

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.01.013

液相色谱串联质谱法测定食品中 淫羊藿苷等 20 种功能成分

Determination of icariin and other 20 functional components in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry

范小龙^{1,2} 陈冉^{1,2} 吴婉琴^{1,2}FAN Xiao-long^{1,2} CHEN Ran^{1,2} WU Wan-qin^{1,2}刘国姣^{1,2} 黄坤^{1,2} 江丰^{1,2}LIU Guo-jiao^{1,2} HUANG Kun^{1,2} JIANG Feng^{1,2}

(1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 湖北 武汉 430000;

2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北 武汉 430000)

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan, Hubei 430000, China; 2. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test Office, Wuhan, Hubei 430000, China)

摘要:采用超高效液相色谱—串联质谱仪建立了配制酒、饮料及代用茶中淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素等 20 种功能成分定量的检测方法。样品经甲醇—水溶液提取后, 稀释净化, 提取液离心, 过滤, 上机测定, Thermo Acclaim RSLC C₁₈ (2.6 μm, 2.1 mm×100 mm) 色谱柱进行分离, 乙腈和水为流动相梯度洗脱, 电喷雾正、负离子多反应监测扫描 (MRM) 模式下进行测定, 外标法定量。20 种化合物的线性检测范围最高浓度为 500 ng/mL, 相关系数 $R^2 > 0.99$, 定量限为 0.5~5.0 mg/kg, 于 1 倍定量限、2 倍定量限、10 倍定量限 3 个添加水平下进行加标回收试验, 20 种化合物平均回收率为 72.80%~107.75%, 相对偏差 > 10%。该方法操作方便、简单、快捷、清洁、灵敏度高、重复性好。

关键词:超高效液相色谱—串联质谱; 配制酒; 饮料; 代用茶; 中药材功效成分

Abstract: A method for the quantitative determination of icariin, hypericin and Psoralen in mix liquor, beverage sample and tea substitutes were established by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Samples were ex-

tracted by methanol water solution, diluted, purified, extracted, centrifuged, filtered, and determined by Thermo Acclaim RSLC C₁₈ (2.6 μm, 2.1 mm×100 mm) chromatographic column. The determination was carried out under the mode of electrospray positive and negative ion multi-reaction monitoring scanning (MRM) with acetonitrile and water. The maximum linear detection concentration of 20 compounds was 500 ng/mL, the correlation coefficient (R^2) was greater than 0.99, and the quantitative limit was 0.5~5.0 mg/kg. The recovery test of standard addition was carried out at three levels of 1, 2 and 10 times limit of quantitation. The average recovery rate of 20 compounds was between 72.80%~107.75%, and the relative deviation was less than 10%. Conclusion: The method is easy to operate, simple, fast, clean, high sensitivity and good repeatability.

Keywords: ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; mix liquor; beverage sample; tea substitutes; functional components of traditional Chinese medicine

淫羊藿苷、金丝桃苷、刺五加苷 B、仙茅苷、补骨脂苷、党参炔苷、β-蜕皮甾酮、刺五加苷 E、黄芪甲苷、补骨脂素、水晶兰苷、丹参酮 IIA、大黄素、欧当归内酯 A、红景天苷、特女贞苷、黄芪皂苷 I、蟛蛄菊内酯、莫诺苷为糖苷类化合物, 这些化合物是 20 种不同的中药材功能成分, 具有补肾壮阳、抗疲劳、增强免疫力等作用。由于这些化合物功效比较明确, 因此不法商家往往以“食疗”为噱头, 向普通食品中添加这些中药材。例如: 含有“生地”的炖鸭煲调料包; 含有“党参”“木香”“白术”的茶叶; 含有“女贞子”和

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

作者简介: 范小龙, 男, 湖北省食品质量安全监督检验研究院工程师, 硕士。

通信作者: 江丰 (1985—), 男, 湖北省食品质量安全监督检验研究院高级工程师, 硕士。E-mail: 349136833@qq.com

收稿日期: 2020-07-03

“淫羊藿”的椰园海宝(干制水产品);含有“红豆杉”和“金樱子”的配制酒;含有“杜仲”和“淫羊藿”的饮料等。在食品中违法添加中药材对人体健康具有潜在或显性的危害,就中药材的性质而言,中药材都有明确功能主治、适用人群、用法用量,具有与食品完全不同的功效和服用禁忌^[1]。目前已报道补骨脂及其制剂会造成肝损伤^[2-3],金丝桃苷具有胚胎毒性^[4],淫羊藿具有心脏毒性、神经毒性^[5]。

中国《食品安全法》第三十八条明确规定“生产经营的食品中不得添加药品,但是可以添加按照传统既是食品又是中药材的物质。”为打击向普通食品和保健食品中违法添加中药材的行为,2017年5月,湖北省食品药品监督管理局、省食药监局联合省工商局也开展专项行动工作,明确重点打击非法添加,其中就重点查处普通食品和保健食品中违法添加药材的行为。2017年10月,贵州也开展严厉打击使用非食品原料生产食品违法行为整治,其中就重点查处了在配制酒、饮料、茶叶及相关制品、蔬菜制品等普通食品生产加工中使用人参、三七、天麻、当归、红景天、杜仲等可用于保健食品的药材或八角莲、马钱子、生半夏、红豆杉、洋地黄、雷公藤等保健食品禁用药材。但是在执法过程中,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。现有食品中中药材化合物的测定方法主要集中在保健食品中^[6-9],普通食品中无相关参考方法,且普通食品基质相比保健食品复杂,因此选择合适的仪器及相关的前处理方法极为重要。超高效液相色谱一串联质谱具有灵敏度高,分析时间短,定量准确的特点,非常适用于食品中非法添加物的鉴别和定量^[10-12],极大地缩短了鉴别时间,降低鉴别的复杂性。试验拟针对配制酒、饮料、代用茶等普通食品中非法添加淫羊藿、菟丝子、补骨脂等可用于保健食品的中药材,建立中药材中功效成分的超高效液相色谱串联质谱的方法,以期打击此类违法行为提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

淫羊藿苷、金丝桃苷、刺五加苷 B、仙茅苷、补骨脂苷、党参炔苷、 β -蜕皮甾酮、刺五加苷 E、黄芪甲苷、补骨脂素、水晶兰苷、丹参酮 IIA、大黄素、欧当归内酯 A、红景天苷、特女贞苷、蟛蜞菊内酯、莫诺苷、异补骨脂素、类叶升麻苷标准品(见表 1);纯度均 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司;

乙腈、甲醇:色谱级,美国 Fisher 公司;

甲酸铵:色谱级,麦克林公司;

表 1 20 种化合物的 CAS 登录号及分子式

Table 1 Chinese names, CAS accession numbers and molecular formulas of 20 compounds

中文名称	CAS 登录号	分子式
淫羊藿苷	489-32-7	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅
金丝桃苷	482-36-0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
刺五加苷 B	118-34-3	C ₁₇ H ₂₄ O ₉
仙茅苷	85643-19-2	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₁
补骨脂苷	905954-17-8	C ₁₇ H ₁₈ O ₉
党参炔苷	136085-37-5	C ₂₀ H ₂₈ O ₈
β -蜕皮甾酮	5289-74-7	C ₂₇ H ₄₄ O ₇
刺五加苷 E	39432-56-9	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈
黄芪甲苷	84687-43-4	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄
补骨脂素	66-97-7	C ₁₁ H ₆ O ₃
水晶兰苷	5945-50-6	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁
丹参酮 IIA	568-72-9	C ₁₉ H ₁₈ O ₃
大黄素	518-82-1	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
欧当归内酯 A	88182-33-6	C ₂₄ H ₂₈ O ₄
红景天苷	10338-51-9	C ₁₄ H ₂₀ O ₇
特女贞苷	39011-92-2	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇
黄芪皂苷 I	84680-75-1	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆
蟛蜞菊内酯	524-12-9	C ₁₆ H ₁₀ O ₇
莫诺苷	25406-64-8	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁
类叶升麻苷	61276-17-3	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅

微孔滤膜:0.22 μm ,有机系,天津市津腾实验设备有限公司;

试验用水:超纯水,电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ (25 $^{\circ}\text{C}$),美国 Millipore 公司。

1.2 仪器与设备

三重四极杆串联质谱仪:Triple Quad 4500 型,美国 AB SCIEX 公司;

超高效液相色谱仪:Ultimate 3000 型,美国 Thermo 公司;

电子分析天平:XS204 型,梅特勒—托利多国际贸易(上海)有限公司;

电子分析天平:ME2002E 型,梅特勒—托利多国际贸易(上海)有限公司;

高速离心机:Allegra X-15R 型,美国贝克曼库尔特有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

(1) 标准储备液:准确称取各标准品 10.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 1.0 mg/mL 标准储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 混合标准中间液 A:准确移取刺五加苷 B、黄芪皂苷 I、黄芪甲苷、刺五加苷 E、欧当归内酯 A、莫诺苷、丹

参酮 IIA 标准储备液各 100 μL ; 补骨脂素 10 μL 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 则刺五加苷 B、黄芪皂苷 I、黄芪甲苷、刺五加苷 E、欧当归内酯 A、莫诺苷、丹参酮 IIA 浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 补骨脂素浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(3) 混合标准中间液 B: 准确移取淫羊藿苷、金丝桃苷、仙茅苷、党参炔苷、特女贞苷标准储备液 50 μL ; 补骨脂苷、 β -蜕皮甾酮、水晶兰苷、红景天苷、类叶升麻苷标准储备液 100 μL ; 大黄素、蟛蜞菊内酯标准储备液 10 μL 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 则淫羊藿苷、金丝桃苷、仙茅苷、党参炔苷、特女贞苷浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 补骨脂苷、 β -蜕皮甾酮、水晶兰苷、红景天苷、类叶升麻苷浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 大黄素、蟛蜞菊内酯浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 样品前处理

(1) 配制酒: 准确称取 1.00 g 试样置于 50 mL 蒸发皿中, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸 15 min, 残渣加入 10 mL 甲醇—水溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 洗涤, 洗涤液转移至 25 mL 容量瓶中, 洗涤两次, 合并洗涤液, 摇匀, 超声 30 min, 冷却至室温后, 用甲醇—水溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 定容至刻度, 混匀静置 10 min, 准确吸取 2.5 mL 上清液至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇—水溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 定容至刻度, 混匀, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液, 根据实际浓度适当的稀释至工作曲线线性范围内, 供高效液相色谱—串联质谱测定。

(2) 饮料: 准确称取 1.00 g 试样置于 100 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇—水溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$), 超声 30 min, 冷却至室温后, 用甲醇—水溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 定容至刻度, 混匀, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液, 根据实际浓度适当的稀释至工作曲线线性范围内, 供高效液相色谱—串联质谱测定。

(3) 代用茶: 准确称取 1.00 g 试样置于 25 mL 容量瓶中, 加入 20 mL 甲醇—水溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$), 摇匀, 超声 30 min, 冷却至室温后, 用甲醇—水溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 定容至刻度, 混匀静置 10 min, 准确吸取 2.5 mL 上清液至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇—水溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$) 定容至刻度, 混匀, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液, 根据实际浓度适当的稀释至工作曲线线性范围内, 供高效液相色谱—串联质谱测定。

1.3.3 液相色谱参考条件的优化 对比选择不同的色谱柱和不同的有机相与水溶液比例及水溶液中添加不同的物质含量, 通过比较色谱峰及分离度, 选择合适的色谱柱和流动相; 并对梯度进行调节优化, 以达到分离度高、峰形好和响应最佳的色谱行为, 从而确定液相色谱条件。正模式下的色谱条件见表 2, 负模式下的色谱条件见表 3。

(1) 液相色谱条件 A 组: 色谱柱为 Thermo Acclaim RSLC C₁₈ (2.6 μm , 2.1 mm \times 100 mm); 流动相 A 为乙腈,

B 为超纯水, 梯度洗脱程序见表 2; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 3 μL 。

(2) 液相色谱条件 B 组: 流动相 A 为乙腈, B 为超纯水, 梯度洗脱程序表 3; 其余同液相色谱条件 A 组。

1.3.4 质谱参数条件的优化 在 ESI⁺ 和 ESI⁻ 模式下分别确定各目标化合物的母离子, 对选定的母离子进行离子扫描, 根据二级碎片离子扫描质谱图及可能的断裂规律, 分别选取丰度相对较强的一对碎片离子作为定量离子, 次强的一对或两对碎片离子作为定性离子, 并分别对子离子的碰撞能量进行优化, 最后在多反应监测模式 (MRM) 下分别对去簇电压 (DP)、碰撞能 (CE) 进行优化。气帘气 (CUR)、雾化气 (GS1)、辅助气 (GS2)、碰撞气 (CAD) 均为高纯氮气或其他合适气体, 使用前应调节相应参数使质谱灵敏度达到检测要求, 电喷雾电压 (IS)、去簇电压 (DP)、碰撞能量 (CE) 等参数使用前应优化至最佳灵敏度, 监测离子对和定量离子对等信息详见表 4。

1.3.5 前处理条件的优化 比较不同的提取溶剂、提取方式及净化方式对提取过程的影响, 以目标化合物的回收率为指标, 确定提取条件。

1.3.6 方法学验证

(1) 定量限: 分别选择配制酒、液体植物饮料、代用茶为 3 种空白样品, 采用逐步定量的方式添加标准溶液, 按照 1.3.2 处理样品, 正、负离子分开扫描进样, 至定量离子、定性离子信噪比均大于 10 时添加浓度即为定量限。

(2) 回收率和精密度: 不同的基质样品进行低、中、高

表 2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution conditions

时间/min	流速/(mL \cdot min ⁻¹)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	0.3	5	95
1.5	0.3	5	95
3.0	0.3	85	15
6.0	0.3	85	15
6.5	0.3	98	2
8.5	0.3	98	2
9.0	0.3	5	95
11.5	0.3	5	95

表 3 梯度洗脱程序

Table 3 Gradient elution conditions

时间/min	流速/(mL \cdot min ⁻¹)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	0.3	5	95
1.0	0.3	5	95
6.0	0.3	95	5
8.0	0.3	95	5
8.5	0.3	5	95
11.0	0.3	5	95

3 个水平添加,每个添加水平平行测定 6 次,分别测定回收率;同一个基质项下的相同添加水平下的化合物 6 次测定的回收率来计算平均回收率,并计算出精密度(相对偏差)。

1.3.7 数据处理 相关质谱数据由 Analyst 分析软件采集,MultiQuant 定量软件分析数据。数据汇总后,经过 Microsoft Office Excel 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的确定

研究的化合物绝大多数极性较弱,因此主要考察常规反相色谱柱分离效果,分别选用 ACE Excel 2 C₁₈ (2.1 mm×100 mm)、Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 mm×100 mm)、Thermo Acclaim RSLC C₁₈ (2.6 μm, 2.1 mm×100 mm) 3 种实验室常用的色谱柱。结果表明,ACE Excel 2 C₁₈ 色谱柱峰形拖尾,Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 50 mm 柱子由于出峰时间较快,杂质易与目标化合物产生干扰,而 18 种化合物在 Thermo Acclaim RSLC C₁₈ (2.6 μm, 2.1 mm×100 mm) 均具有较好的峰型和分离效果,因此,选择 Thermo Acclaim RSLC C₁₈ 色谱柱开展后续试验,见图 1。

2.2 流动相的确定

比较了 0.1% 甲酸水溶液、5 mmol/L 甲酸铵溶液、纯水 3 种流动相对目标化合物分离效果的影响。通过对比在流动相中加酸对目标物分离的影响,发现在流动相中添加 0.1% 甲酸或者 5 mmol/L 甲酸铵,正模式扫描情况下,并没有对化合物的峰形及保留时间有很大的改善,均有化合物的峰出现分叉,可能是由于中药材化学成分均属于糖苷或者黄酮类,化合物性质较特殊,化学性质差别较大。反而,流动相为纯水时,化合物的分离峰形均有改善(见图 2),可能是由于在流动相中加入酸或者盐对目标化合物有抑制作用。另外,结合单独进行负离子模式扫描时,采用不加甲酸的流动相会提高负离子模式下的灵敏度,考虑到有的实验室有性能较好液相色谱-质谱联用仪,将采用正负同时扫描模式一次检测 20 种中药材物质,所以方法最终选择了可以正、负离子模式兼容的流动相——纯水。

2.3 质谱条件的确定

试验比较了 20 种中药材物质在正、负离子两种检测模式下的灵敏度,发现刺五加苷 B、黄芪皂苷 I、刺五加苷

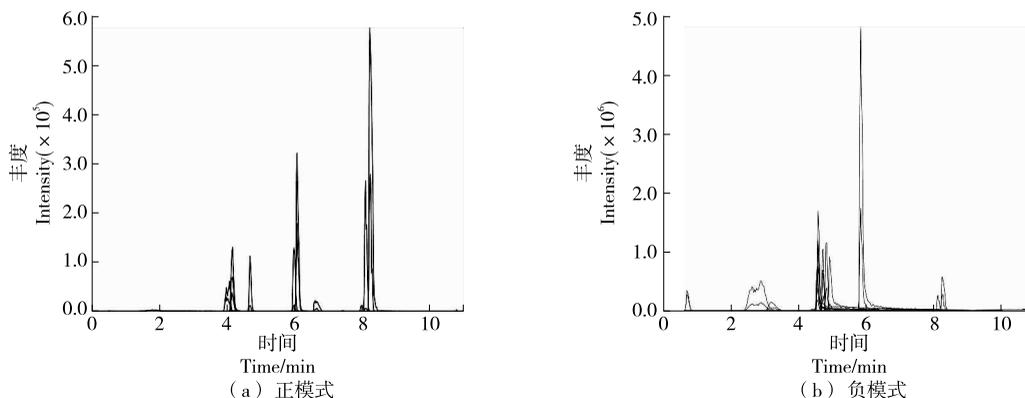


图 1 标准物质正模式(刺五加苷 B 等 8 种)及负模式(淫羊藿苷等 12 种)下总离子流色谱图

Figure 1 Chromatogram of total ion of 8 constituents in positive mode and 12 constituents in negative mode

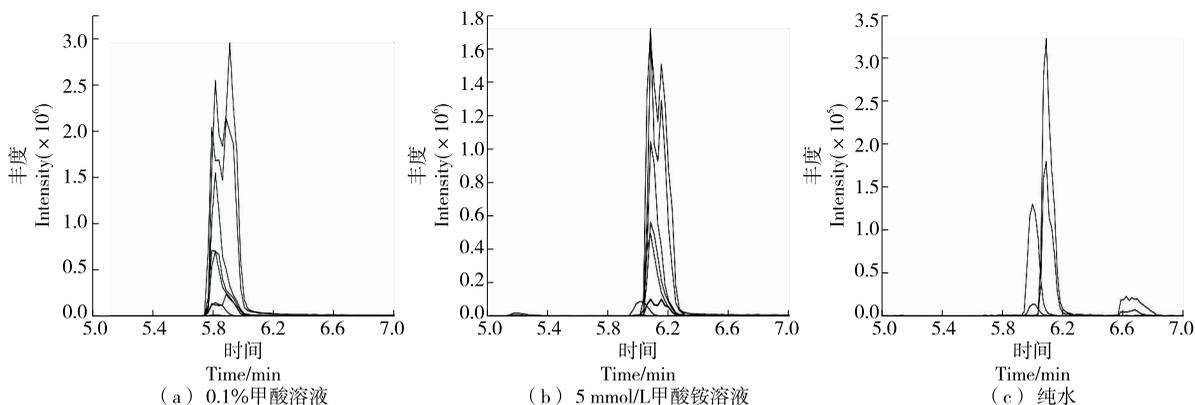


图 2 不同流动相下补骨脂素、黄芪甲苷及莫诺苷的正模式下总离子流图

Figure 2 Chromatogram of total ion of psoralen, astragaloside IV and morroniside in positive mode of different mobile phases

E、黄芪甲苷、补骨脂素、丹参酮 IIA、欧当归内酯 A、莫诺昔 8 种物质在正离子下响应较好,因此,这 8 种物质采用正离子模式,见表 4。还在同一方法下采用正、负离子模

式同时扫描和分正、负离子模式两次分别检测,发现在 AB Sciex 4500 液相色谱-质谱联用仪上正、负离子模式同时扫描采集能够达到试验方法的检出限要求,但在

表 4 淫羊藿苷等 20 种化合物定性、定量离子和质谱分析参数[†]

Table 4 Qualitative and quantitative ion and mass spectrometric analysis parameters of icariin and other 20 compounds

化合物名称	电离方式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/V
刺五加苷 B	ESI ⁺	395.2	231.5*	100	31
			185.1		26
黄芪皂苷 I	ESI ⁺	891.4	711.5*	180	70
			831.5		70
黄芪甲苷	ESI ⁺	785.6	587.5*	120	23
			143.1		23
刺五加苷 E	ESI ⁺	765.4	603.2*	80	55
			687.2		38
补骨脂素	ESI ⁺	187.0	114.9*	95	29
			143.0		24
丹参酮 II A	ESI ⁺	295.1	249.1*	200	31
			277.1		27
欧当归内酯 A	ESI ⁺	381.2	191.1*	160	22
			363.1		21
莫诺昔	ESI ⁺	429.1	267.1*	100	32
			185.1		34
淫羊藿苷	ESI ⁻	721.0	513.1*	-80	-26
			529.3		-27
金丝桃苷	ESI ⁻	463.2	300.0*	-110	-42
			270.8		-52
仙茅苷	ESI ⁻	465.2	283.0*	-85	-21
			180.7		-15
补骨脂苷	ESI ⁻	365.0	202.9*	-60	-20
			158.9		-20
党参炔苷	ESI ⁻	441.1	179.0*	-40	-15
			185.0		-22
β -蜕皮甾酮	ESI ⁻	479.1	319.0*	-120	-35
			159.1		-35
水晶兰苷	ESI ⁻	388.9	190.9*	-85	-21
			226.9		-20
大黄素	ESI ⁻	269.1	224.9*	-100	-36
			241.1		-37
红景天苷	ESI ⁻	298.9	118.9*	-80	-17
			179.0		-13
特女贞苷	ESI ⁻	685.1	523.3*	-115	-30
			453.0		-38
蟛蜞菊类酯	ESI ⁻	312.9	298.0*	-100	-28
			269.7		-41
类叶升麻苷	ESI ⁻	623.0	161.0*	-100	-41
			461.1		-40

[†] * 定量离子对。

waters TQD 液相色谱—质谱联用仪上正离子可以达到方法的检出限,负离子中有几种在定量限浓度相应值较低,而分正模式、负模式二次单独采集后,不同质谱的正、负离子模式均能达到方法的定量限。因此,为了使方法具有普遍适用性和易于推广使用,最终选择采用分正、负离子模式二次单独检测。但如果实验室具有性能较好的液相色谱—质谱联用仪时,也可以同时采用正、负离子模式同时扫描一次检测。

2.4 基质确定

试验方法适用于配制酒、饮料、代用茶添加中药材物质的测定,通过市场调研和网上购物平台调查,对宣称或暗示补肾壮阳及抗疲劳、抗氧化的食品进行数据统计,发现最有可能非法添加的食品基质是配制酒、液态植物饮料(酵素饮料)及代用茶。并且这 3 种基质涵盖了检测方法涉及的主要几种产品类型,以及产品类型所涉及的物理形态,同时对配制酒、饮料及代用茶中可能含有的挥发性酯类、亲水性多糖、鞣质、蛋白质以及叶绿素等复杂成分均予以考虑。因此,选用的 3 种样品基质可以代表方法适用的产品范围。在进行方法开发和验证实验时,选择不含 20 种中药材物质的配制酒、饮料及代用茶作为基质。

2.5 前处理方法的确定

2.5.1 提取溶剂优化 由于试验方法涉及 20 种目标化合物,而且不是一类结构相近的化合物,为了使所有的化合物都能有较高的提取率,在提取溶剂上分别考察了不同比例的甲醇—水作为提取溶剂。

固体类样品(代用茶),由于粉碎后茶叶基质微孔结

构对目标化合物具有一定吸附性,因此提取溶剂中需要加入一定比例的水,使其组织溶胀,提取液渗透至微孔内部,进而提高回收率。方案为:称取粉碎后的阴性茶叶基质 1 g 于 50 mL 的容量瓶中,添加混标静置 1 h 后,采用不同比例甲醇—水提取,当提取溶剂水相比例增大时,茶叶中的水溶性色素、亲水性多糖、鞣质等杂质更容易提取出来,产生基质效应造成回收率显著降低,因此采用 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ 分别为 1:9,3:7,5:5,8:2,10:0 的甲醇—水提取,测得 20 种化合物平均回收率见图 3。结果表明,选择甲醇—水溶液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=5:5$)作为提取溶液时,20 种化合物回收率相比其他比例提取条件,具有更好的提取效果,因此选择甲醇—水溶液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=5:5$)作为固体类样品(代用茶)提取溶液;配制酒因为含有乙醇及挥发性酯类,通过蒸发皿蒸发挥掉一部分杂质再进行溶解稀释提取;饮料样品也只需要溶解稀释来提取。

2.5.2 提取方式优化 采用阴性基质加标方法考察 30 min 振荡提取、均质提取、超声提取 3 种提取方式的影响,通过回收率进行评价比较,对于固体基质,超声提取方式的回收率与均质提取相当,但明显高于振荡提取方式。超声提取简单易行,因此 3 种基质均选择超声提取 30 min。

2.5.3 净化方式选择 由于配制酒、饮料及茶叶中可能存在亲水性多糖、鞣质、蛋白质或叶绿素等复杂成分,为保证提取效率的同时排除基质干扰,则需要选择合适的净化方式,分别考察了固相萃取柱法、直接稀释法,通过阴性样品基质加标,以回收率考察净化效果。

(1) 固相萃取柱选择:HLB为通用型的反相保留固

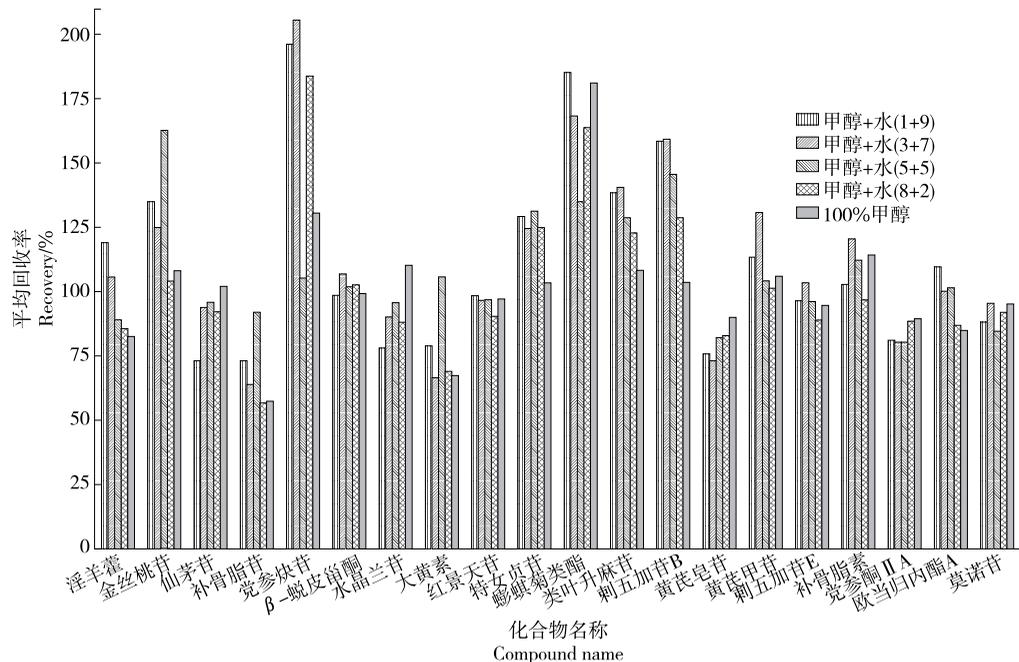


图 3 代用茶中 20 种化合物平均回收率

Figure 3 Average recovery of 20 compounds in substitute tea (n=3)

相萃取柱, PRIME HLB 为通过式净化除杂, HLB、PRIME HLB 固相萃取柱进行前处理净化, 通过对上样、淋洗、洗脱各种组合条件进行优化, 回收率结果表明对水晶兰苷、黄芪甲苷、特女贞苷等经 HLB 柱净化后回收率为 10%~40%, 采用 PRIME HLB 净化, 净化效果有限, 水晶兰苷、黄芪甲苷、特女贞苷等回收率仍小于 50%, 因此 HLB、PRIME HLB 固相萃取柱对 20 种化合物净化方案不可行。

(2) 直接稀释法: 配制酒及饮料样品采用甲醇-水溶液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$)进行溶解稀释, 稀释倍数为 50 时, 回收率在 70%~120%, 均可满足要求。代用茶基质比较复杂, 在进行选择不同溶剂提取比例试验, 稀释 50 倍时发现金丝桃苷、特女贞苷、类叶升麻苷、刺五加苷 B 回收率大于 120%, 为了降低基质干扰, 需要进行稀释。方案为: 称取 1 g 粉碎后的阴性茶叶基质于 25 mL 容量瓶中, 添加混标, 静置 1 h, 加入 20 mL 甲醇-水溶液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$)超声提取 30 min, 冷却至室温, 定容至刻度线, 再采用甲醇-水溶液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$)分别稀释 2, 4, 10 倍。结果表明, 当稀释 4 倍时, 金丝桃苷、特女贞苷、类叶升麻苷、刺五加苷 B 等基质效应显著降低, 满足 70%~120% 方法要求。因此考虑到方法检出限、回收率及仪器的响应值将稀释倍数定为 4 倍。

2.6 方法学的考察

2.6.1 定量限及线性范围 分别选择配制酒、液体植物饮料、代用茶 3 种空白样品, 采用逐步定量的添加标准溶

液方式, 按照前处理方法步骤, 正负离子分开扫描进样, 至定量离子、定性离子信噪比均大于 10 时添加浓度即为定量限, 测定的定量限: 称样量为 1 g, 最后稀释倍数为 100 时, 3 种基质中各化合物的定量限为: 刺五加苷 B、黄芪皂苷、黄芪甲苷、刺五加苷 E、欧当归内酯 A、莫诺苷、补骨脂苷、 β -蜕皮甾酮、水晶兰苷、红景天苷、类叶升麻苷、丹参酮 IIA 定量限为 5 mg/kg; 补骨脂素、大黄素、蟛蜞菊类酯为 0.5 mg/kg; 淫羊藿苷、金丝桃苷、仙茅苷、党参炔苷、特女贞苷为 2.5 mg/kg。采用溶剂标曲进行化合物的定量, 20 种化合物线性最高浓度为 500 ng/mL, 最低点为定量限。

2.6.2 回收率及精密度 由于试验方法测定的物质在普通食品中均为禁用物质, 因此化合物添加量为方法定量限、2 倍方法定量限和 10 倍方法定量限进行 3 水平回收率试验, 各化合物添加水平、回收率、相对标准偏差见表 5。20 种化合物添加水平在 0.5~50.0 mg/kg, 回收率范围为 70.8%~113.4%, 相对标准偏差范围为 0.8%~8.5%, 3 种基质的重复性试验的回收率范围和相对标准偏差满足分析要求。

3 结论

试验建立了配制酒、饮料及代用茶等普通食品中非法添加淫羊藿苷、金丝桃苷、补骨脂素等 20 种功能成分定量的检测方法。该方法操作方便、简单、快捷、重复性

表 5 20 种物质在配制酒、液体饮料及代用茶基质中的回收率

Table 5 Recovery of 20 substances in mixed liquor, liquid beverage and substitute tea ($n=6$)

化合物	添加水平/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	配制酒及饮料		代用茶	
		平均回收率/%	相对偏差/%	平均回收率/%	相对偏差/%
淫羊藿苷	2.5	97.13	3.72	93.00	2.15
	5	97.58	1.95	95.22	1.52
	25	107.75	2.43	101.02	5.69
金丝桃苷	2.5	90.33	5.01	86.40	3.61
	5	91.40	1.67	86.39	6.89
	25	91.11	0.81	89.12	1.91
仙茅苷	2.5	92.00	3.65	90.27	4.97
	5	94.91	1.34	93.05	2.48
	10	91.25	3.85	91.05	4.96
补骨脂苷	5	84.00	5.56	83.73	2.78
	10	84.97	5.01	89.11	3.84
	50	89.00	2.60	87.70	4.27
党参炔苷	2.5	88.00	3.04	83.27	4.30
	5	92.87	4.77	84.70	3.68
	25	91.67	2.85	87.14	4.23
β -蜕皮甾酮	5	91.73	4.02	86.43	5.19
	10	98.05	4.90	86.15	3.47
	50	101.23	4.59	86.87	5.00

续表 5

化合物	添加水平/ (mg · kg ⁻¹)	配制酒及饮料		代用茶	
		平均回收率/%	相对偏差/%	平均回收率/%	相对偏差/%
水晶兰苷	5	85.13	3.83	82.23	2.82
	10	86.72	3.57	80.52	3.69
	50	89.20	6.08	84.88	4.27
大黄素	0.5	83.33	4.20	75.33	7.06
	1	80.83	5.93	76.17	4.35
	5	85.27	3.86	78.73	2.60
红景天苷	5	73.80	5.87	76.47	6.17
	10	84.23	3.01	76.82	3.88
	50	86.00	4.35	76.80	5.36
特女贞苷	2.5	74.73	4.26	72.80	7.55
	5	83.83	4.74	76.10	4.69
	25	80.10	5.96	79.90	2.19
蟛蜞菊类酯	0.5	82.00	5.97	80.67	4.88
	1	81.00	6.98	81.83	5.60
	5	85.60	4.22	80.73	2.48
类叶升麻苷	5	80.64	4.42	79.90	3.47
	10	80.22	1.33	79.93	1.65
	50	84.86	1.93	79.90	1.91
刺五加苷 B	5	103.93	6.09	84.13	5.07
	10	101.22	2.45	85.50	4.89
	50	99.61	4.30	89.18	5.03
黄芪皂苷	5	91.30	5.96	78.60	3.44
	10	82.83	4.96	77.38	2.78
	50	88.46	5.87	80.03	4.02
黄芪甲苷	5	91.40	7.01	76.63	7.68
	10	82.28	4.76	80.88	5.09
	50	90.13	5.16	88.95	4.29
刺五加苷 E	5	97.87	5.94	86.23	4.81
	10	98.28	5.69	86.37	3.95
	50	101.32	3.18	87.03	6.15
补骨脂素	0.5	89.00	4.20	76.67	5.39
	1	85.00	2.68	78.67	4.52
	5	88.17	5.38	89.40	7.05
丹参酮 II A	5	76.97	5.96	76.53	6.82
	10	79.67	4.55	81.60	2.53
	50	89.96	8.05	85.29	5.09
欧当归内酯 A	5	82.80	3.18	74.60	5.75
	10	75.90	3.60	78.18	4.21
	50	87.93	4.55	90.23	5.42
莫诺苷	5	85.20	8.50	74.97	6.01
	10	80.52	5.92	84.08	4.12
	50	89.14	6.61	75.43	6.57

(下转第 98 页)

定了多菌灵对 6 种谷物、4 种油料油脂、16 种蔬菜、28 种水果等食品类别的最大残留限量,而试验研究样本仅限于苹果、白菜等果蔬,今后可根据市场需求,结合该标准对样本进行拓展。

参考文献

- [1] 华孝成,柯建赛,黄兆册.分光光度法检测果蔬中多菌灵残留量的改进[J].浙江农业科学,2013(8):1 016-1 018.
- [2] 高兴,于基成,郭乃菲,等.食品中多菌灵残留检测方法研究进展[J].食品与机械,2010,26(6):153-155.
- [3] 石慧,黄安香,李洙锐,等.超高效液相色谱法检测甘薯中多菌灵的残留方法研究[J].农药科学与管理,2014,35(3):24-27.
- [4] 周晓洁,赵良忠,夏湘,等.改良 QuEChERS—高效液相色谱法检测柑橘中的多菌灵[J].邵阳学院学报,2014,11(2):74-78.
- [5] 车继英.蔬菜、水果中多菌灵的测定方法研究[J].黑龙江科技信息,2009(8):34.
- [6] 崔丽丽,闫梅霞,王春伟,等.液相色谱—质谱/质谱法检测人参和土壤中多菌灵的残留动态[J].分析科学学报,2015,31(2):223-227.
- [7] 张奇泓.紫外分光光度法检测蔬菜、水果中多菌灵残留[J].福建热作科技,2013,38(1):13-15.
- [8] 高国文,朱红霞.液相色谱法测定香菇中多菌灵农药残留方法研究[J].农药科学与管理,2010,31(9):36-38.
- [9] 高国文,刘育清,朱家香.液相色谱法检测柑橘中多菌灵残留的方法研究[J].农药科学与管理,2006,27(5):10-11.
- [10] 张雪波,上官良敏.茶叶中多菌灵和甲萘威农药残留量的测定[J].质量技术监督研究,2009(2):19-21.

(上接第 93 页)

好并且覆盖了大部分基质,可在大多数分析实验室推广应用。但是,由于该方法研究的化合物较多,不同的化合物灵敏度也不一致,因此前处理方法无法保证每一个化合物的回收率都能达到 100% 满意的结果,但均在 70%~120%,满足日常检测的定量要求。今后可扩大检测基质体量、研究不同基质的前处理方式的优化以及如何更加有效去除基质的干扰,以期达到更全面、严格管理监测这类中药材或药物的使用。

参考文献

- [1] 夏新斌,杨勇,吴玉冰,等.中医药膳食品认证管理现状探讨[J].食品与机械,2018,34(8):207-210.
- [2] 蔺红伟,江春霞,陆文铨,等.仙灵骨葆同方提取物的肝细胞毒性研究[J].药学服务与研究,2020,20(2):98-101.
- [3] 宋蕾,毕亚男,袁晓美,等.异补骨脂素腹腔注射 9 d 所致 C57 小鼠肝损害[J].毒理学杂志,2018,32(1):21-24.
- [4] 艾国,黄正明,王德文,等.金丝桃苷的大鼠胚胎—胎仔发育毒性研究[J].中国中药杂志,2012,37(16):2 452-2 455.
- [5] 王丹,贾德贤,李真真,等.淫羊藿的安全性评价与风险控制措施探讨[J].中国中药杂志,2019,44(8):1 715-1 723.

- [11] 房超,董雷玲,宋阳威.高效液相色谱法同步检测橙汁饮料中多菌灵、吡虫啉残留量[J].江苏农业科学,2012,40(9):295-297.
- [12] 吴燕,吴瑞梅,黄双根,等.茶叶中多菌灵残留的 SERS 快速检测[J].江苏农业科学,2015,43(9):338-340.
- [13] 王国霞.多菌灵酶联免疫分析技术研究[D].北京:中国农业科学院,2006:36.
- [14] 王金花,奇日迈励图,张蓉,等.抗多菌灵单克隆抗体的制备、纯化及初步鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2012,28(1):53-54.
- [15] 中国烟草总公司郑州烟草研究院,国家烟草质量监督检验中心,北京勤邦生物技术有限公司.检测多菌灵的酶联免疫试剂盒及其应用:CN201510973048.5[P].2015-12-23.
- [16] 刘小军,冯才伟,冯静,等.一种叶酸的酶联免疫快速检测试剂盒的研制[J].食品工业科技,2013,34(23):303-310.
- [17] 杨利国,胡少昶,魏平华,等.酶联免疫技术[M].南京:南京大学出版社,1998:114-157.
- [18] 郭春祥,郭锡琼.介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J].免疫学杂志,1983(33):97-100.
- [19] 郑百芹,罗晓琴,冯才伟,等.一种喹诺酮类药物的酶联免疫快速检测试剂盒的研制[J].中国酿造,2014,33(2):130-133.
- [20] 冯仁丰.分析灵敏度(检测限)[J].上海医学检验杂志,2002,17(3):133-136.
- [21] 董李学,冯才伟,冯静,等.抗氧氟沙星单克隆抗体的制备及 ELISA 快速试剂盒的初步研制[J].中国畜牧兽医,2014,41(8):90-94.

- [6] 康宁,高媛惠,高利珍.高效液相色谱—串联飞行时间质谱法检测安神类保健食品中非法添加物[J].食品与机械,2018,34(10):49-54.
- [7] 刘云,杨玉忠.超高效液相色谱—串联质谱法定性定量检测中成药及保健食品中非法添加的 17 种化学药物[J].安徽医药,2020(1):82-86.
- [8] 王雨晴,王雨辰,陈亮,等.超高效液相色谱—四极杆—飞行时间质谱快速筛查中成药、保健品中 26 种非法添加化合物[J].食品与发酵工业,2020,46(5):263-269.
- [9] 勇艳华,李鹏,边海涛,等.超高效液相色谱—串联质谱法测定痛风类中成药中 17 种非法添加物[J].中国卫生检验杂志,2019,29(22):2 711-2 714.
- [10] 马俊美,王敬,孙文毅,等.超高效液相色谱—串联质谱法测定保健食品中 90 种那非类药物[J].食品科学,2020,41(14):307-313.
- [11] 易必新,龙凌云,姜成君,等.UPLC-MS/MS 法测定保健食品中非法添加 14 种化学降糖药的研究[J].中南药学,2019,17(10):1 685-1 689.
- [12] 王超,祝波,杨钊.RRLC-MS/MS 法同时测定保健食品中 31 种降糖、降压、降血脂类非法添加化学药物[J].中国药师,2019,22(10):1 946-1 950.