

高效液相色谱法测定3种市售鸡蛋中褪黑素含量

董静妍¹, 邓乐¹, 刘鼎阔², 于晓雪^{1*}, 李留安^{1*}

(1. 农业农村部智慧养殖重点实验室(部省共建), 天津农学院 动物科学与动物医学学院 天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300392; 2. 鼎正新兴生物技术(天津)有限公司 天津市生物饲料添加剂企业重点实验室, 天津 300383)

摘要: 该试验建立高效液相色谱配紫外-可见光检测器检测鸡蛋中褪黑素含量的方法, 并对市售乌鸡蛋、柴鸡蛋及普通鸡蛋的蛋清、蛋黄中褪黑素含量进行测定。色谱条件: C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 0.05% 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)水溶液: 甲醇=40:60(体积比), 流速 0.6 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长 222 nm, 柱温 30 °C。结果表明: 褪黑素浓度在 0.1~10 μg/mL 时线性关系良好, 标准曲线方程为 $y=128.57x-3.1588$, 相关系数 $R^2=0.9999$ 。方法检测限为 0.019 6 μg/mL, 定量限为 0.065 2 μg/mL。蛋黄中褪黑素平均回收率为 97.59%~98.69%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.04%~0.12%; 蛋清中褪黑素平均回收率为 96.94%~99.28%, RSD 为 0.07%~0.49%。使用该方法对 3 种市售鸡蛋的蛋黄、蛋清分别进行检测, 结果显示, 乌鸡蛋、柴鸡蛋和普通鸡蛋蛋黄中的褪黑素含量分别为 39.50、39.70 ng/g 和 38.56 ng/g, 乌鸡蛋和柴鸡蛋蛋黄中褪黑素含量极显著高于普通鲜鸡蛋($P<0.01$), 乌鸡蛋、柴鸡蛋和普通鸡蛋的蛋清中褪黑素含量分别为 10.70、10.74 ng/g 和 10.28 ng/g, 乌鸡蛋和柴鸡蛋蛋清中褪黑素含量极显著高于普通鸡蛋($P<0.01$)。该方法回收率较高, 精密度高, 特异性强, 峰形良好, 适用于测定鸡蛋中的褪黑素含量。

关键词: 高效液相色谱法; 褪黑素; 含量检测; 鸡蛋品种; 蛋清; 蛋黄

Determination of Melatonin Content in Three Kinds of Commercially Available Eggs by High-Performance Liquid Chromatography

DONG Jingyan¹, DENG Le¹, LIU Dingkuo², YU Xiaoxue^{1*}, LI Liu'an^{1*}

(1. Key Laboratory of Smart Breeding of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (jointly built by the Ministry and Province), Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Biological Feed Additives Enterprise, Dingzheng Emerging Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300383, China)

Abstract: This experiment used high-performance liquid chromatography with a UV visible detector to establish a detection method for melatonin content in eggs. Determination was conducted on the melatonin content in the egg whites and yolks of a certain brand of commercially available dark eggs, native eggs, and ordinary fresh eggs. Chromatographic conditions: C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm); the mobile phase: 0.05% trifluoroacetic acid (TFA); aqueous solution: methanol = 40:60 (volume ratio), with the flow rate of 0.6 mL/min, the sample size of 10 μL, the detection wavelength of 222 nm, and the column temperature of 30 °C. The results showed that melatonin had a good linear relationship in the concentration range of 0.1–10 μg/mL. The standard curve equation was $y=128.57x-3.1588$, and the correlation coefficient was $R^2=0.9999$. The limits of detection and quantification were 0.019 6 μg/mL and 0.065 2 μg/mL, respectively. The average recovery rate of melatonin in egg yolk was 97.59%–98.69%, and the relative standard deviation (RSD) was 0.04%–0.12%.

基金项目: 天津市优秀农业科技特派员项目(23ZYCGSN00250); 天津市优秀企业科技特派员项目(22YDTPJC00990); 天津市教委科研计划项目(2021KJ108); 天津市青年科技人才(第三层次)项目(20230301)

作者简介: 董静妍(1997—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 功能性畜禽产品研发。

*通信作者: 于晓雪, 女, 副教授; 李留安, 男, 教授。

The average recovery rate of melatonin in egg white was 96.94%–99.28%, while the RSD was 0.07%–0.49%. This method was applied to detect the yolk and egg white of three kinds of commercially available eggs with the same brand. It was found that the melatonin content in fresh egg yolk of dark eggs, native eggs, and ordinary eggs was 39.50, 39.70 ng/g, and 38.56 ng/g, respectively. The melatonin content in the egg yolk of dark eggs and native eggs was significantly higher than that of ordinary fresh eggs ($P<0.01$). The melatonin content in fresh egg white of dark eggs, native eggs, and ordinary eggs was 10.70, 10.74 ng/g, and 10.28 ng/g, respectively. The content of melatonin in egg white of dark eggs and native eggs was significantly higher than that of ordinary fresh eggs ($P<0.01$). With a high recovery rate, high precision, strong specificity, and good peak shape, the method is suitable for determining melatonin content in eggs.

Key words: high-performance liquid chromatography (HPLC); melatonin; content detection; egg types; egg white; yolk

引文格式:

董静妍, 邓乐, 刘鼎阔, 等. 高效液相色谱法测定3种市售鸡蛋中褪黑素含量[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(23): 140-148.

DONG Jingyan, DENG Le, LIU Dingkuo, et al. Determination of Melatonin Content in Three Kinds of Commercially Available Eggs by High-Performance Liquid Chromatography[J]. Food Research and Development, 2024, 45(23): 140-148.

褪黑素(melatonin, MT), 又名 N-乙酰基-5-甲氧基色胺, 是由动物松果体产生并广泛存在于松果体外多种外周组织和体液中的一种胺类激素, 属于吲哚杂环类化合物, 具有良好的热稳定性。褪黑素参与多种生物调节活动^[1], 有促进睡眠、提高免疫、影响生殖、抗氧化等众多生物学功能^[2-3], 具有较高的应用价值。有研究表明, 褪黑素的分泌随着人们年龄的增长而下降, 可能与失眠、神经退行性疾病等疾病的出现有关^[4-5]。作为我国批准的保健品之一, 褪黑素不仅可以改善睡眠质量, 还有延缓衰老、调节免疫等作用, 更重要的是, 褪黑素的生物半衰期短, 不易在体内蓄积^[6], 毒性极低, 是较为安全的内源性物质。

褪黑素的分泌受光周期控制, 但胃肠部位的褪黑素却不受此影响, 而是受食物摄入的节律控制^[7]。有研究表明, 摄入富含褪黑素的食物可能会通过增加循环褪黑素而对健康产生有益影响^[8-10]。大多数食物中均含有褪黑素^[11], 在动物性食物中, 鸡蛋、鸡肉都存在微量褪黑素, 鸡蛋和鱼肉中的褪黑素浓度高于肉类^[12], 而鸡蛋的性价比较高, 被世界各地的人们广泛食用, 若能通过常规饮食满足人体对褪黑素的需求, 则可为睡眠障碍人群补充褪黑素提供便利。

目前国内外检测褪黑素的方法有高效液相色谱-荧光检测法^[13-15]、高效液相色谱-紫外检测法^[15-17]、高效液相色谱-质谱联用法^[18-19]、放射免疫测定法(radioimmunoassay, RIA)^[20]、酶联免疫法等^[21-23]。有关检测蛋中褪黑素含量的方法则大多采用酶联免疫法, 该方法对前处理的要求相对较低、检测速度快, 但精确度较差。高效液相色谱法具有灵敏度高、准确度高, 可较快

检测大批量样本的优点。本研究采用高效液相色谱法对市售鸡蛋中的褪黑素含量进行检测, 为鸡蛋中褪黑素含量的检测提供理论支撑, 同时为人们选购不同品种的鸡蛋提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乌鸡蛋、柴鸡蛋、普通鸡蛋各 30 枚: 市售; 三氟乙酸(色谱纯): 上海麦克林生化科技股份有限公司; 褪黑素标准品(纯度 $\geq 99.0\%$): 北京索莱宝科技有限公司; 甲醇(色谱纯): 德国默克公司; 正己烷(分析纯): 天津市汇杭化工科技有限公司; 纯净水: 娃哈哈集团有限公司; 乙酸乙酯(分析纯): 天津市风船化学试剂科技有限公司; 亲水亲油平衡(hydrophile-lipophile balance, HLB)固相萃取柱(200 mg/6 mL): 深圳逗点生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪配紫外-可见光检测器(1260): 美国安捷伦科技有限公司; 分析天平(FB223): 上海舜宁恒平科学仪器有限公司; 真空冷冻干燥机(Cool-safe 100-9pro): 丹麦 Labogene 公司; UVF 超声波清洗机(XM-600UVF): 小美超声仪器(昆山)有限公司; 多用途涡旋混合仪(VORTEX-6): 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 旋转蒸发器(IKA HB10): 上海巴玖有限公司; 固相萃取仪(JL-SPE-24D): 上海靳澜仪器制造有限公司; 低速离心机(H1850R): 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 氮吹仪(NEVP-111): 美国 Organomation 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制

标准储备液:精确称取 10 mg 褪黑素标准品,用甲醇溶解定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,4℃避光封闭保存。

标准工作液:准确吸取 0.5 mL 标准储备液于 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成浓度为 10 µg/mL 的标准工作液。分别准确吸取 6、3、1 mL 的 10 µg/mL 标准储备液于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度,分别配制成浓度为 6、3、1 µg/mL 的标准工作液。将 1 µg/mL 的标准工作液进行梯度稀释,分别配制成浓度为 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 µg/mL 的标准工作液,以上溶液均现用现配。

1.3.2 样品前处理方法

取 30 颗鸡蛋样品,分离蛋清蛋黄,分别称重混匀,倒入一次性培养皿中,用保鲜膜密封,-20℃预冻 24 h,冻干 30 h,将冻干后的蛋清蛋黄分别称重,磨成细粉混匀备用。

1.3.2.1 蛋黄样品前处理

称取 50 g 蛋黄粉平均置于 5 个 100 mL 离心管中,每管加入 25 mL 乙酸乙酯,室温超声 20 min,涡旋 30 s,5 000 r/min 离心 20 min,取上层清液。重复提取 1 次,合并两次提取液,移入蒸馏烧瓶,40℃下旋蒸至瓶中液面不再下降。取 50 mL 5% 甲醇水润洗蒸馏烧瓶,将溶液平均移入 5 个 50 mL 离心管,每管加 5 mL 正己烷,涡旋 20 s,5 000 r/min 离心 20 min,弃上层正己烷,收集下层溶液,合并备用。

依次用甲醇 10 mL、纯水 10 mL 活化 HLB 固相萃取小柱,取备用液过柱,控制流速不要过快,用 5 mL 纯水淋洗,5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液备用。

将洗脱液置于 40℃水浴条件下氮气吹干,1 mL 甲醇溶解残余物,经 0.22 µm 滤膜过滤,供高效液相色谱仪测定。

1.3.2.2 蛋清样品前处理

称取 50 g 蛋清粉平均置于 5 个 100 mL 离心管中,每管加入 25 mL 乙酸乙酯,室温超声 20 min,涡旋 30 s,5 000 r/min 离心 20 min,取上层清液。重复提取 1 次,合并两次提取液,移入蒸馏烧瓶,40℃下旋转蒸发至干。取 10 mL 5% 甲醇润洗蒸馏烧瓶,所得溶液备用。

依次用甲醇 10 mL、纯水 10 mL 活化 HLB 固相萃取小柱,取备用液过柱,控制流速不要过快,用 5 mL 纯水淋洗,5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液备用。

将洗脱液置于 40℃水浴条件下氮气吹干,1 mL 甲醇溶解残余物,经 0.22 µm 滤膜过滤,供高效液相色谱仪测定。

1.3.3 色谱条件的优化

色谱柱:Agilent AQ-C18(4.6 mm×250 mm,5 µm);

流动相:0.05% 三氟乙酸水溶液:甲醇=40:60(体积比),流速 0.6 mL/min,检测波长 222 nm,柱温 30℃,进样量 10 µL。

1.3.3.1 流动相的优化

取同一浓度的褪黑素标准溶液为样品,选择甲醇为有机相,其他色谱条件相同,比较酸的种类(0.1% 甲酸、0.1% 冰乙酸、0.1% 三氟乙酸、纯水)、不同三氟乙酸浓度(0.05%、0.1%、0.5%)、不同流动相体积比(25:75、30:70、35:65、40:60)、不同流速(0.7、0.6、0.55、0.5 mL/min),对目标峰峰型及保留时间的影响。

1.3.3.2 不同柱温对褪黑素出峰的影响

取同一浓度的褪黑素标准溶液为样品,调节柱温分别为 20、25、30、35℃时进样,比较不同柱温对褪黑素色谱峰峰面积及保留时间的影响。

1.3.3.3 不同检测波长对褪黑素出峰的影响

取同一浓度的褪黑素标准溶液为样品,储存其在 200~400 nm 下的光谱信息,再调节检测波长为 222、245、265、278 nm 进样,比较不同检测波长对褪黑素色谱峰峰面积的影响。

1.3.4 标准曲线的建立

按照 1.3.1 中标准工作液的配制方法,共制备 10、6、3、1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 µg/mL 9 个浓度梯度的褪黑素标准工作液。参照 1.3.3 中高效液相色谱条件进行测定分析,以标准溶液浓度为横坐标,标准品峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.3.5 方法学验证

按照 1.3.1 配制标准溶液,按照 1.3.2 处理鸡蛋样品,参照 1.3.3 中高效液相色谱条件进行测定分析。

精密性:配制 1 µg/mL 的褪黑素标准工作液,重复进样 6 次,记录峰面积,测定精密性。

特异性:取空白溶液、褪黑素标准品溶液、蛋黄溶液、蛋清溶液,分别测定并记录色谱图,考察本试验方法测定蛋清、蛋黄样品中褪黑素与其他物质的分离情况,确定特异性。

稳定性:取处理好的蛋黄溶液重复进样 7 次,每次间隔 2 h,记录峰面积,确定稳定性。

回收率:将处理好的蛋清蛋黄样品各 4 份,添加 0、0.2、0.4、0.6 µg/mL 的褪黑素标准品溶液,涡旋 30 s 使其充分混合后经高效液相色谱检测分析,各样本重复测定 3 次,对照标准曲线计算方法回收率。

1.3.6 3 种市售鸡蛋中褪黑素含量的测定

按照 1.3.2 方法对普通鸡蛋、乌鸡蛋和柴鸡蛋进行处理,按 1.3.3 中高效液相色谱条件进行测定分析,样品中的褪黑素含量根据标准曲线方程进行计算。

1.4 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 26 软件对试验数据进行显著性分析, $P<0.01$ 表示组间差异极显著, $P<0.05$ 表

示组间差异显著, $P>0.05$ 表示组间差异不显著, 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差进行表示。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 酸的种类对褪黑素色谱峰的影响

酸的种类对褪黑素色谱峰的影响如表 1 所示。

表 1 酸的种类对褪黑素色谱峰的影响

Table 1 Effect of acid types on melatonin chromatographic peak

酸的种类	保留时间/min	峰高/mAU	峰宽/min	峰面积/(mAU·s)	对称因子
纯水	8.846	7.60	0.254 8	125.50	0.803
0.1% 甲酸	8.847	7.55	0.246 7	123.20	0.830
0.1% 冰乙酸	8.855	7.63	0.248 9	124.45	0.850
0.1% 三氟乙酸	8.863	8.00	0.244 4	125.80	0.898

由表 1 可知, 水相中是否加酸以及加酸的种类对褪黑素色谱峰的保留时间几乎无影响。在流动相中加酸可修饰峰形, 其中, 加入三氟乙酸的峰形最好, 且峰面积比加入甲酸、冰乙酸的峰面积略大, 故本试验选用三氟乙酸水溶液作为流动相。

2.1.2 三氟乙酸浓度对褪黑素色谱峰的影响

三氟乙酸浓度对褪黑素色谱峰的影响如表 2 所示。

表 2 三氟乙酸浓度对褪黑素色谱峰的影响

Table 2 Effect of trifluoroacetic acid concentration on melatonin chromatographic peak

浓度/%	峰高/mAU	峰宽/min	峰面积/(mAU·s)	对称因子	pH 值
0.05	8.6	0.228 0	128.8	0.897	3
0.10	8.0	0.244 4	125.8	0.898	2
0.50	8.5	0.233 2	127.0	0.874	1

由表 2 可知, 三氟乙酸水溶液浓度为 0.05% 的对称因子与 0.1% 时相近, 且都大于 0.5% 的对称因子, 三氟乙酸水溶液浓度为 0.05% 的峰高与 0.5% 相近, 且都大于 0.1% 的峰高。浓度为 0.05% 时褪黑素标准品的峰面积最大。三氟乙酸酸性较强, 长期使用 pH 值 ≤ 2 的流动相会对色谱柱柱效造成不可逆转的损伤, 故而选取浓度为 0.05% 的三氟乙酸水溶液作为本试验的流动相。

2.1.3 不同流动相比比例、流速对褪黑素出峰的影响

不同流动相比比例、流速对褪黑素出峰的影响如表 3 所示。

由表 3 可知, 有机相比比例越高, 流速越快, 褪黑素出峰时间越早, 但当流动相比比例一定时, 流速越慢, 目标峰峰宽越大, 甚至会出现平头峰的现象。综合考虑

表 3 不同流动相比比例、流速对褪黑素出峰的影响

Table 3 Effect of different mobile phase ratios and flow rates on melatonin output peak

0.05%TFA:甲醇 (体积比)	流速/(mL/min)	保留时间/min	峰面积/ (mAU·s)
25:75	0.70	5.422	38 480.9
30:70	0.70	5.938	41 124.2
35:65	0.70	6.726	43 902.4
35:65	0.60	7.799	50 613.3
40:60	0.60	9.117	54 512.2
40:60	0.55	9.975	59 108.9
40:60	0.50	11.060	65 365.3

流动相比比例与流速对褪黑素出峰的影响, 本试验选用 0.05% TFA: 甲醇=40:60(体积比), 流速为 0.6 mL/min。

2.1.4 不同柱温对褪黑素出峰的影响

不同柱温对褪黑素出峰的影响如表 4 所示。

表 4 不同柱温对褪黑素出峰的影响

Table 4 Effect of different column temperatures on melatonin output peak

柱温/℃	保留时间/min	峰面积/(mAU·s)
20	9.246	249.3
25	9.131	253.1
30	8.839	255.3
35	8.714	252.6

由表 4 可知, 柱温为 30 ℃时, 峰面积最大, 故本试验选用柱温为 30 ℃。

2.1.5 不同紫外检测波长对褪黑素出峰的影响

不同紫外检测波长对褪黑素出峰时间及峰面积的影响见表 5。不同样品的光谱图见图 1。

表 5 不同检测波长对褪黑素出峰的影响

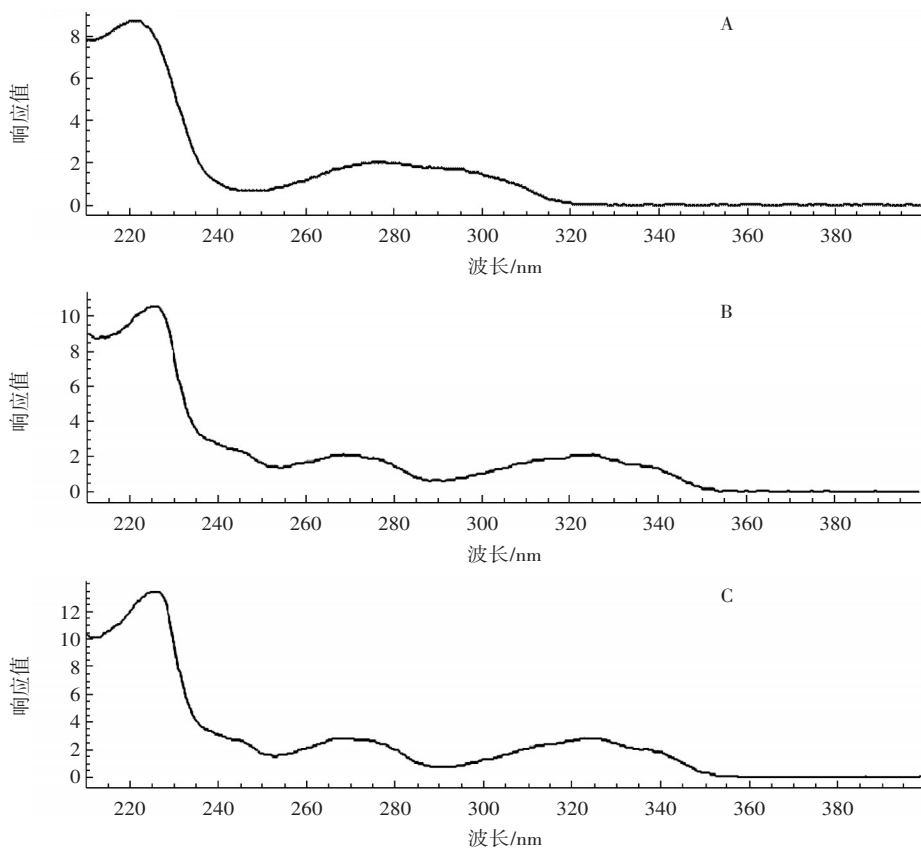
Table 5 Effect of different detection wavelengths on melatonin output peak

检测波长/nm	保留时间/min	峰面积/(mAU·s)
222	8.828	143.5
265	8.829	24.4
278	8.831	31.3

由表 5 可知, 褪黑素在检测波长为 222 nm 时的紫外吸收峰最大。由图 1 可知, 褪黑素在 222 nm 和 278 nm 处均有较大吸收峰值, 故选用 222 nm 作为本试验的检测波长。通过比对褪黑素标准溶液和蛋黄、蛋清样品的图谱, 样品在 8.8 min 处色谱峰的吸光度波形与标准品相似, 故而判断其为同一物质。

2.2 标准曲线的建立

褪黑素标准曲线如图 2 所示。



A. 褪黑素标准品溶液;B. 蛋黄溶液;C. 蛋清溶液。

图1 褪黑素光谱图

Fig.1 Melatonin spectrum

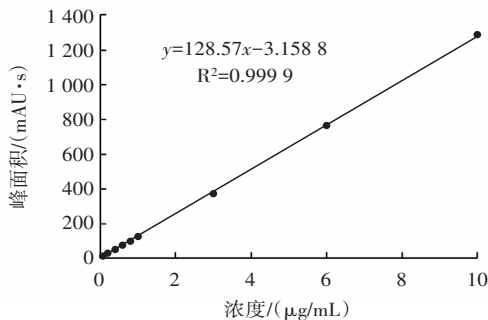


图2 褪黑素标准曲线

Fig.2 Melatonin standard curve

由图2可知,褪黑素浓度在0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 时线性关系良好,标准曲线方程为 $y=128.57x-3.1588$,相关系数 $R^2=0.9999$ 。

2.3 精密度试验结果

精密度试验结果如表6所示。

由表6可知,同一样品连续进样6次时,所测得峰面积范围为127.5~128.8(平均值为128.05),相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值为0.38%,方法精密度较高。

2.4 特异性试验

特异性试验结果如图3所示。

表6 精密度试验结果

Table 6 Precision test results

编号	峰面积/ (mAU·s)	平均值/ (mAU·s)	RSD 值/%
1	127.6	128.05	0.38
2	128.8		
3	128.1		
4	127.9		
5	127.5		
6	128.4		

由图3可知,溶剂甲醇在褪黑素出峰位置无干扰(图3A),褪黑素标准品的保留时间约为8.854 min(图3B),用此方法测定鸡蛋蛋黄、蛋清中的褪黑素含量时色谱峰分离情况良好、峰形良好(图3C、图3D)。

2.5 稳定性试验

稳定性试验结果如表7所示。

由表7可知,以此方法处理检测的样品放置12 h内,褪黑素峰面积平均值为72.94,其RSD值为1.51%,稳定性良好。

2.6 加标回收率试验

蛋黄样品和蛋清样品中加标回收率见表8、表9。

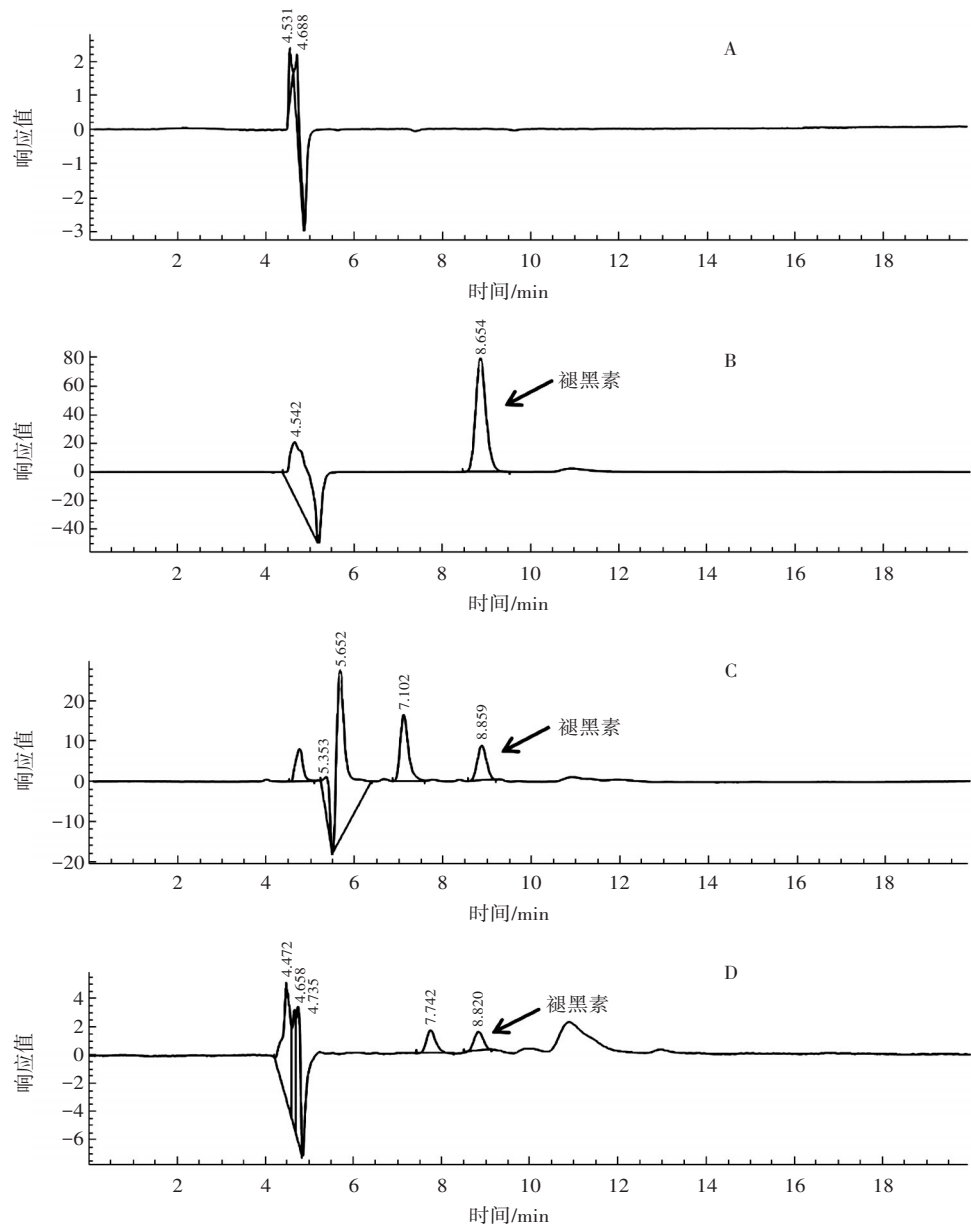


图 3 特异性试验结果

Fig.3 Specific test results

表 7 稳定性试验结果
Table 7 Stability test results

检测时间/h	峰面积/ (mAU·s)	平均值/ (mAU·s)	RSD 值/%
0	73.3	72.94	1.51
2	74.2		
4	72.9		
6	70.4		
8	73.3		
10	73.3		
12	73.1		

表 8 蛋黄样品加标回收率
Table 8 Recovery rate of yolk samples added standard

序号	样品值/ (μg/mL)	加标量/ (μg/mL)	测定值/ (μg/mL)	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD 值/%
1	3.357	0.2	3.510	98.7	98.69	0.04
2	3.357	0.2	3.512	98.7		
3	3.357	0.2	3.509	98.6		
4	3.357	0.4	3.681	98.0	97.93	0.05
5	3.357	0.4	3.679	97.9		
6	3.357	0.4	3.678	97.9		
7	3.357	0.6	3.865	97.7	97.59	0.12
8	3.357	0.6	3.856	97.5		
9	3.357	0.6	3.864	97.7		

表9 蛋清样品加标回收率

Table 9 Recovery rate of egg white samples added standard

序号	样品值/ ($\mu\text{g/mL}$)	加标量/ ($\mu\text{g/mL}$)	测定值/ ($\mu\text{g/mL}$)	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD 值/%
1	3.405	0.2	3.590	99.6	99.28	0.49
2	3.405	0.2	3.587	99.5		
3	3.405	0.2	3.559	98.7		
4	3.405	0.4	3.756	98.7	98.64	0.07
5	3.405	0.4	3.752	98.6		
6	3.405	0.4	3.750	98.6		
7	3.405	0.6	3.888	97.1	96.94	0.19
8	3.405	0.6	3.874	96.7		
9	3.405	0.6	3.885	97.0		

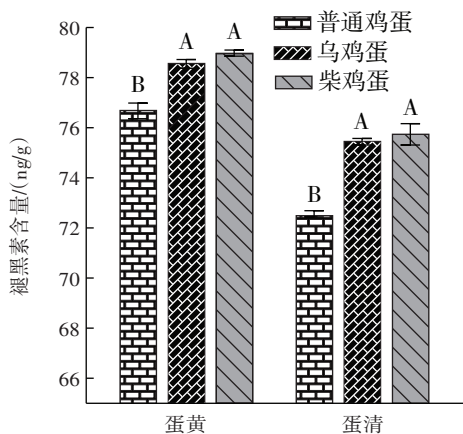
由表8可知,蛋黄平均回收率为97.59%~98.69%,RSD值为0.04%~0.12%;由表9可知,蛋清平均回收率为96.94%~99.28%,RSD值为0.07%~0.49%。

2.7 检测限与定量限

本试验采用信噪比法进行测定,得出方法的最低检测限为0.0196 $\mu\text{g/mL}$,定量限为0.0652 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.8 3种市售鸡蛋中褪黑素含量结果分析

3种市售鸡蛋中的褪黑素含量结果如图4所示。



不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

图4 3种市售鸡蛋中的褪黑素含量

Fig.4 Melatonin content in three commercially available eggs

由图4可知,普通鸡蛋的蛋黄中褪黑素含量极显著低于乌鸡蛋和柴鸡蛋($P < 0.01$),乌鸡蛋的蛋黄中褪黑素含量略低于柴鸡蛋,但差异不显著($P > 0.05$)。普通鸡蛋的蛋清中褪黑素含量极显著低于乌鸡蛋和柴鸡蛋($P < 0.01$),乌鸡蛋的蛋清中褪黑素含量略低于柴鸡蛋,但差异不显著($P > 0.05$)。乌鸡蛋、柴鸡蛋和普通鸡蛋的蛋黄中的褪黑素含量分别为78.64、79.04 ng/g和76.77 ng/g,乌鸡蛋、柴鸡蛋和普通鸡蛋的蛋清中的褪黑素含量分别为75.53、75.82 ng/g和72.57 ng/g。

3 讨论

3.1 HPLC-UV 检测鸡蛋中褪黑素的色谱条件优化

Talebianpoor等^[16]以甲醇:0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(30:70,体积比)为流动相,流速为1 mL/min,测定人血浆中的褪黑素;李珍妮等^[17]以甲醇:0.5 mol/L磷酸氢二钠(45:55,体积比)为流动相,流速1 mL/min,测定保健品中的褪黑素。以上方法重现性好,回收率高,提取时间短,但流速较大,易造成柱压不稳、系统漏液等情况,使用盐溶液做流动相容易使液相系统的阀件中析出结晶,造成色谱柱、单向阀等的损坏,严重影响机器的使用寿命。赵建芬等^[24]以无水甲醇:水(50:50,体积比),流速1 mL/min,柱温室温,测定芦荟、枸杞叶和桑叶中的褪黑素,该方法检测速度快,精密度高、稳定性好和准确度高,但褪黑素的保留时间过于靠前,检测成分复杂的生物样品时会出现目标峰与杂峰分离不完全的情况。GB/T 5009.170—2003《保健食品中褪黑素含量的测定》^[15]以甲醇:水:三氟乙酸(45:55:0.05,体积比)为流动相,流速0.8 mL/min,柱温室温,对胶囊或片剂包装的保健食品中的褪黑素进行测定,目标物褪黑素出峰时间早,峰形良好,与杂峰分离完全。本试验根据实验室条件对柱温、流动相比比例和流速进行优化,确定了以0.05%三氟乙酸水溶液:甲醇=40:60(体积比)为流动相,流速0.6 mL/min,柱温30℃的色谱条件。以此方法测定市售鸡蛋中的褪黑素含量,保留时间较早,峰形良好、重复性高、精密度高。

3.2 不同品种鸡蛋的营养物质含量区别

不同品种的鸡蛋中营养物质的种类与含量都不尽相同。黄涛等^[25]研究表明,高原鸡蛋中各种必需元素种类齐全,硒含量相对较高。董传豪等^[26]研究证明大恒鸡和科宝鸡蛋蛋黄中的铜含量显著高于沪宁鸡;沪宁鸡和大恒鸡蛋中的钙、锌和磷含量显著高于科宝鸡;大恒鸡蛋中钙、锌和锰含量显著高于沪宁鸡和科宝鸡蛋。吴少锋^[27]研究发现,与白、粉、褐壳鸡蛋相比,绿壳鸡蛋中硒、碘、锌、维生素E和氨基酸含量更高,胆固醇含量更低,蛋黄颜色等级更高。姜峻玥等^[28]研究表明松针绿壳鸡蛋的总氨基酸、钙、铁和锌含量高于市售其它品种的鸡蛋。

功能性鸡蛋是指采用外源性营养调控法,通过改变营养物质在饲料中的配比,促进营养物质向蛋中的沉积所获得的,食用后有益于人体健康的动物性产品。多年来关于功能性鸡蛋的开发已取得了不少进展,包括低胆固醇蛋^[29]、 ω -3不饱和脂肪酸蛋^[30-31]、高微量元素蛋^[32]、高维生素蛋^[33-35]等。功能性鸡蛋深受世界各国消费者的喜爱,具有很高的经济价值。而褪黑素生物学功能众多^[2],参与多种疾病防治^[36-37],开发富褪黑素功能性鸡蛋具有良好的市场前景。

4 结论

本试验优化建立一种测定鸡蛋中褪黑素含量的高效液相色谱法,其色谱条件为流动相:0.05% 三氟乙酸水溶液:甲醇=40:60(体积比),流速 0.6 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 222 nm,进样量 10 μ L。该方法回收率较高,精确度高,特异性强,适用于测定鸡蛋中的褪黑素含量。使用上述方法对市售不同品种鸡蛋中的褪黑素含量进行检测分析,结果显示乌鸡蛋、柴鸡蛋中的褪黑素含量极显著高于普通鸡蛋,乌鸡蛋中的褪黑素含量与柴鸡蛋差别不大;蛋黄中的褪黑素含量要远高于蛋清,从褪黑素含量的角度考虑,乌鸡蛋和柴鸡蛋的营养价值要高于普通鸡蛋。

参考文献:

- [1] 杨王浩,赵淑琴,闫美淋,等.松果体外褪黑素研究进展[J].动物医学进展,2022,43(4):74-81.
YANG Wanghao, ZHAO Shuqin, YAN Meilin, et al. Progress of extracpineal melatonin[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(4): 74-81.
- [2] 杨永杰,杨琳,朱勇文,等.褪黑激素的作用机制及生理功能[J].饲料工业,2020,41(16):53-57.
YANG Yongjie, YANG Lin, ZHU Yongwen, et al. Mechanism and physiological function of melatonin[J]. Feed Industry, 2020, 41(16): 53-57.
- [3] 占今舜,张彬.浅谈褪黑素在动物生产中的应用[J].饲料博览,2011(7):41-43.
ZHAN Jinshun, ZHANG Bin. Application of melatonin in animal production[J]. Feed Review, 2011(7): 41-43.
- [4] JIA X X, SONG Y N, LI Z Q, et al. Melatonin regulates the circadian rhythm to ameliorate postoperative sleep disorder and neurobehavioral abnormalities in aged mice[J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2024, 30(3): e14436.
- [5] PANDI-PERUMAL S R, BAHAMMAM A S, BROWN G M, et al. Melatonin antioxidative defense: Therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes[J]. Neurotoxicity Research, 2013, 23(3): 267-300.
- [6] YELESWARAM K, MCLAUGHLIN L G, KNIPE J O, et al. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in pre-clinical animal models and clinical implications[J]. Journal of Pineal Research, 1997, 22(1): 45-51.
- [7] BUBENIK G A. Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2002, 47(10): 2336-2348.
- [8] SAE-TEAW M, JOHNS J, JOHNS N P, et al. Serum melatonin levels and antioxidant capacities after consumption of pineapple, orange, or banana by healthy male volunteers[J]. Journal of Pineal Research, 2013, 55(1): 58-64.
- [9] GONZÁLEZ-FLORES D, GAMERO E, GARRIDO M, et al. Urinary 6-sulfatoxymelatonin and total antioxidant capacity increase after the intake of a grape juice cv. Tempranillo stabilized with HHP[J]. Food & Function, 2012, 3(1): 34-39.
- [10] GONZALEZ-FLORES D, VELARDO B, GARRIDO M, et al. Ingestion of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl. cv. Crimson Globe) increases the urinary 6-sulfatoxymelatonin and total antioxidant capacity levels in young, middle-aged and elderly humans: Nutritional and functional characterization of their content[J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2011, 50(4): 229-236.
- [11] MENG X, LI Y, LI S, et al. Dietary sources and bioactivities of melatonin[J]. Nutrients, 2017, 9(4): 367.
- [12] TAN D X, ZANGHI B M, MANCHESTER L C, et al. Melatonin identified in meats and other food stuffs: Potentially nutritional impact[J]. Journal of Pineal Research, 2014, 57(2): 213-218.
- [13] 杨卫军,李曼,曹秀梅,等.高效液相色谱法测定貉子肉中褪黑素残留量的研究[J].现代畜牧兽医,2016(5):1-4.
YANG Weijun, LI Man, CAO Xiumei, et al. Study on determination of the residual quantity of melatonin in *Nyctereutes procyonoides* tissues using high performance liquid chromatography[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016 (5): 1-4.
- [14] VIEGAS O, ESTEVES C, ROCHA J, et al. Simultaneous determination of melatonin and trans-resveratrol in wine by dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-FLD[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128091.
- [15] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.保健食品中褪黑素含量的测定:GB/T 5009.170—2003[S].北京:中国标准出版社,2004.
Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of melatonin in health foods: GB/T 5009.170—2003[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004.
- [16] TALEBIANPOOR M S, KHODADOUST S, ROZBEHI A, et al. Application of optimized dispersive liquid-liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC-UV in plasma samples[J]. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2014, 960: 1-7.
- [17] 李珍妮,曾文祥.高效液相色谱法测定保健食品中褪黑素含量不确定度的评估[J].现代食品,2020(20):173-176.
LI Zhenni, ZENG Wenxiang. Evaluation of uncertainty in the determination of melatonin in health food by HPLC[J]. Modern Food, 2020(20): 173-176.
- [18] 刘少丹,杨士云,闵涛,等.HPLC-MS/MS同时检测人血液中佐匹克隆、唑吡坦、扎来普隆和褪黑素[J].分析试验室,2017,36(8):930-933.
LIU Shaodan, YANG Shiyun, MIN Tao, et al. Simultaneous determination of zopiclone, zolpidem, zaleplon and melatonin in blood by HPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2017, 36(8): 930-933.
- [19] ALBU C, RADU L E, RADU G L. Assessment of melatonin and its precursors content by a HPLC-MS/MS method from different Romanian wines[J]. ACS Omega, 2020, 5(42): 27254-27260.
- [20] 许建海,武子元,杨春合,等.商品奶中褪黑素的含量分析[J].中国畜牧杂志,2015,51(22):56-58,75.
XU Jianhai, WU Ziyuan, YANG Chunhe, et al. Analysis of melatonin concentration in milk products[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2015, 51(22): 56-58, 75.
- [21] 张苗蕊.褪黑素对蛋鸡产蛋性能的影响研究[D].郑州:河南农业大学,2019.
ZHANG Miaorui. Effect of melatonin on laying performance of laying hens[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2019.
- [22] 郝二英,黄晨轩,孙浩政,等.外源褪黑素对产蛋后期蛋鸡生产性能、血清指标及体内褪黑素含量的影响[J].动物营养学报,2020,32(5):2126-2137.
HAO Erying, HUANG Chenxuan, SUN Haozheng, et al. Effects of exogenous melatonin on performance, serum indexes and melatonin content of laying hens during later laying period[J]. Chinese Journal

- of Animal Nutrition, 2020, 32(5): 2126-2137.
- [23] 刘书印. 白罗曼和皖西白鹅血清褪黑素含量的研究[J]. 吉林畜牧兽医, 2020, 41(1): 94-95.
- LIU Shuyin. Study on serum melatonin content of bailuoman and wanxi white goose[J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2020, 41(1): 94-95.
- [24] 赵建芬, 杨海贵, 李静仪. HPLC-UV 法检测芦荟、枸杞叶和桑叶中的褪黑素[J]. 食品工业, 2015, 36(2): 266-270.
- ZHAO Jianfen, YANG Haigui, LI Jingyi. Detection and quantification of melatonin from *Aloe vera*, medlar leaves and mulberry leaves by HPLC-UV[J]. The Food Industry, 2015, 36(2): 266-270.
- [25] 黄涛, 赵庆军, 张宏林, 等. 高原鸡蛋营养成分分析及评价[J]. 西藏农业科技, 2023, 45(1): 53-56.
- HUANG Tao, ZHAO Qingjun, ZHANG Honglin, et al. Analysis and evaluation of nutritional components in highland eggs[J]. Tibet Journal of Agricultural Sciences, 2023, 45(1): 53-56.
- [26] 董传豪, 徐亚欧, 郑玉才, 等. 3 品种鸡蛋外在品质及营养价值的对比分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 351-354.
- DONG Chuanhao, XU Ya'ou, ZHENG Yucai, et al. Comparative analysis of external quality and nutritional value of three kinds of eggs[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(10): 351-354.
- [27] 吴少锋. 绿壳鸡蛋的营养价值、养殖困境及解决对策[J]. 河南农业, 2023(9): 61-62.
- WU Shaofeng. Nutritional value, cultivation dilemma and countermeasures of green shell eggs[J]. Agriculture of Henan, 2023(9): 61-62.
- [28] 姜峻玥, 黄佳婷, 高亚鹏, 等. 甘肃省松针绿壳鸡蛋营养成分分析及安全评价[C]. 成都: 亚洲营养学会联合会、中国营养学会, 2023: 199.
- JIANG Junyue, HUANG Jiating, GAO Yapeng, et al. Nutrient analysis and safety evaluation of Gansu Province pine needle green shell eggs[C]. Chengdu: Asian Nutrition Society Federation, Chinese Nutrition Society, 2023: 199.
- [29] PESTI G M, BAKALLI R I. Studies on the effect of feeding cupric sulfate pentahydrate to laying hens on egg cholesterol content[J]. Poultry Science, 1998, 77(10): 1540-1545.
- [30] 蒋彩云, 时学锋, 陈若晨, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸强化鸡蛋的研究进展[J]. 中国家禽, 2023, 45(9): 82-89.
- JIANG Caiyun, SHI Xuefeng, CHEN Ruochen, et al. Research advances on ω -3 polyunsaturated fatty acids enriched eggs[J]. China Poultry, 2023, 45(9): 82-89.
- [31] 朱宏, 梁克红, 李光燃, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸强化鸡蛋研究进展: 生产、品质与健康功效[J]. 中国食物与营养, 2022, 28(9): 38-43.
- ZHU Hong, LIANG Kehong, LI Guangran, et al. Research on ω -3 polyunsaturated fatty acids enriched eggs: Production, quality and health benefit[J]. Food and Nutrition in China, 2022, 28(9): 38-43.
- [32] 胡庆勇. 功能性鸡蛋百花齐放, 酵母硒助力锦上添花[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2021, 41(5): 110-112.
- HU Qingyong. Functional eggs are in full bloom, and yeast selenium is the icing on the cake[J]. Animal Science Abroad (Pigs and Poultry), 2021, 41(5): 110-112.
- [33] 王倩, 李留安, 秦梦然, 等. 日粮添加维生素 A 对芦花鸡蛋黄中维生素 A 富集及蛋品质的影响[J]. 家畜生态学报, 2021, 42(4): 34-39.
- WANG Qian, LI Liu'an, QIN Mengran, et al. Effects of dietary vitamin A supplementation on vitamin A enrichment in yolk and egg quality of *Gallus domestica*[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2021, 42(4): 34-39.
- [34] 王瑞, 白彦, 杨玉. 日粮中添加维生素 B₁₂ 对鸡蛋脂肪酸、氨基酸组成的影响及营养价值评价[J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(4): 220-227.
- WANG Rui, BAI Yan, YANG Yu. Effect of vitamin B₁₂ on fatty acid and amino acid composition of eggs and its nutritional value evaluation[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2024, 60(4): 220-227.
- [35] 张宇强, 张彦庭, 吴凤明, 等. 提高日粮维生素 D₃ 水平对鸡蛋的维生素 D₃、钙、磷含量及蛋品质的影响[J]. 饲料研究, 2022, 45(3): 37-42.
- ZHANG Yuqiang, ZHANG Yanting, WU Fengming, et al. Effect of dietary vitamin D₃ supplementation on contents of vitamin D₃, calcium and phosphorus in eggs and egg quality[J]. Feed Research, 2022, 45(3): 37-42.
- [36] 马旭丹, 张江南, 余舒婷, 等. 褪黑素在糖尿病及相关心血管疾病防治中的研究进展[J]. 中国现代医生, 2023, 61(13): 125-128, 133.
- MA Xudan, ZHANG Jiangnan, YU Shuting, et al. Research progress of melatonin in the prevention and treatment of diabetes and related cardiovascular diseases[J]. China Modern Doctor, 2023, 61(13): 125-128, 133.
- [37] 古庆悦, 李鑫森, 徐嘉伟, 等. 褪黑素防治病毒性疾病的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2023, 59(2): 86-89.
- GU Qingyue, LI Xinsen, XU Jiawei, et al. Research progress of melatonin in preventing and treating viral diseases[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2023, 59(2): 86-89.

加工编辑: 王雪
收稿日期: 2024-03-14