷(简称硫苷)是十字花科蔬菜中一种重要的次生代谢产物,其一般的结构如图 1,由于侧链 R 基团的不同,可以把硫苷分为脂肪类、芳香类和吲哚类硫苷。十字花科蔬菜中还含有内源芥子酶,硫苷在其作用下容易水解产生异硫氰酸酯、硫氰酸酯和腈类等化合物,这些降解产物可以抑制真菌和微生物的生长^[1],还可以通过诱导泛醌还原酶的活性成为致癌物的阻断剂^[2],但蔬菜中含有过多的硫苷,将对蔬菜的营养价值产生负面的影响。

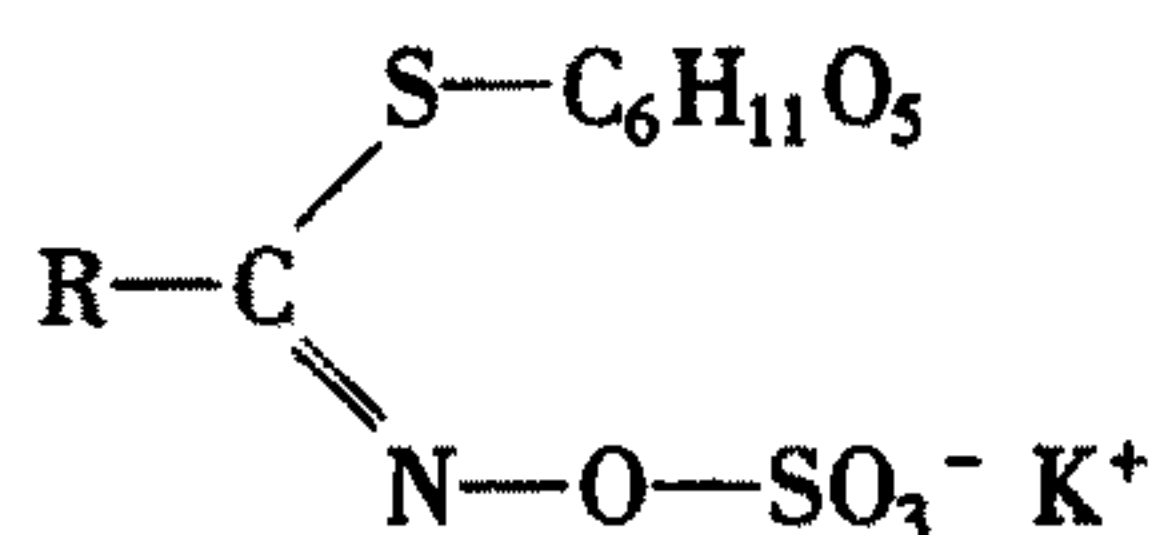


图 1 硫苷的一般结构

43 1.6x4.5

20 世纪 70 年代以前,硫代葡萄糖苷的分离主要采用的是纸色谱和薄层色谱的方法,Ettinger 和 lundeen 首先利用薄层色谱法从植物中分离得到了烯丙基硫苷,并由此提出了硫苷的一般结构。多年来不少研究者探索了分离分析硫苷的方法,取得了很好的效果,但也都存在着这样那样的不足。反相离子对色谱对于带电荷物质的分离是一种比较理想的方法,但若离子对试剂不易挥发,则不宜用于液相色谱-质谱联用。我们以挥发性的三乙胺为离子对试剂,利用电喷雾接口将反相离子对色谱与质谱联用,很好地分离了菜籽中硫苷盐类物质,成功地鉴定了油菜籽中的多种硫苷。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

材料:选用浙江省农业科学研究院培育的油菜籽。

主要仪器:Agilent 1100 型高效液相色谱仪;Agilent 1100 化学工作站;Esquine 3000 plus 质谱仪;KQ-100 型超声波清洗器;Shimadzu UV-265 型紫外扫描仪;自制层析柱。

主要试剂:DEAE Sephadex A-25;Reliasil C₁₈;甲醇为色谱纯;水为二次蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

1.2 硫苷的提取

收稿日期:2003-09-10

作者简介:袁丽凤(1978—)女,在读研究生,湖南郴州人,主要从事色谱分析方法的研究。

取 10 g 菜籽粉碎,用石油醚于索氏提取器中进行脱脂处理,低温干燥,制得脱脂菜籽粉备用。取 2 g 脱脂菜籽粉于烧杯中,在沸水浴中干蒸 5 min 后,用巯基乙醇-水溶液浸提 15 min,抽滤,离心得到约 20 mL 的提取液。取提取液注入 DEAE Sephadex A-25 的层析柱中,待溶液流干后,用醋酸吡啶溶液和水各 20 mL 淋洗,再用硫酸钾溶液洗脱,收集备用。

1.3 液相色谱/质谱条件

色谱柱为 Reliasil C₁₈ 柱(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm);流动相组成为甲醇:水 = 10:90,含 0.1% 三乙胺,用醋酸调节 pH 为 5.5;紫外检测波长 230 nm;液相色谱/质谱为负离子模式电喷雾接口;离子源温度 100 $^{\circ}$ C;扫描质量范围 250 ~ 800 m/z;数据采集由 Agilent 1 100 化学工作站完成。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

我们在 C₁₈ 柱上比较了多种流动相体系的分离情况,发现甲醇-水体系分离不好且重现性极差。在甲醇比例相同的条件下,加入醋酸铵可以使后几个峰的分离得到一定的改善,但结构差异较小的硫苷还是不能很好地分离。我们选择了易挥发的三乙胺为离子对试剂,在酸性条件下,可以起到反相离子对的作用。运用正交实验设计的方法,得到 7 种硫苷能得到很好的色谱条件为:流动相组成为甲醇:水(10:90)和 0.1% 三乙胺(pH = 5.5),流速 1 mL/min,检测波长 230 nm,分离结果见图 2。

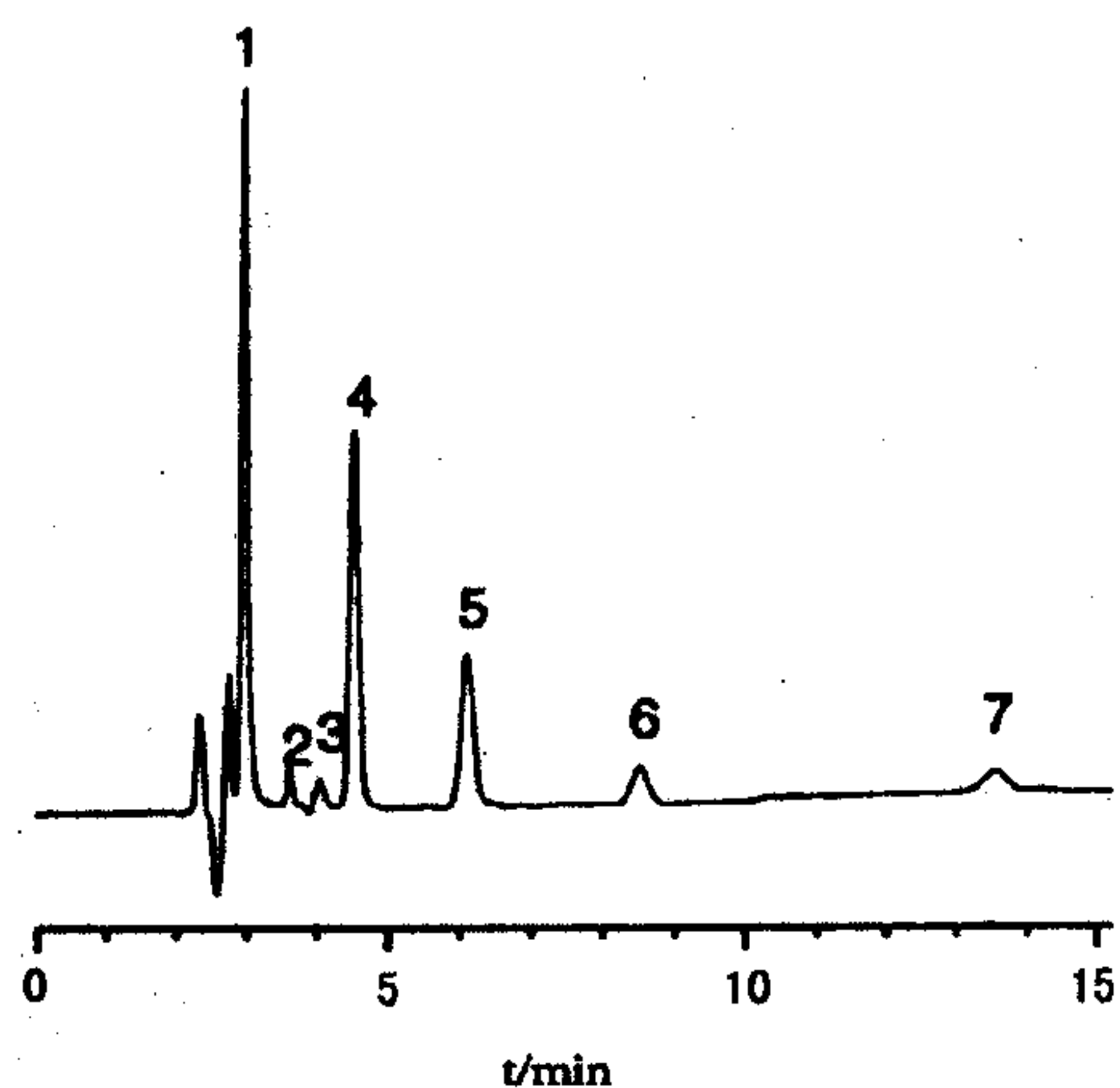


图 2 硫苷的液相色谱

7.44 6.8 6.6 7.3

表 1 液相色谱图中各鉴定的硫苷

色谱峰	硫苷名称	保留时间/t	负离子峰/m/z	最大吸收波长/nm
1	2-羟基-3-丁烯基硫苷	2.97	388	226
2	3-甲硫基丙基硫苷	3.61	450	222
3	2-羟基-4-戊烯基硫苷	4.04	402	226
4	3-丁烯基硫苷	4.52	372	224
5	4-戊烯基硫苷	6.10	386	222
6	吲哚-3-甲基硫苷	8.51	447	226、265
7	苯乙基硫苷	13.55	422	224、268

2.2 方法重现性的研究

采用 1.3 中的色谱条件,对硫苷提取液连续进样 6 次,7 种硫苷的峰高、峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)均在 0.9% - 1.7%,说明方法的重现性较好。

2.3 硫苷分子的鉴定

硫苷类物质在结构上只有侧链 R 基团的微小差别,因此各硫苷的分离提纯显得非常困难。目前市场上能够提供的硫苷标准物质只有烯丙基硫苷一种,这给液相色谱分离中利用硫苷标准物质对各种硫苷进行定性和定量分析带来了很大的困难。以三乙胺为离子对试剂组成的流动相体系,不仅成功的分离了各种硫苷,而且直接用于液相色谱-质谱联用鉴定油菜籽中的硫苷组分。吲哚-3-甲基硫苷是中国油菜籽中含有较多的一种吲哚类硫苷,从图 3 可以看到密度最大的 447 m/z 处对应吲哚-3-甲基硫苷钾盐的[M-K]负分子离子峰;从紫外光谱图(图 4)可以看到,分子在 226 nm 和 265 nm 左右有两处大的吸收峰,其中 226 nm 处还对应了硫苷分子中 S-C=N 结构的特征紫外吸收波长,另外吲哚环的共轭结构在 265 nm 附近可以看到一个较

大的吸收峰。参考 Botting^[3]等的报道可以确定硫苷提取液中其他各种硫苷组分,结果见表 1。从表 1 和色谱图 2 中看出,所选用的菜籽中除含有吲哚-3-甲基硫苷外,主要含有的是脂肪类硫苷,其中含量最高的是 2-羟基-3-丁烯基硫苷和 3-丁烯基硫苷。用同样方法可以判断出其他组分。

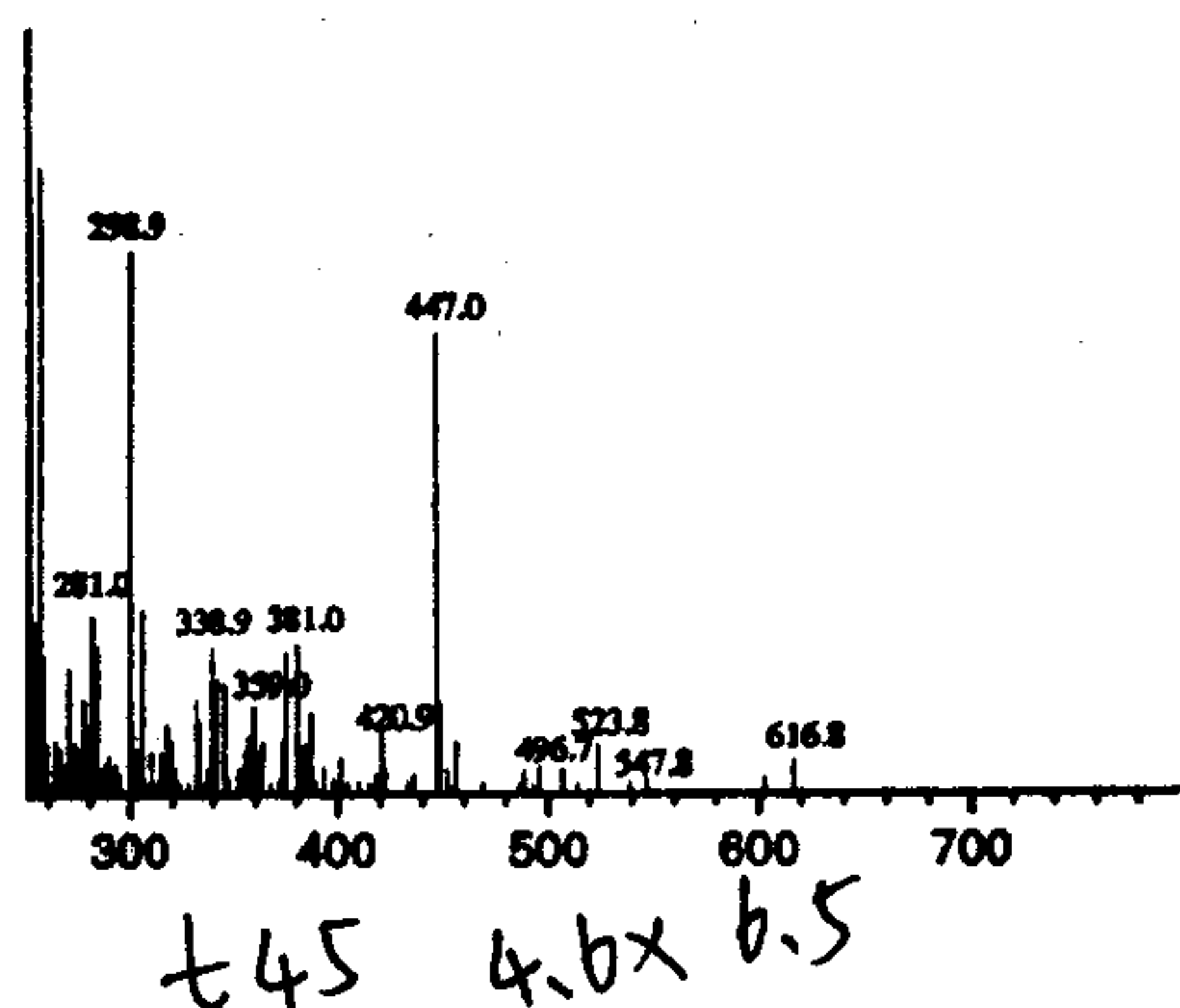


图 3 吲哚-3-甲基硫苷的质谱图

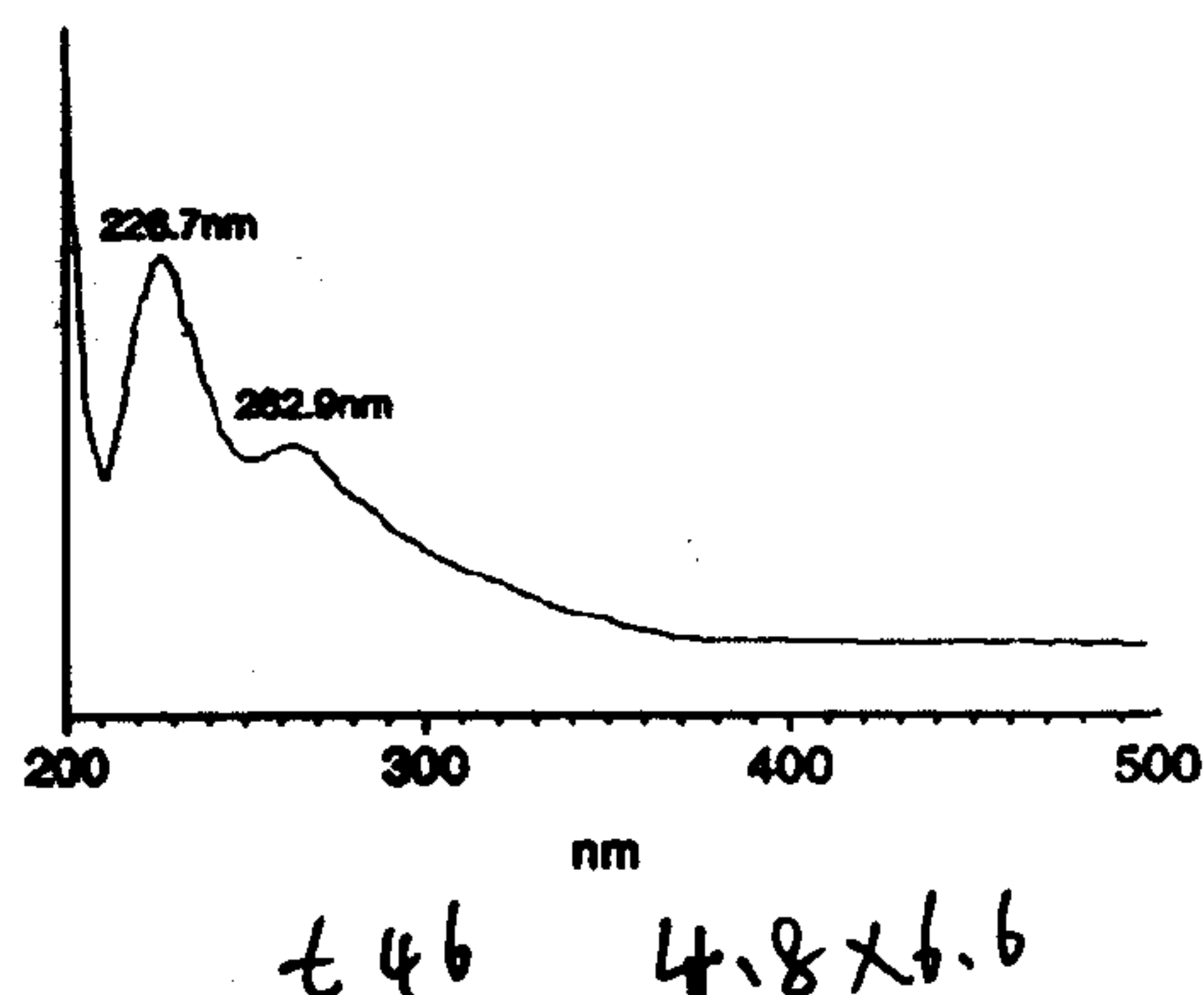


图 4 吲哚-3-甲基硫苷的紫外谱图

3 总 结

液相色谱-电喷雾接口-质谱联用,对于分离鉴定高极性分子是一个强有力的工具。反相离子对色谱中选用挥发性的离子对试剂,可以防止液相色谱-质谱接口的堵塞,因此可以进行直接定性分析,紫外扫描对于硫苷分子特征吸收峰的鉴定有进一步的补充意义。另外在硫苷预处理的过程中,经过离子交换柱的选择,可以除去提取液中大量的单宁及其它杂质,起到了预处理柱的效果。应用这种方法同时分离鉴定了油菜籽提取液中的硫苷。

参考文献:

- [1] Delaquis P J, Mazza G. Antimicrobial properties of iso-thiocyanates in food preservation[J]. Food Technology, 1995, 49: 73-79.
- [2] Tawfiq N, Heaney R K, Plumb J A, Fenwick G R, Musk S R, Williamson G. Dietary glucosinolates as blocking agents against carcinogenesis: glucosinolate breakdown products assessed by induction of quinone reductase activity in murine hepatic cells [J]. Carcinogenesis, 1995, 16:1191-1194.
- [3] Botting C H, Davidson N E, Griffiths D W, et al. Analysis of Intact Glucosinolates by MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50:983-988.

Determination of glucosinolates by liquid chromatography - electrospray mass spectrometry

YUAN Li-feng, GUO Wei-qiang, WANG Zhi-gang

(Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China)

Abstract: A reliable method to separate and identify glucosinolates in rapeseed has been developed by using reversed-phase ion-pair HPLC with confirmation by electrospray mass spectrometry and ultraviolet spectroscopy. The extracting solution of glucosinolates were first purified by a column packed with DEAE-sephadex A-25, and then were injected into the chromatographic system. Confirmation of identity was accomplished by using both negative ion electrospray mass spectrometry and ultraviolet spectroscopy. Seven species of glucosinolates were determined with this method.

Key words: Glucosinolates; ion-pairing reagent; HPLC-MS; DEAE-sephadex A-25