

季大经 (David Ji)

著



# 保健品 的测试方法

液相色谱的分离技术及应用



上海科学技术出版社

# 保健品的测试方法： 液相色谱的分离技术及应用

季大经(David JI) 著

上海科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

保健品的测试方法 : 液相色谱的分离技术及应用 / 季大经著. — 上海 : 上海科学技术出版社, 2020.9

ISBN 978-7-5478-4325-3

I. ①保… II. ①季… III. ①液相色谱—液相分离—应用—保健—产品—测试方法 IV. ①TS207.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2020)第109029号

责任编辑: 包惠芳

特约编辑: 严 岷

封面设计: 赵 军

保健品的测试方法: 液相色谱的分离技术及应用  
季大经(David JD) 著

上海世纪出版(集团)有限公司 出版、发行  
上海科学技术出版社  
(上海钦州南路71号 邮政编码 200235 www.sstp.cn)

印刷

开本 787×1092 1/16 印张 25.75

字数 460千字

2020年10月第1版 2020年10月第1次印刷

ISBN 978-7-5478-4325-3/O·88

定价: 168.00元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题, 请向工厂联系调换

保健品的测试是一项非常有挑战性的工作。测试内容主要是对保健品成分的定量测试,即测试产品标签上所列的所有营养成分及含量,包括天然植物及其提取物的含量。

目前市场上的保健品种类繁多,成分复杂,配方各异,质量参差不齐,还有各种新产品不断出现。科学的、正确的、选择性强的测试方法是保证产品质量及市场监管的基础。

目前比较权威的测试方法有中国国标的方法、美国药典的方法、美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)及 Codex 的方法等。由于保健品配方多样,成分复杂,测试的化合物众多,单一的测试方法很难准确地测试市场上所有的产品。有些方法能准确地测试某些配方中的某些成分,但对不同配方的产品,由于成分、基质、剂型的不同等因素,在测试同样成分时可能会出现一些不可预测的干扰,导致结果出现偏差甚至根本无法测试。所以,依靠单一的权威方法是不够的。同时,有许多产品或产品成分目前尚没有权威的测试方法可循。因此,不断调整、改进已有的测试方法,建立替代的测试方法,开发新的测试方法,在保健品测试业中是非常重要和必要的。

保健品的测试还包括对一些特殊的有可能出现在保健品中的有害物质进行分析测试。例如,一些运动保健品中是否含有违禁物及其衍生的化合物;天然产品中是否含有人工合成的化合物或药物成分等。这类测试也同样需要一系列好的测试方法。

当前,有些权威的测试方法还是用传统的滴定法、重量法、比色法和薄层色谱等这些二三十年前甚至更早时候开发的方法。这些测试方法的准确性及特征性都有待提高、改进和更新。

目前,美国药典在进行测试方法的现代化,旨在用现代仪器和方法去取代那些老旧的重量法、滴定法、比色法等,以期得到更准确、更可靠的测试方法,但进展缓慢,对当前保健品的测试没有太多的影响。2002年,美国国家卫生研究院(National Institute of Health, NIH)卫生研究中心成立了保健品研究室(Office of Dietary Supplements, ODS),旨在对保健品进行研究的同时,开发一批科学的、高质量的保健品测试方法及标准品。ODS委托并资助AOAC开发了一批高质量的测试方法,到目前为止有16种测试方法被验证和发表,还有一些方法正在研发进行中。这显然远远满足不了测试市场所需。中国有关部门也在进行类似的工作,但同样也远远跟不上市场所需。

基于保健品测试的实际情况,美国国会通过的保健品生产和测试的生产质量管理规范(Good Manufacture Practice, GMP)对测试方法有两点要求:一是科学的(scientific);二是验证过的(verified)。没有规定要用官方或权威的测试方法,这个规定是基于保健品测试的特殊性和复杂性而作出的。

笔者是美国保健品及食品测试实验室 Analytical Laboratories In Anaheim 的创始人和技术总管,曾担任过AOAC保健品测试方法开发委员会会员,并任课题组专家、评审组成员及硫酸软骨素测试方法小组负责人,有20年的保健品测试方法的开发和验证及解决疑难问题的经验,本书系笔者有关保健品测试方法的系统总结。本书提供的方法是基于科学性的原则依靠先进仪器而开发出来的。有些方法通过了单一实验室的验证,个别方法正在进行AOAC的多实验室验证程序。这些方法可作为官方及权威测试方法或替代方法,帮助解决一些权威方法在测试实践中出现的问题。本书中还有很多尚没有权威方法可循,这些方法可以考虑先作为行业的测试方法,经验证后可提送有关单位作为权威方法或候选的权威方法。

本书不是简单地介绍测试方法,更重要的是通过演示方法开发的思路以及讨论,给读者一些借鉴,以期对读者今后的工作、学习和研究有所助益。

本书介绍的液相色谱分离方法不仅可以用在保健品测试上,也可以用在医药研究、食品及食品安全测试、农业和环保测试等领域。

保健品的测试还包括安全性测试,主要是重金属、微生物和残留物的测试。这类测试不包括在本书内容中。

第 1 章 液相色谱的分离技术及应用	1
1.1 固定相的种类	1
1.1.1 反相柱	1
1.1.2 芳香基固定相	3
1.1.3 离子交换固定相	6
1.1.4 含有氢键作用力的固定相	8
1.1.5 正相柱	8
1.1.6 亲和力色谱固定相	9
1.1.7 络合配位体或络合中心离子交换固定相	9
1.2 移动相的应用	10
1.2.1 移动相的 pH	10
1.2.2 离子对的应用	11
1.2.3 有机溶剂	15
1.2.4 离子交换色谱中的移动相	16
1.3 样品及标准溶液的配制	16
1.4 仪器介绍	18
1.4.1 高效液相色谱仪	18
1.4.2 超高效液相色谱仪	20
1.4.3 离子色谱仪	22
1.4.4 LC-MS/MS 的定性及定量测试	23

第 2 章	维生素及相关营养素测试方法	30
2.1	水溶性维生素的测试方法	30
2.1.1	水溶性维生素的测试方法	30
2.1.2	维生素 B <sub>12</sub> 和生物素的 LC-MS/MS 测试方法	37
2.1.3	用 LC-MS/MS 的方法测试水溶性维生素	40
2.1.4	甲基 B <sub>12</sub> 的测试方法	43
2.1.5	5-甲基四氢叶酸的测试方法	46
2.1.6	维生素 C 的测试方法	48
2.2	脂溶性维生素的测试方法	50
2.2.1	维生素 D <sub>2</sub> 、D <sub>3</sub> 和 D <sub>3</sub> 的前驱物的测试方法	52
2.2.2	维生素 A 的测试方法	54
2.2.3	维生素 E 的测试方法	56
2.2.4	维生素 K <sub>1</sub> 、K <sub>2</sub> (MK4 和 MK7)、K <sub>3</sub> 的测试方法	59
2.2.5	液相色谱条件的调整	61
2.2.6	维生素 D 和维生素 K 的 LC-MS/MS 方法	61
2.2.7	β-胡萝卜素的测试方法	65
2.2.8	维生素 E、维生素 A 和维生素 D (mg/IU) 的转换系数	68
2.2.9	总生育素和总生育三烯酚的测试方法	68
2.3	类胡萝卜素的测试方法	72
2.3.1	番茄红素的测试方法	73
2.3.2	叶黄素和玉米黄质的测试方法	74
2.3.3	虾青素的测试方法	76
第 3 章	糖类的测试方法	79
3.1	单糖和双糖的测试方法	79
3.2	多糖的测试方法	81
3.3	聚多糖的测试方法	84
3.3.1	硫酸软骨素的测试方法	85
3.3.2	透明质酸的测试方法	93

3.3.3	葡萄糖胺的测试方法	96
3.3.4	甲基磺胺甲烷的测试方法	99
第 4 章	保健品中常用的植物及植物提取物的测试方法	101
4.1	大豆异黄酮(葛根、红三叶草)的测试方法	102
4.2	黄曲霉毒素的 LC-MS/MS 测试方法	106
4.3	人参皂苷的测试方法	109
4.4	绿茶中茶多酚和咖啡因的测试方法	118
4.5	红茶中茶黄素的测试方法	121
4.6	红景天的测试方法	123
4.7	缬草的测试方法	125
4.8	银杏黄酮的测试方法	127
4.9	银杏萜内酯的测试方法	129
4.10	姜的测试方法	131
4.11	紫锥菊的测试方法	134
4.12	羟基柠檬酸的测试方法	137
4.13	香豆素的测试方法	138
4.14	欧洲越橘中花青素和花色苷的测试方法	140
4.15	辣椒中辣椒总碱的测试方法	143
4.16	淫羊藿中淫羊藿苷的测试方法	145
4.17	柑橘生物类黄酮的测试方法	148
4.18	桃叶珊瑚苷的测试方法	152
4.19	山楂的测试方法	153
4.20	红曲米的测试方法	155
4.21	水飞蓟及其萃取物的测试方法	159
4.22	刺五加的测试方法	162
4.23	短碳链有机酸的测试方法	164
4.24	黄芩的测试方法	166
4.25	芹菜素的测试方法	168

4.26	木樨草素的测试方法	170
4.27	玛卡的测试方法	171
4.28	虫草素的测试方法	175
4.29	漆黄素的测试方法	176
4.30	贯叶金丝桃的测试方法	178
4.31	芝麻中芝麻素和芝麻林素的测试方法	180
4.32	毛喉鞘蕊花中佛司可林的测试方法	182
4.33	甘草酸的测试方法	184
4.34	迷迭香的测试方法	185
4.35	匙羹藤酸的测试方法	187
4.36	醉茄素 A 的测试方法	189
4.37	吴茱萸碱的测试方法	191
4.38	石杉碱甲的测试方法	192
4.39	茶氨酸的测试方法	194
4.40	柠檬烯的测试方法	196
4.41	橄榄苦苷的测试方法	197
4.42	鞣花酸的测试方法	199
4.43	育亨宾碱的测试方法	201
4.44	积雪草及其提取物中三萜烯的测试方法	202
4.45	安石榴苷的测试方法	205
4.46	$\beta$ -七叶素的测试方法	207
4.47	白藜芦醇的测试方法	209
4.48	金印草的测试方法	210
4.49	小白菊内酯的测试方法	212
4.50	猫爪草中羟吡啶生物碱的测试方法	214
4.51	枳实中辛弗林和甲基酪胺的测试方法	216
4.52	黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测试方法	219
4.53	萝卜硫苷的测试方法	221
4.54	玄参苷的测试方法	222

4.55	当归中川芎内酯的测试方法	224
4.56	番泻苷 A 和 B 的测试方法	226
4.57	没药甾酮 E、Z 的测试方法	228
4.58	马兜铃酸 I 和 II 的测试方法	230
4.59	锯棕榈中脂肪酸的测试方法	232
4.60	大黄素的测试方法	233
4.61	穿心莲内酯的测试方法	234
4.62	草蒿脑的测试方法	236
4.63	$\alpha$ -没药醇的测试方法	238
4.64	和厚朴酚及厚朴酚的测试方法	240
4.65	香芹酚的测试方法	242
4.66	麝香草酚的测试方法	243
4.67	丁香油酚的测试方法	245
4.68	酸枣仁皂苷 A 的测试方法	247
4.69	羽扇豆醇的测试方法	249
4.70	丁香烯的测试方法	251
4.71	百里醌的测试方法	252
4.72	反式和顺式柠檬醛的测试方法	254
4.73	五味子素 A 的测试方法	256
4.74	薯蓣皂素的测试方法	258
4.75	羟基酪醇的测试方法	259
4.76	氧化苦参碱的测试方法	261
4.77	罗汉果苷 V 的测试方法	263
4.78	姜酮酚的测试方法	265
4.79	甜菊的测试方法	267
4.80	麻黄碱的测试方法	270
4.81	螺旋藻的测试方法	272
4.82	大蒜的测试方法	274
4.83	阿魏酸的测试方法	276

4.84	植物甾醇的测试方法	278
4.85	葛萆亭的测试方法	281
4.86	水杨酸和水杨苷的测试方法	282
4.87	肉桂醛的测试方法	284
4.88	壬二酸的测试方法	286
4.89	芹菜素-7-葡萄糖苷的测试方法	287
4.90	洋蓟素的测试方法	289
第5章	其他营养成分的测试方法	292
5.1	碘的测试方法	292
5.2	甘油磷脂酰胆碱的测试方法	294
5.3	氨基酸的测试方法(直接色谱法)	296
5.4	氨基酸的测试方法(柱前衍生法)	299
5.5	用 UPLC - UV/CD 检测器来定性及定量测试保健品中游离氨基酸的对映体	301
5.6	蜂王浆中 10-羟基癸酸和 10-羟基癸烯酸的测试方法	308
5.7	$\alpha$ -酮戊二酸的测试方法	310
5.8	氨基丁酸的测试方法	312
5.9	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的测试方法	313
5.10	植酸的测试方法	314
5.11	地奥司明的测试方法	317
5.12	脱氧表雄酮的测试方法	318
5.13	3,3'-二吡啶基甲烷的测试方法	320
5.14	胆碱的测试方法	322
5.15	长春西汀的测试方法	323
5.16	胆汁酸的测试方法	324
5.17	4-甲基咪唑的测试方法	327
5.18	抗氧化值的测试方法	330
5.19	布洛芬的测试方法	331

5.20	苯磷硫胺的测试方法	333
5.21	依普黄酮的测试方法	335
5.22	白杨素的测试方法	336
5.23	泛硫乙胺的测试方法	338
5.24	肌醇烟酸酯的测试方法	339
5.25	腺苷甲硫氨酸的测试方法	341
5.26	辅酶 Q10 的测试方法	344
5.27	褪黑激素的测试方法	345
5.28	异牡荆苷的测试方法	346
5.29	鱼油中 $\omega$ -3 的测试方法	348
5.30	N,N-二甲乙醇胺的测试方法	350
5.31	5-羟基色氨酸的测试方法	351
5.32	依布硒啉的测试方法	353
5.33	对苯二酚的测试方法	354
5.34	硫辛酸的测试方法	356
5.35	5-磷酸吡哆醛的测试方法	357
5.36	维生素 C 棕榈酸酯的测试方法	359
5.37	共轭亚油酸的测试方法	361
5.38	多酚化合物的测试方法	362
5.39	原花青素的测试方法	364
5.40	单脂肪酸甘油酯的测试方法	365
5.41	对氨基苯甲酸的测试方法	367
5.42	孕烯醇酮的测试方法	369
5.43	紫苏醛的测试方法	371
5.44	缬氨酸的测试方法	373
5.45	多库酯的测试方法	375
5.46	甜菜碱、肉碱和乙酰肉碱的测试方法	377
5.47	左旋多巴的测试方法	379
5.48	卵磷脂的测试方法	380

保健品的测试方法：液相色谱的分离技术及应用

5.49	尿苷酸二钠的测试方法 .....	382
5.50	N-乙酰-D-氨基葡萄糖的测试方法.....	384
5.51	肌酸的测试方法 .....	385
5.52	谷胱甘肽的测试方法 .....	386
5.53	二十八烷醇的测试方法 .....	388
5.54	肌醇的测试方法 .....	389
5.55	羟苯甲酯和羟苯丙酯的测试方法 .....	391
参考文献 .....		393
索引 .....		394

# 第 1 章

## 液相色谱的分离技术及应用

液相色谱是化学分析测试的一个重要工具,利用不同化合物的分子在移动相的作用下,与固定相(分析柱)产生不同类型、不同强度的相互作用力,形成不同的保留时间,从而起到分离的作用。

### 1.1 固定相的种类

比较常用的固定相有以下几种。

#### 1.1.1 反相柱

反相柱(reversed phase column)就是把具有一定数目的直链碳原子的非极性化合物反应到硅胶或其他载体表面,形成非极性的表面。反应上去的分子有 C18、C8、C30 等,碳链越长非极性越强,其中 C18 是使用最广泛的反相柱。被测分子与反相柱间的作用力是色散力。非极性的分子会产生瞬间偶极矩,并诱导邻近的非极性分子也产生瞬间偶极矩,从而产生相互的亲合力,如图 1-1 所示。

日常生活中相似相溶现象的产生是由于物质之间色散力的作用。例如,非极性的维生素 E 易溶解于非极性的油或其他非极性的溶剂;极性的盐易溶解于极性的水中。被测分子的非极性越强,与反相固定相的相互亲和力就越强,在反相柱中的保留时间越长;反之,分子的极性越强,在反相柱中的保留时间就越短。

保健品的测试方法：液相色谱的分离技术及应用

图 1-2 中的三甲基硅烷 (trimethylsilane, TMS) 是键合到硅胶表面上的分子，以减少硅胶表面 (—OH) 基团的活性。

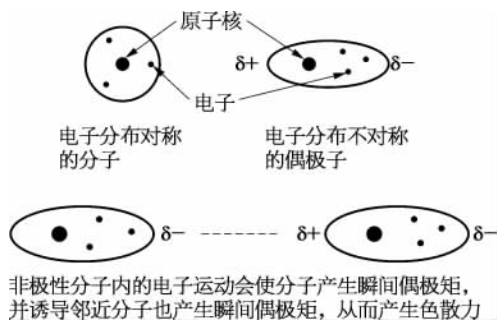


图 1-1 色散力图解

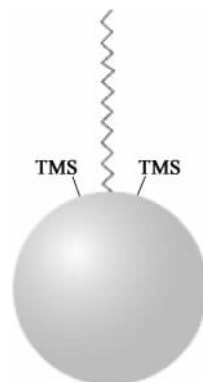


图 1-2 C18 载体的示意图

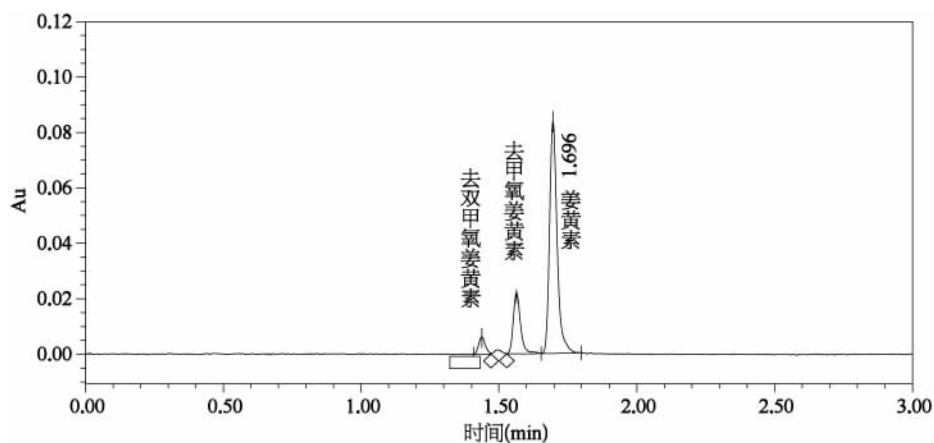
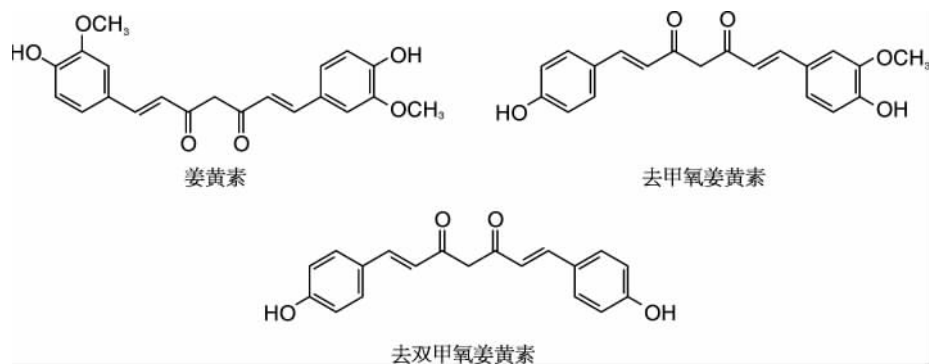


图 1-3 姜黄素的反相色谱图



从图 1-3 可以看到,3 种物质的极性比较为姜黄素<去甲氧姜黄素<去双甲氧姜黄素。因为姜黄素含有 2 个非极性甲氧基,去甲氧姜黄素含有 1 个甲氧基,而去双甲氧姜黄素不含有甲氧基。所以在反相色谱中非极性最强的姜黄素保留时间最长。

### 1.1.2 芳香基固定相

把含有芳香基的硅烷分子结合到载体硅胶表面,从而形成芳香基固定相(phenyl stationary phase),也就是苯基固定相。芳香基固定相与含有芳香基或共轭双键低能量  $\pi$  键的被测分子间的作用力,除了色散力外,还有  $\pi-\pi$  作用力。 $\pi-\pi$  作用力是由 2 个含有低能量  $\pi$  键(如苯环或共轭双键)的分子的  $\pi$  电子云重叠而产生的。图 1-4 所示的是电子云的 3 种不同的重叠形式。

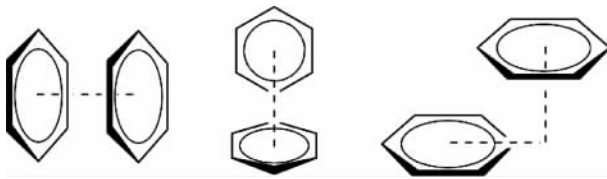


图 1-4 电子云的 3 种不同的重叠形式

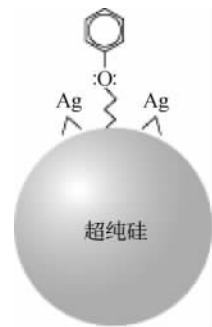


图 1-5 苯基固定相载体的示意图

苯基的固定相与含苯环或共轭双键的被测分子间会产生  $\pi-\pi$  作用力,当相互间的  $\pi$  电子云的能量接近时,会产生较强的亲和力及较长的保留时间,如图 1-5 所示。

比如,叶黄素和玉米黄质是一对在自然界共存的含有共轭低能量  $\pi$  键的同分异构体,极性相似,用反相柱很难分离,如用 C30 柱要用很长时间才能把它们分开,但用苯基柱就很容易分离(图 1-6)。

又如,比较图 1-7 和图 1-8 的光谱图可知,样品中的科罗素酸峰是不纯的,所含杂质分子含有低能量  $\pi$  电子(在 280 nm 处有吸收)。杂质分子的极性可能与科罗素酸相似,所以 C18 反相柱不能把它们分开。换用苯基柱后,由于杂质分子的  $\pi$  电子与固定相上的  $\pi$  电子产生额外的  $\pi-\pi$  作用,所以保留时间会比

科罗素酸长一点,这样就把杂质分离开了。图 1-9 和图 1-10 是用苯基柱分离得到的光谱图和色谱图。把图 1-10 中的杂质峰的光谱图和科罗素酸的光谱图叠加起来,正好和图 1-8 中含有杂质峰的光谱相吻合。

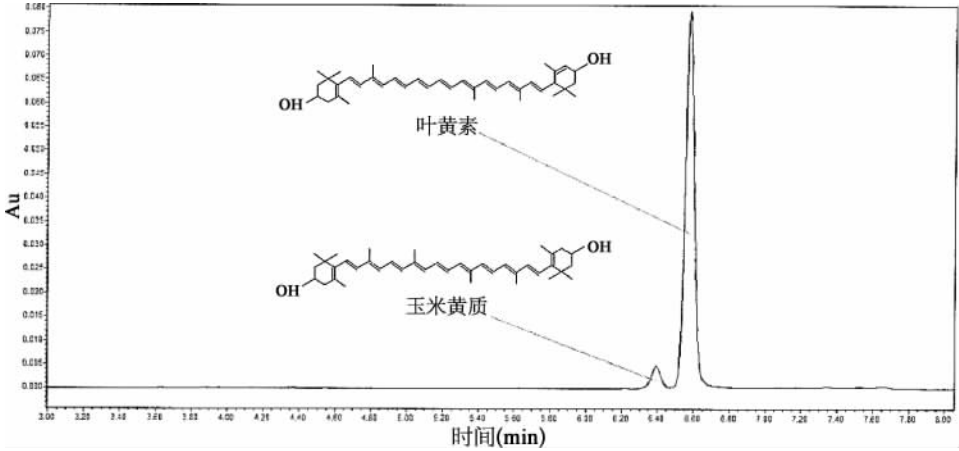


图 1-6 叶黄素和玉米黄质的苯基固定相相色谱图

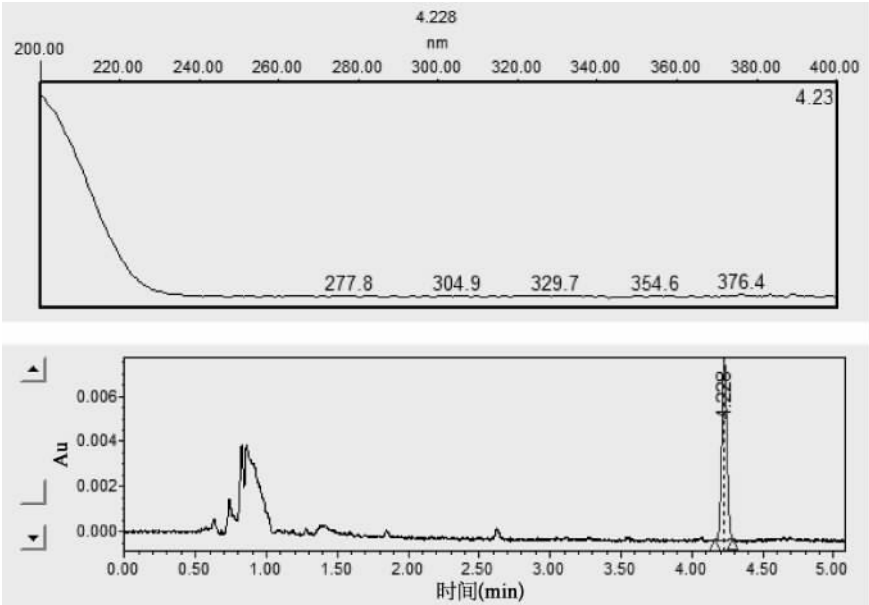


图 1-7 科罗素酸标准品在 C18 反相柱上的光谱图(上)和色谱图(下)