

使用 ATLAS-LEXT NHD 自动化前处理并测定刺五加果中异嗪皮啶含量

LCMSMS-606

摘要：本应用建立了刺五加果中异嗪皮啶含量测定的方法。通过 ATLAS-LEXT NHD 自动前处理装置对刺五加果样品进行处理，在优化后的色谱及质谱条件下，采用正离子模式扫描，通过多反应监测（MRM）模式对目标化合物进行测定。结果表明：异嗪皮啶在 1~500 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线相关系数在 0.9997 以上，各校准点准确度在 98.23%~103.29% 之间，加标回收率在 94.6~98.1% 之间。

关键词：ATLAS-LEXT NHD 刺五加果 异嗪皮啶 LCMSMS

异嗪皮啶（Isofraxidin）为刺五加中重要的活性成分之一，能够预防压力所致的疾病。刺五加含有刺五加苷，对肾上腺有良好的作用，可增强机体抵御疾病的能力，也可以刺激细胞免疫力，对早期阶段的 AIDS 治疗有所帮助。

食品安全国家标准《GB/T 22245-2008 保健食品中异嗪皮啶的测定》中提供了采用甲醇提取，然后三氯甲烷进行液液萃取的方法。本文采用 ATLAS-LEXT

NHD 对刺五加果样品进行自动前处理，利用 ATLAS-LEXT NHD 自定义编程功能进行液液萃取，自动化程度高、通量高、重现性好，可大大简化前处理流程，减少人为操作带来的误差和化学试剂暴露的风险。然后采用岛津三重四极杆液质联用仪对异嗪皮啶含量进行测定，该方法整体分析速度快、灵敏度高，为食品行业相关检测人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

ATLAS-LEXT NHD 自动前处理装置及岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。



图 1 ATLAS-LEXT NHD 系统（左）和 LCMS-8050（右）

1.2 试验条件

1.2.1 ATLAS-LEXT NHD 前处理条件

混合强度：5 级

离心速度：3000 rpm

静置时间：60 sec

进样针吸液高度：1 mm

混合时间：60 sec

离心时间：30 sec

清洗溶液：50% 甲醇 - 水

进样针排液高度：70 mm

1.2.2 LCMS 分析条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III (50 mm×2.0 mm I.D., 1.6 μm; P/N: 228-59922-91, SGLC)

流速: 0.3 mL/min

进样量: 0.2 μL

柱温: 35°C

流动相: A 相 -2 mM 乙酸铵水溶液 (0.1% 甲酸), B 相 - 甲醇 (0.1% 甲酸)

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	B.Conc	30
2.50	Pumps	B.Conc	60
3.00	Pumps	B.Conc	80
3.50	Pumps	B.Conc	80
3.60	Pumps	B.Conc	20
6.00	Controller	Stop	

质谱仪: LCMS-8050

接口温度: 300°C

离子化模式: ESI (+)

DL 温度: 250°C

雾化气流速: 3.0 L/min

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: MRM 模式

加热气流速: 10.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	英文名	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
异嗪皮啶	Isofraxidin	486-21-5	223.1	162.0*	-12	-26	-18
				190.0	-24	-23	-20

注: * 表示定量离子对

1.3 标准工作溶液的制备

精密称取异嗪皮啶标准品 10 mg, 加入适量 50% 甲醇 - 水溶解, 配成浓度为 1 mg/mL 的异嗪皮啶储备液。取适量 1 mg/mL 的异嗪皮啶储备液, 采用 50% 甲醇 - 水逐级稀释, 配制成浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 和 500 ng/mL 标准工作溶液。

■ 样品前处理

2.1 样品预处理

称取 0.2 g 刺五加果样品 (粉碎, 过 70 目筛) 于 15 mL 的离心管中, 加入 5 mL 甲醇, 涡旋混匀, 50°C 水浴条件下超声 30 min, 3500 r/min 条件下离心 5 min, 取上清液到样品管中, 残渣重复提取一次, 合并上清液, 45°C 水浴下氮气吹干, 向每个样品管中加入 2 mL 水复溶。

2.2 ATLAS-LEXT NHD 自定义程序进行自动液液萃取

本过程分三次萃取，程序步骤如下：向样品预处理后的每个样品管中加入 2 mL 二氯甲烷，混匀、离心，静置 60 s，取 1 mL 下层清液至收集清液的干净样品管中，残液重复萃取两次，将三次萃取后的下层清液合并后置于氮吹仪下吹干，采用 2 mL 50% 甲醇 - 水复溶，混匀，0.22 μm 滤膜过滤后上机。

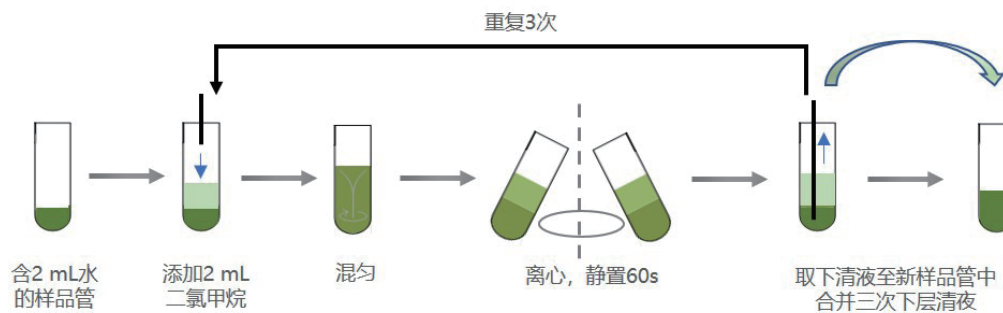


图 2 ATLAS-LEXT NHD 自动化处理过程

2.3 手动液液萃取流程

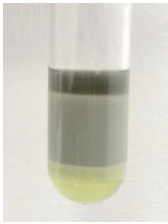


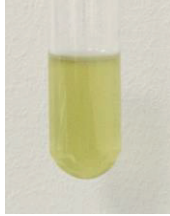
分两次萃取，合并两次萃取液，步骤如下：向样品预处理后的每个样品管中加入 2 mL 二氯甲烷，上下颠倒 5 次，静置 3 min，取 1 mL 下层清液至收集清液的干净样品管中，同法再处理一次后将合并的下层清液置于氮吹仪下吹干，采用 2 mL 50% 甲醇 - 水复溶，混匀，0.22 μm 滤膜过滤后上机分析。

■ 结果与讨论

3.1 自动化前处理的条件优化

在使用 ATLAS-LEXT NHD 进行自动化前处理过程中，考察了离心操作前后下层清液澄清效果，结果显示：混合强度 5，混合时间 60 s，离心速度 3000 rpm，离心时间 30 s，静置 60 s，下层清液澄清效果更好。

表 3 不同自动化前处理条件效果对比

自动化操作条件	液液萃取后下层清液样品管图	合并的下层清液样品管图
混合强度：5 混合时间：60 s 静置时间：90 s		
混合强度：5 混合时间：60 s 离心强度：3000 rpm 离心时间：30 s 静置时间：60 s		

3.2 MRM 色谱图

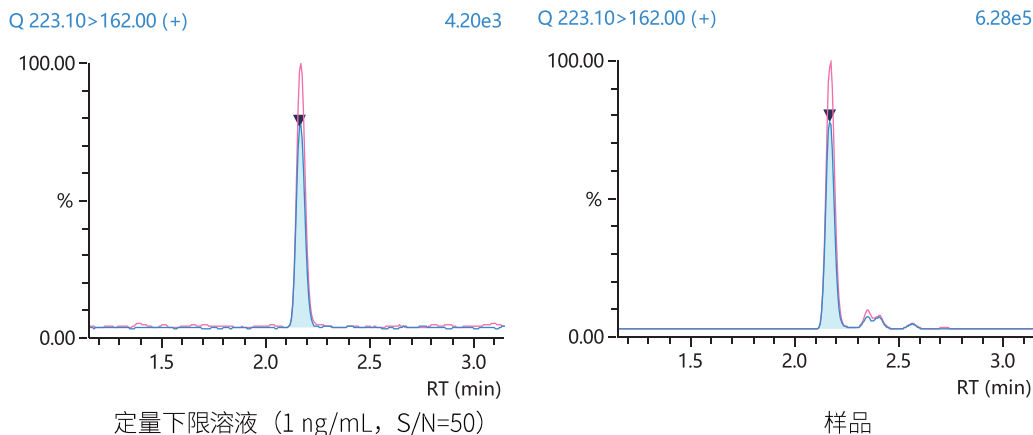


图 3 异嗪皮啶 MRM 色谱图

3.3 标准曲线、检出限及定量限

将 1.3 中的系列浓度标准工作溶液，按“1.2.2 LCMS 分析条件”进行测定，以待测物定量离子峰面积为纵坐标，对应的浓度为横坐标，绘制标准曲线，如图 4 所示。所得校准曲线相关系数大于 0.9997，准确度在 98.23~103.29% 之间，Labsolutions 软件依据信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)。线性方程、检出限及定量限结果见表 4。

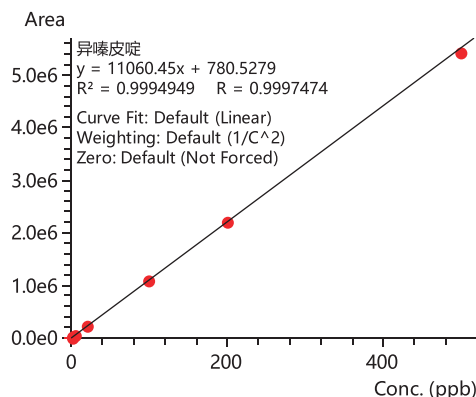


图 4 异嗪皮啶标准曲线

表 4 线性方程、检出限及定量限

目标物	标准曲线	相关系数 R	准确度 %	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
异嗪皮啶	$Y = 11060.45X + 780.5279$	0.9997	98.23~103.29	0.06	0.20

3.4 加标回收率

精密称取已知异嗪皮啶含量的刺五加果粉样品 18 份，每份 0.2 g，再分别加入低、中、高三个浓度的异嗪皮啶标准溶液，每个浓度平行三份。经预处理后按照“2.2 ATLAS-LEXT NHD 自定义程序进行自动液液萃取”和“2.3 手动液液萃取”方法分别处理后制备供试品溶液，上机分析并计算回收率。添加浓度及加标回收率具体结果如表 5 所示。结果显示，ATLAS-LEXT NHD 自动化液液萃取与手动萃取效果相比，回收率相当，重复性更好。

表 5 加标回收率结果 (n=3)

目标物	前处理	样品浓度 (mg/kg)	添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
异嗪皮啶	自动萃取	2.13	1.00	3.07	94.6	3.79
		2.13	2.00	4.09	98.1	6.46
		2.13	3.00	4.97	94.8	3.46
	手动萃取	2.05	0.75	2.79	99.3	7.18
		2.05	1.50	3.56	100.9	5.17
		2.05	2.25	4.26	98.3	8.80

3.5 样品测定结果

称取市售某品牌刺五加果样品 0.2 g，平行 6 样本，按照“2.2 ATLAS-LEXT NHD 自定义程序进行自动液液萃取”方法处理及“1.2.2 LCMS 分析条件”进行测定，刺五加果中异嗪皮啶含量测定结果回算值见表 6，结果显示，6 样本间 RSD% 仅为 1.90%，表明 ATLAS-LEXT NHD 仪器操作重复性良好。

表 6 样品测定结果 (mg/kg)

目标物	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD%
异嗪皮啶	2.17	2.08	2.15	2.10	2.07	2.10	2.13	1.90

■ 结论

本文建立了使用 ATLAS-LEXT NHD 进行自动化前处理并测定保健食品刺五加果中异嗪皮啶含量的方法。ATLAS-LEXT NHD 可根据前处理的需要，进行自定义编程，实现复杂的前处理过程自动化。该方法整体自动化程度高，回收率及重现性好，可为食品行业相关检测人员提供参考。

岛津应用云

