

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测水果中常见 32 种酚类物质

LCMSMS-446

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定水果中常见多酚类物质的方法。该方法可完成 32 种水果中常见多酚类物质测定。在 0.1-2.0 mg/kg 范围内建立校准曲线，各组线性相关系数均在 0.99 以上。分别对市售蓝莓、苹果进行测定，实际样品可检出多种多酚组分。

关键词： 三重四极杆质谱 多酚物质 水果

植物多酚 (Plant Polyphenol) 是一大类广泛存在于植物体内的多元酚类化合物。多酚类物质大体上可以分为简单酚类、酚酸类、羟基肉桂酸类和黄酮类化合物等，其中黄酮类化合物是水果种分布最广的多酚类物质，主要包括黄酮类、黄酮醇类、黄烷酮醇类、黄烷酮类、黄烷醇类、花色苷类、查尔酮类及其衍生物等。

许多水果中都含有一定量的多酚物质，果实多酚含量也是品质评价重要指标之一。文献报道中主要采

用高效液相色谱法对水果中多酚的主要组成进行了研究，但液相色谱法由于在实际样品分析中存在基质干扰，可能会导致假阳性误判，且灵敏度不高，在低含量组分分析受限，本文采取岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定水果中常见多酚类物质，有效提升检测灵敏度，减少前处理净化步骤，为水果中代谢产物分析及营养品质评价奠定基础。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱 : C18 (150 mm×2.1 mm L, 1.8 μm)

流动相 : A 相 -0.5% 甲酸水

B 相 - 乙腈

流速 : 0.3 mL/min

柱温 : 40°C

进样量 : 2 μL

洗脱方式 : 梯度洗脱，B 相初始浓度为 0%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.0	Pumps	Pump B Conc.	5
10.0	Pumps	Pump B Conc.	20
16.0	Pumps	Pump B Conc.	25
18.0	Pumps	Pump B Conc.	40
19.0	Pumps	Pump B Conc.	100
20.0	Pumps	Pump B Conc.	100
21.0	Pumps	Pump B Conc.	0
27.0	控制器	Stop	

LCMS-8045 质谱条件：

离子源	: ESI (+)	接口电压	: 4 kV
雾化气流速	: 3.0 L/min	加热模块温度	: 400°C
加热气流速	: 10.0 L/min	扫描模式	: 多反应监测 (MRM)
接口温度	: 300°C	干燥气流速	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250°C	MRM 参数	: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

No.	名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	熊果苷	497-76-7	271.1	108.10*	15	25	20
				109.15	15	11	10
2	没食子酸	149-91-7	169.2	125.10*	10	15	12
				79.05	20	22	11
3	飞燕草素 -3-5- 葡萄糖苷	17670-06-3	627.2	303.20*	-38	-35	-22
				465.20	-20	-21	-18
				191.20*	12	19	19
4	新绿原酸	906-33-2	353.2	179.20	18	16	19
				303.15*	-10	-24	-22
5	飞燕草素 -3-O- 半乳糖苷	197250-28-5	465.1	229.15	-30	-53	-26
				303.15*	-16	-25	-22
				229.10	-28	-55	-25
6	飞燕草素 - 葡萄糖苷	6906-38-3	465.1	245.20*	16	14	16
				109.05	24	24	10
7	儿茶素	18829-70-4	289.15	191.20*	13	16	12
				85.10	10	41	29
8	绿原酸	327-97-9	353.2	287.15*	-15	-22	-14
				137.15	-15	-55	-27
9	矢车菊素 - 半乳糖苷	27661-36-5	449.15	287.15*	-15	-24	-21
				137.10	-15	-55	-14

10	矢车菊素 - 葡萄糖苷	7084-24-4	449.15	287.15*	-15	-24	-21
				137.10	-15	-55	-14
11	矢车菊素 - 阿拉伯糖苷	57186-11-5	419.1	287.15*	-13	-23	-20
12	矮牵牛素 - 葡萄糖苷	6988-81-4	479.25	317.10*	-13	-23	-23
				302.10	-21	-42	-22
13	表儿茶素	490-46-0	291.2	139.10*	-13	-15	-28
				123.10	-10	-16	-13
14	天竺葵素 -3- 氯化葡萄糖苷	18466-51-8	433.1	271.15*	-14	-21	-19
				121.10	-26	-55	-23
15	二氢杨梅素	27200-12-0	321.15	275.15*	-11	-15	-19
				153.10	-14	-18	-16
16	原花青素 C1	37064-30-5	865.15	125.10*	24	50	12
				287.10	24	31	30
17	芍药素 - 葡萄糖苷	6906-39-4	463.15	301.15*	-10	-23	-22
				286.15	-15	-40	-20
18	矢车菊素 - 木糖苷	29761-24-8	419.2	287.15*	-27	-23	-21
19	锦葵色素 - 葡萄糖苷	7228-78-6	493.1	331.10*	-17	-24	-17
			493.1	315.05	-29	-50	-22
20	氯化锦葵色素 --3-O-阿拉伯糖苷	28500-04-1	463.15	331.15*	-15	-22	-17
				315.10	-15	-47	-23
21	白藜芦醇苷	65914-17-2	389.25	227.15*	13	16	14
				185.15	13	34	18
22	芦丁	153-18-4	609.25	300.15*	20	35	20
				271.15	22	55	17
23	二氢槲皮素	480-18-2	303.2	285.15*	14	10	13
				125.05	14	21	24
24	槲皮素 - 葡萄糖苷	21637-25-2	463.15	300.15*	13	27	30
				271.15	13	21	13
25	木樨草 - 葡萄糖苷	1268798	449.15	287.15*	-10	-24	-21
				153.15	-15	-52	-29
26	山萘酚 -3-O- 芸香糖苷	17650-84-9	595.25	287.10*	-24	-24	-22
				449.15	-24	-13	-24
27	槲皮素 - 阿拉伯糖苷	572-30-5	433.15	301.15*	10	18	20
				300.15	21	24	13
28	异鼠李 -3- 芸香糖苷	604-80-8	625.25	317.15*	-24	-22	-12
				479.20	-24	-13	-18

29	槲皮素 - 鼠李糖苷	522-12-3	447.1	300.15*	16	25	13
				301.20	22	21	21
30	异鼠李 - 葡萄糖苷	5041-82-7	479.2	317.10*	-17	-17	-12
				302.10	-30	-41	-22
31	根皮苷	7061-54-3	435.2	273.20*	12	16	18
				167.15	24	29	30
32	槲皮素	6151-25-3	303.05	153.10*	-26	-33	-16
				229.10	-13	-30	-16

注：* 表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

分别称取多酚标准品适量，用甲醇溶解，配制成 1.0 mg/mL 的混合标准储备液，置于 -20 °C 冰箱中保存。上述标准储备液用甲醇稀释得 10 µg/mL 混合标准品溶液。通过逐级稀释最终配成：0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 µg/mL 的系列标准溶液。

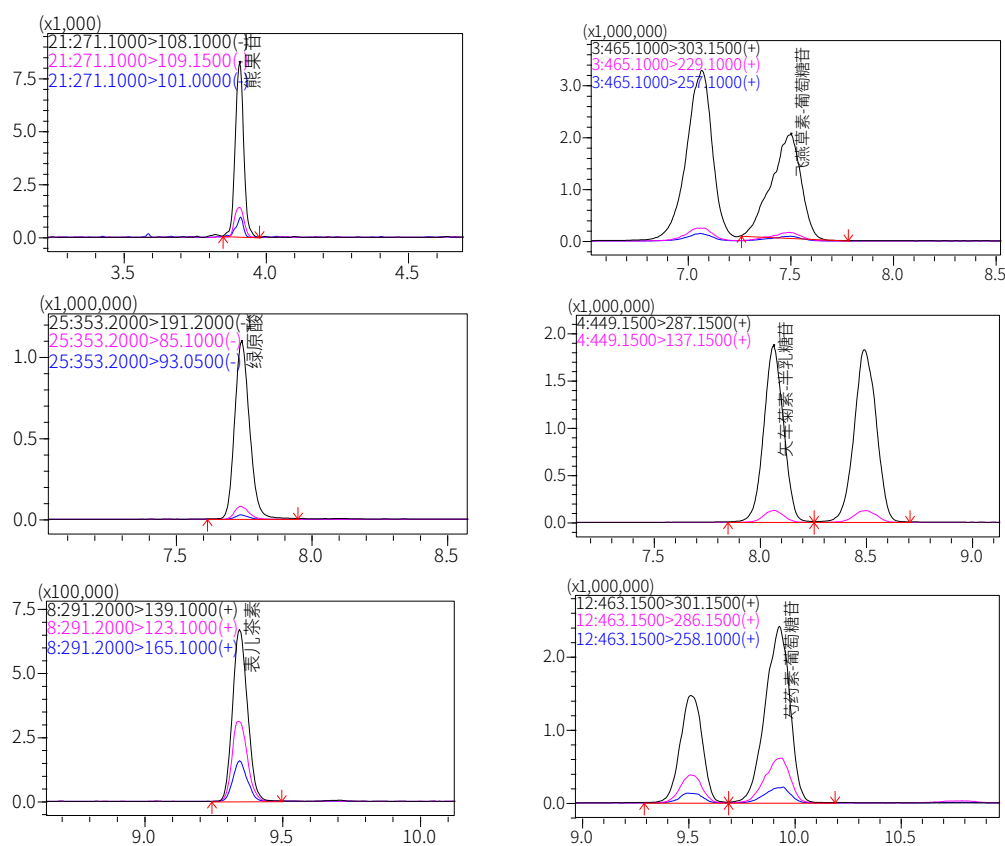
1.4 样品前处理方法

称取 10 g 试样（精确到 0.01 g）于 50.0 mL 棕色离心管中，加入约 20 mL 80% 甲醇溶液，混合，室温下超声 15 min，9000 r/min 离心 5 min，上清液转入 50.0 mL 棕色容量瓶中，残渣再用约 15 mL 80% 甲醇酸性溶液按上述步骤重复提取 1 次，合并 2 次提取液，用 80% 甲醇溶液定容至 50.0 mL 备用，上机前过 0.22 µm 膜，并通过稀释使样品上机浓度在标准曲线线性范围内。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液的 MRM 色谱图

部分代表性多酚物质标准溶液（1 µg/mL）色谱图如下图 1 所示。



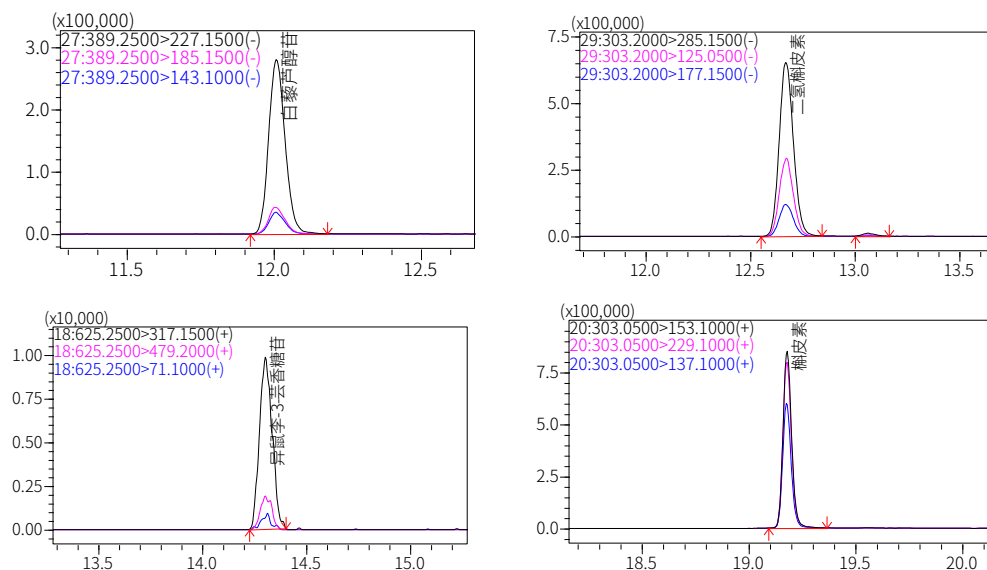


图 1 部分多酚物质标准溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 色谱图

2.2 标准曲线

按照 1.3 配制各浓度混合标准工作液。以标准工作溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法绘制标准曲线，所得校准曲线在 0.1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系均大于 0.99，标准曲线线性方程及相关系数见表 3。

表 3 校准曲线参数

序号	名称	校准曲线	相关系数 R	准确度 %
1	熊果苷	$Y = (18223.7)X + (-73.1264)$	0.9997	97.12~102.15
2	没食子酸	$Y = (1.53411\text{e}+006)X + (4446.46)$	0.9966	93.66~110.43
3	飞燕草素 -3-5- 葡萄糖苷	$Y = (701937)X + (22163.7)$	0.9933	85.98~112.50
4	新绿原酸	$Y = (3.91195\text{e}+006)X + (10409.0)$	0.9999	97.73~101.98
5	飞燕草素 -3-O- 半乳糖苷	$Y = (2.78818\text{e}+007)X + (947312)$	0.9946	87.49~113.00
6	飞燕草素 - 葡萄糖苷	$Y = (2.01374\text{e}+007)X + (574240)$	0.9964	89.33~113.22
7	儿茶素	$Y = (498292)X + (8334.13)$	0.9989	95.26~109.14
8	绿原酸	$Y = (4.54648\text{e}+006)X + (24417.5)$	0.9974	90.78~107.07
9	矢车菊素 - 半乳糖苷	$Y = (1.14521\text{e}+007)X + (128679)$	0.9992	96.77~104.61
10	矢车菊素 - 葡萄糖苷	$Y = (1.44201\text{e}+007)X + (168561)$	0.9996	97.69~103.02
11	矢车菊素 - 阿拉伯糖苷	$Y = (2.98887\text{e}+007)X + (1.42485\text{e}+006)$	0.9975	92.95~109.39
12	矮牵牛素 - 葡萄糖苷	$Y = (445490)X + (32420.9)$	0.9969	93.34~108.78
13	表儿茶素	$Y = (2.44017\text{e}+006)X + (26524.4)$	0.9994	96.21~105.22
14	天竺葵素 -3- 氯化葡萄糖苷	$Y = (4.28063\text{e}+007)X + (619840)$	0.9998	97.51~103.62
15	二氢杨梅素	$Y = (891517)X + (9529.28)$	0.9946	88.40~111.76
16	原花青素 C1	$Y = (589506)X + (941.122)$	0.9987	96.73~106.11
17	芍药素 - 葡萄糖苷	$Y = (1.88408\text{e}+007)X + (170015)$	0.9997	96.78~102.52
18	矢车菊素 - 木糖苷	$Y = (967841)X + (47121.3)$	0.9934	87.37~109.81
19	锦葵色素 - 葡萄糖苷	$Y = (3.86006\text{e}+007)X + (277563)$	0.9999	98.31~102.07
20	氯化锦葵色素 --3-O- 阿拉伯糖苷	$Y = (1.70631\text{e}+007)X + (168086)$	0.9999	97.42~102.62

21	白藜芦醇苷	$Y = (1.05590e+006)X + (2335.68)$	0.9987	95.35~108.27
22	芦丁	$Y = (1.93805e+006)X + (73491.6)$	0.9972	87.02~109.84
23	二氢槲皮素	$Y = (3.02750e+006)X + (19918.7)$	0.9998	95.30~102.87
24	槲皮素 - 葡萄糖苷	$Y = (1.68827e+007)X + (-71123.7)$	0.9998	95.52~105.00
25	木樨草 - 葡萄糖苷	$Y = (911251)X + (3818.26)$	0.9997	97.70~105.17
26	山萘酚 -3-O- 芸香糖苷	$Y = (146109)X + (5785.79)$	0.9965	88.64~111.15
27	槲皮素 - 阿拉伯糖苷	$Y = (4.41331e+006)X + (-4379.60)$	0.9996	94.50~102.96
28	异鼠李 -3- 芸香糖苷	$Y = (40986.5)X + (576.542)$	0.9981	94.82~112.16
29	槲皮素 - 鼠李糖苷	$Y = (3.00895e+006)X + (6713.84)$	0.9999	97.41~101.53
30	异鼠李 - 葡萄糖苷	$Y = (515881)X + (32848.0)$	0.9955	89.00~113.67
31	根皮苷	$Y = (1.86455e+006)X + (-6843.00)$	0.9998	96.13~103.05
32	槲皮素	$Y = (2.29027e+006)X + (25192.8)$	0.9995	97.15~103.20

2.3 精密度实验

以 3 倍信噪比作为检测限，使用标准曲线最低点浓度计算最低检测限（LOD）。峰面积的重复性实验以 0.5 mg/L 的标准样品连续进样 6 次，计算其相对标准偏差（RSD），各多酚物质最低检出限（LOD）及峰面积的 RSD 值见表 4。

表 4 最低检出限（LOD）及峰面积的 RSD（%）

序号	名称	RSD%(n=6)	LOD (µg/ mL)
1	熊果苷	4.30	0.0126
2	没食子酸	3.63	0.0013
3	飞燕草素 -3-5- 葡萄糖苷	2.70	0.0029
4	新绿原酸	0.69	0.0022
5	飞燕草素 -3-O- 半乳糖苷	2.68	0.0005
6	飞燕草素 - 葡萄糖苷	3.56	0.0010
7	儿茶素	3.29	0.0293
8	绿原酸	3.83	0.0048
9	矢车菊素 - 半乳糖苷	1.81	0.0003
10	矢车菊素 - 葡萄糖苷	1.17	0.0011
11	矢车菊素 - 阿拉伯糖苷	1.97	0.0003
12	矮牵牛素 - 葡萄糖苷	3.23	0.0048
13	表儿茶素	3.79	0.0019
14	天竺葵素 -3- 氯化葡萄糖苷	1.73	0.0004
15	二氢杨梅素	4.02	0.0080
16	原花青素 C1	1.20	0.0119
17	芍药素 - 葡萄糖苷	1.49	0.0011
18	矢车菊素 - 木糖苷	3.97	0.0289
19	锦葵色素 - 葡萄糖苷	1.16	0.0009
20	氯化锦葵色素 --3-O- 阿拉伯糖苷	1.07	0.0012

21	白藜芦醇苷	4.58	0.0027
22	芦丁	4.61	0.0113
23	二氢槲皮素	1.34	0.0042
24	槲皮素 - 葡萄糖苷	1.55	0.0010
25	木樨草 - 葡萄糖苷	1.43	0.0040
26	山萘酚 -3-O- 芸香糖苷	4.36	0.0064
27	槲皮素 - 阿拉伯糖苷	1.87	0.0012
28	异鼠李 -3- 芸香糖苷	5.13	0.0146
29	槲皮素 - 鼠李糖苷	1.54	0.0017
30	异鼠李 - 葡萄糖苷	3.70	0.0211
31	根皮苷	2.11	0.0007
32	槲皮素	1.27	0.0015

2.4 实际样品测定结果

从市场购买蓝莓及苹果样品，以 1.4 样品前处理方法进行样品前处理后上机分析，检出结果见表 5。

表 5 实际样品检测结果

序号	名称	蓝莓样品 (mg/kg)	苹果样品 (mg/kg)
1	熊果苷	1.11	—
2	没食子酸	0.12	—
3	飞燕草素 -3-5- 葡萄糖苷	—	—
4	新绿原酸	7.86	0.20
5	飞燕草素 -3-O- 半乳糖苷	63.60	—
6	飞燕草素 - 葡萄糖苷	58.00	—
7	儿茶素	38.88	6.22
8	绿原酸	977.00	10.28
9	矢车菊素 - 半乳糖苷	14.38	3.34
10	矢车菊素 - 葡萄糖苷	9.46	3.03
11	矢车菊素 - 阿拉伯糖苷	8.62	0.13
12	矮牵牛素 - 葡萄糖苷	49.75	—
13	表儿茶素	7.11	30.03
14	天竺葵素 -3- 氯化葡萄糖苷	0.05	—
15	二氢杨梅素	0.44	—
16	原花青素 C1	4.60	20.30
17	芍药素 - 葡萄糖苷	4.68	—
18	矢车菊素 - 木糖苷	1.14	—
19	锦葵色素 - 葡萄糖苷	106.75	—
20	氯化锦葵色素 --3-O- 阿拉伯糖苷	134.5	—
21	白藜芦醇苷	—	—

22	芦丁	19.48	0.09
23	二氢槲皮素	0.27	—
24	槲皮素 - 葡萄糖苷	7.80	0.53
25	木樨草 - 葡萄糖苷	—	—
26	山萘酚 -3-O- 芸香糖苷	1.05	—
27	槲皮素 - 阿拉伯糖苷	—	6.68
28	异鼠李 -3- 芸香糖苷	7.18	—
29	槲皮素 - 鼠李糖苷	—	6.38
30	异鼠李 - 葡萄糖苷	0.69	—
31	根皮苷	0.12	24.75
32	槲皮素	0.08	0.04

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定水果中 32 种常见酚类物质的方法。该方法在 27 min 内完成 32 种多酚物质的定量分析，校准曲线的相关系数在 0.99 以上。0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准品平行测试 6 次，相对标准偏差在 0.69 % ~ 5.13% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势，可用于水果中多酚物质含量检测。

岛津应用云

