

采用蛋白质沉淀与固相萃取对人血浆中的花青素苷代谢物进行UHPLC-MS/MS三重四极杆分析以确定食物中的摄取量

应用简报

食品

作者

Aman Sandhu¹、Indika Edirisinghe¹、
Britt Burton-Freeman^{1,2} 以及
Jerry Zweigenbaum³

¹营养学研究中心，食品安全与健康研究所，伊利诺理工学院，美国伊利诺伊州

²营养学系
加利福尼亚大学戴维斯分校
美国加利福尼亚州
³安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808

摘要

事实表明，生物样品的基质效应是造成液质联用 (LC/MS) 方法的不稳定与不准确性的原因。在本研究中，我们开发出了一种用于分析人血浆中花青素苷代谢物的方法。此外，我们通过提取人血浆中五种不同花青素苷代谢物比较了蛋白质沉淀 (PPT) 与固相萃取 (SPE) 这两种不同的样品前处理技术。血液样品采集自饮用草莓饮料 (40 g 冷冻干燥草莓粉) 0、2 及 3 小时后的健康女性志愿者 (年龄 20 - 35 岁)。采用 PPT 方法时，在血浆 (500 μL) 中加入酸化乙腈 (1.5 mL)，然后涡旋并离心。收集上清液并用氮气吹干，以待进行三重四极杆液质联用分析。采用 SPE 技术时，先将稀释后的血浆样品加载至 SPE 管 (Agilent Bond Elut Plexa, 3 mL) 中，然后用水冲洗，最后收集酸化甲醇的洗脱液。将收集的洗脱液在氮气下吹干，以待进行三重四极杆液质联用分析。采用三重四极杆液质联用系统对花青素苷类/代谢物 (矢车菊素-3-葡萄糖苷 (C3G)、矢车菊素-3-芸香糖苷 (C3R)、天竺葵素-3-葡萄糖苷 (P3G)、天竺葵素-3-芸香糖苷 (P3R) 及天竺葵素葡萄糖苷酸 (PG)) 进行鉴定与定量分析。



Agilent Technologies

在样品前处理流程后加入与基质匹配的标准品，用此进行分析，这些代谢物可获得出色的线性和检测限。在饮用后 2 小时可观察到花青素苷代谢物达到浓度峰值。与 PPT 的样品相比，SPE 的样品中 P3G 和 PG 含量明显更高 ($p < 0.05$)。然而，C3G、C3R 和 P3R 的含量在这两种技术之间并没有差异。取决于化合物的不同，这两种方法的化合物回收率范围分别为 4.2% - 18.4% (PPT) 与 60.8% - 121.1% (SPE)。结果表明采用 SPE 的样品前处理方法可使浓缩的花青素苷代谢物具有更高回收率。

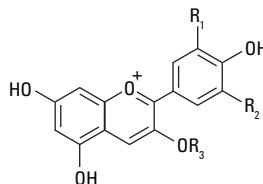
前言

花青素苷类属于黄酮类的多酚物质。它们在浆果、苹果、卷心菜、玉米、葡萄、土豆等红色、蓝色或紫色水果和蔬菜中含量丰富。它们不仅会使水果与蔬菜呈现鲜艳的红/紫色，而且对种子传播和授粉具有重要作用。花青素苷类的基本结构包括黄烷盐阳离子 (C6-C3-C6)，这一结构可与不同的糖、羟基或甲基连接形成不同类型的花青素苷类。此外，糖残基可被芳香酸/脂肪酸酰化 [1]。花青素苷类的糖苷配基（不含糖）称为花青素类，其中六种主要类别为矢车菊素、芍药素、花翠素、天竺葵素、锦葵色素及牵牛花色素 [2]。摄入富含花青素苷类的饮食对健康有益，对高血压、心血管疾病、糖尿病、肥胖及增龄性神经退行性障碍等一些疾病具有预防作用 [3]。

在浆果中，草莓是花青素苷类的主要来源。根据种类的不同，草莓中总花青素苷的含量为 20 - 60 mg/100 g 鲜重 [4]。天竺葵素-3-O-葡萄糖苷是草莓中的主要花青素苷 (83%)，随后依次是天竺葵素-3-O-芸香糖苷 (8%) 及矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 (7%) [4]。草莓中花青素苷类的结构如图 1 所示。花青素苷类能以糖苷形式被人体吸收，但其生物利用度极低。人们已开展临床试验研究不同

浆果中的花青素苷类对健康的益处。研究人员在方法开发中面临的主要挑战是这些化合物在血液中含量极低，而且它们对 pH 较为敏感，在酸性条件下较稳定。因此，需要采用有效的提取技术来提取血浆中的花青素苷代谢物。蛋白质沉淀 (PPT) 因其低廉的成本与简单的操作成为了最常用的生物样品前处理方法，但结果通常无法确保准确性与重现性。而固相萃取 (SPE) 因其较好的回收率和重现性而越来越多地应用于 HPLC 分析前的样品净化。这种技术还可用于代谢物浓缩并能减少血浆基质中其他不必要的干扰。

本应用简报介绍了上述代谢物分析的方法学，其中包括 PPT 与 SPE 在提取人血浆中花青素苷类/代谢物时的比较。样品净化流程对 Agilent Bond Elut Plexa SPE 小柱与传统蛋白质沉淀方法进行了对比。



名称	R1	R2	R3
天竺葵素	H	H	H
矢车菊素	OH	H	H
天竺葵素-3-O-葡萄糖苷	H	H	葡萄糖
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	OH	H	葡萄糖
天竺葵素-3-O-芸香糖苷	H	H	芸香糖
矢车菊素-3-O-芸香糖苷	OH	H	芸香糖

图 1. 草莓中存在的花青素苷类单体及相应花青素的结构

实验部分

研究设计

血浆样品采集自三位女性志愿者（年龄 20 - 35 岁）。志愿者在研究开始前两天和试验期间均采用低多酚饮食。采集基底血样（0 小时）后，我们为志愿者提供了草莓饮料（由 40 g 冷冻干燥草莓粉制成）。表 1 展示了草莓饮料中的花青素苷类组成。分别在 0、2、3 小时时由肘前静脉处采集血液至预标记的 Vacutainer (3×4 mL EDTA) 管中。将所得 500 μ L 等分的血浆转移至微量离心管中，并在分析前始终保存于 -80°C 下。

表 1. 草莓饮料 (40 g 草莓粉) 中的花青素苷类含量 (mg)

花青素苷类	草莓饮料 (mg/40 g 草莓粉)
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	17.60 \pm 0.40
矢车菊素-3-O-芸香糖苷	0.74 \pm 0.01
天竺葵素-3-O-葡萄糖苷	160.12 \pm 1.60
天竺葵素-3-O-芸香糖苷	28.66 \pm 0.24

数据为三次重复分析的平均值 \pm 标准偏差

样品前处理：血浆中花青素苷类/代谢物的提取

PPT

将血浆样品置于冰上解冻，在 500 μ L 中加入 1.5 mL 酸化乙腈（含 1% 甲酸）。将样品置于 4°C 冰箱中 1 小时，每 30 分钟涡旋一次。然后将样品置于 4°C 以 1789 rcf 离心 10 分钟。收集上清液并在氮气下吹干。将吹干后的样品用乙腈（5% 浓度，含有 1% 甲酸）溶解、离心后制得 125 μ L 的最终体积进行 HPLC 分析。

SPE

将血浆置于冰上解冻，用 1.5 mL 酸化水（含 1% 甲酸）稀释 500 μ L 样品。依次采用 2 mL 酸化甲醇（含 1% 甲酸）与 2 mL 酸化水（含 1% 甲酸）活化 SPE 小柱 (Agilent Bond Elut Plexa, 200 mg, 3 mL, 部件号 1219610)。在重力下将样品加载至活化后的小柱中。然后用 1.5 mL 酸化水（含 1% 甲酸）冲洗 SPE 小柱。用 1.5 mL 酸化甲醇（含 1% 甲酸）洗脱代谢物。将收集到的洗脱液在氮气下吹干。将吹干后的样品用 125 μ L UHPLC 初始流动相复溶、离心，并进行 HPLC 分析。

标准溶液的前处理

在样品前处理后将四种糖基化花青素苷类的标准品在样品前处理后加到空白血浆中，加入的浓度用于在研究的线性范围内建立校准曲线。只用 SPE 样品前处理方法所获得的最低浓度标准品的响应来计算检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。这样可得出方法的 LOD 和 LOQ，是测试对象血浆样品中测得浓度的准确反映。葡萄糖酸代谢物的浓度采用天竺葵素-3-O-葡萄糖苷标准品所获得的响应进行计算，这是由于此代谢物的真正标准品无法获得。

仪器

采用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统以及 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪对提取出的花青素苷类/代谢物进行分析。UHPLC 包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A) 及 Agilent 1290 Infinity 温控装置 (G1330B)
- Agilent 1200 系列柱温箱 (G1316A)

LC/MS/MS 分析条件如表 2 所示，用于定量分析的 MRM 目标离子对如表 3 所示。每个离子对中的一个 MRM 时间段的驻留时间为 100 ms。

表 2. Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统运行条件

液相色谱运行条件

色谱柱	Agilent Poroshell 120 Stablebond C18, 2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm (部件号 683775-902)
柱温	30 °C
进样量	5 μL
流动相	A) 1% 甲酸的双蒸水溶液 B) 乙腈
运行时间	22 min
流速	0.3 mL/min
梯度	初始 5% B; 0 - 10 min B 由 5% 增加到 15%; 15 min 时 20% B; 18 min 时 30% B; 20 min 时 90% B; 22 min 时回到 5% B

三重四极杆质谱条件

离子化模式	采用安捷伦喷射流技术的正离子电喷雾
鞘气流速	300 °C, 11 L/min
干燥气流速	9 L/min
雾化气压力	35 psi
毛细管电压	4500 V

表 3. 用于 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 鉴定与定量分析的花青素苷类/代谢物靶标离子对

化合物	保留时间 (min)	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 (V)	碎裂电压 (V)
矢车菊素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	9.80	449.1	287.1	22	82
矢车菊素-3- <i>O</i> -芸香糖苷	10.37	595.2	287.1	38	89
天竺葵素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	11.26	433.1	271.0	18	87
天竺葵素葡萄糖苷酸	11.44	447.1	271.1	22	89
天竺葵素-3- <i>O</i> -芸香糖苷	11.99	579.2	271.1	30	89

表 4. 花青素苷类的线性、LOD 和 LOQ

化合物	线性 (ng/mL)	R ²	LOD (S/N = 3) (ng/mL)	LOQ (S/N = 10) (ng/mL)
矢车菊素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	6.31 – 202.00	0.9999	0.30	0.50
矢车菊素-3- <i>O</i> -芸香糖苷	7.72 – 247.00	0.9999	0.50	1.50
天竺葵素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	6.47 – 207.00	0.9999	0.03	0.10
天竺葵素-3- <i>O</i> -芸香糖苷	6.56 – 210.00	0.9999	0.30	1.25

采用 Agilent MassHunter Optimizer 软件对 C3G、C3R、P3G 和 P3R 标准品的碰撞能量及 MRM 离子对进行优化。PG 的 MRM 离子对基于之前研究中的 Q-TOF 分析所得 [5]。线性、LOD 及 LOQ 如表 4 所示。通过在空白血浆中加入已知浓度标准品（低浓度加标样品为 37 ng/mL，高浓度加标样品为 74 ng/mL）以及比较在溶剂中制备的标准品响应来研究两种技术下的回收率。

结果与讨论

通过 SPE 提取的血浆样品直观上比通过 PPT 提取的样品更洁净（图 2）。通过 PPT 和 SPE 技术提取到的代谢物对比如表 5 所示。在 2 小时的血浆样品中，SPE 样品中 P3G 和 PG 的含量显著高于 PPT 样品中两种物质的含量 ($p < 0.05$)。而在 3 小时时，除 P3R 外，SPE 样品中的所有代谢物含量均显著增大。在基底血浆 ($t =$

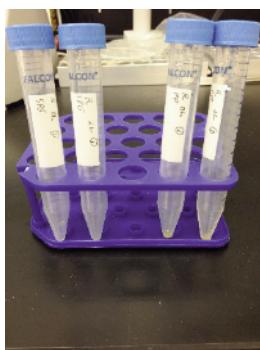


图 2. 离心后 SPE 和 PPT 管的外观

0 小时) 中未检测到草莓花青素苷类/代谢物。PG 是血浆中唯一可检测到的代谢物，而其他四种化合物是存在于草莓中的花青素苷类，无需任何转化即可被人体吸收并存在于血浆中。草莓花青素苷类/代谢物在 2 小时左右达到血浆峰浓度，随后在 3 小时时降低。饮用草莓饮料后不同花青素苷类/代谢物的浓度极低，这说明这些化合物在人体内的吸收率和生物利用度均较低。

由于采用 PPT 技术时化合物可能与蛋白质发生结合/共沉淀，因此通过 SPE 获得的结果更为可靠。表 6 中展示了采用 SPE 和 PPT 得到的花青素苷类回收率。取决于化合物的不同，这两种方法的化合物回收率范围分别为 4.2% - 18.4% 与 60.8% - 121.1%。对于血浆等复杂基质的样品前处理而言，SPE 优于 PPT。结果表明 SPE 有助于样品净化、回收以及花青素苷类/代谢物的浓缩。

表 5. 通过 PPT 和 SPE 技术从血浆中提取出的花青素苷类/代谢物对比结果，单位为 ng/mL 血浆

花青素苷类/代谢物 (ng/mL)	蛋白质沉淀 (PPT) 时间 (小时)			固相萃取 (SPE) 时间 (小时)		
	0	2	3	0	2	3
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	0.07 ± 0.00	0.25 ± 0.06	0.21 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.23 ± 0.15	0.24 ± 0.06
矢车菊素-3-O-芸香糖苷	0.41 ± 0.00	0.83 ± 0.00	0.78 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.83 ± 0.01	0.79 ± 0.01
天竺葵素-3-O-葡萄糖苷	0.00 ± 0.00	1.34 ± 0.86	0.59 ± 0.34	0.00 ± 0.00	1.92 ± 0.66	1.20 ± 0.69
天竺葵素-3-O-芸香糖苷	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.15	0.05 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.59	0.08 ± 0.11
天竺葵素葡萄糖苷酸	0.00 ± 0.00	1.27 ± 1.13	0.77 ± 1.21	0.00 ± 0.00	3.32 ± 2.02	1.97 ± 1.36

数据为三次重复分析的平均值 ± 标准误差

表 6. 通过 PPT 与 SPE 获得的花青素苷类回收率

技术	PPT		SPE	
	低浓度加标样品 回收率 (%)	高浓度加标样品 回收率 (%)	低浓度加标样品 回收率 (%)	高浓度加标样品 回收率 (%)
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	16.12 ± 1.55	10.33 ± 0.06	84.55 ± 1.21	75.16 ± 0.15
矢车菊素-3-O-芸香糖苷	18.35 ± 1.57	12.04 ± 2.71	103.82 ± 3.19	97.3 ± 6.26
天竺葵素-3-O-葡萄糖苷	11.21 ± 1.79	6.79 ± 2.14	68.7 ± 1.42	60.84 ± 2.37
天竺葵素-3-O-芸香糖苷	8.60 ± 3.16	4.18 ± 1.67	121.05 ± 13.76	97.8 ± 4.87

数据为四次重复分析的平均值 ± 标准偏差

图 3 展示了 2 小时在一个受试对象体内四种母体化合物与一种代谢物的色谱分析结果。除 P3G 和 PG 外，所有分析物均实现了良好分离。然而，这两种化合物母离子的差异已足以将其信号分离出来。需要注意的是，从分析物中实现完全色谱分离的另外两种化合物分别与 C3R 和 PG 具有相同的母离子/子离子对。它们可能是相关化合物，但这一关系仅可通过 MS/MS 全谱数据进行评价。

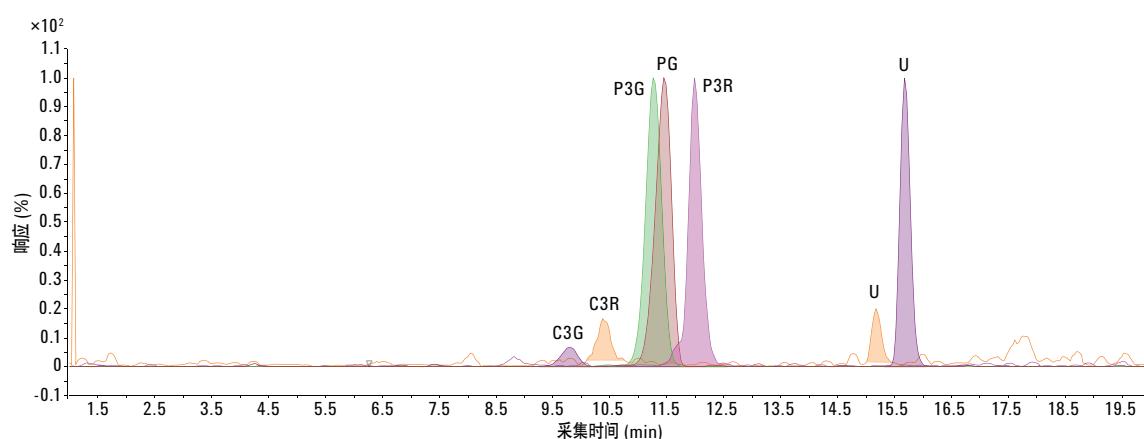


图 3. 饮用草莓饮料 2 小时后血浆中花青素苷类/代谢物的离子对 MRM 色谱图 (叠加)；C3G (矢车菊素-3-O-葡萄糖苷)、C3R (矢车菊素-3-O-芸香糖苷)、P3G (天竺葵素-3-葡萄糖苷)、PG (天竺葵素葡萄糖苷酸) 和 P3R (天竺葵素-3-O-芸香糖苷)；U (未知峰)

结论

采用三重四极杆 LC/MS/MS 分析可准确测定人血浆样品中摄入极低浓度糖基化的花青素苷类及其代谢物。采用 SPE 可提高方法的回收率、准确度和精密度。MRM 的高灵敏度可提供分析所需的灵敏度和选择性。这些研究有助于深入了解促进健康的这些化合物的潜在使用情况。

参考文献

1. M. Horbowicz, R. Kosson, A. Grzesiuk, H. D bski. "Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition" *Vegetable Crops Research Bulletin* **5** (2008).
2. Y. Tanaka, N. Sasaki, A. Ohmiya. "Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids" *The Plant journal: for cell and molecular biology* **54(4)**, 733-49 (2008). doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x.
3. A. Basu, et al. "Strawberry as a functional food: an evidence-based review" *Critical reviews in food science and nutrition* **54(6)**, 790-806 (2014). doi: 10.1080/10408398.2011.608174.
4. F. L. da Silva, et al. "Anthocyanin pigments in strawberry. LWT" *Food Science and Technology* **40(2)**, 374-82 (2007). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>.
5. I. Edirisinghe, et al. "Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin" *Br. J. Nutr.* **106(6)**, 913-22 (2011). doi: 10.1017/s0007114511001176.

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2016
2016 年 3 月 3 日, 中国出版
5991-6526CHCN



Agilent Technologies