Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用ionKey/离子淌度质谱筛查和分析食品中的天然甜味剂甜菊糖苷

[1] M. McCullagh, [1]D. Douce, [1]R. Rao和[2]S. Goscinny
[1] 沃特世公司(英国威姆斯洛)
[2] Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid-Institut Scientifique de Santé Publique(比利时布鲁塞尔)

应用优势

- 利用ionKey/MS™和离子淌度碰撞截面(CCS)的选择性增强电离/传输效率，为复杂的食品类商品中的甜菊苷异构体分析提供更高的灵敏度。
- 使用离子淌度可以分离色谱共洗脱的同分异构物质。
- 明确鉴定甜菊苷异构体，验证食品中甜菊苷的来源(即，天然、合成、半合成)以及制造工艺。

沃特世解决方案

ionKey/MS系统
PCA iKey™分离仪
ACQUITY UPLC® M-Class系统
沃特世(Waters®)离子淌度质谱系统
UNIFI®科学信息系统

关键词

异构体鉴定，甜菊苷，异构体，离子淌度，CCS，甜味剂，天然食品，植物分析，甜菊，微流

简介

甜菊是一种原产于南美洲的菊科常青灌木。由于其叶片中富含具有食用价值的天然甜味剂，甜菊具有重要的经济价值。它又被称为“巴拉圭甜草”。目前，北美洲、南美洲、亚洲和一些欧洲国家已将甜菊植株或提取物用作甜味剂。食品添加剂联合专家委员会(JECFA)建立了一系列关于甜菊糖苷的规定，要求七种化学定义的甜菊糖苷必须达到95%以上的纯度[1]。

对食品中的甜菊糖苷进行全面的残留分析是一项颇为棘手的任务，因为此类分析需要利用通用提取步骤检测复杂食品类商品中的低浓度甜菊糖苷异构体，其本身具有一定的局限性。该分析存在两方面的挑战，一是样品中的甜菊糖苷含量可能很低，因为它们可能会与其它甜味剂或糖类共同使用。此外，如果样品中的一种或两种糖苷(如莱苞迪甙A)的浓度极高，则进行低浓度检测将非常困难。化合物的异构体可能具有不同的化学性质 — 它们可能风味各异，吸收、分布、代谢特性、去除方法和毒性也不尽相同。因此，我们有必要了解能够决定食品风味的物质组成。我们可采用一种具有高选择性和高灵敏度的初步筛选方法进行定性分析，除此之外还需要进行大量的检测工作以测定甜味剂的纯度，因为纯度也会影响风味[2-4]。

高分辨率质谱(HRMS)全扫描具有高度特异性，理论上其可检测的化合物数量没有限制。飞行时间(Tof)质谱技术的不断发展使得分析能够达到更高的灵敏度、分辨率和质量精度(尤其是亚2 ppm)。Tof MS通常与保留时间偏差、同位素匹配、碎片离子/比率及响应阈值结合使用，用于减少筛查分析中的假阳性和假阴性检测结果。

质谱技术的发展已大大提高了全谱图分析的灵敏度，但进一步提高其灵敏度将能够改善质谱数据的质量。这一点对于保证母离子和碎片离子信息的准确性非常重要，还可确保低分析物浓度水平下的质量精度。尽管MS分析已有如此大的进步，但要快速且高效地鉴定样品中的目标异构化合物仍然极具挑战性(尤其是当样品中含有大量的共提取基质组分时)。已有文献介绍过使用ionKey/MS可提升分析的灵敏度，并且具有其它优势[5]，包括可稀释样品以降低基质抑制效应，从而提高可获得的总体分析物信噪比值。

本应用纪要介绍了碰撞截面(CCS)测量与其它MS新技术联用能够为复杂混合物分析带来的选择性优势。本研究结合了高分辨率质谱与基于离子淌度的高效测量和分离方法。离子淌度是一项快速的正交气相分离技术，能在LC时间范围内获得另一个维度的分离。根据化合物的大小、形状和电荷，可以对化合物进行区分。

CCS值CCS值是离子理化性质中的一个稳定而且精确的数值。它是区分每种化合物的化学结构和三维构象差异的一个重要特性[6]。使用基于氮气的行波碰撞截面($^{TW}CCSN_2$)测量方法可提高非靶向筛查的特异性。之前得到的$^{TW}CCSN_2$测量结果已录入UNIFI科学数据库。因此我们可利用TWCCSN2的预期值和测定值筛查并确认甜菊糖苷的存在。本文介绍了一种采用ionKey/MS和离子淌度质谱(IM-MS)筛查食品中的甜菊糖苷的独特方法，该方法利用了这两项技术明显展现了特异性和灵敏度的优势。目标甜菊醇和甜菊糖苷的结构如图1所示。

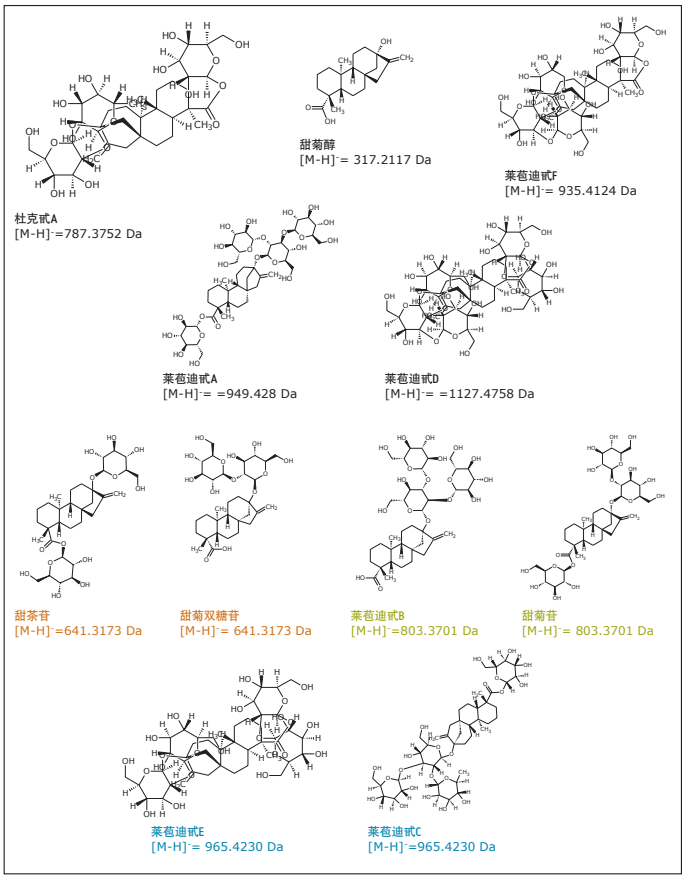


图1. 本研究中使用的甜菊醇和甜菊糖苷的结构。

实验

LC条件

LC系统: ACQUITY UPLC M-Class
流动相A: 100%水(含0.1%甲酸)
流动相B: 100%乙腈(含0.1%甲酸)
梯度:

时间 (min)	流速	%A	%B
0.00	2	99.0	1.0
1.00	2	99.0	1.0
3.00	2	90.0	10.0
5.00	2	70.0	30.0
13 .00	2	1.0	99.0
15.00	2	1.0	99.0
15.10	2	99.0	1.0
17.00	2	99.0	1.0

流速: iKey 2.0 µL/min
进样体积: 1 µL(满定量环)
色谱柱: 具有柱后添加功能的 iKey分离装置, BEH C_{18}, 130Å, 1.7 µm, 150 µm x 50 mm
iKey柱温: 40 °C

MS条件

MS系统: SYNAPT G2-S*i*
电离模式: ESI-
毛细管电压: 2.6 kV
样品锥孔电压: 20 V
锁定质量数和锁定CCS: 亮氨酸脑啡肽, [M-H]- = 554.2620
采集范围: 50 -1200 m/z
采集速率: 10谱图/s
碰撞能量范围: 30-70 eV
分辨率: 20,000 FWHM(分辨率模式)

默认IMS参数

IMS T-Wave™
流速梯度: 开始: 1000 m/s
结束: 300 m/s

IMS T-Wave
脉冲高度: 40 V
IMS气体流速: 90 mL
IMS工作周期: 10.8 ms

提取条件

分两步净化空白巧克力酱样品。第一步，采用液液萃取法去除脂肪。然后对已去除脂肪的提取物进行C_{18}固相萃取，去除其它基质组分。将最终提取物溶解于乙腈中。样品制备完成后，所得提取物中的基质浓度为0.1 g/mL。

甜菊糖苷

使用浓度≤ 1 mg/mL的10种甜菊糖苷及甜菊醇的甲醇溶液(表1)制备净化后的基质强化稀释液。

	溶剂标准储液(H2O)				
化合物	**储液浓度 mg/mL***	**稀释液1浓度 ng/µL**	**稀释液2浓度 ng/µL**	**稀释液3浓度 ng/µL**	**预期保留时间**
莱苞迪甙E	0.92	9.2	0.92	0.092	6.60
莱苞迪甙D	0.80	8.0	0.80	0.080	6.68
莱苞迪甙F	0.76	7.6	0.76	0.076	7.31
甜茶苷	0.68	6.8	0.68	0.068	7.58
莱苞迪甙B	0.70	7.0	0.70	0.070	7.78
甜菊双糖苷	0.72	7.2	0.72	0.072	7.82
甜菊苷	1.00	10.0	1.00	0.10	9.50
莱苞迪甙A	1.00	10.0	1.00	0.10	9.50
甜菊醇	0.64	6.4	0.64	0.064	9.51
莱苞迪甙C	1.00	10.0	1.00	0.10	9.69
杜克甙A	1.00	10.0	1.00	0.10	9.71

表1. 制备甜菊苷加标巧克力酱提取物样品采用的溶剂标准品浓度。

**表示所用的11种分析物中有7种分析物的初始浓度低于1 mg/mL。*

加标方案

为避免出现任何回收率问题，我们在完成净化处理之后的空白基质样品中进行加标操作(表2)。采用与CCS分析结合的策略来确定复杂基质中的检测限，因此我们使用10 mg/mL的恒定基质浓度进行采集(表3)。

商品样品的起始质量(g/mL)	基质体积	溶剂标准品稀释液1的体积	H_2O的体积	最终浓度
0.1	100 µL	10 µL	790 µL	甜菊苷≤ 100 pg/µL 基质= 10 mg/mL
商品样品的起始质量(g/mL)	基质体积	溶剂标准品稀释液2的体积	H_2O的体积	最终浓度
0.1	100 µL	10 µL	790 µL	甜菊苷≤10 pg/µL 基质= 10 mg/mL
商品样品的起始质量(g/mL)	基质体积	溶剂标准品稀释液3的体积	H_2O的体积	最终浓度
0.1	100 µL	10 µL	790 µL	甜菊苷≤1 pg/µL 基质= 10 mg/mL

表2. 最终加标巧克力酱提取物稀释样品的制备方法，其中提取物浓度为10 mg/mL，甜菊苷浓度分别为≤ 100 pg/µL、10 pg/µL和1 pg/µL。

参数	上样详情
	iKey
进样溶剂组成	H_2O/乙腈(90:10)
基质中的加标浓度(mg/kg)	≤ 100 µg/kg、1 mg/kg、10 mg/kg
最终提取物中的甜菊苷溶液的浓度(ng/mL)	≤ 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL
基质载样(µg/mL)	10 mg/mL
进样体积(µL)	1 µL
定量环规格(µL)与进样模式	1 µL 满定量环
色谱柱上加载的甜菊醇 + 甜菊苷质量(pg)	变量见表2

表3. 使用iKey分析的加标甜菊苷样品的样品负载和基质负载。

如图2所示的柱后添加(PCA) iKey分离装置(部件号186007256)配备有直径150 µm的分离通道，其中填充了1.7 µm, ACQUITY UPLC BEH C_{18}固定相。iKey的温度被设置为40 °C，从分离通道中流出的洗脱液直接进入集成的ESI发射装置。将iKey插入源外壳并锁定到位后，所有的微流体、气体和电子接口将自动接合。该设备配备有一个附加通道，可执行IPA溶剂的柱后添加。在本可行性研究中，补偿溶剂被配置为从MS系统流路的通道A输送。

图2. 柱后添加(PCA) iKey分离仪。

结果与讨论

本实验成功建立了在复杂混合物中筛查甜菊糖苷的高灵敏度和选择性的分析方法。

通过基于氮气的行波碰撞截面（$^{TW}CCSN_2$）、精确质量数、碎片离子和保留时间这些信息，鉴别甜菊糖苷莱苞迪甙A～F、甜茶苷、甜菊醇、杜克甙A、甜菊双糖苷和甜菊苷。使用标志物标准品（≤100 pg/µL）轻松测得CCS测量值之后，我们将这些信息与预期的甜菊糖苷$^{TW}CCSN_2$值相结合，在UNIFI中创建了一个科学数据库。之前的研究表明，$^{TW}CCSN_2$筛查具有谱图净化、避免假阳性结果以及发现农药前体等优势[7-9]。由于需要明确鉴定三对异构体，本次分析的难度进一步增大。甜菊糖苷极易碎裂，而且很可能发生源内碎裂，这会导致同分异构碎片产生，出现假阳性鉴定结果[10]。

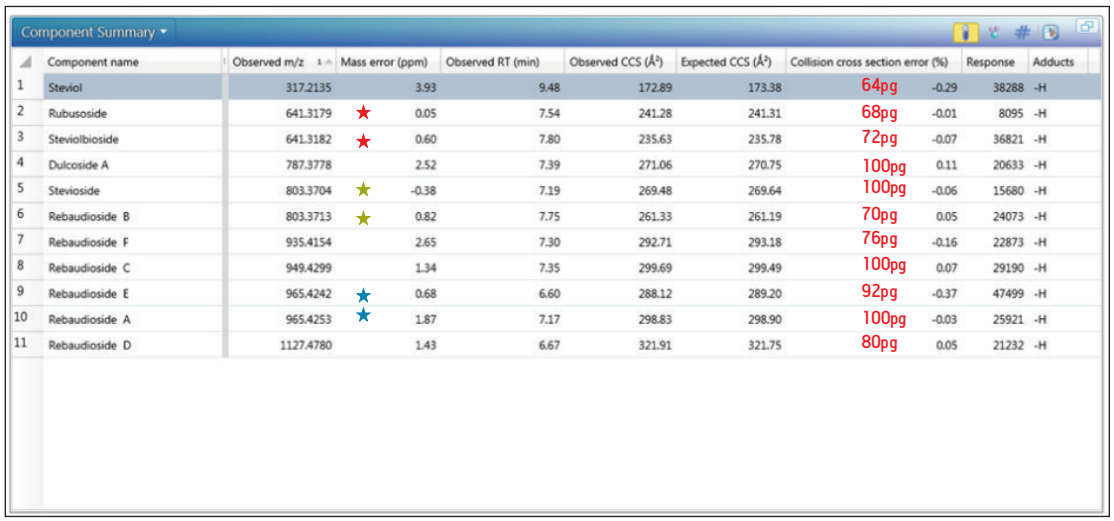
化合物	分子式	$[M-H]^-$	预期保留时间	预期$^{TW}CCSN_2$ (Å$_2$)
莱苞迪甙E	C44H70023	965.4230	6.60	289.2
莱苞迪甙D	C50H80028	1127.4758	6.68	321.75
莱苞迪甙F	C43H68022	935.4124	7.32	293.18
甜茶苷	C32H50013	641.3173	7.56	241.31
莱苞迪甙B	C38H60018	803.3701	7.77	261.19
甜菊双糖苷	C32H50013	641.3173	7.81	235.78
甜菊苷	C38H60018	803.3701	7.20	269.64
莱苞迪甙A	C44H70023	965.4230	7.17	299.48
甜菊醇	C20H3003	317.2117	9.48	173.38
莱苞迪甙C	C44H70022	949.4280	7.37	299.49
杜克甙A	C38H60017	787.3752	7.40	270.75

表4. 甜菊醇和甜菊苷的预期保留时间和预期CCS值。

将分析物加标至巧克力酱提取物（10 mg/mL），并使用ionKey/MS和离子淌度进行分析，然后与UNIFI中的甜菊苷$^{TW}CCSN_2$数据库进行比对筛查。

如表4所示，我们使用甜菊苷标准品确定了甜菊糖苷异构体对（甜茶苷241.31 Å/甜菊双糖苷235.78 Å）、（莱苞迪甙B 261.19 Å2/甜菊苷269.64 Å2）和（莱苞迪甙A 298.9 Å2/莱苞迪甙E 289.2 Å2）的$^{TW}CCSN_2$分配。我们还确定了甜菊醇和其余甜菊苷的CCS测量值：甜菊醇（173.38 Å2）、杜克甙A（270.75 Å2）、莱苞迪甙F（293.18 Å2）、莱苞迪甙C（299.49 Å2）和莱苞迪甙D（321.75 Å2）。

加标至巧克力酱提取物的甜菊苷的预期$^{TW}CCSN_2$值和测定$^{TW}CCSN_2$值如表4所示。UNIFI组分汇总结果（图3）清楚地显示了使用CCS测量值并展示了将ionKey/MS与离子淌度联用的优势。比较预期和测定碰撞截面可得，柱上载样量≤ 100 pg时（图3中的红色文本显示了实际浓度），$^{TW}CCSN_2$测量值的误差通常< 0.4%，质量数测量误差RMS = 1.85 ppm。



Component Summary

	Component name	Observed m/z	Mass error (ppm)	Observed RT (min)	Observed CCS (Å²)	Expected CCS (Å²)	Collision cross section error (%)	Response	Adducts
1	Steviol	317.2135	3.93	9.48	172.89	173.38	64pg -0.29	38288	-H
2	Rubusoside	641.3179	0.05	7.54	241.28	241.31	68pg -0.01	8095	-H
3	Steviolbioside	641.3182	0.60	7.80	235.63	235.78	72pg -0.07	36821	-H
4	Dulcoside A	787.3778	2.52	7.39	271.06	270.75	100pg 0.11	20633	-H
5	Stevioside	803.3704	-0.38	7.19	269.48	269.64	100pg -0.06	15680	-H
6	Rebaudioside B	803.3713	0.82	7.75	261.33	261.19	70pg 0.05	24073	-H
7	Rebaudioside F	935.4154	2.65	7.30	292.71	293.18	76pg -0.16	22873	-H
8	Rebaudioside C	949.4299	1.34	7.35	299.69	299.49	100pg 0.07	29190	-H
9	Rebaudioside E	965.4242	0.68	6.60	288.12	289.20	92pg -0.37	47499	-H
10	Rebaudioside A	965.4253	1.87	7.17	298.83	298.90	100pg -0.03	25921	-H
11	Rebaudioside D	1127.4780	1.43	6.67	321.91	321.75	80pg 0.05	21232	-H

图3. 加标至巧克力酱提取物的甜菊醇和分析甜菊苷（浓度≤ 100 pg/µL，每种分析物的实际柱上浓度（pg/µL）以红色文本显示）的UNIFI组分汇总。三对异构体以彩色星号突出显示，每对异构体都采用CCS实现了明确区分。

图4的UNIFI组分汇总表列出了分析物浓度≤ 1 pg/µL时的分析结果，总体RMS误差为2.72 ppm。但甜茶苷的质量数误差为-7.46 ppm，峰面积响应仅为63。在如此低的浓度下，质量数测定误差受到基质背景中其它丰度更高的离子的影响。我们采用10 ppm的质量数测定容差和2%的CCS%容差进行了数据筛查，确保了痕量(680 fg)甜茶苷鉴定结果的可靠性，同时避免了假阴性检测结果。

Component Summary

	Component name	Observed m/z	Mass error (ppm)	Expected RT (min)	Observed RT (min)	Observed CCS (Å²)	Expected CCS (Å²)	Collision cross section error (%)		Response	Adducts
1	Steviol	317.2120	-0.74	9.48	9.47	174.23	173.38	640fg	0.49	679	-H
2	Rubusoside	641.3131 ★	-7.46	7.56	7.55	242.34	241.31	680fg	0.43	63	-H
3	Steviolbioside	641.3173 ★	-0.91	7.81	7.81	235.28	235.78	720fg	-0.21	372	-H
4	Dulcoside A	787.3739	-2.44	7.40	7.39	271.89	270.75	1pg	0.42	146	-H
5	Stevioside	803.3688 ★	-2.32	7.19	7.19	269.47	269.64	1pg	-0.06	163	-H
6	Rebaudioside B	803.3688 ★	-2.31	7.77	7.76	261.84	261.19	700fg	0.25	347	-H
7	Rebaudioside F	935.4106	-2.47	7.32	7.30	292.37	293.18	760fg	-0.28	300	-H
8	Rebaudioside C	949.4277	-0.92	7.37	7.36	299.86	299.49	1pg	0.12	334	-H
9	Rebaudioside A	965.4230 ★	-0.53	7.17	7.17	299.47	298.90	1pg	0.19	370	-H
10	Rebaudioside E	965.4240 ★	0.46	6.61	6.61	288.71	289.20	920fg	-0.17	1099	-H
11	Rebaudioside D	1127.4755	-0.72	6.68	6.67	322.51	321.75	800fg	0.24	229	-H

图4. 加标至巧克力酱提取物的甜菊醇和分析甜菊苷(浓度≤ 1 pg/µL，每种分析物的实际柱上浓度(pg/µL)以红色文本显示)的组分汇总表。三对异构体以彩色星号突出显示，每对异构体都常采用CCS实现了明确区分。

加标至巧克力酱提取物的甜菊醇和分析甜菊苷(≤1 pg/µL)的组合提取质谱图如图5所示。如图所示，甜菊苷和莱苞迪甙A在7.18分钟处共洗脱。

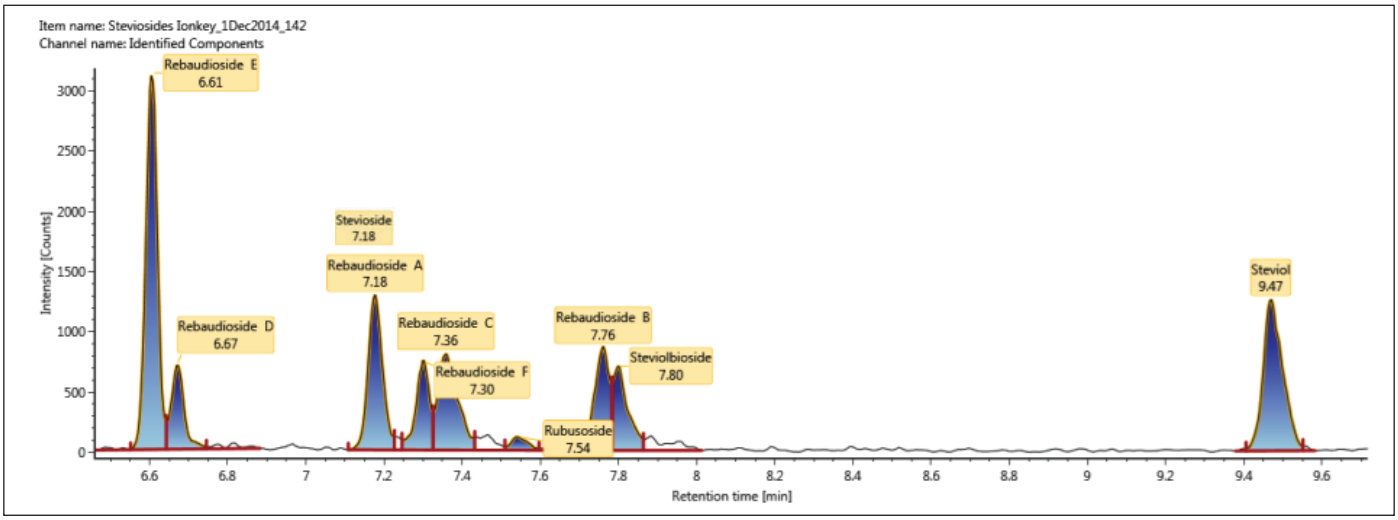


图5. 加标至巧克力酱提取物的甜菊醇和分析甜菊苷(≤1 pg/µL)的提取质谱图。

然而，如图6所示，使用离子淌度分离时，我们在保留时间7.18分钟处得到了两种同量异位的物质(m/z 803.3707)。莱苞迪甙A(棕色m/z 965.4)和共洗脱的甜菊苷(绿色m/z 803.37)在7.19分钟处的保留时间校准多组分谱图如图7所示。

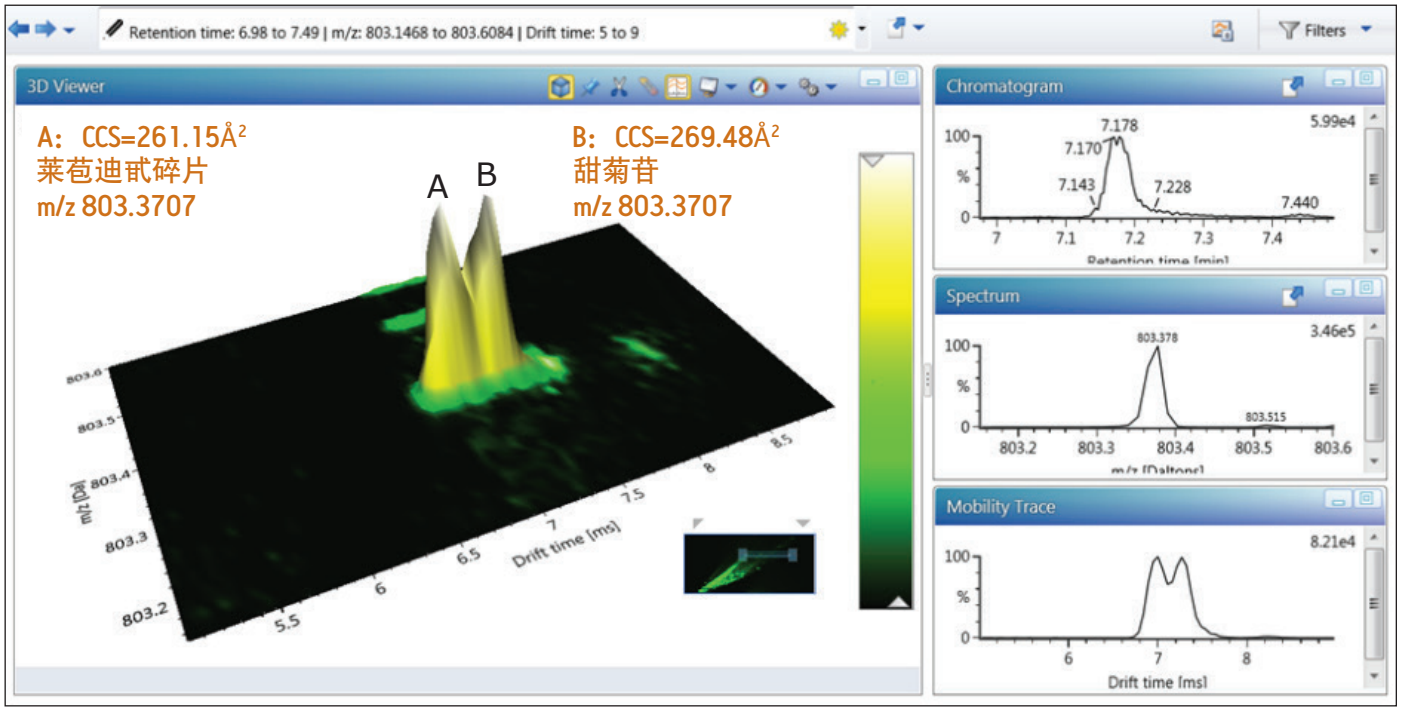


图6. UNIFI离子淌度3D数据查看器结果，显示了保留时间7.18分钟处的两种离子淌度分离的化合物(m/z 803.3707)，其计算所得的™CCSN$_2$值分别为261.15 Å²和269.48 Å²。

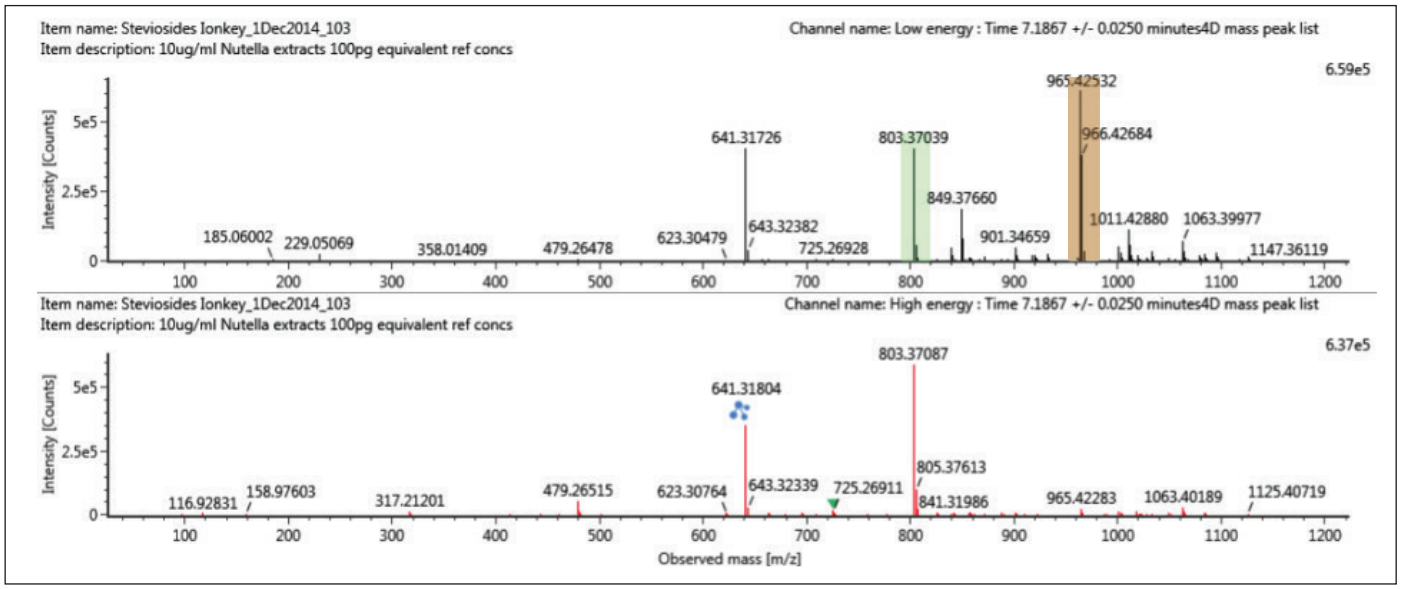


图7. 莱苞迪甙A(棕色m/z 965.4)和共洗脱的甜菊苷(绿色m/z 803.37)在7.19分钟处的保留时间校准多组分谱图。下方显示的是保留时间校准的碎片谱图。

利用经保留时间和漂移时间校准的“净化”离子淌度产物离子谱图，我们可获得从共洗脱组分中分离的甜菊苷(图8)和莱苞迪甙A(图9)的单一组分母离子和离子淌度产物离子谱图。离子淌度技术揭示了同分异构体的共洗脱现象，若不进行离子淌度分离，我们将无法观察到该现象。如图6所示，莱苞迪甙A产生了一个源内碎片离子，其CCS为261.15 Å^2，而甜菊苷为269.48 Å^2。

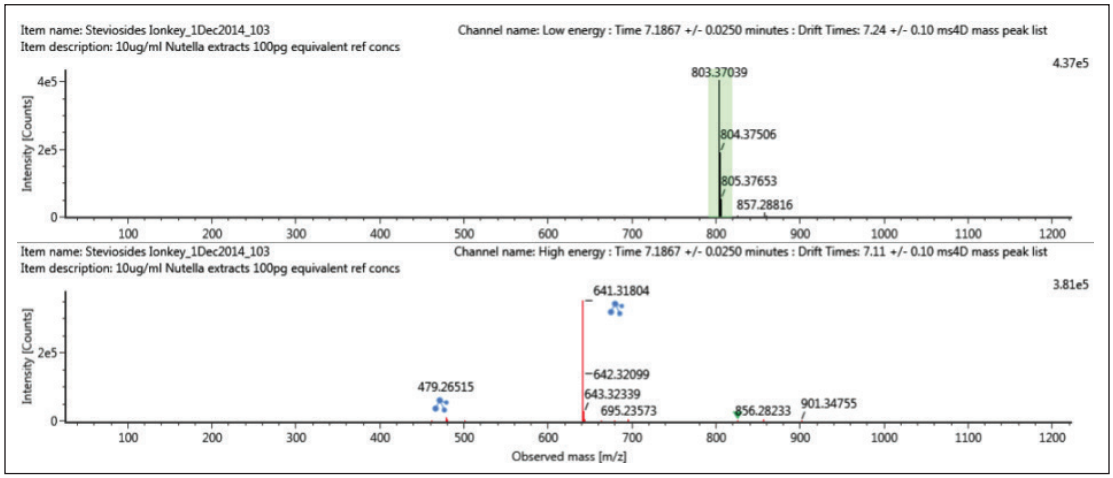


图8. 甜菊苷(绿色m/z 803.37)的保留时间(7.19 min)和漂移时间(7.24 m)校准谱图。一同显示的还有保留/漂移时间校准的离子淌度产物离子谱图。

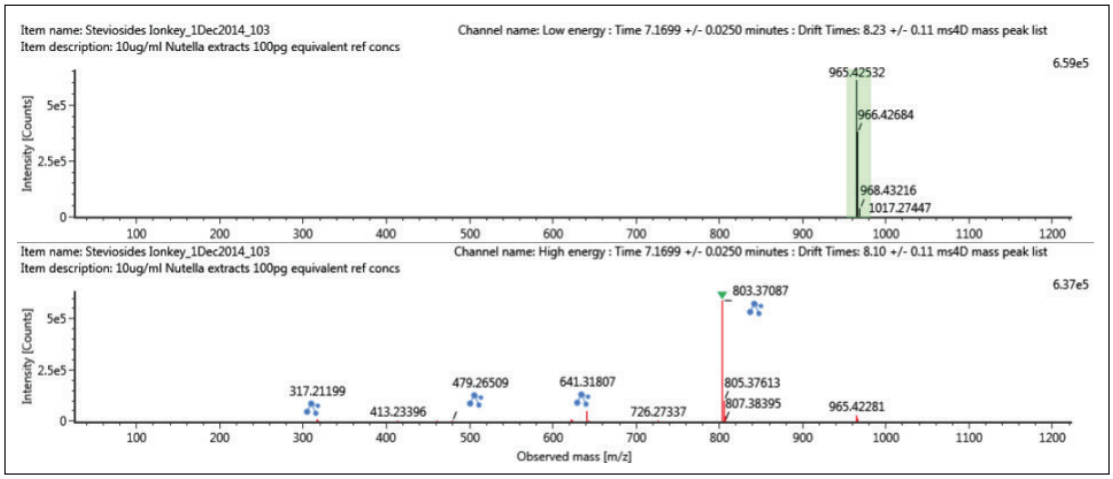


图9. 莱苞迪甙A(绿色m/z 965.4)的保留时间(7.17 min)和漂移时间(7.83 m)校准单一组分谱图。一同显示的还有保留/漂移时间校准的离子淌度产物离子谱图。

本研究利用微流路色谱™CCSN$_2$离子淌度筛查首次实现了甜菊糖苷的独有CCS测量值、母离子谱图和相应的异构体碎片离子谱图。本方法减少了两种昂贵商品(即高纯度标准品和溶剂)的用量，且有可能省去在未来的筛查分析中再次购买昂贵的高纯度标准品的需求(本研究所用的标准品花费2500欧元)。

结论

- ionKey/MS结合离子淌度技术可为复杂基质分析提供独特的优势:
  - 灵敏度与高分辨率全谱图采集相结合。
  - 谱图净化。
  - 利用碰撞截面测量在鉴定中获得独特的选择性并提高结果可靠性。
- 展示了离子淌度的选择性优势，采用准确质量数测量和TWCCSN$_2$测量值成功检测并区分了痕量水平的甜菊苷异构体残留物。
- 成功分离了色谱共洗脱的同分异构体(甜菊苷和莱苞迪甙碎片)。
- iKey/MS提供了分析低浓度甜菊苷所需的高灵敏度。
- 对于分析人员而言，ionKey/MS系统与常规离子淌度筛查配合，能够为“常规使用”的平台增加微流体色谱的优势。
- 应用ionKey/MS离子淌度可降低分析成本:
  - 降低溶剂消耗和废物处理成本。
  - 降低购买昂贵分析标准品的成本。

扫一扫，关注沃特世微信

参考文献

1. J Pól, B Hohnová, T Hyötyläinen. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2010) *Compendium of Food Additive Specifications, Monograph 5, Steviol glycosides*. http://www.fao.org/docrep/011/i0345e/i0345e00.htm (accessed November 2010) 73rd JECFA (2010) published in FAO JECFA Monographs 10 (3).
2. *EFSA Journal* 2011; 9(5):2181.
3. C Well, O Frank, T Hofmann.* Quantitation of Sweet Steviol Glycosides by Means of a HILIC-MS/MS-SIDA Approach. *J Agric Food Chem.* 61: 11312 11320, 2013.
4. R Shah, L S De Jager, T H Begley. Simultaneous determination of steviol and steviol glycosides by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 29,12: 1861–1871, No. 12, December 2012.
5. M McCullagh, S Goscinny, V Hanot, R Tyldesley Worster, and D Douce. Exploring the Benefits and Potential of iKey Microfluidic Chromatography and Time-of-Flight Mass Spectrometry for Pesticide Residue Analysis. Waters Application Note No. 720005195en. October 2014.
6. The use of collision cross section measurements (CCS) in food and environmental analysis. Waters Technical Note No. 720005374en, April 2015.
7. M McCullagh, G Cleland, V Hanot, J Williams, S Goscinny. Collision Cross Section a New Identification Point for a “Catch All” Non Targeted Screening Approach. Waters Application Note No. 720005055en, June 2014.
8. M McCullagh, V Hanot, S Goscinny. The Use of Ion Mobility Spectral Cleanup and Collision Cross Section Values to Increase Confidence and Efficiency in Pesticide Residues Screening Strategies. Waters Application Note No. 720005080en, June 2014.
9. M McCullagh, D Eatough, V Hanot, S Goscinny. Discovery of Pesticide Protomers Using Routine Ion Mobility Screening. Waters Application Note No. 720005028en, June 2014.
10. B F Zimmermann. Tandem mass spectrometric fragmentation patterns of known and new steviol glycosides with structure proposals. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25: 1575–1582, 2011.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, SYNAPT, High Definition Mass Spectrometry, HDMS, UNIFI, UPLC和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。T-Wave, ionKey/MS, iKey和ionKey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。

©2015年 沃特世公司　中国印刷　2015年5月 720005421ZH 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 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

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