

甜茶叶中甜茶苷的 UPLC-MS/MS 分析^①

张 健^{②a, b} 桂新^b 章苏宁^a 刘李明^a 刘志军^c 宋小秋^a

^a(上海应用技术学院香料香精技术与工程学院 上海市漕宝路 120 号 200235)

^b(上海中医药大学中药研究所 上海市蔡伦路 1200 号 201203)

^c(美国路易斯安娜州立大学自然资源学院 美国路易斯安娜州巴吞鲁日城 70803)

摘 要 采用超高效液相色谱-质谱联用法测定广西特产甜茶叶中的主要甜味成分甜茶苷的含量。样品经前处理后以 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱为色谱柱,流动相为乙腈(含体积分数为 0.1% 甲酸)-蒸馏水(含体积分数 0.1% 甲酸),梯度条件为 10min 乙腈相体积由 20% 变化到 65%,柱温 35℃,进样量 5μL,流速为 0.15mL/min。在质谱仪上以电喷雾电离正离子模式多离子反应监测(MRM) 方式进行定量分析,监测的离子为 m/Z 643→319。甜茶苷回归方程的线性关系良好,线性范围 0.1—10.0μg/mL, $r=0.9996$,方法加标回收率为 96.6%,检出限为 0.04μg/mL;定量下限为 0.1μg/mL。该法操作简便快速、灵敏度高、重复性好,适用于甜茶叶中甜茶苷的测定。

关键词 甜茶苷;超高效液相色谱-质谱联用;甜茶叶

中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-8138(2011)05-2692-05

1 引言

甜茶(*Rubus suavissimus* S. Lee),蔷薇科悬钩子属多年生有刺灌木,是广西特有的野生植物,分布在桂林、柳州、梧州等地区,目前贵州亦有种植。其高约 1—4m,茎呈圆柱状,丛生,适宜生长在亚热带气候区及海拔 500—1000m 的丘陵山地,由于其叶片味甜,故名甜茶,是广西民间长期以来应用的甜味品种茶。甜茶叶、根可入药,有养阴补肾、降压、抗过敏、清热解毒、治疮毒、痢疾之功效,它具有无糖自然甜的效果,是天然的无毒、高甜度、低热能和具有保健功能的甜味植物,甜茶叶的化学成分除了黄酮类和维生素等成分以外,主要含有由斯替维醇的葡萄糖甙构成的甜茶苷,分子式为 C₃₂H₅₀O₁₃,据报道其有降低血糖、降血压,促进新陈代谢和抗过敏等药理作用,其甜度约为蔗糖的 100—200 倍,是一种优良的糖类替代品,可广泛应用于糕点、饮料、罐头、医药、烟草等各个食品领域中无糖甜味产品的生产,适合为避免因长期过量的吃糖致使人体发胖和诱发高血压、糖尿病、心血管病等疾病的人们长期食用^[1,2]。甜茶苷的测定对甜茶的研究和开发应用有积极意义。

2 实验部分

2.1 样品、仪器与试剂

甜茶原叶采自广西金秀,广西平乐,贵州三都,甜茶苷标准品(纯度 99%,批号 RS20080521,美

① 上海应用技术学院重点项目资助(KJ2008-16)

② 联系人,电话:(021)64941609; E-mail: jzhang@sit.edu.cn

作者简介:张健(1968—),女,广西桂林市人,副研究员,硕士,主要从事天然植物活性成分研究工作。

国路易斯安娜州立大学自然资源系药用植物实验室)。

Acquity UPLC-Quattro Premier 液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司);TDL-5 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);FA604A 电子天平(上海精天电子仪器有限公司);JL-120DTH 超声波振荡仪(上海杰理科技有限公司)。

乙醇、甲酸(分析纯,上海国药化学试剂公司);乙腈(HPLC 级,德国默克公司)。实验用水为蒸馏水(上海屈臣氏集团有限公司)。

2.2 样品处理

2.2.1 甜茶原叶样液的制备

甜茶原叶经干燥、去梗、粉碎后,分别称取 1g 采自广西金秀,广西平乐,贵州三都的甜茶原叶分两批进行提取及测定。将称好的 3 个不同产地的甜茶叶样品放入标记好的圆底烧瓶中,提取溶剂用 20mL 70% 乙醇溶液,插上冷凝管后放入超声波振荡仪,在温度调至 60℃水浴中经超声波振荡萃取 90min。再用 70% 乙醇溶液洗涤甜茶叶后合并洗涤液,将溶液于离心机中以 10000r/min 速度离心 5min,移取上层清液转入 50mL 容量瓶中混合均匀后用乙醇定容,用于测定。

2.2.2 标准溶液的制备

准确称取甜茶苷标准品 10mg,用 100mL 蒸馏水配制成 100 μ g/mL 的标准储备溶液。准确量取不同体积溶液分别定容到 10mL 容量瓶中配成 0.1, 0.4, 1, 4, 10 μ g/mL 的甜茶苷标准溶液系列备测定。

2.3 测试条件

采用外标法定量,液相色谱条件:流动相为乙腈(含体积分数 0.1% 甲酸)-蒸馏水(含体积分数 0.1% 甲酸),梯度条件为 10min 乙腈相的相对体积由 20%变化到 65%。色谱柱 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1mm $\times$ 100mm, 1.7 μ m, 美国 Waters 公司),柱温 35℃,进样体积 5 μ L,流速 0.15mL/min。质谱条件离子源选用电喷雾电离正离子模式 ESI⁺,毛细管电压 3.00kV,锥孔电压 45V,离子源温度 110℃,脱溶剂气温度 300℃,脱溶剂气流速 450L/h,以多离子反应监测(MRM)方式定量,碰撞能量 45V,监测的离子为 m/Z 643 $\rightarrow$ 319,测定和比较标准品与样品待测组分峰的积分面积值^[3-5]。

3 结果与讨论

3.1 测量条件的选择

根据甜茶苷的分子结构,选择 ESI⁺ 作为电离模式,将甜茶苷的标准品溶液通过全扫描方式找出其母离子,使用子离子扫描(Daughters Scan)的方式选择特征离子,母离子选准分子离子 $[M+H]^+$ m/Z 643 或选其带入钠离子的准分子离子 m/Z 665 $[M+Na]^+$,逐步加大诱导碰撞能量,从 20, 30, 40V 到 45V 随着母离子 m/Z 665 丰度逐渐减少,子离子 m/Z 503 丰度逐渐增加,使得捕获子离子的测试灵敏度相应提高。其他子离子碰撞能量选择方式与此相同,获取子离子最大丰度,确定其最佳诱导碰撞能量的范围,最后在 MRM 方式中进一步调整碰撞能量,以便获得测试甜茶苷的最大灵敏度。甜茶苷的碎片离子中存在碎片离子 m/Z 503 和 m/Z 319,因此可以选择其作为定量离子。图 1 中测定到的离子 m/Z 503 为甜茶苷分子糖苷键断裂后失掉一个糖苷后 $[M+Na]^+ - 162$ 的碎片离子,图 2 中 m/Z 319 为甜茶苷糖苷键断裂后失掉两个糖苷 $[M+H]^+ - 162 \times 2$ 的分子碎片离子。

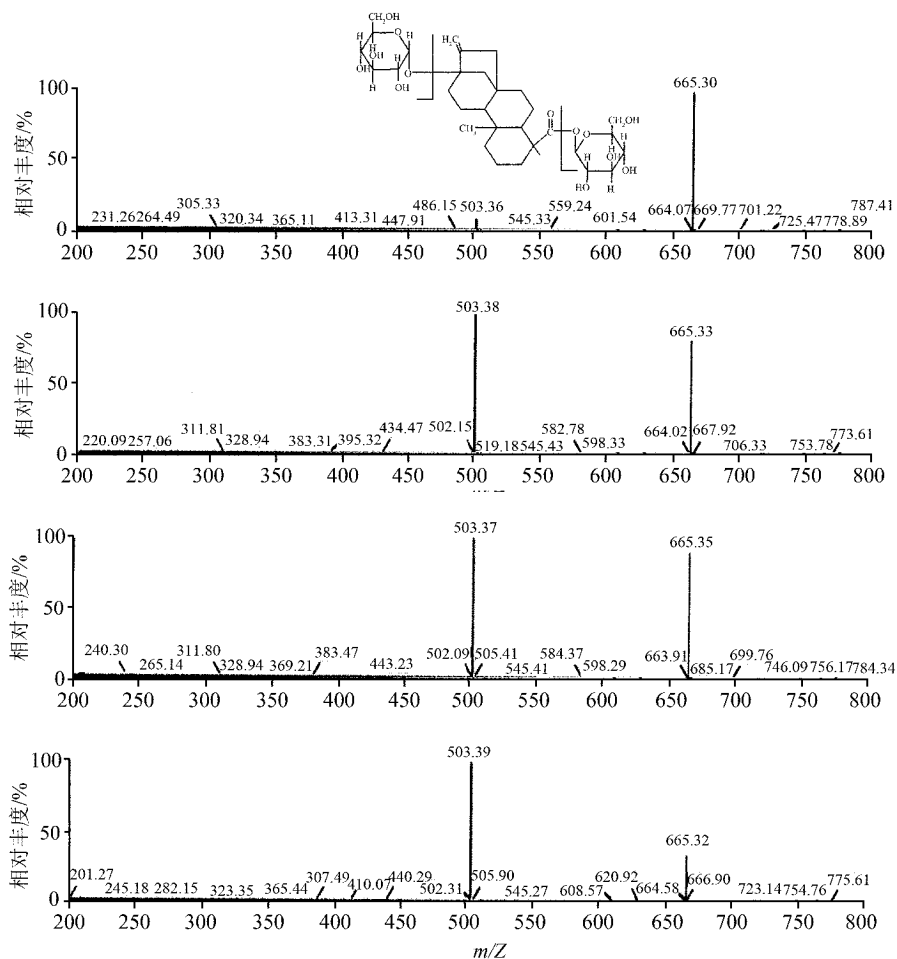


图 1 甜茶苷质谱图以及碎片离子 m/z 503 断裂机理
碰撞能量从上至下分别为 20, 30, 40, 45 eV。

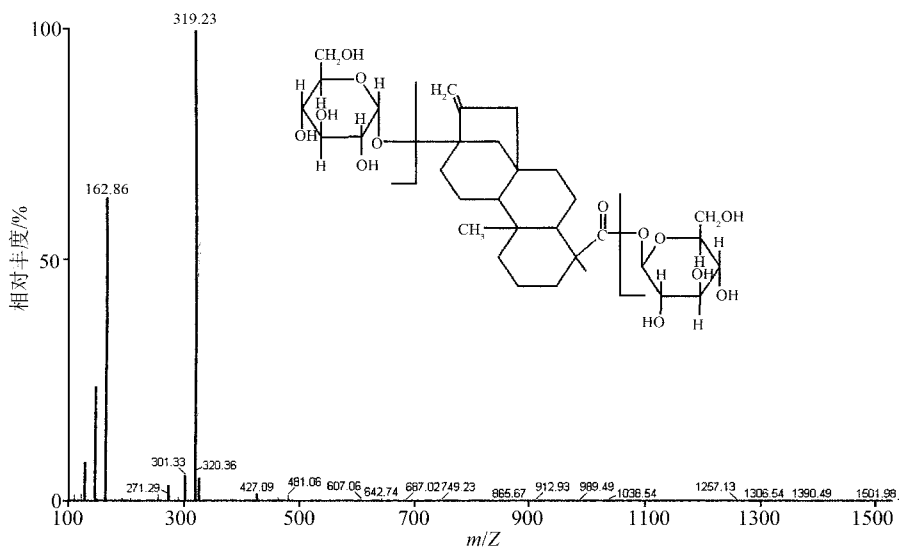


图 2 甜茶苷质谱图以及碎片离子 m/z 319 断裂机理

3.2 方法学考查

通过对 5 个浓度的甜茶苷标准品平行测定两次,以峰面积为纵坐标,样品浓度为横坐标,得到校准曲线,如图 3 所示,甜茶苷的校准曲线回归方程为 $y = 37222x + 1935$, 相关系数 $r = 0.9996$ 。以信噪比(S/N)为 3 倍时检出信号的溶液浓度为检出限(LOD), LOD 为 $0.04\mu\text{g/mL}$, 以信噪比(S/N)为 10 倍时检出信号的溶液浓度为定量下限(LOQ), LOQ 为 $0.1\mu\text{g/mL}$ 。考查方法精密度及测定甜茶叶的提取液在 48h 内甜茶苷的稳定性,5 次平行测定得到的日内精密度 $\text{RSD} = 1.26\%$ ($n = 5$), 经过总共 9 次测定得到的日间精密度的 $\text{RSD} = 1.81\%$ ($n = 9$), 显示方法的精密度及稳定性较高。

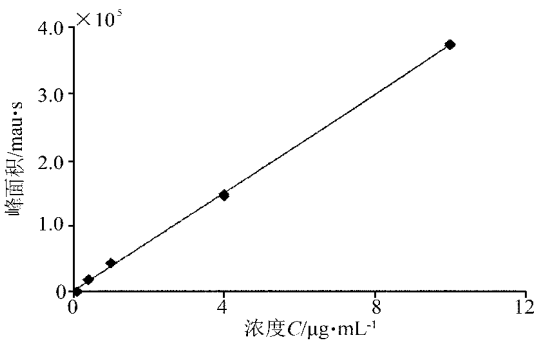


图 3 甜茶苷校准曲线

将标准品加入经测定已知含量的甜茶叶提取液中,分别配制 2 份甜茶苷混合样液并平行测定两次,将测定结果带入校准曲线方程计算含量,通过公式回收率= (加标后测定量- 样品原含量)/ 加标量× 100% 进行计算,结果如表 1 所示得到平均加标回收率为 96.6%。

表 1 回收率测定结果

样品编号	测定次数	原始含量 (μg)	加标量 (μg)	实测含量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	1	1.425	1.25	2.627	96.2	96.6
	2	1.425	1.25	2.620	95.6	
2	1	1.710	1.50	3.166	97.1	
	2	1.710	1.50	3.175	97.7	

3.3 样品测试

分别对广西金秀、广西平乐和贵州三都这 3 个产地的甜茶叶进行提取制备,测定提取得到的样液中甜茶苷占甜茶叶的干重含量,采用 MRM 的方法对甜茶叶中甜茶苷进行定量,定量时以分子离子 $[M + H]m/Z\ 643$ 为母离子,分别选用其子离子 $m/Z\ 319$ 和 $m/Z\ 481$ 进行定量,由于 $m/Z\ 319$ 的丰度较高,为了得到更精确的数据因此最终选择以子离子 $m/Z\ 319$ 进行定量,用两次平行提取样品并且每个样品平行测定两次的方法对 3 个产地的甜茶叶样品进行处理和测定,测试结果显示其重现性很好,出峰时间一致,面积相当,误差较小,使用 MRM 方法进行定量分析与单纯使用 HPLC 相比结果受时间和位移影响小。图 4 是广西平乐甜茶叶样品的 MRM 定量测试图,二次制备及二次平行测定结果的 RSD 为 1.21%。广西金秀、广西平乐和贵州三都 3 个产地 4 次测定甜茶苷占甜茶叶干重的含量平均值如图 5 所示分别为 5.10%, 3.21%, 4.96%。

4 结论

采用超高效液相色谱-质谱联用法测定广西特产甜茶叶中主要甜味成分甜茶苷的含量受测试环境和条件的影响较小。以多离子反应监测方式进行定量分析,用于监测的离子为 $m/Z\ 643 \rightarrow 319$, 建立的甜茶苷测定校准曲线在 $0.1\text{—}10.0\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,方法加标回收率为 96.6%, 结果表明, 该法操作简便、灵敏度高、重复性好,将其用于甜茶叶中甜茶苷的测定,取得了良好的结果。使用质谱方法还可以通过质谱分子离子峰及碎片离子峰推测并找出了甜茶叶中的二氢黄酮苷等物质,与传统分析方法相比 UPLC-MS/MS 方法具有显著的优越性和实用价值,显示了其在天然植物或中药成分分析中广泛运用的良好前景。

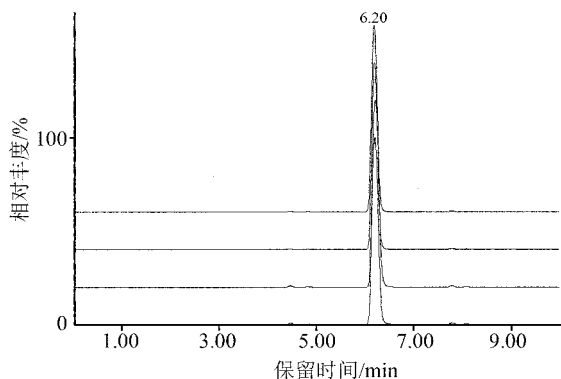


图 4 甜茶叶中甜茶苷测定的 MRM 图
图例为广西平乐样品 4 次测定结果

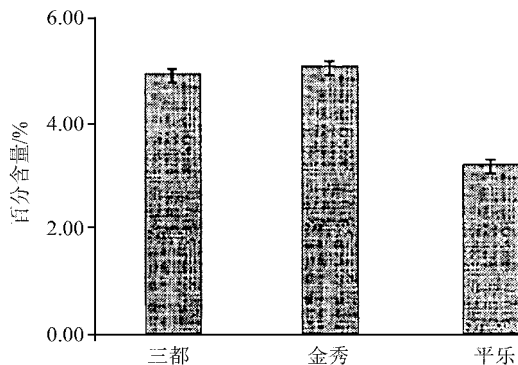


图 5 不同产地甜茶中甜茶苷占甜茶原叶干重的百分含量

参考文献

- [1] 梁坚. 甜茶的研究进展[J]. 广西医学, 2004, **26**(6): 845—847.
- [2] Liu D, Gao Z G, Zhang J *et al.* Bioassay-Guide Fractionation of *Rubus Saavissimus* Leaf Extracts Possessing NF- κ B Inhibitory Activities and a Separable Cytotoxicity[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2005, **43**(8): 713—717.
- [3] Chou G X, Xu S J, Liu D *et al.* Quantitative and Fingerprint Analyses of Chinese Sweet Tea Plant (*Rubus Suaviss Himus S. Lee*) [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**(3): 1076—1083.
- [4] 张健, 叶丽琼. 甜茶中甜茶苷的测定[J]. 食品工业, 2007, **148**(1): 55—57.
- [5] Richman A, Swanson A, Humphrey T *et al.* Functional Genomics Uncovers Three Glucosyltransferases Involved in the Synthesis of the Major Sweet Glucosides of *Stevia Rebaudiana*[J]. *The Plant Journal*, 2005, **41**(1): 56—67.

Determination of Rubusoside from *Rubus Suavissimus* S. Lee Leaves by UPLC-MS/MS

ZHANG Jian^{a,b} CHOU Gui-Xin^b ZHANG Su-Ning^a LIU Li-Ming^a LIU Zhi-Jun^c SONG Xiao-Qiu^a

^a(School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai, 200235, P. R. China)

^b(Institute of Chinese Material Medicine, Shanghai University of Traditional Medical School, Shanghai, 201203, P. R. China)

^c(School of Renewable Natural Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803 U. S. A.)

Abstract A method for determination of rubusoside in sweet tea leaves was established by ultra performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (UPLC-ESI MS/MS). After pretreatment procedure, sample was separated on a Acquity UPLC BEH C18 column with A acetonitrile (with 0.1% formic acid, V/V) and B distilled water (with 0.1% formic acid, V/V) as mobile phase. The gradient elution was from 0 to 10 min followed a linear change from 20% to 65% (V/V) for phase A with injection volume of 5 μ L at a flow rate of 0.15 mL/min. The column temperature was set at 35°C. Detection was performed by multiple reaction monitoring (MRM) on mass spectrometer. Electrospray ionization source was applied and operated in the positive ion mode (ESI+), and m/z 643 $\rightarrow$ 319 was selecting as detecting ion. A good linear calibration was obtained in the range of 0.1—10.0 μ g/mL with correlation coefficient of 0.9996. The average addition standard recovery was 96.6%. The LOD and LOQ were 0.04 μ g/mL and 0.1 μ g/mL. The proposed method is specific, sensitive and reproducible enough to be used for the determination of rubusoside in sweet tea leaves.

Key words Rubusoside; UPLC-MS/MS; *Rubus Suavissimus* S. Lee Leaves