

使用UPLC离子淌度飞行时间质谱分析高度复杂的柑橘类果汁样品中的黄酮类异构体

Michael McCullagh, Kieran J. Neeson, Antonietta Gledhill

Waters Corporation

摘要

在本应用纪要中，将ACQUITY UPLC系统与SYNAPT G2-S质谱仪联用，对柑橘类果汁中存在的成分进行了特异性明确鉴定。

优势

- 离子淌度技术实现的正交分离提升了针对复杂样品的分析能力。
 - < 2 ppm的精确质量数测量可提供特定的元素组成信息，有效提高结构表征数据的可信度。
 - 离子淌度质谱与UPLC联合可将峰容量提高10倍，能够对以前无法观察到的同分异构体和构象异构体进行唯一鉴定。
 - 仅通过一次分析就能完成基于保留时间、母离子精确质量数测量、具有精确质量数测量的碎片信息以及离子淌度分离漂移时间的数据点鉴定。
 - 采用HDMS作为分析方法有望帮助我们更好地了解现有果汁产品。
-

简介

柑橘类果汁中存在的黄酮类化合物因其具有的生物学和生理学益处而备受关注。黄酮类化合物是种类最多、分布最广的化合物之一，具有多种药理和生物学特性。此类特性意味着许多含有黄酮类化合物的植物物种都可用于功能性食品或植物药。黄酮类化合物作为标志物的作用很重要，由于样品的复杂性，对其进行鉴定是一项具有挑战性的工作。黄酮类化合物具有潜在的预防癌症、降低某些慢性病风险、预防心血管疾病功效，还具有抗病毒、抗微生物和抗炎活性，这也是黄酮类化合物及果汁成分备受关注的原因。黄酮类化合物的典型来源为水果、蔬菜和谷物。由于存在着这些相关的健康益处，人们需要更深入地了解食品加工和制备过程对黄酮类化合物含量的影响。因此，分析果汁的所有主要成分和微量成分对于更好地了解膳食影响至关重要。此外，外观和口味之类可能对消费者产生影响的重要因素也会影响产品的商业价值¹。

借助HPLC-MS技术分析黄酮类化合物已经非常普及。在本应用纪要中，将Waters ACQUITY UPLC系统与SYNAPT G2-S质谱仪联用，对柑橘类果汁中存在的成分进行了特异性明确鉴定。高分辨率质谱(HDMS)已被用于柑橘类果汁产品的分析，此项技术在分析复杂混合物方面具有一些特色优势。该系统结合了高分辨率质谱以及基于离子淌度的高效测量和分离方法。离子淌度谱(IMS)是一种快速、正交气相分离技术，可在LC时间范围内提供另一个分离维度，实现更高的离子解析水平和分析特异性。根据化合物的大小、形状、电荷和质量数，可以对化合物进行区分。

实验

样品前处理

使用45 µm过滤器过滤柑橘果汁样品。

高效液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS T3 150 x 2.1 mm, 1.7 µm
柱温：	40 °C
流速：	0.4 mL/min

流动相：MeCN (B)：H₂O (0.2%
HCOOH) (A)

梯度

时间(min)	流速	%A	%B
初始	0.4	99	1
0.75	0.4	95	5
5	0.4	5	95
5.5	0.4	99	1

进样体积：10 µL

质谱条件

质谱系统：SYNAPT G2-S

电离模式：ESI, 2.7 kV

样品锥孔电压：30 V

脱溶剂气温度：650 °C

参比质量数：亮氨酸脑啡肽，[M-H]⁻
=554.2615

采集范围：	50~1200 m/z
采集速率：	5张谱图/s
碰撞能量范围：	33~45 eV
分辨率：	18,000 FWHM
IMS T-Wave波速：	550 m/s
IMS T-Wave脉冲高度：	40 V

结果与讨论

使用配备UPLC-IMS/MS^E功能的SYNAPT G2-S系统，通过负离子模式电喷雾分析柑橘果汁的组分。IMS为快速分析、气相、离子分离提供了另外的途径，具有更高的离子解析水平和分析特异性。IMS被称为“气相电泳”。进行的分析研究清晰展示了使用HDMS的优势。图1展示在常规负离子模式下分析未经稀释的柑橘果汁得到的基峰强度(BPI)色谱图和 m/z 609提取质谱图。对应的准确质量数谱图如图2所示。准确质量数谱图生成了C₂₈H₃₃O₁₅（误差1.1 ppm）和C₁₆H₁₃O₆（误差0.7 ppm）的元素组成。利用生成的元素组成进行ChemSpider搜索，根据搜索结果，认为3.25 min处所示组分的可能候选物为橙皮素7-O-芸香糖苷（橙皮苷）。在使用的实验条件下， m/z 301.0714处的峰由源碎片离子产生，来源于二糖基团的丢失。观察到的碎片以及生成的准确质量数/元素组成可帮助进行结构表征。

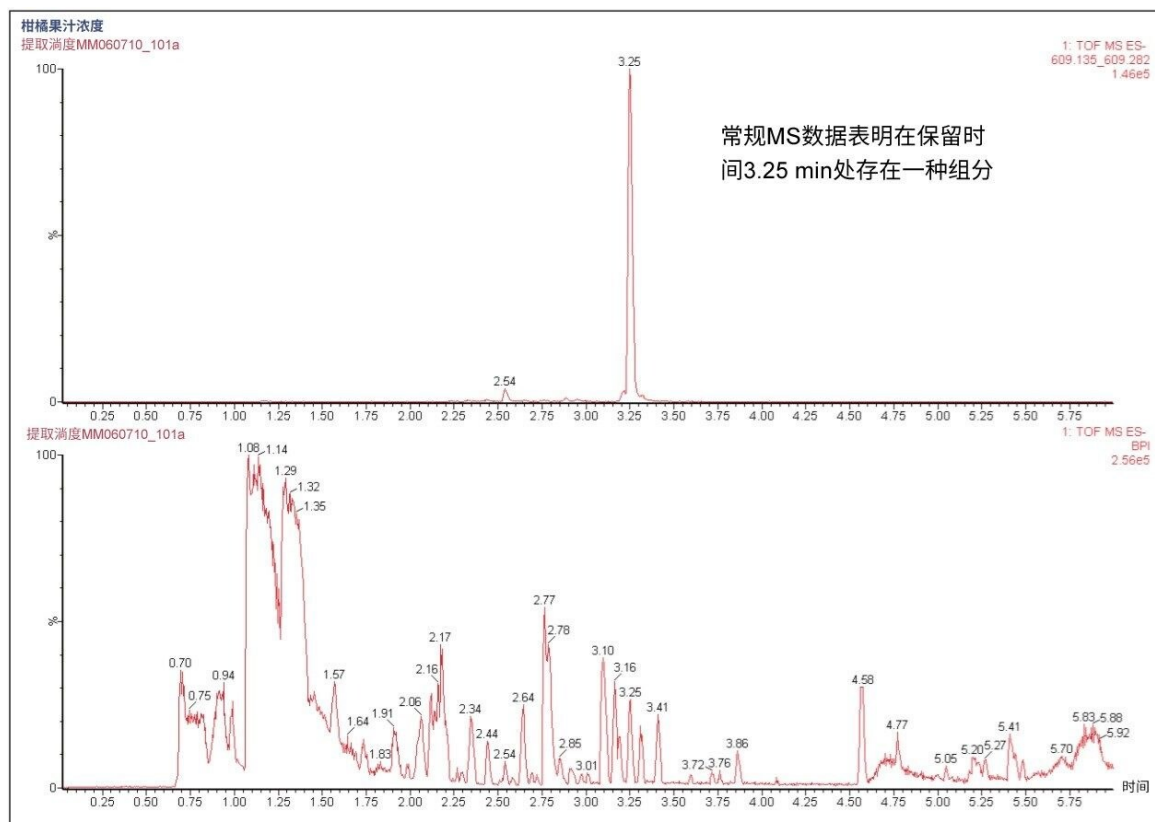


图1.负离子模式下获得的BPI色谱图，以及分析柑橘果汁获得的 m/z 609提取质谱图。

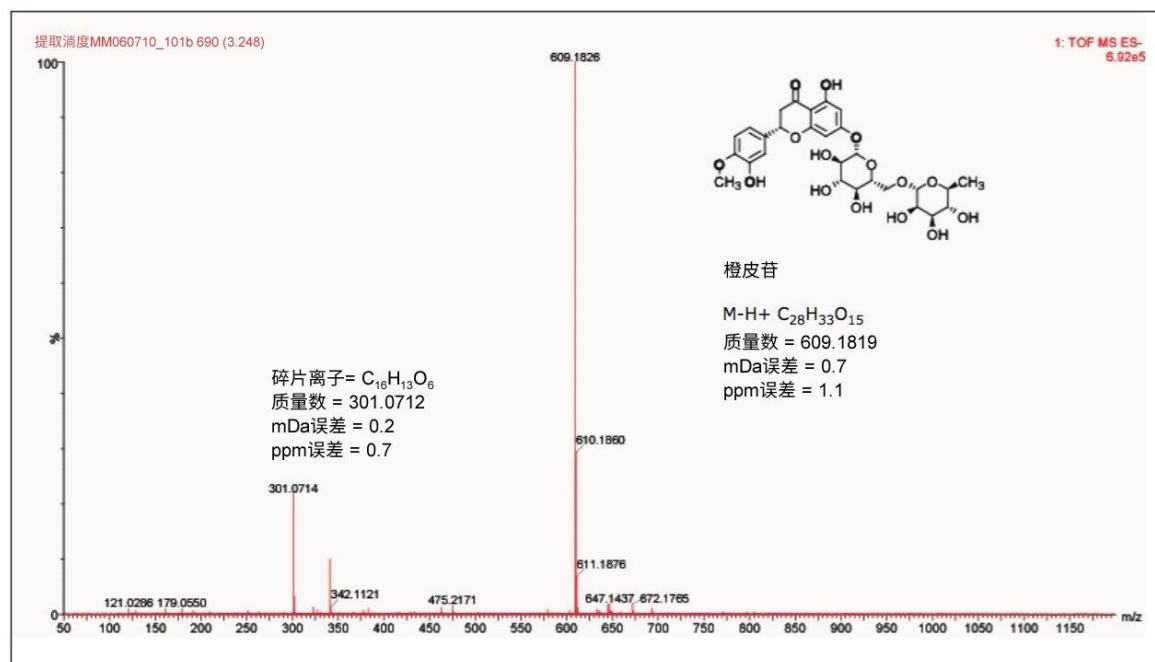


图2.确定柑橘果汁中位于保留时间3.25 min处的组分（橙皮苷）的准确质量数谱图。

使用MS^E数据查看器查看数据时，发现3.25 min处的组分更引人注目，该组分实际上由两种组分组成。MS^E数据查看器展示了检测到的柑橘果汁BPI峰，淌度数据显示在3.25 min处存在两种组分，如图3所示。母离子和碎片离子谱图由两个不同的漂移时间生成，这些同量异位组分的离子淌度分离得到的3D数据如图4所示。MS^E数据查看器可不间断地查看通过MS^E采集生成、经时间校准的高/低能量谱图。此外，还可以访问已经生成的淌度分离和谱图。通过该软件，用户只需单击按钮即可查看具有不同漂移时间但保留时间相同的同量异位组分。通过此过滤器可以立即发现，在这个由930种主要和次要分析物组成的极其复杂的样品中，3.25 min处的峰实际上是两种组分。两种组分的漂移时间为8.8 ms和9.5 ms，据此估算，组分的T-Wave碰撞截面(CCS)分别为164.6 Å²和174.1 Å²。

漂移时间 8.8 ms

漂移时间 9.5 ms

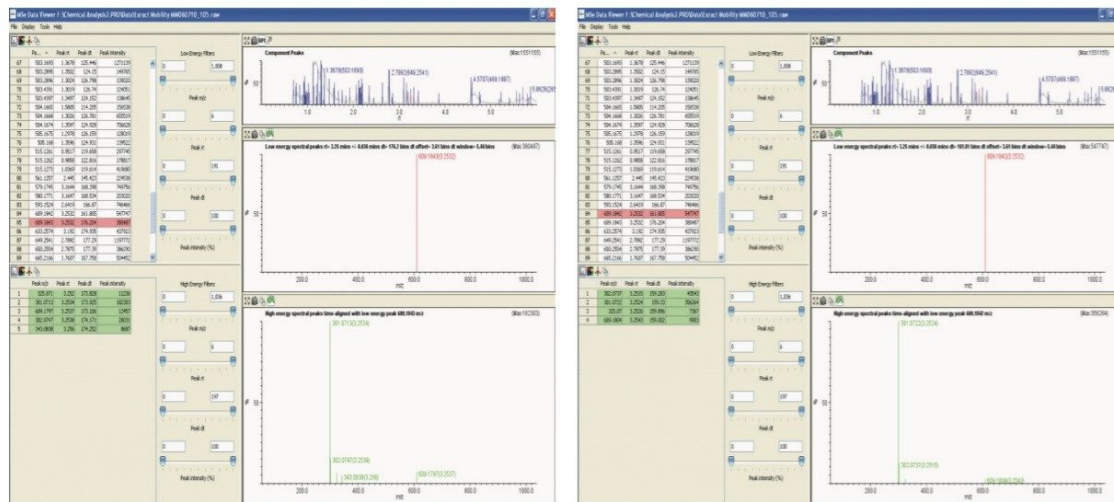


图3. MS^E 数据查看器展示了检测到的柑橘果汁BPI峰，淌度数据显示在3.25 min处存在两种组分。

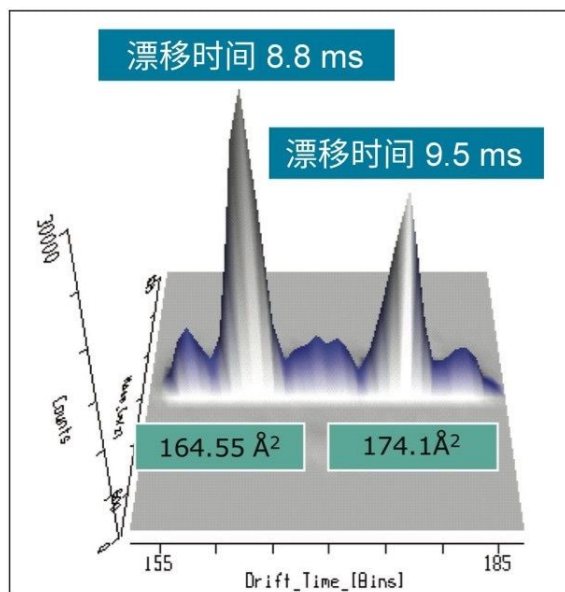


图4.柑橘果汁分析中，确定存在于3.25 min处的同量异位组分的离子淌度分离3D数据图。图中显示了每种组分实测的漂移时间和计算出的碰撞截面面积。

在UPLC-IMS/MS^E法中，我们在“Triwave”的“转移”区域进行了碰撞诱导解离(CID)碎裂；由此在3.25 min内生成了两种IMS同量异位组分的结构表征数据。图5展示了淌度分离的同量异位组分MS^E碎片离子谱图，图中所示为相同的碎片离子谱图。在所用实验条件下，于 m/z 463处观察到一个小碎片，可能是由于 m/z 609母离子丢失了鼠李糖单元，然后进一步丢失葡萄糖单元生成了 m/z 301处的苷元。生成的数据表明存在橙皮苷的构象异构体。

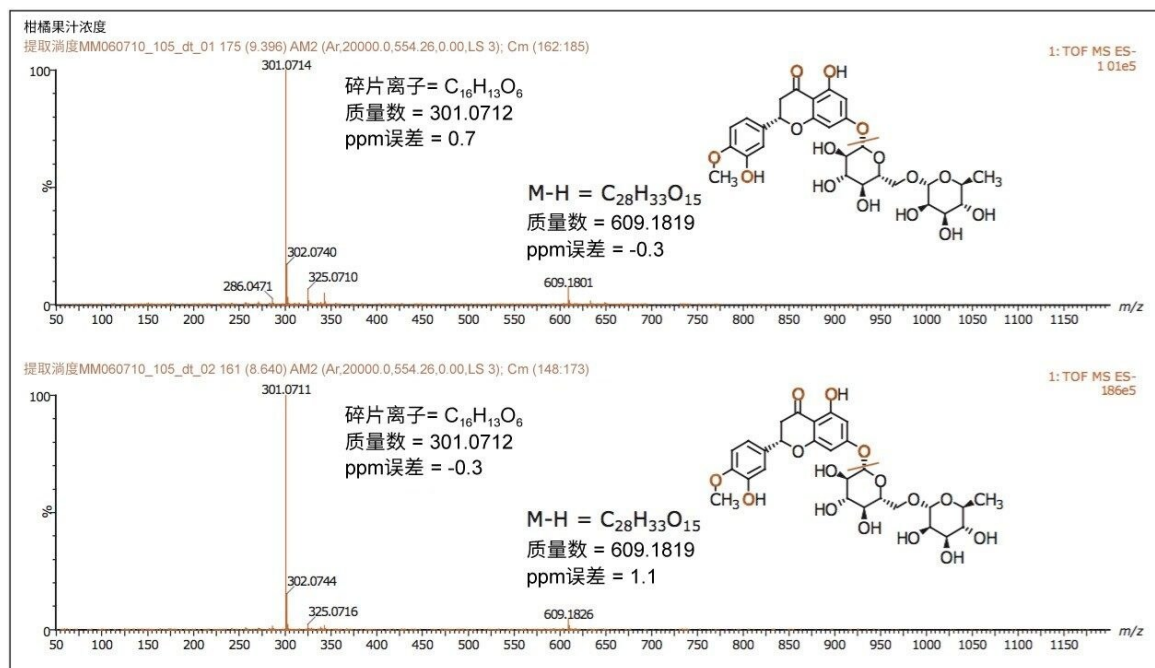


图5.柑橘果汁分析中，确定存在于3.25 min、经淌度分离的同量异位组分 MS^E 碎片离子谱图。

图6展示了另一个示例，其中可以看到分析柑橘果汁时使用常规负离子模式获得的 m/z 385提取质谱图。相应的3D淌度数据如图7所示。常规提取质谱图的前两个峰由四种IMS组分组成。表1所示为估算的T-Wave CCS值示例，表明这些值可用于提供进一步的特征分析数据。

所得结果表明，IMS可以提高峰容量并鉴定出更多组分。IMS与 MS^E 相结合，能够特异性、明确地鉴定经淌度分离的组分。

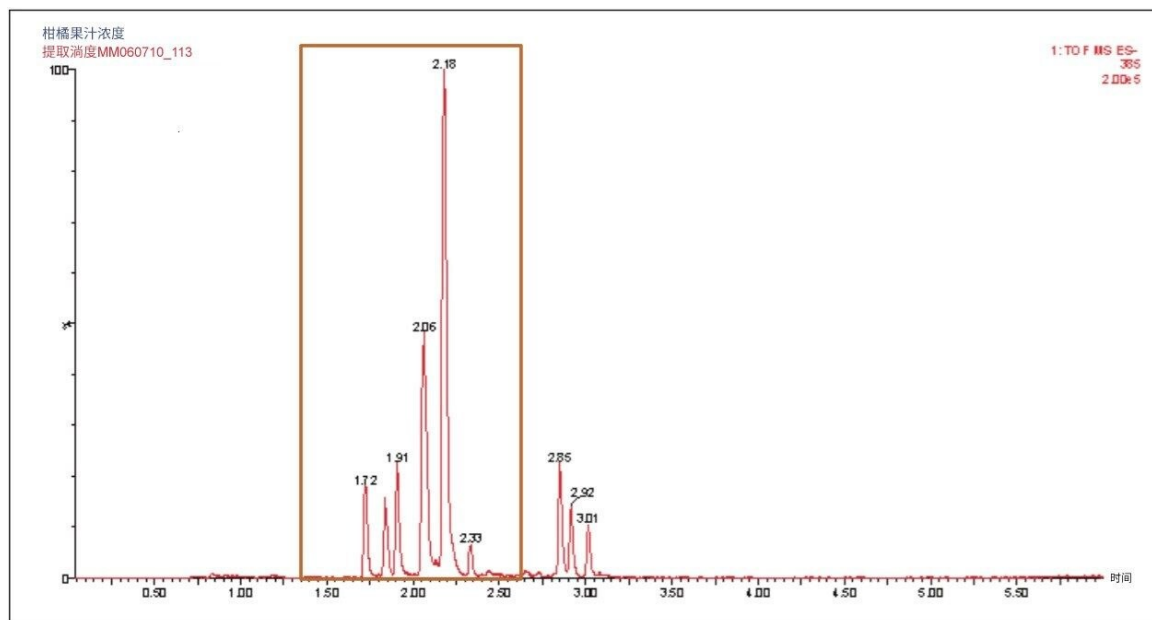


图6.分析柑橘果汁所获得的负离子模式 m/z 385的提取质谱图，其中选择了最初的六种组分用于进一步的数据查询。

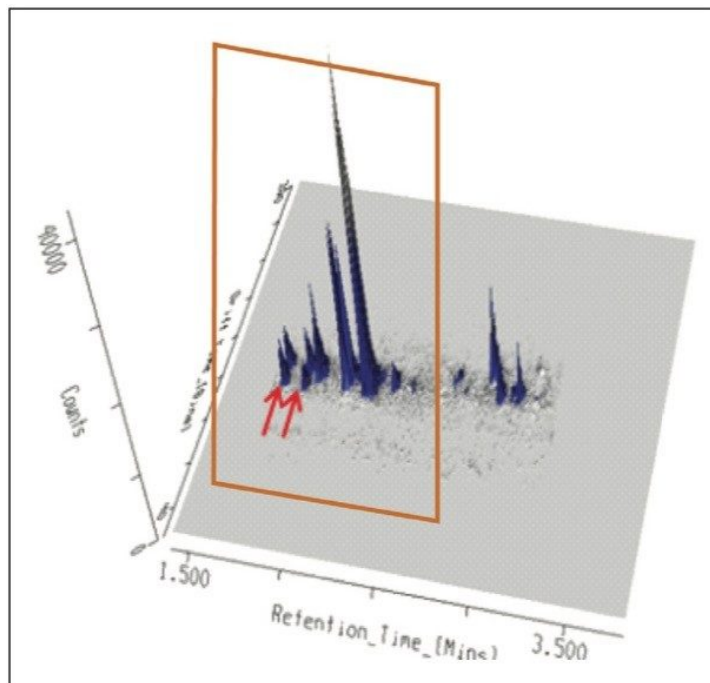


图7.柑橘果汁分析中，负离子模式 m/z 385提取质谱图获得的3D淌度数据图。1.77 min和1.85 min处的峰由两种IMS组分组成。

保留时间 (min)	1.72	1.72	1.86	1.86	1.9	2.06	2.18	2.33
漂移时间 (ms)	5.6	5.7	5.7	5.6	5.4	5.8	5.3	5.7
CCS Å ²	119.3	120.1	120.8	119.3	115.0	121.8	114.0	120.8

表1.使用离子淌度分离得到的组分映射数据，图中展示了组分漂移时间和碰撞截面以及相应的保留时间。

结论

- SYNAPT G2-S技术使UPLC-IMS/MS^E能够真正观察到柑橘果汁的复杂性。

- 通过<2 ppm的准确质量数测量并生成元素组成，结构表征变得更加可靠。
- 实验中获得了橙皮苷IMS构象异构体（在色谱中共洗脱）的单个MS和MS^E碎片离子谱图。
- 通过获得的数据可以生成保留时间、母离子准确质量数测量结果、碎片离子数据和准确质量数测量结果、离子淌度分离结果，进而生成漂移时间和T-Wave CCS估计值。
- HDMS可以实现特异性、明确的鉴定，明确区分复杂样品中的黄酮类异构体。
- 在多种组分的碎片离子研究中，可以同时获得更具特异性的信息和更高的可信度。
- 离子淌度分离能够提高峰容量，有助于复杂样品的分析。
- MS^E数据查看器可不间断处理离子淌度数据并实现可视化展示。
- 本研究使用的方法有望帮助人们更好地了解当前的果汁产品，例如不同种类的鲜榨工业化量产果汁，以及更深入地分析环境影响和进行掺假研究。反过来，让我们有机会改进未来的产品，从而获得更大的健康受益和商业价值。

参考资料

1. Gattuso G*, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules* 2007; 12(8): 1641-1673.*Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Università di Messina, Messina, Italy.

特色产品

ACQUITY UPLC系统 <<https://www.waters.com/514207>>

720004462ZH, 2012年10月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)