

# Application News

## No. C132

LC/MS  
 Liquid Chromatography Mass Spectrometry

### 使用 UHPLC 方法自动切换系统和三重四极杆 LC/MS/MS 对柑橘类的初级和次级代谢产物进行全面分析

Comprehensive Analysis of Primary and Secondary Metabolites in Citrus Fruits Using an Automated Method Changeover UHPLC System and LC/MS/MS System [LCMS-8050]

随着大众健康意识的不断增强，农产品和食品不仅要味美可口，而且还需要有益健康。因此具有高附加价值的食品生产和开发变得尤为重要。对生命体内存在的所有代谢产物进行全面分析的“代谢组学”研究，在分析生物代谢产物之外的领域也得到了应用。近年来，代谢组学成为食品加工行业和植物育种方面的重要技术。

在食品分析中，对食品的颜色、气味、口味以及初级、次级代谢产物进行全面分析非常重要。目前为止，同时测定这些要素的分析示例非常少。

本文向您介绍使用 LC/MS/MS 对食品中的初级代谢产物和次级代谢产物（有机酸、氨基酸、糖、类胡萝卜素、类黄酮的主要化合物）进行全面分析的方法以及对柑橘类样品的分析示例。

#### ■ 样品的预处理

Sample Preparation

使用 7 种柑橘（蜜柑、椪柑、不知火、天草、八朔、文旦、日向夏）（图 1）进行了分析。如图 2 所示，使用 2 种溶剂对各代谢产物进行分离和提取。

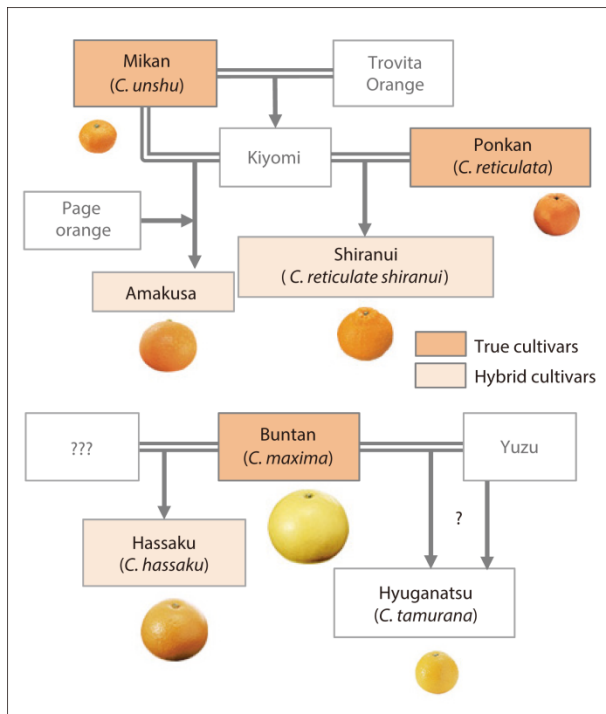


图 1 7 种柑橘的系统图  
 Taxonomic Tree of Seven Citrus Fruits

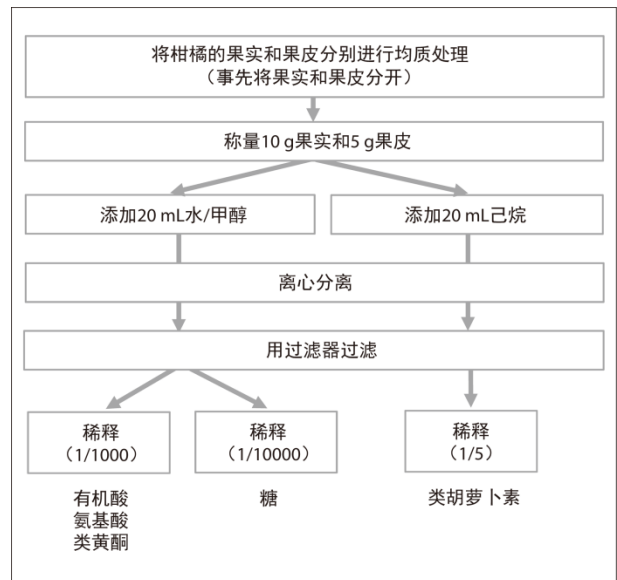


图 2 预处理步骤  
 Sample Pretreatment Protocol

## ■ LC/MS/MS 分析

LC/MS/MS Analysis

从化合物的化学性质上来说，使用相同的色谱参数对初级代谢产物和次级代谢产物进行测定存在困难，所以分别设置了不同流动相和色谱柱的 3 种分析条件。本次分析中使用 Nexera Method Scouting System（全方位的方法探索系统），可自动切换 3 种分析条件（图 3）。

该系统最多可使用 8 种流动相和 6 根色谱柱。本次分析使用了 4 种流动相和 3 根色谱柱。表 1 为分析条件。

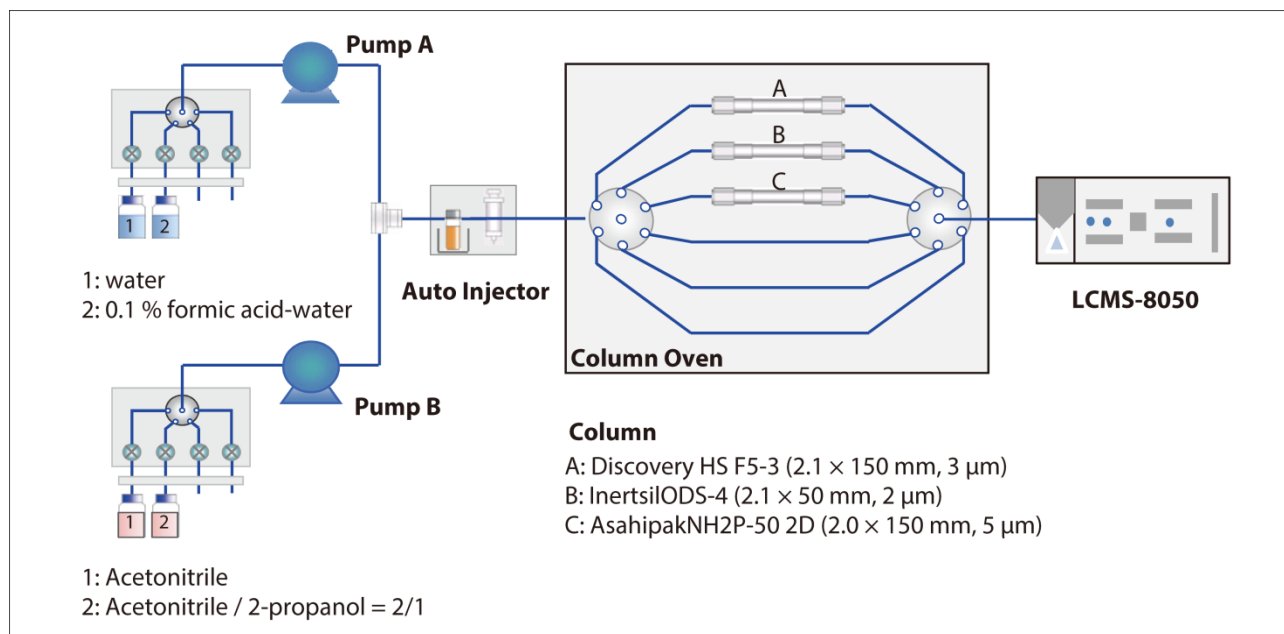


图 3 系统配置  
System Configuration

表 1 分析条件  
Analytical Conditions

Conditions	Condition 1	Condition 2	Condition 3
Instrument	UHPLC Nexera system (Shimadzu)		
Target Compounds	Organic acids Amino acids Flavonoids	Carotenoids	Sugars
Column	A: Discovery HS F5-3 (150 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 μm) Sigma-aldrich	B: Inertsil ODS-4 (50 mm L. × 2.1 mm I.D., 2 μm) GL-science	C: Asahipak NH2P-50 2D (150 mm L. × 2.0 mm I.D., 5 μm) Shodex
Column Oven Temp.	40 °C		
Mobile Phase A	2: 0.1% Formic acid-Water	1: Water	1: Water
Mobile Phase B	1: Acetonitrile	2: Acetonitrile / 2-Propanol =2/1	1: Acetonitrile
Flow Rate	0.25 mL/min	0.4 mL/min	0.4 mL/min
Time Program	0 %B (0-2 min.) → 95 % (10-13 min.) → 0 % (13.01-16 min.)	60 %B (0 min.) → 100 % (5-8 min.) → 60 % (8.01-10 min.)	65 %B (0-8 min.) → 30 % (8-11 min.) → 65 % (11.01-15 min.)
Measurement Time	16 min	10 min	15 min
Total Run Time	41 min		
Injection Volume	2 μL		
Instrument	LCMS-8050		
Ionization	ESI (+ / -)		
Mode	MRM		

## ■ 初级代谢产物、次级代谢产物的 MRM 测定

Multiple Reaction Monitoring (MRM) Analysis of Primary and Secondary Metabolites

图 4 为在不同分析条件下测定化合物得到的 MRM 色谱图。表 2 为所有成分的标准曲线线性范围。

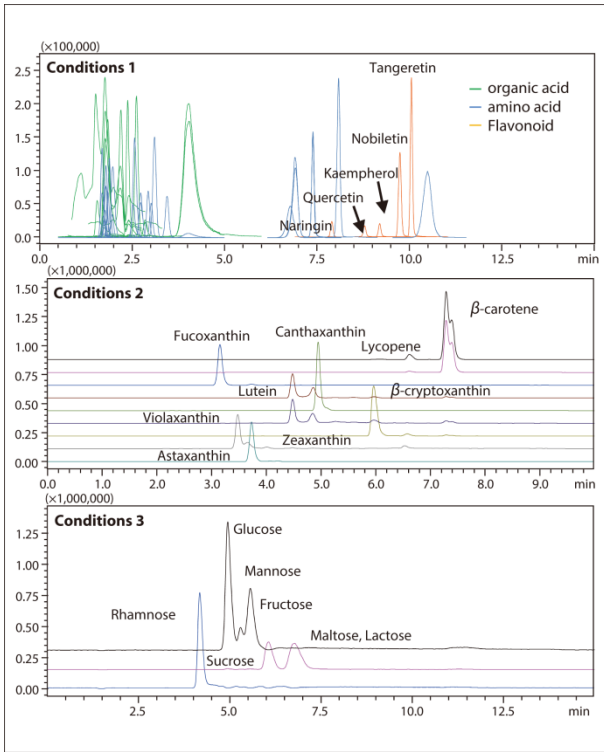


图 4 不同分析条件下的色谱图示例  
Example Chromatograms Obtained Under Three Analytical Conditions

## ■ 果实与果皮的成分比较

Comparison of Flesh and Peel Constituents

首先进行主成分分析,用以比较 7 种柑橘的果实与果皮成分。根据得分图可将果实和果皮可分成两组。由负荷图的结果可知,类胡萝卜素、类黄酮、糖会影响两者的差异。

表 2 目标成分的标准曲线线性范围  
Calibration Curve Ranges of Target Compounds

Amino acids	CAL of range	Organic acids	CAL of range
Cystine	1-100	Tartaric acid	50-10000
Aspartic acid	5-100	2-Ketoglutaric acid	10-10000
Asparagine	5-100	Isocitric acid	50-10000
Serine	5-100	Malic acid	10-5000
4-Hydroxyproline	1-100	Lactic acid	50-10000
Glycine	5-100	Citric acid	50-10000
Lysine	1-100	Pyroglutamic acid	10-10000
Cysteine	50-100	Succinic acid	10-1000
Threonine	5-100	Fumaric acid	500-1000
Glutamic acid	1-100	Maleic acid	50-10000
Alanine	5-100		
Proline	1-100		
Ornithine	5-1000		
Glutamine	5-100		
Histidine	5-100		
Arginine	5-100		
GABA	5-100		
Valine	1-100		
Methionine	5-100		
Tyrosine	5-100		
Isoleucine	5-100		
Leucine	10-100		
Phenylalanine	1-100		
Tryptophan	5-500		
Sugars	CAL of range		
Rhamnose	50-1000		
Fructose	50-5000		
Glucose	50-5000		
Sucrose	100-5000		
Maltose, Lactose	200-2000		
Carotenoids	CAL of range	Flavonoids	CAL of range
Fucoxanthin	0.1-100	Naringin	10-1000
Violaxanthin	1-100	Quercetin	5-1000
Astaxanthin	0.5-100	Kaempferol	5-1000
Lutein	0.1-100	Nobiletin	0.1-1000
Zeaxanthin	0.5-100	Tangeretin	0.1-1000
Canthaxanthin	0.05-100		
$\beta$ -Cryptoxanthin	0.05-100		
Lycopene	50-100		
$\beta$ -carotene	0.1-100		

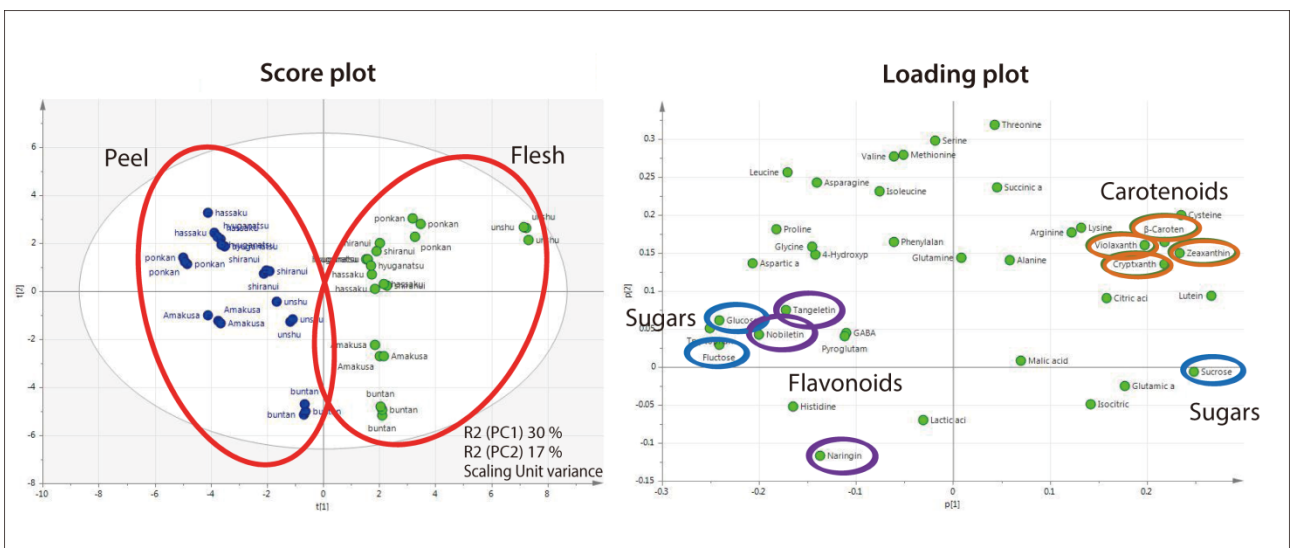


图 5 果实与果皮的主成分分析 (PCA)  
Principal Component Analysis (PCA) of Flesh and Peel

### 糖的比较（果实与果皮）

Comparison of Sugars (Flesh and Peel)

图6为果实与果皮中糖的定量值比较结果。由图可知，果实与果皮的糖总量并无差异，但糖构成的差异较大。

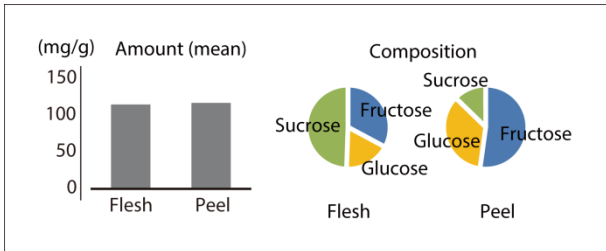


图6 果实与果皮所含糖的量与组成的比较  
Comparison of Sugar Quantity and Sugar Composition in Flesh and Peel

### 次级代谢产物的比较（果实与果皮）

Comparison of Secondary Metabolites (Flesh and Peel)

图7为果实与果皮中次级代谢产物定量值的比较结果。由图可知，类胡萝卜素在果实中含量较多，是果皮中含量的30倍以上。而类黄酮在果皮中含量较多，是果实中含量的5倍。综上所述，次级代谢产物在果实与果皮中的含量差异很大。

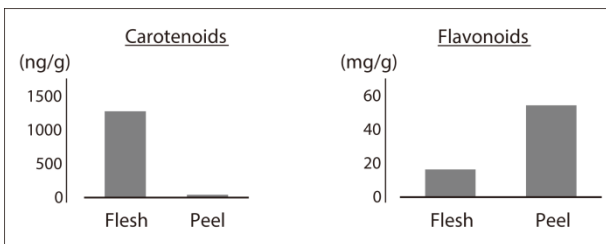


图7 次级代谢产物的平均量比较  
Comparison of Mean Secondary Metabolites

### 品种之间的比较（果实）

Comparison of Citrus Fruits (Flesh)

蜜柑及其杂交品种位于得分图的右上位置。类胡萝卜素类位于负荷图的右上位置（图8）。对类胡萝卜素类进行定量分析。由结果可知，蜜柑及其杂交品种中的类胡萝卜素含量较高，特别是β-隐黄素、β-胡萝卜素的含量比较高（图9）。

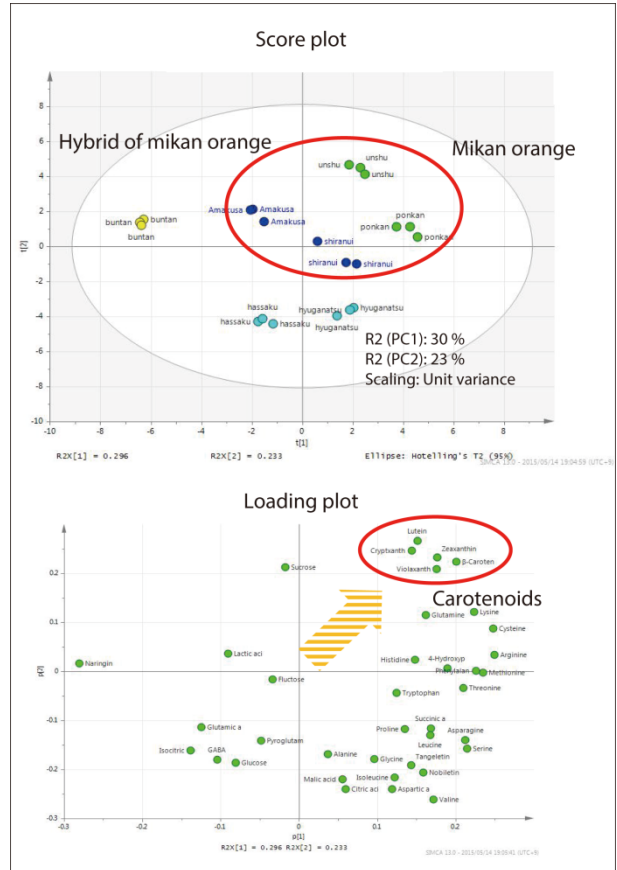


图8 果实的主成分分析 (PCA)  
Principal Component Analysis (PCA) of Flesh

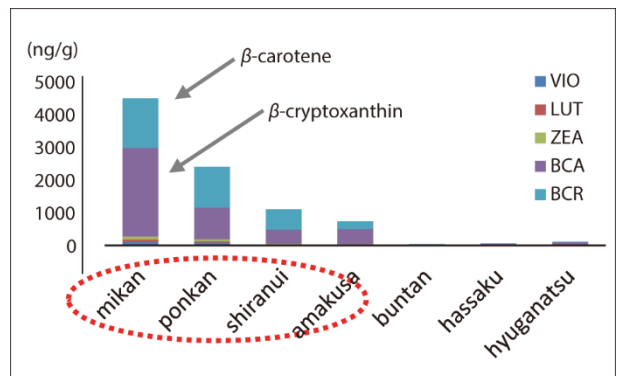


图9 7种柑橘的类胡萝卜素含量比较  
Comparison of Carotenoid Content of Seven Citrus Fruits