

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4488—2025

油料中褪黑素含量的测定 液相色谱串联质谱法

Determination of melatonin in oilseed—Liquid chromatography–
tandem mass spectrometry

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



前 言

本文件按 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院油料作物研究所、农业农村部油料产品质量安全风险评估实验室（武汉）、农业农村部油料及制品质量监督检验测试中心。

本文件主要起草人：张良晓、马飞、汪雪芳、喻理、王秀嫔、李培武。



油料中褪黑素含量的测定 液相色谱串联质谱法

1 范围

本文件规定了植物源农产品中褪黑素含量的液相色谱串联质谱测定方法。

本文件适用于芝麻、大豆、花生等植物源性油料产品中褪黑素含量的测定。

本方法检出限为 $0.3 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的褪黑素, 用甲醇提取, 经固相萃取柱净化, 用高效液相色谱串联质谱仪检测, 外标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外, 所有试剂均为分析纯, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 甲醇(CH_3OH , CAS 号: 67-56-1)。

5.2 甲酸铵(CH_5NO_2 , CAS 号: 540-69-2): 色谱级。

5.3 甲酸(HCOOH , CAS 号: 64-18-6): 色谱级。

5.4 褪黑素标准品($\text{C}_{13}\text{N}_2\text{H}_{16}\text{O}_2$, CAS 号: 73-31-4): 纯度不小于 95%。

5.5 甲醇水溶液(1+19, 体积比)。

5.6 甲醇水溶液(7+3, 体积比)。

5.7 甲醇水溶液(8+2, 体积比)。

5.8 甲酸铵甲酸甲醇溶液(5 mmol/L 甲酸铵+0.1% 甲酸): 称取甲酸铵(5.2)0.315 g, 加入 1 mL 甲酸(5.3), 用甲醇稀释并定容至 1 000 mL。

5.9 甲酸水溶液(0.1%): 准确吸取 1 mL 甲酸(5.3)于 1 000 mL 容量瓶中, 用水稀释并定容至 1 000 mL。

5.10 褪黑素标准储备溶液: 精密称取 10.0 mg 褪黑素标准品(5.4), 用甲醇溶解, 并完全转移至 10 mL 棕色容量瓶中, 定容, 配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液, -18°C 以下避光保存, 有效期 2 个月。

5.11 褪黑素标准中间溶液: 准确移取标准储备溶液(5.10)1 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间溶液, 4°C 以下避光保存, 有效期 1 个月。

5.12 褪黑素标准工作溶液: 分别吸取一定量的标准中间溶液(5.11), 用甲醇稀释成浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 的标准工作溶液。临用现配。

5.13 C18 固相萃取小柱: 1 000 mg, 6 mL, 或性能相当者。

5.14 微孔滤膜: 0.22 μm , 如疏水 PTFE 滤膜或相当者。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 6.2 天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 6.3 离心机:转速不低于为 4 200 r/min。
- 6.4 组织捣碎机。
- 6.5 涡旋振荡器。
- 6.6 氮吹仪。
- 6.7 超声波萃取仪。
- 6.8 固相萃取装置。

7 试样制备

取适量的待测样品,用组织捣碎机将其捣碎成粉末状(其中花生样品需要预先切片再捣碎),然后立即连续完成分析规程。

8 分析步骤

8.1 提取

称取 5 g(精确至 0.01 g)试样至 50 mL 离心管中,加入 20 mL 甲醇至离心管,涡旋 1 min,室温下避光静置 24 h 后,剧烈振荡 15 min,室温超声提取 30 min。4 200 r/min 离心 5 min,吸取 10 mL 上清液,氮吹干后用 2 mL 甲醇水溶液(5.5)复溶,待净化。

8.2 净化浓缩

将 C18 固相萃取柱放置在固相萃取仪上,依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 水活化,控制流速为 1 mL/min,将上述待净化液(8.1)全部加入固相萃取柱中,用 10 mL 的甲醇水溶液(5.5)淋洗,弃去淋洗液,然后将 5 mL 的甲醇水溶液(5.7)加入固相萃取柱中,5 mL 玻璃离心管收集洗脱液,40 ℃ 水浴中氮气吹至近干,用 0.5 mL 的甲醇水溶液(5.6)复溶,涡旋 30 s 后过微孔滤膜(5.14),待上机测定。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),或相当者。
- b) 柱温:30 ℃。
- c) 流动相:A 为有机相,甲醇(5 mmol/L 甲酸铵+0.1%甲酸)(5.8);B 为水相,0.1%甲酸水溶液(5.9)。
- d) 流速:0.20 mL/min。
- e) 进样量:3 μL。
- f) 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A,%	B,%
0	10	90
2	10	90
5	80	20
10	80	20
12	10	90
15	10	90

8.3.2 质谱条件

- a) 离子源类型:电喷雾离子源。
- b) 电离电压:4 000 V。
- c) 毛细管温度:330 ℃。
- d) 鞘气(N₂):35 units;辅气(N₂):8 units;碰撞气(Ar):1.5 mTorr。
- e) 扫描方式:正离子扫描。
- f) 检测方式:选择离子监测,至少选择 2 个子离子。
- g) 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表 2。

表 2 定性离子对定量离子对和碰撞能量

化合物	定量离子对, <i>m/z</i>	碰撞能量,eV	定性离子对, <i>m/z</i>	碰撞能量,eV
褪黑素	233/174	20	233/216	18

8.3.3 定性测定

在相同试验条件下,待测物在样品中的保留时间与标准工作溶液中的保留时间偏差在±2.5%之内,并且色谱图中定性离子对的相对丰度,与浓度接近标准工作液中相应定性离子对的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可判断为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许误差

相对离子丰度,%	>50	20~50(含)	10~20(含)	≤10
允许的相对偏差,%	±20	±25	±30	±50

8.3.4 定量测定

取褪黑素的标准工作溶液(5.12)与试样交替进样,采用单点或多点校准,外标法定量。当样品的上机液浓度超过线性范围时,需根据测定浓度,稀释后进行重新测定。褪黑素标准溶液的选择离子监测色谱图见附录 A。

9 结果计算

样品中褪黑素的含量按公式(1)计算。

$$w=V_1\times\frac{c\times V_2}{m\times V_3}\cdots\cdots\cdots(1)$$

式中:

- w* ——样品中褪黑素含量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- c* ——样液中褪黑素质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V*₁ ——提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V*₂ ——样液最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V*₃ ——用于净化的提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m* ——试料质量的数值,单位为克(g)。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次平行测定结果的算术平均值表示,结果保留 2 位有效数字。

10 精密度

- 10.1 在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 15%。
- 10.2 在再现性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 20%。

附 录 A
(资料性)
褪黑素选择离子监测色谱图

褪黑素选择离子监测色谱图见图 A. 1。

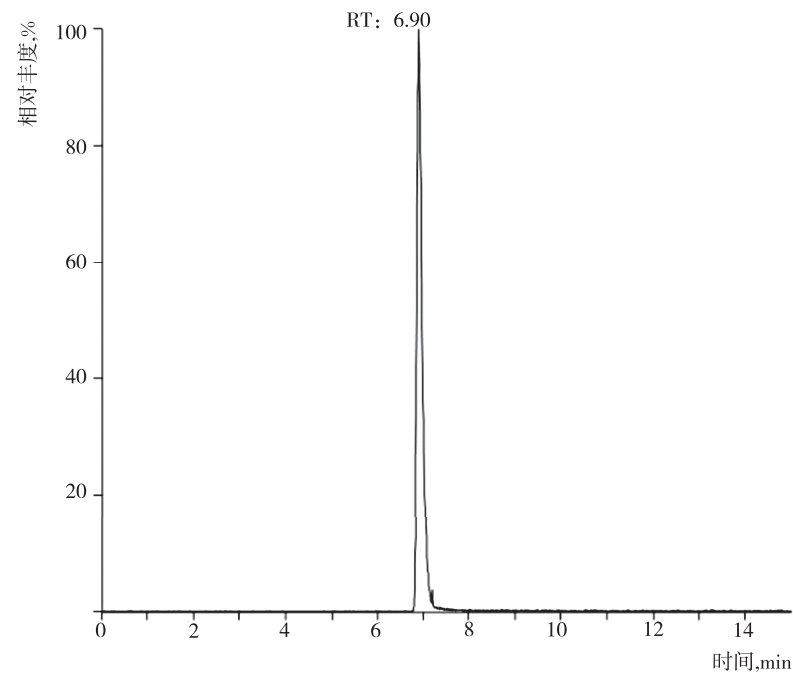


图 A. 1 褪黑素选择离子监测 (SRM) 色谱图