高效液相色谱-串联质谱法测定桑叶茶中1-脱氧野尻霉素的含量

王建山, 宋　莉, 王一欣, 张　乾, 赵俊楠, 李　涛*

(陕西省食品药品检验研究院, 西安　710065)

摘　要: 目的　建立高效液相色谱-串联质谱法检测桑叶茶中 1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)含量的分析方法。**方法**　样品经 70%(*V*/*V*)甲醇水超声提取, 用 Xbridge amide 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm)分离, 以含 0.1%(*V*/*V*)甲酸溶液和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 采用大气压化学电离(atmosphere pressure chemical ionization, APCI)和多离子检测模式(multiple reaction monitoring, MRM)进行检测, 外标法定量。**结果**　目标物在 0.01~0.2 mg/L 范围内线性相关系数大于 0.99; 1-脱氧野尻霉素的定量限为 5 mg/kg; 在 5~50 mg/kg 浓度范围内加标回收实验, 平均回收率为 94.2%~98.7%, 相对标准偏差为 3.2%~4.7%。**结论**　该方法具有分析速度快、操作简便等优点, 可用于桑叶茶中 1-脱氧野尻霉素的含量测定。

关键词: 桑叶茶; 1-脱氧野尻霉素; 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaf tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Jian-Shan, SONG Li, WANG Yi-Xin, ZHANG Qian, ZHAO Jun-Nan, LI Tao*

(*Shaanxi Institute for Food and Drug*, *Xi'an* 710065, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method for the determination of 1-deoxynojirimycin (1-DNJ) in mulberry leaf tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods**　Samples were extracted with 70% (*V*/*V*) methanol solution. The liquid was performed on Xbridge amide column (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) with the gradient elution of 0.1% (*V*/*V*) formic acid aqueous solution and acetonitrile solution. The sample was detected by atmosphere pressure chemical ionization (APCI) using multiple reactions monitoring mode (MRM), and quantified by external standard method. **Results**　Within the range of 0.01–0.2 mg/L, the correlation of linear was above 0.99. The limit of quantitative of the method was 5 mg/kg. The average recoveries were 94.2%–98.7% and the relative standard deviations were 3.2%–4.7% in the concentration range of 5–50 mg/kg. **Conclusion**　This method is simple and rapid, which is suitable for the determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaf tea.

KEY WORDS: mulberry leaf tea; 1-deoxynojirimycin; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 2019 年陕西省创新能力支撑计划项目(2019PT-22)

Fund: Supported by the Plan of Innovation Capability Support of Shaanxi Province in 2019 (2019PT-22)

***通信作者:** 李涛, 主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验、食品安全快速检测技术。E-mail: westyx@126.com

***Corresponding author:** LI Tao, Chief Pharmacist, Shaanxi Supervision & Inspection Institute for Food and Drug, No.21, Kejiwu Road, Gaoxin District, Xi'an 710065, China. E-mail: westyx@126.com

0 引 言

桑叶为桑科植物桑的叶片, 具有较高的食用、药用价值, 而在食品原料、药品领域, 通常选用的是桑叶的干燥叶。桑叶具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目的功效[1]。桑叶具有众多的营养价值, 国内外许多专家学者在桑叶与食品开发、桑叶与健康等方面已经进行大量的研究探索[2]。桑叶茶是利用桑树嫩叶, 参考茶叶工艺加工而成, 以冲泡为主要食用方式的茶叶制品[3]。桑叶茶是市面上最常见的以桑叶为主要原料的代用茶, 受到越来越多人的欢迎。现代药理学研究表明, 桑叶中的 1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)是桑叶中降血糖的主要活性成分之一[4]。1-DNJ 化学名称为 3,4,5-三羟基-2-羟甲基四氢吡啶, 属于强效 α-葡萄糖苷酶抑制剂, 具有降血糖、降血脂、抗衰老和抗病毒等作用[5−7]。

目前, 1-DNJ 的测定方法主要有紫外分光光度法[8]、柱前衍生高效液相色谱-荧光光谱法[9−10]、高效液相色谱法-紫外光谱法[11]和液质联用法[12]等。柱前衍生高效液相色谱-荧光光谱法是目前检测 1-DNJ 的主要方法[9], 但是由于 1-DNJ 的极性较大, 在反相模式下保留很弱, 分离效果不理想, 无法直接测定。所以对其进行衍生以改变其极性, 从而增强其在反相模式下的保留。但这种方式需要衍生化处理, 过程相对烦琐。采用强极性的固定相(如硅胶或衍生化硅胶), 结合高比例的有机相(如乙腈)或者低比例的水相组成的流动相实现对强极性化合物保留的目的, 在极性小分子的分离分析中体现出了独特的优势[13−14]。由于 1-DNJ 具有优良的生物活性, 受到越来越多人的关注, 而通常桑叶茶中 1-DNJ 含量较低, 因此需要建立一个快速灵敏检测桑叶茶中 1-DNJ 的方法。本研究采用色谱和质谱联用法, 建立桑叶茶中 1-DNJ 含量直接测定的方法, 以期便于对桑叶茶品质进行评价。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

QTRAP™ 5500 LC/MS/MS 系统(美国 SCIEX 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); LYNX4000 高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔有限公司); BS223S 型电子分析天平(德国塞多利斯公司); Synergy 型超纯水仪(美国密理博公司)。

1-DNJ 标准品(纯度 96.8%)(加拿大 TRC 公司)。

本研究所用的 10 批次桑叶茶购自陕西省西安市农贸市场; 甲醇和乙腈(色谱级, 赛默飞世尔科技有限公司); 甲酸(色谱级, 西格玛奥德里奇有限公司); 去离子水由超纯水仪制得, 为 GB/T 6682 规定的一级水。

1.2 标准溶液的配制

准确称取 1-DNJ 标准品适量, 用甲醇溶解并稀释成 100 mg/L 的标准储备液, 于–18 ℃避光保存, 备用。用甲醇溶液稀释成浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.10 和 0.20 μg/mL 的标准工作溶液。

1.3 样品前处理

称取 0.3 g(精确至 0.001 g)已粉碎样品(过四号筛)于 150 mL 容量瓶, 加入 100 mL 70%甲醇溶液, 充分摇匀后, 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz)提取 40 min, 待样液冷却至室温后用 70%甲醇溶液定容至刻度, 混匀, 过 0.22 μm 有机相微孔滤膜, 供测定。

1.4 仪器条件

1.4.1 液相色谱条件

沃特世 xbridge amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm), 流动相: 0.1% (*V*/*V*)甲酸(A)-乙腈(B), 流速: 0.4 mL/min, 进样体积: 2 μL, 柱温: 40 ℃。液相色谱梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 85% B; 1.0~3.0 min, 85%~70% B; 3.0~8.5 min, 70% B; 8.5~8.6 min, 70%~85% B; 8.6~15 min, 85% B。

1.4.2 质谱条件

离子源: 大气压力化学电离源(atmosphere pressure chemical ionization, APCI)正离子模式; 离子源接口电压: 5500 V; ESI 离子源参数: 气帘气: 30 psi; 源温度: 550 ℃; 雾化气: 55 psi。扫描模式: 多反应监测模式(multiple reactions monitoring, MRM)。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

分别比较了 ESI 源与 APCI 源下 1-DNJ 的响应强度及信噪比, 发现在 2 种离子源下化合物的响应相近, 但 ESI 源下 1-DNJ 的基线比 APCI 源高了 2 个数量级, ESI 源下存在较强的基质效应, 这是由于 APCI 为大气压化学电离源, 其离子化机制是样品先形成雾, 后电晕放电针对其放电, 在高压电弧中, 样品被电离, 后去溶剂化形成离子, 从而被检测。在此过程中, APCI 模式下参与离子化竞争的离子少于 ESI 模式, 因此 APCI 模式的基质效应小于 ESI 模式[15]。因此选择 APCI 源作为电离源, 取 100 μg/L 的 1-DNJ 标准溶液通过针泵直接注入质谱, 在正离子模式下对去簇电压、碰撞能量等质谱条件优化, 选取响应最强的 4 对离子对作为监测离子对, 选取丰度最强的子离子作为定量离子, 最终确定的质谱条件如表 1 所示, 其色谱图见图 1。

2.2 色谱条件优化

本研究分别比较了沃特世 Cortecs T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)和沃特世 Xbridge amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm)的分离效果, 2 种色谱柱上的保

留如图 2 所示, 在 WatersCortecs T3 色谱柱上 1-DNJ 的保留时间小于 1 min, 且峰拖尾, 无法满足定量要求; 在 Xbridge amide 色谱柱上 1-DNJ 保留强, 峰形对称。这是因为 1-DNJ 是一种多羟基天然糖醇结构的类似物, 极性强, 适合于亲水作用色谱。因此本研究选择在沃特世 xbridge amide 色谱柱进行分离。

分别以 0.1%甲酸-乙腈、0.1%甲酸-甲醇、0.05%氨水-乙腈、水-乙腈、5 mmoL/L 甲酸铵-乙腈为流动相, 考察不同色谱条件下 1-DNJ 的响应情况, 见图 3。从图 3 可看出在 0.1%甲酸-乙腈作为流动相条件下, 1-DNJ 的响应最佳, 因此本研究最终选择的流动相条件为 0.1%甲酸-乙腈。优化梯度洗脱条件, 最终确定的色谱条件如 1.4.1 所示, 在此液相条件下 1-DNJ 标准品和样品的多反应监测色谱图如图 4 所示。

2.3　线性范围与标准曲线

将配制的标准工作液按 1.4 的条件测定, 以进样质量浓度为 X 轴、定量离子的响应值为 Y 轴绘制标准工作曲线, 1-DNJ 的标准曲线方程为 Y=919.86933X–37.65339, 相关系数 r=0.9999。表明在 0.01~0.2 mg/L 范围内 1-DNJ 的标准曲线线性关系良好, 相关系数大于 0.99, 符合定量要求。

2.4　方法的灵敏度

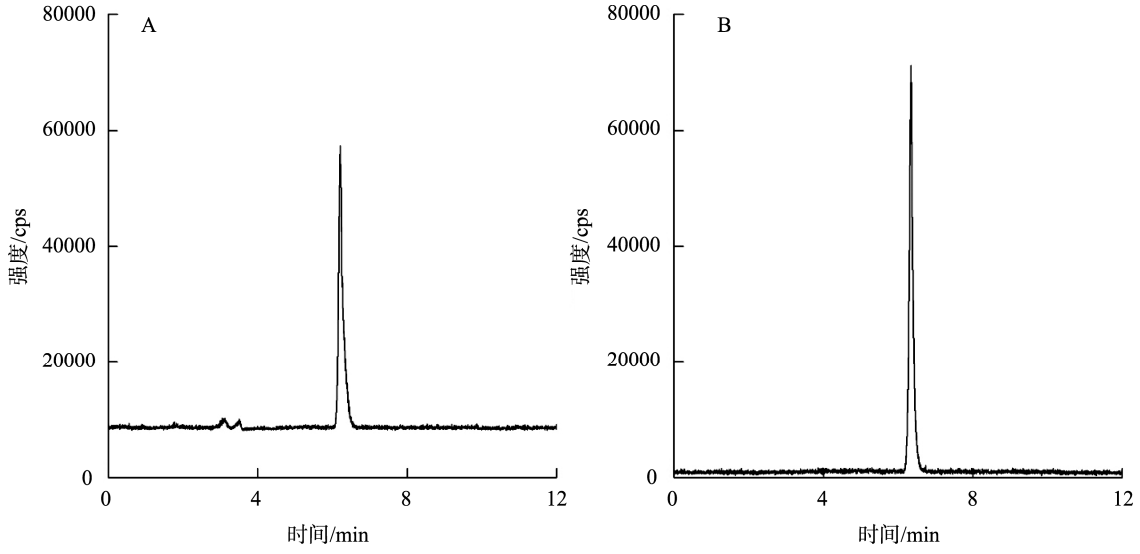
以所有离子对的信噪比均满足信噪比均大于 10 的最低添加浓度作为定量限(limit of quantitation, LOQ)。在最低添加浓度水平做加标回收实验, 在桑叶茶基质中 1-DNJ 的定量限为 5 mg/kg。

表 1　1-DNJ 保留时间及其质谱参数

Table 1　Retention time and MS parameters of 1-DNJ

组分名称	保留时间/min	离子对(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
1-脱氧野尻霉素	6.34	164.1/145.8*	80	15
		164.1/127.9*		20
		164.1/110.0*		20
		164.1/68.9*		24

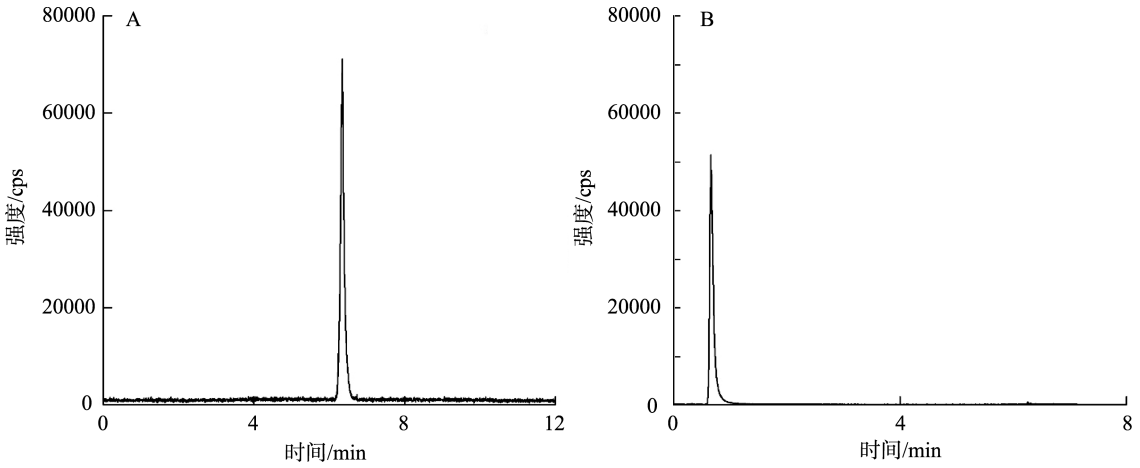
注: 标注*的碎片为定量离子。



注: A: APCI; B: ESI。

图 1　不同离子源下 1-DNJ 的色谱图

Fig.1　Chromatograms of 1-DNJ with different ion sources



注: A:xbridge amide; B: Cortecs T3

图 2 不同色谱柱下 1-DNJ 的色谱图

Fig.2 Chromatograms of 1-DNJ with different column

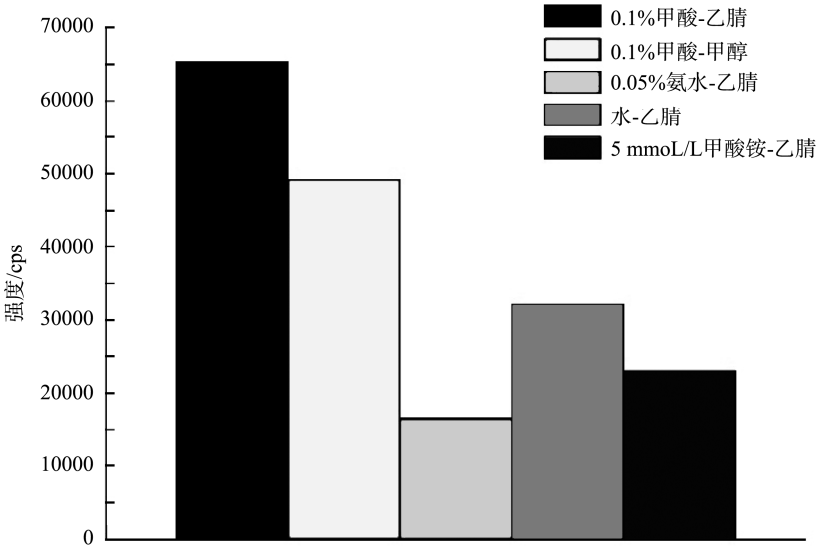
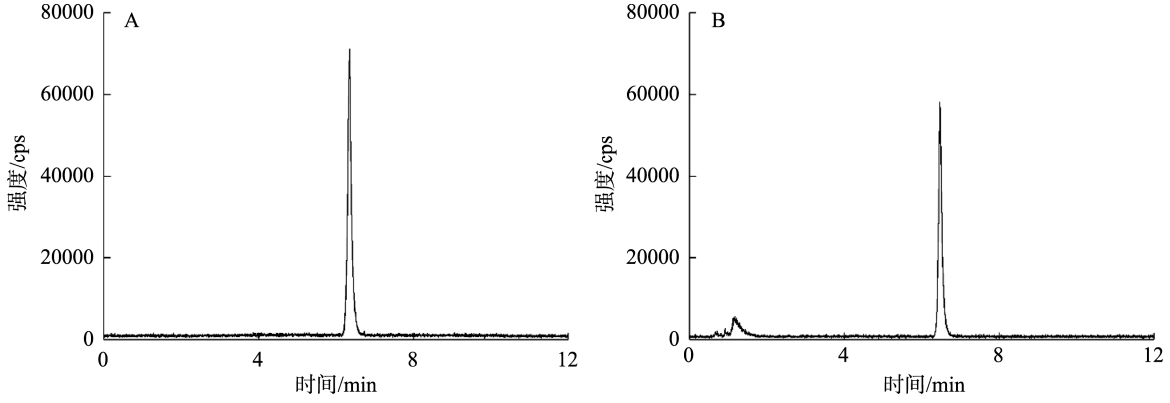


图 3 不同流动相条件下的响应值对比

Fig.3 Response contrast under different solutioncondition



注: A: 标准品; B: 样品。

图 4 1-DNJ 的色谱图

Fig.4 Chromatogram of 1-DNJ

2.5　回收率及精密度实验

采用标准加入法, 在桑叶茶中分别添加 5、10、50 mg/kg 3 个不同浓度做加标回收实验, 各个浓度进行 6 个样品平行实验, 按照 1.3 的方法进行测定, 计算结果见表 2。可知本方法在空白基质中平均回收率在 94.2%~98.7%之间, 精密度在 3.2%~4.7%之间, 符合含量测定的要求。

2.6　实际样品测定

用本方法对来自市场上的 10 批次的桑叶茶进行测定, 1-DNJ 的含量在 32~830 mg/kg 之间。从测定结果看出不同桑叶茶间的含量差异较大, 由于受地域与环境温度的影响, 不同地域与采收时间的桑叶中 1-DNJ 的含量差异大[16], 且受制茶工艺的影响。

3　结　论

本研究采用亲水相互作用色谱结合大气压化学电离源-串联质谱技术建立了桑叶茶中微量的 1-DNJ 含量的测定方法, 本方法操作简单、检测速度快、专属性强和灵敏度高, 可用于桑叶茶中 1-DNJ 的含量测定, 便于对桑叶茶产品品质的控制和评价。

表 2　回收率实验结果(n=6)
Table 2　Results of recovery test(*n*=6)

添加水平/(mg/kg)	回收率/%						平均回收率/%	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
5	98.3	96.2	95.7	87.9	97.6	89.5	94.2	4.7
10	95.8	97.2	90.9	90.9	99.8	97.6	95.4	3.9
50	101.5	92.8	98.7	98.7	99.0	101.3	98.7	3.2

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部) 2015 版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China (1th section) (2015th Edition) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.

[2] 俞燕芳, 黄金枝, 石旭平, 等. 我国桑叶食品开发研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1572–1578.
YU YF, HUANG JZ, SHI XP, *et al*. Research progress in food development of mulberry leaves in China [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(7): 1572–1578.

[3] 杨金宏, 陈正余, 梁嘉俊, 等. 冲泡条件对桑叶茶重要生物活性物质溶出的影响[J]. 山东农业科学, 2020, 52(9): 132–136.
YANG JH, CHEN ZX, LIANG JJ, *et al*. Effect of soaking conditions on dissolution of important bioactive substances in mulberry leaf tea [J]. Shandong Agric Sci, 2020, 52(9): 132–136.

[4] 孙莲, 殷超, 杜申道. 桑枝中 1–脱氧野尻霉素的定性定量分析[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(4): 489–494.
SUN L, YIN C, DU SD. Determination of 1–deoxynojirimycin in different parts of *Morus nigra* Linn. by UPLC–MS /MS [J]. Northwest Pharm J, 2020, 35(4): 489–494.

[5] 杨小蓉, 邢军, 江岩. 桑叶 DNJ 的分离纯化及其生物活性研究进展[J]. 食品工业, 2015, 36(9): 233–236.
YANG XR, XING J, JIANG Y. Advances on extraction, purification and physiological functions ofthe DNJ from the mulberry leaves [J]. Food Ind, 2015, 36(9): 233–236.

[6] 张孟丽, 束成杰, 张卫明. 1–脱氧野尻霉素对秀丽隐杆线虫的抗衰老作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(21): 280–286.
ZHANG ML, SHU CJ, ZHANG WM. Anti–aging effects of 1–deoxynojirimycin on caenorhabditis elegans [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(21): 280–286.

[7] 李思远, 宁俊丽, 丁晓雯, 等. 1–脱氧野尻霉素对肥胖小鼠甲状腺激素稳态的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(17): 161–168.
LI SY, NING JL, DING XW, *et al*. Effect of 1–deoxynojirimycin on thyroid hormone homeostasis in obese mice [J]. Food Sci, 2020, 41(17): 161–168.

[8] 龙玲, 杨艳, 朱乃硕. 应用比色法检测枯草芽孢杆菌变异菌株中 1–脱氧野尻霉素含量[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 187–192.
LONG L, YANG Y, ZHU NS. Colorimetric method in the determination of 1–deoxynojirimycin isolated from the mutant strain of bacillus subtilis [J]. Biotechnol Bull, 2016, 32(6): 187–192.

[9] 欧阳臻, 陈钧, 李永辉. 柱前衍生化高效液相色谱荧光检测法测定桑叶中的 1–脱氧野尻霉素[J]. 分析化学, 2005, (6): 817–820.
OUYANG Z, CHEN J, LI YH. Determ ination of 1–deoxynojirmiycin in *Morus alba* L. leaves byhigh performance liquid chromatography withpre–column derivatization [J]. Chin J Anal Chem, 2005, (6): 817–820.

[10] 刘琳琳, 蔡艳丽, 卞艳晶, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定炎宁糖浆中 1–脱氧野尻霉素含量[J]. 中国药业, 2016, 25(24): 75–77.
LIU LL, CAI YL, BIAN YJ, *et al*. Determinationof rutin, querdertin and 1–deoxynojirmiycin in mulberry lesves by RP–HP: C–UV [J]. China Pharm, 2016, 25(24): 75–77.

[11] 吴秋生, 王俊, 吴福安, 等. 用反相高效液相色谱–紫外检测法测定桑叶中芦丁、槲皮素和 1–脱氧野尻霉素的含量[J]. 蚕业科学, 2009, 35(1): 134–138.
WU QS, WANG J, WU FA, *et al*. Determination of rutin, quercertinand 1–deoxynojirimycin in mulberry leaves by RP–HPLC–UV [J]. Acta Sericol Sin, 2009, 35(1): 134–138.

[12] 尚磊, 欧阳臻, 赵明, 等. HPLC–MS–MS 分析桑叶总生物碱组成及含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 47–51.

SHANG L, OUYANG Z, ZHAO M, *et al*. HPLC–MS–MS analysis and determination ofalkaloids of mori folium [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2014, 20(2): 47–51.

[13] 徐露露, 陈路晓, 骆宜, 等. 亲水作用色谱在天然产物分离分析中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(9): 1516–1525.
XU LL, CHEN LX, LUO Y, *et al*. Application progress of hydrophilic interaction liquid chromatographyin the separation and analysis of natural products [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(9): 1516–1525.

[14] 李欣, 姜燕, 郝旺青. 亲水作用色谱在中药极性成分分析中的应用进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(8): 764–768.
LI X, JIANG Y, HAO WQ. Application of hydrophilic interaction chromatography in the analysis of polar components of Chinese medicine [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2020, 37(8): 764–768.

[15] 曹丽丽, 周鑫达, 张爱芝, 等. QuEChERS–超高效液相色谱–大气压化学电离–串联质谱法测定多种动物源性食品中的地塞米松残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 5080–5087.
CAO LL, ZHOU XD, ZHANG AZ, *et al*. Determination of dexamethasone residues in various animal derived foods by QuEChERS–ultra performance liquid chromatography– atmosphericpr essure chemical ionization–tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(15): 5080–5087.

[16] 李名洁, 王玉, 陈搏, 等. 不同产地及季节桑叶中 dnj 的含量测定[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(5): 123–127.
LI MJ, WANG Y, CHEN B, *et al*. Content of 1–deoxynojirimycin in mulberry leaf from different regions and different harvest time [J]. Food Ferment Technol, 2020, 56(5): 123–127.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

王建山, 硕士研究生, 主管药师, 主要研究方向为食品药品质量与安全。
E-mail: 273650552@qq.com

李 涛, 主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验、食品安全快速检测技术。
E-mail: westyx@126.com