

固相萃取法联用 UPLC-Triple-TOF/MS 法鉴定花菜中自由和结合态植物甾醇

冯思敏^{1,2,3}, 吴思杰¹, 江佳萍¹, 廖杰³, 孙培龙^{1,2}, 邵平^{1,2*}

¹浙江工业大学食品科学与工程学院 杭州 310014

²中国轻工业食品大分子资源加工技术研究重点实验室(浙江工业大学) 杭州 310014

³浙江华才检测技术有限公司 浙江绍兴 311800)

摘要 为探明花菜中植物甾醇的组成,采用固相萃取法(SPE)分离 4 种结合状态的甾醇,然后采用超高效液相色谱串联三重四极杆飞行时间质谱(UPLC-Triple-TOF/MS)法鉴定花菜中植物甾醇的种类,分析其结构。结果表明,花菜中含有的游离甾醇(FS)有豆甾醇、菜油甾醇、羽扇豆醇、 β -谷甾醇;甾醇酯(SE)有菜油甾醇亚油酸酯、豆甾醇油酸酯、 β -谷甾醇油酸酯;甾醇糖苷(SG)有菜油甾醇葡萄糖苷、 β -谷甾醇葡萄糖苷;酰化甾醇糖苷(ASG)有菜油甾醇葡萄糖苷棕榈油酸酯、菜油甾醇葡萄糖苷二十碳烯酸酯、豆甾醇葡萄糖苷亚麻酸酯、 β -谷甾醇葡萄糖苷二十碳烯酸酯、 β -谷甾醇葡萄糖苷亚麻酸酯。

关键词 花菜;植物甾醇;固相萃取;超高效液相色谱-质谱

文章编号 1009-7848(2022)01-0238-13 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.01.026

花菜(*Brassica oleracea* L.var. botrytis L.),又名花椰菜、菜花、洋花菜,为十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种^[1]。其适应性强,在我国分布广泛,主要集中于福建、浙江、江苏等沿海地区,以及河北、云南等地区^[2]。花菜中含有丰富的维生素、碳水化合物、矿物质等营养成分,以及萝卜硫素^[3]、多酚、芥子油苷^[4]、植物甾醇^[5]等生物活性物质,具有较高的营养价值。

植物甾醇(Phytosterol)是一类以环戊烷多氢菲为骨架的天然活性物质^[6],其结构与胆固醇相似,然而功能完全不同,广泛存在于各种植物油、坚果及其它植物性食物中。Han 等^[7]发现蔬菜中总植物甾醇含量为 1.1~53.7 mg/100 g,其中最高浓度出现在豌豆、花椰菜、西兰花和生菜中。在已报道的 200 多种植物甾醇中,谷甾醇、豆甾醇、麦胶甾醇最为常见。有研究表明,植物甾醇具有降低胆固醇^[8]、抗肿瘤^[9]、抗炎^[10]、抗氧化^[11]等功效,Feng 等^[12]指出植物甾醇能调节胆固醇、脂肪酸、TG 和 BA,从而缓解非酒精性脂肪肝、炎症性肠病和肥胖症

等不同疾病。由此可见,植物甾醇在疾病防治方面具有重要作用,使其在医学、生命科学、食品等领域日益受到重视,具有广阔的开发前景。然而植物甾醇结构较复杂,国内对该领域的研究与开发较国外相对滞后,用于分析不同类型、形态植物甾醇的方法尚不完善^[13],尚需深入研究。

甾醇的生理活性可能受其结构的影响^[14]。为进一步扩大植物甾醇在食品、医药、化妆品等领域的应用,对其纯度应有更高的要求。对不同形态植物甾醇的分离、纯化,定量、定性分析以及结构鉴定,具有重要意义。本研究采用固相萃取法(SPE)分离花菜中 4 种结合状态的植物甾醇,用超高效液相色谱串联三重四极杆飞行时间质谱(UPLC-Triple-TOF/MS)鉴定其甾醇的种类,分析其结构,为进一步研究花菜及其它蔬菜中植物甾醇提供理论和试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花菜,当地农贸市场,热风干燥后粉碎待用。

异丙醇(特级色谱纯),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;正己烷(特级色谱纯)、乙腈(特级色谱纯),天津市四友精细化学品有限公司;Silica 固相萃取柱(500 mg/3 mL),Phenomenex 公司;Diol

收稿日期:2021-01-17

基金项目:浙江省重点研发计划项目(2019C02070, 2021C02019);国家自然科学基金青年科学基金项目(31801536)

作者简介:冯思敏(1989—),男,博士生,副研究员

通信作者:邵平 E-mail: pingshao325@zjut.edu.cn

固相萃取柱 (500 mg/3 mL), GL Sciences Inc 公司; 其余化学试剂均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

AY220 型电子天平, 日本岛津公司; AcquityTM ultra 型超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Triple TOF 5600+三重四极杆-高分辨飞行时间质谱仪 (配有大气压力化学电离源), 美国 ABSCIEX 公司; 752N 紫外可见分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; RE-2000A 真空旋转蒸发仪, 上海研承仪器有限公司; miVac 真空离心浓缩仪, 英国 GeneVac 公司; GZX-9076MBE 电热鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; CR21N 高速冷冻离心机, 日本日立工机株式会社; FS-1200pv 超声波处理器, 上海生析超声仪器有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 江苏国华电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的绘制 配制豆甾醇标准溶液: 称取 100.0 mg 豆甾醇标样, 加入适量无水乙醇, 溶解后定容至 100 mL。准确吸取 10 mL 并用无水乙醇定容至 100 mL, 此时的溶液作为标准液。

配制磷硫铁显色剂: 准确称取 10 g 三氯化铁 (III) 六水合物, 加入适量浓磷酸 (85%), 溶解后定容至 100 mL。吸取 1.5 mL 上述溶液于 100 mL 棕色容量瓶, 用浓硫酸定容。

称量 100.0 mg 豆甾醇标样, 加入适量无水乙醇, 溶解后定容至 100 mL。使用时取 10 mL, 用无水乙醇定容至 100 mL, 此时的溶液作为标准液。分别吸取 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 标准液于试管, 加入无水乙醇补充至 4 mL, 再加入 2 mL 磷硫铁显色剂显色 15 min, 于 520 nm 波长下测定吸光度, 以豆甾醇含量为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。得到回归方程 $y=0.063x-0.0066$, $R^2=0.9965$, 表明豆甾醇质量浓度在 0~62.5 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

1.3.2 花菜中植物甾醇的提取及总甾醇含量的测定 称取 500 mg 花菜粉, 各加入 2.5 mL 氯仿和甲醇, 摇匀, 超声 20 min, 过滤, 将滤液转移至圆底烧瓶, 45 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸至干, 复溶于 10 mL 无水乙醇。取 1 mL 样品溶液和 3 mL 无水乙醇于试管中, 按上述方法测其吸光度, 得到总甾醇含量。

1.3.3 固相萃取法分离植物甾醇

1.3.3.1 游离甾醇、甾醇酯和酰化甾醇糖苷、甾醇糖苷分离 准确称取花菜粉 1.000 g, 加入各 5 mL 氯仿和甲醇, 提取方法如上所述, 45 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸, 加 1 mL 氯仿复溶。硅胶柱中加入 5 mL 氯仿活化, 上样 1 mL, 先用氯仿洗脱游离甾醇 (FS) 和甾醇酯 (SE), 干燥后, 加入 1 mL 己烷复溶; 再加入丙酮-异丙醇 (体积比 1:1) 洗脱酰化甾醇糖苷 (ASG) 和甾醇糖苷 (SG), 干燥后, 加 1 mL 庚烷-异丙醇 (体积比 95:5) 复溶。

1.3.3.2 洗脱 硅胶柱中加入 5 mL 己烷活化, 将 1.3.3.1 节中的第 1 个洗脱组分加入柱内, 先用己烷-乙醚 (体积比 99:1) 洗脱 SE, 再加入己烷-乙醚 (体积比 85:15) 洗脱 FS。

Diol SPE 柱 (500 mg, 3 mL) 加入 5 mL 庚烷活化, 将 1.3.3.1 节中的第 2 个洗脱组分加入柱内, 庚烷-异丙醇 (体积比 97:3) 洗柱后, 先加入庚烷-异丙醇 (体积比 92:8) 洗脱 ASG, 再加入庚烷-异丙醇 (体积比 85:15) 洗脱 SG。

分别用 3, 4, 5, 6, 7, 8 mL 的溶剂按照上述流程洗脱甾醇。

1.3.3.3 各组分甾醇含量的测定 按 1.3.2 节的方法测定吸光度, 记录分析不同体积洗脱液对甾醇洗脱量的影响。

1.3.4 UPLC-Triple-TOF/MS 检测分析

1.3.4.1 超高效液相色谱条件 色谱柱: Agilent eclipseplus C18 柱 (4.6 mm \times 100 mm, 1.8 μm); 流动相 A: 90% 甲醇, B 相: 乙腈-异丙醇 (体积比 1:1); 流速: 0.6 mL/min; 检测器: 紫外可见光; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 流动相梯度洗脱见表 1。

1.3.4.2 质谱条件 扫描方式: 正离子模式 (AP-

表 1 液相梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
25	5	95
33	5	95

CI), 一级全扫描, 加自动二级扫描; 电喷雾电压: +5.5 kV; 扫描范围: m/z 100~1 000; 离子源温度:

600 ℃; 辅助气 Gas1 压力:344.75 kPa; 辅助气 Gas2 压力:344.75 kPa; 最大允许误差:±5 ppm 范围内;去簇电压(DP):100 V;聚焦能量:10 V。

1.4 数据统计与分析

除液质分析外, 试验所得数据结果采用2次及以上平行试验,数据表示方法为“平均值±标准差”。使用 Peakview 软件进行质谱图分析鉴定,使用 Origin 2019 进行数据处理及分析,使用 Chem-Draw Professional 17 绘制甾醇结构式。

2 结果与分析

2.1 花菜中总甾醇含量

甾醇提取液与磷硫铁试剂显色反应后,在 520 nm 紫外光波长下测吸光度,结果取平均值,总甾醇含量为(5.034±0.097)mg/g, RSD=1.733%。

2.2 SPE 不同体积洗脱液对甾醇洗脱量的影响

由图 1(a,b)可知,SE 洗脱量随着洗脱液体积增加呈先增加后稳定的趋势,在 5~6 mL 内,洗脱量显著增加 ($P<0.05$),6 mL 后随着洗脱液体积增加,SE 洗脱量无明显变化 ($P>0.05$);FS 洗脱量在

洗脱液体积小于 5 mL 时呈下降趋势,6 mL 时洗脱量显著增加 ($P<0.05$),在 7 mL 时又下降。通过 FS 和 SE 图像对比分析可知,洗脱液体积小于 5 mL 时,SE 未完全洗脱,导致 FS 洗脱液中 SE 的存在。由此可以解释 5 mL 之前 FS 洗脱量随洗脱液体积增加而下降,在 6 mL 之后 SE 洗脱量没有发生明显上升,说明在 6 mL 左右 SE 已洗脱完全,则可将 6 mL 定为 SE 的最佳洗脱体积,计算此时 SE 的洗脱量为(334.69±18.09)μg。而 FS 洗脱量在 6 mL 时出现一个峰值,可将 6 mL 定为 FS 的最佳洗脱体积,此时 FS 的洗脱量为(695.64±31.50)μg。

由图 1(c,d)可知,ASG 的洗脱量随着洗脱液体积的增加,在 6 mL 处出现最大值,在 4~5 mL 内,洗脱量显著增加 ($P<0.05$),洗脱液体积大于 6 mL 后,洗脱量差异不显著 ($P>0.05$);SG 的洗脱量在洗脱液体积为 3~5 mL 时显著减少 ($P<0.05$),5~6 mL 时上升,且之后差异不显著 ($P>0.05$)。通过 ASG 和 SG 图像对比分析可得,洗脱液体积小于 6 mL 时 ASG 未完全洗脱,导致 SG 中混有 ASG,ASG 洗脱量在 6 mL 之后变化不大,可认为此时

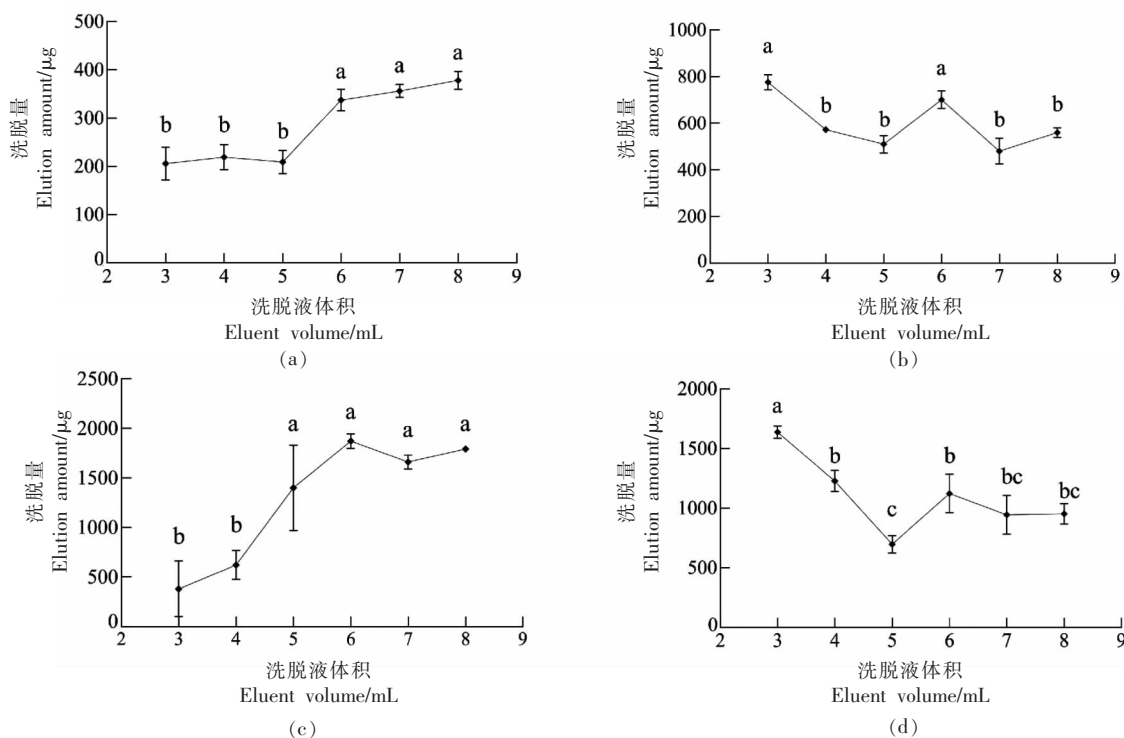


图 1 洗脱液体积对 SE(a)、FS(b)、ASG(c)、SG(d)洗脱量的影响

Fig.1 Effects of eluent volume on the elution amount of SE (a), FS (b), ASG (c) and SG (d)

ASG 已洗脱完全, 可取 6 mL 为其最佳洗脱体积, 此时 ASG 洗脱量为 $(1\ 856.69 \pm 38.22)\ \mu\text{g}$ 。SG 在洗脱液体积为 5 mL 时洗脱量最少, 5~6 mL 时开始上升, 此时应是 SG 逐步洗脱的表现, 在 7 mL 后洗脱量基本不变, 可将 7 mL 定为其最佳洗脱条件, 此时 SG 洗脱量为 $(828.66 \pm 32.78)\ \mu\text{g}$ 。

2.3 UPLC-Triple-TOF/MS 分析结果

2.3.1 花菜中植物甾醇总离子流色谱图及解析

花菜中 4 种结合状态的甾醇经 UPLC-Triple-TOF/MS 分析检测, 总离子流图见图 2。分析图中各峰, 并结合文献中各甾醇二级质谱的特点, 筛选出丰度较高且可能是甾醇母离子的离子进行检索, 最

后通过精确分子质量与实测质荷比的对比, 对误差范围在 $\pm 5\ \text{ppm}$ 以内的分子式进行筛选。经筛选得到 4 个游离甾醇峰(图 2a), 1~4 分别为豆甾醇、菜油甾醇、羽扇豆醇、 β -谷甾醇; 3 个甾醇酯峰(图 2b), 1~3 分别为菜油甾醇亚油酸酯、豆甾醇油酸酯、 β -谷甾醇油酸酯。2 个甾醇糖苷峰(图 2c), 1~2 分别为菜油甾醇葡萄糖苷、 β -谷甾醇葡萄糖苷。5 个酰化甾醇糖苷峰(图 2d), 1~5 分别为菜油甾醇葡萄糖苷棕榈油酸酯、菜油甾醇葡萄糖苷二十碳烯酸酯、豆甾醇葡萄糖苷亚麻酸酯、 β -谷甾醇葡萄糖苷二十碳烯酸酯、 β -谷甾醇葡萄糖苷亚麻酸酯。

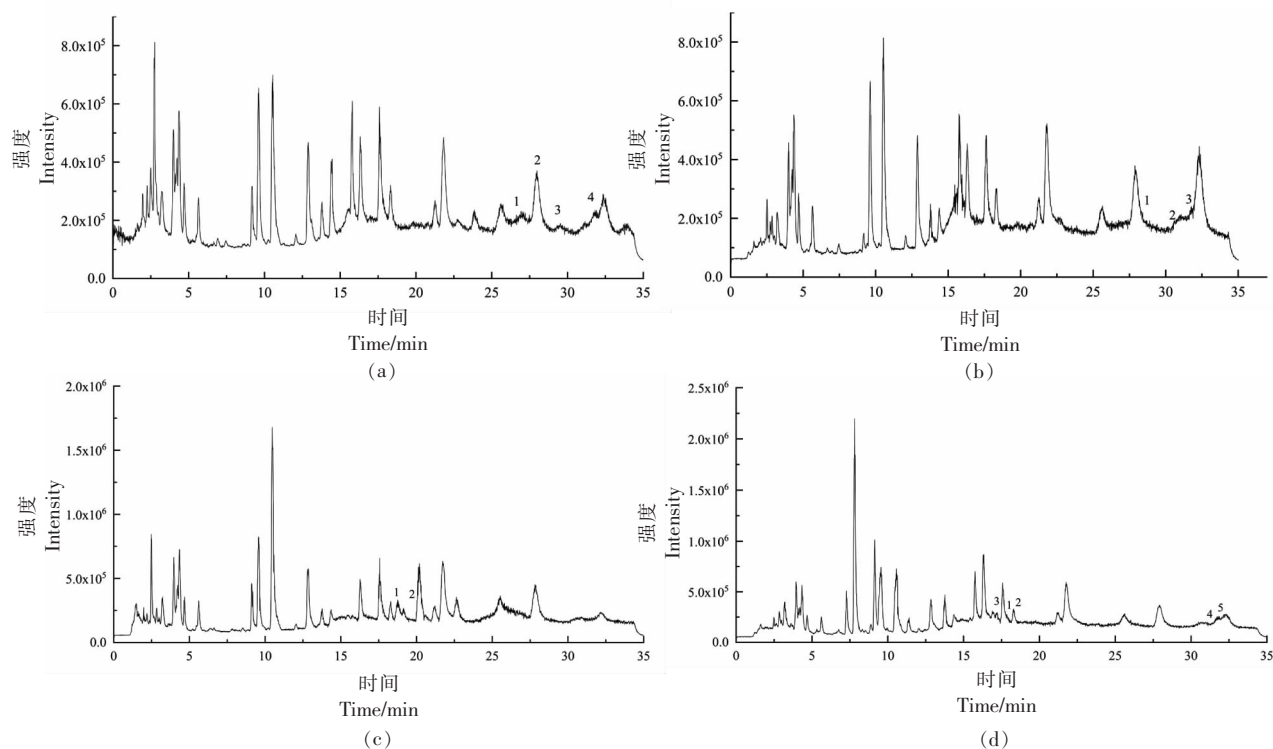


图 2 花菜中甾醇 UPLC-Triple-TOF/MS 总离子流色谱图

Fig.2 UPLC-Triple-TOF/MS total ion current chromatogram of phyosterols from cauliflower

2.3.2 游离甾醇(FS)质谱解析 FS 各峰具体信息见表 2, 对应的二级质谱图如图 3 所示, 分析图中碎片离子峰, 并与相关文献比对, 得到其结构式。对化合物 1 的 $[M+H-H_2O]^+$ 离子峰 m/z 395.3368 进行二级质谱裂解分析, 得到 m/z 121.1012, m/z 147.1163, m/z 161.1325, m/z 175.1474, m/z 257.2260, m/z 297.2565, m/z 353.3215, m/z 379.3372,

m/z 395.3668 等碎片离子峰(图 3a), 根据相关文献^[15], 与豆甾醇裂解规律相符, 因此推断化合物 1 为豆甾醇($C_{29}H_{48}O$)。Mo 等^[16]选择 $[M+H-H_2O]^+$ 的一个丰富的产物离子作为定量剂, 除油菜素甾醇和豆甾醇分别从 C17 侧链上除去 84 和 98 个质量单位形成 m/z 297 产物离子外, 大多数片段离子是通过切割甾醇 C 环形成, 还检测到 m/z 161 的产

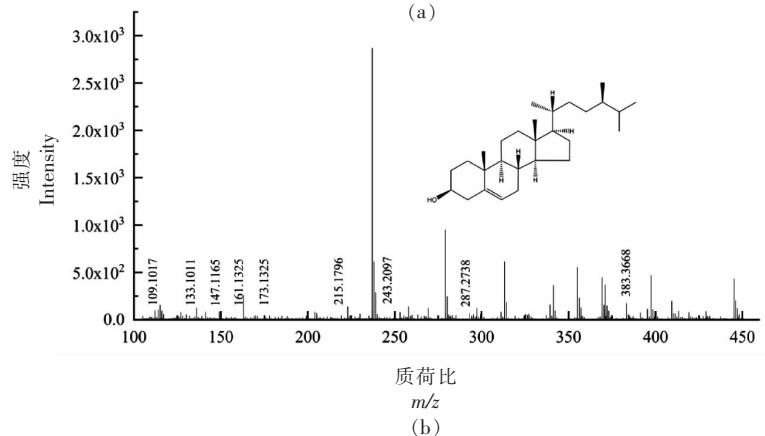
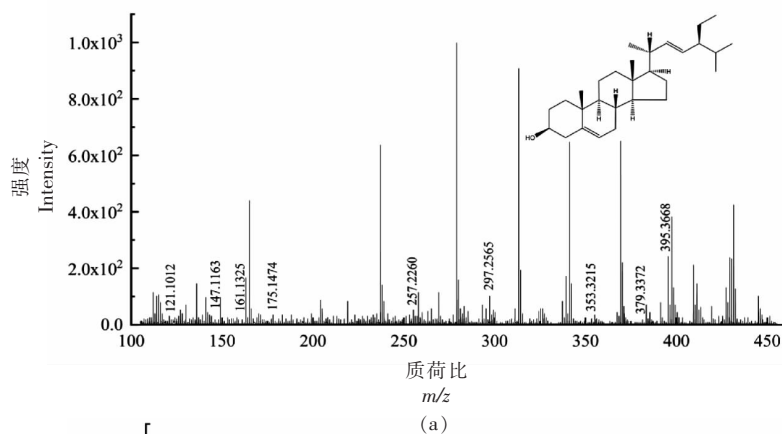
物离子,对应于油菜素甾醇和豆甾醇的碳环断裂。对化合物2的 $[M+H-H_2O]^+$ 离子峰 m/z 383.3668 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 109.1017, m/z 133.1011, m/z 147.1165, m/z 161.1325, m/z 173.1325, m/z 215.1796, m/z 243.2097, m/z 287.2738, m/z 383.3668 等碎片离子峰(图 3b),参考相关文献^[14,16],其裂解规律与菜油甾醇一致,因此推断化合物2为菜油甾醇($C_{28}H_{48}O$)。对化合物3的 $[M+H-H_2O]^+$ 离子峰 m/z 409.3822 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 109.1015, m/z 121.1013, m/z 137.1319, m/z 149.1321, m/z 163.1476, m/z 175.1484, m/z 245.2257, m/z 259.2412, m/z 353.3205, m/z 409.3822 等碎片

离子峰(图 3c),其裂解规律与羽扇豆醇相符,因此推断化合物3为羽扇豆醇($C_{30}H_{50}O$)。Khatal 等^[17]研究发现,在 APCI 阳离子模式下,羽扇豆醇在 m/z 409.5 处有一基峰 $[M+H-H_2O]^+$,二级质谱显示 m/z 137.3 是一个突出的产物离子。对化合物4的 $[M+H-H_2O]^+$ 离子峰 m/z 397.3821 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 133.1018, m/z 135.1165, m/z 147.1173, m/z 203.1791, m/z 215.1793, m/z 243.2105, m/z 255.2100, m/z 287.2723, m/z 397.3821 等碎片离子峰(图 3d),其裂解规律与 β -谷甾醇一致^[16],因此推断化合物4为 β -谷甾醇($C_{29}H_{50}O$)。

表2 FS一级质谱图表

Table 2 FS first-order mass spectrometry chart

编号	保留时间/min	实测质荷比(m/z) $[M+H-H_2O]^+$	理论质荷比(m/z)	甾核母离子	误差/ppm
1	26.869	395.3668	395.3672	$C_{29}H_{47}^+$	-1.1
2	28.157	383.3668	383.3672	$C_{28}H_{47}^+$	-1.1
3	29.424	409.3822	409.3829	$C_{30}H_{49}^+$	-1.7
4	31.702	397.3821	397.3829	$C_{29}H_{49}^+$	-2.0



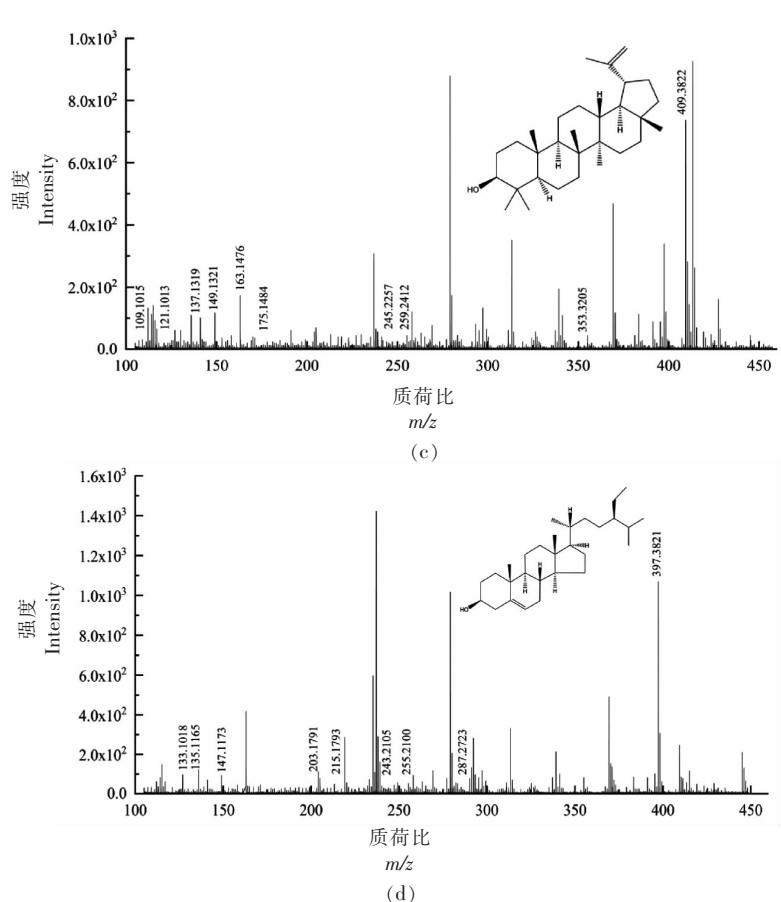


图 3 FS 各峰二级质谱图

Fig.3 Secondary mass spectrogram of each peak of FS

2.3.3 甾醇酯(SE)质谱解析 甾醇酯在 APCI 正离子模式下形成 $[M-FA+H]^+$ 碎片离子^[18],可通过甾核母离子 $[M-FA+H]^+$ 的质荷比,区分不同甾醇核的酯。对化合物 1 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 109.1017, m/z 133.1011, m/z 135.1169, m/z 147.1167, m/z 189.1644, m/z 203.1787, m/z 243.2105, m/z 257.2261, m/z 281.2482, m/z 301.2899, m/z 383.3671, m/z 663.6085 等碎片离子峰(图 4a), m/z 383.3671 为菜油甾醇特征峰, m/z 281.2484 为亚油酸($C_{18}H_{32}O_2$)特征峰, m/z 663.6085 为分子离子峰,根据相关文献^[19],与菜油甾醇亚油酸酯分子质量理论值相当,因此推断化合物 1 为菜油甾醇亚油酸酯($C_{46}H_{78}O_2$)。Rocha 等^[20]采用 ESI-MS 和串联质谱对菜籽油中的甾醇酯进行分析,质谱结果显示 SE 的铵加化合物($[M+NH_4]^+$)是基峰,串联质谱显示了 $[(M+NH_4)-NH_3]^+$ (m/z 663.7)片段的形成,特别是甾醇片段离子 $[(M+NH_4)-NH_3-FA]^+$ (m/z 383.4)

的形成,可鉴定该化合物为 18:2-菜油酯。对化合物 2 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 105.0704, m/z 147.1161, m/z 187.1481, m/z 189.1632, m/z 203.1788, m/z 243.2102, m/z 255.2110, m/z 283.2644, m/z 363.3059, m/z 395.3674, m/z 677.6236 等碎片离子峰(图 4b), m/z 395.3674 为豆甾醇特征峰, m/z 283.2644 为油酸($C_{18}H_{34}O_2$)特征峰, m/z 677.6236 为分子离子峰,与豆甾醇油酸酯分子质量相符,因此推断化合物 2 为豆甾醇油酸酯,分子式为 $C_{47}H_{80}O_2$ 。Tan 等^[21]以响应性、信噪比和线性度为选择标准研究植物甾醇酯的最佳特性离子,选择了 m/z 394, m/z 255, m/z 43 作为豆甾醇油酸酯的特征离子。对化合物 3 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 161.1331, m/z 175.1490, m/z 189.1631, m/z 203.1786, m/z 257.2258, m/z 261.2564, m/z 283.2622, m/z 315.3060, m/z 355.3364, m/z 397.3824, m/z 679.6389 等碎片离子峰(图 4c),其中 m/z

397.3824 为 β -谷甾醇特征峰, m/z 283.2622 为油酸($C_{18}H_{34}O_2$)特征峰, m/z 679.6389 为分子离子峰, 参考相关文献^[22], 与 β -谷甾醇油酸酯分子质量相

当, 因此推断化合物 3 为 β -谷甾醇油酸酯($C_{47}H_{82}O_2$)。

表 3 SE 一级质谱图表

Table 3 SE first-order mass spectrometry chart

编号	保留时间/min	实测质荷比(m/z) [M+H-FA] ⁺	理论质荷比(m/z)	甾核母离子	误差/ppm
1	28.470	383.3671	383.3672	C ₂₈ H ₄₇ ⁺	-0.3
2	30.470	395.3674	395.3672	C ₂₉ H ₄₇ ⁺	0.4
3	31.751	397.3824	397.3829	C ₂₉ H ₄₉ ⁺	-1.3

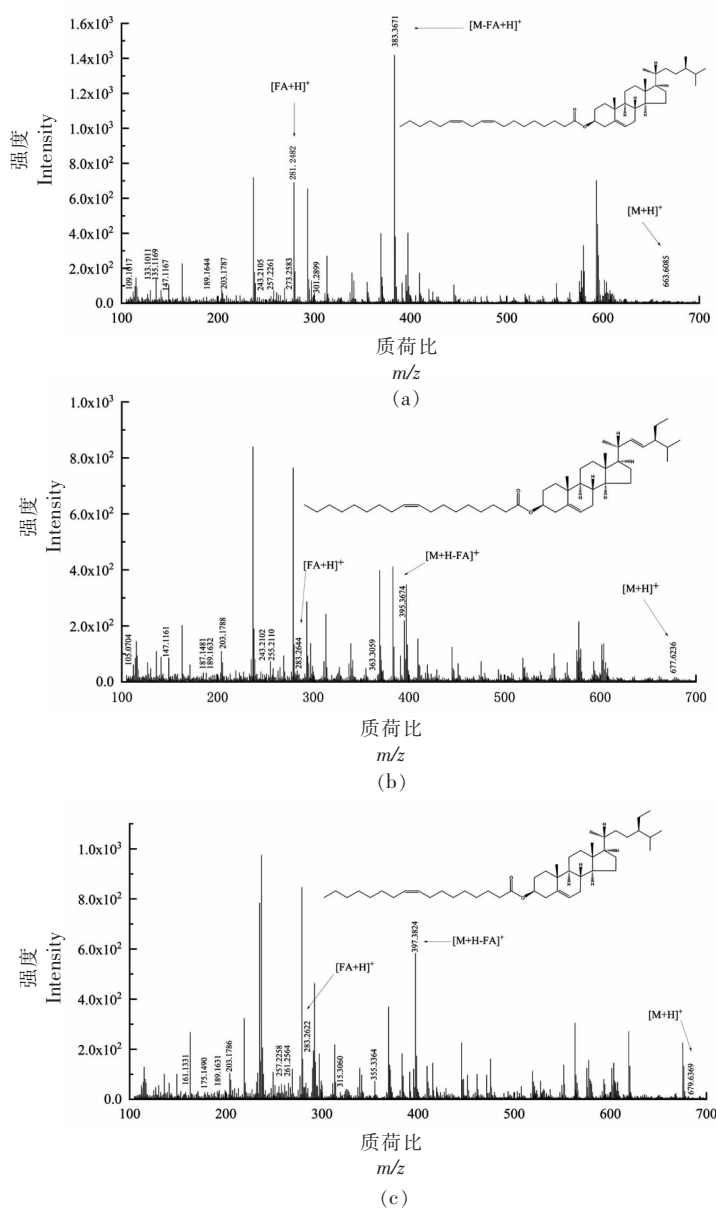


图 4 SE 各峰二级质谱图

Fig.4 Secondary mass spectrogram of each peak of SE

2.3.4 甾醇糖苷(SG)质谱解析 在 SG 的最常见形式中,糖单体(通常是 *D*-吡喃葡萄糖)连接到甾醇的 C3 羟基上,SG 可水解生成甾醇^[23]。SG 各峰具体信息见表 4,为获得更多结构信息,需对其进行二级质谱裂解分析。对化合物 1,裂解得到 m/z 109.1009, m/z 135.1164, m/z 161.1324, m/z 175.1482, m/z 189.1645, m/z 203.1794, m/z 215.1804, m/z 243.2099, m/z 257.2264, m/z 273.2574, m/z 301.2880, m/z 383.3674, m/z 563.4326 等碎片离子峰(图 5a),与相关文献^[24-25]比对,甾醇糖苷的甾核母离子为菜油甾醇, m/z 563.4326 为分子离子峰,因此推断化合物 1 为菜油甾醇葡萄糖苷($C_{34}H_{58}O_6$)。化合物 2 的 $[M+H-Glc]^+$ 离子峰 m/z 397.3832 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 107.0854, m/z 147.1164, m/z

161.132,0, m/z 189.1630, m/z 203.1787, m/z 215.1794, m/z 243.2099, m/z 257.2259, m/z 261.2568, m/z 287.2730, m/z 315.3052, m/z 397.3832, m/z 577.4461 等碎片离子峰(图 5b),结合相关文献^[24,26]其裂解规律与 β -谷甾醇相符合,甾醇糖苷的甾核母离子为 β -谷甾醇, m/z 577.4461 为分子离子峰,因此推断化合物 2 为 β -谷甾醇葡萄糖苷($C_{35}H_{60}O_6$)。Munger 等^[14]对以上 3 种甾醇糖苷的研究表明,MS/MS 谱中主要的特征峰为 m/z 147 和 m/z 161,表示它们的 Δ^5 结构,谷甾醇糖苷和菜油甾醇糖苷侧链的缺失导致的特征峰为 m/z 257,而豆甾醇糖苷的特征峰为 m/z 255 表示 C22 不饱和侧链。豆甾醇葡萄糖苷的进一步特征是 m/z 297 的显性出现,这是区分不饱和侧链甾醇和饱和侧链甾醇的另一个特征。

表 4 SG 一级质谱图表

Table 4 SG first-order mass spectrometry chart

编号	保留时间/min	实测质荷比(m/z)		理论质荷比(m/z)	甾核母离子	误差/ppm
		$[M+H-Glc]^+$				
1	18.810	383.3674	383.3672	383.3672	$C_{28}H_{47}^+$	0.6
2	20.041	397.3832	397.3829	397.3829	$C_{29}H_{49}^+$	0.8

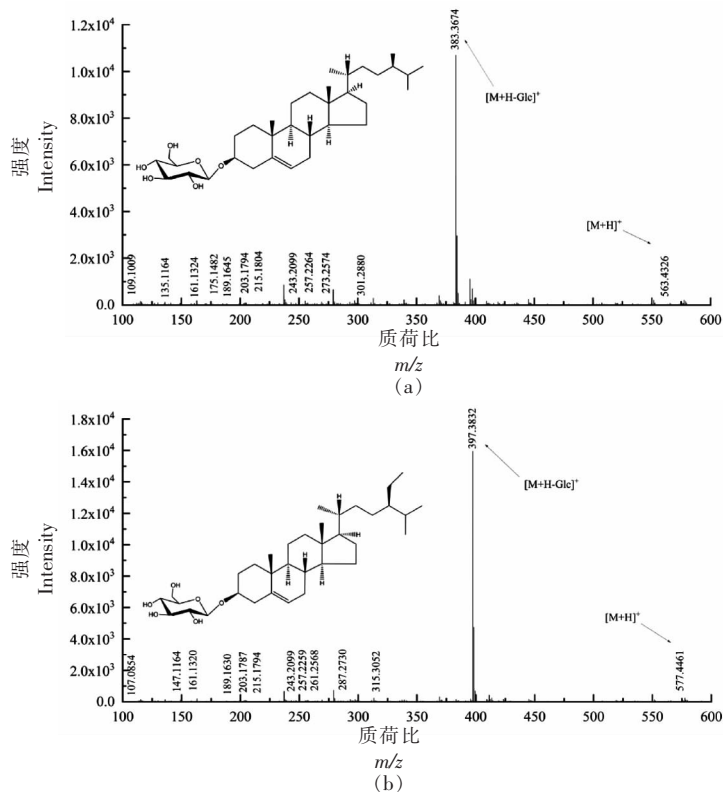


图 5 SG 各峰二级质谱图

Fig.5 Secondary mass spectrogram of each peak of SG

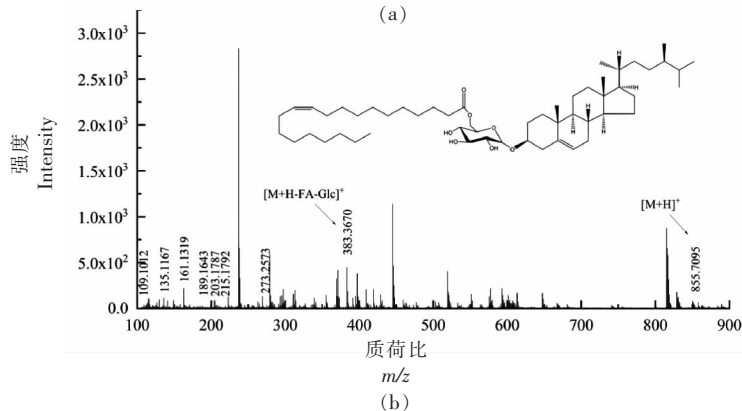
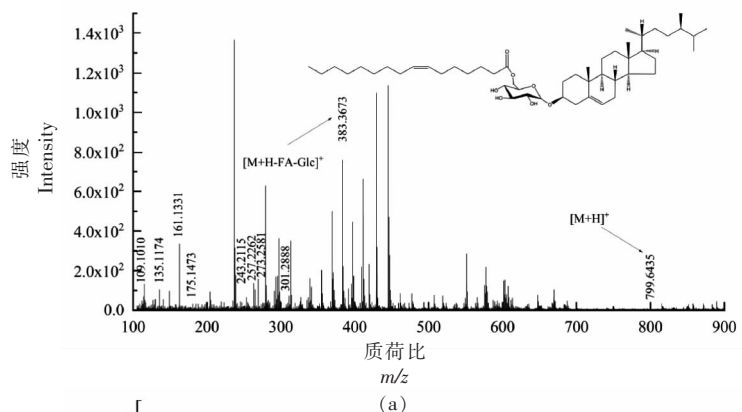
2.3.5 酰化甾醇糖苷(ASG)质谱解析 *D*-葡萄糖单体通过糖苷键与甾醇体中 C3 的羟基结合,糖部分的 C6 羟基进一步被脂肪酸酰化,从而形成 ASG。ASG 各峰具体信息见表 5,对化合物 1 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 109.1010, m/z 135.1174, m/z 161.1331, m/z 175.1473, m/z 243.2115, m/z 257.2262, m/z 273.2581, m/z 301.2888, m/z 383.3673, m/z 799.6435 等碎片离子峰(图 6a), m/z 383.3673 为 $[M+H-Glc-FA]^+$ 离子峰,甾核为菜油甾醇, m/z 799.6435 为分子离子峰 $[M+H]^+$, 因此推断化合物 1 为菜油甾醇葡萄糖苷棕榈油酸酯($C_{50}H_{86}O_7$)。Usuki 等^[27]在对发芽糙米麸皮中酰化甾醇糖苷结构分析中, m/z 818.3 的 MS/

MS 谱图中,前体离子(m/z 818.3)为[棕榈酰化菜油酯基 β -葡萄糖苷+ NH_4] $^+$, m/z 401.2 和 m/z 383.2 分别为[棕榈酰化 β -葡萄糖- H_2O+H] $^+$ 和[菜油甾醇- H_2O+H] $^+$ 。对化合物 2 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 109.1012, m/z 135.1167, m/z 161.1319, m/z 189.1643, m/z 203.1787, m/z 215.1792, m/z 273.2573, m/z 383.3670, m/z 855.7095 等碎片离子峰(图 6b), m/z 383.3670 为 $[M+H-Glc-FA]^+$ 离子峰,裂解规律同化合物 1,甾核为菜油甾醇, m/z 855.7095 为分子离子峰 $[M+H]^+$, 因此推断化合物 2 为菜油甾醇葡萄糖苷二十碳烯酸酯($C_{54}H_{94}O_7$)。对化合物 3 进行二级质谱裂解分析,得到 m/z 107.0852, m/z 147.1166, m/z 161.1318,

表 5 ASG 一级质谱图表

Table 5 ASG first-order mass spectrometry chart

编号	保留时间/min	实测质荷比(m/z) $[M+H-Glc-FA]^+$	理论质荷比(m/z)	甾核母离子	误差/ppm
1	17.934	383.3673	383.3672	$C_{28}H_{47}^+$	0.2
2	18.363	383.3670	383.3672	$C_{28}H_{47}^+$	-0.7
3	17.225	395.3676	395.3672	$C_{29}H_{47}^+$	1.0
4	31.490	397.3837	397.3829	$C_{29}H_{49}^+$	2.0
5	31.894	397.3829	397.3829	$C_{29}H_{49}^+$	0.0



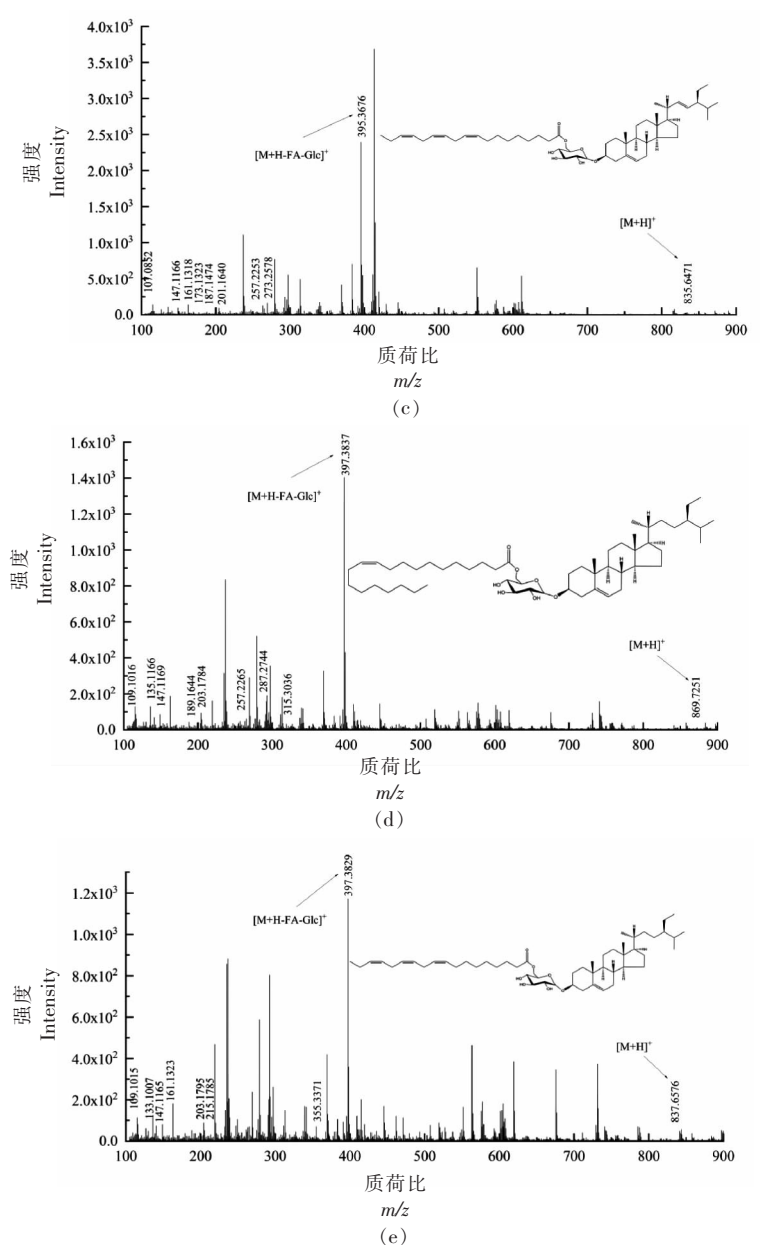


图 6 ASG 各峰二级质谱图

Fig.6 Secondary mass spectrogram of each peak of ASG

m/z 173.1323, m/z 187.1747, m/z 201.1640, m/z 257.2253, m/z 273.2578, m/z 395.3676, m/z 835.6471 等碎片离子峰 (图 6c), m/z 395.3676 为 $[M+H-Glc-FA]^+$ 离子峰, 甾核为豆甾醇, m/z 835.6471 为分子离子峰 $[M+H]^+$, 因此推断化合物 3 为豆甾醇葡萄糖苷亚麻酸酯 ($C_{53}H_{86}O_7$)。对化合物 4 进行二级质谱裂解分析, 得到 m/z 109.1016, m/z 135.1166, m/z 147.1169, m/z 189.1644, m/z 203.1784, m/z 257.2265, m/z 287.2744, m/z 313.3036, m/z 397.3837,

m/z 869.7251 等碎片离子峰 (图 6d), m/z 397.3837 为 $[M+H-Glc-FA]^+$ 离子峰, 其裂解规律与 β -谷甾醇相符, 甾核为 β -谷甾醇, m/z 869.7251 为分子离子峰 $[M+H]^+$, 因此推断化合物 4 为 β -谷甾醇葡萄糖苷二十碳烯酸酯 ($C_{55}H_{96}O_7$)。对化合物 5 进行二级质谱裂解分析, 得到 m/z 109.1015, m/z 133.1007, m/z 147.1165, m/z 161.1323, m/z 203.1795, m/z 215.1785, m/z 355.3371, m/z 397.3829, m/z 837.6576 等碎片离子峰 (图 6e), m/z 397.3829 为

$[M+H-Glc-FA]^+$ 离子峰, 甾核为 β -谷甾醇, m/z 837.6576 为分子离子峰 $[M+H]^+$, 因此推断化合物 5 为 β -谷甾醇葡萄糖苷亚麻酸酯 ($C_{53}H_{88}O_7$)。Yamauchi 等^[28]采用 LC-MS 法从红甜椒中检测出 β -谷甾醇基(6'-O-亚麻酸酰基)葡萄糖苷, 得到如下质谱数据 m/z 859($[M+Na]^+$), m/z 411($[C_{29}H_{47}O]^+$), m/z 397($[C_{29}H_{49}]^+$), m/z 215($[C_{16}H_{23}]^+$), m/z 261($[R]^+$), $[R]^+$ 为脂酰部离子。其裂解规律与化合物 5 基本符合, m/z 859($[M+Na]^+-Na+H$)即为 m/z 837($[M+H]^+$)。

3 结论

本研究采用固相萃取法(SPE)分离花菜中 4 种结合状态的植物甾醇, 再用 UPLC-Triple-TOF/MS 法分析鉴定其甾醇的种类与结构。结果表明, 通过紫外分光光度法粗测花菜中甾醇含量为 (5.034 ± 0.097) mg/g。固相萃取法分离纯化 4 种结合状态的甾醇最佳洗脱条件为 6 mL 己烷-乙醚(99:1)洗脱 SE, 6 mL 己烷-乙醚(85:15)洗脱 FS, 6 mL 庚烷-异丙醇(92:8)洗脱 ASG, 7 mL 庚烷-异丙醇(85:15)洗脱 SG。在最佳洗脱条件下得到的甾醇的洗脱量分别为 SE: (334.69 ± 18.09) μ g, FS: (695.64 ± 31.50) μ g, ASG: (1856.69 ± 38.22) μ g, SG: (828.66 ± 32.78) μ g。花菜中主要含有的游离甾醇(FS)有豆甾醇、菜油甾醇、羽扇豆醇、 β -谷甾醇, 含有的甾醇酯(SE)有菜油甾醇亚油酸酯、豆甾醇油酸酯、 β -谷甾醇油酸酯, 含有的甾醇糖苷(SG)有菜油甾醇葡萄糖苷、 β -谷甾醇葡萄糖苷, 含有的酰化甾醇糖苷(ASG)有菜油甾醇葡萄糖苷棕榈油酸酯、菜油甾醇葡萄糖苷二十碳烯酸酯、豆甾醇葡萄糖苷亚麻酸酯、 β -谷甾醇葡萄糖苷二十碳烯酸酯、 β -谷甾醇葡萄糖苷亚麻酸酯。

参 考 文 献

- [1] 刘运霞, 王晓武. 我国花椰菜种质资源及育种研究现状[J]. 北方园艺, 2010(19): 218-220.
LIU Y X, WANG X W. Current status of cauliflower germplasm resources and breeding research in China[J]. NORTHERN HORTICULTURE, 2010(19): 218-220.
- [2] 朱焕焕. 我国花椰菜种业发展现状、市场需求及研究热点综述[J]. 蔬菜, 2019(4): 30-35.
- [3] 谢述琼, 何珺, 何军. 9 种十字花科蔬菜食用部位中萝卜硫素含量研究[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(3): 460-463.
XIE S Q, HE J, HE J. Determining sulforaphane contents in edible parts of nine cruciferous vegetables[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2013, 40(3): 460-463.
- [4] 孙勃, 许映君, 袁高峰, 等. 花椰菜主要生物活性物质及其抗氧化能力分析[J]. 核农学报, 2010, 24(2): 330-335.
SUN B, XU Y J, YUAN G F, et al. Bioactive compounds and their antioxidant capacity in cauliflower[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2010, 24(2): 330-335.
- [5] PIIRONEN V, TOIVO J, PUUPPONEN-PIMIÄ R, et al. Plant sterols in vegetables, fruits and berries[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83(4): 330-337.
- [6] 葛志伟, 罗自生. 食品中植物甾醇的色谱分析方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 773-778.
GE Z W, LUO Z S. Research progress of chromatographic analysis of phytosterols in foods[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(3): 773-778.
- [7] HAN J H, YANG Y X, FENG M Y. Contents of Phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2008, 21(6): 449-453.
- [8] 卢婧霞, 郑祖国, 徐志猛, 等. 植物甾醇降血脂机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4552-4559.
LU J X, ZHENG Z G, XU Z M, et al. Advances in research on hypolipidemic mechanism of phytosterols[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(21): 4552-4559.
- [9] AWAD A B, FINK C S, WILLIAMS H, et al. *In vitro* and *in vivo* (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells[J]. European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP), 2001, 10

- (6): 507-513.
- [10] ALDINI R, MICUCCI M, CEVENINI M, et al. Anti-inflammatory effect of phytosterols in experimental murine colitis model: Prevention, induction, remission study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): 1-16.
- [11] 高瑀珑, 唐瑞丽, 袁先雯, 等. 植物甾醇在大豆油储藏过程中抗氧化作用的研究[J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(11): 74-80.
- GAO Y L, TANG R L, YUAN X W, et al. Research on the antioxidant effect of phytosterols in the storage of soybean oil[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2016, 31(11): 74-80.
- [12] FENG S M, BELWAL T, LI L, et al. Phytosterols and their derivatives: Potential health-promoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(4): 1243-1267.
- [13] 王东晖, 张玥, 范蓓, 等. 气相色谱-质谱联用法分析不同产地豆类中植物甾醇形态及含量[J]. *农产品质量与安全*, 2017(3): 21-27.
- WANG D H, ZHANG Y, FAN B, et al. Analysis of phytosterol forms and contents in beans of different origins by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Agricultural Product Quality and Safety*, 2017(3): 21-27.
- [14] MÜNGER L H, BOULOS S, NYSTRÖM L. UPLC-MS/MS based identification of dietary steryl glucosides by investigation of corresponding free sterols[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6: 1-19.
- [15] 刘春平. 铜藻中植物甾醇类成分的提取与分离方法研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017.
- LIU C P. Extraction and separation of hystosterols from sargassum horneeri[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2017.
- [16] MO S, DONG L, HURST W J, et al. Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Lipids*, 2013, 48(9): 949-956.
- [17] KHATAL L, MORE H. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of lupeol in plasma and its application to pharmacokinetic study in rats[J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1121: 58-65.
- [18] SCHOLZ B, MENZEL N, LANDER V, et al. An approach based on ultrahigh performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry allowing the quantification of both individual phytosteryl and phytostanyl fatty acid esters in complex mixtures[J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1429: 218-229.
- [19] BARNSTEINER A, ESCHE R, DI GIANVITO A, et al. Capillary gas chromatographic analysis of complex phytosteryl/-stanyl ester mixtures in enriched skimmed milk-drinking yoghurts[J]. *Food Control*, 2012, 27(2): 275-283.
- [20] ROCHA J M, KALO P J, OLLILAINEN V, et al. Separation and identification of neutral cereal lipids by normal phase high-performance liquid chromatography, using evaporative light-scattering and electrospray mass spectrometry for detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(18): 3013-3025.
- [21] TAN S, NIU Y, LIU L, et al. Development of a GC-MS/SIM method for the determination of phytosteryl esters[J]. *Food Chemistry*, 2019, 281: 236-241.
- [22] SCHOLZ B, BARNSTEINER A, FEIST K, et al. Analysis of phytostanyl fatty acid esters in enriched foods via UHPLC-APCI-MS[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(19): 4268-4275.
- [23] SCHRICK K, SHIVA S, ARPIN J C, et al. Steryl glucoside and acyl steryl glucoside analysis of arabidopsis seeds by electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Lipids*, 2012, 47(2): 185-193.
- [24] GUTIÉRREZ A, DEL RÍO J C. Gas chromatography/mass spectrometry demonstration of steryl glycosides in eucalypt wood, Kraft pulp and process liquids[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001, 15(24): 2515-2520.
- [25] YU S, ZHANG Y, RAN Y, et al. Characterization of steryl glycosides in marine microalgae by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (GC-QQQ-MS)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(4): 1574-1583.
- [26] WEWER V, DOMBRINK I, VOM DORP K, et al. Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Lipid Research*, 2011, 52(5): 1039-1054.
- [27] USUKI S, ARIGA T, DASGUPTA S, et al. Structural analysis of novel bioactive acylated steryl glucosides in pre-germinated brown rice bran[J]. *Jour-*

nal of Lipid Research, 2008, 49(10): 2188–2196.
[28] YAMAUCHI R, AIZAWA K, INAKUMA T, et al.
Analysis of molecular species of glycolipids in fruit
pastes of red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) by

high-performance liquid chromatography-mass spec-
trometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chem-
istry, 2001, 49(2): 622–627.

Identification of Free and Bound Phytosterols in Cauliflower by Solid Phase Extraction Combined with UPLC-Triple-TOF/MS

Feng Simin^{1,2,3}, Wu Sijie¹, Jiang Jiaping¹, Liao Jie³, Sun Peilong^{1,2}, Shao Ping^{1,2*}

¹College of Food Science and Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014

²Key Laboratory of Processing Technology of Food Macromolecule Resources in China Light Industry

(Zhejiang University of Technology), Hangzhou 310014

³Zhejiang Huacai Testing Technology Co. LTD, Shaoxing 311800, Zhejiang)

Abstract Phytosterols have been widely concerned for their efficacy in lowering cholesterol, anti-tumor, anti-inflammatory and anti-oxidation. In order to find out the composition of phytosterols in cauliflower, both free and three kinds of conjugated phytosterols were separated by solid phase extraction, and then the species and structure of phytosterols in cauliflower were identified and analyzed by UPLC-Triple-TOF/MS. The results showed that the free phytosterol (FS) in cauliflower were stigmasterol, campesterol, lupeol and β -sitosterol. Campesterol linoleate, stigmasterol oleate and β -sitosterol oleate were identified as three phytosterol esters (SE). Campesterol glucoside and β -sitosterol glucoside were identified as phytosterol glycosides (SG). Acylated sterol glycosides (ASG) include campesterol glucoside palm oleyl ester, campesterol glucoside eicosapentaenoic acid ester, stigmasterol glucoside linolenic acid ester, β -sitosterol glucoside eicosapentaenoic acid ester and β -sitosterol glucoside linolenic acid ester.

Keywords cauliflower; phytosterols; solid phase extraction; UPLC-MS