

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健食品中14种功效成分

杨惠成, 王海鸣, 林绪, 燕云, 何晓峰

(广州广电计量检测股份有限公司, 广东广州 510065)

摘要: 功效成分是保健食品常见的一项检测项目, 是控制保健食品质量的重要指标。本文建立了超高效液相色谱-串联质谱同时测定保健食品中14种功效成分的快速检测方法。样品前期采用甲醇超声提取, 采用 Venusil MP C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3 μm) 色谱柱, 0.1%甲酸水-乙腈为流动相, 梯度分离后使用串联四级杆质谱进行检测, 外标法峰面积进行定量。结果表明, 超高效液相色谱-串联质谱的方法能在4 min内完成所有样品的出峰。芦荟苷、腺苷在0.05~10 ng/mL, 芦丁、淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷在0.5~100 ng/mL, 其余8种功效成分在5~1000 ng/mL浓度范围内线性关系良好($r>0.998$)。方法精密度相对标准偏差<5%。绿原酸、没食子酸、丹参素钠、白藜芦醇、红景天苷、黄氏甲苷、甘草酸、大蒜素检出限为75 μg/kg, 芦荟苷、腺苷检出限为0.75 μg/kg, 芦丁、淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷检出限为7.5 μg/kg。通过三个浓度的加标回收实验表明, 方法回收率在83.42%~108.44%。该方法灵敏度高、线性关系和重现性好, 可快速地对保健食品中多种植物功效成分进行同时测定, 可为保健食品的质量监控提供一定的技术参考。

关键词: 保健食品; 植物功效成分; 超高效液相色谱-串联质谱

文章编号: 1673-9078(2018)11-281-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.041

Simultaneous Determination of 14 Functional Components in Health Foods by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

YANG Hui-cheng, WANG Hai-ming, LIN Xu, YAN Yun, HE Xiao-feng

(Guangzhou Grg Metrology & Test Co., Ltd, Guangzhou 510065)

Abstract: The functional component and composition are commonly analyzed for health foods, and are important quality indices of these products. An ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for simultaneous determination of 14 kinds of plant-based functional components present in health foods. Ultrasonic extraction with methanol was applied to the samples prior to analysis by UPLC-MS/MS using a Venusil MP C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 3 μm) and a gradient mobile phase composed of acetonitrile and water containing 0.1% formic acid. The chromatographic peak areas were quantified using external standards. The results showed that the chromatographic peak of all the test samples were eluted within 4 min by the present UPLC-MS/MS method. Good linearity was observed in the range of 0.05~10 ng/mL for aloin and adenosine, 0.5~100 ng/mL for rutin, icariin, amygdalin and paeoniflorin, and 5~1000 ng/mL for the other 8 kinds of functional components, with the correlation coefficients greater than 0.998. The method precision, the relative standard deviation, was less than 5%. The detection limit was 75 μg/kg for chlorogenic acid, gallic acid, sodium danshensu, resveratrol, salidroside, astragaloside, glycyrrhizin and allicin, 0.75 μg/kg for aloin and adenosine, and 7.5 μg/kg for rutin, icariin, amygdalin and paeoniflorin. The recovery rate was 83.42%~108.44% based on the recoveries of the spike-and-recovery experiments at three standard concentrations. Thus, this current method had a high sensitivity, good linear relationship and reproducibility, and can be used for simultaneous determination of various functional components in a health food, which provides a technical support for the quality control of health foods.

收稿日期: 2018-06-15

作者简介: 杨惠成(1983-), 男, 工程师, 研究方向: 食品质量安全

通讯作者: 何晓峰(1977-), 男, 工程师, 研究方向: 食品质量安全

Key words: health food; plant-based functional components; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

随着人类生活水平的提高,人们已经不再满足于吃饱穿暖,而是更加关注于饮食健康,通过饮食改善自身的身体状况,营养保健成为更多人关注的焦点。保健品作为一种特殊的食品,旨在调节人体功能,补充人体所需的营养素。自保健品问世以来,受到很多消费者的青睐。保健品也获得了快速发展,产品琳琅满目。然而有许多不法商家为了谋取暴利,制造各种各样的劣质保健品,使我国的保健食品市场存在很多安全隐患,急需开展快速检测保健食品的质量的方法。

功效成分是保健食品功能保健功能的关键所在,也是产品质量的主要指标,因此功效成分检测便成为国内外保健食品开发研究十分重视的一个环节。要使保健食品长期稳定的健康发展,弄清其功效成分并解决测定方法有着重要的意义^[1]。现有的保健食品功效成分的检测方法有分光光度法^[2]、气相色谱法^[2]、高效液相色谱法^[3-17]、液相色谱-质谱法^[18]等,其中高效液相色谱法为最常见的检测方法,但检测项目单一,对于含有多种功效成分的保健食品,由于基质的干扰和某些目标物缺乏较强的紫外或荧光吸收,导致检测效果不佳,故难以实现多组分的同时测定,而且其灵敏度也无法达到对相关提取物中低浓度样品的分析。因此,本文利用液相色谱-串联质谱的优势,建立准确、快速测定保健食品中14种功效成分同时测定的分析方法,不仅可以对单一组分不同功能的各类保健食品提供一种优良的检测方法,而且还可以对多种功效成分的保健食品建立一种检测方法,为保健食品的生产研发和监管提供高效灵敏的定性定量检测手段。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

甲醇、乙腈、甲酸(均为色谱纯),乙酸铵(分析纯):默克公司。

标准物质:绿原酸(Chlorogenic acid, 327-97-9, 97.2%)、没食子酸(Gallic acid, 149-91-7, 99.47%)、丹参素钠(Sodium Danshensu, 67920-52-9, 98.1%)、芦荟苷(Barbaloin, 1415-73-2, 94.4%)、白藜芦醇(Resveratrol, 501-36-0, 99.4%)、红景天苷(Salidroside, 10338-51-9, 98.8%)、芦丁(Rutin, 153-18-4, 99.3%)、淫羊藿苷(Icariin, 489-32-7, 94.2%)、苦杏仁苷(Semen Armeniacae Amarum, 29883-15-6, 90.7%)、芍药苷(Paeoniflorin, 23180-57-6,

95.7%)、黄氏甲苷(Astragaloside, 84687-43-4, 97.4%)、腺苷(Adenosine, 58-61-7, 99.7%)、甘草酸(Glycyrrhizic acid, 1405-86-3, 93.0%)、大蒜素(Allicin, 539-86-6, 97.3%):SIGMA公司。

1.2 仪器设备

AB4500 超高效液相色谱-质谱/质谱联用仪(美国SCIEX公司),超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),ME203E 电子分析天平(瑞士梅特勒),XS205DU 电子分析天平(瑞士梅特勒)。

1.3 试剂配制

1.3.1 标准储备液

准确称取各标准物质20 mg,分别置于10 mL容量瓶,用甲醇溶解并定容至刻度,配成2.0 mg/mL单个标准储备液。

1.3.2 混合标准中间液

由于各目标化合物在仪器的响应值存在差异,因此需要配置不同浓度的混合标准中间液,配成浓度分别为100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL的混合标准中间液。

1.3.3 标准使用液

用甲醇配制标准使用液。绿原酸、没食子酸、丹参素钠、白藜芦醇、红景天苷、黄氏甲苷、甘草酸、大蒜素的质量浓度为1000 ng/mL、500 ng/mL、200 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL;芦丁、淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷的质量浓度为100 ng/mL、50 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL;芦荟苷、腺苷的质量浓度为10 ng/mL、5 ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL、0.1 ng/mL、0.05 ng/mL。

1.4 实验方法

1.4.1 样品前处理

准确称取各类样品2.00 g,至100 mL容量瓶中,加入甲醇50 mL,超声提取15 min,冷却后,用甲醇定容至刻度,经0.22 µm滤头过滤,滤液作为测试液。

1.4.2 色谱条件

色谱柱: Venusil MP C18 (100 mm×2.1 mm, 3 µm); 流动相 A: 0.1%甲酸水, 流动相 B: 乙腈, 流动相梯度: 0~3 min, 10% B 保持不变, 3~5 min, 90% B 保持不变; 5~7 min, 10% B 保持不变; 样量: 5 µL;

柱温：40 ℃。

1.4.3 质谱条件

离子源：电喷雾离子（ESI）源；正离子负离子交

替扫描；扫描方式：多反应监测（MRM）；气帘气流

量：30 L/min；雾化气流量：50 L/min；辅助加热气流

量：50 L/min；碰撞气：Medium；辅助加热气温度：

500 ℃；喷雾电压：5000 V（ESI+）/-4500 V（ESI-）；

离子源温度：500 ℃。

表 1 目标化合物的质谱检测参数

Table 1 MRM parameters for tandem mass spectrometry								
组分名称	母离子/ (m/z)	子离子/ (m/z)	驻留时间(Dwell time)/ms	入口电压 (EP)/V	碰撞室出口电 压(CXP)/V	去簇电压 (DP)/V	碰撞能量 (CE)/V	保留时间 t/min
绿原酸	399.3	353*	50	-10	-13	-10	-7	2.36
		191.1	50	-10	-13	-10	-25	
没食子酸	169	124.9*	50	-10	-13	-56	-20	1.82
		79	50	-10	-13	-56	-28	
丹参素钠	197	179*	50	-10	-13	-53	-14	2.08
		134.9	50	-10	-13	-53	-22	
芦荟苷	417.1	297.1*	50	-10	-13	-85	-22	2.74
		268.2	50	-10	-13	-85	-44	
白藜芦醇	227.1	185*	50	-10	-13	-80	-25	2.96
		143	50	-10	-13	-80	-32	
红景天苷	299.1	89*	50	-10	-13	-85	-16	2.19
		119.1	50	-10	-13	-85	-17	
芦丁	609.3	300.1*	50	-10	-13	-156	-48	2.48
		271	50	-10	-13	-156	-65	
淫羊藿苷	721.2	513.2*	50	-10	-13	-95	-24	2.8
		529.2	50	-10	-13	-95	-27	
苦杏仁苷	502.1	456.1*	50	-10	-13	-63	-16	2.36
		323.1	50	-10	-13	-63	-24	
芍药苷	525.2	449.1*	50	-10	-13	-65	-20	2.51
		327.1	50	-10	-13	-65	-27	
黄氏甲苷	785.6	143.2*	50	10	13	70	16	3.1
		437.5	50	10	13	70	29	
腺苷	268.1	136.2*	50	10	13	50	21	1.04
		97.3	50	10	13	50	27	
甘草酸	823.5	453.4*	50	10	13	194	34	3.37
		647.5	50	10	13	194	21	
大蒜素	163.1	135.1*	50	10	13	80	23	2.36
		77.1	50	10	13	80	30	

注：*表示定量离子。

1.4.4 线性关系

用空白样品基质作为溶剂，配制不同浓度的混合标准溶液，用 0.22 μm 微孔针头滤膜过滤，由低浓度至高浓度进行 HPLC-MS/MS 分析，每个浓度重复 3 次，绘制峰面积-质量浓度标准曲线，并计算线性范围，相关系数，精密度和以信噪比 RSN=3 对应质量浓度确定检出限。

1.4.5 回收率

取 2 份同一样品提取液 1 mL，其中 1 份用甲醇定容至 100 mL，另一份加入混合标准溶液再用甲醇定容至 100 mL。在同样色谱条件下进样检测 6 次，根据加标浓度前后的变化及加标量计算回收率。

1.5 数据统计分析

数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, ANOVE 进行方差分析, Duncan 对提取条件进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 超声时间的选择

通过查阅资料得知, 14 种功效成分均是醇溶性物质, 其中芦丁溶于甲醇, 微溶于乙醇。因此, 本文采用甲醇作为提取溶剂。超声时间对灵芝胶囊中功效成分提取浓度的影响如表 2 所示, 在 5~15 min 时, 提取时间对灵芝胶囊中所含功效成分的提取浓度逐渐增大, 且差异性显著 ($p<0.05$)。在 15~20 min 时, 超声

时间对灵芝胶囊功效成分的浓度随之下降, 但差异性不显著。

超声时间对灵芝胶囊中 14 种功效成分加标回收率的影响如表 3 所示, 取灵芝胶囊, 添加 2 $\mu\text{g/kg}$ 、20 $\mu\text{g/kg}$ 、200 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度混合标准液进行超声处理。由表 3 可知, 超声时间为 5 min、10 min、15 min、20 min, 14 种化合物的回收率范围分别为 75.90%~85.03%、82.03%~98.81%、86.83%~108.44%、86.95%~108.02%。化合物在超声时间为在 5 min 至 15 min 之间, 随着提取时间的延长, 化合物的回收率增大。超声时间在 20 min 时的回收率与 15 min 时的回收率没有显著性差异 ($p>0.05$)。因此, 本文选用 15 min 作为超声时间。

表 2 超声时间对灵芝胶囊功效成分提取浓度的影响

化合物	浓度/ (mg/kg)			
	5 min	10 min	15 min	20 min
腺苷	0.987.00±1.01 ^a	1.008±1.47 ^a	1.086±5.25 ^b	1.050±5.20 ^{ab}
没食子酸	28.801±2.10 ^{ab}	28.133±7.38 ^a	30.826±6.16 ^c	29.794±1.26 ^{bc}
红景天苷	57.827±9.22 ^a	59.561±5.87 ^b	62.005±4.63 ^c	60.948±7.02 ^c
淫羊藿苷	0.704±6.50 ^a	0.874±5.03 ^b	1.078±1.14 ^c	0.995±7.37 ^c

注: 同一行中不同字母代表样品的显著性差异 ($p<0.05$)。

表 3 超声时间对功效成分加标回收率的影响

化合物	回收率/%			
	5 min	10 min	15 min	20 min
绿原酸	80.51±3.27 ^b	87.04±1.96 ^a	90.39±2.85 ^a	90.81±2.94 ^a
没食子酸	78.64±2.21 ^b	82.03±1.53 ^b	91.62±2.36 ^a	90.44±3.54 ^a
丹参素钠	85.03±1.10 ^b	85.64±1.64 ^b	95.33±2.11 ^a	87.49±2.36 ^b
芦荟苷	80.82±3.95 ^b	87.39±1.33 ^b	86.83±0.47 ^a	87.54±0.65 ^a
白藜芦醇	77.78±1.71 ^c	82.32±2.32 ^b	87.10±1.73 ^a	86.95±0.80 ^a
红景天苷	83.68±1.47 ^b	90.46±0.78 ^a	89.67±2.63 ^a	90.82±3.65 ^a
芦丁	82.64±0.49 ^b	84.65±0.74 ^b	96.04±0.94 ^a	97.91±1.95 ^a
淫羊藿苷	76.78±2.62 ^c	97.75±5.42 ^b	108.44±1.61 ^a	108.02±0.98 ^a
苦杏仁苷	79.56±2.12 ^c	85.78±3.19 ^b	91.33±3.85 ^a	90.75±1.22 ^a
芍药苷	75.9±1.16 ^c	89.71±1.77 ^b	92.03±0.69 ^a	93.10±0.51 ^a
黄氏甲苷	79.94±0.38 ^c	86.74±1.32 ^b	92.59±2.63 ^a	92.67±3.05 ^a
腺苷	83.4±3.83 ^c	95.78±1.43 ^b	106.31±2.22 ^a	105.02±1.12 ^a
甘草酸	82.01±1.43 ^c	89.04±1.03 ^b	104.04±4.31 ^a	103.1±1.25 ^a
大蒜素	84.97±1.12 ^c	98.81±0.80 ^b	104.97±3.08 ^a	103.84±4.22 ^{ab}

注: 同一行中不同字母代表样品的显著性差异 ($p<0.05$)。

2.2 质谱条件的优化

大蒜素、甘草酸、腺苷、黄氏甲苷在 Q1 MS 负离子模式下, 响应较低, 达不到检出限要求, 在正离子

模式下形成[M+H]⁺峰, 响应较高; 绿原酸、没食子酸、芦荟苷、白藜芦醇、红景天苷、芦丁在 Q1 MS 负离子模式下形成的[M-H]⁻峰响应最高; 淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷在 Q1 MS 负离子模式下形成的[M+HCOO]⁻

峰响应最高,因此采用正负离子交替扫描的方式进行试验。调节 CE 参数,使母离子的强度占子离子强度的 1/3~1/4 为最佳,从质谱图中选择 1 个信号较强的子离子作为定性离子,离子丰度最强的子离子为定量离子,采用针泵流动注射标准溶液,进行参数优化。质谱参数确定后,连接液相色谱进样,由于各物质的离子源温度、辅助加热气、干燥气、气帘气、电喷雾电压等参数与在单纯质谱条件下发生变化,因此选择适中的一组参数在液相条件下进行再优化,最终得到最佳的去簇能量 (DP) 和碰撞能量 (CE)。

2.3 色谱条件的优化

本方法比较了乙酸铵水溶液-乙腈流动相体系和甲酸水溶液-乙腈流动相体系的分离效果,发现两者所得的峰形对称,目标化合物均在 5 min 内检出,但两者在响应值指标上甲酸水-乙腈体系优于乙酸铵-乙腈体系,故而本方法采用甲酸水溶液-乙腈作为流动相。图 1 为分别采用 0.1%甲酸水-乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵-乙腈作为流动相对 14 种目标化合物的响应值。

在流动相中加酸可抑制电离、改善峰形,但酸浓度过高会抑制在负离子模式下的离子化效率。同时考虑到 0.1%的甲酸水溶液已经足以满足检出限 (见 2.5.1) 响应的要求,过高浓度的酸溶液对色谱柱寿命有一定的影响,且不利于离子源中溶剂的高效脱除,所以最终选择了 0.1%的甲酸水溶液-乙腈作为流动相。

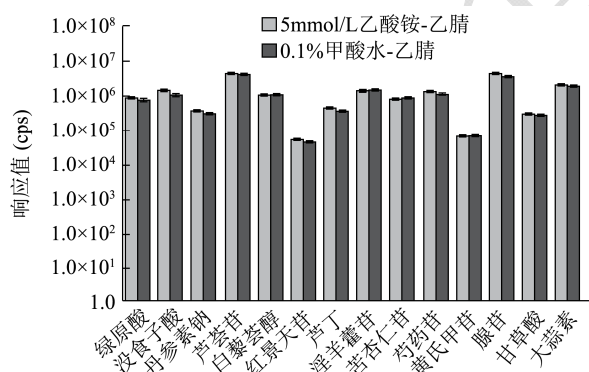


图 1 相同浓度的目标化合物在不同流动相中的响应值

Fig.1 Response values in different mobile phase

2.4 功效成分离子色谱图

功效成分提取离子色谱图见图 2。由图 2 可以看出,采用 2.2 和 2.3 确定的质谱条件和色谱条件,14 种目标化合物均在 4 min 内完成出峰,大部分物质可以较好的进行分离,绿原酸、芦丁、苦杏仁苷和大蒜素,白藜芦醇和黄氏甲苷无法较好的分离。同时,由于采用 MS/MS 检测器,通过 MRM 模式进行检测 14

种目标化合物的特征离子对,对没有完全分离的组分,仍可以进行准确定性及定量。结果表明,该色谱条件和质谱条件适宜 14 种目标化合物的分析。

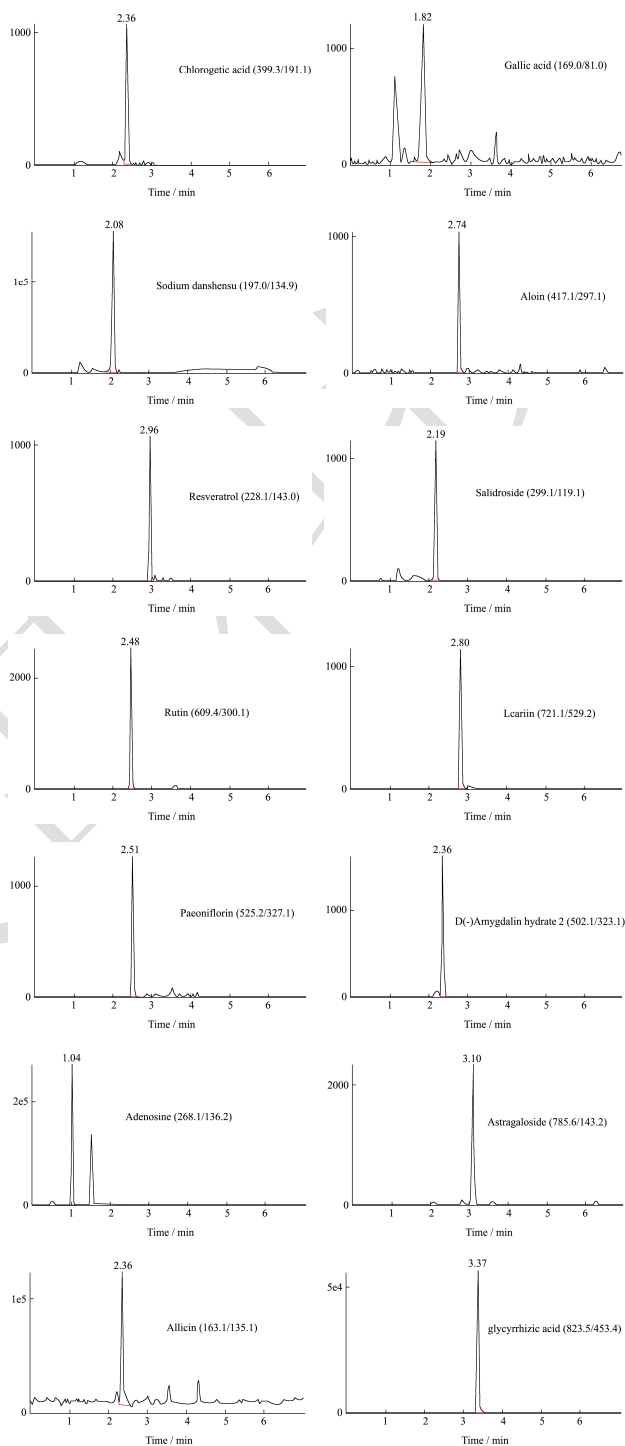


图 2 14 种植物功效成分的提取离子色谱图

Fig.2 Extraction ion chromatography of 14 kinds of functional components

2.5 方法验证

2.5.1 方法的线性范围、检出限、定量限

由于保健食品均含有一种或多种功效成分,其成

分较为复杂(如肽类、糖类、脂类等),用甲醇提取后,仍含有各种有机物,这些物质与目标化合物共流出色谱柱进入电离源时,将严重影响目标化合物的离子化过程,对目标物的信号产生抑制或增强的效果。保健品基质对14种功效成分的影响如表4所示,由表可知,标液在空白基质中的峰面积与标液在流动相中的峰面积的比值均小于1.0,说明保健食品的基质对功效成分具有离子抑制效应。

为了消除基质带来的离子抑制效应对定量测定的影响,试验采用空白样品基质作为溶剂,配制适当浓度的标准工作溶液。绿原酸、没食子酸、丹参素钠、白藜芦醇、红景天苷、黄氏甲苷、甘草酸、大蒜素在5~1000 ng/mL,芦丁、淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷

在0.5~100 ng/mL,芦荟苷、腺苷在0.05~10 ng/mL,依次进样,以14种目标峰的峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,分别得到标准曲线及线性方程,按3倍信噪比确定方法的检出限,10倍信噪比确定方法的定量限。结果表明:采用空白基质配制标准曲线能有效减少基质效应带来的影响,范围内呈现良好的线性关系,线性相关系数均>0.998。绿原酸、没食子酸、丹参素钠、白藜芦醇、红景天苷、黄氏甲苷、甘草酸、大蒜素检出限为75 μg/kg,芦荟苷、腺苷检出限为0.75 μg/kg,芦丁、淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷检出限为7.5 μg/kg。14种功效成分的线性方程、线性系数、检出限和定量限等参数见表5。

表4 保健食品基质对功效成分的影响

Table 4 Effect of health food substrates on functional ingredients

组分名称	浓度/(μg/kg)	峰面积		基质效应峰面积比值
		基质配标(cps)	流动相配标(cps)	
绿原酸	100	726300	770600	0.94
没食子酸	100	122100	140100	0.87
丹参素钠	100	255700	301500	0.85
芦荟苷	1	4048000	4349200	0.93
白藜芦醇	100	901800	1012000	0.89
红景天苷	100	45120	49110	0.92
芦丁	10	340700	403800	0.84
淫羊藿苷	10	1303000	1490200	0.87
苦杏仁苷	10	720700	790100	0.91
芍药苷	10	1156000	1281000	0.90
黄氏甲苷	100	51150	59110	0.87
腺苷	1	3963000	4311000	0.92
甘草酸	100	206000	245000	0.84
大蒜素	100	1784000	1998000	0.89

表5 14种化合物的线性相关系数、检出限和定量限

Table 5 Linearity, detection, and quantification limits for 14 kinds of functional components

组分名称	线性方程	线性系数r	线性范围/(ng/mL)	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
绿原酸	y=15521.06615x+8.74958e4	0.9982	5~1000	75	250
没食子酸	y=19665.29020x+3.16225e4	0.9983	5~1000	75	250
丹参素钠	y=8386.77782x+11343.30536	0.9981	5~1000	75	250
芦荟苷	y=3.53602e4x+339.25672	0.9987	0.05~10	0.75	2.5
白藜芦醇	y=8921.10090x+8297.34976	0.9985	5~1000	75	250
红景天苷	y=420.29959x+269.52469	0.9990	5~1000	75	250
芦丁	y=7662.96068x+647.09409	0.9988	0.5~100	7.5	25
淫羊藿苷	y=5302.14171x+793.40986	0.9982	0.5~100	7.5	25
苦杏仁苷	y=5758.90467x+1965.00369	0.9993	0.5~100	7.5	25
芍药苷	y=9837.41837x+571.99579	0.9985	0.5~100	7.5	25

转下页

接上页					
黄氏甲苷	$y=102.05504x+37.73299$	0.9986	5~1000	75	250
腺苷	$y=6.61679e4x+2626.86279$	0.9991	0.05~10	0.75	2.5
甘草酸	$y=1640.93776x+3345.41165$	0.9983	5~1000	75	250
大蒜素	$y=4120.93650x+14471.76835$	0.9990	5~1000	75	250

2.5.2 方法的回收率和精密度

取灵芝胶囊、藏域红天胶囊、虫草菌丝体口服液添加混合标准溶液得绿原酸、没食子酸、丹参素钠、白藜芦醇、红景天苷、黄氏甲苷、甘草酸、大蒜素浓度为 100 μg/kg、200 μg/kg、500 μg/kg；芦荟苷、腺苷浓度为 1 μg/kg、2 μg/kg、5 μg/kg；芦丁、淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷浓度为 10 μg/kg、20 μg/kg、50 μg/kg，每个浓度 6 个平行，按照 1.4.5 的方式进行添加实验。检测结果在 1 μg/kg~500 μg/kg 浓度范围内，扣除空白值后，加标回收率在 83.42%~108.44%范围内，所有目标峰的相对标准偏差均小于 5.0%，详见表 6。

表 6 方法准确度和精密度

Table 6 Accuracy and precision for 14 kinds of functional components

组分名称	添加水平/ (μg/kg)	灵芝胶囊		藏域红天胶囊		虫草菌丝体口服液	
		平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	100	88.91	0.83	91.21	1.32	87.06	1.99
	200	90.30	1.34	90.34	3.21	87.73	1.82
	500	96.29	2.01	95.58	1.36	88.14	2.27
没食子酸	100	93.28	1.82	89.11	0.89	84.64	2.70
	200	91.55	1.23	88.26	1.58	87.07	3.73
	500	91.51	1.56	94.54	2.17	102.97	3.33
丹参素钠	100	94.62	2.29	94.13	0.81	95.44	1.10
	200	95.33	1.03	90.41	1.98	89.28	3.28
	500	93.32	0.97	91.10	1.77	93.37	0.79
芦荟苷	1	86.41	2.22	84.63	1.01	85.83	2.83
	2	86.81	2.31	91.22	3.98	99.59	4.09
	5	96.66	1.06	90.34	1.97	86.73	3.56
白藜芦醇	100	84.41	2.45	86.42	1.20	103.80	2.34
	200	87.10	4.07	88.87	2.19	92.02	3.23
	500	88.83	2.70	91.39	2.56	86.84	2.36
红景天苷	100	90.17	2.54	87.51	1.09	98.35	1.85
	200	89.59	2.66	94.24	1.90	93.44	1.82
	500	90.02	1.08	88.50	1.45	87.51	1.16
芦丁	10	104.01	2.91	93.23	0.81	84.11	1.82
	20	96.04	1.89	99.92	1.70	86.14	1.74
	50	98.60	2.02	92.11	0.76	88.72	2.49
淫羊藿苷	10	92.32	3.33	95.43	2.65	87.16	3.12
	20	108.44	3.49	98.36	2.29	86.25	1.91
	50	87.30	1.98	89.22	3.56	86.46	1.51
苦杏仁苷	10	98.10	2.31	91.13	1.40	102.03	1.76
	20	91.26	2.00	99.33	1.91	93.78	2.70
	50	98.33	3.08	90.00	3.54	93.00	3.30
芍药苷	10	90.51	2.42	88.42	1.09	94.81	4.35
	20	91.99	2.87	98.60	2.56	85.66	1.82
	50	92.48	1.99	91.51	3.21	84.78	2.43

转下页

接上页

黄氏甲苷	100	92.94	3.29	103.20	1.99	83.42	2.98
	200	92.56	2.10	98.92	1.98	90.08	1.49
	500	91.30	2.10	100.21	3.43	86.53	2.05
腺苷	1	107.64	2.96	91.23	1.08	91.82	3.57
	2	106.32	4.43	99.08	2.00	87.84	1.77
	5	103.64	3.86	90.54	1.76	101.06	4.55
甘草酸	100	105.22	2.05	90.94	1.86	93.67	4.65
	200	104.02	2.67	94.26	3.90	86.83	2.35
	500	102.53	3.01	95.65	2.94	94.18	1.60
大蒜素	100	92.91	1.52	91.23	1.97	88.67	1.15
	200	105.04	1.79	88.82	2.29	88.49	2.31
	500	97.16	1.09	86.34	1.86	87.06	1.99

2.5.3 样品适用性实验

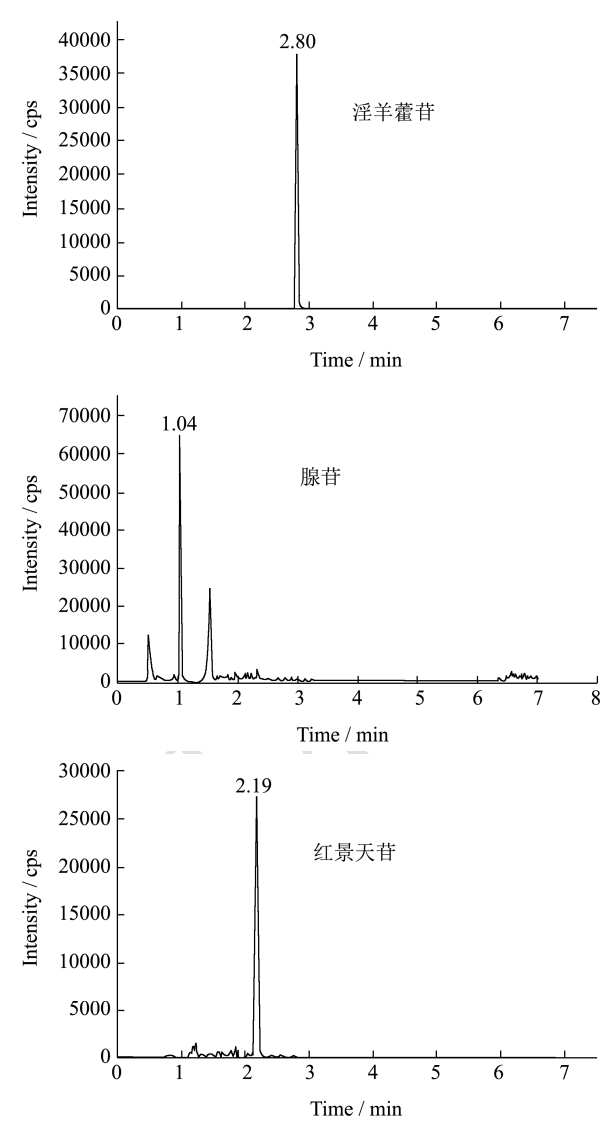


图3 不同样品的植物功效成分的总离子流色谱图

Fig.3 TIC of functional components in different samples

用本方法对市售的保健食品(洋参淫羊藿软胶囊、虫草菌丝体口服液、红景天参杞牛磺酸口服液)进行检测,分别检测出淫羊藿苷(18.0 g/kg,该洋参淫羊

藿软胶囊中淫羊藿苷的浓度较高,在前处理过程中,将测试液逐级稀释 4000 倍后上机测定)、腺苷(0.12 g/kg)、红景天苷(2.4 g/kg),受干扰小,分析速度快(分析时间小于 4 min),实现了一种方法适用于多种保健食品的功效成分的检测,离子色谱图见图 3。

3 结论

3.1 本文通过对保健食品中绿原酸、没食子酸、丹参素钠、白藜芦醇、红景天苷、黄氏甲苷、甘草酸、大蒜素、芦丁、淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷、芦荟苷、腺苷检测条件的探索,当甲醇提取,超声 15 min,流动相为 0.1%的甲酸水溶液-乙腈,正负离子交替扫描时检测条件最佳。该方法能在 4 min 内完成出峰,能很好的将 14 种植物功效成分分离,以信噪比为 3 和 10 分别计算出 14 种功效成分的检出限及定量限,其中绿原酸、没食子酸、丹参素钠、白藜芦醇、红景天苷、黄氏甲苷、甘草酸、大蒜素检出限为 75 μg/kg,定量限为 250 μg/kg;芦荟苷、腺苷检出限为 0.75 μg/kg,定量限为 2.5 μg/kg;芦丁、淫羊藿苷、苦杏仁苷、芍药苷检出限为 7.5 μg/kg,定量限为 25 μg/kg。

3.2 对于保健食品中多种功效成分同时测定的方法一直是国内学者研究的方向,本文建立了一种超高效液相色谱-串联质谱同时测定保健食品中植物功效成分的检测方法,本方法具有前处理简单,快捷简便、高效高通量等特点,可为含有多种功效成分的保健食品的生产、研发及质量监控提供高效、准确和灵敏的检测手段。

参考文献

[1] 李素云.保健食品中功效成分检测方法的研究[D].山东大学,2004

LI Su-yun. Study on the detection method of functional ingredients in health food [D]. Shandong University, 2004

- [2] 郑湘娟,余淑娟,徐晓芳,等.紫外分光光度法测定虎杖中白藜芦醇的含量[J].时珍国医国药,2008,19(8):1881-1882
ZHENG Xiang-juan, YU Shu-xian, XU Xiao-fang, et al. The determination of pterostilbene in *Polygonum cuspidatum* Sieb. by UV spectrophotometry method [J]. Chinese Medicine, 2008, 19(8):1881-1882
- [3] 郭健,李敏,王美茜,等.金银花类保健食品中绿原酸含量HPLC测定[J].中国公共卫生,2006,22(4):438-438
GUO Jian, LI Min, WANG Mei-qian, et al. Determination of chlorogenic acid content in honeysuckle health food by HPLC [J]. Chinese Journal of Public Health, 2006, 22(4): 438-438
- [4] 林夏,胡军华,崔培超,等.HPLC同时测定大花红景天提取物中没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):102-105
LIN Xia, HU Jun-hua, CUI Pei-chao, et al. Determination of gallic acid, salidroside, tyrosol and p-coumaric acid in *Rhodiola* extract by HPLC [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(10): 102-105
- [5] 李慧敏,程泽能.高效液相色谱法检测减肥通便茶类保健食品中没食子酸的含量[J].中南药学,2014,9:915-918
LI Hui-min, CHENG Ze-neng. HPLC determination of gallic acid in health food [J]. Central South Pharmacy, 2014, 9: 915-918
- [6] 徐硕,梁晓丽,金鹏飞,等.高效液相色谱法测定保健品中白藜芦醇的含量[J].中南药学,2015,11:1210-1212
XU Shuo, LIANG Xiao-li, JIN Peng-fei, et al. Determination of resveratrol in health products by HPLC [J]. Central South Pharmacy, 2015, 11: 1210-1212
- [7] Mao Y, Li Y, Yao N. Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in extracts of *Rhodiola* L. by microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 45(3): 510-515
- [8] 任强,吴昊,聂其婷,等.HPLC-DAD法同时测定苦荞麦保健食品中芦丁、槲皮素、山奈酚含量[J].济宁医学院学报,2016,39(5):317-319
REN Qiang, WU Hao, NIE Qi-ting, et al. Simultaneous determination of rutin, quercetin and kaempferol in tartary buckwheat functional food by HPLC-DAD [J]. Jining Medical University, 2016, 39(5): 317-319
- [9] 黎源倩,余洪玲,曾红燕,等.高效液相色谱法测定保健食品中的淫羊藿苷[J].中华预防医学杂志,2002,36(5):336-338
LI Yuan-qian, YU Hong-ling, ZENG Hong-yan, et al. Determination of icariin in health products by HPLC [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2002, 36(5): 336-338
- [10] 甘宾宾,刘培杰,杨睿.高效液相色谱法测定保健食品中的芍药苷含量的研究[J].中国卫生检验杂志,2013,4:851-854
GAN Bing-bing, LIU Jie-pei, YANG Rui. Determination of paeoniflorin in health food by HPLC [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 4: 851-854
- [11] 鲁琳,吴西梅,黄湘东,等.HPLC法测定虫草类保健品中腺苷的含量[J].中国卫生检验杂志,2012,4:704-706
LU Lin, WU Xi-mei, HUANG Xiang-dong, et al. Determination of adenosine content in cordyceps healthcare products by HPLC [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 4: 704-706
- [12] 刘建伟,李青,崔勇,等.高效液相色谱法-蒸发光散射检测器测定保健食品中黄芪甲苷含量[J].中国卫生工程学,2009,6:354-355
LIU Jian-wei, LI Qing, CUI Yong, et al. Determination of astragaloside A in health foods by HPLC-ELSD [J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2009, 6: 354-355
- [13] 方从容,杨大进.保健食品中甘草酸测定方法的研究[J].中国卫生检验杂志,2007,17(6):986-987
FANG Cong-rong, YANG Da-jin. Study on assay method for glycyrrhizic acid in health foods [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(6): 986-987
- [14] 徐丽红,王建清,张巧艳,等.HPLC法检测保健食品中大蒜素的含量[J].浙江农业学报,2012,24(4):711-717
XU Li-hong, WANG Jian-qing, ZHANG Qiao-yan, et al. Determination of allicin in dietary supplement by HPLC [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2012, 24(4): 711-717
- [15] 中华人民共和国卫生部,保健食品检验与评价技术规范. 2003
Ministry of Health of P.R.C. Technical Standards for Testing and Assessment of Health Food. 2003
- [16] Huang H, Liang M, Zhang X, et al. Simultaneous determination of nine flavonoids and qualitative evaluation of *Herba epimedii* by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. Journal of Separation Science, 2007, 30(18): 3207-3213
- [17] Beringhs A O, Dalmina M, Creczynski-Pasa T B, et al. Response surface methodology iv-optimal design applied to the performance improvement of an RP-HPLC-UV method for the quantification of phenolic acids in *Cecropia Glaziovii* products [J]. Revista Brasileira De Farmacognosia, 2015, 25(5): 513-521

- [18] Melo L V D, Sawaya A C H F. UHPLC - MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as *Guaco* (*Mikania Glomerata*, and *Mikania*

Laevigata) [J]. Revista Brasileira De Farmacognosia, 2015, 25(2): 105-110