

成分分析

C₃₀-HPLC-PDA-TOF/MS 对鱼肝油中 维生素 A 酯顺反异构体的分离与鉴定*

顾霄¹, 李煜¹, 赵明娟², 郑金琪^{1**}

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2. 浙江工业大学, 杭州 310014)

摘要 目的: 建立高效液相色谱/飞行时间质谱法对鱼肝油中不同维生素 A 酯的顺反异构体进行分离鉴定。方法: 选择 YMC C₃₀ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲基叔丁基醚-甲醇-水为流动相梯度洗脱, 对鱼肝油中各种维生素 A 酯进行分离, 结合电喷雾正离子化/飞行时间质谱法进行结构推断。并通过对照品比对应方法, 对分离得到的顺反异构体做构型鉴定。结果: 在本试验研究的 2 种样品中, 鳕鱼肝油胶囊中主要含有全反式与 13-顺式维生素 A 棕榈酸酯, 鲨鱼肝油中主要含有全反式与 13-顺式维生素 A 油酸酯、棕榈酸酯与硬脂酸酯, 以及全反式花生烯酸酯与十七烷酸酯。结论: 本方法能有效地分离鉴定鱼肝油中的多种全反式与 13-顺式维生素 A 酯, 可为鱼肝油质量控制提供参考依据。

关键词: 高效液相色谱/飞行时间质谱; C₃₀ 色谱柱; 鱼肝油; 全反式维生素 A 酯; 13-顺式维生素 A 酯; 异构化反应; 结构鉴定

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2019)12-2228-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.12.15

Separation and identification of *cis-trans* isomers of retinyl esters in fish liver oil by C₃₀-HPLC-PDA-TOF/MS*

GU Xiao¹, LI Yu¹, ZHAO Ming-juan², ZHENG Jin-qi^{1**}

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China;

2. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC-TOF/MS method for the separation and identification of *cis-trans* isomers of retinyl esters in fish liver oil. **Methods:** The retinyl esters were separated by gradient elution with a mobile phase of MTBE-methanol-water on a YMC C₃₀ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The structures of retinyl esters in fish liver oil were elucidated by ESI⁺-TOF/MS and by comparing with reference substances. **Results:** Cod liver oil capsule contain all-*trans* and 13-*cis* retinyl palmitate. Shark liver oil contains all-*trans* retinyl oleate, retinyl palmitate, retinyl stearate, retinyl gondoate, retinyl heptadecanoate and 13-*cis* retinyl

* 2019 年度浙江省公益技术研究项目(LGF19H300001)

** 通信作者 Tel:(0571)86459413; E-mail: jingqizheng@hotmail.com

第一作者 Tel:(0571)86459413; E-mail: guxiaonj@aliyun.com

oleate, retinyl palmitate, retinyl stearate. **Conclusion:** The established method is useful for the separation and identification of all-*trans* and 13-*cis* retinyl esters in fish liver oil. The results obtained are valuable for its manufacturing process and quality control.

Keywords: HPLC-PDA-TOF/MS; C₃₀ column; fish liver oil; all-*trans* retinyl ester; 13-*cis* retinyl ester; isomerization reaction; structure identification

鱼肝油是从鳕鱼或鲨鱼等深海鱼肝脏中提取的一种脂肪油,其中富含维生素 A^[1-2]。维生素 A 是一系列包括视黄醇、视黄醛、视黄酸和视黄醇酯等在内的视黄醇衍生物的统称,对细胞分化、胚胎发育、视觉感受等多个生理功能发挥重要作用^[3]。鱼肝油中的维生素 A 主要以视黄醇高级脂肪酸酯的形式存在^[4],并包含多种顺反异构体,以全反式构型为主,还包括 13-顺式^[5],9-顺式与 9,13-顺式构型^[6]等(图 1)。不同构型的维生素 A 生物活性不同,全反式最高,13-顺式、9-顺式与 9,13-顺式构型的活性分别约为全反式的 75%、19% 与 16%^[7]。美国等国药典^[2,8-9]均按全反式构型计算鱼肝油中维生素 A 的含量,很可能造成其实际活性低于理论值。因此,建立一个可以分离鉴定鱼肝油中维生素 A 酯顺反异构体的分析方法对于鱼肝油的质量控制有着重要意义。

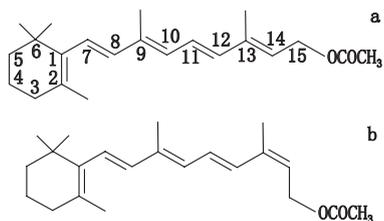


图 1 全反式维生素 A 醋酸酯(a)与 13-顺式维生素 A 醋酸酯(b)结构
Fig. 1 Chemical structures of all-*trans* retinyl acetate (a) and 13-*cis* retinyl acetate (b)

目前,用于维生素 A 分离检测的色谱柱固定相包括硅胶、C₁₈ 及 C₃₀ 等。其中正相硅胶柱多用于视黄醇异构体的分离^[10-12]。C₁₈ 柱也常用于维生素 A 的分析,在此前的研究中,本实验室采用 C₁₈ 柱分离鉴定了 3 种鱼肝油中共 16 种维生素 A 酯^[13],但 C₁₈ 柱对异构体的分离能力较弱^[12]。C₃₀ 色谱柱又被称为类胡萝卜素色谱柱(Carotenoid 色谱柱),在类胡萝卜素及其异构体的分离上有独特的优势,原因在于 C₃₀ 键合相的链长大致与胡萝卜素分子的长度相当,增强了两者的相互选择性^[14]。由于维生素 A 与类

胡萝卜素结构相似,也有文献采用 C₃₀ 柱对维生素 A 做分离,同时分离了 5 种维生素 A 酯及对应的 α 异构体^[15]。由于不同构型维生素 A 酯的紫外最大吸收波长各不相同,紫外光谱鉴别^[12]也是维生素 A 构型鉴别的常用方法之一。

本研究采用 C₃₀ 色谱柱,以甲基叔丁基醚-甲醇-水为流动相,结合对照品比对和飞行时间质谱(TOF/MS)法,对 2 种鱼肝油样品中 8 种维生素 A 酯做了分离与结构鉴定,其中包含 3 组顺反异构体。通过氧化破坏及 13-顺式维生素 A 酯对照品比对等方法对顺式异构体进行研究,结果表明顺式异构体均为 13-顺式构型。本方法可为鱼肝油质量控制提供参考依据。

1 材料与方法

LC-20AD 高效液相色谱仪(岛津公司); 1290 Infinity 液相色谱-6538Q TOF 四极杆飞行时间质谱仪(安捷伦公司)。

鳕鱼肝油胶囊由企业 A 提供,鲨鱼肝油由企业 B 提供。甲基叔丁基醚与甲醇为色谱纯,自制纯化水。全反式维生素 A 醋酸酯(批号 100368-201502)购自中国食品药品检定研究院。13-顺式维生素 A 醋酸酯(批号 11-GJF-32-2)、全反式维生素 A 油酸酯(批号 14-THT-179-1)、全反式维生素 A 棕榈酸酯(批号 2-MWC-189-1)与全反式维生素 A 硬脂酸酯(批号 23-CF-173-3)均购自 Toronto Research Chemicals。

2 实验条件

2.1 液相色谱条件 采用 YMC C₃₀ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱;流动相为甲醇(A)-水(B)-甲基叔丁基醚(C),梯度洗脱,见表 1;流速为 1.0 mL · min⁻¹;检测波长 328 nm;柱温为 40 $^{\circ}$ C;进样量为 20 μ L。

2.2 质谱条件 采用电喷雾正离子化(ESI⁺)检测,喷雾电压 4.0 kV,雾化气压力 0.24 MPa,干燥气流量 10 L · min⁻¹,去溶剂温度 350 $^{\circ}$ C,碎片电压 175 V。质量数扫描范围 m/z 100~1 000。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (time) /min	A-B (90 : 10) /%	C /%
0	75	25
15	75	25
45	20	80
50	20	80
50.1	75	25
60	75	25

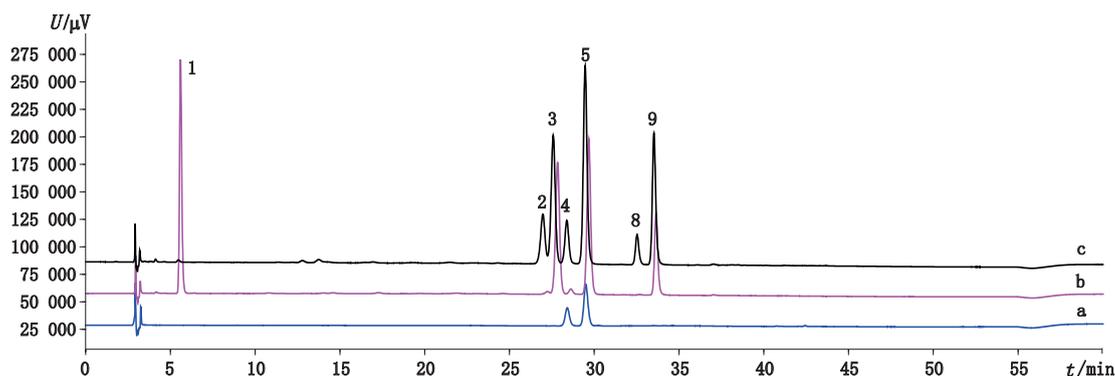
2.3 供试品溶液与对照品溶液 取鱼肝油胶囊内容物或鱼肝油约 0.5 g, 置 50 mL 量瓶中, 加异丙醇适量, 超声 5 min (360 W, 40 kHz), 用异丙醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。取维生素 A 酯对照品各约 5 mg, 分别置 100 mL 量瓶中, 加异丙醇适量, 超声 5 min (360 W, 40 kHz), 用异丙醇稀

释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.4 氧化破坏溶液 取全反式维生素 A 酯对照品约 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加碘试液 1 滴, 超声 10 min (360 W, 40 kHz), 用异丙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为氧化破坏溶液。

3 结果与讨论

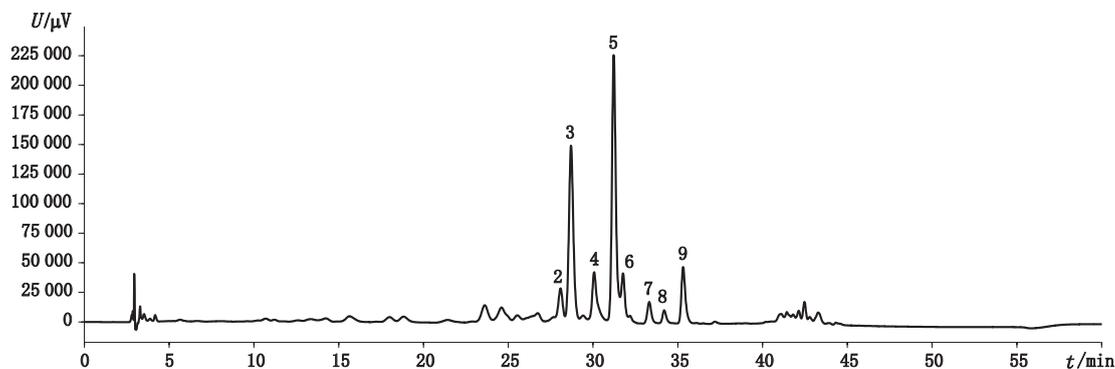
3.1 维生素 A 酯的分离 按照“2.1”项下的条件分别对供试品溶液、对照品溶液与氧化破坏溶液进行分析, 结果见图 2、3, 表明本试验考察的鳕鱼肝油胶囊含有全反式维生素 A 棕榈酸酯、鲨鱼肝油含全反式维生素 A 油酸酯、棕榈酸酯与硬脂酸酯。此外, 两者还有多个未知维生素 A 酯峰, 需做进一步鉴定, 其中峰 2、4、8 分别为对应全反式维生素 A 油酸酯、棕榈酸酯与硬脂酸酯的氧化破坏产物。各色谱峰的紫外最大吸收波长见表 2。



1. 全反式维生素 A 醋酸酯 (all-*trans* retinyl acetate) 2. 全反式维生素 A 油酸酯氧化产物 (oxidation degradation product of all-*trans* retinyl oleate) 3. 全反式维生素 A 油酸酯 (all-*trans* retinyl oleate) 4. 全反式维生素 A 棕榈酸酯氧化产物 (oxidation degradation product of all-*trans* retinyl palmitate) 5. 全反式维生素 A 棕榈酸酯 (all-*trans* retinyl palmitate) 8. 全反式维生素 A 硬脂酸酯氧化产物 (oxidation degradation product of all-*trans* retinyl stearate) 9. 全反式维生素 A 硬脂酸酯 (all-*trans* retinyl stearate)

图 2 鳕鱼肝油胶囊 (a)、对照品 (b) 与氧化破坏溶液 (c) 的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of cod liver oil capsule (a), reference substances (b) and oxidation degradation solution (c)



- 2~5、8~9. 同图 2 (same as Fig. 2) 6. 全反式维生素 A 花生烯酸酯 (all-*trans* retinyl gondoate) 7. 全反式维生素 A 十七烷酸酯 (all-*trans* retinyl heptadecanoate)

图 3 鲨鱼肝油的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of shark liver oil

表 2 鱼肝油中维生素 A 酯的色谱 - 质谱鉴定结果

Tab. 2 Retinyl esters identified in fish liver oil by HPLC- TOF/MS

编号 (No.)	λ_{\max}/nm	测得质量 (observed mass)	理论质量 (calculated mass)	推测分子式 (proposed formula)	质量误差 (mass error) / $\times 10^{-6}$	维生素 A 酯类型 (proposed retinyl ester)
2	328	550.475 0	550.474 4	$\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_2$	-1.0	13- 顺式维生素 A 油酸酯 (13- <i>cis</i> retinyl oleate)
3	325	550.474 3	550.474 4	$\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_2$	0.24	全反式维生素 A 油酸酯 (all- <i>trans</i> retinyl oleate)
4	328	524.457 1	524.458 8	$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_2$	3.2	13- 顺式维生素 A 棕榈酸酯 (13- <i>cis</i> retinyl palmitate)
5	325	524.458 1	524.458 8	$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_2$	1.3	全反式维生素 A 棕榈酸酯 (all- <i>trans</i> retinyl palmitate)
6	325	578.507 6	578.505 7	$\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{O}_2$	-3.2	全反式维生素 A 花生烯酸酯 (all- <i>trans</i> retinyl gondoate)
7	325	538.474 0	538.474 4	$\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{O}_2$	0.80	全反式维生素 A 十七烷酸酯 (all- <i>trans</i> retinyl heptadecanoate)
8	328	552.494 2	552.490 1	$\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{O}_2$	-7.5	13- 顺式维生素 A 硬脂酸酯 (13- <i>cis</i> retinyl stearate)
9	325	552.490 0	552.490 1	$\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{O}_2$	0.15	全反式维生素 A 硬脂酸酯 (all- <i>trans</i> retinyl stearate)

3.2 维生素 A 酯的质谱鉴定 根据此前建立的质谱分析方法^[13], 首先通过 ESI⁺- TOF/MS 对全反式维生素 A 棕榈酸酯对照品做一级质谱分析, 结果见图 4。一级质谱中主要产生 m/z 269, 524 与 563 3 个信号峰, m/z 269 为源内裂解脱去棕榈酸的加氢离子 ($\text{C}_{20}\text{H}_{29}^+$, 质量误差 -0.8×10^{-6}), 为维生素 A 酯的特征离子, 与文献^[15]报道情况一致; m/z 524 与 563 分别为维生素 A 棕榈酸酯的脱电子离子 ($\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_2^+$, 质量误差 1.8×10^{-6}) 与加钾离子 ($\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_2\text{K}^+$, 质量误差 -1.6×10^{-6})。以上质谱特征对于推测未知维生素 A 酯提供了参考依据。

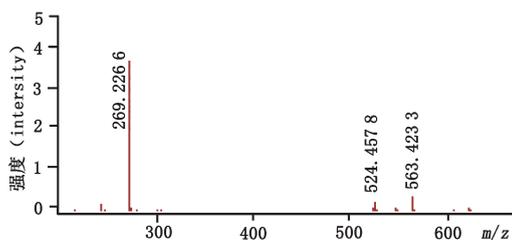


图 4 全反式维生素 A 棕榈酸酯的一级质谱图
Fig. 4 MS spectra of all-*trans* retinyl palmitate

之后以同样条件对全反式维生素 A 棕榈酸酯的氧化破坏产物做一级质谱分析, 其质谱图与全反式维

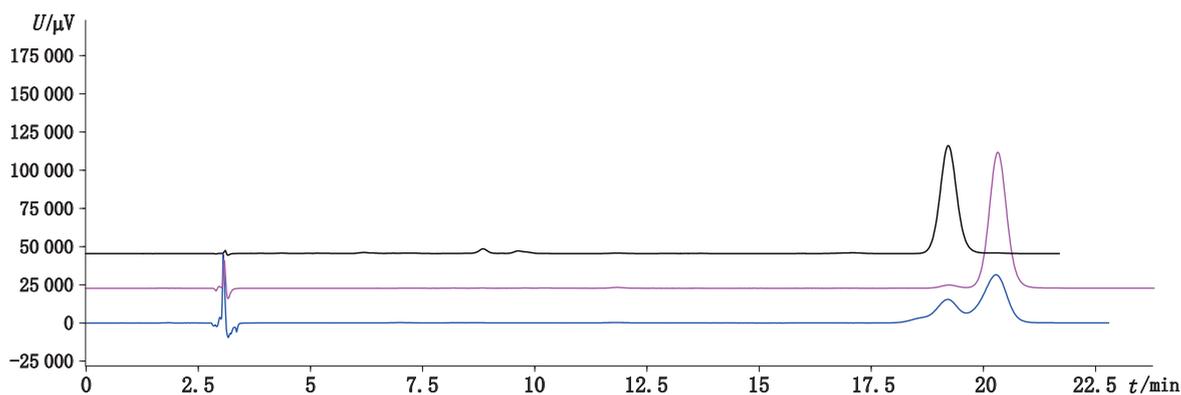
生素 A 棕榈酸酯相同, 说明氧化破坏产物是全反式维生素 A 酯的某种异构体。以 m/z 269 与 524 为母离子, 分别对全反式维生素 A 棕榈酸酯与其氧化产物做二级质谱分析, 结果发现两者二级质谱图均相同, 未发现特征子离子, 进一步说明氧化产物很可能为某种顺反异构体。

最后用同样的方法对供试品溶液做一级质谱分析, 提取每个色谱峰的质谱图, 其中均有 m/z 269 离子, 表明色谱图中标注的色谱峰均为维生素 A 酯峰。并根据分子离子精确分子量, 结合维生素 A 酯的结构特征, 如组成元素为 C、H、O, O 原子数为 2, 最小不饱和度为 7 等, 推测相应分子式。相关色谱质谱数据, 推测分子式、以及推测维生素 A 酯类型见表 2。峰 3、5、9 的保留时间、分子式与 PDA 紫外最大吸收波长分别与全反式维生素 A 油酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯一致。峰 2、4、8 的分子式分别与维生素 A 油酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯一致, PDA 紫外最大吸收波长与 13- 顺式维生素 A 醋酸酯对照品相同, 均为 328 nm。而峰 6 和峰 7 的分子式分别与维生素 A 花生烯酸酯与十七烷酸酯相应, 紫外最大吸收波长均为 325 nm, 与全反式维生素 A 对照品相同, 推测为全反式构型。

3.3 顺反异构体的鉴别 根据文献报道, 鱼肝油中

维生素 A 以全反式构型为主, 13- 顺式构型其次^[16], 结合“3.1”、“3.2”项下的色谱光谱质谱信息, 推测 2 种鱼肝油样品中的维生素 A 酯异构体对应的是 13- 顺式构型。由于市售 13- 顺式维生素 A 酯对照品仅为醋酸酯, 无法直接比对, 但有文献报道全反式维生素 A 在加碘氧化破坏条件下会产生 13- 顺式产物^[17]。因此, 本试验将全反式维生素 A 醋酸酯对照品按“2.4”项条件做氧化破坏, 按“2.1”项下条件[流动相改为甲醇-水(85:15)]进行液相分析, 将破坏产物与 13- 顺式维生素 A 醋酸酯对照品做比对,

结果表明两者保留时间一致(图 5)。同时比较 PDA 图发现(图 6), 全反式与 13- 顺式维生素 A 醋酸酯对照品的紫外最大吸收分别为 325 nm 与 328 nm, 与文献报道^[12]一致, 而氧化破坏产物的最大吸收也为 328 nm。综合以上光谱、色谱与质谱信息, 推测全反式维生素 A 酯在“2.4”项条件下的破坏产物为 13- 顺式构型, 与峰 2、4、8 对应。因此, 峰 2、4、8 分别为 13- 顺式维生素 A 油酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯。该异构化反应属于自由基加成反应, 反应机理见图 7。



a. 全反式维生素 A 醋酸酯氧化破坏溶液 (oxidation degradation solution of all-*trans* retinyl acetate) b. 全反式维生素 A 醋酸酯 (all-*trans* retinyl acetate) c. 13- 顺式维生素 A 醋酸酯 (13-*cis* retinyl acetate)

图 5 维生素 A 醋酸酯的高效液相色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of retinyl acetate

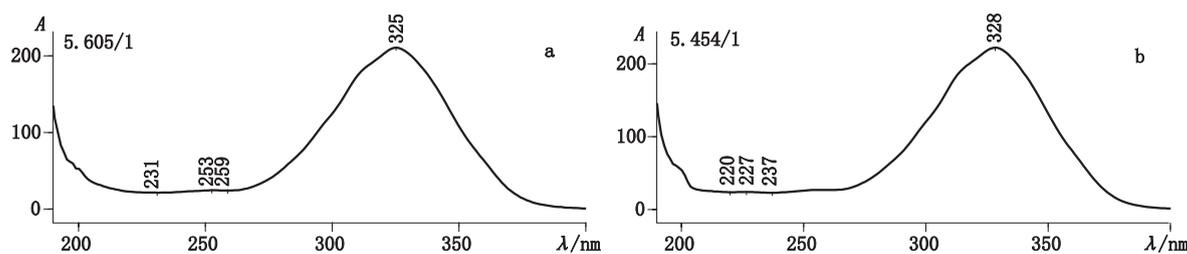


图 6 全反式维生素 A 醋酸酯 (a) 与 13- 顺式维生素 A 醋酸酯 (b) 紫外光谱图

Fig. 6 UV spectra of all-*trans* retinyl acetate (a) and 13-*cis* retinyl acetate (b)

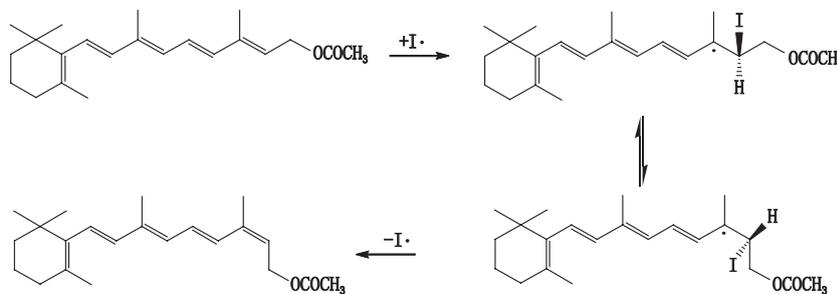


图 7 维生素 A 醋酸酯异构化反应机理

Fig. 7 Isomerization mechanism of retinyl acetate

4 结论

本研究采用 C₃₀ 色谱柱,以甲基叔丁基醚-甲醇-水为流动相,对 2 种鱼肝油样品中的 8 种维生素 A 酯做了分离,采用光谱、色谱、质谱等方法对进行定性分析,并通过氧化破坏方法制备 13- 顺式异构体进行比对。鳕鱼肝油胶囊中主要含有全反式与 13- 顺式维生素 A 棕榈酸酯,鲨鱼肝油中主要含有全反式与 13- 顺式维生素 A 油酸酯、棕榈酸酯与硬脂酸酯等。按面积归一化法计算,2 种样品中 13- 顺式维生素 A 分别约占总量的 31% 与 17%,其维生素 A 的实际活性分别约为理论值的 92% 与 96%,说明了对维生素 A 异构体检查与控制的必要性,本方法可为鱼肝油质量控制提供参考依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 686
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 686
- [2] USP 39-NF34[S]. 2016: 3276
- [3] MAJCHRZAK D, FABIAN E, ELMADFA I. Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals[J]. Food Chem, 2006, 98(4): 704
- [4] HAYES E, PETITPIERRE MA. Neovitamin A and vitamin A alcohol in commercial fish liver oils and vitamin A concentrates[J]. J Pharm Pharmacol, 1952, 4(1): 879
- [5] BAXTER JG. A new vitamin A[J]. Nature, 1945, 155: 300
- [6] BROWN PS, BLUM WP, STERN MH. Isomers of vitamin A in fish liver oils[J]. Nature, 1959, 184(4696): 1377
- [7] WEISER H, SOMORJAI G. Bioactivity of *cis* and *dicis* isomers of vitamin A esters[J]. Int J Vitam Nutr Res, 1992, 62(3): 201
- [8] EP 9. 0[S]. 2016: 2151
- [9] JP XVII[S]. 2016: 745
- [10] BRINKMANN E, DEHNE L, OEI HB, *et al.* Separation of geometrical retinol isomers in food samples by using narrow-bore high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1995, 693(2): 271
- [11] FAVARO RM, IHA MH, BIANCHI ML. Liquid chromatographic determination of geometrical retinol isomers and carotene in enteral feeding formulas[J]. J Chromatogr A, 2003, 1021(1-2): 125
- [12] STANCHER B, ZONTA F. Comparison between straight and reversed phases in the high-performance liquid chromatographic fractionation of retinol isomers[J]. J Chromatogr A, 1982, 234(1): 244
- [13] 顾霄, 李煜. 非水反相色谱-飞行时间质谱法对鱼肝油中维生素 A 酯的分离与鉴定[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 181
GU X, LI Y. Separation and identification of retinyl esters in fish liver oil by NARP-TOF/MS[J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(1): 181
- [14] 惠伯棣, 张西, 文镜. 反相 C₃₀ 柱在 HPLC 分析类胡萝卜素中的应用[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 264
HUI BD, ZHANG X, WEN J. Reverse-phase C₃₀ HPLC used in analysis of carotenoids[J]. Food Sci, 2005, 26(1): 264
- [15] GOETZ HJ, KOPEC RE, RIEDL KM, *et al.* An HPLC-MS/MS method for the separation of α -retinyl esters from retinyl esters.[J]. J Chromatogra B, 2016, 1029: 68
- [16] DALVI PD, MORTON RA. Studies in vitamin A. XVI. Preparation of neovitamin A esters and neoretinene[J]. Biochem J, 1951, 50(1): 43
- [17] RANDO RR, CHANG A. Studies on the catalyzed interconversions of vitamin A derivatives[J]. J Am Chem Soc, 1983, 105(9): 2879

(本文于 2018 年 9 月 9 日收到)