

超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定 发酵饮品中 20 种黄酮和酚酸

LCMSMS-332

摘要：本实验使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 建立了发酵饮品中 20 种黄酮和酚酸类物质的检测方法。本法线性范围宽，相关系数 R 大于 0.99，各标准点准确度在 80~114% 之间。在 100 $\mu\text{g/L}$ (橙皮苷 500 $\mu\text{g/L}$ ，异鼠李素 25 $\mu\text{g/L}$) 加标量下考察萃取回收率和重复性，各组分定量结果的相对标准偏差在 1.7~12.7% 之间，回收率在 84.8~121.9%，可以满足定量分析的需求。本法成功用于多份发酵饮品的含量检测。

关键词：LCMS 发酵饮品 黄酮 酚酸

发酵饮品是以果汁、蔬菜汁为主要原料，经乳酸菌或酵母菌发酵后，再经调香调味的一类现代发酵食品。具有调节肠道菌群、调节免疫系统、抗氧化等作用。果蔬发酵汁中含有很多活性物质，如多酚类、黄酮类、生物碱类、多糖类以及甾醇类化合物。多酚类物质，如对羟基苯甲酸、香草酸、琥珀酸具有维持果蔬色泽、抗菌、

抗氧化的作用。乳酸菌发酵过程中，果蔬中多酚和黄酮类之间会互相转化，改善果蔬汁的口感和功效。

本文使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 建立了发酵饮品中的黄酮和酚酸类物质的检测方法，在发酵饮品营养成分测定，及发酵工艺优化领域具有广阔的应用前景。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统，包括 LC-30AD \times 2(输液泵)，SIL-30AC(自动进样器)，CTO-30A(柱温箱)，CBM-20A(系统控制器)，DGU-20A₅(在线脱气机)，LCMS-8050(三重四极杆质谱仪)和 LabSolutions Ver 5.89。

1.2 样品信息

化合物信息见表 1。

标准溶液配制方法如下：分别称取橙皮苷、川陈皮苷、桔红素、原儿茶酸、绿原酸、儿茶素、表儿茶素、邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸、芦丁、金丝桃苷、香豆酸、芥子酸、阿魏酸、槲皮苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素 10 mg，异鼠李素 2.5 mg，用甲醇超声溶解定容至 10 mL，配制成单一标准溶液。上述 20 种单一标准溶液各取 100 μL ，甲醇定容至 10 mL 配制成 10 mg/L 混合标准溶液母液(异鼠李素为 2.5 mg/L)。再用甲醇对比稀释成 3.91、7.81、15.62、31.25、62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g/L}$ 的混合工作溶液(异鼠李素为 0.98、1.95、3.91、7.81、15.62、31.25、62.5、125、250 $\mu\text{g/L}$)。

实际样品制备方法：桔皮汁和桔肉汁用甲醇稀释 100 倍，过滤后直接进样。柠檬片和普洱样品分别称取 1 g，加 10 mL 甲醇超声 30 分钟，取 1 mL 上述溶液用甲醇稀释至 10 mL，过滤后直接进样。

表1 化合物信息

No.	名称	英文名	CAS#	分子式
1	橙皮苷	Hesperidin	520-26-3	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅
2	川陈皮苷	Nobiletin	478-01-3	C ₂₁ H ₂₂ O ₈
3	桔红素	Tangeretin	481-53-8	C ₂₀ H ₂₀ O ₇
4	原儿茶酸	3,4-Dihydroxybenzoic acid	99-50-3	C ₇ H ₆ O ₄
5	绿原酸	Chlorogenic acid	327-97-9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
6	儿茶素	Catechin hydrate	18829-70-4	C ₁₅ H ₁₆ O ₇
7	表儿茶素	Epicatechin	490-46-0	C ₁₅ H ₁₆ O ₇
8	邻苯二甲酸	Phthalic acid	88-99-3	C ₈ H ₆ O ₄
9	对羟基苯甲酸	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	C ₇ H ₆ O ₃
10	芦丁	Rutin	153-18-4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
11	金丝桃苷	Hyperoside	482-36-0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
12	香豆酸	Coumalic acid	500-05-0	C ₆ H ₄ O ₄
13	芥子酸	Sinapinic acid	530-59-6	C ₁₁ H ₁₂ O ₅
14	阿魏酸	Ferulic Acid	1135-24-6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
15	槲皮苷	Quercitrin	522-12-3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
16	木犀草素	Luteolin	491-70-3	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
17	槲皮素	Quercetin	117-39-5	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
18	芹菜素	Apigenin	520-36-5	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
19	柚皮素	Naringenin	480-41-1	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
20	异鼠李素	Isorhamnetin	480-19-3	C ₁₆ H ₁₂ O ₇

1.3 分析条件

液相色谱条件

流动相: A相 -0.1% 甲酸、1 mM 乙酸铵水溶液,
B相 - 乙腈

流速: 0.2 mL/min

色谱柱: Capcell PAK ADME2.1 mm I.D.
× 50 mm L., 2 μm

柱温: 40°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 20%,
时间程序见表 2。

进样体积: 1 μL

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.00	Pumps	B.Conc	50
8.00	Pumps	B.Conc	80
8.10	Pumps	B.Conc	100
10.00	Pumps	B.Conc	100
10.10	Pumps	B.Conc	20
14.00	Controller	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI

雾化气流速: 3.0 L/min

接口电压: 4 kV

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300°C

表3 MRM参数

No.	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	橙皮苷	611.10	303.10*	-22	-23	-21
		611.10	449.10	-22	-10	-16
2	川陈皮苷	403.10	373.10*	-15	-28	-25
		403.10	388.10	-15	-22	-19
3	桔红素	373.10	343.10*	-14	-27	-23
		373.10	358.10	-14	-20	-24
4	原儿茶酸	153.10	109.10*	30	15	10
		153.10	91.00	30	26	30
5	绿原酸	353.20	191.10*	26	20	19
		353.20	85.00	13	42	12
6	儿茶素	289.20	109.10*	22	25	11
		289.20	203.10	11	19	21
7	表儿茶素	289.20	109.10*	22	25	11
		289.20	203.10	11	19	21
8	邻苯二甲酸	165.10	77.10*	12	16	10
		165.10	121.00	12	13	11
9	对羟基苯甲酸	137.10	93.10*	30	16	12
		137.10	65.10	30	30	22
10	芦丁	609.20	300.10*	24	38	13
		609.20	271.00	24	55	26
11	金丝桃苷	463.20	300.00*	13	27	13
		463.20	271.00	23	43	28
12	香豆酸	163.00	119.10*	18	16	11
		163.00	91.00	12	29	16
13	芥子酸	223.10	148.90*	15	27	28
		193.10	134.10*	14	18	12
14	阿魏酸	193.10	178.00	14	15	17
		447.20	300.10*	22	26	13
15	槲皮苷	447.20	271.00	17	42	27
		285.10	133.10*	21	32	12
16	木犀草素	285.10	151.00	20	25	14
		301.10	179.00*	22	17	17
17	槲皮素	301.10	151.00	22	21	15
		269.10	117.10*	20	34	11
18	芹菜素	269.10	151.00	20	24	14
		271.10	151.00*	30	17	15
19	柚皮素	271.10	119.10	30	24	11
		315.10	300.00*	23	21	13
20	异鼠李素	315.10	151.00	23	28	14

*表示定量离子 注: 芥子酸只有一个离子对

结果与讨论

2.1 LCMS 色谱图

对橙皮苷等 20 种目标物进行色谱分离优化，在 Capcell PAK ADME 色谱柱上各组分保留适中，分离良好。图 1 为 31.2 $\mu\text{g/L}$ (异鼠李素 7.8 $\mu\text{g/L}$) 混标色谱图。

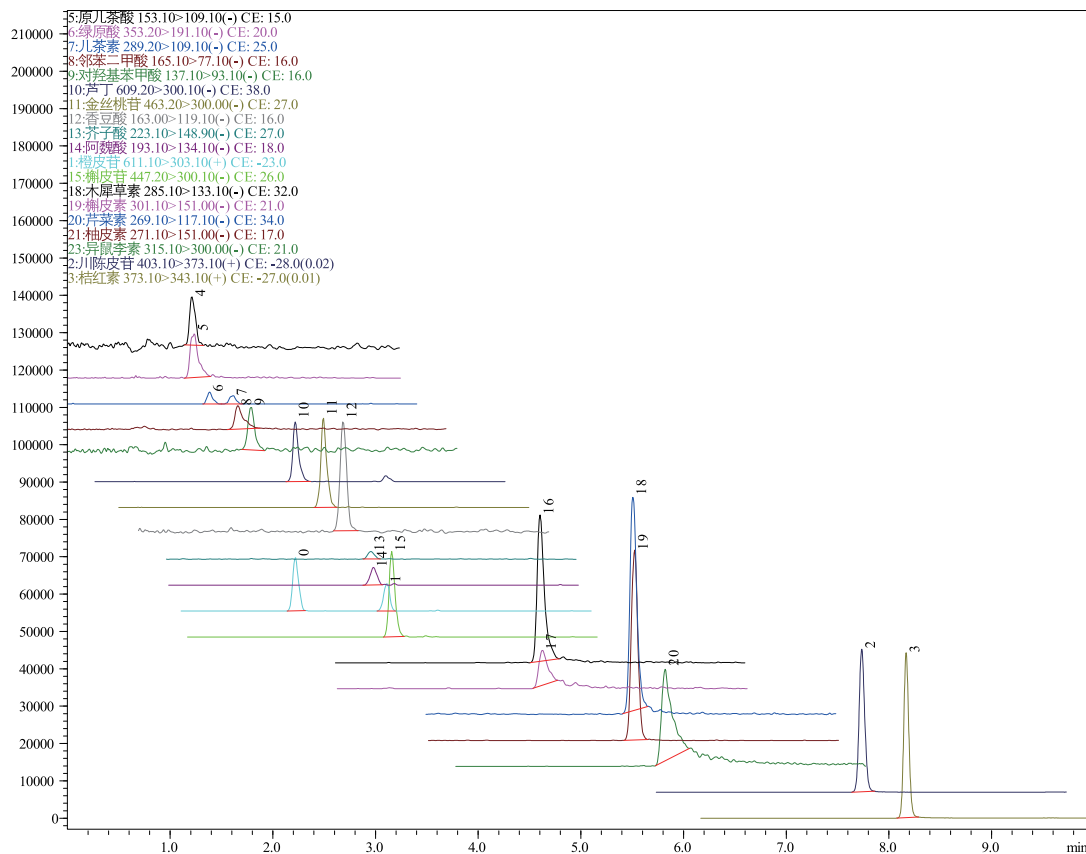


图1 LCMS标样检测色谱图(1、橙皮苷；2、川陈皮苷；3、桔红素；4、原儿茶酸；5、绿原酸；6、儿茶素；7、表儿茶素；8、邻苯二甲酸；9、对羟基苯甲酸；10、芦丁；11、金丝桃苷；12、香豆酸；13、芥子酸；14、阿魏酸；15、槲皮苷；16、木犀草素；17、槲皮素；18、芹菜素；19、柚皮素；20、异鼠李素。1~19号组分浓度为31.2 $\mu\text{g/L}$ ，异鼠李素7.8 $\mu\text{g/L}$)；

2.2 线性范围

按照 1.2 所述方法配制系列工作溶液，按照 1.3 所述分析条件进行测定。以目标峰的浓度为横坐标，以目标峰面积为纵坐标，外标法制作工作曲线，各组分线性回归方程及相关系数见表 4。实验结果表明各组分在考察范围内线性关系良好，线性相关系数 R 大于 0.99，各标准点准确度在 80~114% 之间。使用 LabSolutions 软件，ASTM 法计算最低标准样品的信噪比，由信噪比计算结果计算得到目标组分定量限 (LOQ, S/N=10) 在 1~15 $\mu\text{g/L}$ 之间。

表4 各组分标准曲线及相关系数

No.	名称	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	线性方程	相关系数 r	Accuracy (%)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
1	橙皮苷	7.8-1000	$Y = (641.181)X$	0.9990	83-103	7
2	川陈皮苷	3.9-500	$Y = (136187)X$	0.9986	85-103	3
3	桔红素	7.8-250	$Y = (243871)X$	0.9999	99-114	7
4	原儿茶酸	15.6-1000	$Y = (1124.12)X$	0.9990	94-102	15
5	绿原酸	7.8-1000	$Y = (1631.60)X$	0.9985	82-103	7
6	儿茶素	15.6-1000	$Y = (216.486)X$	0.9997	81-102	15
7	表儿茶素	7.8-1000	$Y = (174.216)X$	0.9994	85-103	7
8	邻苯二甲酸	15.6-1000	$Y = (897.326)X$	0.9992	83-103	15
9	对羟基苯甲酸	15.6-1000	$Y = (997.752)X$	0.9998	81-104	15
10	芦丁	7.8-1000	$Y = (1268.15)X$	0.9996	80-101	7
11	金丝桃苷	7.8-1000	$Y = (1771.81)X$	0.9999	88-101	7
12	香豆酸	7.8-1000	$Y = (2502.40)X$	0.9998	80-102	7
13	芥子酸	15.6-1000	$Y = (183.645)X$	0.9997	80-102	15
14	阿魏酸	15.6-1000	$Y = (480.072)X$	0.9991	88-102	15
15	槲皮苷	7.8-1000	$Y = (1995.78)X$	0.9995	81-101	7
16	木犀草素	7.8-1000	$Y = (3938.24)X$	0.9995	81-102	7
17	槲皮素	15.6-1000	$Y = (2094.55)X$	0.9987	88-103	15
18	芹菜素	3.9-1000	$Y = (5348.28)X$	0.9997	89-103	2
19	柚皮素	0.98-1000	$Y = (3652.61)X$	0.9995	87-105	1
20	异鼠李素	1.95-250	$Y = (23966.4)X$	0.9995	87-103	2

2.3 重复性和回收率考察

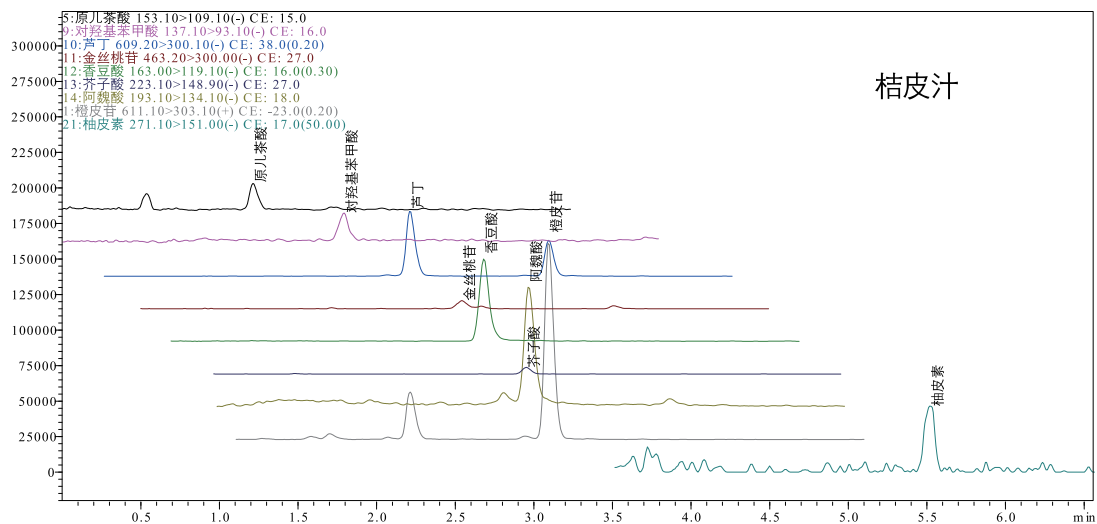
平行制备六份桔肉汁样品, 在 $100 \mu\text{g/L}$ (橙皮苷 $500 \mu\text{g/L}$, 异鼠李素 $25 \mu\text{g/L}$) 加标量下考察萃取回收率和重复性, 结果如表 5 所示。实验结果表明, 各组分定量结果的相对标准偏差在 1.7~12.7% 之间, 回收率在 84.8~121.9%, 可以满足定量分析的需求。

表5 各组分的萃取重复性考察结果(n=6)

No.	名称	样品测试值(μg/L)	加标值(μg/L)	加标结果		
				加标样平均实测值(μg/L)	CV (%)	回收率(%)
1	橙皮苷	665	500	1126	3.6	84.8-103.8
2	川陈皮苷	-	100	95.4	2.5	94.0-97.6
3	桔红素	-	100	105.0	1.7	103.9-105.8
4	原儿茶酸	56.7	100	164.3	4.7	95.8-116.7
5	绿原酸	-	100	115.3	9.7	95.1-120.8
6	儿茶素	-	100	103.3	10.6	89.3-118.3
7	表儿茶素	-	100	105.1	12.7	88.0-121.9
8	邻苯二甲酸	2.1	100	106.7	2.3	101.5-107.9
9	对羟基苯甲酸	8.7	100	115.6	5.5	96.5-114.5
10	芦丁	69	100	177.3	2.5	101.7-111.9
11	金丝桃苷	-	100	117.6	3.8	109.8-120.8
12	香豆酸	-	100	116.1	3.7	111.0-120.8
13	芥子酸	-	100	107.9	10.8	88.7-121.7
14	阿魏酸	-	100	100.5	7.5	89.1-108.3
15	槲皮苷	-	100	103.2	4.3	98.6-110.9
16	木犀草素	-	100	110.9	3.5	107.0-115.3
17	槲皮素	-	100	110.1	6.1	104.3-120.6
18	芹菜素	-	100	112.5	3.6	108.0-116.9
19	柚皮素	45.1	100	151.0	3.8	102.6-109.8
20	异鼠李素	-	25	26.9	5.3	98.5-113.9

2.4 实际样品检测

使用本文开发的方法对多份发酵饮品进行含量测定。样品中各目标组分的含量测定结果见表6,典型色谱图见图2。



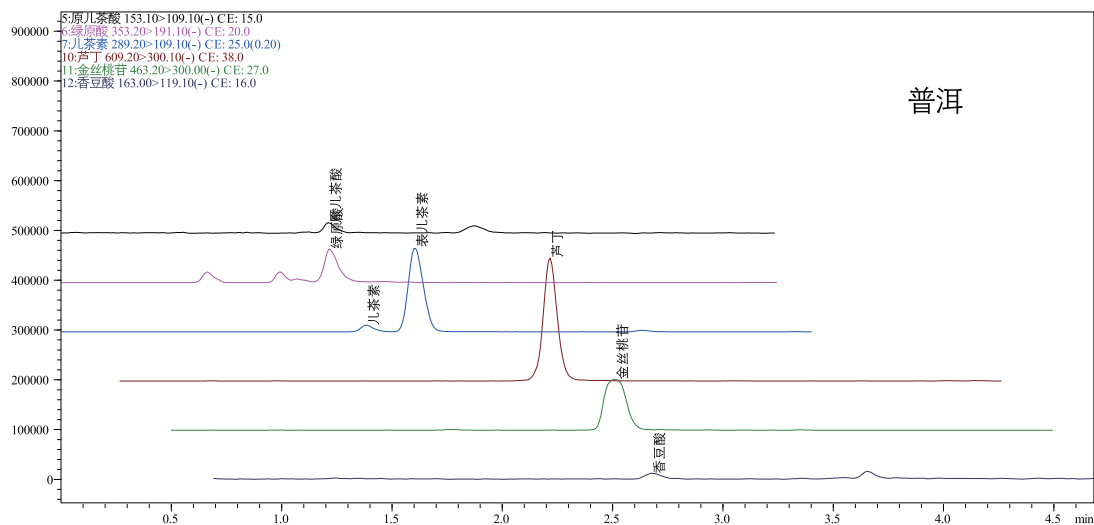


图2 实际样品检测色谱图

表6 实际样品中各组分含量测定结果(mg/L, n=2)

No.	名称	桔皮汁	桔肉汁	柠檬汁	普洱
1	橙皮苷	39.0	66.5	246	-
2	川陈皮苷	-	-	-	-
3	桔红素	-	-	-	-
4	原儿茶酸	0.633	5.67	-	0.676
5	绿原酸	-	-	-	1.86
6	儿茶素	-	-	-	9.29
7	表儿茶素	-	-	-	260
8	邻苯二甲酸	-	0.209	-	-
9	对羟基苯甲酸	0.885	0.870	-	-
10	芦丁	7.25	6.90	5.87	8.46
11	金丝桃苷	0.157	-	-	3.98
12	香豆酸	3.62	-	-	0.239
13	芥子酸	1.15	-	-	-
14	阿魏酸	8.00	0.265	-	-
15	槲皮苷	-	-	-	-
16	木犀草素	-	-	-	-
17	槲皮素	-	-	-	-
18	芹菜素	-	-	-	-
19	柚皮素	0.0119	4.51	-	-
20	异鼠李素	-	-	-	-

结论

本文使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 检测发酵饮品中 20 种黄酮和酚酸类营养成分。该方法在发酵饮品营养成分测定领域具有广阔的应用前景。