

高效液相色谱分析 真菌液态发酵产物中的麦角硫因

许 晟¹,刘 琦²,姜文侠²,王 妍¹,周子振¹

(1.天津中科诺识生物科技有限公司,天津 300100;

2.天津市工业生物系统与过程工程重点实验室,中国科学院天津工业生物技术研究所,天津 300308)

摘 要:利用高效液相色谱(HPLC)建立了定量检测发酵产物中麦角硫因的方法。该方法采用 Zorbax SB-Aq 色谱柱,检测条件为流动相 A(纯水:甲醇体积比99:1,使用20%的乙酸和50%的氨水调节流动相的 pH 至5.0)和 B(甲醇),进样量 5 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 0.7 mL/min,检测波长为 257 nm。建立的梯度洗脱的模式进一步提高了方法的稳定性、延长了色谱柱的使用时间。经高效液相色谱(HPLC)和高效液相色谱质谱联用仪(HPLC-MS)验证,该方法特异性良好,检出限和定量限分别为 0.045 和 0.900 μ g/L。在 2.5~1000 mg/L 的浓度范围内,线性关系良好,相关系数 $R^2 = 0.9991$ 。精密性、日内稳定性和日间稳定性的 RSD 分别为 0.33%、1.89% 和 0.026%。平均加标回收率在 92.17% 和 93.92% 之间。该方法简便、迅速、稳定、准确,可以用于麦角硫因的研发以及应用的定量分析。

关键词:高效液相色谱,麦角硫因,液态发酵

Determination of Ergothioneine Content in Liquid Fermentation Broth of Fungi by HPLC

XU Sheng¹, LIU Qi², JIANG Wen-xia², WANG Yan¹, ZHOU Zi-zhen¹

(1.Tianjin Sinoc Biological Technology Co., Ltd., Tianjin 300100, China;

2.Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: An efficient and stable method was developed for quantitative analysis of ergothioneine (EGT) by high performance liquid chromatography (HPLC). The method was carried out on Zorbax SB-Aq Column with elution A (the volume ratio of ultrapure water vs methanol was 99:1, adjusted to pH5 by 20% of acetic acid and 50% of ammonium and elution B (methanol) as mobile phase at 0.7 mL/min. An UV-VIS detector with a wavelength of 257 nm was employed. The injection volume was 5 μ L, with the column temperature being 30 $^{\circ}$ C. The gradient elution program makes the method more stable and prolong utility time of the chromatographic column. Based on the results of HPLC and HPLC-MS, we detected the specificity of this method was good. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.045 and 0.900 μ g/L. Good linearity (correlation coefficient $R^2 = 0.9991$) could be achieved for EGT quantification at the range of 2.5 to 1000 mg/L. The RSD of precision, stability in 12 h and stability in 14 d were 0.33%, 1.89%, and 0.026% respectively. Meanwhile, the average recoveries of EGT were within 92.17%~93.92%. The method was simple, rapid, stable and accurate, which could be used in the research and application of EGT biosynthesis.

Key words: HPLC; ergothioneine; liquid fermentation

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)18-0238-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.18.041

引文格式: 许晟, 刘琦, 姜文侠, 等. 高效液相色谱分析真菌液态发酵产物中的麦角硫因[J]. 食品工业科技, 2018, 39(18): 238-243.

麦角硫因(ergothioneine, EGT), 即巯基组氨酸三甲基内盐, 是一种天然抗氧化剂^[1], 具有清除自由基^[2]、解毒, 维持 DNA 的生物合成、细胞的正常生长以及细胞免疫等多种生理功能^[3-6]。

EGT 的制备方法主要有化学合成法、天然生物提取法^[7-9]及生物合成法。其中生物合成法^[10-14], 即利用真菌菌丝体深层发酵合成 EGT, 是合成 EGT 的发展方向。采用这种方式可以通过代谢调控提高产

收稿日期: 2018-01-16

作者简介: 许晟(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 化学检测分析, E-mail: ergo_xusheng@163.com。

基金项目: 天津市科技计划项目(15YFSSY0010)。

率,降低成本,并能够保证产品的安全性,拓宽了 EGT 的应用空间。而建立 EGT 快速准确地检测与分析方法,是发酵以及纯化等后续工艺进行优化的前提,对于研究和生产都至关重要。国内外有学者采用 C_{18} 色谱柱^[15-18]、HILIC 色谱柱^[19]和氨基色谱柱^[20]检测 EGT。其中 C_{18} 色谱柱法对色谱柱损耗较大,检测成本高,HILIC 色谱柱法检测时间较长,而氨基酸色谱柱法所用流动相中有机溶剂含量较大,检测废液对环境污染较严重。

本文利用反相耐水色谱柱 Zorbax-SB-Aq 建立了 EGT 的定量检测方法,相较于以上方法,具有检测时间短,流动相中有机溶剂含量低、污染小等优点,同时在菌丝体和发酵液等成分复杂样品的检测过程中,保持了良好的分离度和稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*, CGMCC No.6232) 保存于中国科学院天津工业生物技术研究所——姜文侠课题组;麦角硫因对照品(纯度 $\geq 98\%$) Enzo Life Sciences 公司;甲醇、乙酸(色谱级) 德国默克生物科技有限公司;玉米粉 梅河口市兴达米业有限公司;豆粕粉 北京中棉紫光生物科技有限公司;磷酸二氢钾、硫酸镁 分析纯,天津市北方天医化学试剂厂; α -淀粉酶 美国 Solarbio 科技有限公司;甘油(分析纯) 天津市风船化学试剂科技有限公司;胰酪胨 北京双旋微生物培养基制品厂;PDA 培养基 北京陆桥技术股份有限公司。

ZORBAX SB-Aq(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m) 色谱柱 美国 Agilent 公司;ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} (5 μ m,250 mm $\times$ 4.6 mm) 色谱柱 美国 Agilent 公司;1260 Infinity 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司;Agilent 1200-Sprak Prospekt2-Bruker AVANCE III 600 MHz/Bruker microOTOF-Q II 液相质谱联用仪 美国 Agilent 公司、德国 Bruker 公司;AX205DR 电子天平 瑞士 METTLER TOLEDO 公司;TGL-16M 离心机 湖南湘仪有限公司;MS 3 digital 漩涡振荡器 德国 IKA 公司;超滤离心管(3 kDa,1.5 mL) 美国 MiliPORE 公司;Milli-Q Reference 超纯水机 美国 MiliPORE 公司;SCIENZE SB-5200D 超声清洗机 宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 种子培养基:玉米粉 30.0 g/L,豆粕粉 15.0 g/L,磷酸二氢钾 3.0 g/L,硫酸镁 1.5 g/L, α -淀粉酶 80 U/L,自然 pH,500 mL 三角瓶装液量为 150 mL,121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min;

摇瓶发酵培养基:甘油 50.0 g/L,胰酪胨 35.0 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L,自然 pH,500 mL 三角瓶装液量为 150 mL,121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

1.2.2 发酵液的制备 发酵摇瓶培养方法:挑取 CGMCC 6232 斜面菌种约 1 cm^2 ,接种至种子培养基,25 $^{\circ}$ C 摇床 150 r/min 培养 96 h,制备种子液。将种子液按体积比 5% 的接种量接入发酵培养基,25 $^{\circ}$ C 摇床 150 r/min 培养 15 d,制备菌丝体发酵液。当培养

基中甘油和胰酪胨的添加比例为 5:4 和 5:3,其他培养条件同上时,得到两个样品分别为 3-14d-1 和 3-14d-2;当在 25 $^{\circ}$ C 摇床 150 r/min 下培养时间为 254 h 和 304 h,其他培养条件同上时,得到两个样品分别为 FJ-009-254h 和 FJ-009-304h。

1.2.3 样品的前处理 取适量的菌丝体发酵液,置于 90 $^{\circ}$ C,300 r/min 的磁力搅拌器上浸提 30 min,取上清液经膜孔径 3 kDa 的超滤管在 12840 $\times$ g 的条件下离心 10 min,透过液即为 EGT 待测样品。

1.2.4 HPLC-MS 检测条件 离子源 ESI,离子阱检测器;检测模式:正离子检测;喷雾电压:4.5 KV;氮气流速:3 L/min;毛细管温度:220 $^{\circ}$ C;毛细管电压:10 V;采用全离子扫描方式,扫描范围:50~450 m/z。

1.2.5 HPLC 检测条件 色谱柱:两根 ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m)串联;流动相为 A(纯水:甲醇=95:5/V:V,使用硼酸和氨水调节流动相的 pH 至 5.0);流速 0.7 mL/min;检测波长:257 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ L。

1.2.6 色谱条件的优化 分别对检测波长、流动相组成与比例、流动相 pH、流速和柱温以及梯度条件进行了优化。

1.2.7 方法学验证 对建立的检测方法进行了专属性考察、检出限和定量限、精密性、线性范围、稳定性考察(日内、日间稳定性)和加标回收率考察。

1.2.8 对照品溶液的配制及标准曲线的绘制 精密称量 10 mg 的麦角硫因对照品,溶解于 5 mL 的超纯水中,转移至 10 mL 的容量瓶,使用超纯水定容、混匀,配制成浓度为 1000 mg/L 的对照品储备液,于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。使用前,置于 10 $^{\circ}$ C 水中自然融化,随后分别取上述储备液 0.25、0.5、1、2、4 mL,稀释至 10 mL,配制成浓度为 25、50、100、200 和 400 mg/L 的对照品溶液,也可根据需要进行比例配制其它浓度的对照品溶液,随后进行 HPLC 测定,进样量为 5 μ L,根据积分所得的峰面积与浓度绘制标准曲线。

1.2.9 双 C_{18} 色谱柱串联检测与 SB-aq 色谱柱检测方法的对比实验 分别进行对照品检测对比实验、相同样品的检测结果比较、以及利用液相-质谱联用对两种检测方法进行验证。

1.3 数据处理

本文数据处理软件包括:Agilent 液相色谱仪工作站 Chemstation Edition(版本 C.01.07.SR3),Microsoft Office Excel 2007。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 检测波长的确定 取适量 EGT 对照品溶液,先后在 190~400 nm 和 250~270 nm 范围内进行紫外全波长扫描,确定 EGT 在 257 nm 处有最大吸收,故选择 257 nm 作为检测波长。扫描光谱图见图 1a、图 1b。

2.1.2 流动相组成与比例的选择和优化 选择甲醇-水和乙腈-水作为流动相进行优化,两种流动相对 EGT 的分离效果无明显差别。如图 2~图 4 所示,当流动相为甲醇:水=10:90 和乙腈:水=10:90 时,

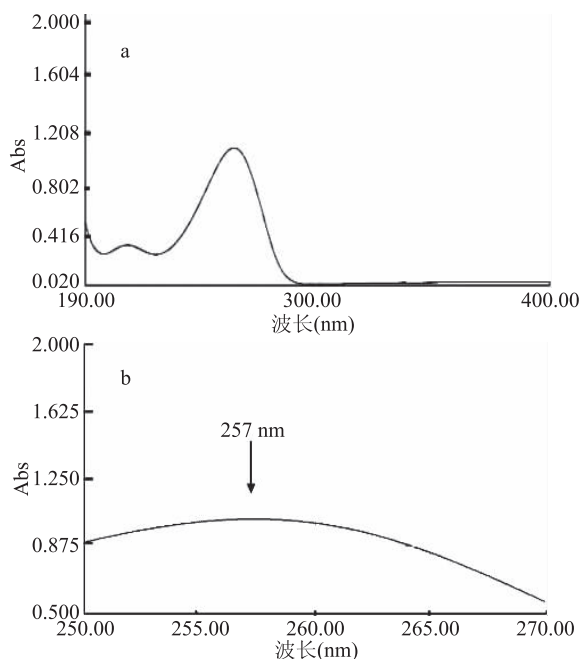


图1 EGT对照品的扫描光谱图

Fig.1 Scanning spectrum of EGT standard

EGT与杂质峰的分离度分别为0.91和0.85,流动相为甲醇:水=1:99时,EGT与杂质峰的分离度为1.78。考虑到乙腈的毒性较大和价格较高,故采用甲醇-水作为流动相。实验发现,甲醇与水的比例越小,EGT与杂质的分离效果越好。同时考虑到色谱柱保护的需要,将甲醇与纯水的比例确定为1:99。

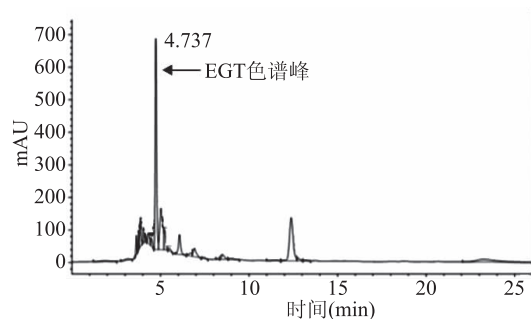


图2 甲醇:水=10:90的HPLC图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of 10% methanol concentration

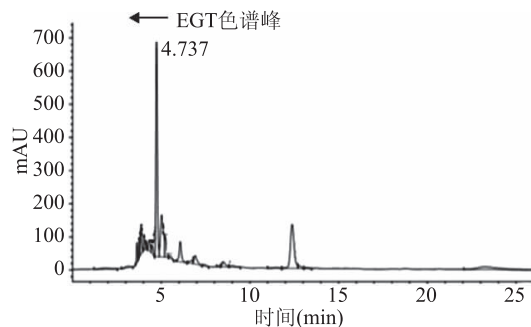


图3 乙腈:水=10:90的HPLC图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of 10% acetonitrile concentration

2.1.3 流动相pH的优化 分别利用乙酸、甲酸、氨水、三乙胺等试剂调节流动相的pH至4.0~6.0,发现使用20%的乙酸和50%的氨水调节流动相的pH为

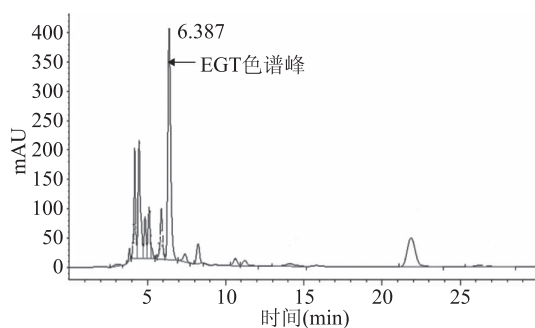


图4 甲醇:水=1:99的HPLC图谱

Fig.4 HPLC chromatogram of 1% methanol concentration

5.0,EGT的峰形及与杂质的分离度最好。

2.1.4 流速和柱温的优化 当流速从0.5 mL/min变化到1.5 mL/min时,EGT的峰形变窄,保留时间逐渐提前,由8 min左右变化至5 min左右,节省了检测时间,但降低了与杂质的分离度。柱温在20~35℃时,随着温度升高,EGT的保留时间提前,峰形变窄,但与杂质的分离度也降低。综合考虑检测时间、分离度和峰形,选择流动相的流速为0.7 mL/min,柱温为30℃。

2.1.5 梯度条件的选择 由于发酵样品杂质较多,若保持等度洗脱,随着杂质的积累,会导致柱压升高,影响检测的稳定性,同时也会缩短色谱柱的使用寿命,增加检测成本。因此建立了梯度洗脱建立程序:首先在50 min内完成B相0%~100%的变化,根据色谱图,调整Δ%B和相应的时间,保持梯度陡度不变,减少色谱图中的空白部分。将梯度时间再缩短1/3,观察目标峰与杂质峰的分离效果($R_s > 1.5$),在此前提下,进一步增大陡度以减少洗脱时间。最终建立的梯度洗脱程序如表1所示,在满足了EGT与杂质良好分离的前提下,检测时间达到最短。

表1 流动相的梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间(min)	A%(甲醇:水=1:99)	B%(甲醇)
1	100	0
8	100	0
20	30	70
24	0	100
30	0	100
31	100	0
38	100	0

2.2 方法学验证

2.2.1 专属性考察 取EGT对照品和摇瓶发酵样品按照方法1.2.1和1.2.3进行处理,根据2.1优化的检测条件进行检测,检测图谱如图5和图6。由图6可知,EGT的保留时间为5.863 min,与杂质峰的分离度为2.24,满足中国药典对于分离度的要求达到1.5以上。

利用液相质谱联用仪对该方法进行专属性验证,结果如图7。EGT的色谱峰与质荷比为230.096的EGT质谱信号基本重合,且该色谱峰内无其他质谱信号。考虑到质谱的死体积大于液相色谱,质谱峰的

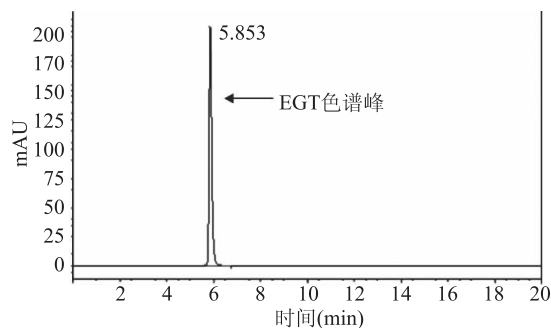


图5 EGT对照品的HPLC图谱

Fig.5 HPLC chromatograms of EGT standeard solution

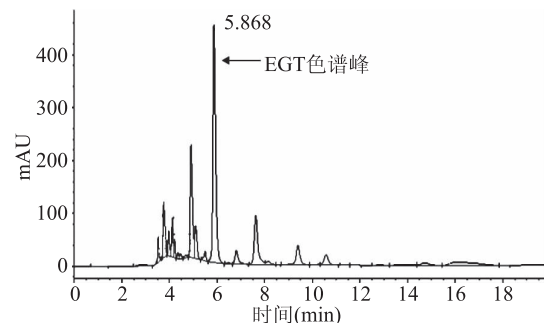


图6 EGT发酵样品的HPLC图谱

Fig.6 HPLC chromatograms of EGT fermentation sample

保留时间会略长于色谱峰,故未能完全重合。上述证明了液相色谱图中所确定的色谱峰为EGT峰,且与杂质实现了良好的分离,专属性符合检测要求。

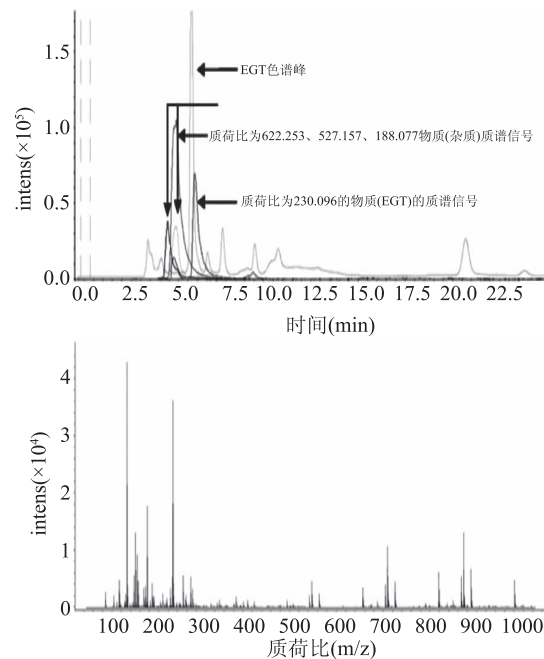


图7 摇瓶发酵样品的HPLC-MS图谱

Fig.7 HPLC-MS chromatograms of fermentation sample

2.2.2 检出限和定量限 分别配制浓度范围为0.01~1 μg/L的EGT对照品溶液,按照浓度由低到高的顺序进行检测,根据信噪比为3和10,确定EGT的检出限和定量限分别是0.045和0.900 μg/L。

2.2.3 标准曲线的绘制 按照1.2.1所述方法精密配制浓度范围为1~1000 mg/L的EGT对照品溶液,按

2.1优化的检测条件进行检测,根据EGT的浓度与峰面积绘制标准曲线。如图8,EGT在2.5~1000 mg/L的浓度范围内线性关系良好,线性回归方程为 $y = 31.06x + 273.31$, R^2 为0.9991。

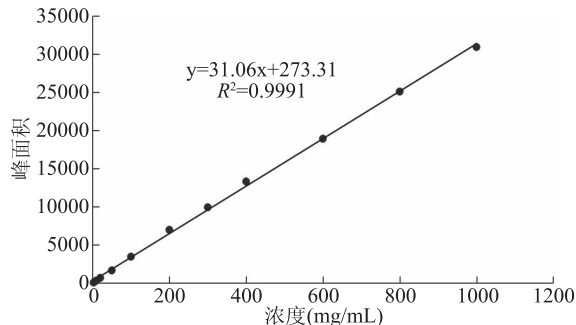


图8 EGT对照品的标准曲线

Fig.8 Standard curve of ergothioneine standeard solution

2.2.4 精密性试验 取摇瓶发酵摇瓶样品,按照1.2.3所述方法进行处理后,得到待测样,连续进样6次,检测结果的相对偏差RSD为0.33%,说明该检测方法的精密性良好。

2.2.5 稳定性考察

2.2.5.1 日内稳定性考察 取1份摇瓶发酵样品于室温下分别放置0、2、4、6、8、10、12 h,按照方法1.2.3处理后进行检测,每个时间点的样品平行测定3次,计算检测结果的相对标准偏差RSD为1.89%,说明待测样品中的EGT含量在12 h内保持稳定。

2.2.5.2 日间稳定性考察 另取1份摇瓶发酵样品储存在-20℃的冰箱中,于第1、7、11、14 d其进行检测,四次检测结果的RSD为0.026%,说明在14 d内,样品中的EGT浓度保持稳定,日间稳定性良好。

2.2.6 加标回收率考察 取一份已知EGT含量的摇瓶发酵样品,分别加入相当于样品中EGT含量为75%、100%和125%的对照品溶液,根据检测结果计算EGT的回收率,见表2。

表2 EGT加样回收率的测定结果
Table 2 The addition recovery of EGT

样品 加入量 (μg)	加标 百分比 (%)	对照品 加入量 (μg)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)	RSD (%)
61.69	75	45.68	93.70	93.92	0.23
			94.14		
			93.93		
			92.06		
61.69	100	60.90	91.49	91.81	0.31
			91.89		
			92.14		
			92.27		
125	125	76.13	92.27	92.17	0.08
			92.12		

由表2得知,样品的加标回收率都在90%~110%之间,符合定量检测的要求^[21]。

2.3 与双C₁₈色谱柱串联检测方法的比较

2.3.1 对照品检测对比试验 按照1.2.6进行试验,结果见表3和表4,明显可见,利用SB-aq色谱柱检

表3 利用SB-aq 色谱柱对 EGT 对照品进行检测结果

Table 3 The result of ergothioneine standeard solution test in 4 weeks by SB-aq column

浓度(mg/L)	第一周峰面积	第二周峰面积	第三周峰面积	第四周峰面积	RSD(%)
50	1481.80	1530.33	1501.80	1557.57	2.18
100	2998.70	3042.95	3000.20	3116.83	1.82
200	6021.80	6067.90	5985.70	6162.83	1.26
300	9290.75	8934.70	8932.50	9226.53	2.08
400	11948.75	12154.80	11973.80	12258.37	1.23

表4 利用双 C₁₈ 色谱柱串联对 EGT 对照品进行检测结果

Table 4 The result of ergothioneine standeard solution test in 4 weeks by C₁₈ column

浓度(mg/L)	第一周峰面积	第二周峰面积	第三周峰面积	第四周峰面积	RSD(%)
50	1257.10	1348.20	873.05	648.20	31.81
100	2561.80	2696.40	1746.10	1572.80	26.44
200	5396.10	5061.10	3826.40	3543.60	20.39
300	8021.00	7558.30	6009.50	5895.70	15.69
400	10947.70	9942.00	8073.60	8311.40	14.67

测时,相同浓度的麦角硫因对照品溶液峰面积一直稳定,而利用双 C₁₈ 色谱柱检测时,相同浓度的麦角硫因对照品溶液峰面积一直在变小,偏差较大。出现此现象的原因,可能与两种色谱柱的调料不同有关。普通 C₁₈ 色谱柱的固定相疏水性较强,在高比例水相条件下,易引起固定相疏水塌陷,导致柱效迅速下降,影响响应强度,进而导致随着使用时间变长,对照品峰面积逐渐变小,而 SB-aq 色谱柱的固定相具有较大的二异丙基侧链基团,避免了色谱柱在低 pH、高比例水相条件下被水解破坏,进而保证相同浓度对照品的峰面积能够一直保持比较稳定的水平。

2.3.2 同一样品的检测结果比较 另取 4 个摇瓶发酵样品,按 1.2.3 进行样品制备,随后利用两种检测方法进行检测,结果如表 5 所示:对于 4 个不同样品,两种检测方法的检测结果均相差较大,采用 SB-Aq 色谱柱检测样品中的 EGT 含量低于 C₁₈ 柱检测的同一样品中的 EGT 含量。后续利用 HPLC-MS 对两种方法进行验证。

表5 同一样品的两种检测方法检测结果比较

Table 5 Test results of same sample by two differert test methods

样品名称	双 C ₁₈ 柱检测 样品中的 EGT 浓度(mg/L)	SB-aq 柱检测 样品中的 EGT 浓度(mg/L)	相对偏差 (%)
3-14D-1	169.57	114.16	-19.5
3-14D-2	213.31	160.46	-14.1
FJ-009-254 h	268.71	228.02	-8.2
FJ-009-304 h	287.89	257.45	-5.6

2.3.3 利用 HPLC-MS 验证两种检测方法

2.3.3.1 对 C₁₈ 色谱检测方法的质谱验证 利用液相质谱联用仪对 C₁₈ 柱分离的摇瓶发酵样品 3-14D-1 和 FJ-009-254 h 进行色谱峰纯度检测,结果如图 9、图 10。由图中可以看出,采用 C₁₈ 色谱柱对成分较为复杂的样品的分离效果较差。前者在 EGT 色谱峰的对

应位置还包含质荷比约为 118.084 和 277.089 的两个质谱杂质信号,

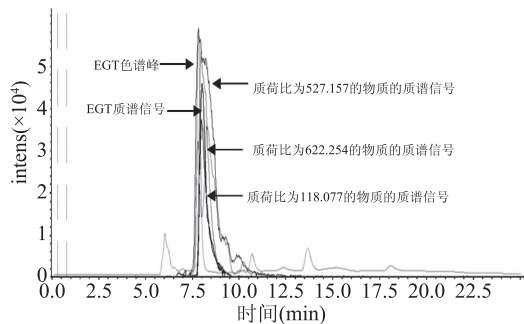


图9 C₁₈柱检测样品 3-14D-1 的 HPLC-MS 谱图

Fig.9 HPLC-MS chromatograms of sample 3-14D-1 by C₁₈ chromatographic column

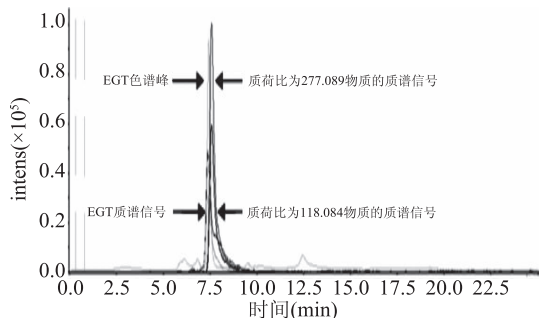


图10 C₁₈柱检测样品 FJ-009-254h 的 HPLC-MS 谱图

Fig.10 HPLC-MS chromatograms of sample FJ-009-254h by C₁₈ chromatographic column

2.3.3.2 对 SB-Aq 检测方法的质谱验证 由图 11、图 12 可看出,与 C₁₈ 柱的检测结果相比,SB-Aq 柱对摇瓶发酵样品的分离效果更佳,在 257 nm 下,EGT 色谱峰与 EGT 质谱峰的保留时间基本一致,同时色谱峰的对

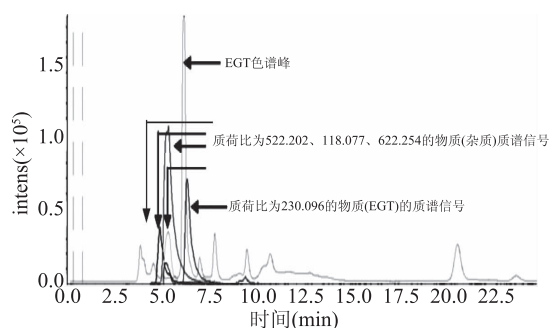


图 11 SB-Aq 色谱柱检测样品
3-14D-1 的 HPLC-MS 谱图

Fig.11 HPLC-MS chromatograms of sample 3-14D-1
by ZORBAX SB-Aq chromatographic column

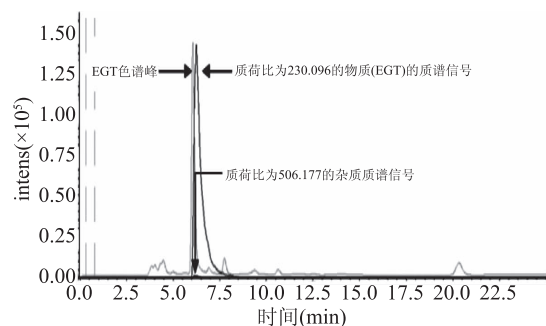


图 12 SB-Aq 色谱柱检测样品
FJ-009-254h 的得 HPLC-MS 谱图

Fig.12 HPLC-MS chromatograms of sample FJ-009-254h by
SB-Aq chromatographic column

3 结论

本文建立的 HPLC 检测方法能够快速、简便地检测样品中的 EGT 含量。所用流动相中只含体积比为 1% 的甲醇,对环境污染很小,EGT 保留时间为 6 min,对于杂质较多的发酵样品,进行梯度洗脱程序的检测时间也仅为 38 min,建立的梯度洗脱程序可以清除杂质的积累,增强了方法的稳定性,延长了色谱柱的使用时间。经统计,检测 200 个样品之后,柱压依然保持在初始状态,且峰形、分离度均保持稳定良好水平。利用液质联用证明了本方法适合于检测成分较为复杂的发酵样品中的 EGT 含量。该方法的线性、精密度、稳定性及加标回收率均满足定量检测的要求,可广泛应用于各种 EGT 样品的定量检测。

参考文献

- [1] Tanret C. Sur une base nouvelle retiree du seigle ergote, L-Ergothioneine Compt[J]. Rend Acad Sci, 1909, 149: 222-224.
- [2] Franzoni F, Colognato R, Galetta F, et al. An *in vitro* study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: Comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2006, 60(8): 453-457.
- [3] Aruoma O I, Spencer J P, Mabmood N. Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine[J]. Food and Chemical Toxicology, 1999, 37(11):

1043-1053.

- [4] Aruoma O I, Whiteman M, England T G, et al. Antioxidant action of ergothioneine: Assessment of its ability to scavenge peroxynitrite [J]. Biochemical and biophysical research communication, 1997, 231(2): 389.
- [5] 朱本占, 朱莉, 范瑞梅, 等. 天然抗氧化剂麦角硫因保护铜所致 DNA 和蛋白质氧化损伤的作用机理[J]. 科技通报, 2011, 56(27): 2283-2288.
- [6] 乔凤云, 陈欣, 余柳青. 抗氧化因子与天然抗氧化剂研究综述[J]. 科技通报, 2006, 22(3): 332-336.
- [7] Xu J, Yadan J C. Synthesis of L-(+)-ergothioneine [J]. Journal of Organic Chemistry, 1995, 60(20): 6296-6301.
- [8] Yadan J C, Xu J. Process for the preparation of ergothioneine: US, 5438151.A [P]. 1995.
- [9] 周念波, 李秋群, 殷勤红. 氧化铝柱层析从双孢菇菇柄中提取麦角硫因[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(27): 14842-14843.
- [10] 何波. 日本侧耳的两种甜菜碱型氨基酸衍生物[J]. 国外医学中医中药分册, 1998, 20(6): 36-39.
- [11] 梅保良, 刘琦, 姜文侠, 等. 营养因子强化麦角硫因生物合成的研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(15): 108-112.
- [12] Michael D Kalaras, John P Richie, Ana Calcagnotto, et al. Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione[J]. Food Chemistry, 2017, 4(109): 429-433.
- [13] 刘琦, 张维亚, 姜文侠. 麦角硫因的合成与降解代谢[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27: 1112-1117.
- [14] 薛天凯, 赵艳敏, 林纪伟, 等. 正交设计优化平菇下脚料中麦角硫因的提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2017, 3(38): 40-45.
- [15] 周念波, 朱艳琴, 殷勤红. 高效液相色谱法测定双孢菇中麦角硫因的含量[J]. 食品科技, 2010, 35(10): 271-272, 279.
- [16] Zhou T, Liu Q, Jiang W X, et al. A new strategy for quantitative analysis of ergothioneine in fermentation broth by RP-HPLC[J]. Lecture Notes in Electrical Engineering, 2014, 249: 313-321.
- [17] N Joy Dubost, Robert B Beelman, Devin Peterson, et al. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2006, 8(3): 215-222.
- [18] The Nguyen, Anupam Giri, Toshiaki Ohshima. A rapid HPLC post-column reaction analysis for the quantification of ergothioneine in edible mushrooms and in animals fed a diet supplemented with extracts from the processing waste of cultivated mushrooms[J]. Food Chemistry, 2012, 133(2): 585-591.
- [19] Zhou T, Liu Q, Jiang W X, et al. Validation of a HILIC method for the analysis of ergothioneine in fermentation broth[J]. Journal of Chromatographic Science, 2016, 54(6): 934.
- [20] 张翠, 赵艳敏, 白淑芳, 等. HPLC 法测定不同品种蘑菇中麦角硫因的含量[J]. 食品工业科技, 2013, 23(34): 307-310.
- [21] 中华人民共和国国家标准. GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范, 食品理化检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.