Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用UPLC-IM-MS常规分离方法提升天然食品的验证分析的专属性和准确性

[1]M McCullagh, [1]D Douce, [3]C A M Pereira和 [2]JH Yariwake
[1]沃特世公司(英国威姆斯洛)
[2]Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, Brazil
[3]Centro Universitario Central Paulista – UNICEP, São Carlos, Brazil

应用优势

- 独具特色的黄酮类异构体标志物常规非靶向筛查工作流程。
- 行波碰撞截面测定(TWCCSN$_2$)值可用作表征6-C和8-C黄酮苷异构体(牡荆素/异牡荆素，荭草素/异荭草素)的额外鉴定因素。
- ACQUITY UPLC®和离子淌度质谱(UPLC-IM-MS)可用于与产品制造/加工、形态分析或饮食的影响分析等相关的验证分析。
- 该UPLC®-IM-MS筛查工作流程仅通过一次采集即可生成10,000多种分析物的TWCCSN$_2$值。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC I-Class系统

ACQUITY UPLC BEH C_{18}色谱柱

沃特世(Waters®)离子淌度质谱系统

UNIFI®科学信息系统

关键词

黄酮类化合物，西番莲属，多酚类化合物，花草茶，植物药，牡荆素，异牡荆素，异荭草素，荭草素C-碳苷，CCS，离子淌度

简介

行波碰撞截面测量(TWCCSN$_2$)结合了UPLC-IM-MS和氮气缓冲气体带来的峰容量优势，能够在常规分析中明确鉴定花草茶产品和营养保健品等复杂混合物中的黄酮类异构体标志物。西番莲属植物中包括约450个品种，但仅有一小部分得到了商业开发利用。若干种西番莲属(西番莲科)品种被用作植物药(抗焦虑药)，其中包含黄酮类化合物，主要是常常以异构体形式存在的C-碳苷黄酮-芹菜素和木犀草素衍生物。黄酮类化合物是自然界中普遍存在的多酚类化合物，也是数量最多且分布最广的化合物种类之一。迄今为止，人们已鉴别出4,000多种黄酮类化合物，它们多种多样的药理作用及生物活性引发了科研领域的广泛关注。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。

在目前的IM-MS验证研究中，研究人员已对粉色西番莲、紫果西番莲、蓝花西番莲和翅茎西番莲品种进行了分析。西番莲属植物中最著名的是产于欧洲和北美的粉色西番莲。原产自巴西的紫果西番莲也很受欢迎，已在许多国家种植用于生产食果。西番莲果(紫果西番莲和翅茎西番莲)在巴西被称为Maracujá(百香果)，巴西是世界上最大的紫果西番莲产地。紫果西番莲在美国和欧洲也相当受欢迎，因为它的果实非常可口，并且其叶片提取物具有镇静/安神效果。

在食品行业中，西番莲的叶片提取物还可用于调味或用于制作果汁[2]。其果实常用于制作果汁、冰淇淋或直接食用。

紫果西番莲是其它许多南美国家(包括巴拉圭、阿根廷和秘鲁)热带地区的原产植物。

除了抗焦虑作用外，紫果西番莲的叶片还具有公认的抗炎活性。已有人研究过摄入紫果西番莲水性提取物可能在生物体内产生的保护性作用。紫果西番莲叶片的植物化学分析结果表明，其中的黄酮类化合物含量是翅茎西番莲的两倍[3]。因此，含紫果西番莲的产品将含有更多的植物化学成分，其镇静作用将比含有等量翅茎西番莲的产品更强。

如果用翅茎西番莲代替紫果西番莲，产品可能无法达到我们所需的和预期的镇静作用。标有“天然”标记的产品不一定安全，但如果按照法规标准生产，我们是可以保证此类产品的安全性的。根据自2011年4月30日起全面生效的欧盟指令2004/24/EC规定，制造商必须证明其产品按照严格的法规标准生产，并且保证产品中的成分含量一致且标识明确。

西番莲属物种的镇静特性与其植物化学成分组成有关。因此，对产品进行可靠的验证分析并获得准确的植物化学组成分析结果就显得尤为重要。基于HPLC-MS和HPLC-MS/MS的方法在黄酮类化合物分析中的应用越来越普遍。将黄酮类化合物作为标志物进行物种分析或产品验证分析是一种非常重要的分析方法，但由于样品成分复杂，这种方法具有一定的挑战性。Zucolotto等人[4]分析了来自南美的西番莲属物种中的C-碳苷黄酮类化合物，结果并未在紫果西番莲中鉴别出牡荆素，这一结果与Pereira等人[5]的研究结果一致。然而，利用UPLC和飞行时间(Tof)MS可确证翅茎西番莲中含有牡荆素[6]。当样品中含有异构体时，这类复杂样品的分析可能会变得非常棘手。由样品基质、色谱柱上样量和色谱条件等引起的任何细微色谱变化都有可能导致异构体发生共洗脱。即使采用MS/MS或CID单独进行质谱分析，也很难确定真正的样品组成，尤其是当异构体产生相同的碎片离子或产物离子时。但是，Pereira等人报道了由6C和8C糖苷产生的不同碎片离子[7]，此后March等人8的研究又进一步确证了这些结果。由于植物化学成分组成会影响生物学特性，因此，黄酮类化合物分析技术的发展与功能性食品的产品设计息息相关，因为这些技术发展有助于我们获得更多与功能性食品相关的健康和安全信息，还有助于改善产品的口感。

在本应用纪要中，我们考察了采用UPLC-IM-MS准确鉴别黄酮类异构体的可行性，因为该技术具备分析复杂混合物的一些独特优势。它结合了基于高分辨率质谱和高效离子淌度的检测方法以及UPLC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。

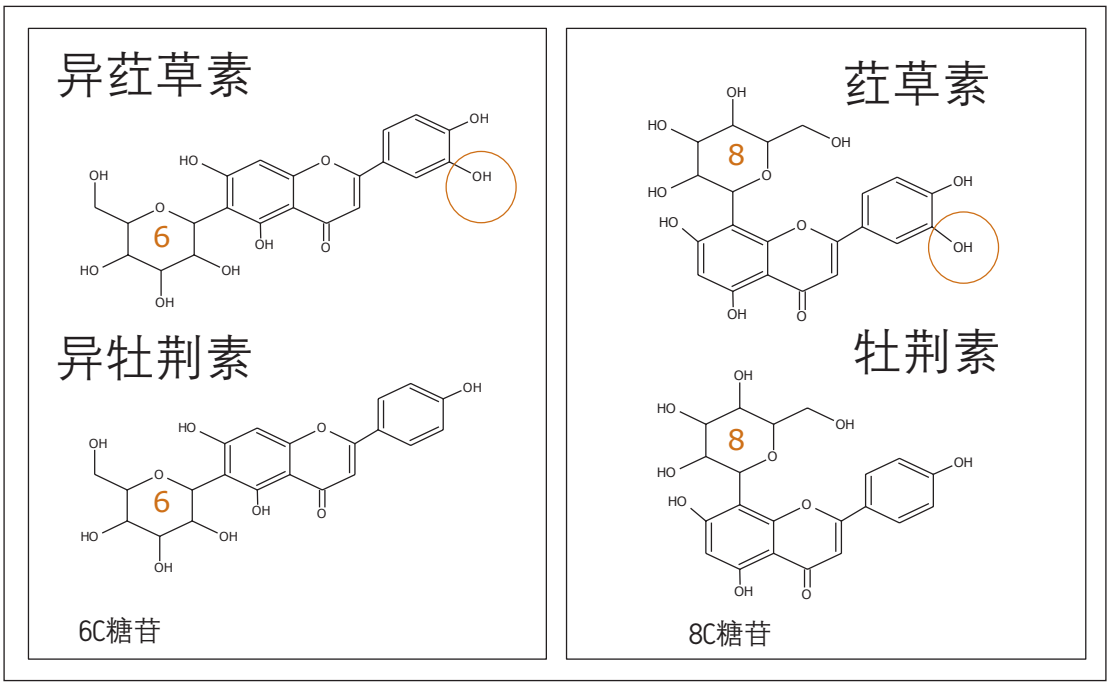

图1. 使用UPLC-IM-MS分析得到的6C和8C糖苷结构。

实验

UPLC条件

UPLC系统: ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm
柱温: 45 °C
流速: 0.75 mL/min
流动相A: H2O（含0.1%甲酸）
流动相B: 乙腈（含0.1%甲酸）
梯度:

时间 (min)	流速	%A	%B
0.00	0.75	98.0	2.0
1.00	0.75	98.0	2.0
5.00	0.75	95.0	5.0
10.00	0.75	80.0	20.0
13.00	0.75	70.0	30.0
15.00	0.75	20.0	80.0
15.10	0.75	98.0	2.0
17.00	0.75	98.0	2.0

进样体积: 2 µL

MS条件

MS系统: SYNAPT® G2-Si
电离模式: ESI -
毛细管电压: 2.3 kV
样品锥孔电压: 20 V
脱溶剂气温度: 600 °C
Lockmass和LockCCS: 亮氨酸脑啡肽，[M-H]- = 554.2620
采集范围: 50 -1200 m/z
采集速率: 10张图/s
碰撞能量梯度: 35~75 eV
分辨率: 20,000 FWHM（分辨率模式）
默认IMS参数:
IMS T-Wave™速度梯度:
起始: 1000 m/s
结束: 300 m/s
IMS T-Wave脉冲高度: 40 V
IMS气体流速: 90 mL

分析物描述

粉色西番莲、紫果西番莲、蓝花西番莲和翅茎西番莲的水醇提取物

提取步骤

用乙醇-水进行提取（2:1 v/v，1 g植物/10 mL溶剂，根据巴西药典步骤进行操作）。SPE纯化（Sep-Pak® RP-18，用60%甲醇–H_2O洗脱）。

水醇馏分=4 mg/mL。
用H_2O稀释水醇馏分: 10:1（400 µg/mL）和40:1（100 µg/mL）。

结果与讨论

碰撞截面(CCS)值是稳定而精确的离子理化性质。它是与离子化学结构和三维构象相关的一个重要区分特征[8]。使用氮气作为缓冲气体的行波碰撞截面测量($^{TW}CCSN_2$)方法能够提高目标筛查的特异性。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$^{TW}CCSN_2$的预期值和测定值筛查并确认黄酮类标志物是否存在。在此我们将$^{TW}CCSN_2$值(来自离子淌度漂移时间)作为新的鉴定参数，用于区分黄酮类异构体和分析未知物。

我们分别使用$^{TW}CCSN_2$值、分子离子精确质量数、离子淌度产物离子和保留时间作为鉴定参数来分析产自巴西的粉色西番莲、翅茎西番莲、紫果西番莲和蓝花西番莲的水醇提取物。所得的结果清楚地表明了使用CCS测量的优势以及ACQUITY UPLC I-Class系统与离子淌度检测相结合的峰容量优势。更高的峰容量有助于我们通过产物离子研究获取更丰富的信息，此外，我们还获得了共洗脱黄酮类化合物异构体的单独离子淌度产物的离子谱图。我们从提取物中获得了6C和8C黄酮苷异构体(牡荆素/异牡荆素，荭草素/异荭草素)的特征匹配结果，而仅通过质量数分辨无法得到该结果。

图2通过UPLC-IM-MS电喷雾负离子模式下获得的传统基峰离子色谱图展示了紫果西番莲提取物的复杂性。图3则使用UNIFI中的离子淌度数据浏览器展示了紫果西番莲样品的真实复杂性，所用数据采用与UPLC分离正交的离子淌度分离获得。

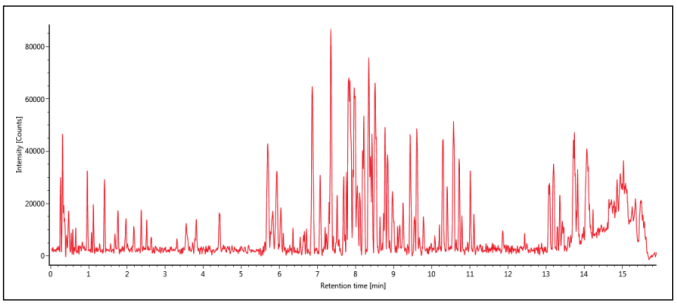

图2. 采用UPLC-IM-MS电喷雾负离子模式获得的紫果西番莲样品的传统基峰离子色谱图。展示了所分析的样品的复杂性。

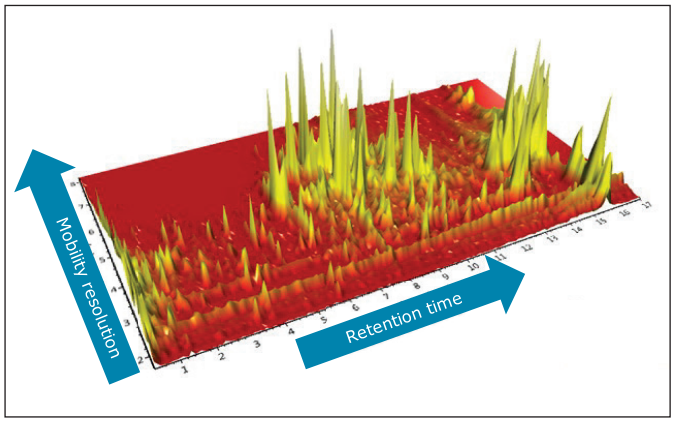

图3. 紫果西番莲样品的UPLC-IM-MS电喷雾负离子模式漂移时间图(离子淌度分辨率)对保留时间所作的图。

更高的峰容量不仅能够实现色谱共洗脱化合物的分离，还能够分离异构体。这样，在这一通用的筛查采集过程中，上述化合物和异构体的相应单独组分就能生成其母离子谱图/离子淌度产物离子谱图，通过碰撞产生的碎片谱图的特异性也显著提高。使用保留时间与离子淌度漂移时间将离子淌度产物离子与其母离子对应起来。这样，保留时间相同但漂移时间不同的两种分析物就能得到彼此完全分开的离子淌度产物离子谱图。该过程将产生最干净的离子淌度产物离子谱图。

获得黄酮类标志物标准品的CCS测定结果之后，在UNIFI中将该信息与预期的$^{TW}CCSN_2$值相结合，创建科学数据库。我们在UNIFI黄酮类$^{TW}CCSN_2$科学数据库中对四种西番莲属植物的提取物进行常规筛查，以确定是否存在6C和8C黄酮苷异构体并对其进行明确的鉴定。使用标准品测定了黄酮类标志物异荭草素(197.68Å2)、荭草素(187.64Å)、牡荆素(188.47Å2)和异牡荆素(195.03Å2)的预期$^{TW}CCSN_2$值。值得注意的是，在每对异构体中，8C糖苷的碰撞截面都更小，这可用作相对区分特征。该观察结果进一步展示了我们应该如何利用$^{TW}CCSN_2$的选择性。如果基质引起了保留时间漂移，或者如果使用了替代色谱方法，采用上述方法仍可区分糖苷对，无论其保留时间如何。

我们测定了蓝花西番莲复杂提取物中的标志物糖苷对(牡荆素/异牡荆素)188.8Å/195.5Å2的™CCSN$_2$值，结果如图4所示，与UNIFI中的黄酮类化合物筛查数据库中的CCS预期值相比，CCS误差分别为-0.17%和-0.24%。

图4还展示了蓝花西番莲的UNIFI组分汇总，展示了所选的牡荆素/异牡荆素的提取质谱图，以及获得的相应母离子谱图和离子淌度产物离子谱图。结果显示质量数测量误差< 2 ppm，还显示了预期/观察到的碰撞截面和碰撞截面误差。另外，提取质谱图显示，8.0~12.0 min之间出现了一系列同量组分。

图4. 蓝花西番莲的UNIFI组分汇总，展示了提取质谱图中选择的牡荆素(A)和异牡荆素(B)的，以及所得的相应的母离子谱图和离子淌度产物离子谱图。结果显示质量数测量误差<2 ppm，碰撞截面误差< 0.5%。提取质谱图还显示，8.0~12.0 min之间出现了一系列同量组分。

重现性和稳定性，其中的数据为10个月后进行重复分析所得，该实验是™CCSN$_2$多变量分析研究的一部分。将所得的结果与10个月前在UNIFI筛查数据库中创建的™CCSN$_2$预期值相比，得到的误差< 0.3%。

黄酮类标志物	异荭草素		荭草素		异牡荆素		牡荆素	
预期™CCSN$_2$	197.68Å²		187.64Å²		195.03Å²		188.47Å²	
物种	CCS (误差)	质量数误差 PPM	CCS (误差)	质量数误差 PPM	CCS (误差)	质量数误差 PPM	CCS (误差)	质量数误差 PPM
紫果西番莲	197.05 Å² (-0.54)	-1.28	187.31 Å² (-0.18)	-1.17	195.89 Å² (0.20)	-2.25	188.57 Å² (-0.12)	-0.25
翅茎西番莲	197.75 Å² (-0.18)	-0.98	187.57 Å² (-0.04)	-1.08	194.61 Å² (-0.46)	-1.57	188.51 Å² (-0.15)	-0.13
粉色西番莲	197.64 Å² (-0.24)	-1.89	187.47 Å² (-0.10)	-0.58	195.46 Å² (-0.02)	0.55	188.45 Å² (-0.18)	2.67
蓝花西番莲	197.68 Å² (-0.22)	-4.87	187.64 Å² (0.0)	-2.43	195.03 Å² (-0.24)	1.85	188.47 Å² (-0.17)	1.63
CCS标准差	0.32		0.14		0.55		0.05	
CCS RSD	0.16		0.08		0.35		0.03	
RMS质量数误差PPM		2.73		1.48		1.68		1.57

表1. 四个西番莲物种的CCS误差及质量数测量误差。

黄酮类标志物	异荭草素		荭草素		异牡荆素		牡荆素	
预期TWCCSN$_2$	197.68Å^2		187.64Å^2		195.03Å^2		188.47Å^2	
物种	CCS (误差)	质量数误差 PPM	CCS (误差)	质量数误差 PPM	CCS (误差)	质量数误差 PPM	CCS (误差)	质量数误差 PPM
紫果西番莲	197.65 Å^2 (-0.01)	2.51	187.37 Å^2 (-0.15)	2.46	195.51 Å^2 (0.01)	0.31	188.78 Å^2 (-0.01)	1.12
翅茎西番莲	197.78 Å^2 (-0.17)	3.30	187.36 Å^2 (-0.15)	0.07	195.14 Å^2 (-0.18)	-0.09	188.10 Å^2 (-0.36)	-0.28
粉色西番莲	197.41 Å^2 (-0.35)	1.45	187.31 Å^2 (-0.18)	3.49	195.44 Å^2 (-0.03)	1.39	188.32 Å^2 (-0.25)	2.50
蓝花西番莲	197.80 Å^2 (-0.16)	-1.40	187.32 Å^2 (-0.18)	-0.10	195.21 Å^2 (-0.15)	-0.91	188.51 Å^2 (-0.15)	0.94
CCS标准差	0.27		0.05		0.26		0.22	
CCS RSD	0.13		0.02		0.17		0.23	
RMS质量数误差PPM		2.31		2.14		0.85		1.45

表2. 在得到表1所示的研究结果10个月后，重复分析四个物种得到的CCS误差及质量数测量误差。

相应的UPLC-IM-MS漂移时间图(离子淌度分离)对保留时间的所作的图如图5所示。图中展示了样品的真实复杂性，通过离子淌度技术获得了与UPLC分离正交的分离结果。使用TWCCSN$_2$可区分8.0~12.0 min之间出现的一系列同量组分。独特的专利UNIFI淌度数据浏览器能够将显示的数据保存为标签，该标签随后可用于手动快速解析/查找实验分析的所有西番莲物种。图6中的等量候选物UNIFI组分汇总表中显示了分析所得的TWCCSN$_2$值，其中包括对物种进行离子淌度分离时得到的保留时间观测值、碰撞截面观测值、漂移时间观测值和检测器计数。获得的信息接下来将添加到分析方法中用于靶定目标化合物。

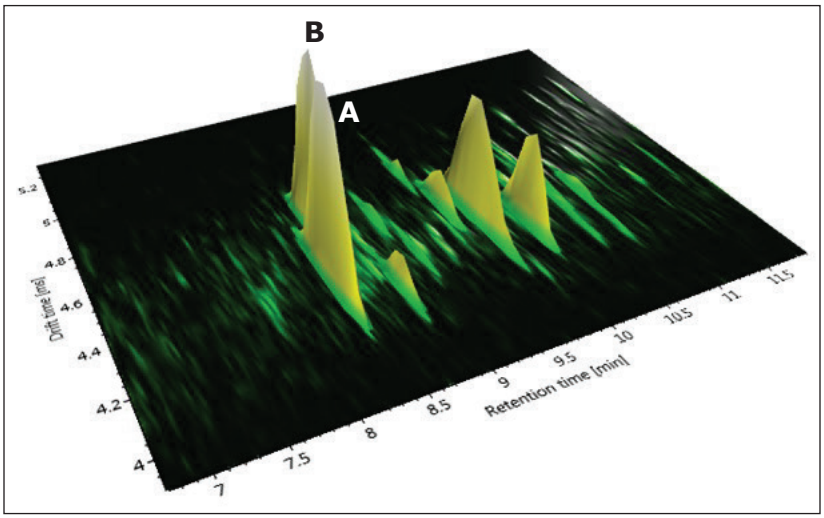

图5. 蓝花西番莲(牡荆素A和异牡荆素B)的UPLC-IM-MS电喷雾负离子模式漂移时间图对保留时间所作的图。图中展示了样品的真实复杂性，通过离子淌度技术获得了与UPLC分离正交的分离结果。图中展示了图4中的提取质谱图的离子淌度分离结果；使用TWCCSN$_2$可区分8.0~ 12.0 min之间出现的一系列同量组分。

Component Summary　View: *Accurate Mass Screening IMS

	Component name	Identification status	Observed RT (min)	Observed drift time (ms)	Observed collision cross section (Å^2)	Detector counts	Expected collisi
4984	Candidate Mass 431.0964	None	8.79	4.64	196.97	373	
4985	Candidate Mass 431.0965	None	9.14	4.40	189.28	535	
4986	Candidate Mass 431.0966	None	9.03	4.62	196.31	848	
4987	Candidate Mass 431.0966	None	10.45	4.66	197.37	119	
4988	Candidate Mass 431.0967	None	9.61	4.57	194.82	3209	
4989	Candidate Mass 431.0967	None	9.36	4.37	188.54	210	
4990	Candidate Mass 431.0970	None	8.84	4.27	185.46	2801	
4991	Candidate Mass 431.0972	None	10.54	4.35	187.96	766	
4992	Candidate Mass 431.0973	None	11.37	4.44	190.59	191	
4993	Candidate Mass 431.0975	None	10.51	4.82	202.55	186	
4994	Candidate Mass 431.0983	None	9.79	4.49	192.08	21753	

图6. 8.70 ~11.40 min之间洗脱的等量候选物的UNIFI组分汇总，其中显示了图5中进行离子淌度分离的物种的保留时间观测值、碰撞截面观测值、漂移时间观测值和检测器计数。

图7展示了翅茎西番莲的UPLC-IM-MS漂移时间图对保留时间所作的图。图中展示了牡荆素/异牡荆素的离子淌度分离结果，从中可以看出，这两种黄酮类标志物异构体都存在于翅茎西番莲中，结合™CCSN$_2$筛查与离子淌度质谱可对这两种物质其进行检测和区分。

牡荆素/异牡荆素均在预期的保留时间处检出，且精确质量数测量误差< 5 ppm，碰撞截面误差< 0.5%。此前的研究并未在翅茎西番莲中检出牡荆素，但在本研究中，技术改进让我们能够明确鉴定该物质的存在。此前的研究使用的是HPLC方法，异牡荆素的色谱峰峰底处存在一个小肩峰，但即使通过精确质量数测量，也无法识别牡荆素峰，因为这两种物质为异构体。此外，由于所用的技术不够灵敏，牡荆素独有的碎片离子也无法被识别。

其它的研究提升了分析灵敏度并采用ACQUITY UPLC I-Class系统，能够实现牡荆素的部分色谱分离和检测。

然而，实现两对标志物糖苷的色谱分离仍是一项挑战。本研究将UPLC与离子淌度分离相结合，用于开发能够充分利用这两种技术的分离能力的新方法。UPLC参数能够实现异牡荆素和牡荆素的最佳分离，而离子淌度参数能够实现异荭草素和荭草素的最佳分离。荭草素和异荭草素虽未实现色谱分离，但成功实现了离子淌度分离。该实例展示了如何利用色谱峰容量与离子淌度峰容量的结合来实现我们期待的分离效果。

离子淌度的优势还包括能够降低谱图复杂性，图8展示了保留时间8.395 min处生成的牡荆素色谱峰 (m/z 431.0983) 的传统保留时间校准多组分母离子和碎片离子谱图。除m/z 431.0983之外，谱图中还有许多其它的离子。

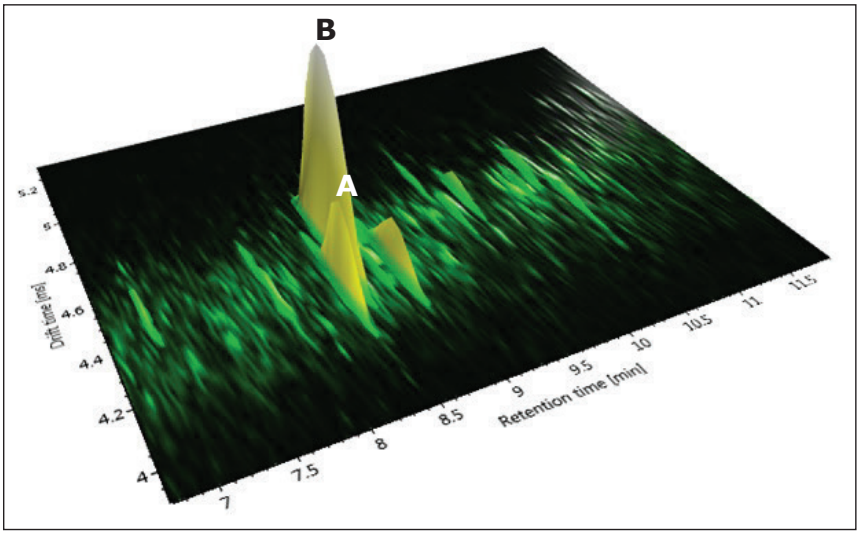

图7. 翅茎西番莲的UPLC-IM-MS电喷雾负离子模式漂移时间图对保留时间所作的图。展示了牡荆素和异牡荆素的离子淌度分离结果以及6.5~12.0 min之间的一系列微量同量组分，这些组分可使用™CCSN$_2$进行区分。

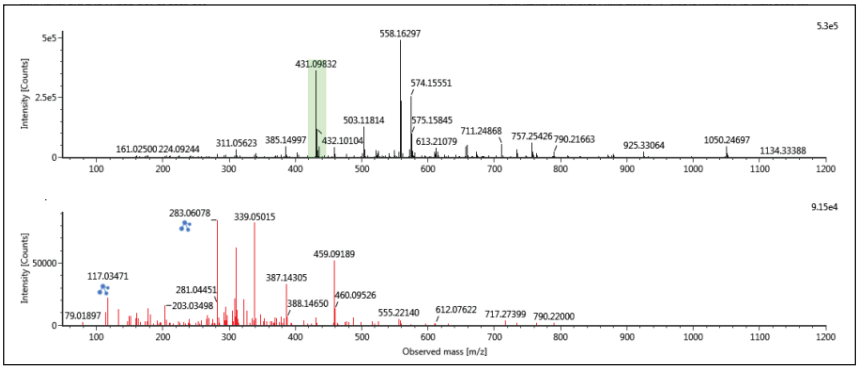

图8. 保留时间8.395 min处生成的牡荆素峰 (m/z 431) 的传统多组分母离子和碎片离子谱图。

然而，如图9所示，当同时采用保留时间和漂移时间生成谱图时，色谱共洗脱的离子实现了淌度分离，谱图上的母离子和离子淌度产物离子均减少，谱图得到了“净化”。这样我们就得到了高特异性的离子淌度产物离子谱图。该特异性产物离子谱图中含有在所分析样品中检出的所有分析物，包括未知化合物和非目标化合物。

在蓝花西番莲的UNIFI组分汇总中，展示了在提取质谱图窗口中选择的色谱共洗脱异荭草素和荭草素，以及所得的相应异荭草素母离子谱图和离子淌度产物离子谱图。6C/8C糖苷对荭草素/异荭草素的保留时间相差1.24 s。然而，分析实际提取物时，会出现很小的保留时间差异，而且分析物浓度会随着物种不同而变化。在本研究中，我们可以看到目标物质合并成为了一个峰。质量数测量误差< 5ppm且CCS误差< 0.5%。提取质谱图还显示，7.0~11.0 min之间存在一系列同量组分。

经测定，标志物糖苷对(荭草素/异荭草素)187.65Å2/197.68Å2的CCS误差分别为0%和0.22%。图11展示了蓝花西番莲的UPLC-IM-MS漂移时间图对保留时间所作的图。此处选择了色谱共洗脱的异荭草素(图中标示出的峰)和荭草素的离子淌度分离图，选中两种组分后使用UNIFI软件的“放大至组分”功能进行了自动提取。

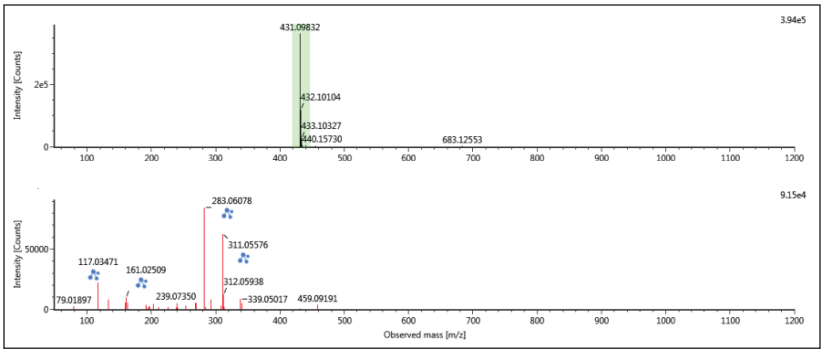

图9. 采用离子淌度分离，在保留时间8.395 min和漂移时间4.27 ms处生成的色谱共洗脱组分分离所得的牡荆素的单组分母离子谱图和离子淌度产物离子谱图。

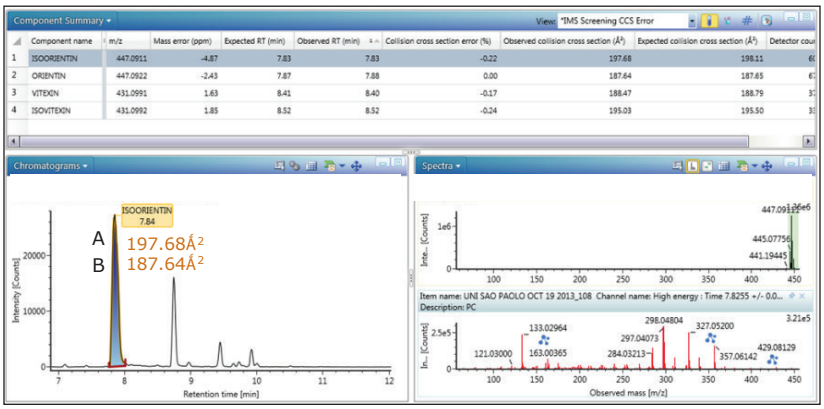

图10. 蓝花西番莲的UNIFI组分汇总，展示了提取质谱图中选择的共洗脱异荭草素和荭草素，以及所得的相应的母离子谱图和离子淌度产物离子谱图。质量数测量误差< 5 ppm，CCS误差< 0.5%。提取质谱图还显示，7.0~11.0 min之间出现了一系列同量组分。

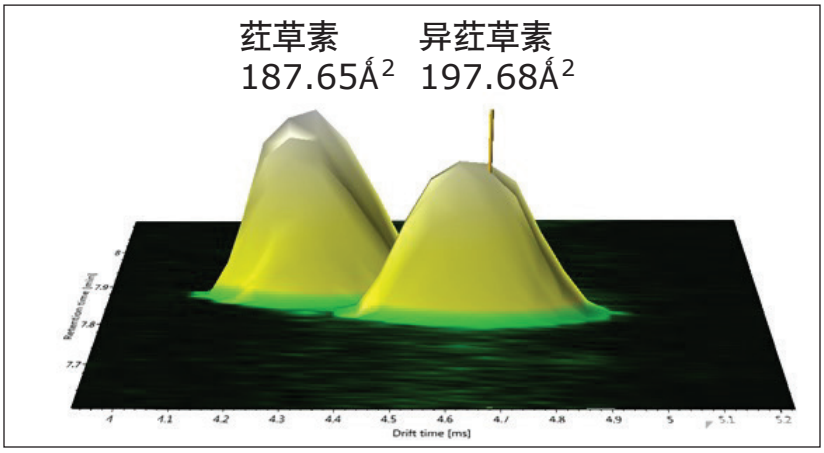

图11. 蓝花西番莲的UPLC-IM-MS电喷雾负离子模式漂移时间图(离子淌度分离)对保留时间所作的图。利用UNIFI软件的“放大至组分”功能展示了色谱共洗脱的异荭草素和荭草素的离子淌度分离图。

实验结果表明，使用TWCCSN$_2$测量能够区分所分析的提取物中的标志物异构体对。预期的碰撞截面与测得的碰撞截面相比，TWCCSN$_2$测量误差通常< 0.5%。此外，采用该方法能够实现共洗脱组分的淌度分离，得到“净化”离子淌度产物离子谱图。对于异荭草素/荭草素(它们在色谱分离中共洗脱并具有相同的产物离子)，离子淌度分离让我们能够观察到离子淌度产物离子比率。我们首次获得了独有的碰撞截面测量结果和相应的异构体碎片离子谱图。

图12和13展示了在蓝花西番莲中测得的异荭草素和荭草素(在色谱分离中共洗脱)的分离离子淌度产物离子谱图。两种异构体产生相同的产物离子，但我们可以看到，如果应用适当的碰撞能量，各异构体可产生其特有的产物离子比率。

6C和8C糖苷的离子淌度产物离子谱图和分析方法已在此前进行了解析[4]。可利用m/z 284/285和m/z 297/298/299处特有的离子淌度产物离子比率与TWCCSN$_2$测量相结合来表征异构体对。对于异荭草素，产物离子比率为m/z 284 < m/z 285，以及m/z 297 <m/z 298 >m/z 299。而对于荭草素，离子淌度产物离子比率为m/z 284 >m/z 285，以及m/z 297 >m/z 298 <m/z 299。对于异牡荆素和牡荆素，可使用m/z 281/282/283/284的独特产物离子比率结合特有的CCS测量结果来表征异构体对。对于异牡荆素，离子淌度产物离子比率为m/z 281 >m/z 282 > m/z 284。而对于牡荆素，离子淌度产物离子比率为m/z 281 >m/z 282 <m/z 284。在两种情况下，离子淌度产物离子m/z 283均可形成特征产物离子簇的基峰离子。

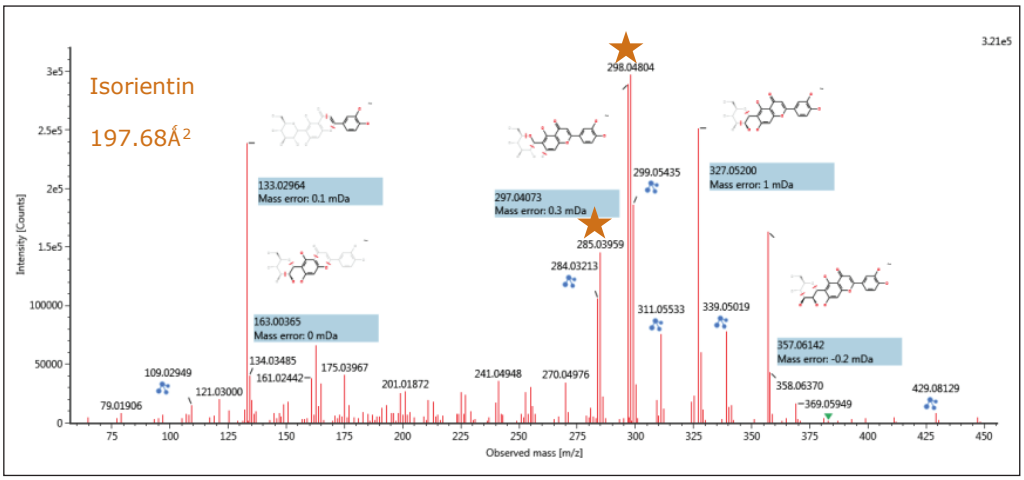

图12. 蓝花西番莲中测得的异荭草素(在色谱分离中与荭草素共洗脱)的离子淌度分离产物离子谱图。

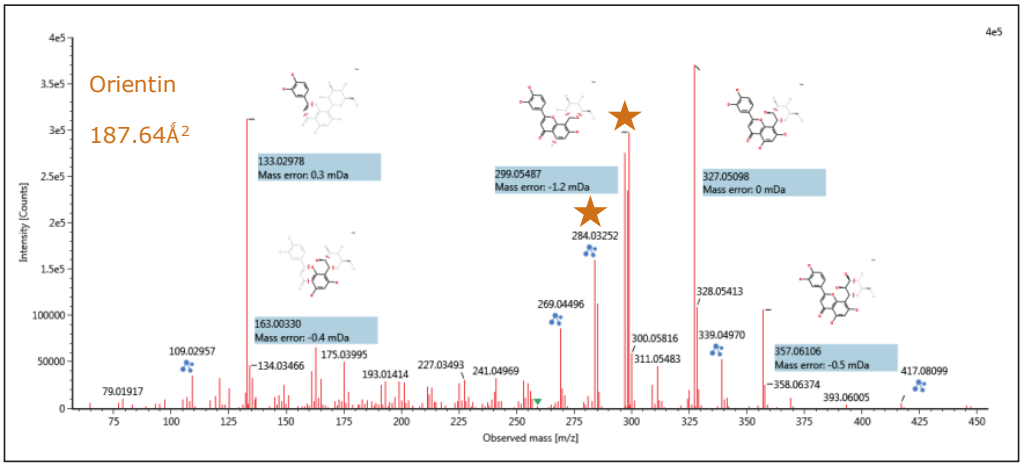

图13. 蓝花西番莲中测得的荭草素(在色谱分离中与异荭草素共洗脱)的离子淌度分离产物离子谱图。

实验结果还表明，使用UNIFI软件可推测碎裂路径，采用该碎裂路径通常可获得误差< 5 ppm的精确质量数测量结果。由于IMS实验能够获得更高的峰容量，因此所产生的碎片离子谱图能够与提取物中的共洗脱结构相关黄酮类化合物分离，从而提高该特征信息的可靠性。

图14和15展示了相应的离子淌度质谱分离结果，图中展示的是以m/z对漂移时间作图得到的离子淌度漂移图。在图14中，漂移图A显示了在保留时间7.83 min处检测到的所有离子，漂移图B显示了由色谱共洗脱的母离子产生的相应的保留时间校准碎片离子。观察到的异荭草素的母离子自动以绿色突出显示，相应的预期碎片离子在图B中以蓝色显示。UNIFI软件经专门设计，能够实现离子淌度数据的智能可视化。从图15中我们可以看到，可以仅选择观察到的母离子以及在特定m/z和漂移时间处产生的离子淌度产物离子。

对于蓝花西番莲中观察到的异荭草素，我们可以看到在保留时间7.83 min和漂移时间4.67 ms处检测到的所有离子的离子淌度漂移图。

由沃特世率先实现商业化的MS^{E}离子碎裂技术利用了飞行时间技术的工作周期和优势。该技术有助于采集准确的碎片离子信息，使分析人员通过单次采集就能获得10,000多种化合物的结构解析和确证信息。HDMS$^{E®}$的离子淌度产物离子形成功能又通过增加漂移时间校准功能进一步提高了保留时间校准的MS^{E}数据采集的特异性。离子淌度分离不仅能够分离母离子，还能分离碰撞诱导的解离过程产生的离子。HDMS^{E}离子淌度产物离子采集为我们提供了一种无与伦比的方法，使采集中检测到的所有化合物都能达到MS/MS的特异性。由图12和13可以看出，HDMS^{E}离子淌度产物离子采集可提供高于传统MS/MS的选择性。

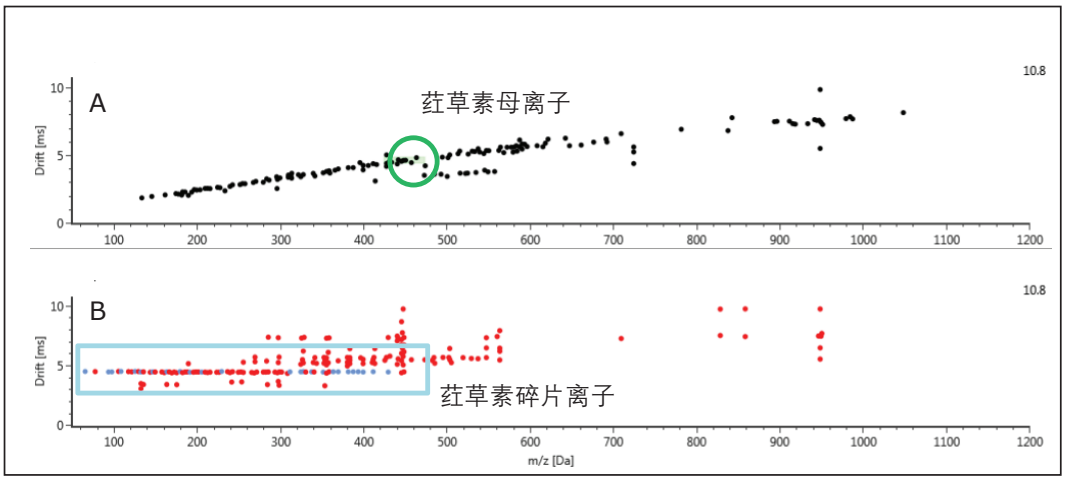

图14. 在保留时间7.83 min处检测到的蓝花西番莲的所有离子的离子淌度漂移图。图A为母离子的漂移图，图B为保留时间校准的碎片离子的漂移图。

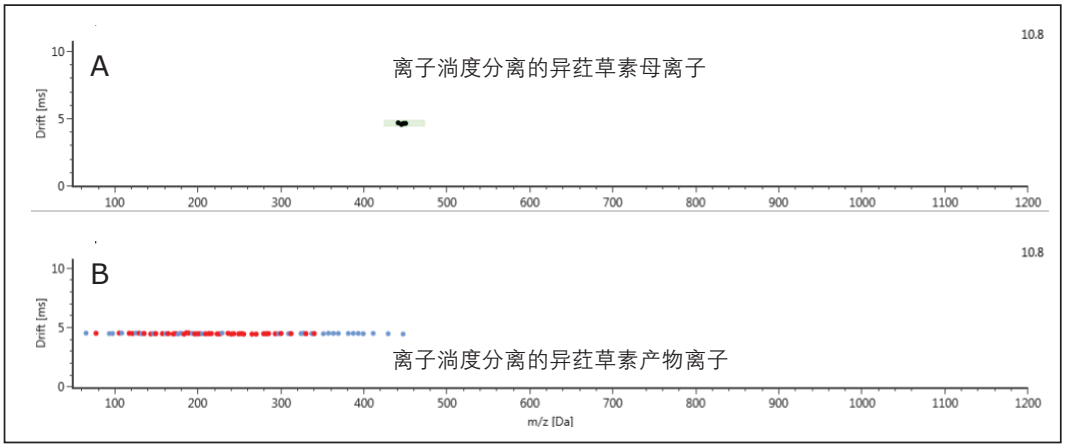

图15. 在保留时间7.83 min和漂移时间4.35 ms处检测到的蓝花西番莲的所有离子的离子淌度漂移图。图A为母离子的漂移图，图B为保留时间/漂移时间校准的碎片离子的漂移图。

结论

- 采用独特的离子淌度$^{TW}CCSN_2$筛查方法分析了牡荆素、异牡荆素、异荭草素和荭草素C-碳苷黄酮类化合物，并分析了它们在四个西番莲属物种中的存在情况。
- ACQUITY UPLC I-Class系统与离子淌度质谱相结合可用于植物化学成分组成的常规筛查和验证分析，且该方法具有单独使用质量数准确度方法无法达到的无以伦比的特异性。
- 使用常规工作流程获得了误差< 0.5%的碰撞截面 (CCS) 测量结果。
- 使用离子淌度质谱和CCS测量成功区分了C-碳苷黄酮类化合物。
- $^{TW}CCSN_2$筛查方法可用于分析样品组成，而且能够独特地区分黄酮类异构体组分，确保不会因色谱共洗脱而丢失黄酮类化合物。
- 可采集共洗脱异构体的各种同分异构碎片谱图并表征其独特的碎片离子比率。
- 通过一次采集可生成10,000多种分析物 (已知物/未知物) 的$^{TW}CCSN_2$值。
- 当由于基质原因产生保留时间漂移或使用替代色谱方法时，可利用$^{TW}CCSN_2$的选择性。
- HDMS^{E}离子淌度产物离子采集提供了无与伦比的方法，使采集中检测到的所有化合物都能达到MS/MS的特异性，而且其选择性比传统的精确质量数MS/MS更高。

参考文献

1. M L Zeraik, J H Yariwake. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. *Microchemical Journal*. 96 (1): 86–91; 2010.
2. F Ferreres, C Sousa, P Valentão, P B Andrade, R M Seabra, and Á Gilizquierdo. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. *J Agric Food Chem*. 55: 10187–10193; 2007.
3. P Noriega, D De Freitas Mafud, M Strasser, E T M Kato, E M Bacchi. Passiflora alata Curtis: A Brazilian medicinal plant. B*oletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 10 (5): 398–413; ISSN 0717 7917; 2011.
4. S M Zucolotto, C Fagundes, F H Reginatto, F A Ramos, L Castellanos, C Duque, and E P Schenkel. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem Anal*. 23: 232–239; 2012.
5. C A M Pereira, J H Yariwake, and M McCullagh. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. *Phytochem Anal*. 16: 295–301; 2005.
6. M McCullagh, R Rao, C A M Pereira, and J H Yariwake. Profiling and quantitation of c-glycosidic marker flavonoids in natural products using UPLC time of flight mass spectrometry. *5th International Symposium on Recent Advances In Food Analysis* (RAFA 2011). November, 2011.
7. M McCullagh, C A M Pereira, J H Yariwake. High throughput characterization of C-glycosidic flavonoids from Brazilian *Passiflora* species using LC-MS exact mass measurement and in-source CID. *19th Montreux Symposium*, Montreux, Switzerland, 6–8 November, 2002.
8. R E March, E G Lewars, C J Stadey, X Miao, X Zhaob, C D Metcalfe. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 248: 61–85; 2006.
9. The use of collision cross section measurements (CCS) in food and environmental analysis. Waters Technical Note No. 720005374en, April 2015.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, UPLC, ACQUITY UPLC, UNIFI, SYNAPT, Sep-Pak, HDMS和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。T-Wave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6月 720005424ZH 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