

高效液相色谱法测定免疫功能型保健食品中 8种功效成分

陈东洋, 冯家力, 张昊*, 曾栋, 刘先军, 李帮锐

(湖南省疾病预防控制中心, 长沙 410005)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定免疫功能型保健食品中8种功效成分(左旋肉碱、L-茶氨酸、天麻素、吡啶甲酸铬、咖啡因、淫羊藿苷、菊苣酸、10-羟基- α -癸烯酸)的分析方法。**方法** 样品用70%甲醇超声提取, 采用C₁₈色谱柱分离, 以甲醇-磷酸二氢钾(0.1%磷酸)水溶液为流动相, 梯度洗脱, 外标法定量。**结果** 左旋肉碱、L-茶氨酸在10.0~150.0 mg/L, 吡啶甲酸铬、天麻素、咖啡因和淫羊藿苷在1.5~30.0 mg/L, 菊苣酸在5.0~100.0 mg/L, 10-羟基- α -癸烯酸在2.5~50.0 mg/L质量浓度与色谱峰面积有良好的线性关系, 相关系数 $r \geq 0.9990$ 。方法检出限为1~10 mg/kg, 回收率为93.8%~108%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为0.7%~6.8%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合保健食品中8种增强免疫力功效成分的同时测定。**关键词:** 保健食品; 免疫功能型; 功效成分; 高效液相色谱法

Determination of 8 kinds of functional components in immune functional health food by high performance liquid chromatography

CHEN Dong-Yang, FENG Jia-Li, ZHANG Hao*, ZENG Dong, LIU Xian-Jun, LI Bang-Rui

(Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the simultaneous determination of 8 functional components (*L*-carnitine, *L*-theanine, gastrodin, chromium picolinate, caffeine, icariin, cichoric acid and 10-hydroxy- α -decenoic acid) in immune functional health food by high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were extracted by ultrasound with 70% methanol, and separated on a C₁₈ column, using methanol-potassium dihydrogen phosphate (0.1% phosphoric acid) aqueous solution as the mobile phase with gradient elution, and quantified by external standard method. **Results** The mass concentrations of *L*-carnitine and *L*-theanine in the range of 10.0 to 150.0 mg/L, chromium picolinate, gastrodin, caffeine and icariin in the range of 1.5 to 30.0 mg/L, cichoric acid in the range of 5.0 to 100.0 mg/L, and 10-hydroxy- α -decenoic acid in the range of 2.5 to 50.0 mg/L had good linear relationship with the chromatographic peak area, and the correlation coefficient $r \geq 0.9990$. The detection limits of the method were 1–10 mg/kg, the recoveries were 93.8%–108%, and the relative standard deviations were 0.7%–6.8%. **Conclusion** This method is rapid, accurate and sensitive, and is suitable for the simultaneous determination of 8 functional compositions in health food.

基金项目: 湖南省卫健委科研项目(B20140134、B20160073、C20190035)

Fund: Supported by the Research Project of Hunan Provincial Health Commission (B20140134, B20160073, C20190035)

*通信作者: 张昊, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhanghao678g@foxmail.com

*Corresponding author: ZHANG Hao, Master, Technician, Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, No.450, Furong Middle Road, Changsha 410005, China. E-mail: zhanghao678g@foxmail.com

KEY WORDS: health food; immune functional type; functional composition; high performance liquid chromatography

0 引言

保健食品具有调节人体功能的作用, 但不以治疗疾病为目的, 是具有特定保健功能, 适用于特定人群食用的食品^[1-2]。当前, 在我国保健食品的申报功能有减肥、缓解体力疲劳、增强免疫力和营养素补充剂等 28 项^[3], 其中免疫功能型保健食品市场规模较大, 占比很高^[4]。因此, 对免疫功能型保健食品中功能成分进行有效测定, 对保健食品质量控制具有重要的意义。

左旋肉碱、*L*-茶氨酸、天麻素、吡啶甲酸铬、咖啡因、淫羊藿苷、菊苣酸和 10-羟基- α -癸烯酸(10-HAD)被认为具有提高机体非特异性免疫功能及细胞免疫的功效, 对人体的免疫功能有着很好的保健作用, 常应用于免疫功能型保健食品^[5-9]。目前对这 8 种功效成分的测定方法主要有电化学方法^[10]、气相色谱法^[11]、紫外分光光谱法^[12-13]、液相色谱法^[14-17]、液相色谱质谱法^[18-20]等, 但对保健食品中同类多组分同时测定的文献报道较少, 建立高通量、多组分同时测定方法对检测大批量样品具有重要的实际意义。本研究通过优化前处理方法和色谱条件, 建立了高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定保健食品中 8 种增强免疫力功效成分, 以期对免疫力功能型保健食品的质量控制提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 液相色谱仪, 附有二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); Elma 超声清洗仪(德国爱尔玛公司); VORTE-X 涡旋混匀器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); BT 十万分之一电子天平(深圳市精耐仪器有限公司); TGL16 高速离心机(长沙英泰仪器有限公司)。

L-茶氨酸(纯度: 98.92%)、天麻素(纯度: 99%)(成都曼思特生物科技有限公司); 左旋肉碱(纯度: 98.9%)(美国 Stanford chemicals 公司); 吡啶甲酸铬(纯度: 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 淫羊藿苷(纯度: 94.2%)、菊苣酸(纯度: 99.8%)(中国食品药品检定研究院); 咖啡因(纯度: 99.5%)(中国计量科学研究院); 10-HAD(纯度: 97.6%, 中国药品生物制品鉴定所); 甲醇、乙腈、磷酸二氢钾(色谱纯, 德国 Merck 公司); 实验用水为经 Millipore 处理的一级水。

1.2 样品前处理

片剂、胶囊及液体样品: 称取 5.0 g 均匀样品于 50 mL 离心管中, 加 70%甲醇至 20 mL, 超声提取 20 min, 再补加

70%甲醇至 25 mL, 涡旋混匀, 8000 r/min 离心 5 min, 经 0.45 μ m 滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

含油胶囊样品: 称取 5.0 g 内容物于 50 mL 离心管中, 加 70%甲醇至 20 mL, 添加 5 mL 石油醚, 超声提取 20 min, 涡旋混匀, 8000 r/min 离心 5 min, 弃去上层石油醚, 视含油情况重复萃取 1 次, 下层清液再补加 70%甲醇至 25 mL, 经 0.45 μ m 滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

1.3 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流动相及梯度: A 为乙腈, B 为 20 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液; 0~3.0 min, 1.0% A, 3.0~6.0 min, 1.0%~10% A, 6.0~10.0 min, 10%~75% A, 10.0~15.0 min, 75% A, 15.0~16.0 min, 75%~1.0%, 16.0~20.0 min, 1.0% A; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μ L; 检测波长: 左旋肉碱、*L*-茶氨酸、10-HAD: 210 nm; 天麻素: 330 nm; 吡啶甲酸铬: 220 nm; 菊苣酸、淫羊藿苷: 270 nm; 咖啡因: 265 nm。

1.4 标准溶液配制

分别精密称取左旋肉碱、*L*-茶氨酸、10-HAD、天麻素、吡啶甲酸铬、咖啡因、淫羊藿苷、菊苣酸 10 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用 70%甲醇溶解定容制备成 1.0 mg/mL 标准储备液。

临用前, 用 70%甲醇稀释成混合标准系列, 其中左旋肉碱、*L*-茶氨酸质量浓度为 10.0、20.0、50.0、100.0、150.0 mg/L; 吡啶甲酸铬、天麻素、咖啡因和淫羊藿苷质量浓度为 1.5、3.0、7.5、15.0、30.0 mg/L; 菊苣酸质量浓度为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 mg/L; 10-HAD 质量浓度为 2.5、5.0、12.5、25.0、50.0。按 1.3 色谱条件, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作图, 并计算标准曲线的回归方程。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

研究表明仅用甲醇或乙腈与水为流动相, 8 种功效成分峰形不佳, 且分离效果不好。为了改善峰形, 加入磷酸二氢钾(0.1%磷酸)作为缓冲盐以改善分离效果。选用 5、10、20、30 mmol/L 磷酸二氢钾溶液进行实验, 随着缓冲盐浓度的增大, 色谱峰峰形随之改善, 但盐浓度过高易造成仪器的腐蚀并清洗困难。因此本研究选用 20 mmol/L 的磷酸二氢钾缓冲溶液为流动相。

在最佳分离条件下, 确定 8 种功效成分最大吸收波长以减少干扰并提高灵敏度。光谱表明左旋肉碱、*L*-茶氨酸、10-HAD 在 210 nm 有最大吸收, 咖啡因最大吸收波长为

265 nm, 淫羊藿苷最大吸收波长为 273 nm, 天麻素、吡啶甲酸铬、菊苣酸最大吸收波长分别为 330、220、270 nm(图 1)。图 2 为最佳色谱条件下标准色谱图。

2.2 前处理方法的优化

左旋肉碱、L-茶氨酸、天麻素、咖啡因、菊苣酸易溶于水, 而淫羊藿苷、吡啶甲酸铬、10-HAD 水溶性较差, 但溶于甲醇、乙醇, 8 种化合物均不溶于苯、醚类, 根据相似相溶的原理, 比较了 50%甲醇、70%甲醇、甲醇和乙腈对 8 种化合物的提取效果, 结果表明采用 70%甲醇提取, 8 种成分回收率最高, 色谱峰峰形较好, 因此采用 70%甲醇作为提取液。保健食品基质中蛋白质含量一般较少, 无需沉淀蛋白质处理, 直接超声提取。对于含油脂样品, 直接提取进样对色谱柱损伤大, 且干扰较多, 因此本研究采用石油醚萃取油脂后进样测定。

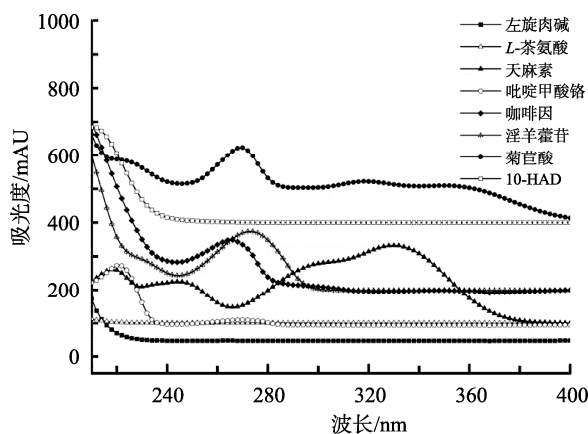
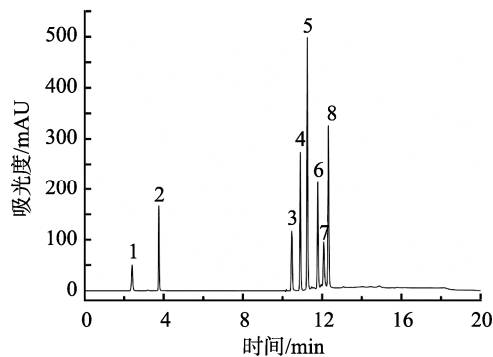


图 1 8 种化合物特征光谱图

Fig.1 Characteristic spectra of 8 kinds of compounds



注: 1: 左旋肉碱; 2: L-茶氨酸; 3: 天麻素; 4: 吡啶甲酸铬; 5: 咖啡因; 6: 淫羊藿苷; 7: 菊苣酸; 8: 10-HAD。

图 2 8 种待测物标准色谱图

Fig.2 Standard chromatogram of 8 kinds of compounds

2.3 方法学考察

2.3.1 方法线性范围及检出限

在确定最佳测定条件下, 左旋肉碱、L-茶氨酸在 10.0~150.0 mg/L, 吡啶甲酸铬、天麻素、咖啡因和淫羊藿苷在 1.5~30.0 mg/L, 菊苣酸在 5.0~100.0 mg/L, 10-HAD 在 2.5~50.0 mg/L 质量浓度与色谱峰面积有良好的线性关系, 相关系数 $r \geq 0.9990$ 。按 3 倍信噪比获得仪器的检出限, 左旋肉碱、L-茶氨酸、天麻素、吡啶甲酸铬、咖啡因、淫羊藿苷、菊苣酸、10-HAD 的检出限分别为 2、1、0.3、0.2、0.3、0.4、1 和 0.5 mg/L。根据方法操作步骤, 左旋肉碱、L-茶氨酸、吡啶甲酸铬、天麻素、咖啡因、淫羊藿苷、菊苣酸、10-HAD 的检出限分别为 10、5、1.5、1、1.5、2、5、2.5 mg/kg。结果见表 1。

表 1 8 种增强免疫力功效成分标准曲线相关参数

Table 1 Correlation parameters of 8 boost immunity ingredients standard curves

名称	线性范围/(mg/L)	回归方程	相关系数 r	检出限/(mg/L)
左旋肉碱	10.0~150.0	$Y=0.1396X-0.1122$	0.9990	2
L-茶氨酸	10.0~100.0	$Y=4.5463X+1.8816$	0.9991	1
天麻素	1.5~30.0	$Y=14.578X-3.5796$	0.9992	0.3
吡啶甲酸铬	1.5~30.0	$Y=58.486X-0.828$	0.9997	0.2
咖啡因	1.5~30.0	$Y=70.977X-0.801$	0.9992	0.3
淫羊藿苷	1.5~30.0	$Y=19.473X-2.7163$	0.9994	0.4
菊苣酸	5.0~100.0	$Y=4.814X-0.7143$	0.9992	1
10-HAD1	2.5~50.0	$Y=24.614X-1.6255$	0.9990	0.5

2.3.2 方法回收率及精密度

分别在样品中添加 3 个浓度水平, 平行测定 6 次。其中左旋肉碱、天麻素、吡啶甲酸铬添加样品为片剂, L-茶氨酸、淫羊藿苷、菊苣酸添加样品为胶囊, 咖啡因添加样品为饮料, 10-HAD 添加样品为软胶囊。按 1.2 进行前处理并分析, 计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs), 结果见表 2。8 种功效成分回收率为 93.8%~108%, RSDs 为 0.7%~6.8%, 结果表明本研究建立的方法重复性好, 回收率结果满意。此外, 分别在片剂、饮料和软胶囊类空白样品中添加浓度为 160 mg/kg 咖啡因标准溶液, 以考察基质对测定结果的影响。检测结果分别为 162、157 和 166 mg/kg, 表明基质对待测组分无明显干扰。

2.3.3 实际样品检测

采用本方法对保健食品样品进行检测(图 3), 测得 L-茶氨酸、咖啡因、淫羊藿苷、菊苣酸含量分别为 0.12、0.23、8.02、0.78 g/kg, 符合样品标识的浓度范围。此外, 采用国家标准方法-《保健食品检验与评价技术规范(2003 年版)》、GB 5009.139—2014《食品安全国家标准 饮料中咖啡因的测定》、GB/T 22247—2008《保健食品中淫羊藿苷的测定》、《中华人民共和国药典(2020 年版)一部》对样品进行测定, 结果 L-茶氨酸、咖啡因、淫羊藿苷、菊苣酸含量分别为 0.11、0.23、8.06 和 0.80 g/kg, 表明建立的方法与国家标准方法测定结果吻合。

表 2 方法的回收率和相对标准偏差(n=6)
Table 2 Method recoveries and relative standard deviations (n=6)

待测物	本底值 /(mg/kg)	添加水平 /(mg/kg)	回收率 /%	相对标准 偏差/%
左旋肉碱	131	60	98.2	2.9
		120	102	4.6
		240	108	3.1
		30	97.1	6.8
L-茶氨酸	62.4	60	98.9	4.4
		120	100	3.9
		40	98.8	2.1
天麻素	88.3	80	97.4	1.7
		160	99.6	0.9
		60	94.7	3.2
吡啶甲酸 铬	126	120	98.9	4.8
		240	102	3.9
		80	99.3	0.7
		160	96.2	3.2
咖啡因	164	320	99.1	2.1
		100	101	3.5
		200	93.8	4.2
淫羊藿苷	236	400	105	3.7
		20	99.8	1.5
		40	96.3	2.4
菊苣酸	-	80	99.3	1.1
		40	100	5.4
		40	102	2.8
10-HAD	89.4	80	102	2.8
		160	99.7	4.1

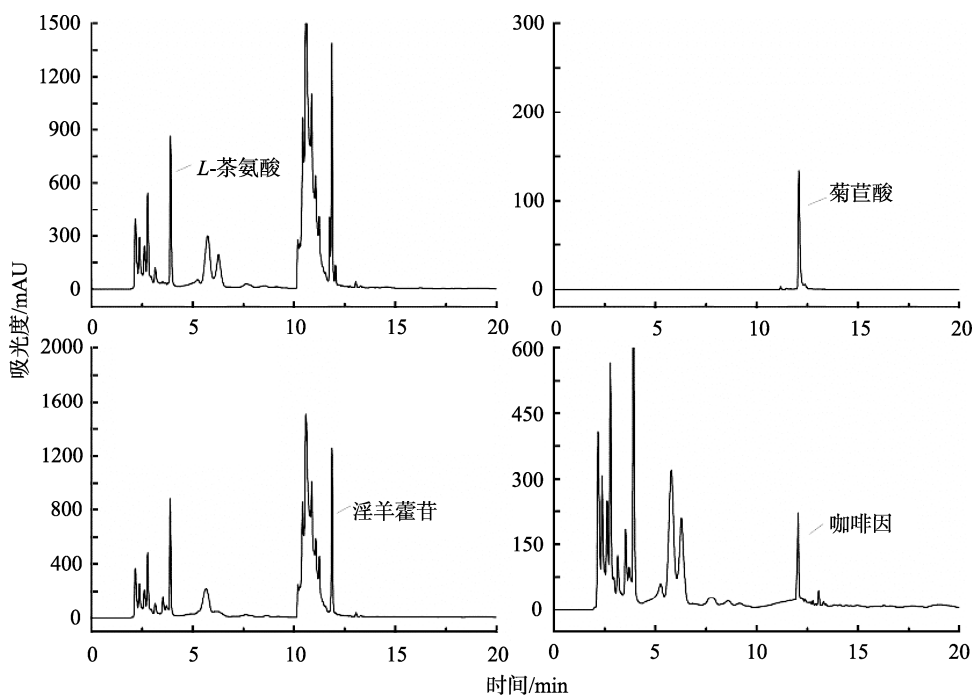


图 3 典型样品色谱图

Fig.3 Typical chromatogram of the samples

3 结论与讨论

本研究建立了高效液相色谱法同时测定保健食品中左旋肉碱、L-茶氨酸、天麻素、吡啶甲酸铬、咖啡因、淫羊藿苷、菊苣酸、10-HAD 8种增强免疫力功效成分。采用70%甲醇超声提取前处理方式,方便快捷。8种功效成分方法检出限为1~10 mg/kg,回收率为93.8%~108%,RSD≤6.8%。该方法快速、准确、灵敏,适用于保健食品中8种功效成分的同时测定。

参考文献

- [1] GANIYU O. Phytochemistry and functional foods: Keys to sustainable healthcare delivery [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(3): e13634.
- [2] ISHIMI Y, TAKEBAYASH J, TOUSEN Y, *et al.* Quality evaluation of health foods containing licorice in the Japanese market [J]. *Toxicol Rep*, 2019, 6: 904–913.
- [3] 陈东洋, 张昊, 冯家力, 等. 保健食品中违禁药物检验技术研究进展 [J]. *色谱*, 2020, 38(8): 880–890.
CHEN DY, ZHANG H, FENG JL, *et al.* Advances in technologies for determination of illegal drugs in health food [J]. *Chin J Chromatogr*, 2020, 38(8): 880–890.
- [4] 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 containing Chinese materia medica [J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(5): 875–879.
- [5] WU ZM, LUO J, SHI XD, *et al.* Icarin alleviates rheumatoid arthritis via regulating miR-223-3p/NLRP3 signalling axis [J]. *Autoimmunity*, 2020, 53(8): 450–458.
- [6] 徐丽华, 陈燕平, 马天宇, 等. 紫锥菊化学成分和药理作用研究进展 [J]. *食品与药物*, 2020, 22(3): 233–237.
XU LH, CHEN YP, MA TY, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Echinacea purpurea* [J]. *Food Drug*, 2020, 22(3): 233–237.
- [7] QIN B, LUO N, LI Y, *et al.* Protective effect of gastrodin on peripheral neuropathy induced by anti-tumor treatment with vincristine in rat models [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2018, 44(1): 84–91.
- [8] DUONG HA, WU MT, NGUYEN TD, *et al.* Determination of 10-hydroxy-2-decenoic acid and free amino acids in royal jelly supplements with purpose-made capillary electrophoresis coupled with contacted conductivity detection [J]. *J Food Compos Anal*, 2020, 87: 103422.
- [9] 王锡洪, 梁慧玲, 毛斌瑛, 等. 茶氨酸的开发利用现场与展望 [J]. *中国茶叶*, 2012, 43(3): 6–10.
WANG XH, LIANG HL, MAO BY, *et al.* The current situation and prospect of the utilization of theanine [J]. *China Tea*, 2012, 43(3): 6–10.
- [10] AREFI NN, MEHDI FM, SHOHREH J. Simultaneous determination of theobromine, theophylline, and caffeine using a modified electrode with petal-like MnO₂ nanostructure [J]. *Talanta*, 2021, 222: 121563.
- [11] 张佳, 王川坯, 阮建云. GC-MS及GC测定茶叶中主要游离氨基酸的方法研究 [J]. *茶叶科学*, 2010, 30(6): 445–452.
ZHANG J, WANG CP, RUAN JY. Determination of main free amino acids in tea by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) [J]. *J Tea Sci*, 2010, 30(6): 445–452.
- [12] 王冬梅, 杨明, 邱肖依, 等. 分光光度法和液相-质谱联用法检测奶粉中的左旋肉碱 [J]. *食品工业*, 2020, 41(3): 282–285.
WANG DM, YANG M, QIU XY, *et al.* Determination of L-carnitine in milk powder by spectrophotometry and liquid-phase mass spectrometry [J]. *Food Ind*, 2020, 41(3): 282–285.
- [13] 张海红, 田洪芸, 王文特, 等. 分光光度法检测特殊医学用途婴儿配方乳粉中左旋肉碱 [J]. *中国乳品工业*, 2020, 48(9): 41–46.
ZHANG HH, TIAN HY, WANG WT, *et al.* Determination of L-carnitine content in special medical formula food by UV-traviolet visible spectrophotometry [J]. *China Dairy Ind*, 2020, 48(9): 41–46.
- [14] 吴望君, 任玉琴, 黄娟. 高效液相色谱法测定饲料中的吡啶甲酸铬 [J]. *农产品质量与安全*, 2019, 18(3): 39–42.
WU WJ, REN YQ, HUANG J. Determination of chromium picolinate in feed by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Qual Saf Agro-Prod*, 2019, 18(3): 39–42.
- [15] 支红峰, 杨璐, 胡中豪, 等. 超高效液相色谱法同时测定绿茶中10种活性物质 [J]. *食品工业*, 2019, 40(2): 306–309.
ZHI HF, YANG L, HU ZH, *et al.* Simultaneous determination of 10 active substances in green tea using ultra high performance liquid chromatography [J]. *Food Ind*, 2019, 40(2): 306–309.
- [16] 郑容, 郭正卫, 程燕, 等. UPLC同时测咖啡饮料中5-HMF和咖啡因的含量 [J]. *现代食品*, 2020, 21: 218–221.
ZHENG R, GUO ZW, CHENG Y, *et al.* Simultaneous determination of 5-HMF and caffeine in coffee drink by UPLC [J]. *Mod Food*, 2020, 21: 218–221.
- [17] 何艳, 胡小祥, 陈新明, 等. 高效液相色谱法同时测定丹藤颗粒中8种成分含量 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(2): 263–267.
HE Y, HU XX, CHEN XM, *et al.* Simultaneous determination of eight components in *Dan Xi* granules by HPLC [J]. *Trad Chin Drug Res Clinic Pharm*, 2021, 32(2): 263–267.
- [18] 陈建平, 谢皓玥, 周际宇. 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 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(1): 192–196.
CHEN JP, XIE HY, ZHOU JY. Simultaneous determination of icariin, hyperoside and psoralen in functional food by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(1): 192–196.
- [19] 王艳, 刘芸, 姜珊, 等. 高效液相色谱-高分辨质谱法测定奶粉及保健

食品中的左旋肉碱[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 5920–5926.

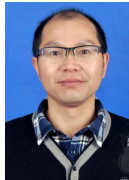
WANG Y, LIU Y, JIANG S, *et al.* Determination of *L*-carnitine in milk powder and healthy food by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(17): 5920–5926.

[20] 王媚, 边敏琦, 邹俊波, 等. UPLC-ESI-MS/MS 法同时测定强力定眩胶囊的 7 个指标成分[J]. *化学与生物工程*, 2020, 37(12): 63–68.

WANG M, BIAN MQ, ZOU JB, *et al.* Simultaneous determination of seven index compositions from Qiangli Dingxuan capsules by UPLC-ESI-MS/MS [J]. *Chem Bioeng*, 2020, 37(12): 63–68.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



陈东洋, 博士, 主管技师, 主要研究方向为理化检验技术研究。

E-mail: dychen2008@126.com.



张 昊, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: zhanghao678g@foxmail.com