



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116718712 A

(43) 申请公布日 2023.09.08

(21) 申请号 202311009775.0

(22) 申请日 2023.08.11

(71) 申请人 中国农业科学院作物科学研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72) 发明人 任玉龙 孙莹璐 张丽娜 肖湘女
陈青 杜羽晨

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 朱惠惠

(51) Int. Cl.
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)

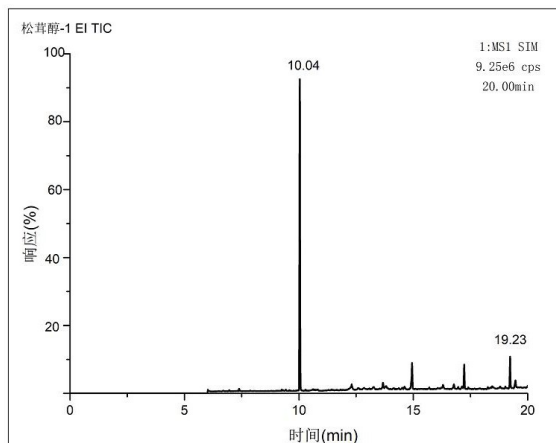
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

一种检测松茸中松茸醇含量的方法

(57) 摘要

本发明提供一种检测松茸中松茸醇含量的方法,包括使用提取试剂二氯甲烷对样品进行提取,对提取混合物进行混匀,放置过夜进行萃取;进行离心处理,取上清液;低温条件下进行浓缩至近干;使用甲醇进行回容,对试样进行色谱分离并对分离得到的化合物进行质谱检测并定量分析。本发明采用的化合物分离及检测系统分离用时短、检测灵敏度高,10分钟即可给出化合物的分离色谱图及高分辨质量数,最大程度地保留了化合物本身的物理化学性质,减少了样品的降解和损失。



1. 一种检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,采用气相色谱-质谱法进行检测;所述方法包括:以二氯甲烷为提取试剂对松茸样品进行提取;

其中,气相色谱条件:

进样口温度:220-250℃;

升温程序:起始温度45-55℃,保持2-4min;以8-12℃/min升温至120-130℃,保持1-3min,再以8-12℃/min升温至220℃,保持4-6min;

质谱条件中的驻留时间为: $\geq 0.1s$ 。

2. 根据权利要求1所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,提取试剂二氯甲烷与松茸样品组织的比例为(8-12 ml):1000mg。

3. 根据权利要求1所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,提取试剂二氯甲烷与松茸样品组织的比例为10ml:1000mg。

4. 根据权利要求1-3任一项所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,气相色谱条件:

进样口温度:240℃;

升温程序:起始温度50℃,保持3min;以10℃/min升温至120℃,保持1min,再以10℃/min升温至220℃,保持5min。

5. 根据权利要求1-3任一项所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,质谱条件中的驻留时间为:0.1s。

6. 根据权利要求1-3任一项所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,质谱条件:

离子源:电子轰击离子源;电子能量:70eV;离子源温度:200℃;气质接口温度:240℃;驻留时间为:0.1s;采集模式:选择离子扫描模式。

7. 根据权利要求1-3任一项所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,供试品的制备方法包括:以二氯甲烷为提取试剂对松茸样品进行提取,将提取物进行混匀,放置过夜进行萃取;对所述提取物进行离心处理,取上清液;将所述上清液浓缩至近干。

8. 根据权利要求1-3任一项所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,包括:

1) 使用二氯甲烷为提取试剂对松茸样品进行提取,得到提取混合物;

2) 使用涡旋混匀器对提取混合物进行混匀,放置过夜进行萃取;

3) 对提取混合物进行离心处理,取上清液;

4) 使用平行浓缩仪,对上清液在低温条件下进行浓缩至近干;

5) 使用甲醇进行回溶,过滤膜后装入上机瓶中备用;

6) 对试样进行色谱分离并对分离得到的化合物进行质谱检测并定量分析。

9. 根据权利要求8所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,所述低温条件为5-15℃。

10. 根据权利要求8所述检测松茸中松茸醇含量的方法,其特征在于,用于回溶的甲醇与松茸样品组织的比例为(1.5-3ml):1000mg。

一种检测松茸中松茸醇含量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生化分析技术,具体涉及提取松茸中的松茸醇,并应用气相色谱-串联质谱检测其含量的方法。

背景技术

[0002] 松茸(*Tricholoma matsutake*)又叫松蕈、松菇,属口蘑科食用真菌,是珍稀濒危食药真菌,肉质肥厚、香气宜人、味道鲜美,因有多糖、多肽蛋白、挥发性等多种活性物质,表现出抗肿瘤、抗病毒、调节免疫等药用价值而有“菇中之王”的美称。食用风味是松茸的关键品质之一,1-辛烯-3-醇、3-辛醇、1-辛烯-3-酮、3-辛酮等C₈类挥发性物质是食用风味的主要来源,其中松茸醇(1-辛烯-3-醇)是检测到的松茸风味的主要成分之一,其含量不同时呈现出不同的风味,包括蘑菇、泥土、湿木头的的气味。

[0003] 天然芳香挥发性化合物扩散至空气中呈现出独特的气味,松茸醇常用于防御昆虫和病原的攻击。已有研究表明松茸醇具有抑菌作用,在日本紫珠(*Callicarpa japonica* Thunb.)、黄芩(*Scutellaria Grossa* Wall ex Benth.)、马鞭草(*Premna integrifolia* Linn)和牛至(*Origanum vulgare* L.)的提取物中鉴定到了具有抗菌活性的松茸醇。由于松茸醇具有挥发性气味,也常被用于蚊虫引诱剂的制作,对于动物大脑神经系统有一定的损伤。有研究表明低剂量(体积分数0.1%)的松茸醇能通过降低多巴胺水平而导致黑腹果蝇的神经元变性。

[0004] 目前,针对松茸醇的检测多是集中在食用菌及各类植物中,对用松茸中松茸醇的检测较少报道。并且其测定主要通过气相色谱(GC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)法进行,然而多数测定是将松茸醇作为众多成分之一进行非靶向扫描定性,未对其进行精准定量。GC-MS在食品风味成分检测中应用最广泛,但存在灵敏度低、基线漂移、共检出等问题。气相色谱-三重四级杆串联质谱(GC-MS/MS)具有高灵敏度及分离能力,使得其在痕量物质精准定量领域应用增多。因此,亟需开发一种快速、便捷提取并结合精准检测松茸醇的方法。

发明内容

[0005] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种能够快速提取检测松茸中的松茸醇方法。本方法样品处理操作简单,检测速度快,准确度高,重现性好。

[0006] 一种检测松茸中松茸醇含量的方法,采用气相色谱-质谱法进行检测;所述方法包括:以二氯甲烷为提取试剂对松茸样品进行提取;

其中,气相色谱条件:

进样口温度:220-250℃;

升温程序:起始温度45-55℃,保持2-4min;以8-12℃/min升温至120-130℃,保持1-3min,再以8-12℃/min升温至220℃,保持4-6min;

质谱条件中的驻留时间为:≥0.1s。

[0007] 根据本发明实施例,提取试剂二氯甲烷与松茸样品组织的比例为(8-12 ml):

1000mg, 优选为10ml:1000mg。研究发现, 二氯甲烷能够最大程度地提取松茸样品中的松茸醇, 在同等浓度的试样和色谱条件下, 二氯甲烷在质谱检测过程中, 显示出更高的相应值, 同时其他干扰的相应值较低, 可以更准确地检测出试样的真实浓度。

[0008] 根据本发明实施例, 所用松茸样品为松茸组织中的菌盖或菌杆。

[0009] 研究发现, 当进样口温度过低时, 在质谱离子扫描(SIM)模式下, 低浓度的试样相应值也偏低, 无法呈现出标准的峰形, 并导致标准曲线的线性较差。

[0010] 根据本发明实施例, 气相色谱条件:

进样口温度:240℃;

升温程序:起始温度50℃, 保持3min;以10℃/min升温至120℃, 保持1min, 再以10℃/min升温至220℃, 保持5min。

[0011] 根据本发明具体实施例, 气相色谱条件中, 柱流量为1.0-2.0mL/min, 优选为1.5mL/min。

[0012] 根据本发明具体实施例, 气相色谱条件中, 载气为He。

[0013] 根据本发明具体实施例, 气相色谱条件中, 进样量为1.0-1.2uL, 优选为1.0uL。

[0014] 根据本发明实施例, 气相色谱采用安捷伦DB-Wax气相色谱柱(30m×0.25mm, 0.25μm)。

[0015] 根据本发明具体实施例, 气相色谱条件为:柱流量:1.5mL/min;进样口温度:240℃;载气:He;进样量:1.0uL;升温程序为:起始温度50℃, 保持3min;以10℃/min升温至120℃, 保持1min, 再以10℃/min升温至220℃, 保持5min。

[0016] 研究发现, 当驻留时间过少, 将对标准曲线的线性造成负面影响。

[0017] 根据本发明实施例, 质谱条件中的驻留时间为:0.1s。

[0018] 根据本发明实施例, 质谱条件:

离子源:电子轰击(EI)离子源;电子能量:70eV;离子源温度:200℃;气质接口温度:240℃;驻留时间为:0.1s;采集模式:选择离子扫描(SIM)模式。

[0019] 根据本发明实施例, 供试品的制备方法包括:以二氯甲烷为提取试剂对松茸样品进行提取, 将提取物进行混匀, 放置过夜进行萃取;对所述提取物进行离心处理, 取上清液;将所述上清液浓缩至近干。

[0020] 具体地, 所述离心使用高速离心机, 所述离心的条件为:12000-12700rpm离心10-30分钟。

[0021] 具体地, 将上清液在低温条件下进行浓缩至近干。所述低温条件为5-15℃。

[0022] 将浓缩至近干的提取物, 使用甲醇进行回容, 过滤膜后装入上机瓶中即可进行后续检测。

[0023] 具体地, 用于回溶的甲醇与松茸样品组织的比例为(1.5-3ml):1000mg, 优选为2ml:1000mg。

[0024] 根据本发明实施例, 所述检测松茸中松茸醇含量的方法包括:

- 1) 使用二氯甲烷为提取试剂对松茸样品进行提取, 得到提取混合物;
- 2) 使用涡旋混匀器对提取混合物进行混匀, 放置过夜进行萃取;
- 3) 对提取混合物进行离心处理, 取上清液;
- 4) 使用平行浓缩仪, 对上清液在低温条件下进行浓缩至近干;

5) 使用甲醇进行回容,过滤膜后装入上机瓶中备用;

6) 对试样进行色谱分离并对分离得到的化合物进行质谱检测并定量分析。

[0025] 上述方法步骤6)中,采用外标法对样品中的松茸醇含量进行定量,具体可为:分别以2ug/mL、1ug/mL、0.5ug/mL、0.1ug/mL、0.05ug/mL标准溶液按照上述气相色谱-三重四极杆串联质谱方法进行测定,绘制标准曲线,测定待测样品中的松茸醇含量。

[0026] 本发明由于采取以上技术方案,具有以下优点:1)提取溶剂简单、成本低、提取效果好;2)提取溶剂体系最大程度地减少了样品的降解和损失;3)本发明采用的化合物分离及检测系统分离用时短、检测灵敏度高,10分钟即可给出化合物的分离色谱图及高分辨质量数,最大程度地保留了化合物本身的物理化学性质,减少了样品的降解和损失。

附图说明

[0027] 图1为本发明二氯甲烷提取溶剂稀释标品松茸醇为1ug/mL的TIC谱图。

[0028] 图2为本发明二氯甲烷提取松茸样品的TIC谱图。

[0029] 图3为本发明松茸醇质谱信息图。

[0030] 图4为本发明外标法线性关系图。

[0031] 图5为对比例2中色谱条件2外标法线性关系图;

图6为对比例2中色谱条件3外标法线性关系图;

图7为对比例2中色谱条件4外标法线性关系图;

图8为对比例3中质谱条件2外标法线性关系图。

具体实施方式

[0032] 下面通过具体实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试剂、材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0033] 实施例1

[0034] 市售松茸新鲜样品共4种用干净毛刷去除表面泥土,取菌盖,分别研磨至均匀浆状,各准确称取1.000g,使用10ml二氯甲烷为提取试剂进行提取,得到提取混合物;使用涡旋混匀器对4份提取混合物进行混匀,放置过夜进行萃取;对4份提取混合物进行离心处理,采用高速离心机,以12000rpm离心的条件进行离心,20分钟后取上清液;使用平行浓缩仪,对4份上清液在低温条件下进行浓缩至近干,本次实施方法中采用的具体操作温度为15℃;使用2ml甲醇对4份样品分别进行回容,过滤膜后装入上机瓶中备用。

[0035] 对试样进行色谱分离并对分离得到的化合物进行质谱检测。

[0036] 采用安捷伦DB-Wax气相色谱柱(30m×0.25mm,0.25μm),气相色谱(GC 2000,杭州谱育科技发展有限公司),设置仪器条件为柱流量:1.5mL/min;进样口温度:240℃;载气:He气;进样量:1.0uL;设置升温程序为:起始温度50℃,保持3min;以10℃/min升温至120℃,保持1min,再以10℃/min升温至220℃,保持5min。

[0037] 采用三重四极杆串联质谱仪(EXPEC 5230杭州谱育科技发展有限公司),设置仪器条件为:离子源:电子轰击(EI)离子源;电子能量:70eV;离子源温度:200℃;气质接口温度:240℃;驻留时间为:0.1s;采集模式:选择离子扫描(SIM)模式。

[0038] 如图1所示,结合质谱检测在10.04min出的峰对应的化合物为目标化合物松茸醇(1-Octen-3-ol)。

[0039] 精密配制浓度为2ug/mL、1ug/mL、0.5ug/mL、0.1ug/mL、0.05ug/mL标准溶液按照上述气相色谱-三重四极杆串联质谱方法进行测定,绘制标准曲线,测定待测样品中的松茸醇含量。经测定,本次检测的4份市售松茸样品中的松茸醇含量分别为:7.044(mg/kg)、7.051(mg/kg)、6.527(mg/kg)、6.035(mg/kg)。

[0040] 采用本实施例的快速提取检测方法得到的质谱图(如图2所示)色谱峰尖锐,色谱柱理论塔板数达到905378.60,其质谱信息如图3所示。

[0041] 本实施例采用市售松茸醇标准品对提取检测松茸中松茸醇的方法进行了评价,实验结果表明,峰面积与浓度呈良好的线性关系,相关系数为0.9998(如图4所示)。

[0042] 本发明的提取检测方法样品制备简便、提取快速,方法易上手、可操作性强,最大程度地减少了待测物的损失和自降解,为测试类似结构的化合物提供了一个新的解决途径。

[0043] 对比例1

[0044] 与实施例1的区别仅在于,分别使用等量的二氯甲烷和甲基叔丁基醚溶解同等浓度的标准溶液,在同等的色谱和质谱条件下进样,比较其响应值和干扰状况。实验结果显示,同等条件下二氯甲烷的响应值为 $1.53e7$ CPS,而甲基叔丁基醚的相应值为 $4.49e6$ CPS。同时,二氯甲烷为溶剂时除目标峰外,其他峰的相应值均偏小,对实验结果造成干扰的可能性低。而甲基叔丁基醚为溶剂时,其他峰的相应值也较大。当试样的浓度较低时,将对实验的结果造成一定承担的干扰。

[0045] 对比例2

[0046] 与实施例1的区别仅在于,改变色谱条件。具体如下。

[0047] 使用二氯甲烷配置同样梯度的标准溶液,分别在色谱条件2、色谱条件3、色谱条件4下进样,并在与实施例1同等的质谱条件下检测。

[0048] 色谱条件2:

柱流量:1.5mL/min;进样口温度:180℃;载气:He气;进样量:1.0uL;设置升温程序为:起始温度50℃,保持3min;以10℃/min升温至120℃,保持1min,再以10℃/min升温至220℃,保持5min。

[0049] 色谱条件3:

柱流量:1.5mL/min;进样口温度:240℃;载气:He气;进样量:1.0uL;设置升温程序为:起始温度50℃,保持3min;以15℃/min升温至120℃,保持1min,再以10℃/min升温至220℃,保持5min。

[0050] 色谱条件4:

柱流量:1.5mL/min;进样口温度:180℃;载气:He气;进样量:1.0uL;设置升温程序为:起始温度50℃,保持3min;以10℃/min升温至120℃,保持1min,再以10℃/min升温至240℃,保持5min。

[0051] 图5、图6、图7分别为色谱条件2、3、4的外标法线性关系图。

[0052] 实验结果表面,以上不同色谱条件下的标准曲线线性分别为:0.9882、0.9875,0.9886。其中色谱条件1为最佳条件。

[0053] 对比例3

[0054] 与实施例1的区别仅在于,改变质谱条件。具体如下。

[0055] 质谱条件2:

离子源:电子轰击(EI)离子源;电子能量:70eV;离子源温度:200℃;气质接口温度:240℃;驻留时间为:0.005s;采集模式:选择离子扫描(SIM)模式。

[0056] 图8为质谱条件2外标法线性关系图。

[0057] 实验结果表面,该质谱条件下的标准曲线线性为: 0.9864。经对比可知,质谱条件1为最佳条件。

[0058] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

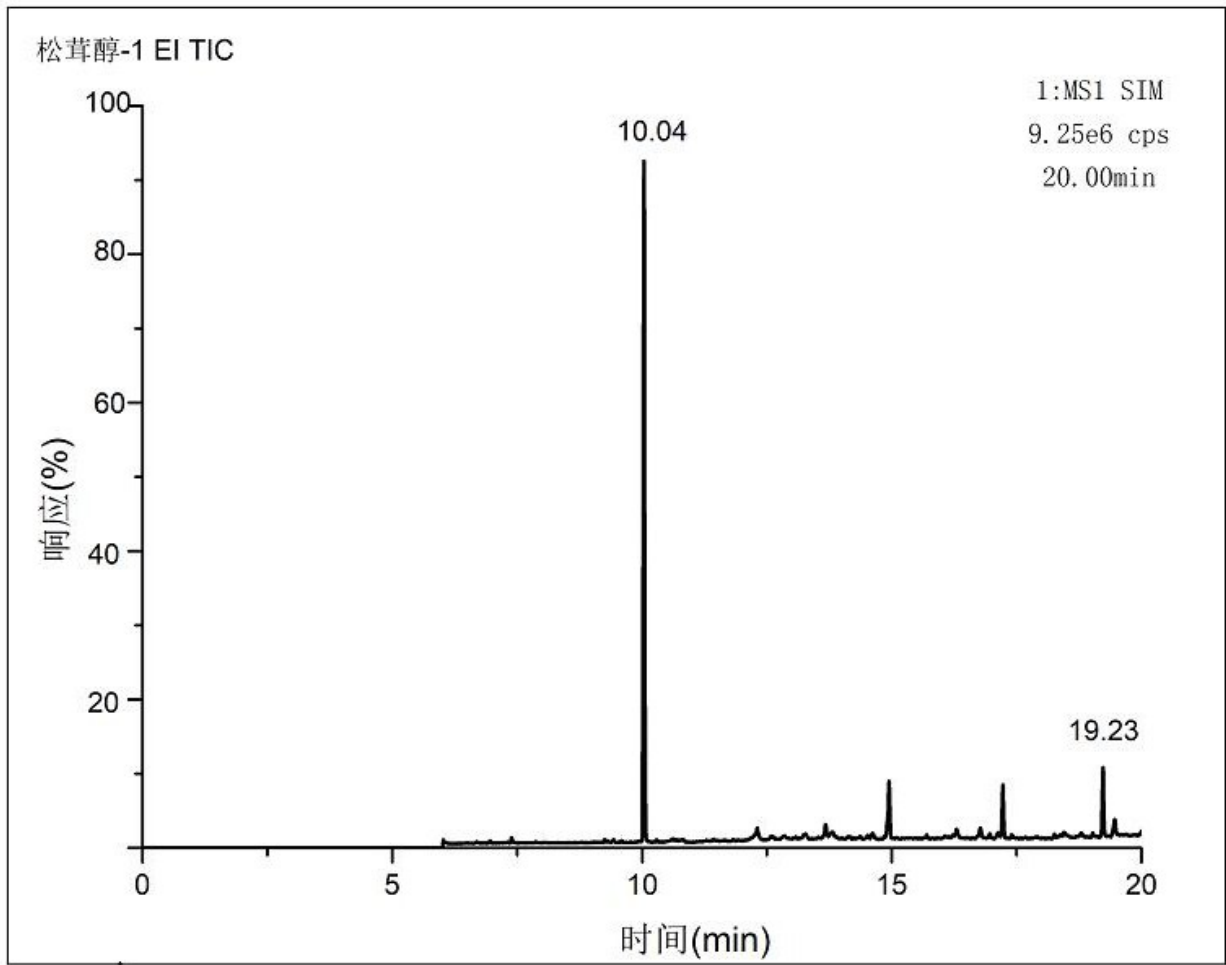


图 1

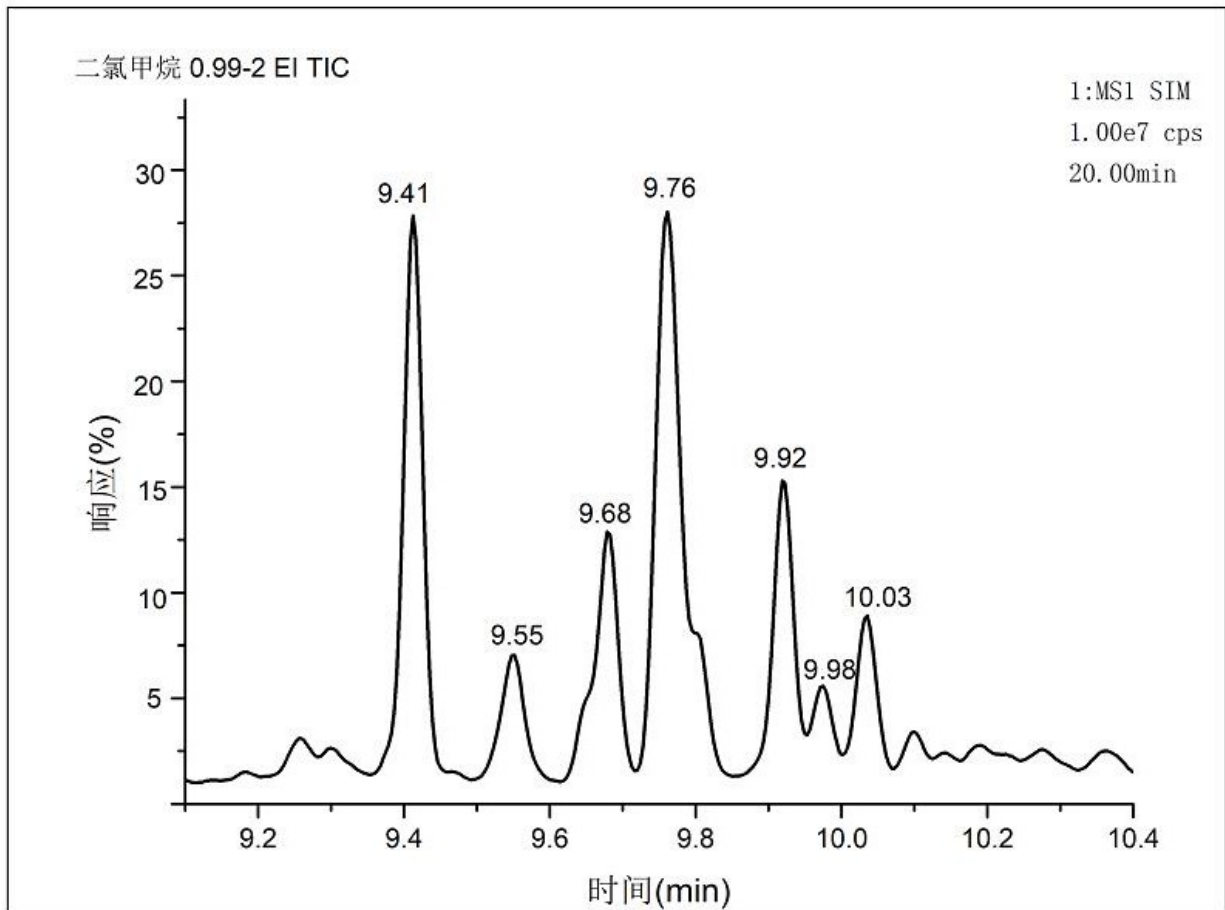


图 2

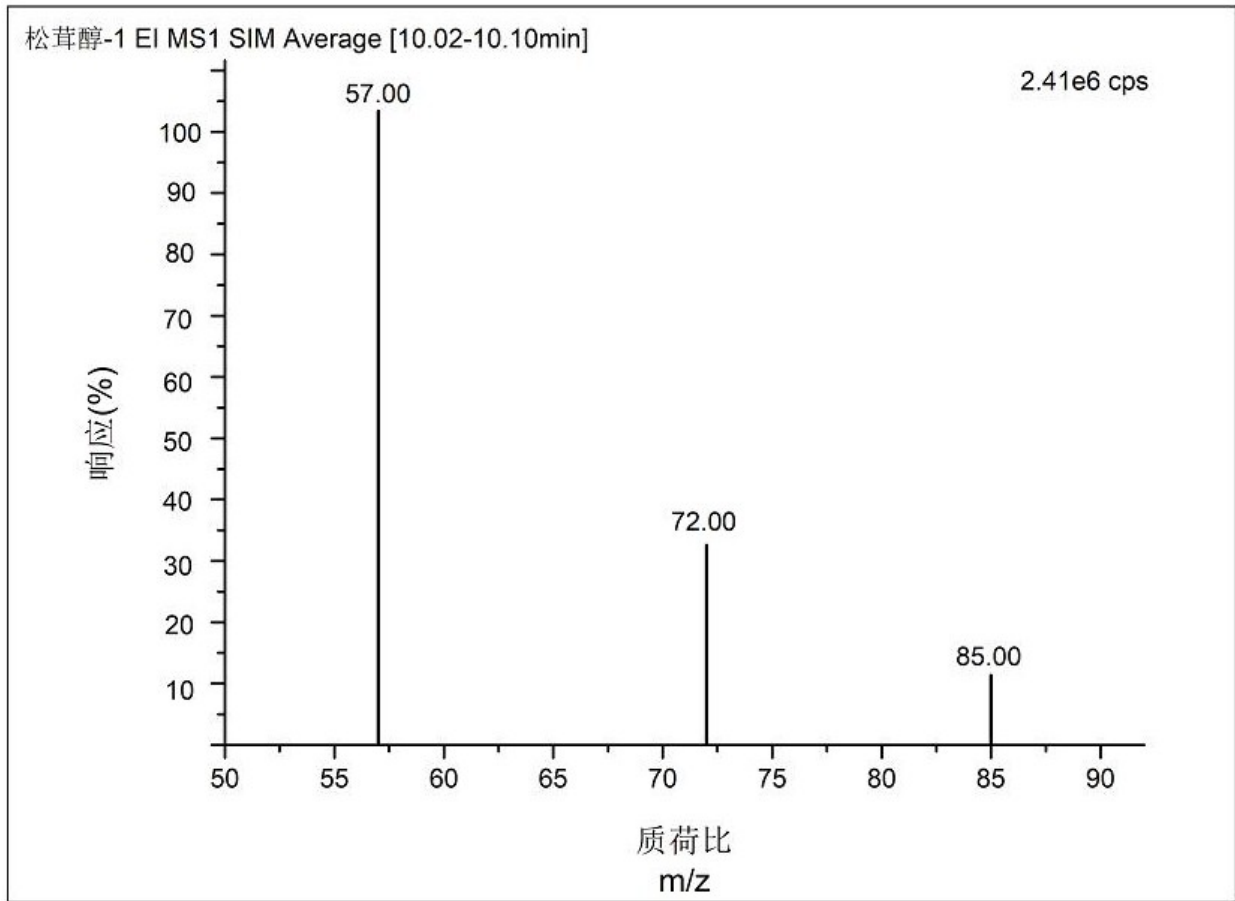


图 3

松茸醇: 5个级别, 使用了5个级别; 5个点, 使用了5个点

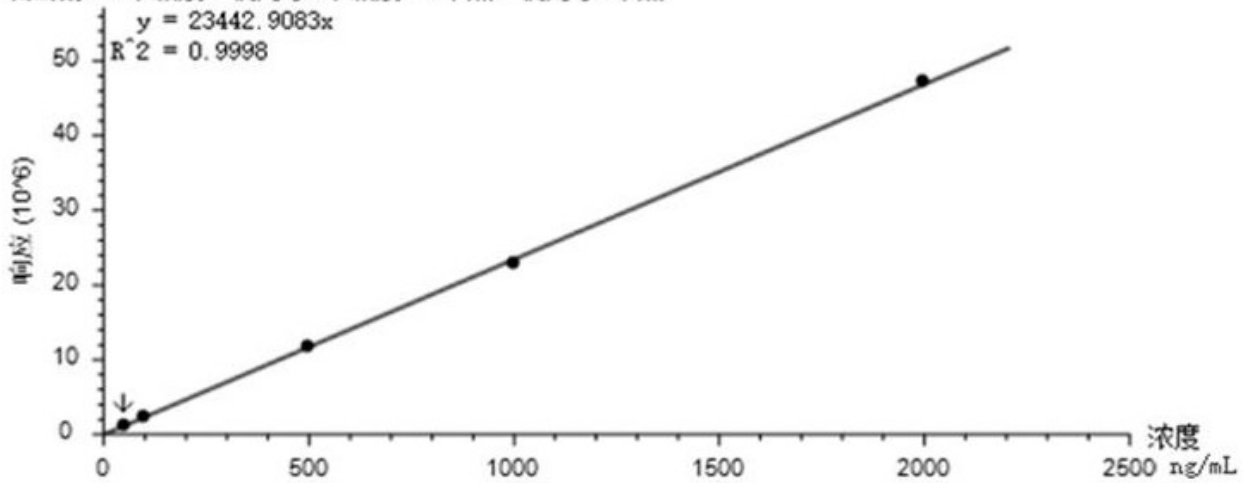


图 4

松茸醇: 5个级别, 使用了5个级别; 5个点, 使用了5个点

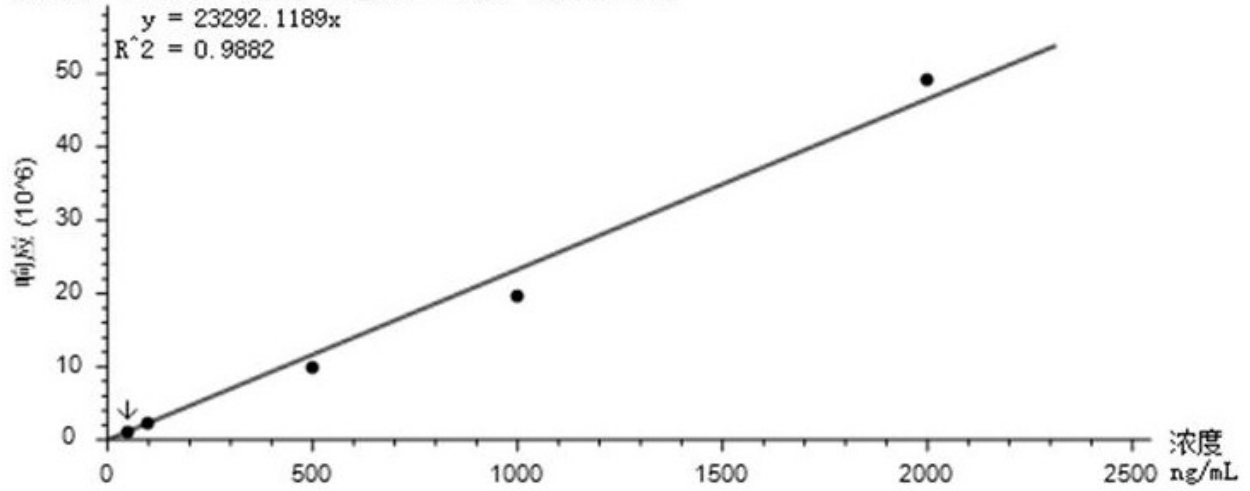


图 5

松茸醇: 5个级别, 使用了5个级别; 5个点, 使用了5个点

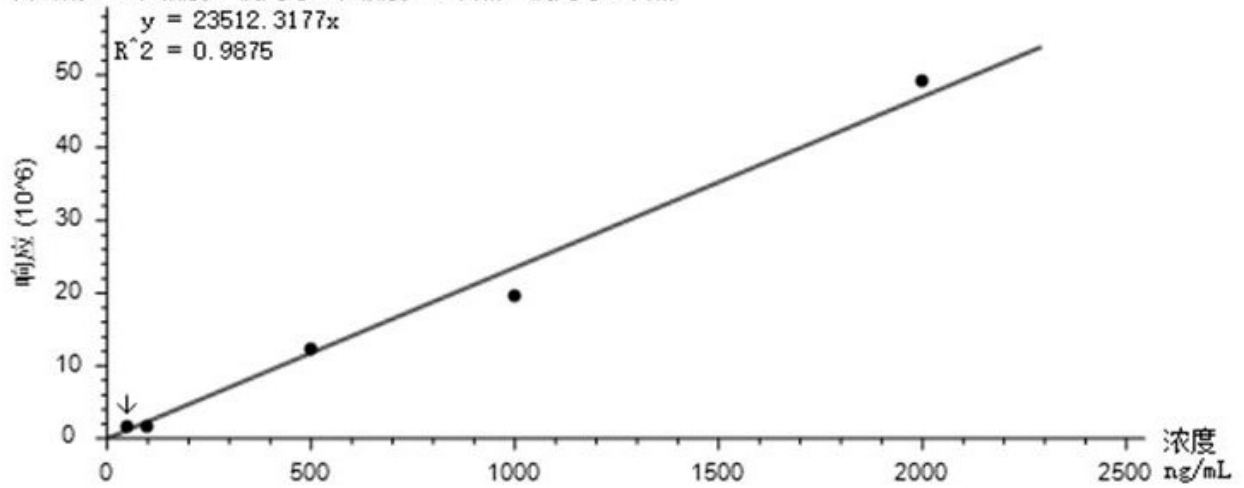


图 6

松茸醇: 5个级别, 使用了5个级别; 5个点, 使用了5个点

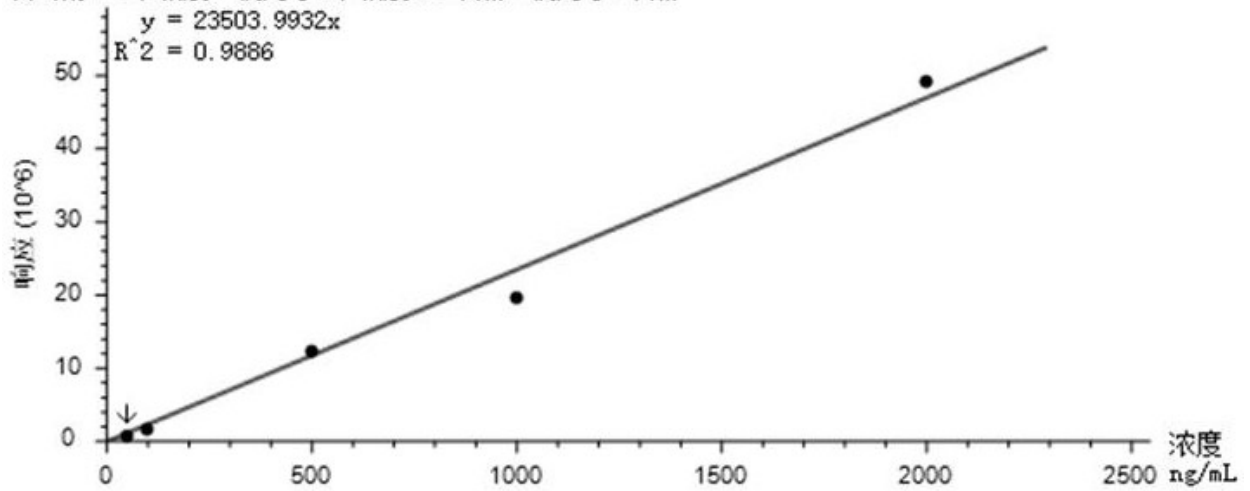


图 7

松茸醇: 5个级别, 使用了5个级别; 5个点, 使用了5个点

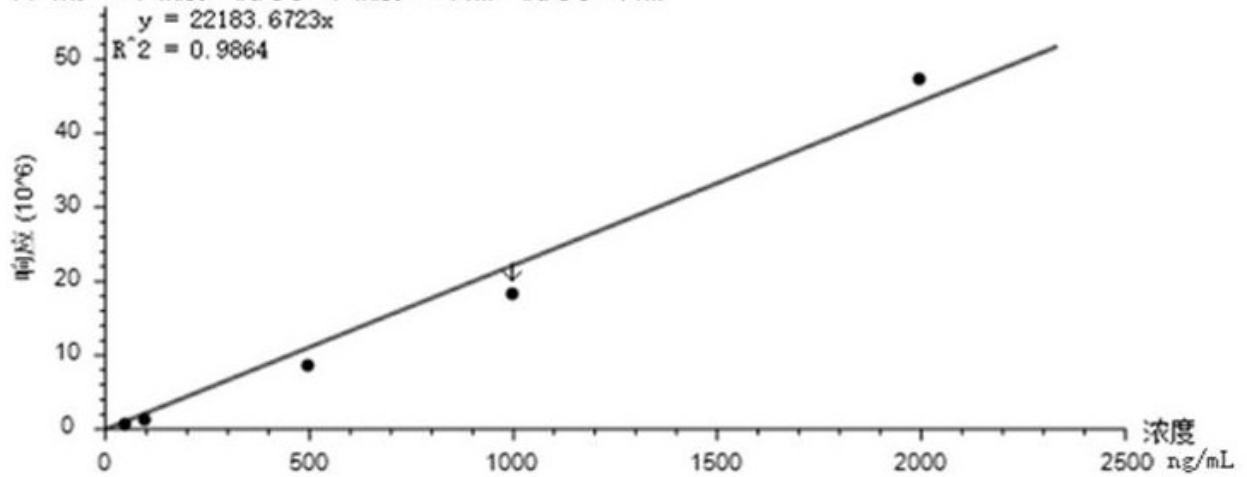


图 8