

高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健食品中淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素

陈建平, 谢皓玥*, 周际宇

(自贡检验检测院, 自贡 643000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定保健食品中淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素的分析方法。**方法** 样品经 70% 甲醇提取后, 采用 0.1%甲酸(A)和乙腈(B)作为流动相进行梯度洗脱, 质谱离子源选用电喷雾离子(electron spray ionization, ESI+)源, 采用多离子检测模式(multiple reaction monitoring, MRM)对定量离子和定性离子进行监测, 在液相色谱-串联质谱仪上测定。**结果** 在 15 min 内完成 3 种目标化合物的分离分析。3 种功能成分在 0.25、0.5 和 5 mg/kg 添加水平的回收率为 84.3%~95.0%, 相对标准偏差为 0.67%~2.11%(n=7), 方法检出限分别为 0.05、25、10 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合保健食品中淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素的同时检测。

关键词: 保健食品; 高效液相色谱-串联质谱法; 淫羊藿苷; 金丝桃苷; 补骨脂素

Simultaneous determination of icariin, hyperoside and psoralen in functional food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Jian-Ping, XIE Hao-Yue*, ZHOU Ji-Yu

(Zigong Inspection and Testing Institute, Zigong 643000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of icariin, hyperoside and psoralen in functional food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted with 70% methanol solution, and 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) as mobile phase were used for gradient elution. The electron spray ionization (ESI+) source was selected for mass spectrometry ion source, and the quantitative ion and qualitative ions were monitored by multiple reaction monitoring (MRM), and determined by HPLC-MS/MS. **Results** This method completed the separation and analysis of 3 target compounds in 15 minutes. The recoveries were ranged from 84.3% to 95.0% for the 3 kinds of target compound with 3 spiked levels of 0.25, 0.5 and 5 mg/kg. The relative standard deviations (RSDs) were from 0.67% to 2.11% (n=7), and the limits of detection (LOD) for the 3 kinds of target compound were 0.05, 10, 25 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for detecting icariin, hyperoside and psoralen in functional food.

KEY WORDS: functional food; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; icariin;

*通信作者: 谢皓玥, 工程师, 主要研究方向为食品药品安全检测。E-mail: 258350711@qq.com

*Corresponding author: XIE Hao-Yue, Engineer, Zigong Inspection and Testing Institute, No.6, Rongchuan Road, Yantan District, Zigong 643000, China. E-mail: 258350711@qq.com

hyperoside; psoralen

0 引言

2020年新冠病毒突袭全球,在恐慌与死亡面前,大众对健康的重视达到最高点,提高自身免疫力以增强抗病毒能力成为人们的迫切需求。功能成分是保健食品保健功能的关键所在,增强免疫类保健食品一直是市场销售热点^[1-2]。作为可用于保健食品的中药,淫羊藿、金丝桃苷、补骨脂在增强免疫类保健食品中广泛存在,而淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素是温肾壮阳填精益髓的主要功能成分^[3-5]。目前国家标准中的技术要求重点对产品的安全性指标做出了具体的限度规定并明确了检验方法,但是国家对于相关功能成分未做规定^[6]。原卫生部2003年版《保健品检验与评价规范》已经作废,而新的评价规范尚未出台,检测标准真空导致检测机构无法依照国家标准进行法定检测,对保健食品的监管十分不利^[7]。现有检测方法对于含有多种功能成分的保健食品难以实现多组分同时测定,而且因其灵敏度偏低、专属性差,对于保健食品中低浓度样品的分析能力不足^[8]。高效液相色谱法因其对复杂样品高分离能力的色谱优势以及质谱的高选择性,高灵敏度的定性和定量分析,广泛应用于食品、药品、环境等领域,为食品、药品原材料筛选、质量控制等提供了有效可靠快速的分析手段^[9-11]。并且高效液相色谱仪目前已在基层食品检测机构广泛配备,属于常规检测设备在日常检测工作中大量运用^[12-13]。已有相关文献^[14-16]报道,采用高效液相色谱法分别检测药品中的淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素,但只是采用紫外光谱法定性定量,准确度低,采用不同的分离提取方法单个检测,效率低。本研究采用高效液相色谱质谱联用法针对性检测保健食品中淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素,建立统一的样品前处理方法,同时运用保留时间和离子丰度比的一致性进行定性确证,多种物质同时检测具有高效准确快速的优点。依照GB/T 5009.1—2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》^[17],同时参考中国药典9101药品质量标准分析方法验证指导原则,决定采用标准物质,并进行方法学考察,以期对相关分析标准的制定提供技术支撑,补足现行标准保健食品功能成分检测的短板,满足食品检验机构日常检验和市场监管部门的监管需求,利用技术手段打击保健食品市场上长期存在的制假售假、虚假广告宣传等违法行为。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

API4000Qtrap液相色谱-串联质谱仪(美国AB公司); AUTO EVA 氮吹仪(厦门睿科公司); H1850 离心机(湖南

湘仪公司); SCQ-6201C 超声仪(上海声彦公司)。

对照品: 金丝桃苷(111521-201809, 质量分数 94.9%)、淫羊藿苷(110737-201516, 质量分数 94.2%)、补骨脂素(11739-201918, 99.6%)(中国食品药品检定研究院)。

乙腈、甲醇(色谱纯, 美国天地公司); 甲酸(分析纯, 国药集团); 0.22 μm 尼龙滤头(天津津腾公司); 实验室用水为超纯水。

实验样品为硫酸软骨素淫羊藿杜仲叶补骨脂胶囊。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

标准溶液配制: 分别准确称取 10 mg 的金丝桃苷、淫羊藿苷、补骨脂素对照品到 100 mL 的容量瓶中, 用甲醇配成质量浓度为 1 mg/mL 标准贮备液, -20 °C 保存。量取 3 种贮备液, 置于棕色容量瓶中, 用甲醇稀释成质量浓度为 1 μg/mL 工作液。

0.1%甲酸水溶液: 取 1 mL 甲酸于 1000 mL 容量瓶中, 定容至 1000 mL, 抽滤超声除去气泡。

1.2.2 液相色谱-串联质谱条件

(1)液相色谱条件

安捷伦 Poroshell SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm); 流动相: 0.1%甲酸(A)-乙腈(B), 流速: 0.5 mL/min; 进样体积: 10 μL; 柱温: 35 °C。液相色谱梯度洗脱程序: 0~3.0 min, 20%~70%B; 13.0~13.1 min, 70%~20%B; 13.1~15.0 min, 20%B。

(2)质谱条件

离子源: 电喷雾电离[electron spray ionization, ESI(+)]; 帘气(curtain gas): 35 psi; 碰撞气(collison gas): 中等; 喷雾电压(ion spray voltage): 5500 V; 雾化温度: 550 °C; 雾化气(ion source gas1): 60 psi; 辅助气(ion source gas2): 60 psi; 扫描模式: 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

分别将淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素标准溶液配制成 1 μg/mL 浓度的标准溶液, 使用针泵直接接入质谱, 首先在正离子模式下根据化合物分子量进行 Q1 全扫描, 确定母离子的质荷比; 然后二级质谱扫描, 选取丰度较强、干扰较小的 2 个子离子分别作为定性及定量离子, 并优化去簇电压(declustering potential, DP), 碰撞电压(collison energy, CE)和碰撞室出口电压(cell exit potential, CXP), 3 种化合物质谱参数优化结果见表 1。

图 1 为提取离子色谱图, 其中补骨脂素的丰度比为 70, 金丝桃苷的丰度比为 2.76, 淫羊藿苷的丰度比为 57。

表 1 质谱参数
Table 1 Mass spectrometry parameters

编号	化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间/ms	去簇电压/V	碰撞能量/V	碰撞室出口电压/V
1	淫羊藿苷	677.3	369.2*	100	110	38	10
		677.3	313.3	100	110	77	10
2	金丝桃苷	465.1	303.0*	100	82	18	20
		465.1	85.0	100	84	54	20
3	补骨脂素	186.9	130.9*	100	100	38	7
		186.9	114.9	100	100	33	7

注: *为定量离子。

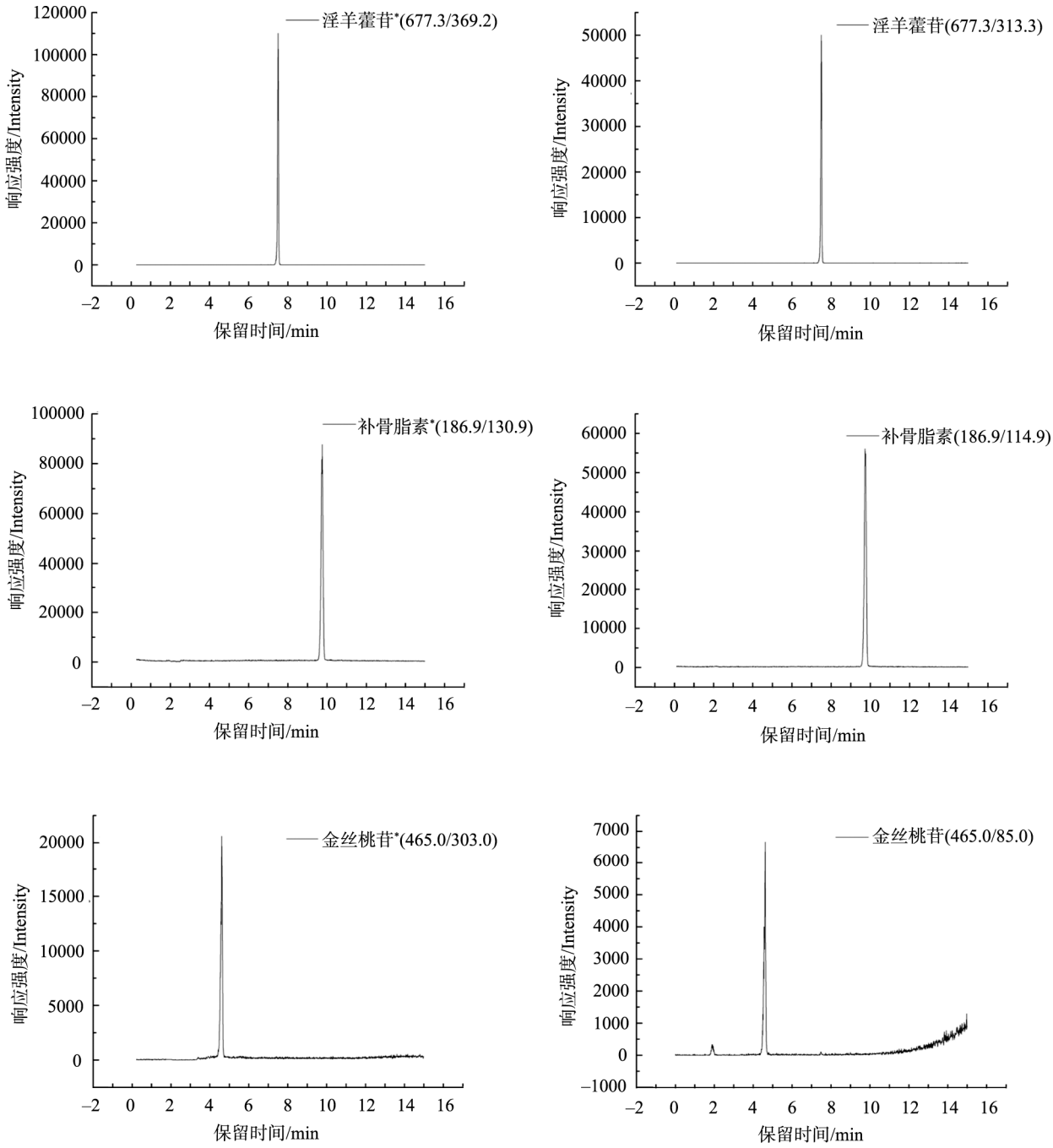


图 1 提取离子色谱图
Fig.1 Extracted ion chromatogram

2.2 提取条件优化

称取样品 1 g, 置于 50 mL 离心管中, 用 15 mL 70%甲醇超声提取 30 min, 离心过滤至 50 mL 容量瓶中, 残渣用 15 mL 70%甲醇重复提取 1 次, 再定容至刻度(视具体情况稀释至线性范围内), 用 0.22 μm 有机滤头过滤。对实验样品进行了超声和加热回流 2 种提取方式的分析, 在相同时间内 2 种方式所得结果无明显区别, 故采用超声进行提取。同时对实验样品进行了不同超声时间比较, 在 5~30 min 时, 提取浓度呈逐渐增大趋势, 而 30 min 以后提取浓度无明显变化。故采用 30 min 作为超声提取时间。

2.3 线性范围、检出限及精密度

按照 1.2.1 配制 1、5、10、50、100 ng/mL 的标准溶液, 以质量浓度为横坐标(ng/mL)、目标化合物峰面积为纵坐标绘制基质工作曲线, 线性方程及相关系数见表 2。以信噪比为 3(S/N=3)时的标准溶液浓度(μg/kg)作为仪器检出限, 以称样量为 1 g, 定容至 50 mL 计算方法检出限(limits of detection, LOD), 结果见表 2。由表 2 可知, 在 1~100 ng/mL 范围内目标化合物线性相关性良好, 相关系数(r)均大于 0.9998。相对标准偏差为 0.67%~2.11%(n=7), 方法检出限分别为 0.05、25、10 μg/kg, 检出限和精密度良

好, 说明该方法适用于保健食品中淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素的检测。

2.4 回收率

以空白样品为对照, 在 0.25、0.5 和 5 mg/kg 三个水平下进行加标回收实验, 回收率结果为表 3。由表 3 可知, 在 0.25、0.5 和 5 mg/kg 添加水平下的回收率为 84.3%~95.0%, 说明该方法满足检测的条件。

2.5 实际样品测定

对市售数种宣称具有增强免疫力且成分中含有淫羊藿的保健食品进行了检测, 成分表均含有淫羊藿提取物但未标示准确含量。经此方法检测均含有淫羊藿苷, 含量在 0.21~15.4 mg/g 之间, 差异较大, 而淫羊藿的另一功效成分金丝桃苷含量则在 0~0.29 mg/g 之间。

3 结 论

本研究采用高效液相色谱质谱联用仪同时对保健食品中淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素进行检测, 运用保留时间和离子丰度比的一致性进行定性比较, 前处理简单, 准确性、线性、检出限均能满足要求。本方法可用于食品检测机构对保健食品中功效成分的检测, 并以期为保健食品中功效成分的检测标准的制定提供参考。

表 2 线性范围、检出限及精密度结果(n=7)
Table 2 Results of linearity range, detection limit and precision (n=7)

化合物	线性方程	相关系数(r)	方法检出限/(μg/kg)	精密度/%
淫羊藿苷	Y=3.66e+003X+1.9e+004	0.9999	0.05	0.67
金丝桃苷	Y=1.24e+003X-226	1.0000	25	2.11
补骨脂素	Y=6.12e+003X+2.77e+003	0.9998	10	1.70

表 3 回收率结果
Table 3 Recovery results

化合物	加标 1		加标 2		加标 3		平均回收率/%
	加标水平/(mg/kg)	回收率/%	加标水平/(mg/kg)	回收率/%	加标水平/(mg/kg)	回收率/%	
淫羊藿苷	0.25	94.8	0.5	93.2	5	97.1	95.0
金丝桃苷	0.25	78.1	0.5	83.3	5	91.4	84.3
补骨脂素	0.25	82.0	0.5	87.6	5	95.9	88.5

参考文献

[1] 张悦, 高建峰. 时疫背景下的保健食品行业发展道路[J]. 科技智囊, 2020, (6): 54-57.
ZHANG Y, GAO JF. Development of health food industry in the context of epidemic [J]. Think Tank Sci Technol, 2020, (6): 54-57.

[2] 张士恒. 免疫力保健品迎来小阳春[J]. 知识经济, 2020, (2): 132-133.
ZHANG SH. Immunity health products meet gong opportunities [J]. Knowl Econ, 2020, (2): 132-133.

[3] 鲁亚奇, 张晓, 王金山, 等. 补骨脂化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 180-189.
LU YQ, ZHANG X, Wang JJ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of psoralea fructus [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(3): 180-189.

- [4] 袁航, 曹树萍, 陈抒云, 等. 淫羊藿的化学成分及质量控制研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(24): 3630–3640.
YUAN H, CAO SP, CHEN SY, *et al.* Research progress on chemical constituents and quality control of epimedium folium [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2014, 45(24): 3630–3640.
- [5] 齐晓甜, 赵春媛, 张家祥, 等. 中药类保健食品增强免疫力功能评价现状和研究策略[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 875–879.
QI XT, ZHAO CY, ZHANG JX, *et al.* Current evaluation situation and research strategies on enhanced immune function of health food containing Chinese materia medica [J]. Chin J Chin Mater Med, 2019, 44(5): 875–879.
- [6] 戴莹, 于春媛, 周立新, 等. 中药类保健食品质量安全主要风险因子分析[J]. 首都食品与医药, 2018, 6(1): 142–144.
DAI Y, YU CY, ZHOU LX, *et al.* Analysis on main risk factors of quality and safety of traditional Chinese medicine health food [J]. Capit Food Med, 2018, 6(1): 142–144.
- [7] 李江华, 李丹. 我国保健食品法律法规体系与标准体系现状[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 318–323.
LI JH, LI D. Current status of Chinese legal system and standard system for health food [J]. Food Sci, 2011, 32(21): 318–323.
- [8] 代云桃, 靳如娜, 孙蓉, 等. 中药保健食品的质量控制现状和研究策略[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 880.
DAI YT, JIN RN, SUN R, *et al.* Current situation and research strategy of quality control of health food containing Chinese materia medica [J]. Chin J Chin Mater Med, 2019, 44(5): 880.
- [9] 王聪, 梁瑞强, 曹进, 等. 液相色谱-质谱联用法测定保健食品中9种脂溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 991–999.
WANG C, LING RQ, CAO J, *et al.* Determination of 9 kinds of fat-soluble vitamins in healthy foods by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(3): 991–999.
- [10] 迟少云, 裴琳, 王超. 液相色谱-离子阱质谱联用法快速检测补肾壮阳类保健食品中非法添加的11种化学物质[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(22): 3852–3854.
CHI SY, PEI L, WANG C. Rapid detection of illegal added chemicals in kidney strong health products with HPLC-MS [J]. Chin J Health Lab Tech, 2015, 25(22): 3852–3854.
- [11] 舒展, 王琤帅. 液相色谱-高分辨率四级杆飞行时间质谱联用法测定保健食品中非法添加的N-去甲基他达拉非[J]. 中国药业, 2017, 26(4): 22–26.
SHU Z, WANG CS. Determination of N-demethyltadalafil illegally added in dietary supplements by HPLC-QTOF [J]. Chin Pharm, 2017, 26(4): 22–26.
- [12] 鲁艺, 邱颖娟, 陈平平. 降压类保健食品及中成药中添加化学药品的液相色谱-质谱联用测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1913–1917.
LU Y, QIU YH, CHEN PP. Detection of chemical composition mixed into health care food and traditional Chinese medicine antihypertensive preparations by the liquid chromatography-quadrupole mass spectrometry method [J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(10): 1913–1917.
- [13] 甘宾宾, 汤艳荣, 蒋世琼. 高效液相色谱-质谱联用技术在食品安全中的应用及进展[J]. 化工技术与开发, 2009, 38(12): 33–37.
GAN BB, TANG YR, JIANG SQ. Progress and applications of HPLC/MS technology in food safety [J]. Technol Dev Chem Ind, 2009, 38(12): 33–37.
- [14] 俞吉, 朱裕林, 桑冉, 等. 高效液相色谱法测定骨疏灵颗粒中淫羊藿苷含量[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(6): 691–693.
YU J, ZHU YL, SANG R, *et al.* Determination of icariin in Gushuling granule by HPLC [J]. Pract Pharm Clin Reme, 2015, 18(6): 691–693.
- [15] 王珍, 李秀霞, 李娇, 等. 高效液相色谱法测定山楂中芦丁、金丝桃苷和槲皮素的含量[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 302–305.
WANG Z, LI XX, LI J, *et al.* Determination of rutin, hyperoside and quercetin in extract from crataegus pinnatifida by HPLC [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(9): 302–305.
- [16] 李俊娟, 李军. HPLC法测定补骨脂药材中补骨脂素和异补骨脂素[J]. 中成药, 2012, 34(8): 1545–1548.
LI JJ, LI J. Assay of psoralen and isopsoralen in psoraleae fructus by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2012, 34(8): 1545–1548.
- [17] GB/T 5009.1—2003 食品卫生检验方法 理化部分 总则[S].
GB/T 5009.1—2003 Methods of food hygienic analysis-Physical and chemical section-General principles [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



陈建平, 主管中药师, 主要研究方向为食品药品安全检测。
E-mail: 282450626@qq.com



谢皓玥, 工程师, 主要研究方向为食品药品安全检测。
E-mail: 258350711@qq.com