

高分辨质谱库和特征组分诊断比值法快速鉴别食品中非法添加淫羊藿

吴婉琴^{1,2}, 江丰^{1,2}, 干国平^{3,4*}, 范小龙^{1,2}, 刘国姣^{1,2}, 王彬^{1,2}, 高芳^{1,2}, 朱松松^{1,2}, 张啟恒^{1,2}, 宋哲^{1,2}

(1. 湖北省食品质量监督检验研究院, 湖北武汉 430075) (2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北武汉 430075) (3. 湖北中医药大学药学院, 湖北武汉 430065) (4. 湖北省中药炮制工程技术研究中心, 湖北武汉 430065)

摘要: 建立了一种基于高分辨质谱库和特征组分诊断比值法鉴别食品中非法添加淫羊藿的方法。采用高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪构建淫羊藿6种特征组分高分辨质谱库进行初步筛查, 将不同产地和采摘时间的淫羊藿中药材模拟配制酒、代用茶和饮料样品, 构建3种基质中淫羊藿特征组分液相色谱分析方法, 选取受产地、采摘时间、加工工艺等影响较小, 不同基质组间无显著性差异的3组特征组分峰面积诊断比值DR1(朝藿定A/朝藿定B)、DR3(朝藿定A/淫羊藿苷)和DR7(朝藿定B/淫羊藿苷), 合并后绘制箱图确定各诊断比值非异常值范围分别为0.60~0.96、0.26~0.64和0.35~0.91, 以此作为鉴别指标。对实际样品配制酒、代用茶及饮料进行分析, 1批次配制酒样品与淫羊藿6种特征组分高分辨质谱库匹配一致, 且3组特征组分诊断比值DR1、DR3、DR7分别为0.73、0.28、0.38, 均在规定的范围内, 推断该配制酒样品中加入了淫羊藿中药材。该方法准确、快捷、稳定性好, 可快速鉴别食品中非法添加淫羊藿, 为打击食品中非法添加淫羊藿违法行为提供技术支持。

关键词: 高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱; 高效液相色谱; 诊断比值; 淫羊藿

文章编号: 1673-9078(2022)02-286-294

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0515

Rapid Identification of Illegally Added Epimedium in Food Based on High-resolution Mass Spectrometry Library and Diagnostic Ratio of Characteristic Components

WU Wanqin^{1,2}, JIANG Feng^{1,2}, GAN Guoping^{3,4*}, FAN Xiaolong^{1,2}, LIU Guojiao^{1,2}, WANG Bin^{1,2}, GAO Fang^{1,2}, ZHU Songsong^{1,2}, ZHANG Qiheng^{1,2}, SONG Zhe^{1,2}

(1.Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China) (2.Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China)

(3.Pharmacy Faculty Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

(4.Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Hubei Province, Wuhan 430065, China)

Abstract: A method based on high-resolution mass spectrometry library and characteristic component diagnostic ratio was established for identifying illegally added epimedium in food. A high resolution mass spectrometry library of six characteristic components of epimedium was constructed by high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOF-MS) for preliminary screening. Simulated wine, substitute tea and drink samples were prepared using Chinese medicinal materials of epimedium obtained from

引文格式:

吴婉琴,江丰,干国平,等.高分辨质谱库和特征组分诊断比值法快速鉴别食品中非法添加淫羊藿[J].现代食品科技,2022,38(2):286-294,+189

WU Wanqin, JIANG Feng, GAN Guoping, et al. Rapid identification of illegally added epimedium in food based on high-resolution mass spectrometry library and diagnostic ratio of characteristic components [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 286-294, +189

收稿日期: 2021-05-16

基金项目: 国家市场监督管理总局技术保障专项项目(2019YJ030); 湖北省食品药品监督管理局市局级重点科研项目(201801010)

作者简介: 吴婉琴(1991-), 女, 工程师, 研究方向: 食品安全与检测, E-mail: 429371379@qq.com

通讯作者: 干国平(1965-), 男, 教授, 研究方向: 中药及其制剂的物质基础, E-mail: 510577319@qq.com

different origins and picking times. A liquid chromatography analysis method was established for the characteristic components of epimedium in three different matrices. The characteristic component peak area diagnostic ratios, DR1 (epimedin A/ epimedin B), DR3 (epimedin A/ icariin) and DR7 (epimedin B/ icariin), which were less affected by the origin, picking time and processing technology, with no significant differences among different matrix groups, were selected and combined to draw box plots. Then, the non-abnormal value ranges of diagnostic ratios were determined to be 0.60~0.96, 0.26~0.64 and 0.35~0.91, respectively, which were used as identification indicators. The actual samples of prepared wine, substitute tea and drink were analysed. The prepared wine samples of one batch matched with the high-resolution mass spectrometry library of the six characteristic components of epimedium. The diagnostic ratios of the three characteristic components DR1, DR3 and DR7 were 0.73, 0.28 and 0.38, respectively, which were all within the specified range, inferring that epimedium-containing Chinese medicinal materials had been added to the prepared wine samples. The method is accurate, fast and stable, and can quickly identify the illegal addition of epimedium to food and provide technical support for cracking down on the illegally added epimedium in food.

Key words: high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF-MS); high performance liquid chromatography (HPLC); diagnostic ratio; epimedium

淫羊藿 (*Epimedium brevicornu* Maxim.) 又名短角淫羊藿、仙灵脾等, 为小檗科植物淫羊藿属淫羊藿的干燥叶, 属应用历史悠久的常用补益中药, 其具有益精气、补肾阳、强心力、坚筋骨等功效, 可用于治疗风湿痹痛、筋骨萎软、阳痿遗精^[1,2]。现代药理学研究表明, 淫羊藿还具有促进缺血心肌血管新生、保护生殖系统、抗肿瘤、治疗类风湿关节炎、阿尔茨海默病等功能^[3-9]。依据卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知(卫法监发[2002]51号)^[10]和《食品安全法》第三十八条^[11], 淫羊藿在药品及保健食品中允许添加, 但在食品中禁止添加。一些食品生产企业受利益的驱动, 只顾中药材功效而忽视其毒性和副作用, 在所谓的“食疗”、“养生”等食品中违法添加淫羊藿, 如宣称具有补益壮阳的配制酒、代用茶及饮料。在打击向普通食品违法添加中药材的行为过程中, 监管部门执法人员只能通过查看产品配料表和到企业现场巡查等最传统的方式来判断食品中是否违法添加中药材, 但往往会因生产企业不如实标注配料表或生产现场对非法添加的中药材原料进行隐藏等情况, 形成监管盲区。因此, 食品中非法添加中药材的鉴别工作在技术手段上面临巨大的挑战。

目前淫羊藿中药材的鉴别手段, 主要有性状鉴别^[12,13]、显微鉴别^[14]、薄层鉴别^[15,16]、中药材特征图谱^[17,18]或指纹图谱鉴定^[19,20]、DNA 条形码分子鉴定^[21-23]等方法, 但以上方法均是对中药材的真伪鉴别, 而对食品中违法添加中药材的识别和鉴别, 从本质上可追溯为鉴定其违法添加中药材的化学成分, 而由于食品原料的多样性、食品基质和加工工艺的复杂性、加入的中药材品种未知性等原因, 导致所添加的中药材在食品中可能与中药材原料中的特征图谱或指纹图谱发生了变化, 因而以上几种鉴别方法不适用于食品中违法添加中药材的鉴别。

诊断比值 (Diagnostic ratio, 简称 DR) 是指样品中某些特定组分之间的比值, 它能够表征不同样品各自的化学组成, 用于判别两个样品来源是否一致^[24]。其具有独特性和差异性, 基本不受外界因素影响或受外界因素影响较小。目前主要运用于环境中污染物溯源鉴别^[25-28]、海上溢油的鉴定^[24,29,30]、医学疾病诊断^[31-34]等领域, 在食品领域用于中药材鉴别暂未见报道。

为了建立一种简单易行且可靠的鉴别食品中非法添加淫羊藿中药材的方法, 本实验采用高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪构建淫羊藿特征组分高分辨质谱库进行初步筛查, 再选取淫羊藿的 6 种特征成分 (淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 I、宝藿苷 II) 为考察对象, 选取常见易非法添加中药材的食品配制酒、代用茶和饮料为研究对象, 于高效液相色谱探索出基于特征组分的诊断比值法确证典型食品中违法添加淫羊藿中药材的鉴定技术, 构建了食品中非法添加淫羊藿确证技术体系, 为食品中淫羊藿非法添加的科学监管提供有效的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

淫羊藿中药材均购自电商平台, 经干国平教授鉴定为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶, 采用粉碎机进行粉碎处理后过二号筛得淫羊藿粗粉, 置于密封袋中, 10 批次淫羊藿中药材编号为 Y1-Y10, 待检测; 配制酒样品、代用茶样品、饮料样品, 电商平台; 淫羊藿对照药材, 中国食品药品检定研究院; 淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 I、宝藿苷 II (纯度 $\geq 98\%$), 上海源叶生物技术有限公司; 乙腈 (色谱纯), 德国 Merck 公司; 甲醇 (色谱纯), 德国 Merck 公司; 甲酸 (质谱纯),

美国 Fisher Scientific 公司; 超纯水 (电阻率为 18.2 M Ω ·cm, 25 $^{\circ}$ C), 美国 Millipore 公司; 其余试剂均为分析纯。

Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 美国 Thermo 公司; AB Sciex TOF 5600+型串联四极杆质谱仪 (配备 Analyst 1.6 工作站、Peak View 定性筛查软件、Library View 数据库软件), 美国 SCIEX 公司; Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters 2998 光电二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司; Allegra X-15R 型离心机, 美国 Beckman 公司; EDAA-2600T 型超声波清洗器, 上海安谱科学仪器有限公司; 涡旋混合器, 美国 TALBOYS 公司; ME2002E 分析天平, 梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司; 0.22 μ m 有机系滤膜、水系滤膜, 天津津腾公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

标准储备液: 准确称取淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 I、宝藿苷 II 标准品置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 配制成淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 I 浓度为 1.0 mg/mL, 宝藿苷 II 浓度为 0.5 mg/mL 的标准储备液, 置于 4 $^{\circ}$ C 环境中冷藏避光保存。

标准工作溶液: 分别取上述 6 种标准储备液适量, 用甲醇稀释并定容, 配制成浓度均为 0.1 mg/mL 的混合标准溶液, 置于 4 $^{\circ}$ C 环境中冷藏避光保存。

1.2.2 样品的制备

模拟淫羊藿酒的制备及前处理: 称取淫羊藿中药材 2 g (精确至 0.01 g) 置于棕色广口瓶中, 准确加入 20 mL 50%乙醇-水溶液, 超声 30 min, 取出放至室温, 浸提 24 h 以上。取上清液过 0.22 μ m 有机系微孔滤膜, 供高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪和高效液相色谱仪检测用。

模拟淫羊藿代用茶的制备及前处理: 称取淫羊藿中药材 2 g (精确至 0.01 g) 置于具塞离心管中, 准确加入 20 mL 甲醇, 超声 30 min, 取出放至室温, 于 4000 r/min 离心 5 min。取上清液过 0.22 μ m 有机系微孔滤膜, 供高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪和高效液相色谱仪检测用。

模拟淫羊藿饮料的制备及前处理: 称取淫羊藿中药材 2 g (精确至 0.01 g) 置于棕色广口瓶中, 加入 20 mL 50%乙醇-水溶液, 超声 30 min, 取出放至室温, 浸提 24 h 以上。于 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液于圆底烧瓶, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴中减压浓缩至近干, 准确加入 20 mL 超纯水, 超声 10 min, 取上清液过 0.22 μ m

水系微孔滤膜, 供高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪和高效液相色谱仪检测用。

配制酒: 取适量样品, 于 4000 r/min 离心 5 min, 过 0.22 μ m 有机系微孔滤膜, 供高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪和高效液相色谱仪检测用。

代用茶: 准确称取 2 g (精确至 0.01 g) 样品置于具塞离心管中, 准确加入 20 mL 甲醇, 超声 30 min, 取出放至室温, 于 4000 r/min 离心 5 min。取上清液过 0.22 μ m 有机系微孔滤膜, 供高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪和高效液相色谱仪检测用。

饮料: 取适量样品, 于 4000 r/min 离心 5 min, 过 0.22 μ m 水系微孔滤膜, 供高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪和高效液相色谱仪检测用。

1.2.3 仪器分析条件

1.2.3.1 HPLC-TOF-MS 分析条件

(1) 高效液相色谱条件

色谱柱: Thermo Accucore aQ 色谱柱 (150 \times 2.1 mm, 2.6 μ m); 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ L; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1%甲酸水溶液, 梯度见表 1。

表 1 流动相梯度程序

Table 1 Mobile phase gradient program

时间 t/min	流速 v/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.3	5	95
2	0.3	5	95
20	0.3	95	5
25	0.3	95	5
26	0.3	5	95
30	0.3	5	95

(2) TOF/MS 工作条件

离子源: 电喷雾离子源; 正离子扫描模式: 电喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 550 $^{\circ}$ C; 气帘气: 35 psi; 雾化气: 55 psi; 辅助气: 55 psi; 去簇电压: 60 V; 碰撞能量: 35 V; 扫描方式采用全扫描一级质谱, 质量采集范围 100~1000 u; 全扫描二级质谱, 质量采集范围 50~1000 u。质量数校正液为 10 mmol/L 甲酸钠溶液。

(3) TOF/MS 筛查高分辨质谱库筛查条件

鉴别参数设置: 化合物提取离子流响应强度>100 或信噪比 S:N>5, 母离子精确分子量和二级碎片质量数偏差设为 $\pm(10\times 10^{-6})$, 保留时间偏差 $\pm 2.5\%$; 数据库综合得分设置: 质量数偏差、保留时间偏差、同位素比值、分子式匹配、数据库匹配占比均设为 20%。

1.2.3.2 HPLC-PDA 分析条件

色谱柱: Waters Symmetry Shield C18(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测波长 270 nm; 进样量:

10 μL; 流动相 A 为甲醇; 流动相 B 为纯水, 梯度见表 2。

表 2 流动相梯度程序

Table 2 Mobile phase gradient program

时间 t/min	流速 v/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.8	25	75
26	0.8	25	75
40	0.8	37	63
62	0.8	37	63
66	0.8	75	25
70	0.8	25	75
80	0.8	25	75

1.3 数据处理

采用 AB Sciex Library View 数据库软件构建目标化合物高分辨质谱库, 采用 AB Sciex Peak View 定性筛查软件对样品进行筛查分析, 采用 SPSS 21.0 统计软件对样品数据进行分析, 采用 SPSS 21.0 统计软件和 GraphPad Prism 5 完成绘图。

2 结果与分析

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 HPLC-TOF-MS

正离子扫描模式下, 比较考察了乙腈-5 mmol/L 乙酸铵和乙腈-0.1%甲酸两种流动相体系, 部分化合物在乙腈-5 mmol/L 乙酸铵流动相体系下峰形不佳出现拖尾现象, 且峰响应较差, 故选择乙腈-0.1%甲酸流动相体系进行分析。

为得到更全面的质谱数据信息, 设定全扫描一级质谱, 质量采集范围 100~1000 u, 全扫描二级质谱, 质量采集范围 50~1000 u。

2.1.2 HPLC-PDA

比较了甲醇-纯水、乙腈-纯水和甲醇-20 mmol/L

乙酸铵溶液 (0.1%乙酸) 三种流动相体系分离效果。采用乙腈-纯水作为流动相时, 淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 出峰较快导致分离度不理想; 采用甲醇-20 mmol/L 乙酸铵溶液 (0.1%乙酸) 时, 6 种化合物分离度较好, 但是淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 有一定程度拖尾; 采用甲醇-纯水时, 6 种目标化合物均有良好的分离度和峰形, 如图 1 所示。故选择甲醇-纯水流动相体系进行分析。

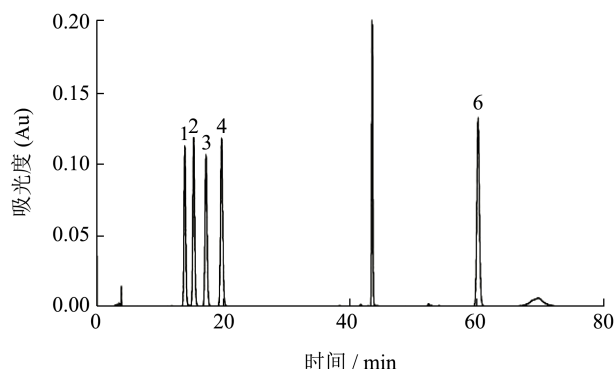


图 1 6 种化合物液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatogram of 6 compounds

注: 1.朝藿定 A; 2.朝藿定 B; 3.朝藿定 C; 4.淫羊藿苷; 5.宝藿苷 II; 6.宝藿苷 I。

2.2 淫羊藿特征组分高分辨质谱数据库的建立

自建高分辨质谱库中淫羊藿包括 6 种特征成分一级精确质量数据库和二级碎片离子谱库, 具体信息见表 3。

2.3 诊断比值的选取

结合上述配制酒、代用茶和饮料食品基质模拟过程, 选用淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 I、宝藿苷 II 6 种特征组分作为研究对象, 通过各特征组分两两间峰面积的比值作为淫羊藿中药材特征组分的诊断比值, 共计 15 组诊断比值分别为 DR1-DR15, 如表 4 所示。

表 3 淫羊藿特征组分信息表

Table 3 Information of characteristic components of epimedium

化合物名称	英文名	CAS 号	分子式	理论母离子 精确分子量 /u	质量 偏差 ($\times 10^{-6}$)	扫描 模式	保留 时间 /min	实测母 离子/u	子离子 1 /u	子离子 2 /u	子离子 3 /u
淫羊藿苷	Icariin	489-32-7	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	677.24455	-8.89	[M+H] ⁺	10.33	677.23853	313.06884	369.13104	531.18184
朝藿定 A	Epimedin A	110623-72-8	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	839.29737	-7.36	[M+H] ⁺	9.96	839.29119	369.13450	531.18512	677.24190
朝藿定 B	Epimedin B	110623-73-9	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	809.28681	-7.76	[M+H] ⁺	10.08	809.28053	369.13143	531.18293	677.23974
朝藿定 C	Epimedin C	110642-44-9	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	823.30246	-7.19	[M+H] ⁺	10.16	823.29654	369.13114	531.18310	677.23981
宝藿苷 I	Baohuoside I	113558-15-9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	515.19173	-4.43	[M+H] ⁺	12.91	515.18944	85.02791	313.06874	369.13162
宝藿苷 II	Baohuoside II	55395-07-8	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	501.17607	-0.50	[M+H] ⁺	11.63	501.17582	85.02800	299.05441	355.11734

表 4 淫羊藿中药材特征组分的诊断比值编号及描述

Table 4 Diagnostic ratio number and description of characteristic components of epimedium

比值编号	诊断比值描述	比值编号	诊断比值描述	比值编号	诊断比值描述
DR1	朝藿定 A/朝藿定 B	DR6	朝藿定 B/朝藿定 C	DR11	朝藿定 C/宝藿昔 II
DR2	朝藿定 A/朝藿定 C	DR7	朝藿定 B/淫羊藿昔	DR12	朝藿定 C/宝藿昔 I
DR3	朝藿定 A/淫羊藿昔	DR8	朝藿定 B/宝藿昔 II	DR13	淫羊藿昔/宝藿昔 II
DR4	朝藿定 A/宝藿昔 II	DR9	朝藿定 B/宝藿昔 I	DR14	淫羊藿昔/宝藿昔 I
DR5	朝藿定 A/宝藿昔 I	DR10	朝藿定 C/淫羊藿昔	DR15	宝藿昔 II/宝藿昔 I

表 5 10 批次淫羊藿中药材模拟配制酒的特征组分诊断比值

Table 5 Diagnostic ratio of characteristic components in 10 batches of prepared wine of epimedium

样品	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6	DR7	DR8	DR9	DR10	DR11	DR12	DR13	DR14	DR15
Y1	0.72	0.96	0.31	5.64	9.37	1.34	0.43	7.88	13.09	0.32	5.87	9.74	18.42	30.58	1.66
Y2	0.94	0.11	0.36	0.79	0.10	0.12	0.38	0.84	0.10	3.13	6.94	0.84	0.14	1.19	0.12
Y3	0.63	0.15	0.54	84.48	7.45	0.24	0.85	133.86	11.81	3.59	565.34	49.88	0.03	0.02	0.09
Y4	0.77	0.28	0.36	5.58	0.95	0.36	0.47	7.24	1.23	1.29	19.89	3.39	0.05	0.30	0.17
Y5	0.74	0.95	0.27	3.46	4.81	1.29	0.37	4.69	6.53	0.29	3.63	5.05	0.28	0.20	1.39
Y6	0.72	0.64	0.28	2.51	1.96	0.89	0.38	3.48	2.72	0.43	3.92	3.06	0.26	0.33	0.78
Y7	0.71	0.50	0.48	4.47	3.24	0.70	0.68	6.32	4.57	0.97	8.99	6.51	0.11	0.15	0.72
Y8	0.64	0.39	0.50	4.92	2.46	0.61	0.78	7.70	3.85	1.28	12.58	6.30	0.08	0.16	0.50
Y9	0.63	0.55	0.47	6.48	3.90	0.87	0.74	10.31	6.21	0.85	11.86	7.14	0.08	0.14	0.60
Y10	0.73	0.59	0.64	3.83	2.60	0.81	0.87	5.23	3.55	1.07	6.44	4.37	0.16	0.23	0.68
RSD, % (n=10)	12.49	57.36	29.30	208.29	77.84	56.47	35.00	216.09	78.89	86.27	272.72	149.12	295.01	287.78	77.50

表 6 10 批次淫羊藿中药材模拟代用茶的特征组分诊断比值

Table 6 Diagnostic ratio of characteristic components in 10 batches of substitutional tea of epimedium

样品	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6	DR7	DR8	DR9	DR10	DR11	DR12	DR13	DR14	DR15
Y1	0.63	1.15	0.27	7.71	8.67	1.82	0.42	12.23	13.74	0.23	6.72	7.55	28.81	32.38	1.12
Y2	0.96	0.12	0.35	1.32	0.15	0.12	0.37	1.38	0.16	2.93	11.02	1.26	0.09	0.79	0.11
Y3	0.64	0.16	0.54	123.23	34.01	0.25	0.84	193.34	53.36	3.34	769.36	212.35	0.03	0.02	0.28
Y4	0.72	0.33	0.31	5.66	3.27	0.46	0.43	7.83	4.52	0.93	17.20	9.93	0.06	0.10	0.58
Y5	0.75	1.29	0.26	3.78	3.23	1.72	0.35	5.03	4.30	0.20	2.93	2.50	0.34	0.40	0.85
Y6	0.74	0.75	0.28	2.92	2.67	1.01	0.37	3.92	3.59	0.37	3.89	3.56	0.26	0.28	0.92
Y7	0.72	0.84	0.38	118.21	6.54	1.16	0.53	163.31	9.04	0.45	140.18	7.76	0.01	0.13	0.06
Y8	0.72	0.87	0.41	119.96	4.55	1.20	0.57	166.11	6.31	0.47	137.96	5.24	0.01	0.19	0.04
Y9	0.60	0.72	0.32	39.26	3.66	1.22	0.54	65.98	6.15	0.44	54.20	5.06	0.02	0.20	0.09
Y10	0.73	0.99	0.43	3.78	3.91	1.37	0.59	5.20	5.38	0.43	3.81	3.93	0.26	0.25	1.03
RSD, % (n=10)	13.83	55.50	24.47	128.84	137.79	56.37	29.75	127.80	144.77	117.86	205.94	252.98	303.64	292.38	86.84

对网购的 10 批次淫羊藿中药材样品按 1.2.2 过程处理后, 各组分的诊断比值如表 5~表 7 所示, 在配制酒模拟过程中, 朝藿定 A 与朝藿定 B 峰面积比值 DR1 数值集中在 0.63~0.94 区间, 各样品间的相对标准偏差 (RSD) 为 12.49%; 朝藿定 A 与淫羊藿昔峰面积比值 DR3 数值集中在 0.27~0.64 区间, 各样品间的相对标准偏差 (RSD) 为 29.30%; 朝藿定 B 与淫羊藿昔峰面积比值 DR7 数值集中在 0.37~0.87 区间, 各样品间的相对标准偏差 (RSD) 为 35.00%。在代用茶模拟

过程中, 朝藿定 A 与朝藿定 B 峰面积比值 DR1 数值集中在 0.60~0.96 区间, 各样品间的相对标准偏差 (RSD) 为 13.83%; 朝藿定 A 与淫羊藿昔峰面积比值 DR3 数值集中在 0.26~0.54 区间, 各样品间的相对标准偏差 (RSD) 为 24.47%; 朝藿定 B 与淫羊藿昔峰面积比值 DR7 数值集中在 0.35~0.84 区间, 各样品间的相对标准偏差 (RSD) 为 29.75%。在饮料模拟过程中, 朝藿定 A 与朝藿定 B 峰面积比值 DR1 数值集中在 0.61~0.86 区间, 各样品间的相对标准偏差 (RSD)

为 10.53%；朝藿定 A 与淫羊藿苷峰面积比值 DR3 数值集中在 0.35~0.58 区间，各样品间的相对标准偏差 (RSD) 为 18.63%；朝藿定 B 与淫羊藿苷峰面积比值 DR7 数值集中在 0.41~0.91 区间，各样品间的相对标准偏差 (RSD) 为 26.49%。通过各组诊断比值比较发现，在配制酒、代用茶和饮料三种模拟体系中，10 批

次样品的 DR1, DR3, DR7 数值波动相对较小，各样品间的相对标准偏差 (RSD) 均不高于 35.00%，其它 12 组诊断比值波动区间较大，可能是由于受淫羊藿药材产地或采收季节的不同而造成了诊断比值的波动较大，故初步选择诊断比值 DR1, DR3, DR7 作为淫羊藿中药材鉴别的依据。

表 7 10 批次淫羊藿中药材模拟饮料的特征组分诊断比值

Table 7 Diagnostic ratio of characteristic components of 10 batches of drink of epimedium

样品	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6	DR7	DR8	DR9	DR10	DR11	DR12	DR13	DR14	DR15
Y1	0.77	0.82	0.41	28.83	43.47	1.06	0.54	37.43	56.44	0.51	35.25	53.14	69.53	104.82	1.51
Y2	0.86	4.47	0.35	2.44	0.21	5.17	0.41	2.82	0.25	0.08	0.55	0.05	1.83	20.94	0.09
Y3	0.64	0.15	0.58	16.13	42.03	0.24	0.91	25.12	65.43	3.82	105.95	276.00	0.02	0.02	2.61
Y4	0.80	0.30	0.39	14.44	2.78	0.37	0.49	18.02	3.46	1.31	48.07	9.24	0.02	0.11	0.19
Y5	0.80	0.82	0.35	11.04	17.06	1.02	0.44	13.80	21.33	0.42	13.46	20.82	0.07	0.05	1.55
Y6	0.79	0.47	0.36	8.07	5.60	0.59	0.46	10.26	7.12	0.77	17.32	12.02	0.06	0.08	0.69
Y7	0.70	0.47	0.41	14.81	17.66	0.68	0.59	21.20	25.27	0.88	31.37	37.40	0.03	0.03	1.19
Y8	0.70	0.44	0.49	14.94	11.28	0.63	0.70	21.27	16.06	1.10	33.71	25.45	0.03	0.04	0.76
Y9	0.61	0.49	0.42	12.37	10.00	0.80	0.68	20.22	16.34	0.86	25.35	20.49	0.04	0.05	0.81
Y10	0.76	0.59	0.54	11.00	14.49	0.78	0.72	14.54	19.16	0.92	18.64	24.55	0.05	0.04	1.32
RSD, % (n=10)	10.53	140.77	18.63	50.48	91.19	126.93	26.49	50.15	93.41	96.48	87.58	170.08	305.74	261.98	68.90

表 8 配制酒、茶叶和饮料食品的诊断比值方差分析

Table 8 Analysis of variance of the diagnostic ratios of prepared wine, substitutional tea and drink

诊断比值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
DR1	组间	0.00	2	0.00	0.18	0.83	不显著
	组内	0.22	27	0.01			
	总数	0.22	29				
DR3	组间	0.03	2	0.02	1.72	0.20	不显著
	组内	0.26	27	0.01			
	总数	0.30	29				
DR7	组间	0.06	2	0.03	0.97	0.39	不显著
	组内	0.81	27	0.03			
	总数	0.87	29				

2.4 不同食品基质间诊断比值显著性差异分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件对选定的模拟配制酒、代用茶及饮料食品的 3 组诊断比值 DR1、DR3、DR7 进行显著性差异分析，结果显示 (见表 8)：3 种食品基质间各组诊断比值均无显著性差异 ($p>0.05$)，表明所选的 3 组诊断比值具有一定的稳定性，不受样品基质、加工工艺和提取溶剂的干扰，可用于不同食品基质中淫羊藿中药材的鉴别。

2.5 诊断比值非异常范围的确定

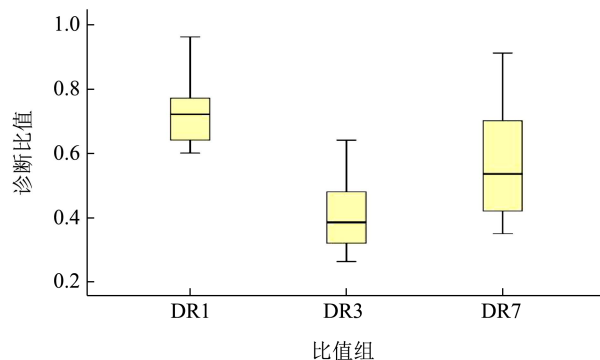


图 2 食品中淫羊藿中药材的诊断比值箱线图

Fig.2 Box plot of diagnostic ratio of epimedium in food

显著性差异分析显示 3 组诊断比值于不同基质间均无显著性差异，为更全面统一地对不同食品中淫羊

藿进行鉴别,使方法具有一定的通用性,考虑将3种不同基质的各诊断比值进行合并,进行箱图绘制如图2,确定各比值非异常值范围,诊断比值DR1范围为0.60~0.96,诊断比值DR3范围为0.26~0.64,诊断比值DR7范围为0.35~0.91。

2.6 基于高分辨质谱库和特征诊断比值法对实际样品的检测

对购买的10批次淫羊藿中药材以及10批次配制

酒、10批次代用茶和10批次饮料样品进行筛查分析,10批次淫羊藿中药材高分辨数据均与自建质谱库6种特征组分匹配一致,说明所建立的方法可有效筛查鉴别淫羊藿特征组分,1批次配制酒样品高分辨数据与自建质谱库6种特征组分匹配,推断该样品中可能含有淫羊藿。该配制酒样品靶向筛查结果如表9所示,配制酒样品中朝藿定A与标准品朝藿定A碎片离子镜像图如图3所示(图中上半部分为配制酒样品中朝藿定A的碎片离子图,下半部分为标准品朝藿定A的碎片离子图)。

表9 配制酒样品与标准品特征组分高分辨质谱数据库靶向筛查分析结果表

Table 9 Targeted screening analysis results of characteristic components of prepared wine samples and standards by high resolution mass spectrometry library

匹配化合物	分子式	加合方式	保留时间/min	实测母离子/u	保留时间偏差/%	质量偏差/($\times 10^{-6}$)	数据库得分
淫羊藿苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	+H	10.33	677.24212	0.14	-0.30	98.60
朝藿定A	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	+H	9.97	839.29480	0.10	0.20	99.50
朝藿定B	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	+H	10.09	809.28457	0.03	-0.40	99.20
朝藿定C	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	+H	10.17	823.29975	0.01	0.80	98.80
宝藿苷I	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	+H	12.92	515.19033	0.02	-0.70	99.90
宝藿苷II	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	+H	11.63	501.17513	0.04	1.20	100.00

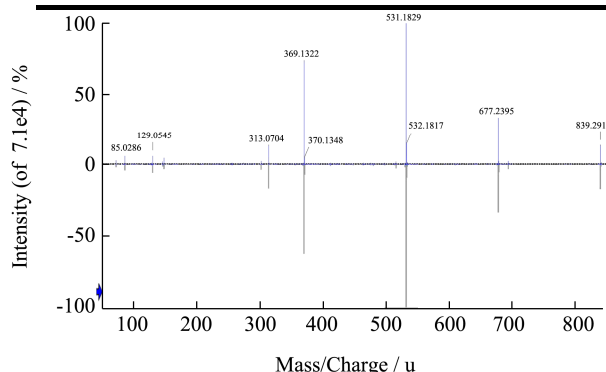


图3 配制酒样品中朝藿定A的碎片离子镜像图

Fig.3 Spectral difference in results of epimedin A in prepared wine

为进一步确证样品中是否添加淫羊藿,采用特征组分峰面积诊断比值法对样品进行进一步分析。于高效液相色谱采用诊断比值法对该样品进行鉴别确证,检测出6种特征组分,其中诊断比值DR1(朝藿定A/朝藿定B)为0.73,诊断比值DR3(朝藿定A/淫羊藿苷)为0.28,诊断比值DR7(朝藿定B/淫羊藿苷)为0.38,3组诊断比值均在选定的诊断比值非异常值范围内,进一步表明该配制酒样品可能加入淫羊藿中药材。

目前淫羊藿中药材的鉴别手段,主要有性状鉴别、显微鉴别、薄层鉴别、中药材特征图谱或指纹图谱鉴定、DNA条形码分子鉴定等方法,研究对象多为单味药材饮片及复方制剂,对于食品中淫羊藿的鉴别鲜有

报道,由于食品基质复杂且多样,成分组成繁多,对样品进行分析时相应的杂质干扰也多,单纯的性状鉴别、显微鉴别、薄层鉴别、DNA条形码分子鉴定对于复杂的食品基质中淫羊藿药材的鉴别已不适用,而中药材特征图谱或指纹图谱由于食品基质的干扰,在不同食品基质中会发生一定的变化,定性鉴别存在一定的偏差。对于食品中的淫羊藿的鉴别,要开发出一种不受不同基质影响且定性准确的方法,高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪通过测定母离子和碎片离子的精密质量数,定性准确度高,且分析速度快,用于多个化合物的初步筛查具有一定的优势,基于化合物定性准确的基础上,依据某种中药材自身特征组分之间不受其他因素影响具有的稳定比值即特征组分诊断比值法进一步定性,最终构建食品中淫羊藿药材的鉴别方法,所构建的方法较其它方法前处理简便,特征成分和诊断比值不受食品基质干扰和影响,可以准确地用于食品中淫羊藿的定性鉴别。

3 结论

本研究开发出一种基于高分辨质谱库和特征组分诊断比值法快速筛查鉴别食品中非法添加淫羊藿中药材的方法,选取6种特征组分构建高分辨质谱库进行初步筛查,最终确定稳定性较好的朝藿定A与朝藿定B峰面积比值(DR1)、朝藿定A与淫羊藿苷峰面积比值(DR3)、朝藿定B与淫羊藿苷峰面积比值(DR7)

3 组诊断比值作为鉴别依据,并考察了特征比值在配制酒、饮料、茶叶普通食品中的显著性差异,确定了3 组诊断比值的非异常范围,构建了食品中淫羊藿中药材确证技术体系。该方法简便快捷、稳定、重复性好,可以有效地防止食品中淫羊藿中药材的非法使用,为打击食品中非法添加淫羊藿违法行为提供技术方法和依据。

参考文献

- [1] 何丽君,江金井,陈豪,等.淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展[J].中医临床研究,2020,12(2):17-20
HE Lijun, JIANG Jinjing, CHEN Hao, et al. A review on pharmacological effects and clinical application of Herba *epimedii* [J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2020, 12(2): 17-20
- [2] 罗露,袁志鹰,黄惠勇,等.淫羊藿化学成分及药理研究进展[J].亚太传统医药,2019,15(6):190-194
LUO Lu, YUAN Zhiying, HUANG Huiyong, et al. Advances in the chemical constituents and pharmacology studies of *epimedium* [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2019, 15(6): 190-194
- [3] 白晓君,任建勋,张卫萍.淫羊藿总黄酮对大鼠急性心肌梗死后缺血心肌血管新生作用的影响[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(12):40-47
BAI Xiaojun, REN Jianxun, ZHANG Weiping. Effect of *epimedium* total flavonoids on angiogenesis of ischemic myocardium in rats with post-acute myocardial infarction [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2021, 27(12): 40-47
- [4] 丁越,徐晓宇,王亚非,等.淫羊藿生物碱对环磷酰胺引起的雄鼠生殖系统损伤的保护作用[J].食品工业科技,2021,42(21):353-360
DING Yue, XU Xiaoyu, WANG Yafei, et al. Effects of *epimedium* alkaloid on reproductive system injury induced by cyclophosphamide in male mice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 353-360
- [5] 徐飞,唐照,秦静静,等.淫羊藿次苷II通过下调MDSC比例抑制小鼠肺癌生长的研究[J].中华中医药学刊,2021,39(10):122-125
XU Fei, TANG Zhao, QIN Jingjing, et al. Icariside II inhibits lung cancer growth by decreasing MDSC ratio in mice [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2021, 39(10): 122-125
- [6] 陈奕晨,王娜,王文杰.淫羊藿抗抑郁作用机制的网络药理学研究[J].陕西中医药大学学报,2021,44(2):53-60
CHEN Yichen, WANG Na, WANG Wenjie. Network pharmacology study on antidepressant mechanism of *epimedium* [J]. Journal of Shaanxi University of Chinese Medicine, 2021, 44(2): 53-60
- [7] Pan C, Fujiwara Y, Horlad H, et al. Flavonoid compounds contained in *epimedii* Herba inhibit tumor progression by suppressing STAT3 activation in the tumor microenvironment [J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 262
- [8] Zhou L, Wong K Y, Yu W, et al. Selective estrogen receptor modulator-like activities of Herba *epimedii* extract and its interactions with tamoxifen and raloxifene in bone cells and tissues [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 11: 571598
- [9] Li Y, Yang Q, Yu Y. A network pharmacological approach to investigate the mechanism of action of active ingredients of *epimedii* Herba and their potential targets in treatment of alzheimer's disease [J]. Medical Science Monitor, 2020, 26: e926295
- [10] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知(卫法监发[2002]51号)[Z].(2002-03-11) [2021-05-16]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s3593/200810/bc239ea3d226449b86379f645dfd881d.shtml>.
National Health Commission of the People's Republic of China. The notice of the ministry of health of the People's Republic of China on further regulating the management of raw materials of health food (Weifa Jianfa (2002) No.51). [Z]. (2002-03-11) [2021-05-16]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s3593/200810/bc239ea3d226449b86379f645dfd881d.shtml>
- [11] 全国人民代表大会常务委员会.中华人民共和国食品安全法[M].北京:中国法制出版社,2018
Standing Committee of the National People's Congress. Food Safety Law of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Legal Publishing House, 2018
- [12] 孙淑英.淫羊藿及其混淆品、伪品的鉴别[J].中国中医药现代远程教育,2015,13(18):12-14
SUN Shuying. The identification of *epimedium* Herba and its confused and pseudo species [J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2015, 13(18): 12-14
- [13] 强小娟,马晓玉,尹玎.几种常用中药饮片的快速鉴别[J].实用中医药杂志,2017,33(3):315-316
QIANG Xiaojuan, MA Xiaoyu, YIN Ding. Rapid identification of several pieces of traditional Chinese medicine [J]. Journal of Practical Traditional Chinese Medicine, 2017, 33(3): 315-316
- [14] 康帅,鲁静,张继,等.淫羊藿药典品的基原调查及性状显微鉴别研究[J].中国中药杂志,2018,43(4):696-703

- KANG Shuai, LU Jing, ZHANG Ji, et al. Study on original investigation, macroscopic and microscopic identification of pharmacopoeia contained species of *Epmidii* folium [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(4): 696-703
- [15] 孙舒放,崔艳莉,严寒,等.兽用扶正解毒散中淫羊藿的薄层鉴别方法研究[J].广西畜牧兽医,2019,35(3):102-103,105
- SUN Shufang, CUI Yanli, YAN Han, et al. Study on TLC identification of epimedium in animal Fuzheng Jiedu powder [J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 35(3): 102-103, 105
- [16] 谢媛媛,彭灵,苏加坤,等.中药淫羊藿薄层色谱鉴别方法的建立[J].中药与临床,2017,8(4):16-20
- XIE Yuanyuan, PENG Ling, SU Jiakun, et al. Establishment of TLC identification method of Yinyanghuo [J]. Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica, 2017, 8(4): 16-20
- [17] 许春芳,崔莉莉,鄢红霞,等.昆仙胶囊 HPLC 特征指纹图谱和多成分定量测定研究[J].中草药,2020,51(24):6213-6220
- XU Chunfang, CUI Lili, YAN Hongxia, et al. HPLC characteristic chromatograms and quantitative analysis of Kunxian capsules [J]. Chinese Herbal Medicine, 2020, 51(24): 6213-6220
- [18] 张正,陈江平,程学仁,等.淫羊藿配方颗粒 UPLC 特征图谱及主要成分含量测定研究[J].中医药导报,2020,26(14):20-23, 28
- ZHANG Zheng, CHEN Jiangping, CHENG Xueren, et al. Study on UPLC characteristic spectrum and content determination of main components of Yinyanghuo formula granules [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2020, 26(14): 20-23, 28
- [19] 姚林才,陈帅,卿大双,等.HPLC 指纹图谱化学模式识别法评价淫羊藿药材质量一致性[J].亚太传统医药,2017,13(5):27-30
- YAO Lincan, CHEN Shuai, QING Dashuang, et al. Evaluation quality coherence of Herba *epidium* through chemical pattern recognition of fingerprint by HPLC [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2017, 13(5): 27-30
- [20] 康帅,张炜,郑健,等.淫羊藿黄酮苷类成分的指纹图谱与含量测定研究[J].中国药品标准,2018,19(5):359-375
- KANG Shuai, ZHANG Wei, ZHENG Jian, et al. Investigation of fingerprint and assay of flavonoid glycosides in *epmedii* [J]. Folium Drug Standards of China, 2018, 19(5): 359-375
- [21] Sajad A L, Qazi P H, Suphla G. Development of DNA barcode for rapid identification of *Epimedium elatum* (Morren & Decne) from northwestern Himalayas in India [J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2019, 13(C)
- [22] Ye S, Kwok-Pui F, Ping-Chung L, et al. A phylogenetic analysis of *Epimedium* (Berberidaceae) based on nuclear ribosomal DNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 35(1): 287-291
- [23] Nakai R, Shoyama Y, Shiraiishi S. Genetic characterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2008, 19(1): 67-70
- [24] 孙培艳,赵玉慧,曹丽歆,等.油指纹鉴别中诊断比值的重复性限比较法[J].海洋环境科学,2011,30(1):110-113,117
- SUN Peiyan, ZHAO Yuhui, CAO Lixin, et al. Repeatability limit comparison method of diagnostic ratios in oil fingerprint identification [J]. Marine Environmental Science, 2011, 30(1): 110-113, 117
- [25] Coralie B, Laurence M, Pierre F. Impact of oxidation and biodegradation on the most commonly used polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) diagnostic ratios: implications for the source identifications [J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 267: 31-39
- [26] Jheng-Jie J, Chon-Lin L, Meng-Der F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments of southwest Taiwan: an appraisal of diagnostic ratios in source recognition [J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 58(5): 752-760
- [27] Agung D S. Molecular diagnostic ratios to assess the apportionment of petroleum hydrocarbons contamination in marine sediment [J]. Molekul, 2016, 11(2): 208-208
- [28] Clément N, Muresan B, Hedde M, et al. PAH dynamics in roadside environments: influence on the consistency of diagnostic ratio values and ecosystem contamination assessments [J]. The Science of the Total Environment, 2015, 538: 997-1009
- [29] 黄义,齐超越,李佳,等.基于诊断比值的 Fisher 判别法鉴定海上溢油[J].海洋环境科学,2018,37(2):299-303
- HUANG Yi, QI Chaoyue, LI Jia, et al. Identification of marine oil spills by fisher discriminant based on the diagnostic ratios [J]. Marine Environmental Science, 2018, 37(2): 299-303

(下转第 189 页)