

LC-MS/MS法测定蔬菜中49种氨基酸、B族维生素、黄酮和酚酸

Simultaneous determination of 49 amino acids, B vitamins, flavonoids, and phenolic acids in vegetables by LC-MS/MS

赵刘清¹, 贺泽英², 杨总¹, 刘冰洁¹, 郭立海¹

Zhao Liuqing¹, He Zeying², Yang Zong¹, Liu Bingjie¹, Guo Lihai¹

SCIEX China¹

农业部农产品质量安全环境因素控制重点实验室, 农业农村部环境保护科研监测所, 天津, 中国²

Key Laboratory for Environmental Factors Control of Agro-product Quality Safety, Ministry of Agriculture, Agro-Environmental Protection Institute, Tianjin, PR China²

Key words: Amino acids, B vitamins, Phenolic compounds, UPLC-MS/MS, Vegetable

引言

蔬菜具有显著的营养和健康益处, 并且富含生物活性化合物。其中氨基酸、维生素、类黄酮、酚酸等天然植物活性成分, 具有重要的营养和药用价值和功能, 对人体健康具有保护潜力。除了营养和功能外, 氨基酸, 维生素, 类黄酮和酚酸已被公认为植物代谢组学和食品代谢组学研究的重要生物标志物。鉴于它们的潜在健康益处和作为代谢组学研究中生物标志物的应用, 开发快速可靠的分析方法至关重要。

本文采用SCIEX Triple Quad™ 系统建立了一种基于代谢组学提取法与UPLC-MS/MS相结合的快速方法, 可同时测定蔬菜中游离氨基酸、B族维生素、类黄酮和酚酸的含量, 该方法具有以下特点:

1. 本方法灵敏度高, 蔬菜基质中同位素内标的LODs分别为0.06 ~ 2.5和0.07 ~ 1.7 µg/kg, LOQs分别为0.19 ~ 8.3和0.23 ~ 5.62 µg/kg。对于溶剂中的49种分析物, 有较低的LOQ (0.06-17 µg/kg)。
2. 该方法效率高, 一针进样只需要20 min, 正负切换, 可对蔬菜中49种营养素进行全面测定。

实验方法

混合标准工作液配制

氨基酸和维生素的标准储备溶液用水配制(1000 mg/L), 在

4°C保存直到使用。类黄酮和酚酸的标准储备溶液用甲醇配制(1000 mg/L), 并在 -20°C保存。测定时用含0.2%维生素C的50%甲醇水溶液稀释配制系列浓度标准工作溶液, 现用现配。为避免目标物光降解, 所有标准品都在柔和的灯光下制备, 使用棕色玻璃器皿。

样品前处理

样品在液氮中使用自动管磨机(IKA, 德国)磨成细粉, 称量200 mg粉末装到在1.5 mL离心管中, 然后用冷冻干燥机(Christ Alpha-4, Christ, Osterode, 德国)进行冷冻干燥。在提取前, 加入同位素内标溶液50 µL静置30 min, 然后加入含有0.2%维生素C的50%甲醇水溶液1 mL, 涡旋震荡30 s。然后自动震荡提取10分钟后, 在4°C, 15 000 rpm条件下离心10分钟。最后, 取300 µL的上清液通过聚四氟乙烯微孔滤器(0.22 µm)过滤, 转入样品瓶进行UPLC-MS/MS分析。

仪器设备

液相色谱条件

色谱柱: C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 µm)

流动相: A (pH = 2.98, 25°C)为水, 流动相B为甲醇, 两者均含有0.02%甲酸。

流速: 0.2 mL/min

运行时间: 20分钟

梯度条件：见表1

表1. 液相梯度洗脱程序

Time (min)	A %	B %
0.5	99	1
2.5	92	8
15	50	50
18	5	95
18.1	99	1
20	99	1

质谱条件

采集方式：MRM

扫描模式：详细质谱条件见表2，MRM离子对见表3和表4

表2. 质谱条件

质谱条件	参数
电喷雾电离 (ESI)	正负切换
气帘气CUR (psi)	35
碰撞气CAD (psi)	Medium
喷雾电压IS (V)	5500/-4500
温度TEM (°C)	550
雾化气GS1 (psi)	50
辅助雾化气GS2 (psi)	40
入口电压EP (eV)	10

表3. 用于UPLC-ESI+-MS/MS分析时27种化合物的保留时间(RT)和MRM条件

Q1	Q3	RT (min)	化合物名称	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
90	44	1.27	L-丙氨酸1	50	10	15	10
175.2	70	1.12	L-精氨酸1	80	10	25	10
241	152	1.22	L-半胱氨酸1	60	10	20	10
241	120	1.22	L-半胱氨酸2	50	10	25	10
148.2	84.1	1.32	L-谷氨酸1	50	10	20	10
148.2	102	1.32	L-谷氨酸2	50	10	15	10
156	110	1.09	L-组氨酸1	80	10	20	10

Q1	Q3	RT (min)	化合物名称	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
156	93	1.09	L-组氨酸2	60	10	30	10
132.1	86.1	3.44	L-亮氨酸 异亮氨酸1	80	10	30	10
132.1	86.1	3.65	L-亮氨酸1	60	10	15	10
147.1	84.1	1.06	L-赖氨酸1	15	10	20	10
147.1	130	1.06	L-赖氨酸2	15	10	15	10
150.2	104	2.33	L-蛋氨酸1	50	10	15	10
150.2	133	2.33	L-蛋氨酸2	30	10	15	10
166	120	5.77	L-苯丙氨酸1	60	10	20	10
166	103	5.77	L-苯丙氨酸2	50	10	35	10
116	70	1.47	L-脯氨酸1	60	10	20	10
106	60	1.23	L-丝氨酸1	60	10	15	10
120.1	74.1	1.29	L-苏氨酸1	50	10	15	10
182	136	3.73	L-酪氨酸1	60	10	20	10
182	165	3.73	L-酪氨酸2	40	10	15	10
118.1	72.2	2	L-缬氨酸1	60	10	15	10
153	88	1.32	L-谷氨酸 ¹³ C5 1	30	10	17	13
153	136	2.43	L-蛋氨酸-d3 1	35	10	21	13
173	127	5.81	L-苯丙氨酸 -d7 1	30	10	22	13
173	108	5.81	L-苯丙氨酸 -d7 2	30	10	18	13
265	122	1.52	硫酸素1	30	10	23	12
265	144.2	1.52	硫酸素2	30	10	17	10
377.1	243	11.94	核黄素1	80	10	33	24
377.1	172.2	11.94	核黄素2	80	10	49	18
124	80.1	2.68	烟酸1	70	10	27	13
124	78.1	2.68	烟酸2	70	10	31	13
220.1	90	6.91	泛酸1	26	10	17	32
220.1	202.1	6.91	泛酸2	26	10	15	22
170	134.1	3.59	吡哆醇1	41	10	27	12
170	152.2	3.59	吡哆醇2	41	10	19	20
245	227.1	10.89	生物素1	67	10	20	7
245	97.1	10.89	生物素2	67	10	37	7
678.4	359.1	10.25	氰钴胺素1	51	10	33	32
678.4	147.1	10.25	氰钴胺素2	51	10	65	14
224	94	6.91	泛酸- ¹³ C3 ¹⁵ N 1	30	10	19	15
224	206	6.91	泛酸- ¹³ C3 ¹⁵ N 2	30	10	16	15
173	155	3.57	吡哆醛-d3 1	30	10	21	13
173	136	3.57	吡哆醛-d3 2	30	10	36	13

表4. 用于UPLC-ESI-MS/MS 分析时30种化合物的保留时间(RT)和MRM条件

Q1	Q3	RT (min)	化合物名称	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
289	203	8.72	(-)-儿茶素 1	-60	-10	-29	-10
289	245	8.72	(-)-儿茶素 2	-60	-10	-22	-10
477	314	16.21	3'-O-槲皮素甲基槲皮素 3-半乳糖苷甲基槲皮素 3-半乳糖苷 1	-120	-10	-36	-13
477	243	16.21	3'-O-槲皮素甲基槲皮素 3-半乳糖苷 2	-120	-10	-54	-13
317	161	4.07	熊果苷1	-30	-10	-17	-10
317	108	4.07	熊果苷2	-30	-10	-34	-10
433.1	301	15.67	广寄生甙1	-110	-10	-26	-13
433.1	300	15.67	广寄生甙 2	-110	-10	-33	-13
463	300	14.65	金丝桃苷 1	-120	-10	-39	-13
463	271	14.65	金丝桃苷 2	-120	-10	-55	-13
315	300	18.12	异鼠李素 1	-100	-10	-30	-10
315	151	18.12	异鼠李素 2	-100	-10	-40	-10
477.1	314	16.25	异鼠李素-3-葡萄糖苷 1	-90	-10	-40	-10
477.1	243	16.25	异鼠李素-3-葡萄糖苷 2	-90	-10	-55	-10
623	315	16.35	异鼠李素-3- 芦丁芸香糖甙 1	-140	-10	-42	-13
623	271	16.35	异鼠李素-3- 芦丁芸香糖甙 2	-140	-10	-71	-13
285	239	17.99	山奈酚 1	-100	-10	-40	-10
285	187	17.99	山奈酚 2	-100	-10	-40	-10
593.1	285	16.05	山奈酚-3-o- 芦丁芸香糖甙 1	-120	-10	-45	-10
593.1	284	16.05	山奈酚-3-o- 芦丁芸香糖甙 2	-120	-10	-50	-10
288.9	245	10.67	L-表儿茶素 1	-30	-10	-23	-10
288.9	123	10.67	L-表儿茶素 2	-90	-10	-25	-10
285	133	17.65	木犀草素 1	-90	-10	-45	-10
285	151	17.65	木犀草素 2	-90	-10	-35	-10
435	273	15.27	根皮苷 1	-100	-10	-25	-10
435	167	15.27	根皮苷 2	-100	-10	-40	-10
577	289	8.42	原花青素 b1 1	-90	-10	-35	-10
577	407	8.42	原花青素 b1 2	-80	-10	-35	-10
577.2	289	9.18	原花青素 b2 1	-90	-10	-35	-10

Q1	Q3	RT (min)	化合物名称	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
577.2	407	9.18	原花青素 b2 2	-80	-10	-35	-10
301	151	17.36	槲皮素 1	-90	-10	-30	-10
301	179	17.36	槲皮素 2	-90	-10	-25	-10
433	300	15.1	瑞诺甙 1	-110	-10	-37	-13
433	301	15.1	瑞诺甙 2	-110	-10	-31	-13
609	300	14.75	芦丁 1	-100	-10	-50	-10
609	270.8	14.75	芦丁 2	-100	-10	-70	-10
304	151	17.36	槲皮素-d3 1	-30	-10	-27	-13
304	179	17.36	槲皮素-d3 2	-30	-10	-24	-13
612	303	14.73	芦丁-d3 1	-80	-10	-51	-13
612	274	14.73	芦丁-d3 2	-80	-10	-72	-13
153	109	6.87	3,4-羟基苯甲酸 二羟基苯甲酸 1	-45	-10	-20	-10
153	108	6.87	3,4-羟基苯甲酸 二羟基苯甲酸 2	-45	-10	-35	-10
137	93	8.97	4-羟基苯甲酸 1	-50	-10	-20	-10
137	65	8.97	4-羟基苯甲酸 2	-50	-10	-43	-10
163	119	12.44	4-羟基肉桂酸 1	-50	-10	-15	-10
163	93	12.44	4-羟基肉桂酸 2	-50	-10	-35	-10
179	134	10.36	咖啡酸 1	-40	-10	-35	-10
179	135	10.36	咖啡酸 2	-40	-10	-20	-10
353.1	191	9.47	绿原酸 1	-40	-10	-30	-10
353.1	127	9.47	绿原酸 2	-40	-10	-50	-10
193	134	13.13	阿魏酸 1	-30	-10	-20	-10
193	133	13.13	阿魏酸 2	-30	-10	-40	-10
169	125	4.73	没食子酸 1	-60	-10	-35	-10
169	79	4.73	没食子酸 2	-60	-10	-35	-10
197	123	11.06	丁香酸 1	-30	-10	-29	-13
197	167	11.06	丁香酸 2	-30	-10	-23	-13
167	152	10.28	香草酸 1	-30	-10	-19	-13
167	108	10.28	香草酸 2	-30	-10	-26	-13
196	134	13.11	阿魏酸-d3 1	-30	-10	-23	-13
196	178	13.11	阿魏酸-d3 2	-30	-10	-17	-13

实验结果

条件优化

对方法参数进行了优化，包括色谱柱、流动相、提取溶剂、抗氧化剂添加。对于色谱柱的优化，实验比较了不同品牌、不同填料的色谱柱，主要是从色谱峰峰形、化合物的保留情况等多方面进行评估，最终选择了C18色谱柱，保证了蔬菜中49种营养物质很好的分离和较强的保留效果（如图1）。

对流动相进行了优化，对比了不同甲酸含量和添加甲酸铵的差异，发现添加甲酸对峰形和响应改善明显，添加甲酸铵后部分化合物响应显著降低。最终选择流动相为水和甲醇，分别添加0.02%甲酸。

仪器方法确定后，对样品提取方法进行优化。分别使用四种提取溶剂及其不同配比的组合提取韭菜冻干粉。除槲皮素-d3在乙腈/水(1/1:V/V)中的含量外，同位素内标回收率均在86.33%以上，均在可接受范围内。结果发现，韭菜中L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-酪氨酸和熊果苷的峰面积在不同提取液中重现性较差，其原因是不同提取溶剂上机时峰形差异较大，峰形较差时对影响准确定量。通过对比色谱图可见，在使用甲醇/水(1/1:V/V)时峰形最好。因此，最终选择甲醇/水(1/1:V/V)进行样品提取。

对添加抗氧化剂维生素C及含量进行了优化。结果显示添加维生素C可提高回收率，降低RSD；其中，浓度为0.2%时RSD小于5%。因此，提取过程中使用0.2%维生素C溶液。

基于以上研究，建立了正/负源切换同时测定15种氨基酸、7种B族维生素、18种黄酮和9种酚酸液相色谱串联质谱法方法。所选49种目标物的提取离子色谱图(XIC)如图1所示。

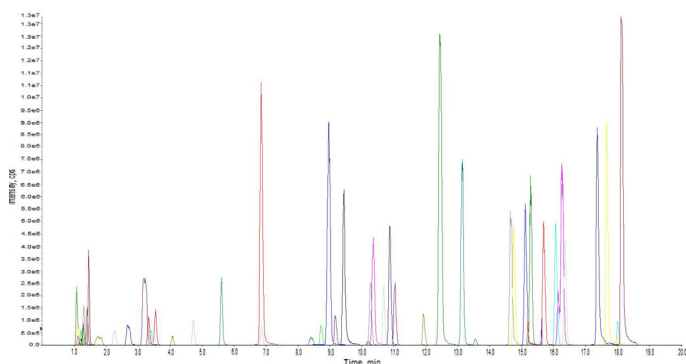


图1. 49种目标物的提取离子色谱图

方法学考察

在以上研究基础上开展方法学考察，使用同位素内标对该方法的回收率、精密度、线性、检出限和定量限进行评价。在4种代表性蔬菜（甘蓝、生菜、西红柿和胡萝卜）中进行了三浓度水平（0.1、1.0和10 mg/kg）的添加回收实验，每个浓度水平6个平行。通过评价所有同位素内标的基质匹配校准曲线，研究了线性同时对基质效应进行评估。通过3倍和10倍信噪比计算LODs和LOQs。方法的精密度通过日内精度和日间精度来评估。除生菜中的阿魏酸-d3、槲皮素-d3和芦丁-d3外，其余化合物的回收率均在65.05%~105.27%之间，大部分回收率在75%以上，RSD<20%，表明该方法具有较好的准确度。对于某些化合物，回收率依赖于基质。4种基质中L-蛋氨酸-d3、L-苯丙氨酸-d7、泛酸-¹³C¹⁵N和吡哆醇-d3在3个加标水平上的回收率均在75%以上。L-谷氨酸-13C5在胡萝卜中的回收率在68.71%~78.22之间，低于其他基质。阿魏酸-d3、槲皮素-d3、芦丁-d3在甘蓝、番茄、胡萝卜中的回收率为66.56%~97.89%，均在可接受范围内。

采用溶剂和空白甘蓝、生菜基质配置标准品进行线性评价，线性范围为0.001~10 mg/kg。在溶剂和两种蔬菜基质中，同位素内标和化合物的校正曲线的相关系数均高于0.993。蔬菜基质中同位素内标的LODs分别为0.06~2.5和0.07~1.7 μg/kg，LOQs分别为0.19~8.3和0.23~5.62 μg/kg。对于溶剂中的49种分析物，有较低的LOQ(0.06-17 μg/kg)，表明该方法具有较高的灵敏度。日内精密度(n=5)和日间精密度(n=3)分别为0.64~9.37%和0.61~13.91%。

实际样品测定

应用所建立的方法，测定并比较了26种蔬菜中氨基酸、B族维生素、类黄酮和酚酸的含量，结果如图2所示，不同类别蔬菜中各种营养素和功能成分的含量差异很大。26种蔬菜中游离氨基酸的总含量从99.98 mg/kg FW到977.17 mg/kg FW不等。在研究的蔬菜中，主要氨基酸是L-谷氨酸（占油菜中游离氨基酸总含量的43.8%）和L-缬氨酸（占芹菜中游离氨基酸总含量的24.2%）。在菠菜的氨基酸组成中，谷氨酸的比例高达12%。在紫甘蓝和西兰花中发现的必需氨基酸的含量高于其他蔬菜。紫甘蓝游离必需和非必需氨基酸含量最高，分别为466.85和510.32 mg/kg FW，而胡萝卜含量最低，分别为44.08和55.90 mg/kg FW。

西兰花中游离维生素总量最高（10294.1 μg/kg FW），其次是香菜（9667.2 μg/kg FW），是茼蒿中含量（946.5 μg/kg FW）的10.8倍和10.2倍。番茄中游离核黄素含量在26种蔬菜中最低，而番

茄中吡哆醇的含量最高，为 $633.5 \pm 23.1 \mu\text{g}/\text{kg FW}$ ，是胡萝卜的77倍。在三种菊科蔬菜中未检测到烟酸，在小白菜中检测到的浓度（ $376.7 \pm 5.0 \mu\text{g}/\text{kg FW}$ ）高于其他蔬菜。在菠菜中检测到的泛酸含量为 $461.1 \pm 32.4 \mu\text{g}/\text{kg FW}$ 。与大多数其他水溶性维生素相比，蔬菜中生物素的含量较低。菠菜中生物素的含量为 $6.2 \pm 1.5 \mu\text{g}/\text{kg FW}$ ，但花椰菜和西兰花中的浓度大于报告值。在所有测定的蔬菜中均未发现氰钴胺素。

在该方法中的27种酚类物质中，两种羟基苯甲酸，没食子酸和丁香酸均未检出。对于其余的酚类化合物，在豇豆中检测到21种，但在黄瓜，油菜和白萝卜中仅检测到8种。木犀草素和槲皮素是菊科蔬菜中的主要黄酮醇。香菜、红苋、豇豆中游离黄酮类糖苷的总含量较高，芦丁占比最高（58.7~76.6%）。在这项研究中，不仅在菊科蔬菜和西兰花中检测到游离熊果苷，而且红苋菜中也检测到游离熊果苷，浓度高达 $2693.8 \pm 95.5 \mu\text{g}/\text{kg FW}$ ，这在以前的研究中没有报道过。L-表儿茶素，(-)-儿茶素，原花青素b1和原花青素b2仅在豇豆中同时检测到。在3种羟基苯甲酸中，在菊科蔬菜中检测到3,4-二羟基苯甲酸和香草酸，但没有检测到4-羟基苯甲酸。然而，在伞科和其他几种蔬菜中检测到4-羟基苯甲酸，除了芹菜。在香菜中发现咖啡酸，4-羟基肉桂酸和阿魏酸总浓度高达 $851.1 \mu\text{g}/\text{kg FW}$ 。绿原酸在菊科和伞科蔬菜中占主导地位。绿原酸及其结构相关衍生物是香菜中重要的酚类成分。在26种蔬菜中，红苋苜、茴香和香菜的游离绿原酸含量最高，分别为 $284.25 \pm 13.54 \text{ mg}/\text{kg FW}$ 、 $68.19 \pm 12.95 \text{ mg}/\text{kg FW}$ 、 $63.55 \pm 1.34 \text{ mg}/\text{kg FW}$ 。

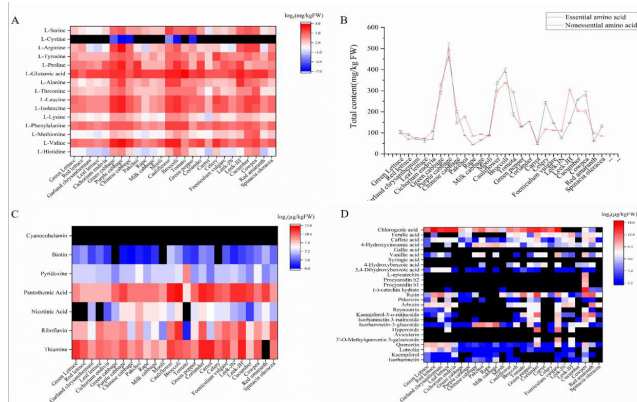


图2. 26种蔬菜中49种目标物的浓度[log₂ (mg/kg FW)]。(黑色表示未检测到或低于LOQ)。

小结

本文建立了液相色谱串联质谱同时测定蔬菜中49种游离氨基酸、维生素、类黄酮和酚酸。为该方法详细优化了液相和质谱条件，具有灵敏度高等特点。用8个同位素内标从回收率、线性、基质效应、精密度和灵敏度等方面对方法进行验证。4种蔬菜基质的回收率在65.0% ~ 105.3%之间，RSD > 20%。LOQ较低，为0.06 ~ 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，线性相关系数 $R^2 > 0.993$ 。该方法已成功应用于26种蔬菜中49种化合物的准确定量。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14373-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)