

基于液质联用仪(LC-MS/MS)测定农作物中海藻糖、

海藻糖-6-磷酸

仪莹, 孙莹璐, 张丽娜

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100084)

摘要: 用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法(UPLC-MS/MS)检测农作物中的海藻糖、海藻糖-6-磷酸, 色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3, 检测柱温为 35°C, 流动相为乙腈:水=4:1, 按 0.1% 的量加乙酸铵, 检测流速为 0.3 mL/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, 回收率分别为 83.7%~95.6%, 相对标准差分别为 2.7%~3.3%, 满足农作物中 T6P 和 Tre 同时检测的要求。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱;海藻糖-6-磷酸;海藻糖;农作物

Determination of trehalose and trehalose-6-phosphate in crops based on LC-MS/MS

Yi Ying, Sun Yinglu, Zhang Lina

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100084, China)

Abstract: Ultra-performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to detect trehalose and trehalose 6-phosphate in crops. The chromatographic column was Waters Acquity UPLC HSS T3, the temperature of the detection column was 35°C, the mobile phase consisted of acetonitrile:water =4:1, and 0.1% ammonium acetate was added. The detection flow rate was 0.3 mL/min, the detection limits were 1.25-5.10 µg/L, and the quantification limits were 3.75-15.60 µg/L, the recovery rates were 83.7%-95.6%, the relative standard deviations were 2.7%-3.3%, respectively, which satisfied the requirements of simultaneous detection of T6P and Tre in crops.

Keywords: UPLC-MS/MS; trehalose; trehalose-6-phosphate; crops

1 引言

海藻糖(Tre)和海藻糖-6-磷酸(T6P)在农作物生长和发育过程中具有重要的调控作用。海藻糖-6-磷酸(T6P)是海藻糖代谢的中间产物,也是调节农作物糖代谢等生理过程的信号分子。农作物不同阶段的生长发育,包括胚胎发育,幼苗生长,成花诱导及叶片衰老等都受T6P的调控^[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)。



甲醇和乙腈(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:Waters Acquity UPLC HSS T3 Column (100 mm \times 3.0 mm,1.7 μ m),柱温 40 $^{\circ}$ C,进样体积 5 μ l,流动相、洗脱梯度和流速根据色谱柱特性确定^[3]。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);优化的质谱条件见表 1。

表 1 T6P 和 Tre 的质谱多反应检测质谱参数

化合物	分子式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压	碰撞能
T6P	C ₁₂ H ₂₃ O ₁₄ P	421.1	241.0、78.97	-55、-70	-30、-70
Tre	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.0	179.0、88.98	-60、-45	-15、-25

样品制备：准确称取样品 50mg 于离心管中，加入 1ml 的乙醇水溶液用超声波清洗机超声破壁 30min，离心，取上清液待测^[4]。

3 结果与分析

3.1 线性范围与检出限

Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱检测时，T6P 的质量浓度为 7.25 μg/L、14.5 μg/L、72.5 μg/L、145 μg/L、290 μg/L、725 μg/L、1450 μg/L，Tre 的质量浓度为 8.65 μg/L、17.3 μg/L、43.25 μg/L、86.5 μg/L、173 μg/L、346 μg/L、865 μg/L、1730 μg/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 T6P 和 Tre 通过 T3 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^[5]。

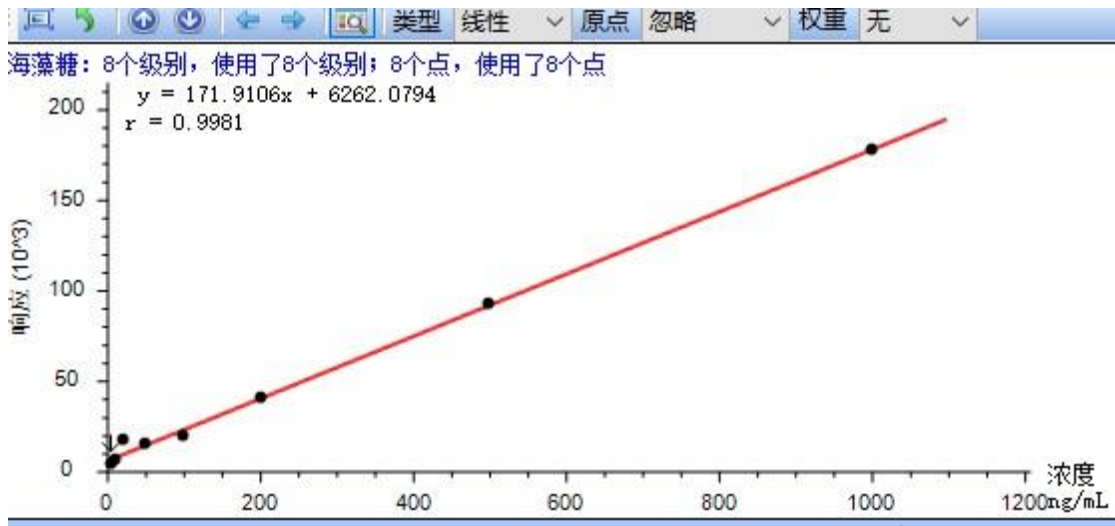


图1 海藻糖标准曲线

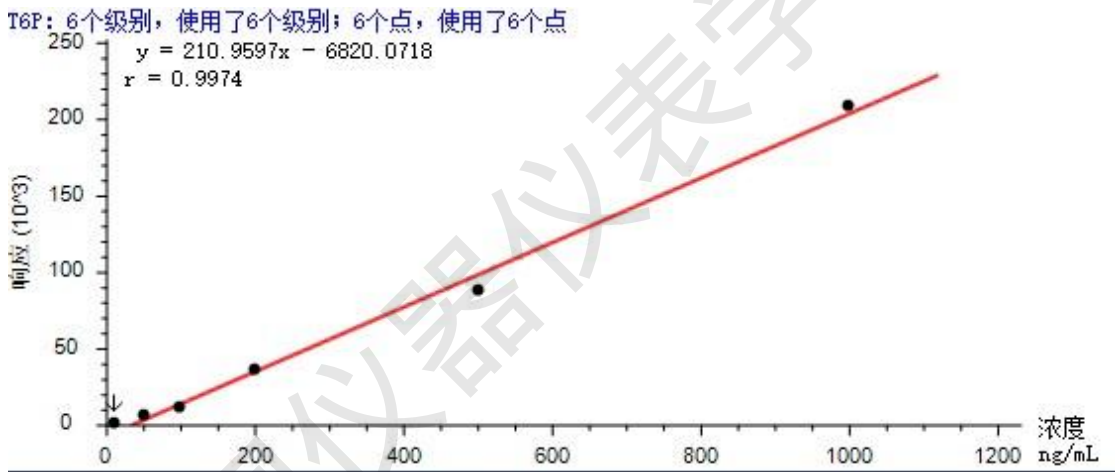


图2 T6P 标准曲线

表2 T6P 和 Tre 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($\mu\text{g/L}$)	相关系数	检出限($\mu\text{g/L}$)
T6P	$y = 210.96x - 6820.07$	7.25-1450	0.9974	1.25 3.75
Tre	$y = 171.91x - 6262.078$	8.65- 1730	0.9981	5.10 15.60

3.2 回收率和精密度

准确称取小麦叶片 50mg, 添加一定质量浓度的标准品溶液后, 每个质量浓度 3 次重复,

计算该方法的回收率和相对标准差,结果(表 2)表明,利用 HSS T3 色谱柱,在 3 个加标水平下, T6P 的回收率分别 83.7%~95.6%,相对标准差为 2.7%~3.3%; Tre 的回收率分别为 82.8%~84.8%,相对标准差为 2.8%~3.2%^[6]。

表 3 回收率与精密度的试验结果

化合物	加标量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率	相对标准偏差
T6P	62.5、500.0、1 000.0	83.7% ~ 95.6%	2.7% ~ 3.3%
Tre	10.0、80.0、250.0	82.8% ~ 84.8%	2.8% ~ 3.2%

3.3 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 3 所示。

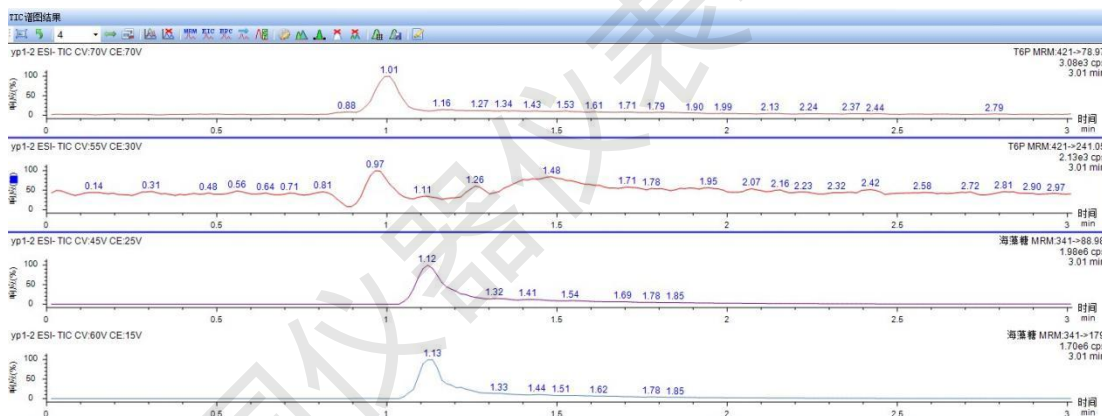


图 3 小麦叶片中 T6P 和 Tre 的色谱图

且同一批次样品 3 次平行样得到 T6P 和 Tre 的 RSD 值小于 3%,如图 4 所示,说明前处理方法可行,仪器的稳定性良好。

样品信息		T6P					
样品名称	定量方法	保留时间	理论塔板数	峰面积	峰高	信噪比	最终浓度
NP-1-BS	T6P.	1.01	1174.85	149586.90	30630.24	0.00	817.41
NP-2-BS	T6P.	1.01	1438.08	164554.10	36359.76	0.00	812.36
NP-3-BS	T6P.	1.02	810.60	112938.60	21616.90	0.00	804.68

样品信息		海藻糖					
样品名称	定量方法	保留时间	理论塔板数	峰面积	峰高	信噪比	最终浓度
NP-1-BS	海藻糖	1.12	1032.93	7288797.00	1337543.00	0.00	206663.60
NP-2-BS	海藻糖	1.13	703.44	7861382.00	1357143.00	0.00	207798.70
NP-3-BS	海藻糖	1.13	929.38	7864406.00	1612591.00	0.00	207878.60

图4 小麦叶片中 T6P 和 Tre 的测定值

分别对小麦、水稻、大豆等农作物叶片进行前处理提取实验，前处理方法简便可行，仪器性能可靠，满足对样品中海藻糖、六磷酸海藻糖的检测。

参考文献:

- [1] 陈素丽,彭瑜,周华,等. 植物海藻糖代谢及海藻糖-6-磷酸信号研究进展[J]. 植物生理学报, 2014, 50(3):233-242.
- [2] 蒋卫杰,李强,余宏军. 番茄中海藻糖-6-磷酸含量的超高效液相色谱串联质谱检测方法:CN109900833A [P]. 2019-06- 18.
- [3] 解楠,黄雨晴,郑国建. 亲水作用色谱法测定食品中 5 种糖[J].理化检验(化学分册), 2020, 56(12):1303-1306.
- [4] MATA A T, JORGE T F, FERREIRA J, et al. Analysis of low abundant trehalose-6-phosphate and related metabolites in *Medicago truncatula* by hydrophilic interaction liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1477:30-38.
- [5] SHAN S, MIN H, LIU T, et al. Structural insight into dephosphorylation by trehalose 6-phosphate phosphatase (OtsB2) from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. The FASEB Journal, 2016, 30(12): 3989.
- [6] 张雯,王宇斐,郭延平. 高等植物 6-磷酸海藻糖信号调控研究进展[J]. 植物生理学报, 2016, 52 (4):394-400.

