[应用纪要]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用ACQUITY QDa检测器分析果汁中的黄酮类化合物

Jinchuan Yang, Rich DeMuro和Joe Romano
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- ACQUITY QDa™检测器可提供比UV/Vis或PDA检测器更好的选择性。
- ACQUITY QDa的卓越选择性可在无需基线分离的条件下实现简单、快速的色谱方法。
- 样品制备中单一样品稀释比率被用于多种浓度水平的分析。
- ACQUITY QDa检测器可显著提高黄酮类化合物的分析通量，其准确性和精度不亚于UV/Vis检测。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class系统

ACQUITY UPLC PDA检测器

ACQUITY QDa 检测器

MassLynx® v. 4.1 MS软件

关键词

多酚，黄酮类化合物，黄烷酮，
多甲氧基黄酮，ACQUITY QDa

简介

黄酮类化合物是一类天然的多酚类化合物，存在于多个来源中，包括柑橘类水果。它包括两个重要的亚类：黄烷酮和黄酮。黄烷酮也被称为多甲氧基黄酮(PMF)。最常见的黄烷酮是来自橙子的橙皮素，最常见的黄酮是橙子和橘子皮中的橘皮素和川陈皮素。柑橘类植物中黄酮类化合物的分析常被作为质量控制和辨别产品真伪的手段，因为它们具有显著的味道特征，并且在不同物种和各种柑橘类植物中，黄酮类化合物的特征也各有不同[1,2]。本研究中使用的黄酮类化合物的化学结构如图1所示。

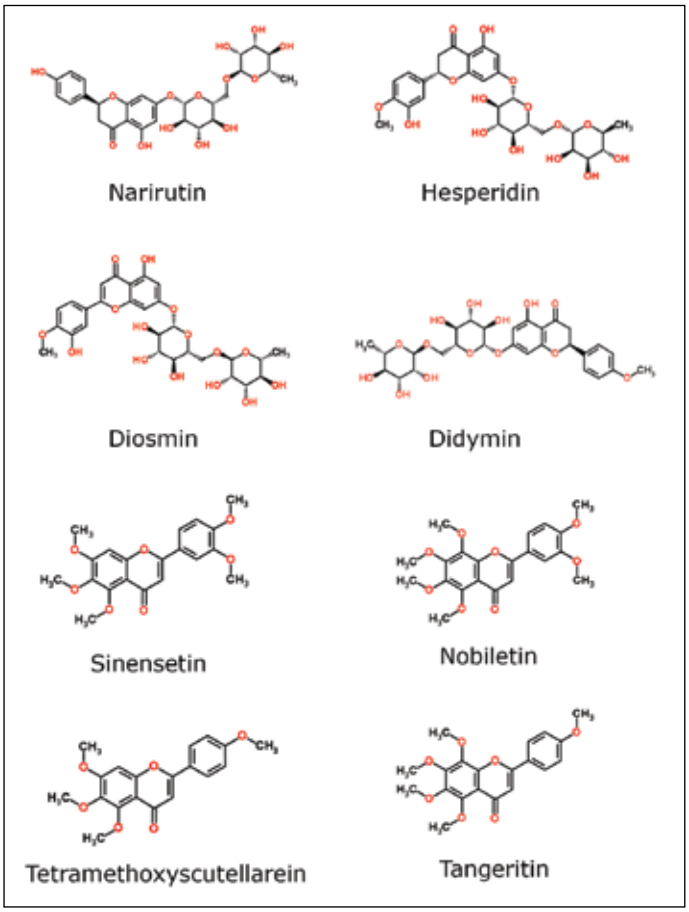

图1. 黄酮苷和多甲氧基黄酮的化学结构。

实验

样品制备

标准品和柑橘类果汁样品用DMSO/乙腈/水溶液稀释。

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC H-Class
检测器:	ACQUITY QDa
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm颗粒, 2.1 x 100mm, (部件号186003539)
柱温:	35 °C
样品温度:	4 °C
进样体积:	2.0 µL
流速:	0.6 mL/min
流动相 A:	0.1% 甲酸的去离子水溶液
流动相 B:	0.1% 甲酸的乙腈水溶液
运行时间:	13 min

梯度:

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	曲线
初始	98	2	6
5.5	27	73	6
6.0	0	100	6
10.0	0	100	6
10.5	98	2	6
13.0	98	2	6

MS条件

电离模式:	ESI+
采集模式:	SIR
锥孔电压:	5 V
探头:	缺省(600 °C)
毛细管:	缺省(0.8 kV)
采样频率:	缺省(5 Hz)

数据管理

使用MassLynx 4.1 MS软件(SCN 888, Build 274)处理数据。

黄酮类化合物分析最常用的技术是反相液相色谱法配以紫外检测器或光电二极管阵列检测(PDA)。PDA方法优于UV/Vis方法，因为它能提供色谱数据，并且有利于检查峰纯度。 PDA分析所面临的挑战是黄酮类化合物包括数十种结构类似的化合物，它们之间的差异仅仅在于环取代程度、取代类型以及糖基化类型和糖基化程度。 PDA检测缺乏分辨黄酮类化合物之间细微结构差异所需的选择性。与PDA检测相比，质谱(MS)在黄酮类化合物分析方面具有更好的选择性和更高的灵敏度。然而，MS仪器的成本及易用性是将它用于黄酮类化合物分析的一个障碍，尤其是对于生产工厂中的QC实验室而言。

配备ACQUITY QDa检测器的沃特世(Waters®) ACQUITY UPLC H-Class系统实现了选择性、可用性和成本问题的最佳平衡。ACQUITY QDa检测器只需最少的质谱调谐即可得到满意的结果并提供了合理的成本消耗。它不仅扩展了光学检测的覆盖范围，可对不含UV或荧光发色团的样品进行分析，还提升了对结构相似的化合物的选择性，这些对于黄酮类化合物的分析都极其重要。

结果与讨论

黄酮类化合物的检测通过对目标黄酮类化合物的分子离子进行选择离子扫描(SIR)而实现。黄酮类化合物的单一同位素质量数及其分子离子质荷比(*m/z*)如表1所示。它们中的大多数都具有不同的*m/z*值，仅甜橙素和橘皮素除外，这两种化合物的*m/z*值相同。甜橙素和橘皮素可以通过色谱方法轻松分离，因此它们不会彼此干扰。图2示出了一种果汁样品的UV (325 nm)检测和ACQUITY QDa检测的色谱图。如图2所示，甜橙素(峰E)和橘皮素(峰H)在不同时间被洗脱。川陈皮素和四甲氧基野黄芩素的峰部分重叠。使用UV/Vis或PDA检测方法很难对这些峰进行定量，但对ACQUITY QDa检测器来说完全不成问题，因为这两种分析物可以分别在*m/z* 403.2和343.1处被选择性地监测。

表1. 分析物的单同位素质量数和分子离子m/z。

分析物	分子离子 *m/z*	单同位素质量数 (Da)
芸香柚皮苷	581.2	580.18
香叶木甙	609.2	608.17
橙皮甙	611.2	610.19
香风草甙	595.3	594.19
甜橙素	373.1	372.12
川陈皮素	403.2	402.13
四甲氧基野黄芩素	343.1	342.11
橘皮素	373.1	372.12

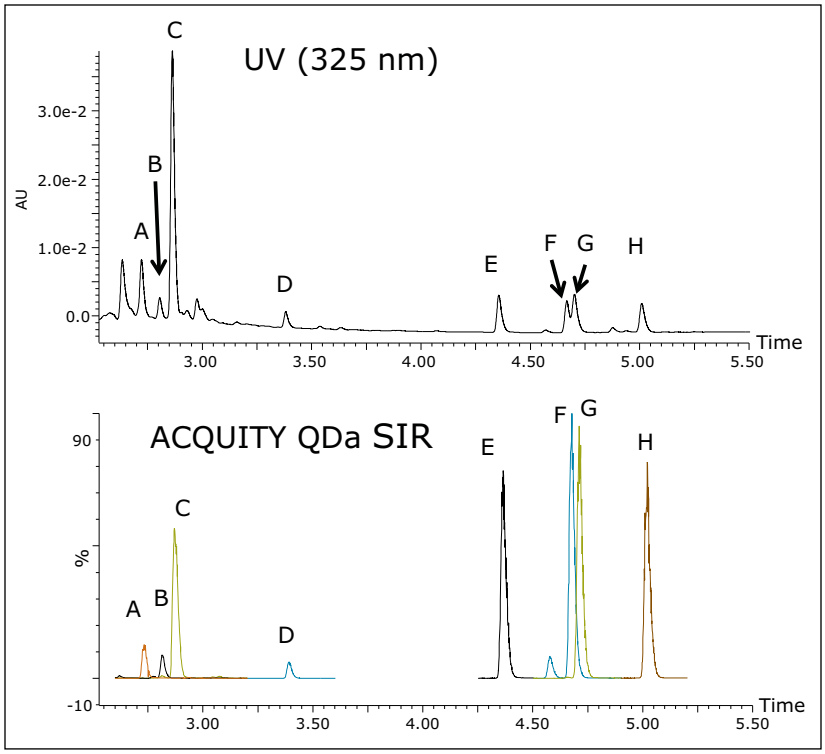

图2. 果汁中黄酮类化合物的UV和SIR色谱图: A)芸香柚皮苷、B)香叶木甙、C)橙皮甙、D)香风草甙、E)甜橙素、F)川陈皮素、G)四甲氧基野黄芩素和H)橘皮素。

ACQUITY QDa检测器的选择性简化了色谱方法开发工作。只要化合物能被质谱选择出来，色谱方法就无需达到基线分离。UV/Vis或其他光学检测器都要求所有分析物实现色谱基线分离，这对于某些结构相近的化合物来说非常困难，而且通常需要更长的运行时间。本文介绍的方法的总进样循环时间(包括柱平衡时间)为13分钟，比现有方法快至少四倍。果汁的分析结果汇总于表2中。分析性能与现有的QC方法相当。

表2. 柑橘类果汁中多酚类物质测定的准确度和重复性(n=10)。

分析物	RT (min)	准确度 (%)	重复性 RSD (%)
芸香柚皮苷	2.73	86	3
香叶木甙	2.81	139	8
橙皮甙	2.87	82	3
香风草甙	3.39	94	4
甜橙素	4.36	103	4
川陈皮素	4.68	110	3
四甲氧基野黄芩素	4.71	100	3
橘皮素	5.02	112	3

结论

与通常使用的光学检测器相比，配备ACQUITY QDa检测器的沃特世ACQUITY UPLC H-Class系统提高了检测柑橘类果汁中黄酮类化合物的选择性。选择性的提升简化了分析方法的开发，得到更加快速、简便的色谱方法，同时也使得样品制备步骤更快、更高效。这些功能改进进而提高了实验室效率和样品通量。除此之外，ACQUITY QDa检测器的易用性及合理的成本也让它成为常规分析实验室的必备工具。

参考文献

1. AOAC Official Method 999.05 Naringin and Neohesperidin in Orange Juice, Official Method of Analysis, AOAC.
2. W Widmer. Determination of Naringin and Neohesperidin in orange juice by liquid chromatography with UV detection to detect the presence of grapefruit juice: collaborative Study. *J. AOAC Int.* 83(5): 1155, 2000.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。ACQUITY QDa是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014 沃特世公司 印制于中国 2014年3月 720004985ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 5999
成都: 028 - 6578 4990
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com