

天然维生素 E 制品中杂质的分离与鉴定

谢云峰^{1,2}, 杨悠悠^{1,2}, 刘佳佳^{1,2}, 武文华³, 杨永坛^{1,2*}

(1. 中粮营养健康研究院, 北京 100020; 2. 北京市营养健康与食品安全重点实验室, 北京 100020; 3. 中粮天科生物工程(天津)有限公司, 天津 300457)

摘要: 利用高效液相色谱-气相色谱-质谱联用与高分辨质谱对天然维生素 E 制品中的杂质进行了分离分析与结构鉴定。采用正相高效液相色谱法分离天然维生素 E 的 4 种异构体及 2 种杂质, 并对杂质馏分进行富集纯化。将气相色谱-质谱联用与高分辨质谱检测相结合, 用于获得杂质的结构信息。通过比较杂质精确相对分子质量和解析质谱碎片离子, 推断杂质为芝麻素及其同分异构体表芝麻素。经与芝麻素对照品保留时间及碎片离子数据比对, 确证了对杂质结构的推断。所建立的杂质鉴定方法快捷、有效, 可应用于天然维生素 E 制品的食品安全控制。

关键词: 高效液相色谱; 气相色谱-质谱联用; 高分辨质谱; 天然维生素 E; 杂质; 结构鉴定

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)07-0679-05

Isolation and identification of impurities in the natural vitamin E

XIE Yunfeng^{1,2}, YANG Youyou^{1,2}, LIU Jiajia^{1,2}, WU Wenhua³, YANG Yongtan^{1,2*}

(1. COFCO Nutrition and Health Research Institute, Beijing 100020, China;

2. Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety, Beijing 100020, China;

3. COFCO Tech Bioengineering (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: Two impurities in the natural vitamin E extracted from oil deodorizer distillate were separated and characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICR-MS). The impurities were purified and collected by normal-phase HPLC. The accurate masses were determined using FTICR-MS and fragmentation behavior was studied by GC-MS. The results showed that the impurities had identical MS spectra and similar electron impact (EI) fragmentation patterns. Based on the spectra, the structures of the two impurities were proposed as the enantiomers of sesamin. The presented method is rapid and effective, and can be applied for the food safety to the vitamin E manufacturing industry.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); high resolution mass spectrometry; vitamin E; impurity; structure identification

维生素 E 又名生育酚, 由于早期被发现具有抗不育作用而得名。维生素 E 包括 α 、 β 、 γ 、 δ 构型和相应的生育三烯酚以及具有 D- α -生育酚活性的衍生物^[1,2]。维生素 E 分为天然制品和人工合成两类。天然维生素 E 为具有生理活性的右旋体, 生物活性远高于合成消旋体, 生物利用度也要优于合成产品, 具有更高的食用安全性^[3,4]。目前, 维生素 E 被广泛

应用于保健品、医药品、食品或饲料添加剂以及化妆品中, 高纯度的天然维生素 E 更是生产加工维生素类膳食补充剂的首选原料。油脂加工业中的脱臭馏分和油渣等副产物富含维生素 E, 经提取、分离和浓缩等工艺可获得天然维生素 E^[5]。在提取过程中可能会引入残留于脱臭馏分中的杂质, 从而造成食品安全隐患。对维生素 E 工业制品中的杂质进行分

* 通讯联系人. Tel: (010) 62736770, E-mail: yangyongtan@cofco.com.

基金项目: 中粮集团公司资助项目(2013-C2-F001L)。

收稿日期: 2013-05-10

析将有助于提高产品质量,控制食品安全风险。

维生素 E 结构复杂,异构体众多,目前主要的分离和检测方法有紫外光谱法^[6]、荧光法^[7]、电化学法^[8]、薄层色谱法^[9]、气相色谱法^[10]和高效液相色谱(HPLC)法^[11]。高效液相色谱法因其快速简便,无需繁琐的样品衍生化,且异构体分离效果好而被广泛应用于维生素 E 工业制品分析中。

本文开展了建立工业制取天然维生素 E 产品中杂质分离鉴定方法的研究。利用高效液相色谱分离了维生素 E 异构体及其杂质,并对杂质进行富集纯化,使用气相色谱-质谱联用(GC-MS)及高分辨质谱对杂质结构进行分析鉴定,为天然维生素 E 制品的质量控制与食品安全提供了技术支撑。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Agilent 1260,美国 Agilent 公司)配置紫外检测器;气相色谱-质谱联用仪(GC-MS-QP 2010 plus,日本岛津公司);傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(FTICR-MS, Apex Ultra 9.4T, 美国 Bruker Daltonics 公司)。天然维生素 E 制品由某公司提供; α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚对照品购自 Sigma 公司;芝麻素对照品购自北京寰宇科创科技发展有限公司;正己烷、乙酸乙酯、异丙醇、甲醇均为色谱纯试剂,购自 Fisher Scientific 公司。

1.2 色谱及质谱条件

1.2.1 HPLC 条件

色谱柱: Agilent Zorbax Sil 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μ m);流动相: 正己烷-异丙醇(99:1, v/v);柱温: 30 $^{\circ}$ C;流速: 1.0 mL/min;检测波长: 295 nm。

色谱柱: Agilent Zorbax-NH₂ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μ m);流动相: 正己烷(含 0.5% 异丙醇)-乙酸乙酯(90:10, v/v);柱温: 30 $^{\circ}$ C;流速: 1.0 mL/min;检测波长: 295 nm。

1.2.2 GC-MS 条件

色谱柱: DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m);载气: 高纯氦气(99.999%);流速: 1.0 mL/min;分流比: 100:1;进样口温度: 250 $^{\circ}$ C;离子源温度: 200 $^{\circ}$ C;接口温度: 280 $^{\circ}$ C;离子源: 电子轰击离子源(EI)(70 eV);扫描范围: m/z 30 ~ 500;升温程序: 初始温度 100 $^{\circ}$ C,保持 2 min,以 15 $^{\circ}$ C/min 升至 290 $^{\circ}$ C,保持 15 min。

1.2.3 FTICR-MS 条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI+);扫描范围: m/z 150 ~ 1 000。用甲醇将样品稀释至 1 g/L,分析时加

入 0.1% (v/v) 的甲酸;样品溶液通过注射泵直接注入离子源。

2 结果与讨论

2.1 天然维生素 E 制品的 HPLC 分析

HPLC 法由于具有灵敏度高、分离能力强、重复性好等优点成为测定维生素 E 的首选方法^[12]。应用 HPLC 法分离维生素 E 既可采用正相模式也可采用反相模式,两者各有特点。反相 HPLC 具有色谱柱性能稳定、保留时间恒定和易于平衡等优点,但是无法完全分离维生素 E 所有的异构体^[13]。与反相 HPLC 相比,正相 HPLC 法最大的优势在于能够将维生素 E 的 4 种异构体完全分离,因此只有在仅需测定维生素 E 总量时,才会选用反相 HPLC 法。

经提取、蒸馏工艺处理食用油脂原料获得的天然维生素 E 制品含有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种形式的异构体,其生理活性存在较大差异,使用正相 HPLC 法可以测定每种异构体的准确含量,从而获得有效的维生素 E 含量。本文在优化文献^[14,15]方法的过程中发现,当采用正己烷-异丙醇(99:1, v/v)流动相体系时, Zorbax Sil 柱对 4 种异构体对照品混合物具有良好的分离作用,色谱分离结果如图 1 所示。应用所建立的上述正相 HPLC 法分析某批次天然维生素 E 制品时发现 2 个未知杂质峰,保留时间分别为 8.05 min 和 9.47 min,其中一种杂质与 δ -生育酚的出峰时间非常接近,相差 0.3 min。虽然尝试调整了多种流动相条件,但是该杂质与 δ -生育酚在所使用的硅胶柱上仍然无法获得基线分离。

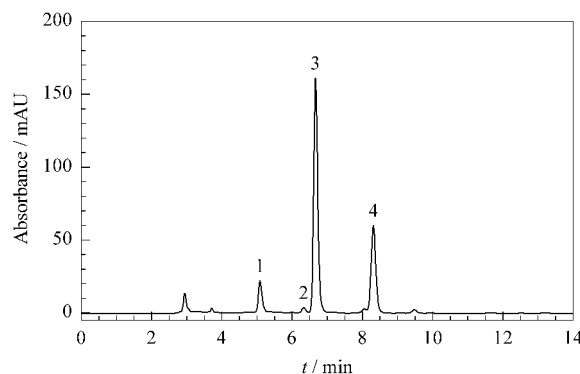


图 1 4 种异构体对照品的混合溶液的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of a mixture of the four isomers reference materials

1. α -tocopherol; 2. β -tocopherol; 3. γ -tocopherol; 4. δ -tocopherol.

2.2 天然维生素 E 制品中杂质的分离纯化

氨基柱是一种特殊的正相色谱柱,通过在高纯硅胶表面键合氨基硅烷制备得到。该柱对脂溶性

维生素众多异构体常表现出独特的分离能力。本实验选用氨基柱对杂质进行分离,并考察了多种不同配比的正己烷-乙酸乙酯流动相体系对杂质分离效果的影响。结果发现,当流动相比比例调整为正己烷(含0.5%异丙醇)-乙酸乙酯(90:10, v/v)时,两种杂质在 Zorbax-NH₂ 柱上的保留时间分别为 13.84 min 与 14.83 min,能够与 4 种生育酚异构体完全分离且互不干扰,见图 2。为获取杂质纯品供后续质谱鉴定,采用分析柱对杂质进行少量制备。将维生素 E 制品浓溶液注入 HPLC,经氨基柱分离后,在紫外检测器出口处收集杂质馏分。将收集到的杂质馏分用氮吹除去有机溶剂后即得到杂质固体纯化物。

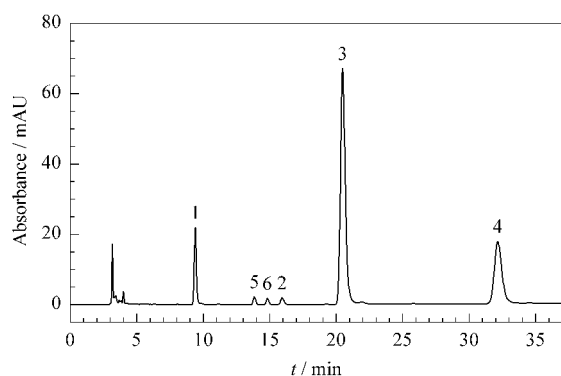


图 2 天然维生素 E 制品中杂质的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of two impurities in the natural vitamin E product

1. α -tocopherol; 2. β -tocopherol; 3. γ -tocopherol; 4. δ -tocopherol; 5. impurity 1; 6. impurity 2.

2.3 天然维生素 E 制品中杂质的鉴定

采用 GC-MS 分析制备得到的两种杂质纯化物。对 DB-5MS 柱温条件进行了选择,为了避免低沸点物质的干扰和可能的强极性物质的残留,初始柱温为 100 °C,保持 2 min;终温为 290 °C,保持 15 min。

图 3a、3b 所示为两种杂质的总离子流图,由图 3 可知杂质 1 与杂质 2 的保留时间分别为 21.58 min 与 21.70 min;图 4a、4b 所示为杂质的质谱图,谱图显示两种杂质分子的离子峰均为 m/z 354,推测两杂质为一对同分异构体。

为了验证上述推断,采用高分辨质谱测定两种杂质的精确相对分子质量。以直接进样方式将质子化后的杂质纯化液注入 FTICR-MS 的 ESI 源,在正离子模式下扫描得到杂质 1 与杂质 2 的 $[M + Na]^+$ 峰分别为 m/z 377.102 60 与 m/z 377.102 56,经质谱精密质量检索得到杂质的元素组成为 C₂₀H₁₈O₆,不饱和度为 12。高分辨质谱结果表明两种杂质的相对分子质量相同,确证了 GC-MS 的推断结果。

为进一步获得杂质的结构信息,对其 EI 质谱图

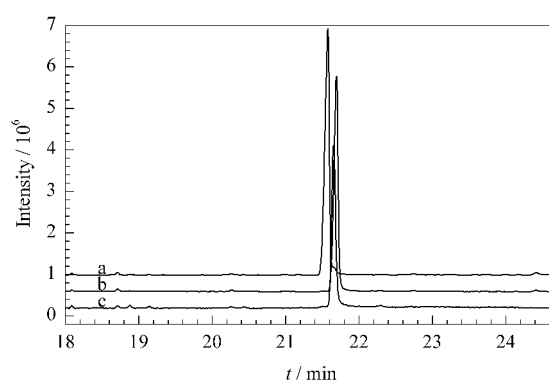


图 3 两种杂质纯化物与芝麻素对照品的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms of two pure impurities and sesamin reference material

a. impurity 1; b. impurity 2; c. sesamin.

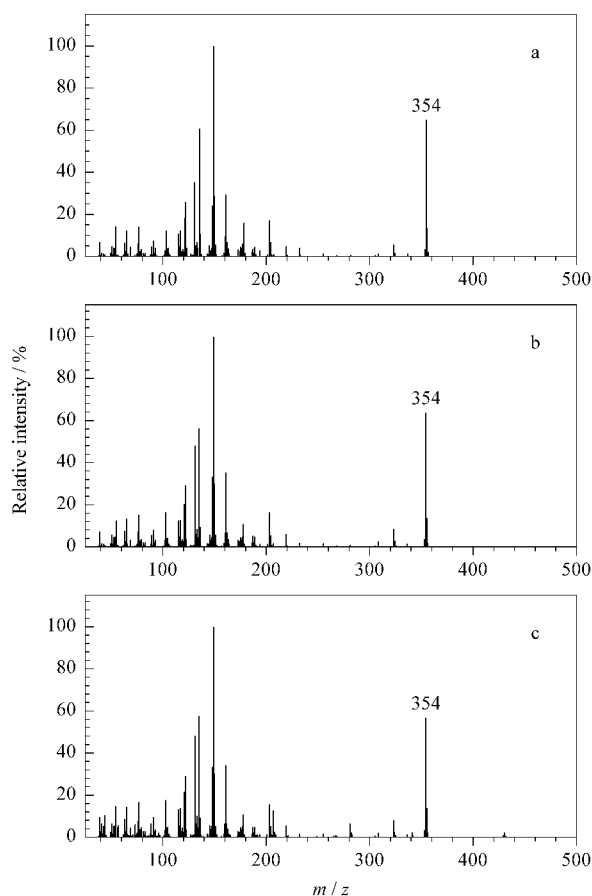


图 4 两种杂质纯化物与芝麻素对照品的质谱图

Fig. 4 Mass spectra of two pure impurities and sesamin reference material

a. impurity 1; b. impurity 2; c. sesamin.

进行了分析。比较发现两种杂质的质谱图概貌高度吻合,主要碎片离子完全相同,由此判断两种杂质可能为一对立体异构体。利用 NIST 谱库检索得到与杂质相似度最大的化合物为 2,6-二(3,4-亚甲基二氧苯基)-3,7-二氧杂双环[3.3.0]辛烷,匹配度达到 98%。该物质属于木脂素类化合物,为芝麻的特

征性成分,存在立体异构体,俗称芝麻素和表芝麻素^[16]。由 GC-MS 分析结果结合高分辨质谱数据推测两种杂质分别是芝麻素及其异构体表芝麻素。

采用相同条件对芝麻素对照品进行 GC-MS 分析以确证杂质的推测结果,结果如图 3c、4c 所示。由图 3b、3c 可知芝麻素标准品与杂质 2 的保留时间一致,图 4 显示芝麻素标准品和两种杂质的质谱碎片离子结果完全吻合,并且芝麻素标准品与两种杂质的 NIST 谱库检索结果相同,证实了杂质为芝麻素类物质的推断。

2.4 天然维生素 E 制品中杂质碎片离子形成过程

对杂质的主要碎片离子进行了归属分析,其中 m/z 65 和 m/z 77 离子属于芳香族化合物特征峰,源自 $C_6H_5^+$; m/z 103 离子源自 $C_8H_7^+$; m/z 178 离子源自 $C_{10}H_{10}O_3^+$; m/z 203 离子源自 $[M - C_8H_7O_3]^+$; m/z 161 离子源自 $C_{10}H_9O_2^+$; m/z 149 离子源自 $C_8H_5O_3^+$; m/z 135 离子源自 $C_8H_7O_2^+$; m/z 122 离子源自 $C_7H_5O_2^+$; m/z 232 离子源自 $[M - C_7H_5O_2]^+$ 。碎片离子可能的形成过程见图 5。

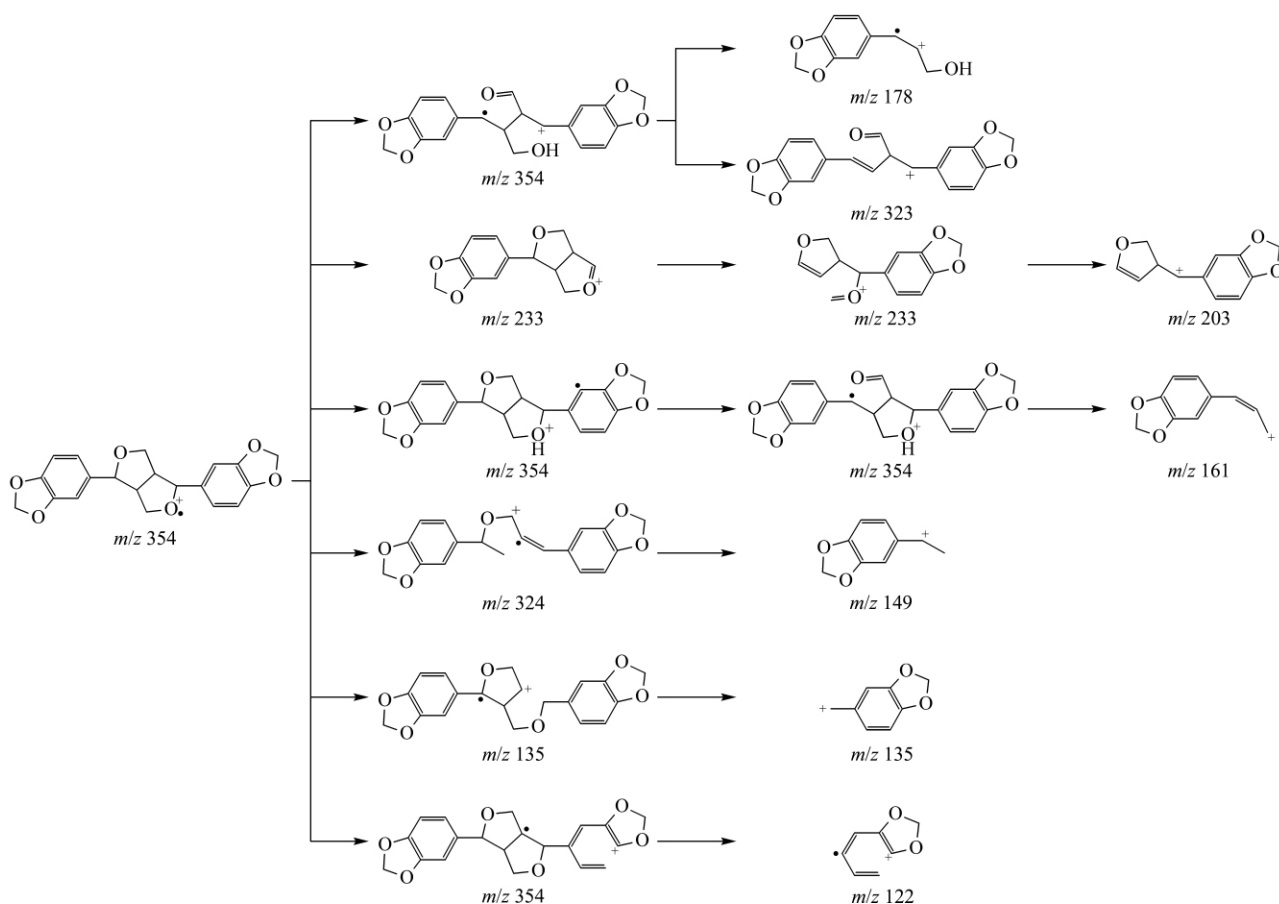


图 5 杂质主要碎片离子可能的形成途径示意图

Fig. 5 Proposed mechanisms for the formation of characteristic ions of the impurity

3 结论

建立了一种快速、有效分离鉴定天然维生素 E 制品中杂质结构的分析方法。通过对维生素 E 异构体与杂质的 HPLC 分离条件优化,制备得到杂质纯品,利用 GC-MS 和高分辨质谱对杂质结构进行了分析鉴定,证实杂质为芝麻素及其异构体表芝麻素,并推测了杂质主要碎片可能的质谱裂解途径。该方法可为源于不同制取工艺的天然维生素 E 产品的杂质分析鉴定提供了参考和借鉴。

致谢 感谢中国石油化工科学研究院王威博士在高分辨质谱检测工作中给予的帮助。

参考文献:

- [1] Zingg J M. Mol Aspects Med, 2007, 28(5/6): 400
- [2] Yang Y, McClements D J. Food Chem, 2013, 141(1): 473
- [3] Shao B. China Food Additives (邵斌. 中国食品添加剂), 2000 (2): 78
- [4] Song X Y, Yang T K. China Oils and Fats (宋晓燕, 杨天奎. 中国油脂), 2000, 25(6): 45
- [5] Zhao Y F, Gu K R. China Oils and Fats (赵一凡, 谷克仁. 中国油脂), 2007, 32(10): 50

- [6] Li H, Li G L, Yao Z X, et al. Journal of Instrumental Analysis (栗晖, 黎国梁, 姚志湘, 等. 分析测试学报), 2009, 28 (11): 1314
- [7] Shao X F, Guo H Y. Spectroscopy and Spectral Analysis (邵晓芬, 郭或杨. 光谱学与光谱分析), 1993, 13(3): 93
- [8] Diaz T G, Merás I D, Cabanillas A G, et al. Anal Chim Acta, 2004, 511(2): 231
- [9] Pyka A, Sliwiok J. J Chromatogr A, 2001, 935(1/2): 71
- [10] Melchert H-U, Pabel E. J Chromatogr A, 2000, 896(1/2): 209
- [11] Zhou J, Zhong H Y, Yin L, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (周洁, 仲海燕, 尹良, 等. 分析化学), 2011, 39 (6): 777
- [12] Yang J R, Huang L N, Huang G L, et al. Chinese Journal of Chromatography (杨建锐, 黄丽娜, 黄光亮, 等. 色谱), 2011, 29(10): 995
- [13] Li X, Wang X, Cai T P, et al. Chinese Journal of Chromatography (李翔, 王星, 蔡天培, 等. 色谱), 2004, 22(1): 96
- [14] Hewavitharana A K. Anal Biochem, 2003, 313(2): 342
- [15] Qiao H O, Wang X, Wang M J. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (乔海鸥, 王辛, 王敏娟. 中国卫生检验杂志), 2012, 22(6): 1271
- [16] Tang C H, Peng Z Y. Cereals and Oils (唐传核, 彭志英. 粮食与油脂), 2000(6): 37

2013 年“气质联用 (GC-MS) 应用技术培训班”即将举办

信立方质谱培训中心与仪器行业最大的门户网站仪器信息网合作将于 2013 年 8 月 14-16 日举办“气质联用 (GC-MS) 应用技术培训班”。信立方质谱培训中心致力于质谱应用技术培训工作,旨在提高分析人员的应用技术水平,使质谱技术更好地服务于科研、生产及质控、监测等工作。自 2009 年,迄今已举办二十余期不同类型 (包括气质联用、液质联用和质谱谱图解析) 和层次的质谱培训班,受到广大分析工作人员的好评。欢迎有志提高气质联用水平的分析人员前来参加。

【培训大纲】GC-MS 联用仪的基本结构及性能;GC-MS 离子化方法及质量分析器;GC-MS 联用技术的定性、定量方法及应用;GC-MS 联用操作技术及常规维护

【主讲专家】王光辉 苏焕华 李重九

【报名方式】电话:(010)51654077-8113 传真:(010)5141369 E-mail: training@instrument.com.cn

联系人:孙老师

信立方质谱培训中心还将在 2013 年底举办“LC-MS 液质应用技术培训班”、“有机质谱谱图解析培训班”,更多内容及详细课程设置请查阅 <http://www.instrument.com.cn/training/>

仪器信息网供稿