

- HepG-2 cell by a HPLC-ESI-MS system with porous graphitic carbon as stationary phase [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877(22): 2019-2024.
- [11] Mao Y, Li Y, Yao N. Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in extracts of *Rhodiola L.* by microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45(3): 510-515.
- [12] Cui S, Hu X, Chen X, Hu Z. Determination of p-tyrosol and salidroside in three samples of *Rhodiola crenulata* and one of *Rhodiola kirilowii* by capillary zone electrophoresis [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377(2): 370-374.
- [13] 申进文, 孙晓萍, 赵旭, 等. 人工蛹虫草核苷类成分超声提取工艺优化及 HPLC 定量分析 [J]. 河南农业大学学报, 2011, 4(4): 391-394.
- [14] 杨晓艳, 芦启琴, 张晓峰. HPLC 法测定不同溶剂对红景天中红景天苷提取率的影响 [J]. 分析实验室, 2008, 27(Suppl): 295-297.
- [15] 董彦莉. 超声波法提取红景天苷工艺条件的优化 [J]. 广东农业科学, 2011, (18): 64-65.

实验技术与方法

高效液相色谱-串联质谱测定蝙蝠蛾被毛孢菌丝体中的褪黑素含量

李晓明¹, 黄宏南¹, 林宏琳², 张占蓬¹

(1. 福建中医药大学, 福建 福州 350108; 2. 福建省疾病预防控制中心, 福建 福州 350001)

摘要:目的 建立测定蝙蝠蛾被毛孢菌丝体中褪黑素含量的高效液相色谱-串联质谱方法。方法 样品中褪黑素以甲醇为提取溶剂, 以超声波为提取方式进行提取。采用色谱柱 Thermo Beta Basic-18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水 (60:40), 流速 0.6 ml/min, 柱温 40 °C。用串联离子阱质谱在电喷雾电离正离子 (ESI+) -二级质谱 (MS/MS) 模式进行质谱测定。结果 方法的线性范围为 10 ~ 200 μg/kg, 基质加标工作曲线线性方程为 $y = 10204.8x - 8575.85$, 相关系数 $r = 0.9992$ 。方法的检出限为 0.5 μg/kg, 定量限为 2.0 μg/kg, 平均回收率为 81.92%, 相对标准偏差 < 10%。结论 本方法选择性高、快速, 可以应用于蝙蝠蛾被毛孢菌丝体粉末中褪黑素检测, 也可为其他复杂体系中褪黑素的测定提供依据。

关键词: 蝙蝠蛾被毛孢菌丝体; 褪黑素; 高效液相色谱-串联质谱法; 保健食品

中图分类号: R155; O657.7; Q576 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)02-0162-04

Determination of melatonin in *Cordyceps sinensis mycelium* by high liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

Li Xiaoming, Lin Honglin, Zhang Zhanpeng, Huang Hongnan

(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Fuzhou 350108, China)

Abstract: Objective To establish a method of determining melatonin in *Cordyceps sinensis mycelium* by high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Melatonin in the sample was extracted ultrasonically with methanol. The content was then separated on Thermo Beta Basic-18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with methanol/0.1% formic acid solution (60:40) as mobile phase. The flow rate was 0.6 ml/min, and column temperature was set to 40 °C. Detection was performed under positive ion electrospray ionization tandem ion trap mass spectrometry (ESI+) -tandem mass spectrometry (MS/MS) mode. **Results** There was a good linearity of melatonin in the range of 10 ~ 200 μg/kg with correlation coefficient of 0.9992. The detection limit of the method was 0.5 μg/kg, and the limit of the quantification was 2.0 μg/kg. The average recovery was 81.92%. The relative standard deviation was lower than 10%. **Conclusion** This method is selective and fast. It can be applied to detect the melatonin in *Cordyceps sinensis mycelium* powder, and it may also provide basis for the determination in other complex systems.

Key words: *Cordyceps sinensis mycelium*; melatonin; HPLC-MS/MS; health food

收稿日期: 2013-01-31

作者简介: 李晓明 女 硕士生 研究方向为营养与食品安全 E-mail: lixiaoming198522@126.com

通信作者: 黄宏南 男 主任技师 研究方向为营养与食品安全 E-mail: hhn66666@163.com

褪黑素(melatonin)是一种吲哚类色胺,化学名称为N-乙酰-5-甲氧基色胺,广泛地存在于动植物中,有研究表明褪黑素具有改善睡眠障碍、抗氧化作用、抗肿瘤、免疫调节等作用^[1]。其测定方法主要有:高效液相紫外检测法^[2]、高效液相荧光检测法^[3]、高效液相-质谱法^[4]、气相色谱法^[5]、气相色谱-质谱法^[6]、化学发光法^[7]、伏安法和安培法^[8]等。国内对药用植物褪黑素研究已有报道^[9-10]。由于在实际样品中复杂的基质往往影响测定结果的准确度和重复性,因此本文研究建立了测定复杂基质蝙蝠蛾被毛孢菌丝体中褪黑素的液相色谱-串联质谱方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

蝙蝠蛾被毛孢菌丝体粉,购于智得冬虫夏草真菌开发有限公司。

1.1.2 仪 器 与 试 剂

Finnigan LCQ XP MAXLC-MS 液相色谱串联离子阱质谱仪(Thermo-Finnigan 公司,美国)、超纯水仪、EYELA 旋转蒸发仪、离心机、超声波清洗器、H H-2 恒温水浴锅。

甲醇(色谱纯,美国 Fisher),褪黑素对照品(纯度 99.5%,批号 0812014, Augsburg Germany),标准储备液:精确称取褪黑素标准品 10.00 mg 于 100 ml 棕色容量瓶中,甲醇定容至刻度,配制浓度为 0.10 mg/ml 褪黑素标准储备溶液,避光储存于 2~4 °C 冰箱中;褪黑素标准使用液:用空白蝙蝠蛾被毛孢菌丝体基质提取液来稀释标准储备液,配制不同浓度褪黑素标准系列溶液并储存于棕色容量瓶中。

1.2 方 法

1.2.1 样 品 前 处 理

将蝙蝠蛾被毛孢菌丝体低温冷冻干燥后粉碎过 80 目筛(此步由智得冬虫夏草真菌开发有限公司完成),准确称取蝙蝠蛾被毛孢菌丝体粉 5.000 g,加入 60 ml 甲醇,涡旋混匀,超声(超声功率 250 W)提取 60 min 后,4 °C,8 000 r/min 离心 5 min。取上清液,50 °C 减压浓缩至 2 ml,过 0.22 μm 微孔滤膜后,备用。

1.2.2 仪 器 条 件

质谱条件:正离子扫描模式,喷雾电压 4 kV,鞘气流速 45 Arb,辅助气流速 10 Arb,毛细管温度 350 °C,扫描模式 MS/MS,褪黑素碰撞能量百分比为 38%。

色谱条件:色谱柱 Thermo Beta Basic-18(150 mm ×

4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.1% 甲酸水(60:40),流速 0.6 ml/min,进样量 10 μl,柱温 40 °C。

2 结 果 与 讨 论

2.1 样 品 前 处 理 的 选 择

通过空白基质加标的方法比较了液液萃取、超声波提取以及回流提取前处理方法,结果表明,超声波提取简单、方便、提取率高。而文献中有报道使用 C₁₈^[3,9] 和 HLB^[11] 固相萃取小柱进行净化,经实验结果发现两种固相萃取小柱的洗脱液发生不同程度乳化现象,破乳后过 0.22 μm 微孔滤膜后测定褪黑素,其含量有损失。因此,采用超声提取浓缩后直接测定的处理方法。

2.2 质 谱 条 件 优 化

在用 HPLC-MS/MS 进行检测时,使用 ESI(+) 模式时组分的响应值比 ESI(-) 模式明显增强,灵敏度提高。对质谱条件进行优化,先通过全离子扫描方式观察总离子流质谱图得到分子离子峰,然后通过逐级增加碰撞能量得到碎片离子,以甲醇为溶剂时碰撞能量为 35%,当以蝙蝠蛾被毛孢菌丝体空白基质为溶剂时碰撞能量需加至 38%。以甲醇为溶剂的褪黑素标准品,结果表明,褪黑素的分子离子峰为[M+H]⁺(233.3),其 MS/MS 质谱图见图 1,碎片离子(质荷比 m/z)有 216.2、191.1、174.2,其中 m/z 174.2 是由于发生麦氏重排产生,为主要的碎片离子。但是,因为样品中成分组分复杂,以不含目标物的基质溶液作为溶剂时,出现其他的碎片峰 205.3 和 189.3,其 MS/MS 质谱图见图 2,为了确定是否是因为基质影响产生,我们对其进行三级质谱分析,其 MS³ 见图 3,结果表明 m/z 174.2 仍为主要的碎片离子,因此可以选择离子 m/z 216.2 和 m/z 174.2 作为辅助定性离子和定量离子。

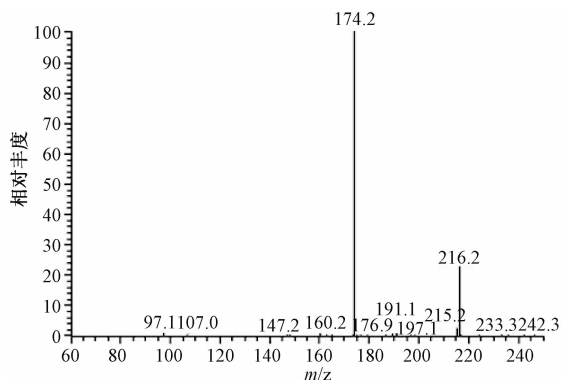


图 1 褪黑素(100 ng/ml,甲醇)对照品 MS/MS 图

Figure 1 MS/MS spectrum of standard melatonin (100 ng/ml, MeOH)

2.3 色 谱 条 件 优 化

色谱柱的选择:褪黑素的测定一般选用 C₁₈ 反相

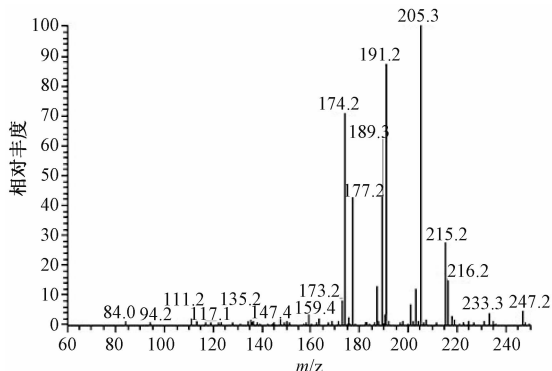


图2 褪黑素(100 ng/ml,空白基质)对照品 MS/MS 图

Figure 2 MS/MS spectrum of standard melatonin (100 ng/ml, matrix)

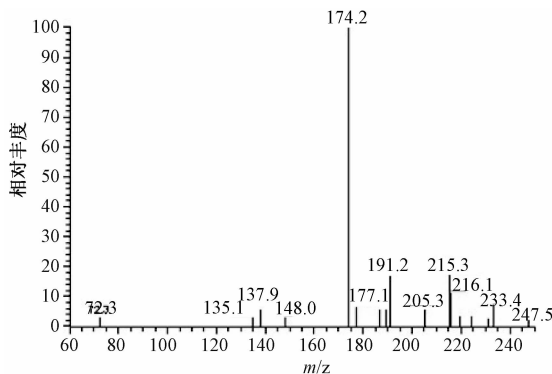


图3 褪黑素(100 ng/ml,空白基质)对照品 MS³ 图

Figure 3 MS³ spectrum of standard melatonin (100 ng/ml, matrix)

色谱柱,因此为了获取最佳的效果,研究选取了3种不同的色谱柱 XBridge™ C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)、Thermo Beta Basic-18(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Thermo BetaBasic-18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),结果发现 XBridge™ C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)柱色谱峰峰形扭曲变形,出峰时间较短;Thermo Beta Basic-18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)柱色谱峰峰展宽,出峰时间较长;而 Thermo Beta Basic-18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)柱峰形较好,峰尖锐,出峰时间适宜。

流动相的选择:文献中报道使用甲醇-水^[3]、甲醇-0.5% NaH₂PO₄^[12]、乙腈-醋酸缓冲盐^[13]等做为褪黑素的流动相,由于缓冲盐质谱损害较大,而本仪器使用乙腈效果并不好,因此选用甲醇-水作为流动相,为了减轻色谱脱尾现象,在水中加入0.1%甲酸。通过进行流动相不同配比,不同流速和梯度程序选取最佳条件获得良好的分离和峰形。结果以甲醇-0.1%甲酸水(60:40)为最佳条件。

色谱柱柱温的选择:为了优化色谱峰形,研究选取了不同柱温进行分析,结果发现在40℃时,色谱峰更加尖锐,拖尾现象减轻。综合上述不同条

件,发现以 Thermo Beta Basic-18(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%甲酸水(60:40),流速0.6 ml/min,柱温40℃时为最佳色谱条件,保留时间为4.26 min,色谱图见图4。

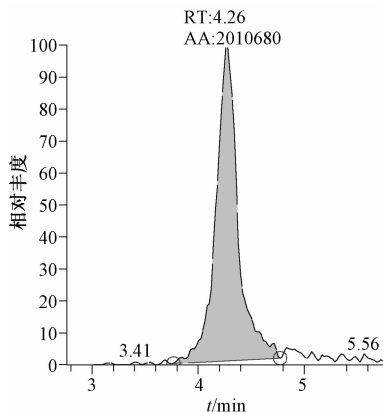


图4 褪黑素对照品(100 ng/ml)色谱图

Figure 4 Chromatogram of standard melatonin(100 ng/ml)

2.4 线性关系

用空白蝙蝠蛾被毛孢菌丝体基质提取液配制褪黑素系列标准溶液,其浓度范围为10~200 ng/ml。在1.2.2实验条件下依次进样,进样量10 μl,以被分析物的峰面积(y)为纵坐标,褪黑素浓度为横坐标(x),用加权(W = 1/C²)最小二乘法进行线性回归,计算得线性回归方程为:y = 10204.8x - 8575.85,线性相关系数为:r = 0.999 2。褪黑素标准曲线见图5。

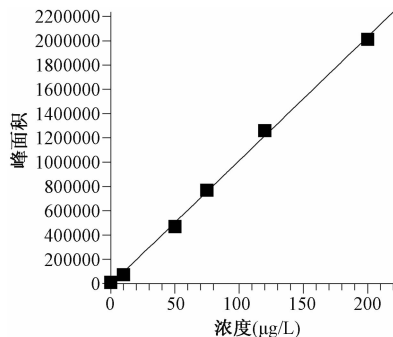


图5 褪黑素标准曲线

Figure 5 Melatonin standard curve

2.5 准确度和精密度实验

采用加样回收率实验验证方法测定准确度和精密度,准确称取蝙蝠蛾被毛孢菌丝体粉加入褪黑素标准品,添加水平分别是10、25、50 ng 按照1.2方法进行样品处理与测定,对各加标水平分别进行6次平行测定,其平均回收率分别为77.10%、81.49%、85.02%;RSD分别为2.98%、4.33%、1.66%。结果表明该方法回收率高,精密度好,稳定可靠。

2.6 方法的检出限、定量限

以信噪比为 3 时的空白基质提取液加标的含量为方法的检出限,以信噪比为 10 时的空白基质提取液加标的含量为方法的定量限。用于计算检出限和定量限的空白基质加标水平分别为 1 和 10 μg/kg,计算得到方法的定性检出限为 0.5 μg/kg,定量检出限为 2.0 μg/kg。

2.7 加标回收率结果

以已知褪黑素含量的蝙蝠蛾被毛孢菌丝体为基础,进行高、中、低三个浓度加标回收实验。采用加样回收率实验,取样品 5.000 g,称取 6 份,按照表 1 中所示加入褪黑素标准品,按照 1.2 方法进行样品处理与测定,计算回收率和相对标准偏差(RSD)。

表 1 加样回收率实验结果(n=6)

Table 1 Recovery of melatonin

样品褪黑素含量 (ng)	褪黑素标准品加入量 (ng)	日内		日间	
		平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
19.96	10	77.10	2.98	75.38	3.57
19.96	25	81.49	4.33	79.42	5.88
19.96	50	85.02	1.66	82.71	2.12

2.8 样品中褪黑素含量测定

选取 9 组不同培养条件下的蝙蝠蛾被毛孢菌丝体用 1.2 方法进行处理测定,结果发现有 5 组可以定量测定褪黑素,其含量范围为 2.16~19.96 μg/kg,另有 2 组可检出褪黑素但无法定量,有 2 组样品未检出褪黑素。

3 结论

本文方法可以用来快速检测蝙蝠蛾被毛孢菌丝体中褪黑素的含量,并且分析了复杂基质中褪黑

素定性方法,同时建立了测定蝙蝠蛾被毛孢菌丝体中褪黑素的高效液相色谱-串联质谱方法。

参考文献

[1] 刘建忠,朱艳君,周丽芳.褪黑素生理及药理作用研究进展[J].武汉科技大学学报,2004,27(2):198-201.

[2] 王英娟,郝建国,贾敬芬,等.RP-HPLC法测定转基因叶连翘植株中褪黑素[J].中草药,2009,10:1651-1653.

[3] 王金英,江川,李书柯,等.褪黑素测定方法及玉米、水稻种子中褪黑素含量的分析研究[J].中国农学通报,2009,25(17):20-24.

[4] 王永军,唐景玲,孙进,等.HPLC-MS测定褪黑素缓释片的家犬体内药动学和相对生物利用度[J].中国药理学杂志,2005,40(24):1887-1889.

[5] 张蕾萍,杜鸿雁,栾玉静,等.固相萃取-气相色谱法提取全血中的外源性褪黑素[J].中国法医学杂志,2010,2:84-86.

[6] 付良青,骆传环,舒融.气相色谱-质谱选择离子检测法测定失眠病人体内 Melatonin 的血药浓度[J].质谱学报,2002,23(1):17-20.

[7] 周福林,章竹君,罗丽荣.流动注射化学发光法测定褪黑素[J].分析试验室,2006,25(3):25-27.

[8] 许海燕,屠一锋.线性扫描伏安法测定胶囊中褪黑素的含量[J].淮北煤炭师范学院学报(自然科学版),2005,26(4):52-54.

[9] Murch S J, Simons C B. Melatonin in feverfew and other medicinal plants[J]. Lancet,1997,350:1598-1599.

[10] Chen Guofang, Huo Yishu, Tan Dunxian, et al. Melatonin in Chinese medicinal herbs[J]. Life Sciences,2003,73:19-26.

[11] Okazaki M, Ezura H. Profiling of melatonin in the model tomato (Solanum lycopersicum L.) cultivar Micro-Tom[J]. J. Pineal Res, 2009,46:338-343.

[12] 张相年,向军,赵树进.褪黑素原料和片剂的高效液相色谱分析[J].广东药学,2002,12(6):31-32.

[13] 袁成,于燕莉,张卫星,等.高效液相色谱法用于褪黑素香口胶的含量测定[J].中国生化药物杂志,2005,26(4):232-234.

· 请示批复 ·

关于绿色食品标签标识有关问题的复函

卫办监督函[2013]140号

中国绿色食品发展中心:

你中心《关于绿色食品标签标注问题的请示》(中绿科[2012]118号)收悉。经研究,现答复如下:

根据《预包装食品标签通则》(GB7718-2011)4.1.10规定,预包装食品(不包括进口预包装食品)应标示产品所执行的标准代号。标准代号是指预包装食品产品所执行的涉及产品质量、规格等内容的标准,可以是食品安全国家标准、食品安全地方标准、食品安全企业标准,或其他相关国家标准、行业标准、地方标准。按照《绿色食品标志管理办法》(农业部令2012年第6号)规定,企业在产品包装上使用绿色食品标志,即表明企业承诺该产品符合绿色食品标准。企业可以在包装上标示产品执行的绿色食品标准,也可以标示其生产中执行的其他标准。

专此函复。

卫生部办公厅 农业部办公厅
二〇一三年二月十六日