

实验技术与方法

高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱法测定保健食品中水苏糖含量

苏 娜 陈 波 姚守拙
(湖南师范大学化学研究所, 湖南 长沙 410081)

摘 要:目的 以质谱定性定量,测定保健品中水苏糖含量。方法 采用高效液相色谱/电喷雾质谱联用法(HPLC-ESI/MS),色谱柱:瑞典 Kromasil NH₂ 柱;流动相:甲醇+乙腈+0.1%甲酸氨水溶液=8+52+40(体积比);流速1.0 ml/min。质谱采用电喷雾正离子模式(ESI⁺),对 m/z 689 进行选择离子监测,扫描范围(m/z):620~700 amu。结果 水苏糖在 80~120 μg/ml 范围内,峰面积和浓度呈良好的线性关系($r=0.9992$);相对标准偏差(RSD)为0.73%;在3个添加水平下的回收率均在93.0%~105.8%。结论 本方法快速、选择特异性高、分析时间短且无需衍生处理,抗干扰能力强,能准确快速测定水苏糖的含量。
关键词:色谱法, 高压液相;光谱法, 质量, 电喷雾电离;水苏糖;营养保健品

Determination of Stachyose in Health Food by High Performance
Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
SU Na, CHEN Bo, YAO Shou-zhuo
(Chemical Research Institute of Hunan Normal University, Hunan Changsha 410081, China)

Abstract : Objective To develop a simple, rapid and accurate method to determine stachyose. **Method** A high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS) was used. The analyte of samples were separated on a Kromasil NH₂ column with a ternary solvent mixture of methanol + acetonitrile + 0.1 % water solution of ammonia formate (8 + 52 + 40, v/v/v) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min. Stachyose was identified and quantified by electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS), and the electrospray ionization was operated in positive ion mode to generate protonated ions. The ion at m/z 689 was recorded in the selective ionization and the scan range was 620-700 amu. **Results** The concentration of stachyose over a range of 80-120 μg/ml was in a good linearity. The correlation coefficient of the calibration curve was 0.9992 and the RSD was 0.73 %. The average recovery were between 93.0 % and 105.8 %. **Conclusion** The advantages of the proposed method are easy to operate without derivation and less time for analysis, and are in good precision and accuracy.
Key words: Chromatography, Liquid; Spectrometry, Mass, Electrospray Ionization; Stachyose; Dietary Supplements

水苏糖(stachyose)是自然界存在的一种四糖,广泛分布于豆科植物中,属于棉子糖属半乳糖苷类非还原性功能低聚糖,是一种具有促进肠道双歧杆菌的生长,能产生一系列独特保健功能的活性物质^[1,2]。

近年来,检测水苏糖的方法主要有 HPLC-UV、HPLC-RID、HPLC-ESLD^[3-6],但这几种模式存在着需要进行糖类衍生、灵敏度低、稳定性差、不能进行梯度洗脱等缺点,所以有必要建立一种简单、快速、灵敏度高且无需进行衍生处理的检测糖类的方法。本项工作采用质谱做检测器,检测保健食品中的糖类成分,其测定的灵敏度得到了较大的提高,并且可在定量的同时得到部分结构信息,为此该方法

在检测保健食品中的糖类中具有重要意义。

1 材料与方法

- 1.1 仪器 Waters 2695 分离单元(配有自动进样器),Waters ZQ2000 质谱检测器(配有电喷雾电离源,ESI)、Waters MasslynxTM3.5 色谱管理系统(Waters 公司,美国)。KQ3200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);瑞典 Kromasil NH₂ 柱(5 μm,150 mm ×4.6 mm),大连江申分离科学技术公司。
- 1.2 试剂和样品 水苏糖标准品购自天津一方科技有限公司,纯度为 99%;蔗糖四糖标准品购自 sigma 公司,纯度为 99%;乙腈、甲醇均购自湖南化工研究院精细化工研究所,均为色谱纯;水为二次蒸馏水,经 Milli-Q 系统纯化;保健品购自药房;
- 1.3 校正曲线的绘制 精密称取 10.9 mg 水苏糖

作者简介:苏 娜 女 硕士生
通讯作者:陈 波 男 教授 博士生导师

标准品,用流动相超声溶解,定容于 100 ml 容量瓶中,得储备液。取该储备液适量稀释至最终浓度分别为 80、90、100、110、120 $\mu\text{g/ml}$ 的系列标准溶液,每个浓度溶液分别进 10 μl ,以吸收峰面积对浓度作曲线,进行拟合,得到校正曲线。

1.4 试样的处理 本试验待测试样的剂型为口服液、片剂和胶囊。精密称取 0.997 0 g 保健口服液、药片或去壳后的胶囊样品,用 20 ml 流动相超声 30 min,提取液在转速为 12 000 r/min 离心 10 min,上清液转至 50 ml 的容量瓶中,用流动相稀释至刻度,此为原始样品溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜,滤液直接进高效液相色谱/质谱仪检测。

1.5 实验条件 HPLC 条件 色谱柱:瑞典 Kromasil NH_2 柱,流动相:甲醇 + 乙腈 + 0.1 % 甲酸氨水溶液 = 8 + 52 + 40 (体积比)。进样前柱子用流动相平衡 10 min,流速:1.0 ml/min,柱温:室温,进样体积为 10 μl 。

MS 条件 用电喷雾离子化正离子采集模式 (ESI^+), m/z 范围:620 ~ 700 amu,毛细管电压:3.5 kV,锥孔电压:60 V,萃取电压:4.0 V,射频电压:0.0 V,源温度:120 ,脱溶剂温度:300 ,脱溶剂气:300 L/h,锥孔反吹气:10 L/h,选择离子 m/z 689。进入质谱的流量由三通阀调为 0.2 ml/min。

2 结果

2.1 线性范围和检出限 绘制校正曲线,每个浓度平均进 3 针,所得峰面积取平均值对浓度做校正曲线方程 $y = 648.15x - 28\,916$, $r = 0.999\,2$,将标准溶液逐渐稀释,求得被分析物的检测下限,检出限为 2.0 μg ($S/N = 3$)。

2.2 精密度试验 精密吸取水苏糖浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 标准品溶液 10 μl ,重复进样 6 次。结果测得水苏糖的 RSD 为 0.73 %,符合分析要求。

2.3 回收率试验 称取某口服液约 15.5 mg (其中水苏糖的含量约为 2.5 mg) 3 份,分别加入水苏糖标准品 2.0 mg、2.5 mg、3.0 mg,定容于 50 ml 容量瓶中,每份平行处理 6 次。计算试样的加样回收率。结果见表 1。

2.4 样品测定 对 8 种保健品进行检测,1 号口服液、2 号口服液、3 号口服液、4 号胶囊、5 号胶囊、6 号片剂、7 号胶囊和 8 号胶囊的含量分别为 11.37 %、16.09 %、12.35 %、8.07 %、10.32 %、1.58 %、2.19 %、1.42 %, $n = 8$ 。

3 讨论

3.1 实验条件的选择 在确定流动相时,以文献^[5-7]报道的流动相乙腈 + 水 = 68 + 32、乙腈 + 水 =

70 + 30、乙腈 + 水 = 75 + 25 进行试验,但在上机测定 40 min 之后都没有任何响应,而在流动相甲醇 + 乙腈 + 水 = 8 + 52 + 40 的条件下,样品中水苏糖不仅能与其他组分很好的分开,而且在 12 min 左右就出了峰,检测分析的周期非常好。后来用 0.1 % 甲酸氨水溶液代替水相,发现准分子离子的丰度被大大增强,因此,本实验最终确定采用甲醇 + 乙腈 + 0.1 % 甲酸氨水溶液 = 8 + 52 + 40 体系为流动相,在该色谱条件下,水苏糖的保留时间为 $t_R = 12.82\text{ min}$ 。

表 1 某口服液的回收率和精密度测定结果

某口服液	本底浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	加标浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	测定浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)	RSD (%)
1	48.30	39.61	88.94	102.6	2.33
	47.72	39.40	86.54	98.5	
	50.73	39.81	92.36	104.5	
	50.02	40.18	91.28	102.7	
	50.10	37.11	87.25	100.1	
	50.82	38.80	90.47	102.2	
2	48.16	50.62	95.22	93.0	2.28
	47.86	50.10	95.24	94.8	
	51.53	50.22	100.58	98.1	
	50.98	50.46	99.95	97.0	
	47.96	51.23	98.34	98.3	
	47.95	49.20	96.24	98.2	
3	49.33	64.87	116.87	104.5	2.79
	49.04	63.64	111.98	99.1	
	50.61	61.28	115.49	105.8	
	50.64	59.61	110.96	101.2	
	49.35	57.21	109.33	105.2	
	51.56	58.03	109.45	99.8	

为得到水苏糖最佳质谱响应,提高其灵敏度,利用流动注射法 (flow injection analysis, FIA) 对其质谱参数进行优化。经过试验比较,发现其在正离子模式下的响应更好。根据各参数对其响应和碎裂方法的影响情况,主要对锥孔电压、锥孔反吹气进行调节。本试验分别考察了在 10、20、40、60、70 V 的锥孔电压的条件下,在 10、20、40、50、60 L/h 锥孔反吹气的条件下水苏糖的响应信号和碎裂方法。结果表明,当锥孔电压在 60 V、锥孔反吹气在 10 L/h 时,分子离子的信号达到最大值,当增大或者降低锥孔电压和锥孔反吹气时,其响应信号反而减小。适量调节其他质谱条件,进一步优化。

在本方法的实验条件下,水苏糖在 12.82 min 左右出峰,能够与样品中的其他成分很好的分离,见图 1。图 2 中 m/z 689.25 为水苏糖分子加钠后形成的分子离子 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。

3.2 抗干扰试验 在试样中加入蔗果四糖,按照 1.4 所述的方法进行前处理,采用 1.5 所述色谱条件进行分析。结果见图 3,蔗果四糖的保留时间为 t_R

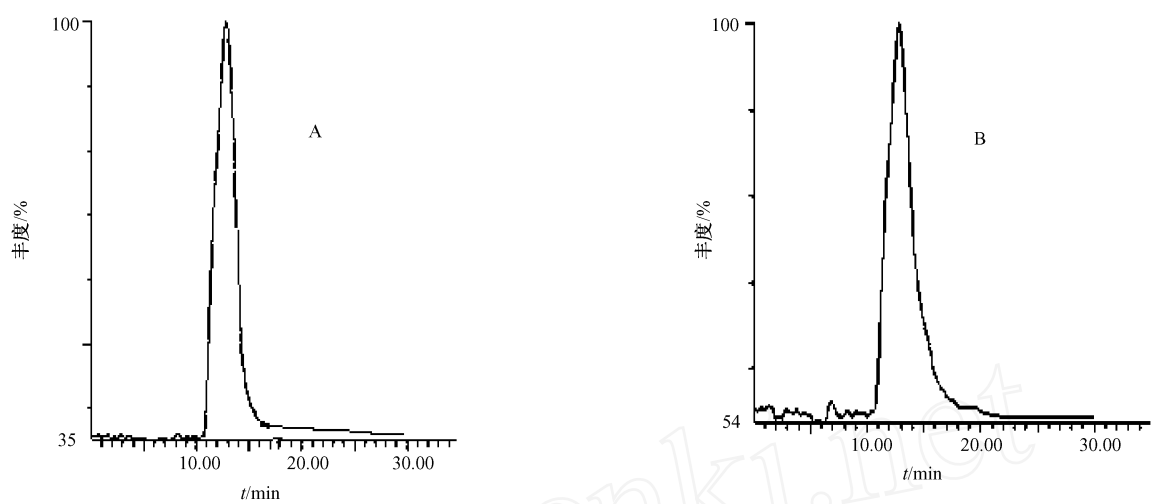


图 1A 水苏糖标准品色谱图 (SIR, m/z 689)

图 1B 2 号口服液试样色谱图 (SIR, m/z 689)

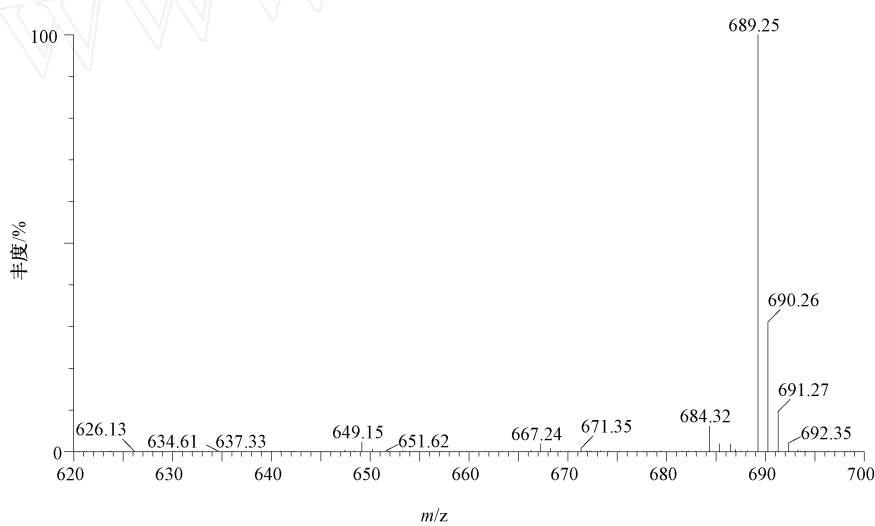


图 2 水苏糖质谱图

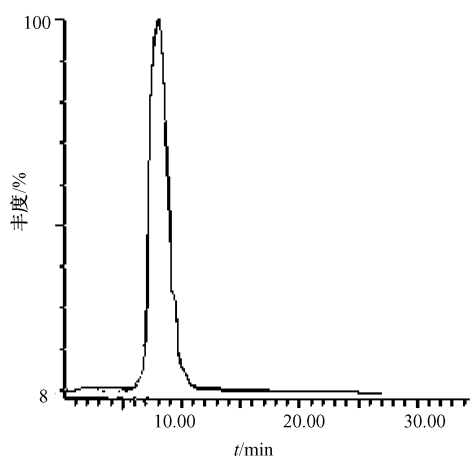


图 3 蔗果四糖 (0.1 mg/ml) 标准品色谱图
(SIR, m/z 689)

= 8.05 min ,而水苏糖的保留时间为 $t_R = 12.82$ min ,
所以蔗果四糖未对检测目标 (水苏糖) 造成干扰。

参考文献

[1] 崔洪斌. 大豆生物活性物质的开发与应用[J]. 中国食物与营养, 2000, (1) :15-17.

[2] 尤新. 功能性低聚糖[J]. 中国食品添加剂, 2002, (2) :40-49.

[3] 夏海涛,刘玉芬,陈红卫. 蒸发光散射检测器 HPLC 法测定大豆低聚糖[J]. 应用化学, 2006, 23 (4) :462-464.

[4] 郝岩平,姜金斗,杨秀茹. HPLC 法测定食品中大豆低聚糖的含量[J]. 中国甜菜糖业, 2003, (1) :8-11.

[5] 朱建华,杨晓泉. 反相液相色谱法同时测定大豆制品中的功能性低聚糖 ——水苏糖和棉籽糖[J]. 粮油加工与食品机械, 2005, (11) :75-76.

[6] 凌秀菊,万端极,吴正奇,等. HPLC 法快速检测大豆乳清中的低聚糖[J]. 湖北工业大学学报, 2005, 20 (6) :45-47.

[收稿日期 :2009 - 03 - 18]