

超高效液相色谱 - 三重四极杆串联质谱法同时 测定植物油中 4 种维生素 E 异构体

李彩玲¹, 张 见^{1,2}, 刘元法^{1,3}, 王晓超¹, 梅东旭¹

(1. 白马未来食品研究院, 南京 210000; 2. 南京福喆未来食品研究院有限公司, 南京 210000;

3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:为提高植物油中 4 种维生素 E 异构体(α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚)的检测效率,建立一种超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定植物油中 4 种维生素 E 异构体含量的方法。分别对质谱条件、色谱条件及样品前处理条件进行了优化,并对检测方法进行了考察。结果表明:0.5 g 样品经 10 mL 甲醇提取,35 mg C18 粉末净化后,采用 Kintex F5 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m)分离,以 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸-甲醇溶液为流动相梯度洗脱,流速 0.4 mL/min,电喷雾离子源在正离子模式下进行多反应监测扫描,采用外标法对 4 种维生素 E 异构体进行定量;在该条件下,4 种维生素 E 异构体在 1~100 ng/mL 质量浓度范围内线性关系良好,相关系数(R^2)均在 0.998 以上,检出限均为 6 ng/g,定量限均为 20 ng/g,加标回收率范围为 92.0%~108.0%,相对标准偏差为 0.7%~7.1%,与国标方法测定结果相对误差在 -4.3%~5.1%。该方法准确、灵敏、重现性好,可应用于实际样品的分析。

关键词:维生素 E;植物油;超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱

中图分类号:O657.7+2;TS227 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)01-0061-05

Simultaneous determination of four vitamin E isomers in vegetable oil by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry

LI Cailing¹, ZHANG Jian^{1,2}, LIU Yuanfa^{1,3}, WANG Xiaochao¹, MEI Dongxu¹

(1. Future Food (Bai Ma) Research Institute, Nanjing 210000, China; 2. Nanjing Fuzhe Future Food Research Institute Co., Ltd., Nanjing 210000, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: To improve the detection efficiency of four vitamin E isomers (α -, β -, γ -, δ -tocopherol) in vegetable oil, a method for simultaneous determination of the content of four vitamin E isomers (α -, β -, γ -, δ -tocopherol) in vegetable oil by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established. The conditions of mass spectrometry, chromatography, and sample pretreatment were optimized, and the method established was examined. The results showed that the sample (0.5 g) was extracted with methanol (10 mL), purified with C18 powder (35 mg), separated with Kintex F5 chromatographic

column (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m), eluted with 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid-methanol solution as mobile phase by gradient under the speed of 0.4 mL/min, detected under positive ion mode of electric spray (ESI) and multi reaction monitoring mode (MRM), and quantified by external standard

收稿日期:2023-07-07;修回日期:2024-07-30

基金项目:未来食品技术创新中心建设项目资金(BM2020023)

作者简介:李彩玲(1991),女,助理工程师,主要从事食品检测工作(E-mail)2446581610@qq.com。

通信作者:刘元法,教授,博士生导师(E-mail)liuyf@ffri-bm.cn。

method. Under these conditions, there were a good linear relationships for four vitamin E isomers in the mass concentration range of 1 – 100 ng/mL, with correlation coefficients (R^2) above 0.998, detection limits of 6 ng/g, and quantification limits of 20 ng/g. The recovery rate ranged from 92.0% to 108.0%, the relative standard deviation was 0.7% – 7.1%, and the relative error of the determination results with national standard method was –4.3% – 5.1%. This method has the advantages of accuracy, sensitivity, and good reproducibility, and it can be applied to the analysis of actual samples.

Key words: vitamin E; vegetable oil; UPLC – MS/MS

维生素 E 是一种脂溶性维生素,主要以 α -、 β -、 γ -、 δ - 生育酚和 α -、 β -、 γ -、 δ - 生育三烯酚形式存在,是人体重要且必需的维生素之一。维生素 E 能阻止脂肪的过度氧化,保护细胞膜不受氧化破坏,从而维持骨骼肌、心肌、平滑肌和心血管系统的正常功能,此外,维生素 E 可维持正常的新陈代谢,增强机体免疫力,提高血液中氧的利用率和肌肉持久力,具有抗氧化、降血压、抗癌、抗衰老、抗不育等功效^[1]。不同形式维生素 E 的生物活性及作用效果不同^[2],因此有必要准确测定各种异构体的含量。

植物油中富含天然维生素 E,是膳食中维生素 E 的主要来源。目前测定维生素 E 的前处理方法主要有皂化法、溶剂提取法、固相萃取法等^[3-8],其中溶剂提取法耗时短、操作便捷,但是净化不完全容易损坏色谱柱^[9-10],而 C18 粉末则可以净化溶剂中的脂类物质。维生素 E 的分离方法主要有气相色谱法、气相色谱-质谱法、高效液相色谱法和液相色谱-质谱法等^[11-17],其中:气相色谱法和气相色谱-质谱法的柱效和灵敏度较高,分析速度较快,但在分离检测维生素 E 时大多需要衍生化,过程较烦琐,而且衍生化过程也可能引入其他干扰;液相色谱法是测定植物油中维生素 E 最普遍的方法,其中正相液相色谱法需要消耗较多的有机试剂,环境不友好,且稳定性有待提高,反相液相色谱法虽更加稳定,色谱柱的寿命更长,但是分析时间较长。超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)选择性与灵敏度比液相色谱法高,且分析时间短^[18],但未见其应用于测定植物油中维生素 E 异构体。因此,本文以核桃油为例,采用溶剂提取法加 C18 粉末对样品进行前处理净化后,采用 UPLC-MS/MS 同时测定维生素 E 的 4 种异构体(α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚)的含量,以期为植物油中维生素 E 异构体的快速、准确测定提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

α -、 β -、 γ -、 δ - 生育酚标准品,色谱级乙腈,色谱级甲醇,色谱级乙醇,色谱级甲酸,C18 粉末(粒

径 40 ~ 60 μm),上海安谱实验科技股份有限公司。一级压榨核桃油,江西天成油脂有限公司。

SCIEXAB 5500 + 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪,美国 SCIEX 公司;BSA224S 电子天平;DMT-2500 多管旋转振荡器;KH-800DE 超声波清洗器;X4R Pro 高速冷冻离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

分别称取 10 mg α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚标准品于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙醇溶解并定容,配制成 1.0 mg/mL 的标准溶液,–18 °C 避光保存。在使用前按照 GB 5009.82—2016 附录 B 进行浓度校正。

1.2.2 样品前处理

称取 0.5 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 甲醇涡旋 15 min,超声 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,取 1 mL 上清液加入 35 mg C18 粉末,涡旋 1 min,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜待测(根据待测样品浓度,用甲醇稀释 2 ~ 100 倍上机)。

1.2.3 UPLC-MS/MS 检测条件

色谱条件:Kintex F5 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm,1.7 μm);柱温 40 °C;进样量 5 μL ;流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为 0.1% 甲酸-甲醇溶液,流速 0.4 mL/min,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	A/%	B/%
0	90	10
1.0	90	10
1.5	10	90
5.0	10	90
5.1	90	10
7.0	90	10

质谱条件:多反应监测模式(MRM);电喷雾离子源(ESI),正离子模式;离子源温度 550 °C,气帘气(CUR)压力 241.31 kPa,碰撞气(CAD)压力 55.16 kPa,离子化电压(IS)5 500 V,喷雾气(GS1)压力

379.21 kPa,辅助加热气(GS2)压力 379.21 kPa。

2 结果与分析

2.1 测定条件的优化

2.1.1 质谱条件的优化

在MRM、ESI正离子模式下,采用自动调谐优

化和手动调谐优化相结合的方式,优化去簇电压(DP)和碰撞能量(CE),选定对质谱响应强、无干扰的两个离子对分别作为定量离子和定性离子,优化后的质谱参数见表2。

表2 目标化合物质谱参数

Table 2 Mass spectral parameters of target compounds

目标化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	DP/V	CE/eV	目标化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	DP/V	CE/eV
α -生育酚	431.7	165.3*,137.3	78	35	γ -生育酚	417.7	151.3,95.3	80	32
			62	78				58	80
β -生育酚	417.7	151.3*,57.2	80	32	δ -生育酚	403.7	137.3*,109.2	85	25
			80	40				85	60

注: *为定量离子

Note: *. Quantitative ions

2.1.2 色谱条件的优化

首先对比了Kintex EVO C18色谱柱和Kintex F5色谱柱,前者不能分离 β -生育酚和 γ -生育酚,后者获得了更好的分离效果和响应。随后选择了0.1%甲酸水溶液(A相)与0.1%甲酸-甲醇溶液(B相)作为流动相,分别进行等度洗脱(A相与B相体积比分别为90:10、88:12)和梯度洗脱(洗脱条件见表1),结果发现梯度洗脱时分离度和响应度更好。

对流速优化实验发现,在流速0.3~0.5 mL/min范围内,流速越大,响应越高,出峰时间越靠前,但是系统压力明显增加,且分离度变小。综合考虑,最终选择Kintex F5色谱柱、0.1%甲酸水溶液与0.1%甲酸-甲醇溶液梯度洗脱、流速0.4 mL/min。在优化条件下,4种生育酚的定量离子选择离子流图见图1。

由图1可知,经质谱和色谱条件优化后,4种生育酚的峰形尖锐,分离度较好。

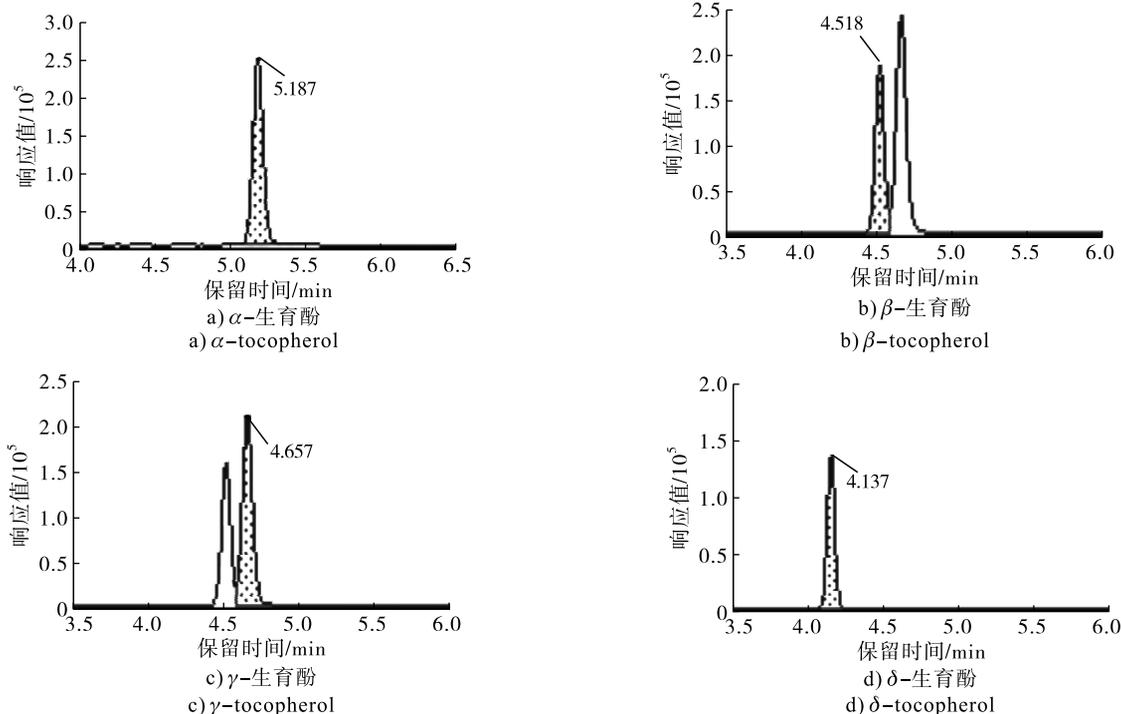


图1 4种生育酚的定量离子选择离子流图

Fig.1 Quantitative ion selected ion current diagrams of four tocopherols

2.1.3 前处理条件的优化

按1.2.2采用甲醇直接提取核桃油样中的4种生育酚,不同体积(5、8、10、12、15 mL)的甲醇对4

种生育酚的提取效果见表3。

由表3可知,甲醇用量越大,生育酚含量越高,但是超过10 mL时,生育酚含量增幅不大,所以最终

选择用 10 mL 甲醇进行提取。

表 3 不同体积甲醇对 4 种生育酚的提取效果

Table 3 Extraction effect of different volumes of methanol on four tocopherols

化合物	含量/(mg/100 g)				
	5 mL	8 mL	10 mL	12 mL	15 mL
α -生育酚	3.28	3.69	4.09	4.17	4.21
β -生育酚	0.18	0.20	0.22	0.23	0.23
γ -生育酚	7.10	7.94	8.74	8.91	9.00
δ -生育酚	0.91	1.02	1.13	1.15	1.16

样品经 10 mL 甲醇提取后,采用 C18 粉末进行净化,不同用量(30、35、40、45、50 mg)的 C18 粉末净化后样品中 4 种生育酚的含量见表 4。

表 4 不同用量 C18 粉末对 4 种生育酚含量的影响

Table 4 Effect of different dosage of C18 powder on four tocopherols content

化合物	含量/(mg/100 g)				
	30 mg	35 mg	40 mg	45 mg	50 mg
α -生育酚	4.13	4.09	3.85	3.64	3.41
β -生育酚	0.23	0.22	0.22	0.21	0.20
γ -生育酚	8.83	8.74	8.54	8.33	8.13
δ -生育酚	1.15	1.13	1.07	1.01	0.92

表 5 4 种生育酚的线性回归方程、相关系数、检出限及定量限

Table 5 Linear regression equation, correlation coefficient, limit of detection and limit of quantification of the four tocopherols

化合物	线性回归方程	R^2	检出限/(ng/g)	定量限/(ng/g)
α -生育酚	$y = 61\ 500x - 40\ 300$	0.998 3	6	20
β -生育酚	$y = 37\ 600x - 5\ 143$	0.999 4	6	20
γ -生育酚	$y = 54\ 200x - 15\ 664$	0.998 0	6	20
δ -生育酚	$y = 24\ 239x - 3\ 876$	0.998 0	6	20

2.2.2 加标回收率和精密度

取核桃油作本底,加入低、中、高 3 个水平的标准溶液,按照本文的方法测定 4 种生育酚的含量,每个水平重复 6 次,计算其加标回收率,结果见表 6。

表 6 加标回收实验结果($n=6$)

Table 6 Results of spiked recovery experiments ($n=6$)

化合物	本底值/(mg/100 g)	加标量/(mg/100 g)	加标实测值/(mg/100 g)	回收率/%
α -生育酚	4.09	0.50	4.55	92.0
		2.00	6.17	104.0
		5.00	9.16	101.4
β -生育酚	0.22	0.50	0.76	108.0
		2.00	2.29	103.5
		5.00	5.17	99.0

实验中观察到,经 C18 粉末净化后的提取液,45 °C 氮气吹干后,残余油脂的量随着 C18 粉末用量的增加而减少,表明 C18 粉末用量越多净化效果越好。由表 4 可知,随着 C18 粉末用量的增加,生育酚含量随之降低,超过 35 mg 时生育酚含量降低程度明显加大,所以最终确定 C18 粉末用量为 35 mg。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围和检出限

用甲醇配制 1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 系列质量浓度的各生育酚混合标准溶液,在优化的测定条件下进行测定,以混合标准溶液中 4 种生育酚的质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,绘制工作曲线。以定性离子 3 倍信噪比和 10 倍信噪比分别确定各生育酚的检出限和定量限。4 种生育酚的线性回归方程、相关系数(R^2)、检出限和定量限见表 5。

由表 5 可知,在 1 ~ 100 ng/mL 质量浓度范围内,4 种生育酚的质量浓度与峰面积的线性关系良好,相关系数(R^2)均大于 0.998,方法检出限均为 6 ng/g,定量限均为 20 ng/g。

续表 6

化合物	本底值/(mg/100 g)	加标量/(mg/100 g)	加标实测值/(mg/100 g)	回收率/%
γ -生育酚	8.74	0.50	9.21	94.0
		2.00	10.84	105.0
		5.00	13.81	101.4
δ -生育酚	1.13	0.50	1.59	92.0
		2.00	3.27	107.0
		5.00	6.15	100.4

由表 6 可知,4 种维生素 E 异构体的加标回收率为 92.0% ~ 108.0%,表明该方法具有良好的准确度。

使用同一核桃油进行 6 次重复实验,计算相对标准偏差(RSD),考察方法的精密度,结果见表 7。

由表 7 可知,4 种维生素 E 异构体的 RSD 均不大于 7.1%,说明该方法具有良好的精密度。

表 7 方法的精密度 ($n=6$)
Table 7 Precision of methods ($n=6$)

化合物	含量 (mg/100 g)						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
α -生育酚	4.05	4.06	4.12	4.09	4.10	4.11	0.7
β -生育酚	0.23	0.22	0.22	0.24	0.21	0.22	4.6
γ -生育酚	9.25	8.51	8.77	8.90	8.67	8.35	3.6
δ -生育酚	1.22	1.12	1.17	1.02	1.04	1.18	7.1

2.2.3 与国标方法的比较

使用同一核桃油,按照 GB 5009.82—2016 第二法进行测定,并与本方法的测定结果进行比较,结果见表 8。

表 8 本方法与国标方法测定结果的比较

Table 8 Comparison of the results of this method with the national standard method

化合物	本方法/ (mg/100 g)	国标方法/ (mg/100 g)	相对误差/%
α -生育酚	4.09	3.89	5.1
β -生育酚	0.22	0.23	-4.3
γ -生育酚	8.74	8.91	-1.9
δ -生育酚	1.13	1.18	-4.2

由表 8 可知,本方法测定结果与 GB 5009.82—2016 第二法测定结果相对误差为 $-4.3\% \sim 5.1\%$,表明本方法测定结果可靠。

3 结论

本研究建立了一种同时测定植物油中 4 种维生素 E 异构体 (α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚) 的 UPLC-MS/MS, 0.5 g 样品经 10 mL 甲醇提取, 35 mg C18 粉末净化, 以 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸-甲醇溶液作为流动相进行梯度洗脱, Kintex F5 作为色谱柱, 流速为 0.4 mL/min, 在 ESI 正离子模式下, 进行 MRM 扫描, 采用外标法定量。结果表明: 所测维生素 E 异构体 (α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚) 在 1~100 ng/mL 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数 (R^2) 均在 0.998 以上, 检出限均为 6 ng/g, 定量限均为 20 ng/g; 低、中、高水平加标时回收率为 92.0%~108.0%, RSD 为 0.7%~7.1%, 具有较好的准确度和精密度。该方法前处理简便安全, 测定灵敏、准确、重现性好, 具有线性范围宽, 定量限低等优点, 能满足植物油中 4 种维生素 E 异构体含量的检测要求。

参考文献:

[1] 王月, 王晶, 郭思瑞, 等. 天然维生素 E 化合物研究进展[J]. 中国药业, 2023, 32(2): 128-135.
[2] 黄筱声. 天然维生素 E 与人体健康[J]. 中国油脂, 2003, 28(1): 39-40.
[3] 于瑞祥, 张欣, 张秀芹, 等. 反相高效液相色谱法同时测定植物油中四种生育酚[J]. 分析测试学报, 2013, 32(6): 764-767.
[4] 谢云峰, 王浩, 刘佟, 等. 在线固相萃取-高效液相色谱联用测定动物源食品中的维生素 A、E[J]. 分析化学, 2014, 42(9): 1343-1347.
[5] KNECHT K, SANDFUCHS K, KULLING S E, et al.

Tocopherol and tocotrienol analysis in raw and cooked vegetables: A validated method with emphasis on sample preparation[J]. Food Chem, 2015, 169: 20-27.

[6] 李君绩, 汪国权, 戴承兵, 等. 婴幼儿配方食品和成人营养品中脂溶性维生素 A 和维生素 E 标准测定方法的比较[J]. 理化检验: 化学分册, 2017, 53(8): 898-904.
[7] 武利梅, 吴丽华, 赵晶晶, 等. 反相高效液相色谱法同时测定植物油中 8 种维生素 E 异构体[J]. 中国油脂, 2022, 47(10): 124-129.
[8] 赵孔祥, 姜婷婷, 何佳, 等. 同位素稀释/液相色谱-串联质谱测定婴幼儿配方奶粉中脂溶性维生素[J]. 分析测试学报, 2015, 34(12): 1372-1376.
[9] 陈燕舞, 吴佳文. 高效液相色谱法测定植物油中维生素 E 的样品前处理方法比较[J]. 理化检验: 化学分册, 2016, 52(8): 928-931.
[10] 曹江平, 解启龙, 邸宏伟, 等. 天然维生素 E 分析的样品前处理方法研究新进展[J]. 分析测试学报, 2018, 37(2): 257-262.
[11] AOUN E, RIMA J, CHIDIAC G, et al. High-performance liquid chromatographic and spectrofluorometric determination of α -tocopherol in a natural plant: *Ferula hermonis* (Zalooch root)[J]. J Food Compos Anal, 2005, 18(7): 607-615.
[12] 陈曦, 宫照龙, 沈旻. 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定血清中维生素 A 和维生素 E[J]. 卫生研究, 2021, 50(2): 301-307.
[13] DEMIRKAYA F, KADIOGLU Y. Simple GC-FID method development and validation for determination of α -tocopherol (vitamin E) in human plasma[J]. J Biochem Biophys Meth, 2007, 70(3): 363-368.
[14] 杜杰, 林春兰, 郑绣蓓, 等. 高效液相色谱法同时测定食用油中维生素 A 和维生素 E 的方法[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(10): 258-263.
[15] 徐向华, 张欣, 于瑞祥, 等. 高效液相色谱法同时测定植物油中角鲨烯、生育酚和甾醇烯[J]. 食品科学, 2015, 36(16): 141-147.
[16] 王琴, 王建友, 刘凤兰, 等. 黑果枸杞油中脂肪酸、植物甾醇的组成及维生素 A、维生素 E 的分析[J]. 中国油脂, 2017, 42(4): 145-147.
[17] 黄旭, 刘家阳. 固相萃取-高效液相色谱法测定婴幼儿配方粉中维生素 A 和维生素 E 的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 38-42.
[18] 郑熠斌, 黄百芬, 许娇娇, 等. 食品中维生素 E 异构体的检测技术研究进展[J]. 理化检验: 化学分册, 2016, 52(9): 1080-1084.