

LC-MS/MS 法测定大枣中环磷酸腺苷含量

LCMSMS-627

摘要: 本应用建立了大枣中环磷酸腺苷含量测定的方法。在优化后的色谱及质谱条件下,采用负离子模式扫描,通过多反应监测(MRM)模式对目标化合物进行测定。结果表明:环磷酸腺苷在1~200 ng/mL浓度范围内线性良好,所得校准曲线相关系数在0.9999以上,各校准点准确度在98.15~101.55%之间,保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.14%~0.29%和0.71%~2.75%之间,加标回收率在85.08~101.77%之间。

关键词: 大枣 环磷酸腺苷 LC-MS/MS

大枣作为美容养颜、益气补血的佳品,广受大众女性的喜爱。俗话说“一日吃三枣,终生不显老”。枣果中含有丰富的环磷酸腺苷,美国哥伦比亚大学坎德尔教授通过科研发现环磷酸腺苷能够修活化调节脑细胞功能,能够增强记忆缓解脑细胞疲劳和衰老,并凭此荣获诺贝尔医学奖。

环磷酸腺苷(cAMP)是细胞内参与调节物质代谢和生物学功能的重要物质,是生命信息传递的“第二

信使”,其具有增强机体免疫力,增强机体造血机能,保护肝功能等生理作用。为了有效地评价枣果中该功能活性成分的多少,有必要对其含量进行测定。

目前国内尚未发布关于食品中环磷酸腺苷检测的国标方法,本文采用岛津三重四极杆液质联用仪建立了大枣中环磷酸腺苷含量测定的方法,本方法灵敏度高、重现性好,适用于大枣中环磷酸腺苷的快速检测,为食品行业相关检测人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。配置信息如下:

系统控制器: SCL-40

自动进样器: SIL-40C X3

柱温箱: CTO-40C

输液泵: LC-40B X3

脱气机: DGU-405

工作站: Labsolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

1.2.1 液相条件

色谱柱: Shim-pack Velox HILIC (100 mm×2.1 mm I.D., 2.7 μm; 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-32025-03)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 0.2 μL

流动相: A相 - 水(含0.05%甲酸, 2 mM乙酸铵), B相 - 乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为80%, 洗脱程序见表1

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	B.Conc	80
2.50	Pumps	B.Conc	30
3.50	Pumps	B.Conc	30
3.60	Pumps	B.Conc	80
6.00	Controller	Stop	

1.2.2 质谱条件

分析仪器：LCMS-8050	接口温度：300°C
离子源：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：多反应监测 (MRM)
加热气流速：10.0 L/min	MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
cAMP	60-92-4	328.0	133.9*	16	22	14
			106.9	38	49	42

注：* 表示定量离子对

1.3 标准工作溶液的制备

精密称取 cAMP 标准品 10 mg，加入 50% 甲醇 - 水溶液 10 mL，配成浓度为 1 mg/mL 的 cAMP 储备液，取适量 1 mg/mL 的 cAMP 储备液，然后采用初始比例流动相逐级稀释，配制成浓度分别为 1 ng/mL，2 ng/mL，5 ng/mL，20 ng/mL，50 ng/mL，100 ng/mL 和 200 ng/mL 的 cAMP 标准系列工作溶液。

■ 样品前处理

取鲜枣样品，去核，经高速匀浆机匀浆处理后，-20°C 条件下贮存备用。称取 2.5 g 样品于 50 mL 离心管中，加入 20% 甲醇 - 水（含 0.05% 甲酸，2 mM 乙酸铵）溶液 10 mL，摇匀，立即移入超声中，超声浸提 30 min，转入离心机中，3500 r/min 条件下离心 10 min，取上清液 10 μL，加入 990 μL 初始比例流动相，混匀，过 0.22 μm 滤膜，上机分析。

取干枣样品，经粉碎机粉碎后，-20°C 条件下贮存备用。称取 0.1 g 样品于 15 mL 的离心管中，加入 20% 甲醇 - 水（含 0.05% 甲酸，2 mM 乙酸铵）溶液 10 mL，摇匀，立即移入超声中，超声浸提 30 min，转入离心机中，3500 r/min 条件下离心 10 min，取上清液 10 μL，加入 990 μL 初始比例流动相，混匀，过 0.22 μm 滤膜，上机分析。

■ 结果与讨论

3.1 MRM 色谱图

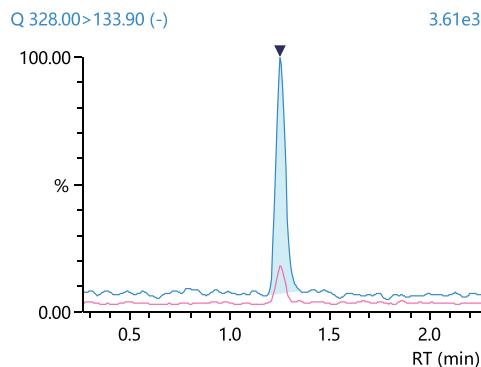


图 1. 标准溶液定量下限 MRM 色谱图

3.2 校准曲线及线性范围

将 cAMP 标准系列工作溶液，按“1.2 分析条件”进行测定，以定量离子峰面积为纵坐标，标准工作溶液浓度为横坐标，绘制校准曲线，使用外标法定量。校准曲线如图 2 所示。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)。结果显示，所得校准曲线相关系数大于 0.9999，各校准点准确度在 98.15~101.55% 之间，线性方程、相关系数、检出限及定量限结果见表 3。

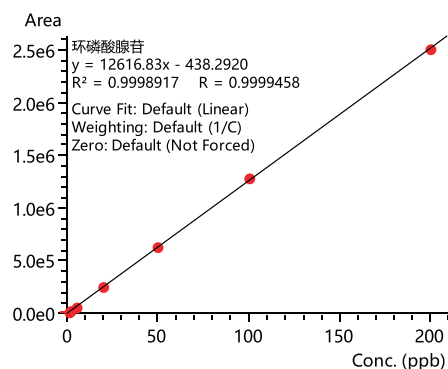


图 2 校准曲线

表 3 线性关系及相关系数

目标物	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (ng/mL)	准确度 %	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
cAMP	$Y = 12616.83X - 438.292$	0.9999	1~200	98.15~101.55	0.15	0.50

3.3 精密度结果

采用浓度为 1 ng/mL、5 ng/mL 和 100 ng/mL 的标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的重复性。结果如表 4 所示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.14% ~ 0.29% 和 0.71% ~ 2.75% 之间，显示仪器重复性良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

目标物	理论浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
cAMP	1.00	0.29	2.75
	5.00	0.15	1.14
	100	0.14	0.71

3.4 加标回收率

精密称取已知 cAMP 含量的市售鲜枣 (2.5 g) 和干枣 (0.1 g) 样品各 9 份，再分别加入低、中、高三个浓度的 cAMP 标准品储备液，每个浓度平行样品 3 份，按照“2. 样品前处理”方法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结果如表 5 所示，结果显示：cAMP 的加标回收率在 85.08~101.77% 之间，回收率结果良好。

表 5 加标回收率结果 (n=3)

目标物	样品	样品浓度 (mg/kg)	添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
cAMP	鲜枣	23.63	16.00	38.61	93.61	4.11
		23.63	24.00	44.05	85.08	3.74
		23.63	32.00	51.33	86.54	5.82
	干枣	171.8	120.0	287.2	96.22	2.62
		171.8	160.0	334.1	101.47	7.27
		171.8	200.0	375.3	101.77	3.59

3.5 样品测定结果

分别取市售鲜枣样品 2.5 g, 干枣样品 0.1 g, 每种样品 6 份, 按照“2. 样品前处理”方法处理及“1.2 分析条件”进行测定, 样品中 cAMP 含量测定结果见表 6。

表 6 样品测定结果 (n=6)

目标物	样品	平均值 (mg/kg)	RSD (%)
cAMP	鲜枣	23.63	1.40
	干枣	171.8	1.13

■ 结论

本应用建立了采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定大枣中环磷酸腺苷含量的方法, 采用岛津 Shim-pack Velox HILIC 色谱柱进行分离。本方法分析时间短、回收率高、重复性好, 可为食品行业相关检测人员提供参考。

岛津应用云

