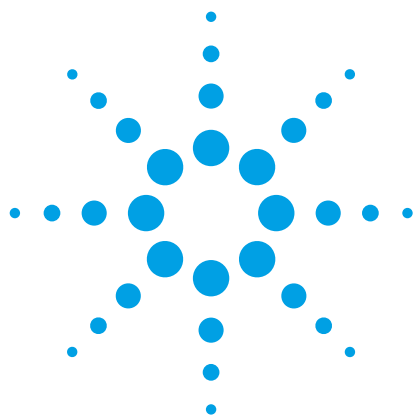




多种固定相的安捷伦 ZORBAX RRHD 色谱柱为蓝莓中花色苷的 UHPLC/MS 分析提供更广泛的选择性

应用简报

食品和饮料

作者

Anne E. Mack
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
华盛顿, DE 19808
美国

摘要

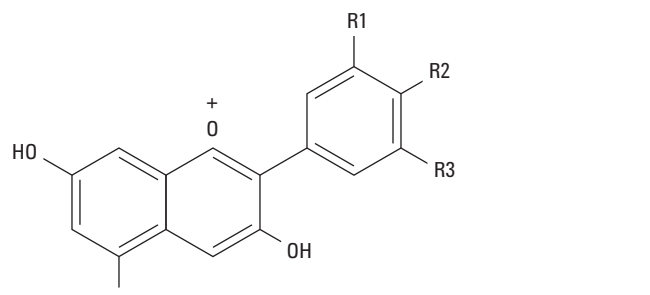
蓝莓汁采用酸化的甲醇萃取，然后通过 UHPLC/MS 使用简单的甲醇/甲酸梯度分析萃取液中的花色苷。对四种安捷伦 ZORBAX RRHD 固定相——Eclipse Plus C18、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、StableBond SB-Aq 和 StableBond SB-Phenyl——进行了快速评估。Phenyl-Hexyl 色谱柱可从蓝莓汁样品中分离出大部分的花色苷，而 SB-Phenyl 色谱柱是其最好的补充。检测到了最常见的五种花青素（矢本菊色素或芙蓉花色素、翠雀素或飞燕草色素、芍药色素、牵牛花色素和锦葵色素）的糖苷和酰基化糖苷。

前言

蓝莓是所有水果和蔬菜中抗氧化能力最高的水果，它富含纤维素、口感好、热量低，是公认的超级食品[1]。抗氧化物因其公认的健康益处，如抗癌和保护心血管，而受到越来越多的关注。蓝莓的抗氧化能力主要归功于其含有丰富的花色苷。花色苷是一种天然的水溶性的红-蓝色素，不仅存在于蓝莓中，还存在于许多其他水果、花卉和植物中。花色苷是花青素的糖苷和酰基化糖苷衍生物[2]。从蓝莓提取液中检测到了五种常见的花青素：芙蓉花色素、飞燕草色素、芍药色素、牵牛花色素和锦葵色素，本文对其进行了详细的论述。图 1 为这些花青素的基本化学结构。



Agilent Technologies



花青素	R1	R2	R3	MW
芙蓉花色素	OH	OH	H	287
飞燕草色素	OH	OH	OH	303
芍药色素	OCH ₃	OH	H	301
牵牛花色素	OCH ₃	OH	OH	317
锦葵色素	OCH ₃	OH	OCH ₃	331

图 1. 蓝莓汁提取液中五种常见花青素的化学结构

液相色谱的进展极大提高了分析通量，这对分析方法开发非常有利。安捷伦 1290 Infinity UHPLC 和安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 色谱柱的设计耐压高达 1200 bar, 这意味着在方法开发中可使用更快的流速，充分利用固定相的不同选择性进行快速的色谱柱筛选。

ZORBAX RRHD 色谱柱家族中，目前有两种苯基色谱柱可用：Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 和 StableBond SB-Phenyl。两种固定相都能凭借强大的化合物键合能力用于花色苷的分离。这些化合物双键上的 P 电子与苯基固定相上的 P 电子结合，与传统的烷基固定相如 C18 [3]相比，形成了更加独特的选择性机制。而 P-P 键合并不象疏水作用那样强，这可使苯基色谱柱在分析关联紧密的共轭化合物时，具备微弱的选择性优势。

实验

本研究基于 W. Long 新近发表的文献，此文献将花色苷的分析方法从 250 mm, 5 μ m 的 StableBond SB-C18 色谱柱转换到表面多孔的 75 mm, 2.7 μ m 的 Poroshell 120 StableBond SB-C18 色谱柱上，梯度淋洗、流速和进样量等均按比例缩减[4]。本实验所用蓝莓汁萃取液由 W. Long 制备和提供。

本实验使用安捷伦 1290 Infinity 超高效液相色谱和安捷伦 6410 三重串联四级杆质谱联用系统。

流动相	A – 5% 甲酸水溶液 B – 甲醇
流速	0.65 mL/min
梯度	10–50% B 15 min 内
样品	5 μ L 蓝莓汁萃取液进样
TCC	30 °C
DAD	Sig = 525, 8 nm; Ref = Off
MS	MS2 Scan: 200-1000, ESI 正离子模式
扫描时间	100 ms, 0.2 amu 步进
碎裂电压	180 V
干燥气	10 L/min, 350 °C
雾化气压力	50 psig
毛细管电压	3500
花青素 EIC	芙蓉花色素 <i>m/z</i> 286 飞燕草色素 <i>m/z</i> 302 芍药色素 <i>m/z</i> 300 牵牛花色素 <i>m/z</i> 316 锦葵色素 <i>m/z</i> 330

MassHunter B.03.01, B.02.00 和 B.03.01 三个不同版本的软件分别用于数据采集、定性分析和定量分析。

使用了四种安捷伦 ZORBAX RRHD 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μ m 色谱柱：

- Eclipse Plus C18 (p/n 959758-902)
- Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (p/n 959758-912)
- StableBond SB-Aq (p/n 858700-914)
- StableBond SB-Phenyl (p/n 858700-912)

从当地（华盛顿，DE，USA）购买的新鲜蓝莓中提取花色苷，提取步骤如下：

- 将 10g 蓝莓果浆和 10ml 甲醇:水:甲酸为 70:28:2 的溶液在干冰上混匀 10min，实现充分萃取
- 使用 10ml 注射器经玻璃棉将上述混合液过滤，持续 1h 确保过滤完全
- 再使用 0.2 μ m 的滤膜进一步过滤滤液，弃去残渣

结果和讨论

10g 的蓝莓果浆被酸化的甲醇溶液萃取，萃取液经 LC/UV 分析得到的谱图如图 2 所示。使用了四种不同的安捷伦 ZORBAX RRHD 固定相：Eclipse Plus C18, Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, StableBond SB-Aq 和 StableBond SB-Phenyl。所有色谱柱均为 2.1×100 mm 的规格，填充物粒径均为 $1.8 \mu\text{m}$ ，均可耐受 1200 bar 的高压。凭借 1200 bar 的高压系统和色谱柱压力范围，可以对四种色谱柱实现快速筛选。用甲醇/甲酸梯度流动相以 0.65 mL/min 的流量淋洗产生的最大压力为 1020 bar，每个分析所用时间仅为 15 min。由于紫外检测器 (UV) 并非定性未知峰或鉴定共流出峰的最佳检测器，因此无法仅通过图 2 的紫外检测结果确定最佳固定相。

为了得到每个色谱峰对应化合物的更多信息，可以使用质谱检测器。图 3 为各色谱柱得到的蓝莓汁萃取液的总离子流图 (TIC)，质量扫描范围为 200–1000。质谱检测器比紫外检测器更灵敏，可以记录更多的色谱峰，包括紫外检测器无法检测到的几个晚流出的小峰。尽管 TIC 本身并不比紫外数据包含明显更多的信息，但通过提取离子色谱图 (EIC) 可以揭示出此蓝莓汁萃取液中常见的五种花青素（芙蓉花色素、飞燕草色素、芍药色素、牵牛花色素和锦葵色素）的糖苷和酰基化糖苷衍生物。

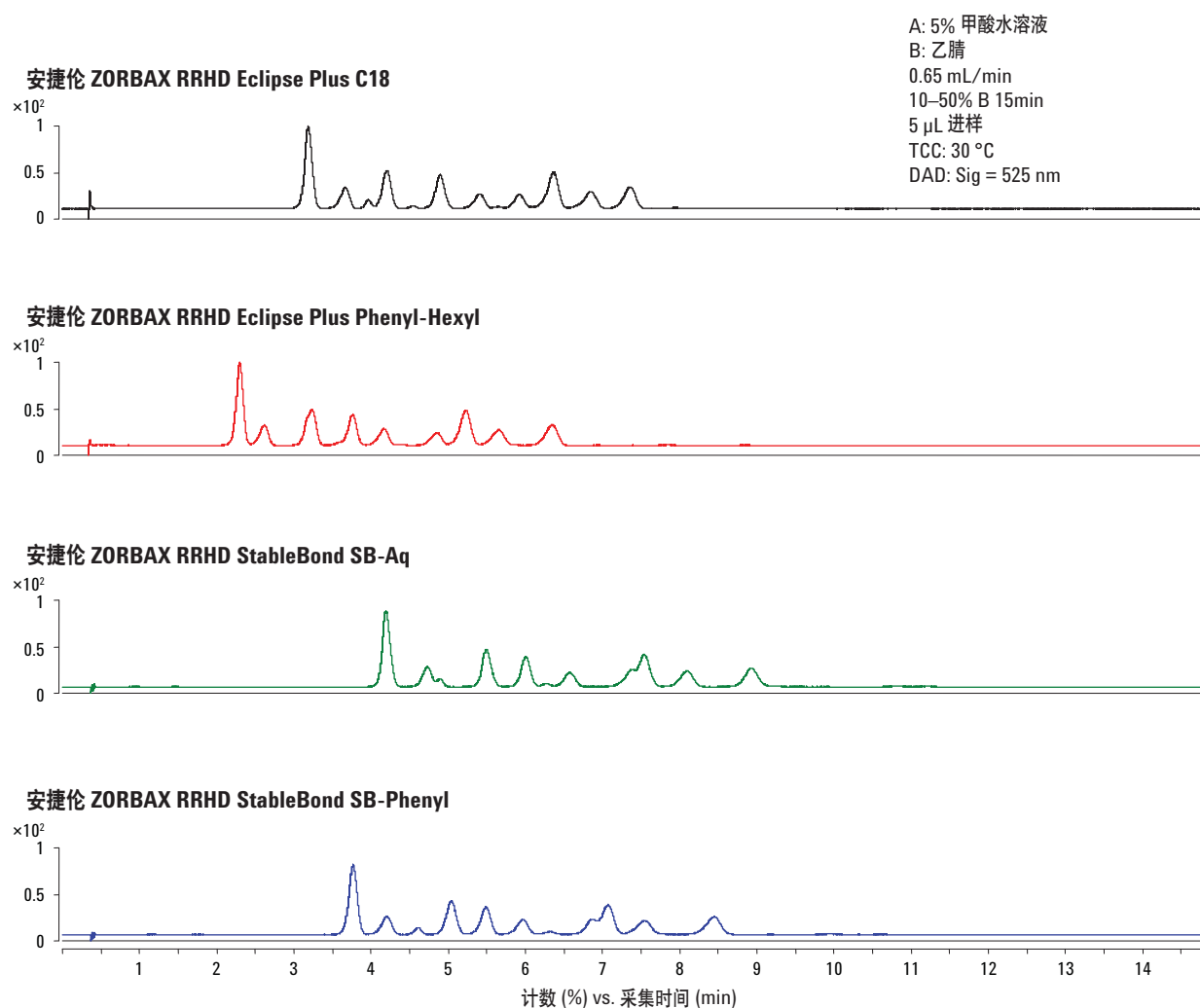


图 2. 蓝莓汁萃取液中的花色苷在四种安捷伦 ZORBAX RRHD 色谱柱上的谱图，使用 UV 检测器。方法参数详见实验部分

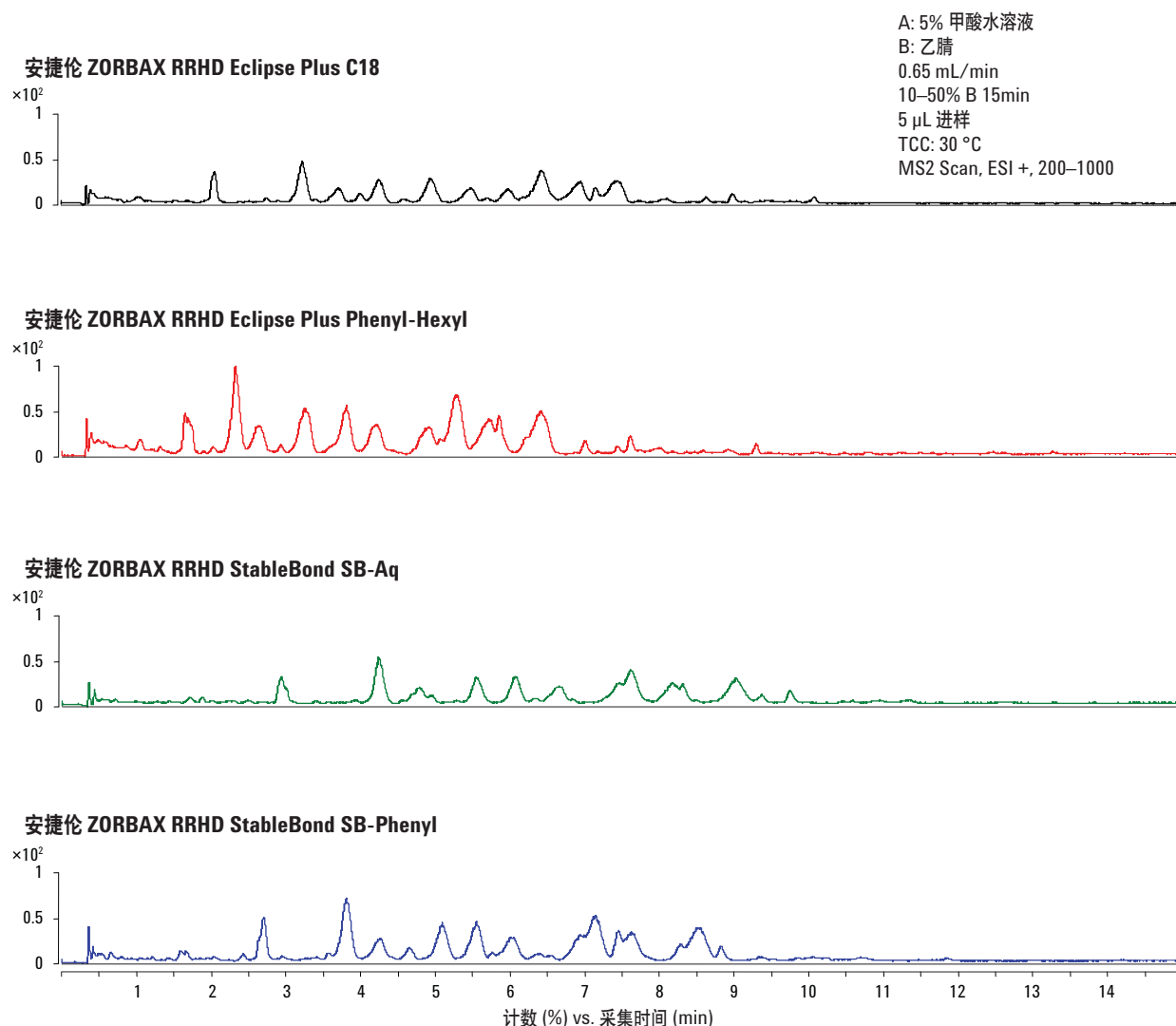


图 3. 蓝莓汁萃取液中的花色苷在四种安捷伦 ZORBAX RRHD 色谱柱上的谱图，使用 MS 检测器。方法参数详见实验部分

图 4 中的 EIC 谱图清楚地显示出五种不同花青素的糖苷和酰基化糖苷的差异，每种颜色代表一种花青素。通过观察 EIC，很容易发现谱图中有很多较小的色谱峰，而这些在图 2 的 UV 结果和图 3 的 TIC 中没有观测到。EIC 谱图中得到的花色苷的种类和总数归纳于表 1。结果表明，Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 色谱柱在本研究设置的甲醇/甲酸梯度淋洗条件下，获得的花色苷色谱峰略多于其他三种色谱柱。

此外，图 5 为色谱柱正交性散点图。所有花色苷在每个色谱柱上的色谱峰对其在最佳色谱柱 Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 上的色谱峰，以保留因子 k' 作图。StableBond SB-Phenyl 色谱柱的保留差异最大，斜率最低， $m = 0.9175$ ，相关系数最小， $R^2 = 0.8711$ 。与 Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 色谱柱相比，StableBond SB-Aq 色谱柱的保留差异也较大。这种保留差异产生的原因最有可能是 StableBond 固定相比封端的 Eclipse Plus 固定相具有更多暴露的硅醇基。

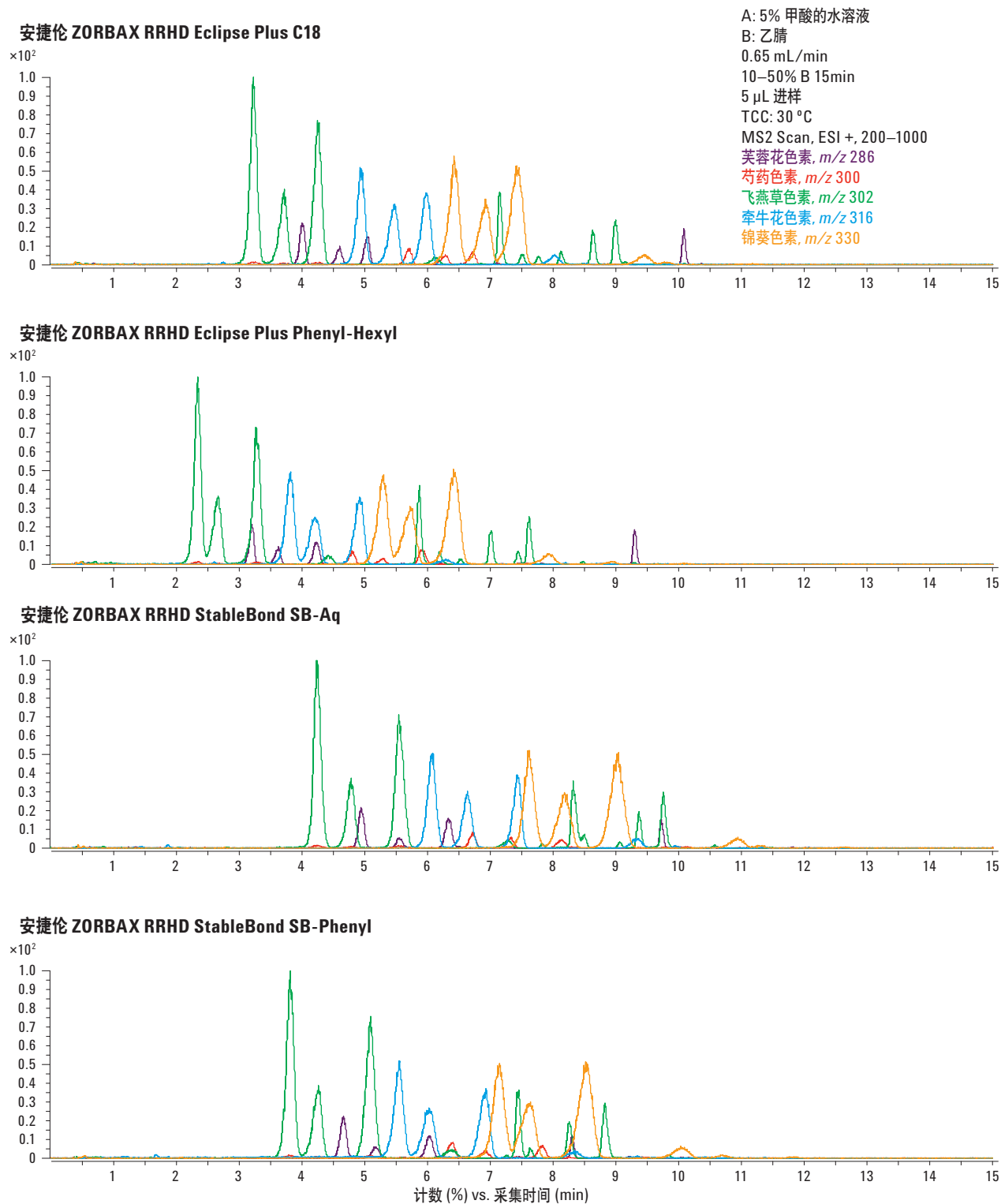


图 4. 从图 3 的 LC/MS 扫描数据中得到的蓝莓花色苷提取离子谱图。方法参数详见实验部分

表 1: 四种 ZORBAX RRHD 色谱柱各自得到的蓝莓花色苷色谱峰总数，以甲醇/甲酸梯度淋洗。

	安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18	安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl	安捷伦 ZORBAX RRHD StableBond SB-Aq	安捷伦 ZORBAX RRHD StableBond SB-Phenyl
芙蓉花色素, <i>m/z</i> 286	11	13	10	10
芍药色素, <i>m/z</i> 300	9	8	9	10
飞燕草色素, <i>m/z</i> 302	12	13	12	11
牵牛花色素, <i>m/z</i> 316	9	12	9	9
锦葵色素, <i>m/z</i> 330	6	6	6	6
总数	47	52	46	46

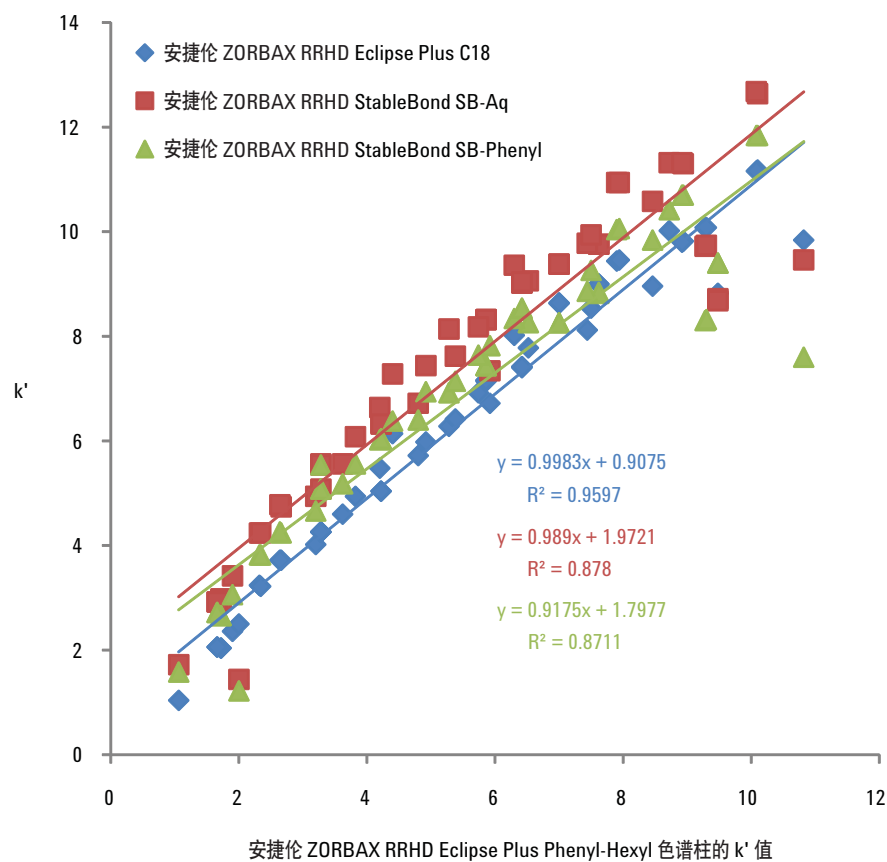


图 5. 各色谱柱相对于 ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 的正交性散点图，以各花色苷的保留因子 k' 作图。方法参数详见实验部分

结论

LC/MS 测定结果表明, Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 色谱柱可比其他三种色谱柱分离出更多的蓝莓花色苷色谱峰。可检测到五种花青素, 它们分别是芙蓉花色素、芍药色素、飞燕草色素、牵牛花色素和锦葵色素。花色苷具备大量的双键可以和苯基色谱柱形成 P-P 共轭。另外, SB-Phenyl 色谱柱表现出最不同于其他色谱柱的出峰顺序, 其原因是因为除了其具备苯基的特性外, 结构中还存在大量暴露的硅醇基。

参考文献

1. Tufts University. Researching a Blueberry/Brain Power Connection. Tufts University Health and Nutrition Letter, March 2001, Vol. 19. Number 1 2001.
2. R. L. Prior, S. A. Lazarus, G. Cao, *et al.* Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (vaccinium spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J Agric Food Chem 2001 Mar;49(3):1270-6 2001.
3. Min Yang, Steven Fazio, David Munch, Patrick Drumm, Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column Journal of Chromatography A, 1097 (2005) 124–129.
4. William J. Long, Analysis of Anthocyanins in Common Foods Using an Agilent Poroshell 120 SB-C18. May 27, 2011. Agilent Technologies Publication Number 5990-8249EN.

更多信息

有关我们产品和服务的更多信息, 请访问
www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料所引起的相关损失不承担责任。

本文中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 8 月 8 日，中国印刷
5990-8470CHCN



Agilent Technologies