

液相色谱—串联质谱法测定植物油中的6种儿茶素

廖杰¹ 宋玉乔¹ 赵玉兰¹ 李宁¹ 吕效兴¹ 薛长勇²

(1. 解放军总医院医学实验测试中心 北京 100853)

(2. 解放军总医院营养科 北京 100853)

摘要 建立液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定各种植物油中儿茶素的方法。植物油经水或甲醇液-液萃取,采用Zorbax SB C₁₈柱,以乙腈-0.1%甲酸为流动相进行梯度洗脱,用多反应监测扫描方式对表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯和没食子儿茶素没食子酸酯等6种儿茶素类茶多酚进行检测。方法的最低检出限均为5~20pg,平均回收率为79.6~99.9%,精密密度为0.97%~5.35%。用所建立的方法测定市售植物油中儿茶素类茶多酚的含量。

关键词 液相色谱-串联质谱法 植物油 儿茶素

茶多酚(Tea polyphenols)富含于茶叶中,其主要成分为儿茶素、黄酮及黄酮醇、花色素、酚酸及缩酚酸4类化合物,其中儿茶素类占茶多酚总量的60%~80%。由于茶多酚具有抗氧化、抗衰老、抗癌、抗辐射、降血糖、血脂、血压等多种功能^[1],因此,食品的保健功能也体现在其茶多酚的含量上。现有文献报道的茶多酚提取方法主要有溶剂萃取法,沉淀法,树脂法等3类^[2-6],但其提取的对象多数为茶叶,含量测定方法多为HPLC法,从植物油中提取并测定茶多酚的方法尚未见文献报道。由于茶多酚水溶性较强,在植物油中即使有,含量也会很低,所以选择灵敏度较高的串联质谱法进行测定。本文采用MRM法建立测定各种植物油中儿茶素类茶多酚含量的方法,并对各种市售植物油中的儿茶素类茶多酚进行测定。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与测试样品

岛津UFLC-20AD液相色谱仪;API 3200Q TRAP液质联用仪(Turbospray ESI电离源);超声波清洗仪;BF-2000M型氮气吹干仪;美国Milli-Q II型纯水器。

儿茶素标准品表没食子儿茶素(EGC)、儿茶素(C)、表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)和表儿茶素没食子酸酯(ECG)均购于Sigma公司。乙腈、甲酸为国产生谱纯试剂。

芝麻油、菜籽油、大豆油、花生油、茶籽油均为市售国产植物油(生产厂家略),橄榄油(Extra Virgin)产自希腊。

1.2 标准溶液的制备

精密称取各标准品适量,加25%乙腈溶解成浓度约为0.2 μg/mL的标准储备溶液。

1.3 试样的制备及测定

水提取 精密量取各种植物油10mL,加水20mL,超声30min后在分液漏斗中静置,取水层,再用0.45 μm的滤膜过滤后立即测定,进样量90 μL。

甲醇提取 精密量取各种植物油10mL,加甲醇20mL,超声30min后在分液漏斗中静置,取甲醇层5mL, N₂吹干后,用25%乙腈2mL定容,再用0.45 μm的滤膜过滤后立即测定,进样量90 μL。

1.4 测定条件

1.4.1 液相条件 色谱柱:Zorbax SB C₁₈柱,4.5×150mm,5 μm;流速:0.8mL/min;流动相:A相(25%乙腈)与B相(0.1%甲酸)梯度洗脱,梯度程序为0~5min,A相62.5%,B相37.5%;5.1~9min,A相100%,9.1~14min,恢复到A相62.5%,B相37.5%。

1.4.2 质谱条件 负Turbospray电离源(ESI),离子源参数为CUR:25.0、CAD:Medium、IS:-4500、TEM:700、GS₁:70、GS₂:70。监测模式:MRM方法;离子对以及电参数(见表1)。

2 结果和讨论

2.1 提取条件的选择

文献报道儿茶素从茶叶中提取茶多酚的方法主要有溶剂萃取法、沉淀法、树脂法等^[2-6],考虑到植物油基质复杂、粘稠度大,但极性与儿茶素类相差较

表 1 6 种儿茶素液相色谱 - 串联质谱测定的 MRM 离子对及电参数表

对照品	Q ₁	Q ₃	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)	Dwell Time (ms)
C 和 EC	289.1	109.0	-50	-35	-8	-3	100
C 和 EC	289.1	123.1	-50	-37	-8	-3	100
C 和 EC	289.1	151.1	-50	-30	-8	-3	100
C 和 EC	289.1	203.2	-50	-27	-8	-3	100
ECG	441.1	169.0	-40	-30	-8	-3	100
EGC	305.1	125.0	-55	-25	-8	-3	100
EGC	305.1	137.0	-55	-40	-8	-3	100
EGC	305.1	165.0	-55	-25	-8	-3	100
EGC	305.1	219.0	-55	-25	-8	-3	100
EGCG 和 GCG	457.1	169.0	-50	-25	-8	-3	100

大的特点, 我们选择溶剂萃取法。用甲醇虽然能够提取出 EGC、C、EC、ECG, 但 ECG 的提取回收率较低 (约为 80%), 用水提取 EGC、C、EC 可获得较好的回收率。

2.2 测定条件的优化

我们用反相液相色谱法, 乙腈 / 三氟醋酸 / 水梯度洗脱对标准品溶液进行分离, 结果显示 6 种儿茶素在 15min 内均得到良好分离 (见图 1)。但由于植物油中儿茶素含量较低, 用 UV 法无法得到检测。所以建立 LC/MS/MS 多反应监测方法 (见图 2), 该 6 种茶多酚中, 按照出峰顺序, 第 2 和第 3、第 4 和第 5 是两对立体异构体, 在质谱条件进行优化的过程中发现, 其离子对完全一样, 所以仅仅依靠离子对不能区分第 2 和第 3 (离子对均为 289.1~109.0、289.1~123.1、289.1~151.1、289.1~203.2)、第 4 和第 5 (离子对均为 457.1~169.0), 因此必须保证在液相分离上, 每对异构体对应的物质完全分离, 而选用该流动相能够使得两对异构体分离良好; EGC 的离子对为 305.1~125.0、305.1~137.0、305.1~165.0、305.1~219.0, 其中 305.1~125.0 的信号强度最高, 故选该离子对进行定量, C 与 EC 的离子对均为 289.1~109.0、289.1~123.1、289.1~151.1、289.1~

203.2, 其中 289.1~109.0 的信号强度最高, 故选该离子对进行定量。

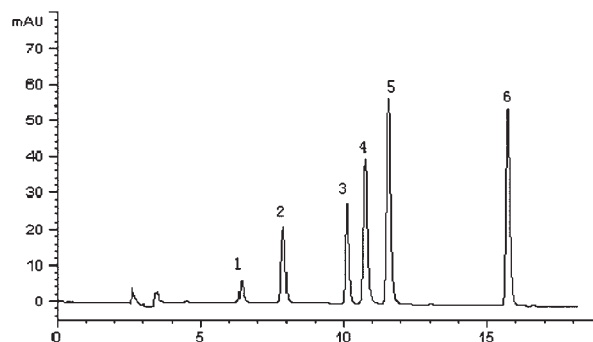


图 1 6 种儿茶素的液相色谱分离结果。

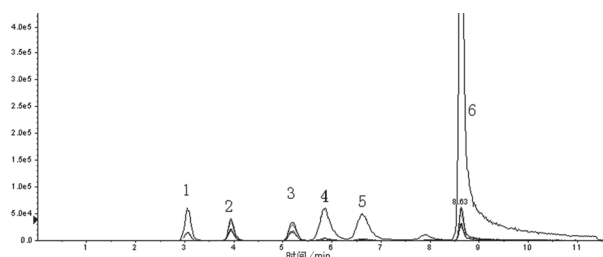


图 2 6 种儿茶素标准品的 LC/MS/MS 离子流图

1. EGC: 保留时间 3.05min, 分子量 306.3; 2. 儿茶素: 保留时间 3.94min, 分子量 290.3; 3. EC: 保留时间 5.20min, 分子量 290.3; 4. EGCG: 保留时间 5.87min, 分子量 458.4; 5. GCG: 保留时间 6.60min, 分子量 458.4; 6. ECG: 保留时间 8.63min, 分子量 442.4。

2.3 方法的线性范围和最低检出限

精密称取 6 种对照品适量, 加 25% 乙腈溶解成浓度各为 2 μg/mL 的混合对照品溶液, 再分别精密量取该对照品溶液适量, 加 25% 乙腈制成对照品系列溶液。分别精密进样 10 μL, 将峰面积 (Y) 与对照品浓度进行回归, 测定方法的线性范围 (见表 2)。在选定的色谱条件下, 当信噪比为 3 时, EGC、C、EC、EGCG、GCG 最小检测限均为 20pg, ECG 为 5pg。

2.4 方法的回收率和精密度

精密量取 0.2ug/mL 的对照品溶液 10 μL, 重复 6 次, EGC、C、EC、EGCG、GCG、ECG 对照品溶液峰面积 RSD 值分别为 2.39%、0.97%、1.25%、2.04%、4.11%、5.35%。精密取茶油 10mL, 加水 19mL 以及 2 μg/mL 的混合对照品溶液 1mL, 超声 30min 后在分液漏斗中静置, 取水层测定回收率,

表 2 6 种儿茶素类儿茶酚检测的线性范围、线性方程和相关系数

对照品	EGC	C	EC	EGCG	GCG	ECG
线性方程	Y=207X-862	Y=176X-151	Y=180X-382	Y=460X-1.05 × 10 ⁴	Y=519X-1.52 × 10 ⁴	Y=3.32 × 10 ³ X-1.88 × 10 ⁴
线性 r 值	0.9992	0.9996	0.9996	0.9998	0.9997	0.9996
线性范围	10.9ng/mL~ 2.18 μg/mL	10.6ng/mL~ 2.12 μg/mL	2.16ng/mL~ 2.16 μg/mL	10.55ng/mL~ 2.11 μg/mL	20ng/mL~2.0 μg/mL	2.68ng/mL~268 μg/mL

共测定 6 份, EGC、C、EC 的平均回收率为 98.6% (RSD 为 3.1%)、98.8% (RSD 为 2.8%)、98.2% (RSD 为 4.8%), EGCG、GCG、ECG 均未检测到。精密取茶油精油 10mL, 加甲醇 19mL 以及分别为 2 μg/mL 的 EGC、C、EC、ECG 4 种对照品混合溶液 1mL, 超声 30min 后在分液漏斗中静置, 取甲醇层 5mL, N₂ 吹干后, 用 25% 乙腈 5mL 定容后测定回收率, 共测定 6 份, EGC、C、EC、ECG 的平均回收率为 99.9% (RSD 为 3.4%)、98.3% (RSD 为 2.7%)、97.3% (RSD 为 3.9%)、79.6% (RSD 为 7.6%)。

2.5 儿茶素在溶液中的稳定性

将标准品溶液分别在室温下放置 0h、6h、8h、10h、12h、14h、16h、18h, 按照前述的方法检测, 考察 6 种儿茶素在配制溶液中的稳定性。结果表明, C、EC、ECG 溶液的峰面积 RSD 值分别为 3.9%、3.1%、2.45%; GCG 在 14h 基本稳定, 截止 18h, 降解 15.9%; EGC 在 18h 降解 68.4%, EGCG 在 18h 降解 66.9%, 且生成复杂的降解产物。

2.6 植物油样品测定

按照前述样品处理方法提取各种植物油中儿茶素, 测定结果显示, 橄榄油中含有 C、EC 的异构体, 离子对为 289.1~109.0; 芝麻油中含有 2 个 C、EC 的异构体, 共有离子对分别为 289.1~151.1 和 289.1~123.1; 菜籽油中含有 EC 0.9ng/mL; 其余茶油毛油、茶油、大豆油、花生油中均未检测到。由于儿茶素极易氧化变质, 前述菜籽油、橄榄油以及芝麻油在开瓶放置 2 月后已经不能再测到儿茶素, 说明植物油的加工、运输、贮存条件对儿茶素含量

的影响非常大。

3 结论

茶多酚是一类具有抗氧化, 抗衰老, 抗癌, 抗辐射, 降血糖, 血脂, 血压等多种功能天然成分, 儿茶素类是其主要成分, 食品的相关保健功能也体现在其儿茶素的含量上。本文建立液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 测定各种植物油中 6 种儿茶素的方法。植物油经水或甲醇液-液萃取, 采用 Zorbax SB C₁₈ 柱, 以乙腈-0.1% 甲酸为流动相进行梯度洗脱, 用多反应监测扫描方式对表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯和没食子儿茶素没食子酸酯等 6 种儿茶素类茶多酚进行检测。方法灵敏、准确, 适用于测定植物油中的儿茶素含量。

参考文献

- 1 张民桂, 冯鑫, 严爱萍. 茶多酚的药理学研究概况, 山东医药工业, 1999, 18 (3): 21~23
- 2 姜守刚, 蒋建勤等. 茶多酚的提取分离和分析鉴定研究, 药学进展, 2005, 29 (2): 72~77
- 3 郭宇妹, 张沂, 朱新生. 茶多酚的提取分离与含量测定方法进展, 解放军药学学报, 2007, 23 (2): 121~124
- 4 何昱, 洪筱坤, 王智华. 茶多酚中儿茶素及咖啡因的含量测定, 中成药, 2003, 25 (10): 827~830
- 5 黄雄伟. 浅谈茶多酚的含量测定, 中成药, 2002, 24 (7): 549~550
- 6 蒋丽, 俞雪钧. 紫外分光光度法测定口香糖中的茶多酚, 中国公共卫生, 2002, 18 (4): 489

Determination of 6 catechins in vegetable oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Liao Jie Song Yuqiao Zhao Yulan Li Ning Lv Xiaoxing

(Medical experiment and analysis center of General Hospital of PLA, Beijing 100853)

Abstract A method was developed for the determination of 6 catechins in vegetable oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). After liquid-liquid extraction using methanol and water, the vegetable oils were chromatographed on a Zorbax SB C₁₈ column with a gradient system of acetonitrile and 0.1% formic acid as mobile phase, then detected using a MS/MS system with electrospray ionization (ESI) in multi-reaction monitoring (MRM) mode. The detection limits of epigallo-catechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallic acid, gallic acid gallate and epicatechin gallate ranged from 5pg to 20pg. The recoveries ranged from 79.6% to 99.9%, and the precisions (measured as relative standard deviations) were 0.97%~5.35%. The method has been successfully applied in the determination of catechins in the vegetable oils.

Key words Liquid chromatography-tandem mass spectrometry Vegetable oils Catechins