

基于质谱裂解规律和 UPLC-Q-TOF 技术的 玛咖酰胺类化合物筛查检测

房艳^{1,2}, 李婷¹, 高俊海^{1,2}, 肖进进¹

(1. 谱尼测试集团股份有限公司, 北京 100095) (2. 谱尼测试集团北京科学技术研究院有限公司, 北京 100095)

摘要:本研究基于电荷或游离基中心诱导理论归纳了典型苄基和间甲氧苄基玛咖酰胺类化合物的 UPLC-Q-TOF 质谱裂解规律, 搭建了定性筛查谱库, 同时建立了 4 种玛咖酰胺的定量检测技术。谱库包括保留时间、准分子离子及碎片离子的质荷比和分子结构等相关信息。结果表明, 玛咖酰胺类化合物(A-J)可充分分离, 出峰时间依次为 5.83、5.32、5.93、6.50、6.40、5.23、7.32、6.58、6.47、7.32 min, 利用谱库筛查时 10 种玛咖酰胺均可匹配 10 个以上碎片信息且质量分析误差在 10 Mu 以内; 定量检测时 4 种玛咖酰胺 (Mb18:3、Mo18:2、Mb18:2、Mb16) 的检出限分别为 0.50、1.20、1.20、0.50 mg/kg, 定量限分别为 1.50、3.60、3.60、1.50 mg/kg, 平均回收率在 81.64%~113.00%, 且 RSD 均小于 10%。本方法具有高准确性和精密度, 对于玛咖及其制品的产地溯源、真假鉴别、质量分级和市场监管具有重要意义。

关键词: UPLC-Q-TOF; 质谱裂解规律; 玛咖酰胺; 筛查

文章编号: 1673-9078(2019)12-282-293

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.036

Research on Screening and Detection Technology of Macamides with Mass Fragmentation Patterns and UPLC-Q-TOF

FANG Yan^{1,2}, LI Ting¹, GAO Jun-hai^{1,2}, XIAO Jin-jin¹

(1. Pony Testing International Group Co. Ltd., Beijing 100095, China)

(2. Pony Testing International Group Beijing Science and Technology Research Institute, Beijing 100095, China)

Abstract: A qualitative screening library from the mass fragmentation patterns of benzyl and m-methoxybenzyl macamides was constructed based on the theory of charge or free radical center induction by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight (UPLC-Q-TOF), and a quantitative determination method for 4 macamides was also established. The library includes retention time, mass-to-charge ratio and molecular structure of the excimer ions and fragment ions, and other information. The results showed that not only ten macamides were completely separated, but also more than 10 fragment ions for each macamide could be matched in library with a mass analysis error smaller than 10 Mu. The peak times of the macaamides (A-J) were 5.83, 5.32, 5.93, 6.50, 6.40, 5.23, 7.32, 6.58, 6.47, 7.32 min, respectively. In quantitative detection, the detection limits of 4 macamides (Mb18:3, Mo18:2, Mb18:2, Mb16) were 0.50, 1.20, 1.20, 0.50 mg/kg, respectively, and the quantitative limits were 1.50, 3.60, 3.60, 1.50 mg/kg, respectively. An average recovery rate ranged from 81.6% to 113.0% (RSD<10%) for 4 macamides. This method had high accuracy and precision, putting great significance for origin traceability, identification, quality classification and market supervision of maca and its products.

Key words: ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight (UPLC-Q-TOF); mass fragmentation pattern; macamides; screening

玛咖 (*Lepidium meyenii* Walp.) 为十字花科独行菜属, 原产于南美洲安第斯山区, 我国于本世纪初引进且主要种植在云南、新疆等地, 是一年或两年生草

收稿日期: 2019-07-19

基金项目: 特膳食品安全与营养成分检测关键技术北京市工程实验室创新能力建设项目(京发改〔审〕[2017]184号)

作者简介: 房艳 (1978-), 女, 博士, 研究方向: 食品、环境、药品、新能源等相关产品及材料的分析化学

本植物^[1]。玛咖根茎形似小圆萝卜, 为可食用部分, 具有丰富的营养成分, 于 2011 年被我国卫生部第 13 号公告批准为新资源食品。相关研究表明, 玛咖中的玛咖生物碱^[2]、硫代葡萄糖苷、异硫氰酸酯等次生代谢产物, 可能直接或间接地与提高记忆力^[3]、神经保护^[4]、改善骨质疏松^[5,6]、提高精子质量^[7]、抗疲劳^[8]等保健功效相关。其中, 玛咖酰胺是玛咖特有的生物碱, 是一类由不饱和脂肪酸长链与苯甲胺结合而成的

苯基酰胺类化合物。目前,被发现并证实的玛咖酰胺类化合物有几十种,其分子结构相似,主要通过碳链长度、双键或三键个数和位置以及不同取代基在碳链或苯环上的位置^[8]来区分。同时,不同产地或品种的玛咖中玛咖酰胺的种类及含量差异较大^[9],因此准确性识别玛咖酰胺种类并定量检测,对于相关产品的产地溯源、真假鉴别和质量分级是十分重要的。

目前,国内外研究多采用光谱^[10]、核磁^[11]等手段鉴定玛咖酰胺类化合物,并利用液相色谱^[12]、液相色谱串联质谱^[13]等方法对一种或多种玛咖酰胺进行定性定量分析,但鲜有利用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight, UPLC-Q-TOF)分析玛咖酰胺的相关研究报道。同时,玛咖酰胺类化合物的质谱裂解分析也局限在个别玛咖酰胺的几个主要特征碎片的分析,未归纳裂解规律并进行推断和验证,且分析方式的质量精度较低^[14]。UPLC-Q-TOF具有高通量、高质量精度、高分辨率、高灵敏度等优势,可降低基质干扰并改善极端复杂样品的分离情况,在食品^[15]、环境^[16]、医药^[17]等多领域得到广泛应用,且通过 UNIFI 可显著提高化合物推断和鉴定的整体工作效率,充分保证定性结果准确性^[18,19]。本研究拟利用高分辨质谱 UPLC-Q-TOF 结合 UNIFI 建立一种高质量精度的玛咖酰胺类化合物的筛查检测技术,基于电荷或游离基中心诱导理论分析典型玛咖酰胺的质谱裂解情况并归纳裂解规律,推断同类化合物的质谱裂解方式并进行筛查和定性定量验证。本方法具有较高的准确性和灵敏度,为玛咖及其制品的产地溯源、真假鉴别和质量分级提供了一种新的有效方法,对于市场监管和质量保证具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

富硒玛咖片(市售);乙腈、异丙醇、甲酸(LC-MS级),西陇科学股份有限公司;亮氨酸脑啡肽(分析纯),

美国 Waters 公司;N-苄基-十六碳酰胺(Mb16:0)、N-苄基-(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺(Mb18:2)、N-间氧基苄基(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺(Mo18:2)、N-苄基-(9 Z,12 Z,15 Z)-十八碳三烯酰胺(Mb18:3)(纯度均≥98%),上海源叶生物科技有限公司;UPLC-QTOF流动相用水(LC-MS级),霍尼韦尔贸易(上海)有限公司;除 UPLC-QTOF 流动相用水外均采用经 Millipore-Q 超纯水净化仪制备的超纯水;滤膜(尼龙,0.22 μm),美国 Agela Technologies 公司。

Waters Xevo G2-XS QTOF/UPLC 系统、电喷雾离子源,美国 Waters 公司;UNIFI 1.8 软件系统,美国 Waters 公司;T18 均质机,德国 IKA 公司;Vortex-Genie 2 涡旋振荡器,美国 Scientific Industries 公司;CT15 RT 高速冷冻离心分离机,中国上海天美生化仪器设备工程有限公司;Millipore-Q 超纯水净化仪,美国 Millipore-Q 公司;AB135-S 分析天平(感量 0.01 g/0.01 mg),瑞士 METTLER TOLEDO 公司;KH-500 E 超声清洗器,中国昆山禾创超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);进样体积:5 μL;流速:0.45 mL/min;柱温:40 °C;流动相:A 为含 0.1%(体积分数)甲酸的乙腈异丙醇(V:V=9:1)溶液,B 为 0.1%(体积分数)甲酸溶液,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0	5	95
0.5	50	50
7	100	0
9	100	0
9.1	5	95
10	5	95

1.2.2 质谱条件

表 2 监测参数

Table 2 Monitoring parameters

化合物名称	扫描时间/min	碰撞能/V	母离子(m/z)	子离子(m/z)
N-苄基-十六碳酰胺 Mb16	6.2~6.7	20~35	346.3104	239.2382* 109.1014
N-苄基-(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺 Mb18:2	5.8~6.2	10~30	370.3104	108.0808* 204.1383
N-间氧基苄基(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺 Mo18:2	5.6~6.2	20~30	400.3210	121.0648* 383.2948
N-苄基-(9 Z,12 Z,15 Z)-十八碳三烯酰胺 Mb18:3	5.0~5.6	25~30	368.2953	106.0651* 261.2213

注: *为定量离子。

电离模式:ESI⁺;扫描模式:灵敏度模式;毛细

管电压:2.5 kV;锥孔电压:40 eV;离子源温度:110 °C;

脱溶剂气温度：550 ℃；脱溶剂气流速：1000 L/h；锥孔气流速：50 L/h；扫描范围： m/z 100~600；实时校正液：亮氨酸脑啡肽(m/z 556.2771)；MS 模式：碰撞能 off；MS^E 模式：低碰撞能量为 off，高碰撞能量为 10~30 V；MSMS 模式：监测参数见表 2。

1.2.3 对照品溶液的配制

玛咖酰胺的对照品经乙腈溶解并稀释，4 ℃ 保存，备用。

1.2.4 样品前处理

将样品粉碎、混匀，称取约 0.1 g 于离心管中，加入约 20 mL 乙腈溶解，涡旋混匀；超声提取 10 min，80000 r/min 离心 5 min，上清液定容至 25 mL，混匀，适当稀释后过有机滤膜，待测。

1.2.5 数据处理

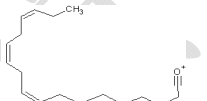
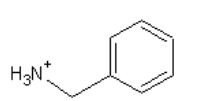
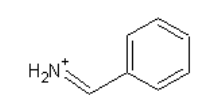
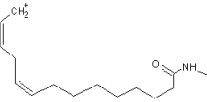
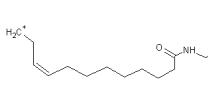
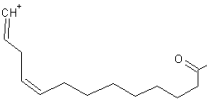
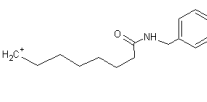
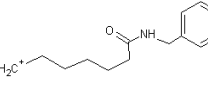
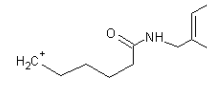
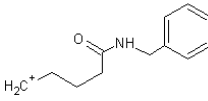
数据采用 SPSS 21.0 软件(美国 SPSS 股份有限公司)进行统计学分析，每个样品做 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 玛咖酰胺类化合物的质谱裂解规律解析

表 3 Mb18:3 碎片裂解途径及理论碎片信息

Table 3 The fragmentation pathway and theoretical fragmentation information of Mb18:3

N-苄基-(9 Z,12 Z,15 Z)-十八碳三烯酰胺分子结构	断键方式	碎片结构
	酰胺键	 m/z 261.2213($C_{18}H_{29}O^+$)
		 m/z 108.0808($C_7H_{10}N^+$)
		 m/z 106.0651($C_7H_8N^+$)
	双键间单键	 m/z 312.2322($C_{21}H_{30}NO^+$)
		 m/z 274.2165($C_{18}H_{28}NO^+$)
		 m/z 300.2322($C_{20}H_{30}NO^+$)
	碳碳单键	 m/z 232.1696($C_{15}H_{22}NO^+$)
		 m/z 218.1539($C_{14}H_{20}NO^+$)
		 m/z 204.13829($C_{13}H_{18}NO^+$)
		 m/z 190.1226($C_{12}H_{16}NO^+$)

如图 1 所示，Mb18:3 的准分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 368.2963，在 25~30 V 碰撞能量的作用下，采集到 m/z 106.0657、261.2207 和 190.1225 等强度不同的二级碎片。

其中，强度最高的 m/z 106.0657 ($C_7H_8N^+$)是由准

质子化位点、离子/中性复合物建立、取代基效应、电荷或游离基中心诱导^[20]等理论常被用来分析化合物的质谱裂解路径。酰胺类化合物以酰胺键、碳氧键断裂为主，因此电荷或游离基中心诱导理论更为适用^[21]。本研究以不同种类玛咖中普遍含有且含量较高的 Mb18:3 和 Mo18:2 为典型代表，结合 UPLC-Q-TOF-MS/MS 正离子模式采集数据，UNIFI 分析。

2.1.1 Mb18:3 的裂解情况分析

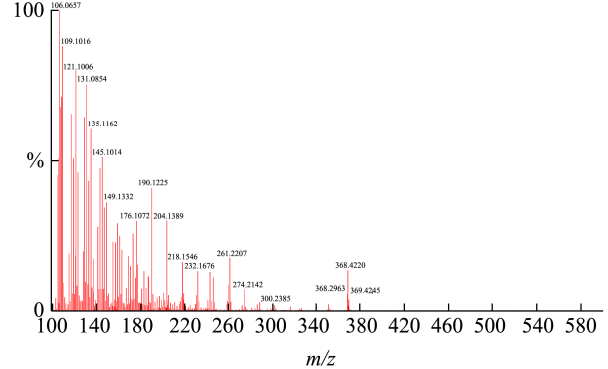


图 1 Mb18:3 的二级质谱图

Fig.1 The mass spectrum of Mb18:3

分子离子在氧原子游离基中心诱导下，酰胺键断裂产生的 m/z 108.0808 ($C_7H_{10}N^+$)经氢重排形成的碎片，且该碎片含有的苯环、碳氮双键不易断裂，可作为该物质的典型特征碎片，具体的相关断键方式和碎片结果详见表 3。 m/z 261.2207 ($C_{18}H_{29}O^+$)则是与 m/z 108.0808

($C_7H_{10}N^+$)同步产生的碎片,但因结构中含有多个碳碳单键或双键会进一步的诱导断裂,因此其强度相对较低。 m/z 274.2142 ($C_{18}H_{28}NO^+$)、 m/z 300.2385 ($C_{20}H_{30}NO^+$)、 m/z 312.2322 ($C_{21}H_{30}NO^+$)等均为该物质分子中三个双键间单键的断裂及氢重排形成的碎片离子。碎片 m/z 232.1676 ($C_{15}H_{22}NO^+$)、 m/z 218.1546 ($C_{14}H_{20}NO^+$)、 m/z 204.1389 ($C_{13}H_{18}NO^+$)、 m/z 190.1225 ($C_{12}H_{16}NO^+$)是相差 n 个 CH_2 (m/z 14.0157)的碎片离子,是准分子离子碳碳单键的断裂形成的,各碎片裂解途径及结构式见表3。

2.1.2 Mo18:2 裂解情况分析

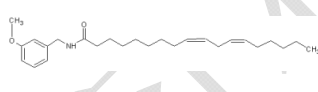
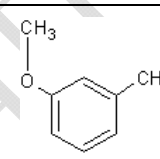
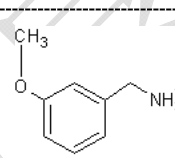
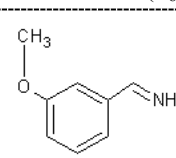
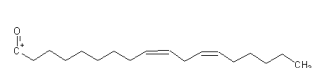
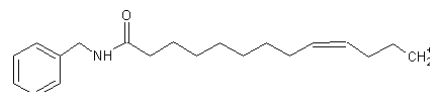
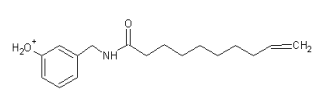
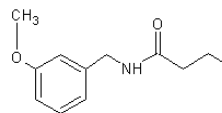
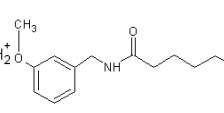
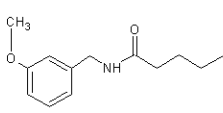
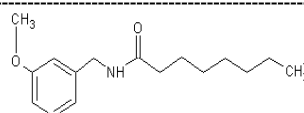
如图2所示,Mo18:2的准分子离子 $[M+H]^+$ m/z 400.3178,在20~30 V碰撞能的作用下,采集到 m/z 121.0646、138.0898和234.1491等强度不同的二级碎片。

其中,强度最高的 m/z 121.0646($C_8H_9O^+$)是准分子

离子在氮原子游离基中心诱导作用下,发生碳氮键断裂得到的间甲氧基苄基结构,该碎片含有苯环,结构稳定,可作为间甲氧基苄基类玛咖酰胺的典型特征碎片,具体的断键方式和碎片结果详见表4。准分子离子在氧原子游离基中心诱导下,发生酰胺键断裂,形成 m/z 138.0898 ($C_8H_{12}NO^+$)及 m/z 263.2360 ($C_{18}H_{31}O^+$)等碎片离子, m/z 138.0898 发生氢重排形成 m/z 136.0744 ($C_8H_{10}NO^+$)碎片离子。准分子离子的间甲氧基结构的碳氧键易断裂, m/z 276.1972 ($C_{17}H_{26}NO_2^+$)、 m/z 316.2271 ($C_{20}H_{30}NO^+$)等碎片离子即为碳氧键的断裂并伴随碳碳单键的断裂所形成。 m/z 220.1302 ($C_{13}H_{18}NO_2^+$)、 m/z 234.1491 ($C_{14}H_{20}NO_2^+$)、 m/z 248.1620 ($C_{15}H_{22}NO_2^+$)及 m/z 262.1810 ($C_{16}H_{24}NO_2^+$)等为相差 n 个 CH_2 (m/z 14.0157)的碎片离子,是准分子离子碳碳单键的断裂形成的,各碎片裂解途径及理论碎片信息见表4。

表4 Mo18:2 碎片裂解途径及理论碎片信息

Table 4 The fragmentation pathway and theoretical fragmentation information of Mo18:2

N-间甲氧基苄基-(9Z,12Z)-十八碳二烯酰胺分子结构	断键方式	碎片结构
	碳氮键	 m/z 121.0648($C_8H_9O^+$)
	酰胺键	   m/z 138.0913($C_8H_{12}NO^+$) m/z 136.0757($C_8H_{10}NO^+$) m/z 263.2369($C_{18}H_{31}O^+$)
	碳氧键 碳碳键	  m/z 316.2271 ($C_{20}H_{30}NO^+$) m/z 276.1958($C_{17}H_{26}NO_2^+$)
	碳碳键	   m/z 220.1332 ($C_{13}H_{18}NO_2^+$) m/z 234.1489 ($C_{14}H_{20}NO_2^+$) m/z 248.1645 ($C_{15}H_{22}NO_2^+$)
		 m/z 262.1802($C_{16}H_{24}NO_2^+$)

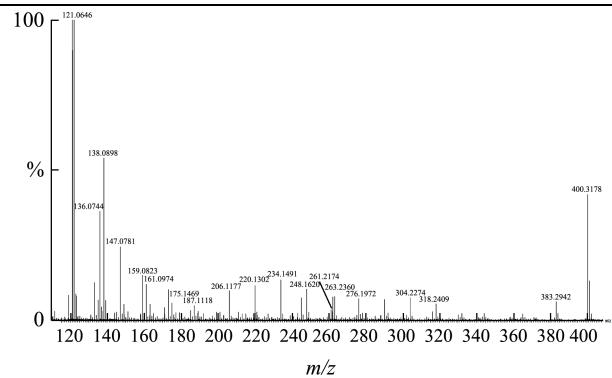


图 2 Mo18:2 二级质谱图

Fig.2 The mass spectrum of Mo18:2

2.1.3 玛咖酰胺类化合物质谱裂解规律总结

Mb18:3 和 Mo18:2 是玛咖中典型的含苺基和间甲氧基苺基的玛咖酰胺，综上总结同类化合物的质谱裂解规律。苺基玛咖酰胺在氧原子游离基中心诱导下，易发生酰胺键断裂，伴随氢的重排会得到特征碎片 m/z 108.0808($C_7H_{10}N^+$)、 m/z 106.0651($C_7H_8N^+$)；碳碳

单键比双键易断裂，碳链上不同位置的单键断裂会形成相差 n 个 CH_2 的碎片离子；氮原子游离基中心诱导作用会使碳氮键断裂，而剩余离子氢重排，伴随单键的断裂会形成一系列碎片；间甲氧基苺基玛咖酰胺在氮原子游离基中心诱导下易使碳氮键断裂，得到间甲氧基苺甲基特征碎片 m/z 121.0648($C_8H_9O^+$)；在氧原子游离基中心诱导下会发生酰胺键断裂，氢重排后得到一系列碎片；间甲氧基的碳氧键断裂，伴随碳碳单键的断裂会形成一系列碎片且碳碳单键不同位置的断裂会形成相差 n 个 CH_2 的碎片离子。

2.2 谱库建立

基于玛咖酰胺类化合物质谱裂解规律，推断 8 种玛咖酰胺裂解情况，并建立 Q-TOF 谱库，初步包含准分子离子及特征离子在内的不少于 10 个碎片信息，见表 5。

表 5 Q-TOF 谱库信息

Table 5 Q-TOF library information

编号	名称	CAS No.	分子式	分子量	准分子离子	二级碎片
A	N-苺基-(9 Z,12 Z,15 Z)-十八碳三烯酰胺 (Mb18:3)	883715-18-2	$C_{25}H_{37}NO$	367.2875	368.2956	108.0808、106.0651、261.2213、246.1852、312.2322、232.1696、204.1383、218.1539、274.2165、190.1226、300.3222
B	间甲氧基苺基-(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺 (Mo18:2)	883715-22-8	$C_{26}H_{41}NO_2$	399.3137	400.3210	121.0648、138.0913、136.0757、263.2369、220.1332、234.1489、248.1645、262.1802、276.1958、316.2271
C	N-苺基-(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺 (Mb18:2)	18286-71-0	$C_{25}H_{39}NO$	369.3032	370.3104	108.0808、106.0651、204.1383、190.1226、218.1539、176.1070、263.2369、292.2635、232.1696、278.2478、246.1852
D	N-苺基-十六碳酰胺 (Mb16)	74058-71-2	$C_{23}H_{39}NO$	345.3032	346.3104	108.0808、239.2369、268.2635、254.2478、111.1168、125.1325、139.1481、114.0913、128.1070、226.2165、212.2009
E	N-间甲氧基苺基-十六碳酰胺 (Mo16)	847361-96-0	$C_{24}H_{41}O_2$	375.3137	376.3210	121.0648、256.2635、152.0706、221.1410、102.0913、116.1070、300.2791、263.1880、331.2506、125.0961
F	间甲氧基苺基-(9 Z,12 Z,15 Z)-十八碳三烯酰胺 (Mo18:3)	883715-23-9	$C_{26}H_{39}NO_2$	397.2981	398.3054	121.0648、138.0913、136.0757、219.1254、262.1802、261.2213、290.2115、276.1958、304.2271、234.1489

转下页

接上页

G	N-苄基-十七碳酰胺 (Mb17)	883715-19-3	$C_{24}H_{41}NO$	359.3188	360.3261	108.0808、282.2791、240.2322、
						198.1852、254.2478、111.1168、 139.1117、125.0961、114.0913、 212.2009、226.2165、128.1070
H	N-苄基-(9 Z) - 十八烯酰胺 (Mb18:1)	101762-87-2	$C_{25}H_{41}NO$	371.3188	372.3261	108.0808、106.0651、204.1383、 302.2478、190.1226、218.1539、 176.1070、294.2791、232.1696、 246.1852、260.2013、274.2169
						121.0648、301.2036、299.1880、 217.1097、151.1117、138.0913、 299.2244、176.1070、 137.1325、300.2322
L	N-间甲氧基苄基-(9 Z)- 十八碳烯酰胺 (Mo18:1)	883715-21-7	$C_{26}H_{43}NO_2$	401.3294	402.3367	108.0808、111.1168、114.0913、 128.1070、125.0961、139.1117、 111.0804、282.2791、254.2478、 268.2635、240.2322、226.2165
J	N-苄基-十八碳酰胺 (Mb18)	5327-45-7	$C_{25}H_{43}NO$	373.3345	374.3417	

表 6 Mb18:2、Mb16 高碰撞能匹配成功的碎片信息

Table 6 Matching fragmentation information of Mb18: 2 and Mb16 at high collision energy

化合物	序号	碎片	测量值	理论值	误差/Mu
N-苄基-(9 Z, 12 Z) -十八碳二烯酰胺 Mb18:2	1	$C_{25}H_{39}NO$	370.3108	370.3104	0.40
	2	$C_7H_{10}N$	108.0810	108.0808	0.20
	3	C_7H_8N	106.0655	106.0651	0.40
	4	$C_{13}H_{18}NO$	204.1383	204.1383	0.00
	5	$C_{12}H_{16}NO$	190.1229	190.1226	0.30
	6	$C_{14}H_{20}NO$	218.1543	218.1539	0.40
	7	$C_{11}H_{14}NO$	176.1072	176.1070	0.20
	8	$C_{18}H_{31}O$	263.2373	263.2369	0.40
	9	$C_{19}H_{34}NO$	292.2636	292.2635	0.10
	10	$C_{15}H_{22}NO$	232.1698	232.1696	0.20
	11	$C_{18}H_{32}NO$	278.2481	278.2478	0.30
	12	$C_{16}H_{24}NO$	246.1855	246.1852	0.30
N-苄基-十六碳酰胺 Mb16	1	$C_{25}H_{39}NO$	346.3104	346.3110	0.60
	2	C_7H_8N	108.0808	108.0828	2.00
	3	$C_7H_{10}N$	239.2369	239.2374	0.50
	4	$C_{13}H_{18}NO$	268.2635	268.2639	0.40
	5	$C_{12}H_{16}NO$	254.2478	254.2488	1.00
	6	$C_{14}H_{20}NO$	111.1168	111.1174	0.60
	7	$C_{11}H_{14}NO$	125.1325	125.1328	0.30
	8	$C_{18}H_{31}O$	139.1481	139.1487	0.60
	9	$C_{19}H_{34}NO$	114.0913	114.0918	0.50
	10	$C_{15}H_{22}NO$	128.1070	128.1074	0.40
	11	$C_{18}H_{32}NO$	226.2165	226.2173	0.80
	12	$C_{16}H_{24}NO$	212.2009	212.2021	1.20

2.3 对照品验证

为验证质谱裂解规律和推断结果的准确性,利用 Mb18:2、Mb16 的对照品进行验证, MS^E 模式采集数据。结果表明,碎片匹配率达 100%,且质量误差均在 5 Mu 之内,见图 3 和表 6。

基于上述结果,充分印证了玛咖酰胺类物质谱裂解规律及建立的谱图具有较高的实际应用性,可进一步用于玛咖制品中各类玛咖酰胺的快速筛查。

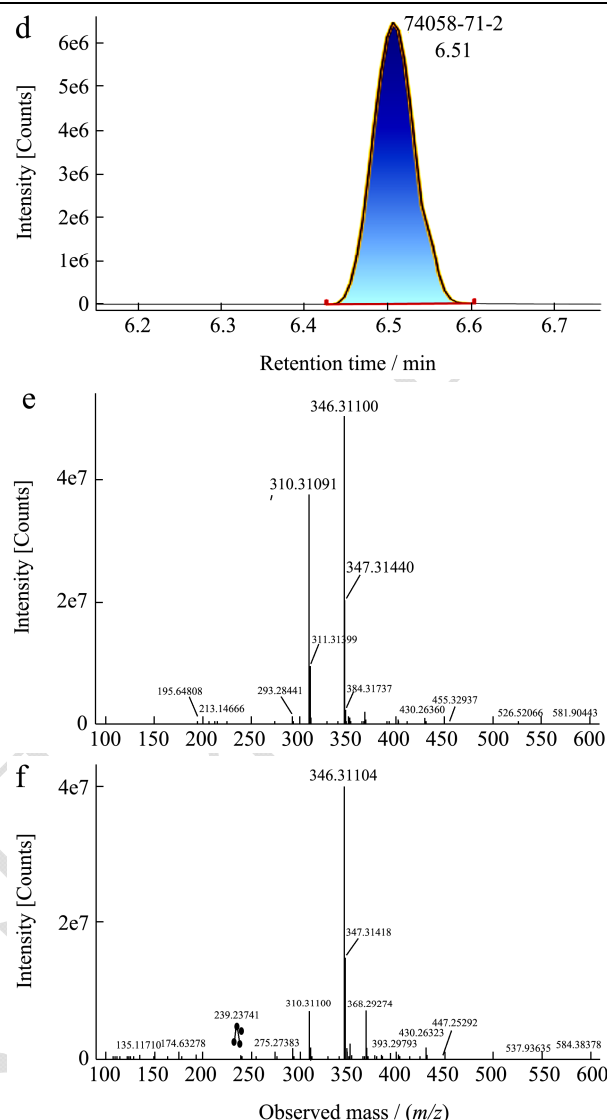
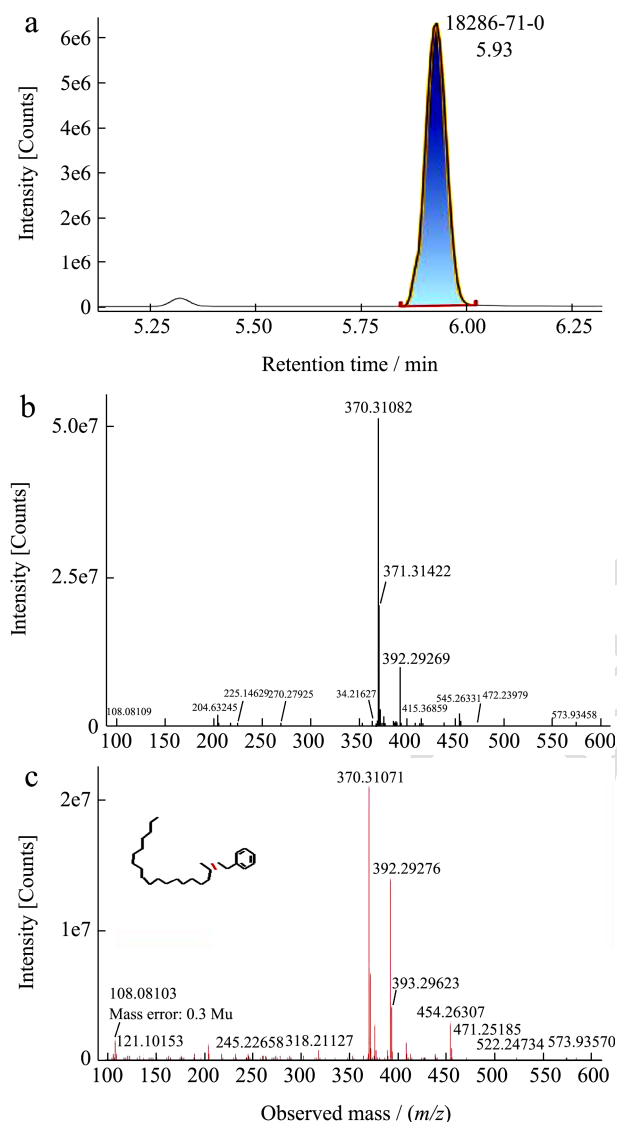


图3 Mb18:2 (a、b、c)、Mb16 (d、e、f) 提取离子色谱图和 MS^E 模式下的高低碰撞能通道质谱图

Fig.3 Extracted ion chromatograms and the corresponding MS^E spectra at low and high collision energies of Mb18: 2 (a, b, c) and Mb16 (d, e, f)

2.4 富硒玛咖片中玛咖酰胺类化合物的快速筛查

表 7 10 种玛咖酰胺匹配信息表

Table 7 Matching information of 10 macamides

化合物		碎片信息										保留时间
A	元素组成	C ₇ H ₁₀ N	C ₇ H ₈ N	C ₁₈ H ₂₉ O	C ₁₆ H ₂₄ NO	C ₂₁ H ₃₀ NO	C ₁₅ H ₂₂ NO	C ₁₃ H ₁₈ NO	C ₁₄ H ₂₀ NO	C ₁₈ H ₂₈ NO	C ₁₂ H ₁₆ NO	5.83
	测量值	108.0811	106.0654	261.2200	246.1853	312.2326	232.1697	204.1325	218.1541	274.2169	190.1228	
	理论值	108.0808	106.0651	261.2213	246.1852	312.2322	232.1696	204.1383	218.1539	274.2165	190.1226	
	误差/Mu	0.3	0.3	-1.3	0.1	0.4	0.1	-5.8	0.2	0.4	0.2	
B	元素组成	C ₈ H ₉ O	C ₈ H ₁₂ NO	C ₈ H ₁₀ NO	C ₁₈ H ₃₁ O	C ₁₃ H ₁₈ NO ₂	C ₁₄ H ₂₀ NO ₂	C ₁₅ H ₂₂ NO ₂	C ₁₆ H ₂₄ NO ₂	C ₁₇ H ₂₆ NO ₂	C ₂₀ H ₃₀ NO ₂	5.32
	测量值	121.0648	138.0914	136.0758	263.2369	220.1340	234.1476	248.1639	262.1795	276.1945	316.2303	
	理论值	121.0648	138.0913	136.0757	263.2369	220.1332	234.1489	248.1645	262.1802	276.1958	316.2271	
	误差/Mu	0.0	0.1	0.1	0.0	0.8	-1.3	-0.6	-0.7	-1.3	-3.2	
C	元素组成	C ₇ H ₁₀ N	C ₇ H ₈ N	C ₁₃ H ₁₈ NO	C ₁₂ H ₁₆ NO	C ₁₄ H ₂₀ NO	C ₁₁ H ₁₄ NO	C ₁₈ H ₃₁ O	C ₁₉ H ₃₄ NO	C ₁₅ H ₂₂ NO	C ₁₈ H ₃₂ NO	5.93
	测量值	108.0810	106.0655	204.1383	190.1229	218.1543	176.1072	263.2373	292.2640	232.1698	278.2481	
	理论值	108.0808	106.0651	204.1383	190.1226	218.1539	176.1070	263.2369	292.2635	232.1696	278.2478	
	误差/Mu	0.2	0.4	0.0	0.3	0.4	0.2	0.4	0.5	0.2	0.3	
D	元素组成	C ₇ H ₁₀ N	C ₁₆ H ₃₁ O	C ₁₇ H ₃₄ NO	C ₁₆ H ₃₂ NO	C ₈ H ₁₅	C ₉ H ₁₇	C ₁₈ H ₃₁ O	C ₆ H ₁₂ NO	C ₇ H ₁₄ NO	C ₁₄ H ₂₈ NO	6.5
	测量值	108.0814	239.2374	268.2639	254.2488	111.1174	125.1327	139.1486	114.0918	128.1074	226.2173	
	理论值	108.0808	239.2369	268.2635	254.2478	111.1168	125.1325	139.1481	114.0913	128.107	226.2165	
	误差/Mu	0.6	0.5	0.4	1.0	0.6	0.2	0.5	0.5	0.4	0.8	
E	元素组成	C ₈ H ₉ O	C ₁₆ H ₃₄ NO	C ₈ H ₁₀ NO ₂	C ₅ H ₁₂ NO	C ₁₃ H ₁₉ NO ₂	C ₆ H ₁₄ NO	C ₂₂ H ₃₆ NO	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	C ₂₁ H ₃₃ NO ₂	C ₈ H ₁₃ O	6.4
	测量值	121.0648	256.2635	152.0618	102.0917	221.1336	116.1070	330.2774	263.1795	331.2511	125.0963	
	理论值	121.0648	256.2635	152.0706	102.0913	221.1410	116.1070	330.2791	263.1880	331.2506	125.0961	
	误差/Mu	0.0	0.0	-8.8	0.4	-7.4	0.0	-1.7	-8.5	0.5	0.2	
F	元素组成	C ₈ H ₉ O	C ₈ H ₁₂ NO	C ₈ H ₁₀ NO	C ₁₃ H ₁₇ NO ₂	C ₁₆ H ₂₄ NO ₂	C ₁₈ H ₂₉ O	C ₁₈ H ₂₈ NO ₂	C ₁₇ H ₂₆ NO ₂	C ₁₉ H ₃₀ NO ₂	C ₁₄ H ₂₀ NO	5.23
	测量值	121.0649	138.0915	136.0759	219.1321	262.18	261.2224	290.2129	276.196	304.2264	234.1459	
	理论值	121.0648	138.0913	136.0757	219.1254	262.1802	261.2213	290.2115	276.1958	304.2271	234.1489	
	误差/Mu	0.1	0.2	0.2	6.7	-0.2	1.1	1.4	0.2	-0.7	-3	
G	元素组成	C ₇ H ₁₀ N	C ₁₈ H ₃₆ NO	C ₁₅ H ₃₀ NO	C ₁₂ H ₂₄ NO	C ₁₆ H ₃₂ NO	C ₈ H ₁₅	C ₉ H ₁₅ O	C ₈ H ₁₃ O	C ₆ H ₁₂ NO	C ₁₃ H ₂₆ NO	7.32
	测量值	108.0813	282.2789	240.232	198.1858	254.2489	111.1167	139.112	125.0964	114.0915	212.2012	
	理论值	108.0808	282.2791	240.2322	198.1852	254.2478	111.1168	139.1117	125.0961	114.0913	212.2009	
	误差/Mu	0.5	-0.2	-0.2	0.6	1.1	-0.1	0.3	0.3	0.2	0.3	

转下页

接上页

H	元素组成	C ₇ H ₁₀ N	C ₇ H ₈ N	C ₁₃ H ₁₈ NO	C ₂₀ H ₃₂ NO	C ₁₂ H ₁₆ NO	C ₁₄ H ₂₀ NO	C ₁₈ H ₂₈ NO	C ₁₁ H ₁₄ NO	C ₁₅ H ₂₂ NO	C ₁₉ H ₃₆ NO	6.58
	测量值	108.0811	106.0655	204.1386	302.2475	190.1227	218.1543	274.2168	176.1072	232.1702	294.2792	
	理论值	108.0808	106.0651	204.1383	302.2478	190.1226	218.1539	274.2165	176.1070	232.1696	294.2791	
	误差/Mu	0.3	0.4	0.3	-0.3	0.1	0.4	0.3	0.2	0.6	0.1	
L	元素组成	C ₈ H ₉ O	C ₁₉ H ₂₇ NO ₂	C ₁₀ H ₁₅ O	C ₁₉ H ₂₅ NO ₂	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂	C ₂₀ H ₂₉ NO	C ₂₂ H ₃₂ NO	C ₁₁ H ₁₄ NO	C ₁₀ H ₁₇	C ₂₀ H ₃₀ NO	6.47
	测量值	121.0652	301.2017	151.1122	299.1887	217.1066	299.2150	326.2513	176.0971	137.1331	300.2335	
	理论值	121.0648	301.2036	151.1117	299.1880	217.1097	299.2244	326.2478	176.1070	137.1325	300.2322	
	误差/Mu	0.4	-1.9	0.5	0.7	-3.1	-9.4	3.5	-9.9	-0.6	1.3	
J	元素组成	C ₇ H ₁₀ N	C ₈ H ₁₅	C ₆ H ₁₂ NO	C ₇ H ₁₄ NO	C ₈ H ₁₃ O	C ₉ H ₁₅ O	C ₇ H ₁₁ O	C ₁₈ H ₃₆ NO	C ₁₆ H ₃₂ NO	C ₁₅ H ₃₀ NO	7.32
	测量值	108.0810	111.1167	114.0915	128.1069	125.0964	139.1120	111.0805	282.2789	254.2489	240.2320	
	理论值	108.0808	111.1168	114.0913	128.1070	125.0961	139.1117	111.0804	282.2791	254.2478	240.2322	
	误差/Mu	0.2	-0.1	0.2	-0.1	0.3	0.3	0.1	-0.2	1.1	-0.2	

MS^E 模式采集样品信息, 利用谱库进行筛查。结果显示, 样品中含有上述 10 种玛咖酰胺, 不少于 10 个碎片匹配成功且质量误差在 10 Mu 以内。同时, 10 种玛咖酰胺在设定条件下的保留时间分别为 5.83、5.32、5.93、6.50、6.40、5.23、7.32、6.58、6.47、7.32 min, 碎片等相关信息如表 7 所示。

2.5 富硒玛咖片中 4 种玛咖酰胺的定性定量检测

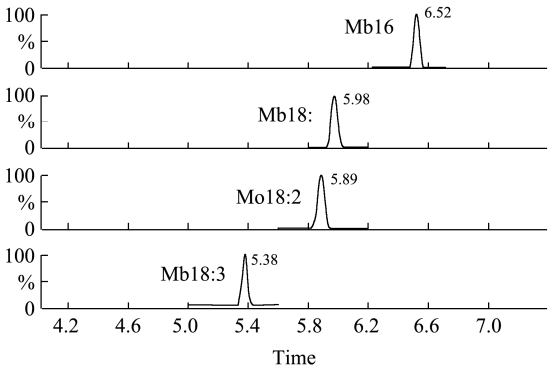


图 4 4 种玛咖酰胺总离子流图

Fig.4 Total ion chromatogram of 4 macamides

针对常见且含量较高的四种玛咖酰胺 (Mb18:3、Mo18:2、Mb18:2、Mb16), 本研究建立了分离度较高且定性定量准确的检测方法, 相较于三重四级杆质谱

或液相方法具有基质干扰小、分离效果好的优势。总离子流谱图和质谱图见图 4 及图 5。

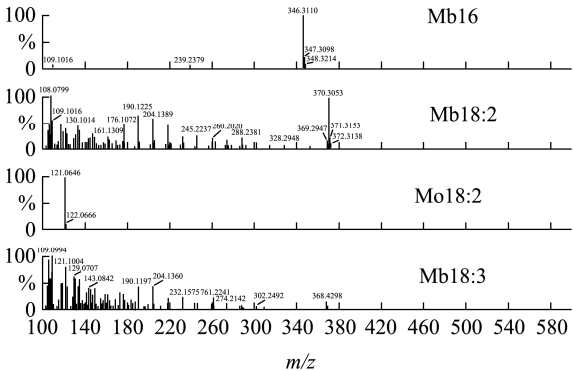


图 5 4 种玛咖酰胺二级质谱图

Fig.5 Mass spectrums of 4 macamides

2.5.1 线性范围、检出限和定量限

四种玛咖酰胺的线性方程、线性范围、相关系数、检出限等见表 8, 相关系数均大于 0.99, 线性关系良好。Mb18:3、Mo18:2、Mb18:2、Mb16 的方法检出限分别为 0.5 mg/kg、1.2 mg/kg、1.2 mg/kg、0.5 mg/kg, 方法定量限为方法检出限的 3 倍。

2.5.2 样品测定及方法回收率考察

样品重复测定三次。结果表明, 富硒玛咖片含有 Mb18:3、Mo18:2、Mb18:2、Mb16 的量分别为 21.53、5.70、47.43、91.58 mg/kg, 且 RSD 均小于 4.0%, 详细检测结果如表 9 所示。

表 8 4 种玛咖酰胺的线性方程、相关系数和检出限

Table 8 Linear equations, correlation coefficients and detection limits of 4 macamides

名称	线性方程	线性范围/(ng/mL)	相关系数	方法检出限/(mg/kg)	方法定量限/(mg/kg)
N-苄基-(9 Z,12 Z,15 Z)-十八碳三烯酰胺 Mb18:3	$y=2.67x+3.89$	2~500	0.9976	0.50	1.50
N-间甲氧基苄基-(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺 Mo18:2	$y=168.453x+544.04$	5~500	0.9978	1.20	3.60
N-苄基-(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺 Mb18:2	$y=3.66x+12.00$	5~500	0.9984	1.20	3.60
N-苄基-十六碳酰胺 Mb16	$y=17.81x+20.59$	2~500	0.9998	0.50	1.50

表 9 样品测定结果

Table 9 Test results of the sample

目标物名称	称样量/g	稀释倍数	测定值/(ng/mL)	样品含量/(mg/kg)	平均含量/(mg/kg)	RSD/%
N-苄基-十六碳酰胺 Mb16	0.1007	1	369.7	91.78	91.58	3.54
	0.1012		357.2	88.24		
	0.1002		379.6	94.71		
N-苄基-(9 Z,12 Z)-十八碳二烯酰胺 Mb18:2	0.1007	1	192.8	47.86	47.43	2.71
	0.1012		196.1	48.44		
	0.1002		184.3	45.98		

转下页

接上页

N-间甲氧基苄基-(9 Z,12 Z)- 十八碳二烯酰胺 Mo18:2	0.1007	23.2	5.76	5.70	1.36
	0.1012	23.2	5.73		
	0.1002	22.5	5.61		
N-苄基-(9 Z,12 Z,15 Z)- 十八碳三烯酰胺 Mb18:3	0.1007	84.6	21.00	21.53	3.09
	0.1012	86.3	21.32		
	0.1002	89.3	22.28		

表 10 准确性和精密度测定结果

Table 10 Test results of accuracy and precision

目标物名称	加标量/ μg	称样量/g	稀释倍数	测定/(ng/mL)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
N-苄基-十六碳酰胺 Mb16	7.35	0.1011	2	345.2	108.80	108.48	0.81
		0.1005		342.6	107.81		
		0.1002		343.6	108.83		
	10.0	0.0998		352.3	84.71	82.07	2.58
		0.1013		349.7	82.03		
		0.1010		344.0	79.46		
N-苄基-(9 Z,12 Z)- 十八碳二烯酰胺 Mb18:2	4.7	0.1011	1	333.8	74.95	81.64	9.94
		0.1005		339.7	78.69		
		0.1002		362.8	91.29		
	5.73	0.0998		380.0	82.64	91.90	9.52
		0.1013		411.1	94.97		
		0.1010		417.7	98.10		
N-间甲氧基苄基-(9 Z, 12 Z)- 十八碳二烯酰胺 Mo18:2	0.56	0.1011	1	47.7	110.04	108.47	4.80
		0.1005		45.9	102.62		
		0.1002		48.1	112.74		
	0.67	0.0998		52.2	109.54	113.00	3.77
		0.1013		53.3	112.36		
		0.1010		54.5	117.08		
N-苄基-(9 Z,12 Z,15 Z)- 十八碳三烯酰胺 Mb18:3	2.0	0.1011	1	162.9	94.94	104.65	8.23
		0.1005		171.3	106.09		
		0.1002		176.5	112.91		
	2.6	0.0998		187.3	97.57	93.91	4.53
		0.1013		186.3	95.37		
		0.1010		179.2	88.79		

为进一步考察方法的准确性及精密度,以富硒玛咖片进行标准物质加入实验,加标量为在样品含量80%~120%范围内选择两个水平,平行测定三次,测定结果见表10。结果表明,此方法适用于富硒玛咖片中4种玛咖酰胺的定性定量检测,各玛咖酰胺的加标回收率在81.64%~113.00%,RSD均小于10%,说明本方法具有高准确性和精密度。

3 结论

本研究基于电荷或游离基中心诱导理论归纳了典型苄基和间甲氧基苄基玛咖酰胺类化合物的UPLC-Q

-TOF质谱裂解规律,搭建了定性筛查谱库,谱库包括保留时间、准分子离子及碎片离子的质核比和分子结构等相关信息。筛查结果表明,10种玛咖酰胺均可匹配10个以上碎片信息且质量分析误差在10 Mu以内;定量检测结果表明,4种玛咖酰胺的平均回收率在81.64%~113.00%,且RSD均小于10%。方法具有较高的准确性和精密度,为玛咖及其制品的产地溯源、真假鉴别和质量分级提供了一种新的有效方法,为市场监管和质量保证提供了有力的技术支持。

参考文献

- [1] 邵炎,李芸,刘涛,等.玛咖中主要酰胺类化合物的提取工艺优化研究[J].食品研究与开发,2017,38(3):35-40
SHAO Yan, LI Wei, LIU Tao, et al. Optimization of extraction process of main amide compounds in maca [J]. Food Research and Development, 2017, 38(3): 35-40
- [2] Cui B, Zheng B L, He K, et al. Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii* [J]. Journal of Natural Products, 2003, 66(8): 1101-1103
- [3] Gonzales G F. Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a plant from the Peruvian highlands [J]. Evid-Based Compl Alt, 2012: 1-10
- [4] 周严严.玛咖化学成分分析及其神经保护作用机制研究[D].北京:中国中医科学院,2017:119-177
ZHOU Yan-yan. Study on chemical composition analysis and neuroprotective mechanism of maca [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2017: 119-177
- [5] Zhang Y, Yu L, Ao M, et al. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 105(1/2): 274-279
- [6] 余龙江,刘浩,金文闻,等.天然玛咖酰胺化合物在制备增加骨密度产品中的应用:中国,CN 103585138 A [P].2014-02-19
YU Long-jiang, LIU Hao, JIN Wen-wen, et al. Application of natural macamide compounds in the preparation of products for increasing bone density: China, CN 103585138 A [P]. 2014-02-19
- [7] Carla G, Julio R, Manuel G, et al. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 103: 448-454
- [8] 邵炎.玛咖中特征活性成分制备与抗疲劳作用研究[D].广州:广东药科大学:2017
SHAO Yan. Preparation of active ingredients and anti-fatigue effects in maca [D]. Guangzhou: Guangdong University of Traditional Chinese Medicine: 2017
- [9] 张恺骅.不同产地玛咖化学成分及抗氧化活性研究[D].天津:天津科技大学,2016
ZHANG Kai-hua. Study on chemical constituents and antioxidant activity of maca from different places [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016
- [10] 林涛,邵金良,刘兴勇,等.玛咖中玛咖酰胺特征光谱学及快速测定研究[J].分析试验室, 2017, 36(4): 394-398
LIN Tao, SHAO Jin-liang, LIU Xing-yong, et al. Characteristic spectroscopy and rapid determination of macamides in maca [J]. Analysis laboratory, 2017, 36(4): 394-398
- [11] Fernando E C, María F L, Alfredo G, et al. Structural, electronic, topological and vibrational properties of a series of N-benzylamides derived from maca (*Lepidium meyenii*) combining spectroscopic studies with ONION calculations [J]. Journal of Molecular Structure, 2016(1105): 403-414
- [12] 陈秋露,刘亚林,徐德锋.玛咖样品中9种玛咖酰胺含量的高效液相色谱法测定及质谱确证[J].分析试验室,2017,36(10): 1224-1229
CHEN Qiu-lu, LIU Ya-lin, XU De-feng. Determination of 9 kinds of macamide content in maca samples by high performance liquid chromatography and mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Laboratory, 2017, 36(10): 1224-1229
- [13] 蔡翔宇,江思华,吴玉杰,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时检测功能食品中6种玛咖酰胺[J].食品安全质量检测学报,2018,9(7):1628-1633
CAI Xiang-yu, JIANG Si-hua, WU Yu-jie, et al. Simultaneous detection of six kinds of macamide in functional foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(7): 1628-1633
- [14] 李绍辉.玛咖中的玛咖酰胺含量测定及其质量控制方法研究[D].上海:华东理工大学,2016
LI Shao-hui. Study on the determination of macamide content and its quality control method in maca [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2016
- [15] 于泓,胡青,孙健,等.超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法定性筛查保健食品中西地那非及其相关功效类非法添加化合物[J].色谱,2018,36(10):1005-1017
YU Hong, HU Qing, SUN Jian, et al. Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry for the screening of sildenafil and its related illicit compounds in health foods [J]. Chromatography, 2018, 36(10): 1005-1017
- [16] 赖国银,林立毅,丁亦男,等.固相萃取-超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法分析地表水中26种农药[J].环境化学,2019,38(5):1-9
LAI Guo-yin, LIN Li-yi, DING Yi-nan, et al. Analysis of 26 pesticides in surface water by solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(5): 1-9