

基于液质联用仪(LC-MS/MS)测定农作物中松柏醇、松脂醇、落叶松脂素

仪莹^{1,2,1}, 孙莹璐^{1,2}, 张丽娜^{1,2,2}

(1.中国农业科学院作物科学研究所重大平台中心, 北京 100089; 2.中国仪器仪表学会科学仪器设备验证评价中心(生命科学站), 北京 100089)

摘要: 用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法(UPLC-MS/MS)检测农作物中的松柏醇(CA)、松脂醇(Pin)、落叶松脂素(Lar), 色谱柱为 Agilent SB C18 RRHD, 检测柱温为 40°C, 初始流动相为乙腈:水=4:1, 按 5mM 的量加乙酸铵, 检测流速为 0.3mL/min, 其检出限分别为 1.25~5.10 µg/L, 定量限分别为 3.75~15.60 µg/L, 满足农作物中 CA、Pin 和 Lar 同时检测的要求。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 松柏醇; 松脂醇; 落叶松脂素; 农作物

Determination of CA, Pin and Lar in crops based on LC-MS/MS

Yi Ying¹², Sun Yinglu¹², Zhang Lina¹²

(1. Major Platform Center, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100089, China; 2. Scientific Instruments and Equipment Verification and Evaluation Center of China Instruments and Apparatus Society (Bioscience Station))

Abstract: Ultra-performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to detect CA, Pin and Lar in crops. The chromatographic column was Waters Acquity Agilent SB C18 RRHD, the temperature of the detection column was 40°C, the mobile phase consisted of acetonitrile:water =4:1, and 5mM ammonium acetate was added. The detection flow rate was 0.3mL/min, the detection limits were 1.25-5.10 µg/L, and the quantification limits were 3.75-15.60 µg/L, respectively, which satisfied the requirements of simultaneous detection of T6P and Tre in crops.

Keywords: UPLC-MS/MS; CA; Pin; Lar; crops

¹作者简介: 仪莹(1994-), 女, 工程师, 主要从事色谱、质谱的应用分析. Email:18817650637@163.com

²通讯联系人: 张丽娜, 女, 副研究员. Email:zhanglina@caas.cn

1 引言

自 1997 年 Lewis 等首次提出 DIR 蛋白广泛存在于植物体内，参与并指导木脂素生物合成过程中位置的选择和立体选择，这类具有 dirigent 结构域的蛋白就引起了科学家的广泛关注。为了了解木脂素在不同农作物组织中含量的差异，我们通过 HPLC-MS/MS 平台对木脂素代谢途径中的母核化合物 CA，Pin 和 Lar 进行含量测定^[1,2]。

2 材料和方法

仪器与试剂：谱育 EXPEC5210 三重四极杆液相色谱联用仪（UPLC5210 二元高压输液泵、自动进样器、柱温箱、质谱仪）、电子天平(BSA224S 型，赛多利斯科学仪器有限公司产品),KQ-250E 型超声波清洗器（昆山禾创超声仪器有限公司产品），PICO17 型离心机(美国赛默飞公司产品)。



乙腈(色谱纯,美国赛默飞公司产品)，乙酸铵(纯度 $\geq 98\%$ ，德国 CNW 公司产品)。 T6P 和 Tre 购 sigma-aldrich 贸易有限公司，质谱用水为屈臣氏蒸馏水。

分析条件: 色谱柱:Agilent SB C18 RRHD Column (100 mm \times 2.1 mm,1.8 μ m), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样体积 5 μ l, 流动相:A:乙腈 B:5 mM 乙酸铵-水, 流速 0.3ml/min

0min	20A%
1	20A%
5	80A%
5.1	20A%
7	20A%

离子源:电喷雾离子源; 扫描方式:负离子切换扫描; 检测方式: 质谱多反应监测(MRM)

[3]; 优化的质谱条件见表 1。

表 1 Lar 和 CA、Pin 的质谱多反应检测质谱参数

化合物母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压	碰撞能
Lar	359	329.1	50 10
CA	179.2	146、164	50 15
Pin	357	151、136.1	50 20

3 结果与分析

3.1 线性范围与检出限

Agilent SB C18 RRHD 色谱柱检测时, Lar 的质量浓度为 7.25 $\mu\text{g/L}$ 、14.5 $\mu\text{g/L}$ 、72.5 $\mu\text{g/L}$ 、145 $\mu\text{g/L}$ 、290 $\mu\text{g/L}$ 、725 $\mu\text{g/L}$ 、1450 $\mu\text{g/L}$, CA 的质量浓度为 8.65 $\mu\text{g/L}$ 、17.3 $\mu\text{g/L}$ 、43.25 $\mu\text{g/L}$ 、86.5 $\mu\text{g/L}$ 、173 $\mu\text{g/L}$ 、346 $\mu\text{g/L}$ 、865 $\mu\text{g/L}$ 、1730 $\mu\text{g/L}$, Pin 的质量浓度为 8.23 $\mu\text{g/L}$ 、16.46 $\mu\text{g/L}$ 、82.3 $\mu\text{g/L}$ 、164.6 $\mu\text{g/L}$ 、329.2 $\mu\text{g/L}$ 、823 $\mu\text{g/L}$ 、1646 $\mu\text{g/L}$; 按照优化后的色谱条件对每个点重复测定 3 次。以质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 以标准曲线的第一个和最后一个点的质量浓度作为线性范围。

不同浓度梯度的 Lar、CA 和 Pin 通过 C18 柱时在线性范围内呈现良好的线性关系; 系数均在 0.99 以上, 均符合实际分析的要求[4]。

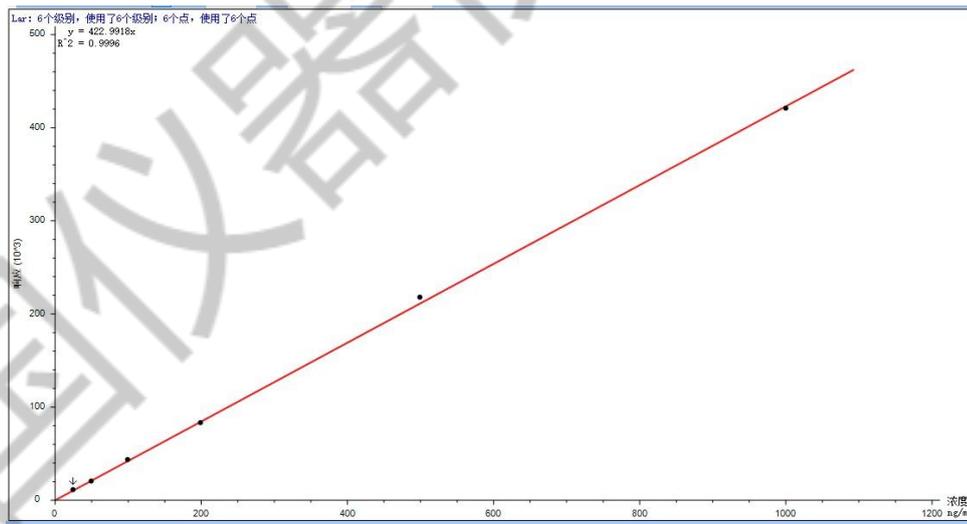


图 1 Lar 标准曲线

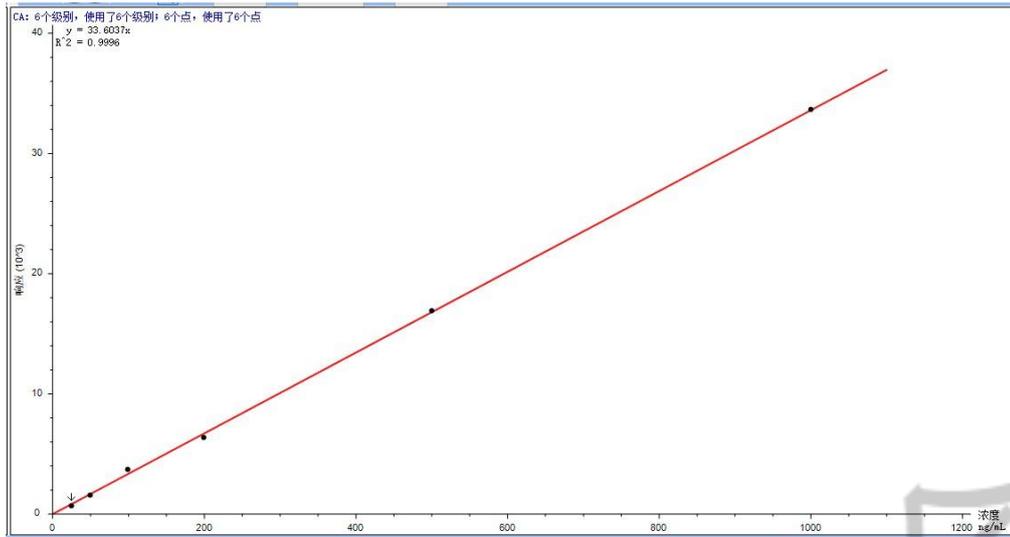


图2 CA 标准曲线

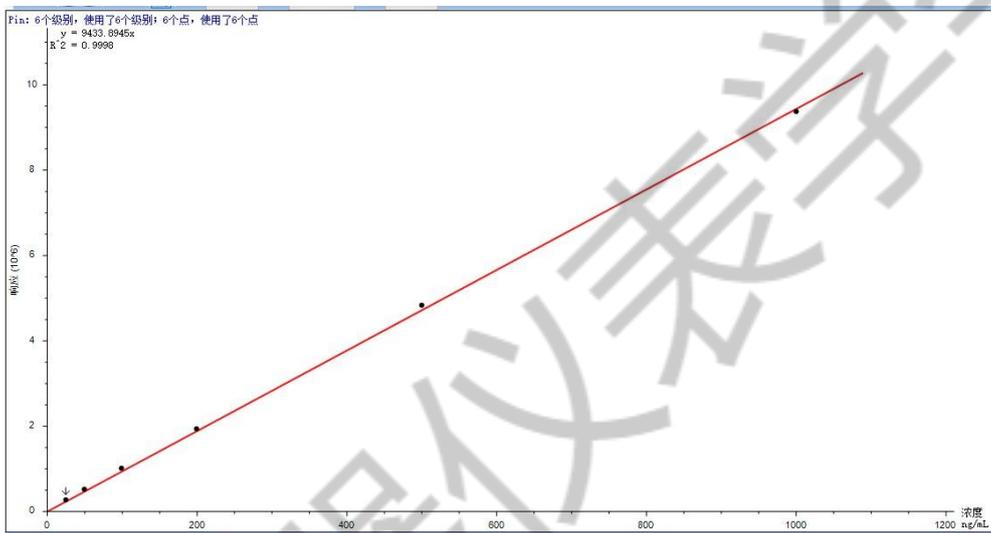


图3 Pin 标准曲线

表2 Lar、CA 和 Pin 标准曲线、线性范围、决定系数、检出限和定量限

化合物	标准曲线方程	线性范围(µg/L)	相关系数	检出限(µg/L)	定量限(µg/L)
Lar	$y=422.9818x$	7.25-1450	0.9996	1.25	3.75
CA	$y=33.6037x$	8.65- 1730	0.9996	5.10	15.60
Pin	$y=9433.8945x$	8.23- 1646	0.9998	3.59	10.77

3.2 实际样品的测定

用建立的方法测定 40 份小麦类样品，部分样品的色谱图如图 4 所示。

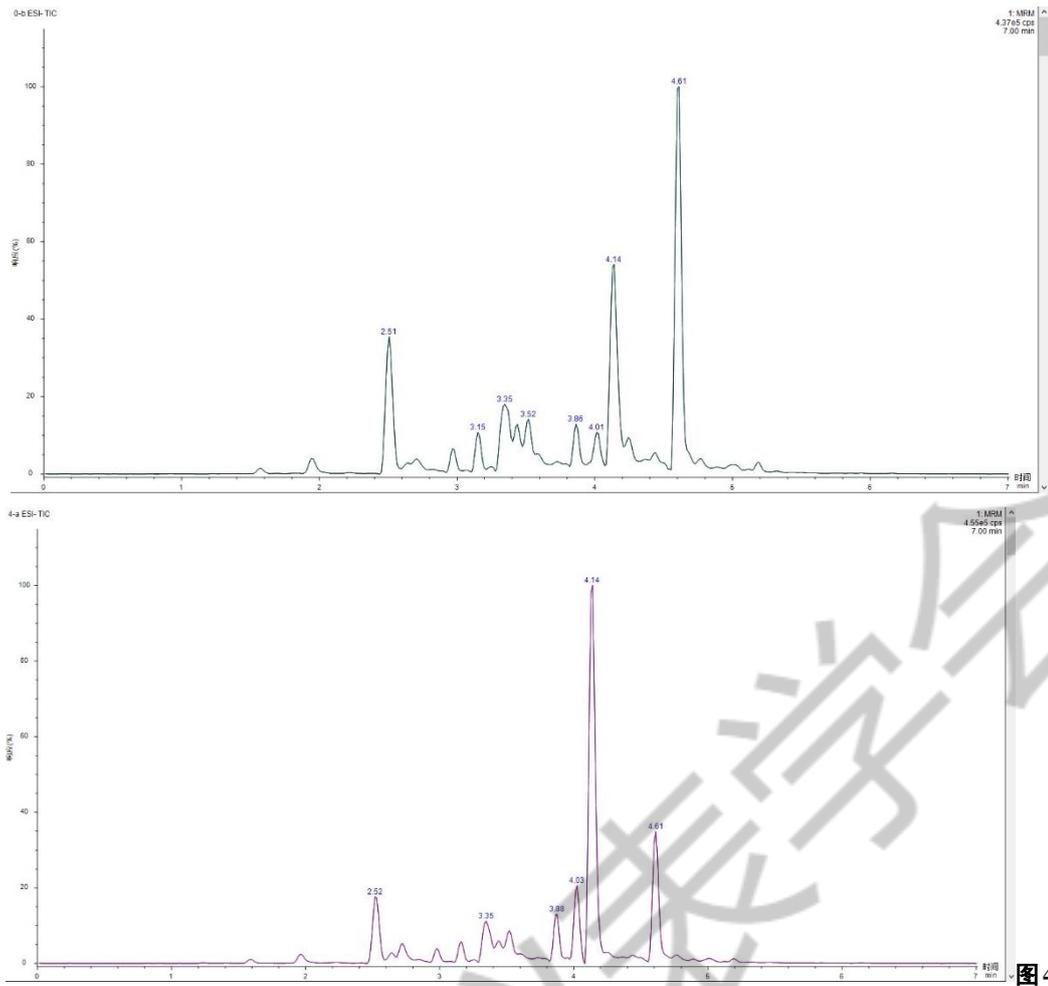


图4

小麦叶片中 Lar、CA 和 Pin 的色谱图

且同一批次样品 3 次平行样得到 T6P 和 Tre 的 RSD 值小于 3%，如表 3 所示，说明前处理方法可行，仪器的稳定性良好^[5]。

样品信息				CA				Lar				Pin			
数据文件	样品类型	样品级别	定量方法	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度
3	4-a	未知	木质素湿标-20230911	2.52	161043.20	161043.20	4792.42	3.44	64322.49	64322.49	152.07	3.87	138110.90	138110.90	14.64
4	4-b	未知	木质素湿标-20230911	2.52	174680.80	174680.80	5198.25	3.44	64617.80	64617.80	152.76	3.86	142711.50	142711.50	15.13
5	4-c	未知	木质素湿标-20230911	2.50	163777.80	163777.80	4873.80	3.44	60027.94	60027.94	141.91	3.86	132731.70	132731.70	14.07
6	0-a	未知	木质素湿标-20230911	2.51	238328.00	238328.00	7092.31	3.44	102626.90	102626.90	242.62	3.87	93392.34	93392.34	9.90
7	0-b	未知	木质素湿标-20230911	2.51	328788.70	328788.70	9784.29	3.44	130744.20	130744.20	309.09	3.86	96693.06	96693.06	10.25
8	0-c	未知	木质素湿标-20230911	2.51	225409.20	225409.20	6707.86	3.44	107524.30	107524.30	254.20	3.88	89326.90	89326.90	9.47

表 3 小麦叶片中 Lar、CA 和 Pin 的测定值

分别对小麦不同组织的样本进行前处理提取实验，前处理方法简便可行，仪器性能可靠，满足对样品中松柏醇、松脂醇、落叶松脂素的检测。

参考文献:

[1]周海旭. 樟树叶中木脂素提取分离及其生物活性研究[D]. 2017.
 [2]戴清源,朱秀灵,刘皓. 芝麻木脂素及其生物活性研究进展[J]. 农产品加工. 学刊, 2012, (1

期):16-21.

- [3]Du, Bingyuan, et al. Phillygenin exhibits anti-inflammatory activity through modulating multiple cellular behaviors of mouse lymphocytes[J]. Immunopharmacology and immunotoxicology, 2019, 41(1): 76-85.
- [4]Murata, Jun, et al. Oxidative rearrangement of (+)-sesamin by CYP92B14 co-generates twin dietary lignans in sesame[J]. Nature communications, 2017, 8(1): 1-10.
- [5]Hano, C, et al. Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinoldiglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds[J]. Planta, 2016, 224(6): 1291-1301.

