

海带等 4 种大型海藻中甜菜碱液质分析研究

赵鹏, 徐继林, 刘雪梅, 陈娟娟, 王秀娟, 陈海敏, 严小军* (宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 目的 利用高效液相色谱-三重四极杆质谱和四极杆-飞行时间质谱建立了大型海藻中甜菜碱的分析方法。方法 海藻用甲醇-氯仿-0.2 mol·L⁻¹碳酸氢钾水溶液(12:5:1)提取, 经过 MCX 柱固相微萃取后上机分析。标准甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱在 SCX 强阳离子交换色谱柱实现分离; 利用高效液相色谱-三重四极杆质谱系统, 在电喷雾电离源正离子模式下, 分别取 *m/z* 58.34 和 92.18 作为甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱的定量目标离子进行检测。结果 甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱的检测限分别为 0.12 和 0.06 μg·L⁻¹, 回收率分别为 83.76% 和 95.54%, 相对标准偏差均小于 6%; 另外, 借助液相色谱-四极杆-飞行时间质谱系统, 对海藻中除标准品外几种可能的甜菜碱进行了结构确认, 并对海带(*Laminaria japonica*)、长石莼(*Ulva lactuca* L)、蜈蚣藻(*Grateloupia filicina*) 和紫菜(*Porphyra tenera* Kjellm) 中的甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱进行了精确定量分析, 对没有标准品的几种甜菜碱进行了半定量分析。该方法测定各种甜菜碱在 4 种大型海藻中的含量在未检出 ~1 015.3 ng·g⁻¹ 内。结论 所建方法灵敏、精密、准确, 可用于大型海藻中甜菜碱定性定量的研究。

关键词: 大型海藻; 甜菜碱; 高效液相色谱仪; 三重四极杆质谱; 四极杆-飞行时间质谱

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)24-1886-04

Determination of Betaines in Four Marine Algae by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

ZHAO Peng, XU Ji-lin, LIU Xue-mei, CHEN Juan-juan, WANG Xiu-juan, CHEN Hai-min, YAN Xiao-jun* [Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology (Ningbo University), Ministry of Education, Ningbo 315211, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate a qualitative and quantitative analysis method of four kinds of macrophytes *i. e.* *Laminaria japonica*, *Ulva lactuca* L., *Grateloupiafilicina* and *Porphyra tenera* Kjellm by high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (HPLC/QqQ-MS) and high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS). **METHODS** The mass spectrometry was performed in positive mode, using precursor ions at *m/z* 58.34 and 92.18 as quantitative ions for Glycine betaine and Trigonelline, respectively. Glycine betaine and Trigonelline were separated with high efficiency in the Selective Reaction Monitoring (SRM) mode on CNWSIL SCX column. **RESULTS** The detection limit of glycine betaine and trigonelline were 0.12 and 0.06 μg·L⁻¹, respectively. The recoveries were 83.76% and 95.54% with the relative standard deviations (RSDs) less than 6% (*n* = 3). In addition, the proposed fragmentation pathways of the suspected betaines were explained using Q-TOF Premier MS. The method confirmed that the suspected betaines definitely existed in the samples, and they were semi-quantitatively analyzed. The concentrations of betaines in the four kinds of Macrophytes were from under detection limit to 1 015.3 ng·g⁻¹. **CONCLUSION** This method is sensitive, specific and rapid. Therefore, it can be used for qualitative and quantitative analysis of betaines in Macrophytes.

KEY WORDS: Macrophyte; betaines; high performance liquid chromatography; triple quadrupole mass spectrometry; quadrupole-time of flight mass spectrometry

甜菜碱, 属季铵类生物碱, 它广泛存在于高等植物和海洋藻类之中^[1-3], 其在藻类体内大量累积对于藻类抵抗外界环境的不良影响起着重要的作用^[3-5]。另外甜菜碱由于其结构特性在医疗、农业、食品、日化等领域都有着广泛的应用^[1, 3-4]。

由于甜菜碱有永久阳离子基团, 因此质谱法是较理想的检测手段^[6-7]。本实验分别利用高效液相色谱串联三重四极杆质谱(HPLC-QQQ-MS)在定量方面的高灵敏度、宽线性范围的特点对大型海藻中的甜菜碱进行定量或半定量分析, 利用四极杆-飞行

时间质谱(Q-TOF MS)的高质量精度对海藻中无标准品的甜菜碱进行定性工作, 为海洋大型藻类中甜菜碱更为深入的研究提供了有效的分析方法。

1 仪器与试剂

TSQ Quantum Access 液相色谱-三重四极杆质谱联用分析系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Q-TOF Premier 四极杆与飞行时间串联质谱仪(美国 Waters 公司); 超纯水系统(法国 Millipore 公司)。甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱标准品(纯度 >

作者简介: 赵鹏, 男, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物化学; * 通讯作者: 严小军, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 海洋生物化学
Tel: (0574) 87609570 E-mail: yanxiaojun@nbu.edu.cn

98% 美国 Sigma-Aldrich 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司) 纯水由超纯水系统制备; CNWSIL SCX 强阳离子交换色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm) (德国 CNW 公司); Sep-Pak C18 固相萃取小柱(3 cc 60 mg) (美国 Waters 公司), Oasis MCX 固相萃取小柱(3 cc 60 mg) (美国 Waters 公司)。其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

色谱条件: 使用 CNWSIL SCX 强阳离子交换色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm), 进样量 10 μL, 柱温 25 °C, 流动相为 10 mmol · L⁻¹ 甲酸铵水溶液(A) 和纯乙腈(B), 流速 0.2 mL · min⁻¹, A-B = 50:50 等度洗脱 50 min。

质谱条件: QQQ MS 条件: 采用电喷雾电离源正离子电离模式, 喷雾电压 3 000 V, 鞘气压力 207 kPa; 辅助气流量 2, 离子传输毛细管温度 350 °C, Q2 碰撞室碰撞诱导解离电压 1.5 V, 采用选择反应监测(SRM) 扫描模式, 标准品选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 1。碰撞气采用氦气, 碰撞气压力 200 mPa。

Q-TOF MS 条件: 采用电喷雾电离源, 正离子电离模式, 毛细管电离电压 3 kV, 锥孔电压 20 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂温度 200 °C, 脱溶剂氮气流速 400 L · h⁻¹, 锥孔反吹氮气 0, 四极杆扫描范围 m/z 100 ~ 1 000, TOF 离子飞行方式采用 V 模式。碰撞室能量根据分析目标的不同采用 5 ~ 35 V 不等, 使用亮脑啡肽(m/z 556.277 1) 作为外标物对目标离子进行精确质量锁定。

2.2 标准溶液的配制

准确称取 5.0 mg 甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱标准品, 甲醇溶解定容到 1.0 mL, 充分摇匀, 配制成 5 g · L⁻¹ 标准储备液, 置 4 °C 冰箱中保存, 制作工作曲线时再取此储备液用 100% 甲醇配制成不同浓度的标准溶液。

2.3 样品处理

分别取海带(*Laminaria japonica*)、长石莼(*Ulva lactuca* L)、蜈蚣藻(*Grateloupia filicina*) 和紫菜(*Porphyra tenera* Kjellm) 各 0.2 g, 液氮冰浴研磨后, 甲醇-氯仿 0.2 mol · L⁻¹ 碳酸氢钾水溶液(12:5:1, V/V/V) 3 mL 超声提取 20 min, 12 000 r · min⁻¹ 高速离心 15 min 后收集上清液。残渣中加入 3 mL 甲醇-水(1:1) 再次提取, 合并上清液, 用 1 mol · L⁻¹ 盐酸调节提取液 pH 小于 3, 过 MCX 固相微萃取柱, 用 5 mL 5% 氨水甲醇溶液洗脱, 洗脱液旋转蒸发后, 用 1 mL 甲醇-水(1:1) 复溶后上机分析。

2.4 质谱离子化条件的选择和色谱分离

用 1 μg · mL⁻¹ 的甘氨酸甜菜碱、葫芦巴碱的标准溶液, 以流动注射方式进行 ESI 源质谱分析。正离子模式下, 甘氨酸甜菜碱主要产生 [M + H]⁺ (m/z 118.1)、[M + NH₄]⁺ (m/z 135.3) [M + Na]⁺ (m/z 140.1) 准分子离子, 葫芦巴碱主要产生 [M + H]⁺ (m/z 138.0)、[M + NH₄]⁺ (m/z 155.3)。而在负离子模式下, 则无法得到对应的准分子离子峰。因此选择正离子模式作为甜菜碱液质采集模式, 甘氨酸甜菜碱、葫芦巴碱均以 [M + H]⁺ 准分子离子峰信号最强, 与文献^[6] 报道一致, 故选择各目标化合物的 [M + H]⁺ 作为选择检测模式下的母离子。对其进行二级质谱扫描, 甘氨酸甜菜碱主要产生碎片离子 m/z 58.34 和 59.34, 葫芦巴碱主要产生碎片离子 m/z 92.17、94.18 和 78.22 分别选取信号最强的碎片离子 m/z 58.34 和 92.17 作为各标准品的定量离子, 分别选取丰度次强的子离子作为辅助定性离子, 最后以选择反应监测(SRM) 正离子模式优化锥孔电压(tube lens offset)、碰撞能量(collision energy) 等质谱参数。

对于甜菜碱的液相分离分析, 一般采用甲醇或者乙腈和甲酸铵水溶液作为流动相, 在强阳离子交换色谱柱上进行色谱分离。本实验分别采用甲醇、乙腈以及甲醇-乙腈(1:1, V:V) 作为有机相, 发现当使用乙腈作为有机相时, 信号响应最强, 而且峰形良好, 结合质谱离子化条件的选择, 在流动相的水相中加入甲酸铵缓冲盐, 可以进一步优化峰形,

表 1 甜菜碱标准品在 SRM 模式下获得的特征碎片离子

Tab. 1 Characteristic fragment ions of authentic betaines obtained by QQQ MS with SRM mode

Analytes	Transition 1	Collision energy		Transition 2	Collision energy	
		/eV			/eV	
Glycine betaine	118.1 > 58.34	28		118.1 > 59.34	19	
Trigonelline	138.0 > 92.18	18		138.0 > 94.17	20	138.0 > 78.22
						26

提高 $[M+H]^+$ 离子化效率。流动相甲酸铵浓度对甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱色谱峰的峰形会产生较大的影响,经反复实验,采用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液获得理想的峰形。

2.5 甜菜碱定性定量分析

样品中没有标准品的甜菜碱的定性分析主要利用三重四极杆质谱的中性丢失扫描模式,结合 Q-TOF MS 的精确分子质量和二级质谱比对,进行确证。

样品定量分析,利用三重四极质谱对有标准品的甜菜碱进行精确定量;对于没有标准品的甜菜碱利用色谱峰面积比值进行半定量。

2.6 方法的线性范围和检测限

通过优化实验条件,标准品在一定的浓度范围内,线性良好(表 2)。方法检测限采用信噪比为 3 时对应的上机样品浓度,表 2 可见方法对两标准品的检测限均远低于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,说明该方法对甜菜碱非常灵敏。

2.7 回收率与精密度测定

向已经提取过的样品残渣中加入 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱标准溶液各 $20 \mu\text{L}$,再按照“2.3”步骤提取后,分别采用直接上机分析(1)、过 C_{18} 固相萃取小柱(2)和 MCX 固相小柱(3),每种方法平行测定 3 次,求得方法的绝对回收率(表 3)。可见,提取样品经过 MCX 固相小柱纯化后的回收率比较好,方法稳定性最好。

2.8 样品定量或半定量分析

4 种大型藻类定量或半定量分析在液相色谱-三重四极杆质谱联用分析系统上完成。以海带样品为例,有标准品的甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱通过外标法精确定量为 $3.46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $34.78 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。三重四极杆质谱仪对海带样品的提取离子色谱图,见图 1 根据脯氨酸甜菜碱、羟基脯氨酸甜菜碱相对甘氨酸甜菜碱峰面积比,可以半定量出海带样品中脯氨酸甜菜碱、羟基脯氨酸甜菜碱(表 4)。可见,通过对 4 种大型海藻的分析,各甜菜碱在各品种中的分布并不均匀,其含量在未检出至 $1015.3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 内。

2.9 样品定性分析

表 4 4 种大型海藻中各种甜菜碱的含量 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. $n=3 \bar{x} \pm s$

Tab. 4 Contents of betaine in four kinds of marine algae $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. $n=3 \bar{x} \pm s$

Compound	Glycine betaine	Trigonelline	GABA betaine	Hydroxyproline betaine	Proline betaine	Alanine betaine
<i>Laminaria japonica</i>	173 ± 3.15	1.79 ± 0.74	no checked	70.5 ± 4.98	117 ± 2.21	no checked
<i>Ulva lactuca</i> L	210.5 ± 5.73	2.35 ± 0.39	no checked	no checked	14.0 ± 3.19	28.3 ± 2.15
<i>Glateloupia filicina</i>	31.7 ± 1.42	no checked	841.5 ± 13.58	no checked	18.7 ± 0.99	no checked
<i>Porphyra tenera</i> Kjellm	188 ± 2.31	no checked	1015.3 ± 5.43	10.1 ± 1.58	no checked	no checked

由于甜菜碱的种类非常多,有报道的总数已经超过几十种,所以不可能得到所有甜菜碱的标准品进行定性定量分析,本实验进一步利用 Q-TOF 质谱对海藻中可能存在的甜菜碱进行定性以及半定量分析。

有一类甜菜碱,是由胆碱头部连接脂肪酸链构成,由于其结构的相似性,其裂解过程均会丢失中性的胆碱头部($\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$, 59),从而可以利用三重四极杆质谱的中性丢失模式寻找样品中类似结构的化合物。紫菜样品分析时得到的中性丢失 59 时的总离

表 2 甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱的线性方程及方法检测限

Tab. 2 Linearity and detection limits of glycine betaine and trigonelline

Compound	Range of concentration / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Calibration equation	Regression coefficient	Detection limit / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Glycine betaine	0.01 - 50	$Y = 9.3889 \times 10^6 + 65550.3X$	0.9985	0.1209
Trigonelline	0.01 - 50	$Y = 2.62593 \times 10^6 + 218207X$	0.9986	0.0622

表 3 甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱回收率. $n=3 \bar{x} \pm s$

Tab. 3 Recovery data of glycine betaine and trigonelline (%). $n=3 \bar{x} \pm s$

Process mode	1		2		3	
	$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
Glycine betaine	87.33 ± 6.58	7.54	20.34 ± 5.45	26.79	83.76 ± 3.51	4.19
Trigonelline	57.39 ± 5.99	10.43	90.31 ± 9.43	10.44	95.55 ± 5.20	5.44

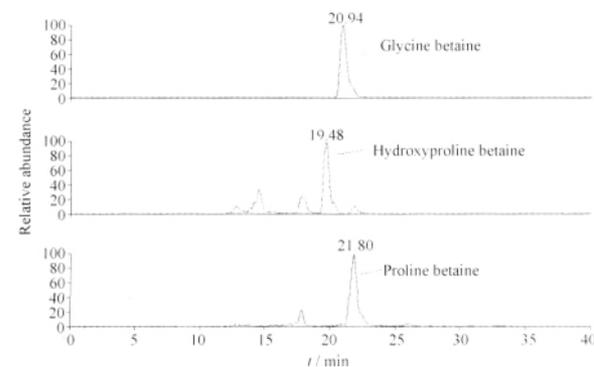


图 1 海带样品的提取离子色谱图

Fig. 1 EIC of *Laminaria japonica* sample

子流图(图2) 图中有一系列信号峰,但从质量数上就可以判定只有保留时间 22.14 min(对应母离子 m/z 118) 和 41.86 min(对应母离子 m/z 146) 的离子质量数在甜菜碱质量数范围内。进一步 LC-Q-TOF MS 分析,在对应保留时间处相应母离子的精确质量数值和二级质谱数据,可以认为它们分别是甘氨酸甜菜碱和氨基丁酸甜菜碱(图3,图中括号内的数值为理论质荷比,括号外为实测质荷比,下同)。

对于其他的未知甜菜碱,可根据从 Q-TOF MS 分析中得到的母离子的精确质量数推断出可能的元素组成,然后通过二级质谱数据进一步确认。比如在海带样品中,除检测到甘氨酸甜菜碱、葫芦巴碱之外,还检测到 m/z 144.097 9 和 160.096 9 的物质离子信号,选择 C、H、O、N 4 元素在 ± 5 mD 范围内软件均分别给出唯一的元素组成 $C_7H_{14}O_2N$ 和 $C_7H_{14}O_3N$ 。

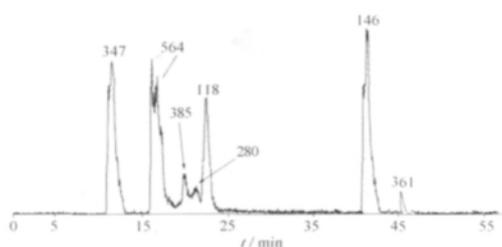


图2 紫菜样品的中性丢失 59 的总离子流图
Fig. 2 Neutral loss chromatograms of *Porphyra tenera* Kjellm

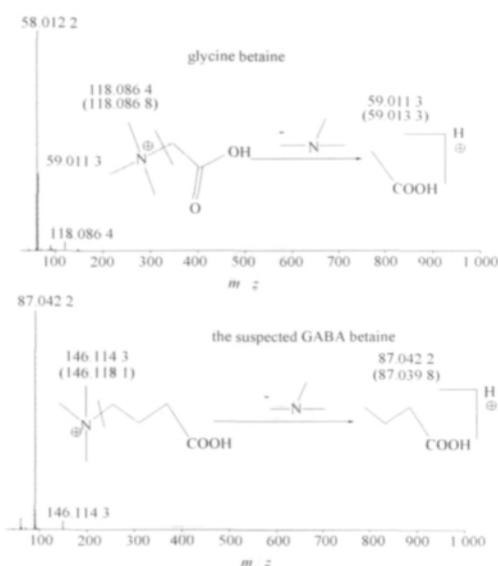


图3 紫菜样品中甘氨酸甜菜碱和疑似氨基丁酸甜菜碱的飞行时间二级质谱图以及可能的 ESI-MS² 裂解途径
Fig. 3 Time of flight (TOF) MS² spectrum for glycine betaine and the suspected GABA betaine in *Porphyra tenera* Kjellm and proposed fragmentation pathways of the target in ESI-MS²

对两物质进行二级质谱分析,根据裂解规律可确定两者分别为脯氨酸甜菜碱和羟基脯氨酸甜菜碱(图4)。

根据以上定性过程,在 4 种大型海藻中,除了标准甜菜碱外,另外还定性出 4 种甜菜碱,分别为氨基丁酸甜菜碱、羟基脯氨酸甜菜碱、脯氨酸甜菜碱和丙氨酸甜菜碱(表 4)。

3 结论

建立了高效液相色谱-三重四极杆质谱和四极杆-飞行时间质谱测定大型海藻中甜菜碱的分析方法。样品通过固相微萃取后上机分析,标准甘氨酸甜菜碱和葫芦巴碱的回收率分别达到 83.76% 和 95.54%,检测限分别为 0.12 和 0.06 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,通过对 4 种大型海藻进行检测,共检测出 6 种甜菜碱,各甜菜碱含量在未检出 $\sim 1\ 015.3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 内。

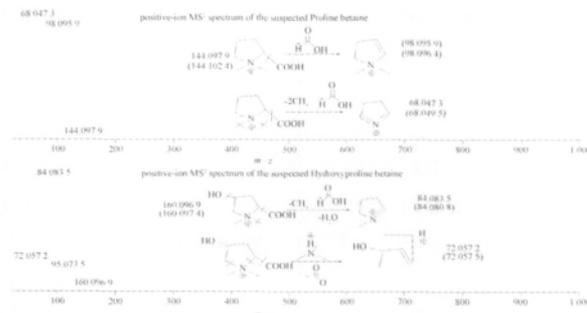


图4 海带样品的飞行时间二级质谱图以及目标离子可能的 ESI-MS² 裂解途径

Fig. 4 Time of flight (TOF) MS² spectrum for *Laminaria japonica* and proposed fragmentation pathways of the targets in ESI-MS²

REFERENCES

- [1] BLUNDEN G, GORDON S M. Betaines and their sulphonio analogues in marine algae[J]. *Prog Phycol Res*, 1986, 4(1): 39-80.
- [2] CSONKA L N, HANSON A D. Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1991, 45(1): 569-606.
- [3] RHODES D, HANSON A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 1993, 44(1): 357-384.
- [4] FUNAYAMA S, YOSHIDA K, KONNO C *et al.* Structure of kukoamine A, a hypotensive principle of *Lycium chinense* root barks[J]. *Tetrahedron Lett*, 1980, 21(14): 1355-1356.
- [5] HITZ W D, HANSON A D. Determination of glycine betaine by pyrolysis-gas chromatography in cereals and grasses[J]. *Phytochemistry*, 1980, 19(11): 2371-2374.
- [6] WOOD K V, BONHAM C C, MILES D, *et al.* Characterization of betaines using electrospray MS/MS[J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(7): 759-765.
- [7] LI C, HILL R W, DANIEL JONES A. Determination of betaine metabolites and dimethylsulfoniopropionate in coral tissues using liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry and stable isotope-labeled internal standards[J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(21): 1809-1816.

(收稿日期: 2010-10-15)