

《保健食品中淫羊藿苷的测定》国家标准

编制说明（征求意见稿）

一、工作简况

（一）任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2023 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发〔2023〕37 号），《保健食品中淫羊藿苷的测定》（计划号 20230865-T-424）列入修订计划，由全国特殊食品标准化技术委员会归口，由中国食品发酵工业研究院等单位共同组织完成起草修订工作。

（二）主要工作过程

起草阶段

2023 年 8 月~2023 年 10 月，成立标准修订组，确定标准制修订方案和工作计划，并开展了方法学验证。

2023 年 11 月，全国特殊食品标准化技术委员会在北京召开《14 项保健食品分析方法标准启动会》修订工作启动会，会上讨论了《保健食品中淫羊藿苷的测定》的修订方案。

2023 年 11 月~2024 年 1 月，起草组各单位根据《保健食品中淫羊藿苷的测定》标准修订方案开展实验室内方法验证的工作。

2024 年 1 月，全国特殊食品标准化技术委员会组织各参与单位开展新修订保健食品中淫羊藿苷测定方法的实验室间方法验证工作。

2024 年 1 月，起草工作组在前期工作基础上形成标准征求意见

稿。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

本标准是根据 GB/T1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构与编写规则》进行编写。

（二）标准主要内容及其确定依据（包括修订前后技术内容的对比）

描述了保健食品中淫羊藿苷的测定方法；适用于胶囊、软胶囊、片剂、颗粒、丸剂、口服液、酒类等剂型保健食品中淫羊藿苷的测定。

GB/T 22247-2008相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了第二法 液相色谱-串联质谱法；
- 修改了适用范围；
- 增加了试样制备；
- 优化了前处理条件和色谱条件；
- 修改了检出限和定量限。

增加液相色谱-串联质谱法原因有：

目前已知的含淫羊藿苷的样品绝大部分是添加的淫羊藿提取物，淫羊藿提取物是淫羊藿功效成分的混合物，所以产品中会存在朝藿定C等其他功效成分，我们建议增加液相色谱-串联质谱法的目的是在必要时提供一个淫羊藿苷定性手段，防止出现“假阳性”。

三、试验验证的分析、综述报告

高效液相色谱法

方法线性关系：以淫羊藿苷为定量外标，在1.0~100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，相关系数 R^2 大于0.999，线性关系良好。选择胶囊、片剂、保健茶、颗粒、丸剂、粉剂、酒类、口服液空白样品，做LOQ、5LOQ、10LOQ三个水平添加，每个添加六个平行，样品的平均加标回收率在80.5%~109.6%之间，相对偏差在1.10%~8.57%之间，符合GB 5009.295-2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》对方法正确度和精密度的要求。

液相色谱-串联质谱法

方法线性关系：以淫羊藿苷为定量外标，在1.0~100.0 ng/mL 浓度范围内，相关系数 R^2 大于0.999，线性关系良好。选择胶囊、片剂、保健茶、颗粒、丸剂、粉剂空白样品，分别加入1 mg/kg 、5 mg/kg 、10 mg/kg 淫羊藿苷标准品，选择酒类、口服液空白样品分别加入1 mg/L 、5 mg/L 、10 mg/L 淫羊藿标准品，每个添加六个平行，样品的平均加标回收率在80.3%~108.7%之间，相对偏差在1.26%~5.97%之间，符合GB 5009.295-2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》对方法正确度和精密度的要求。

方法验证基础上，起草工作组组织6家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。

具体方法验证和实验室比对情况见附件一。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

无。

五、以国际标准为基础的起草情况

本标准没有采用国际标准。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准与现行法律法规和强制性国家标准协调一致。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议

建议本标准发布 6 个月后实施，由归口单位组织行业相关单位积极开展宣贯工作。

十、其他应当说明的事项

本标准发布实施后，GB/T 22247-2008 废止。

附件：方法学验证报告

附件一

保健食品中淫羊藿苷的测定方法学验证

第一法高效液相色谱法

一、方法验证

1、特异性

比较了与淫羊藿其他功效成分朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 对淫羊藿苷出峰的影响，结果显示，淫羊藿苷能与朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 基线分离，淫羊藿苷与朝藿定 C 的分离度为 2.83，满足分离要求。4 种功效成分的色谱图见图 1。

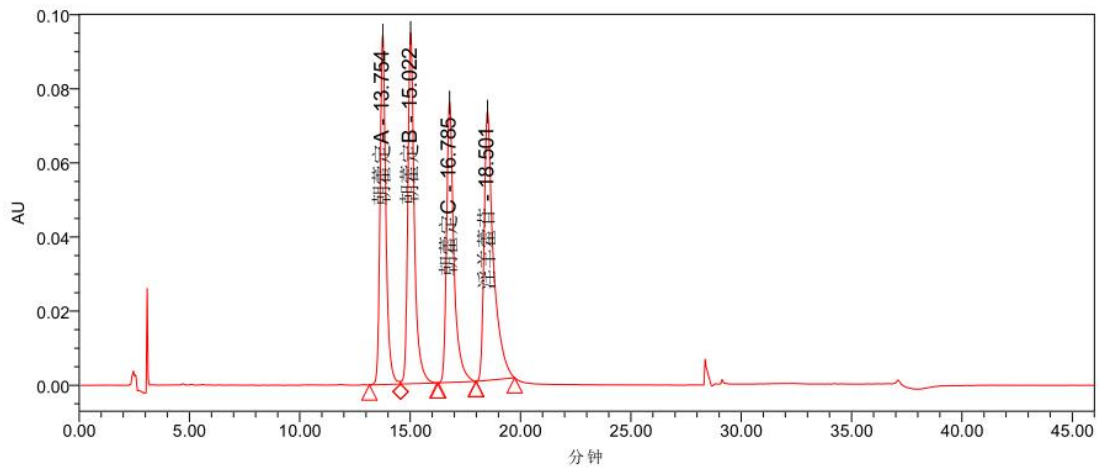
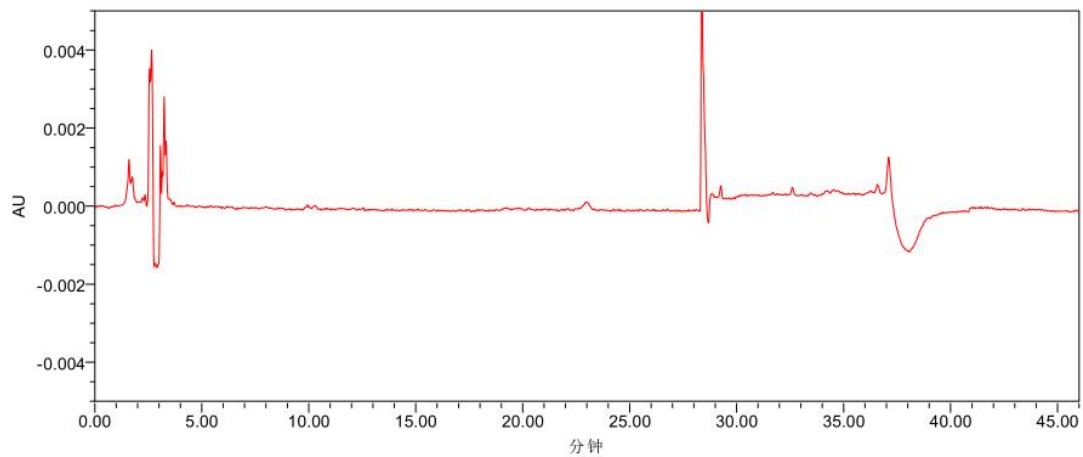
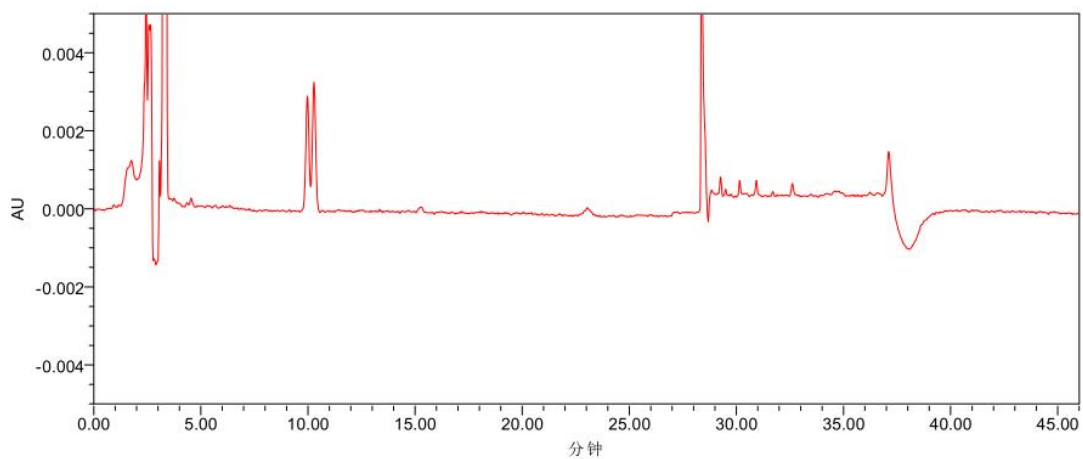


图 1 淫羊藿苷与朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的色谱图

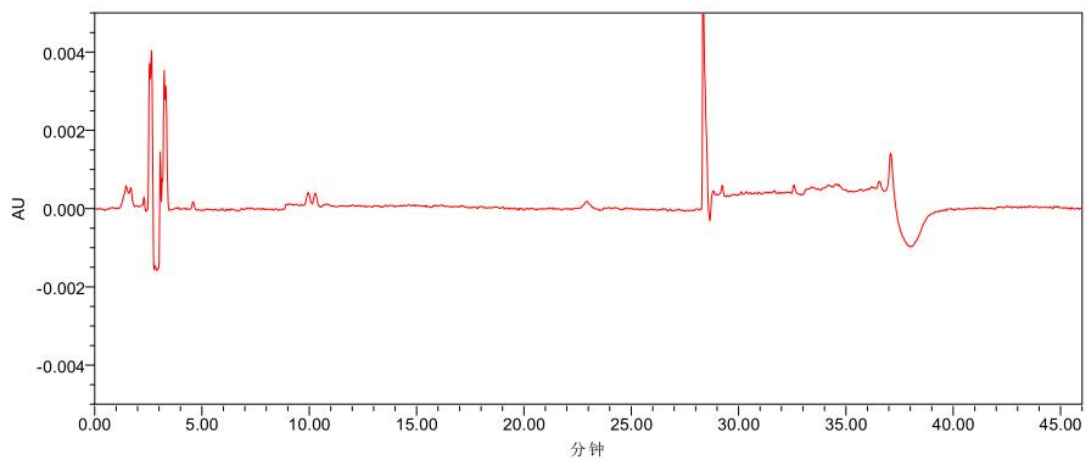
选择胶囊、片剂、酒类、软胶囊、口服液、保健茶、颗粒、丸剂、粉剂等空白样品与淫羊藿苷标准进行比对，结果显示淫羊藿苷保留时间为 18.305，空白辅料中无色谱峰对淫羊藿苷检测造成干扰，具体见图 2。



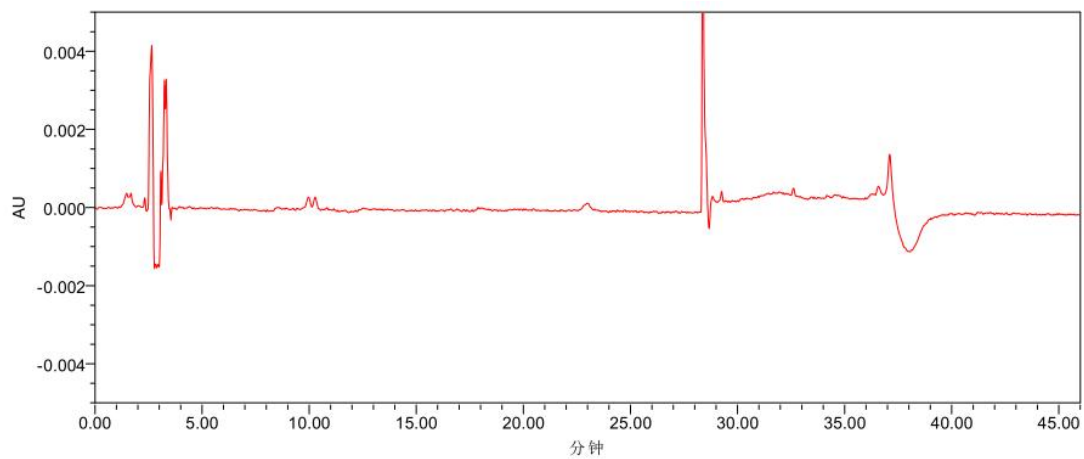
(a) 胶囊样品空白



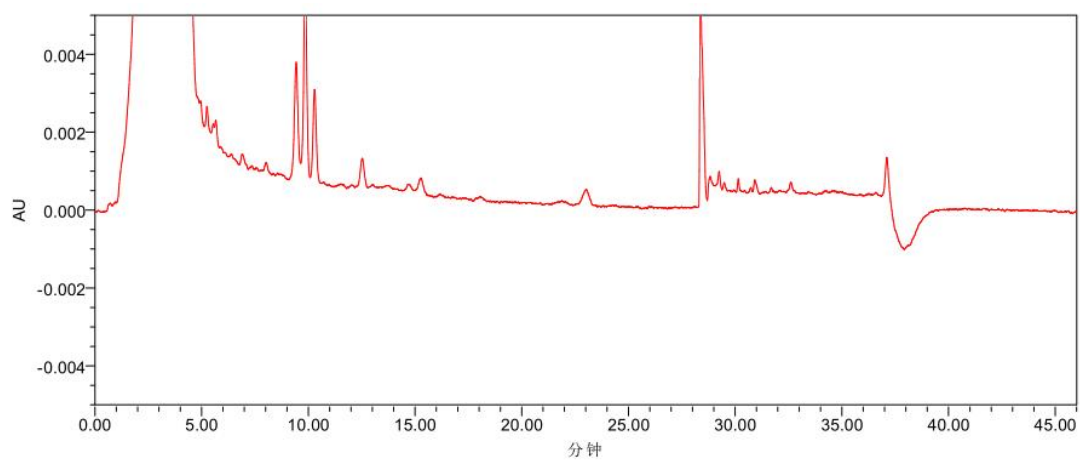
(b) 片剂样品空白



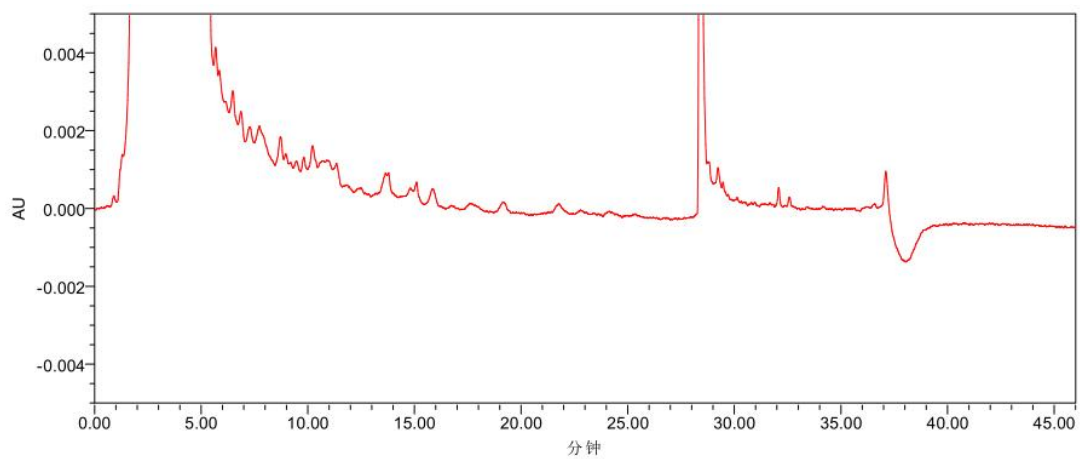
(c) 酒类样品空白



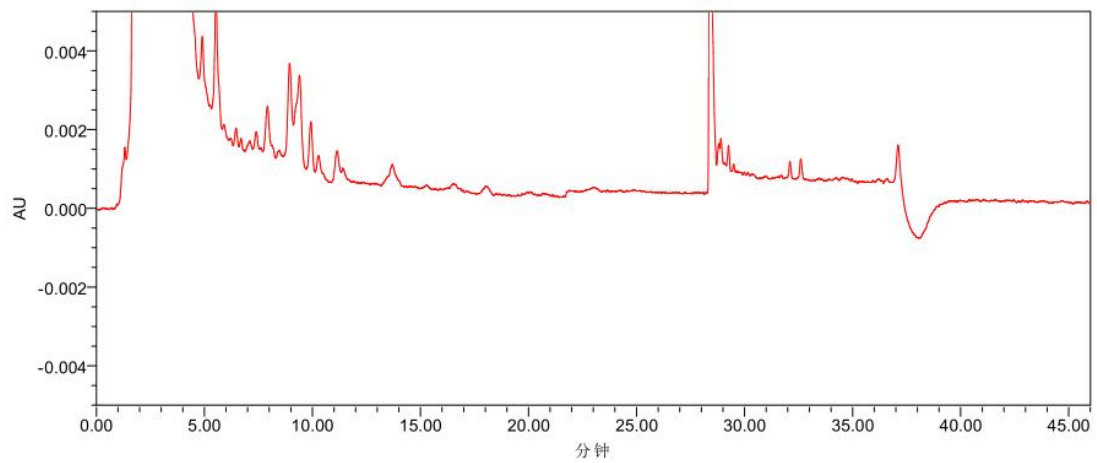
(d) 软胶囊样品空白



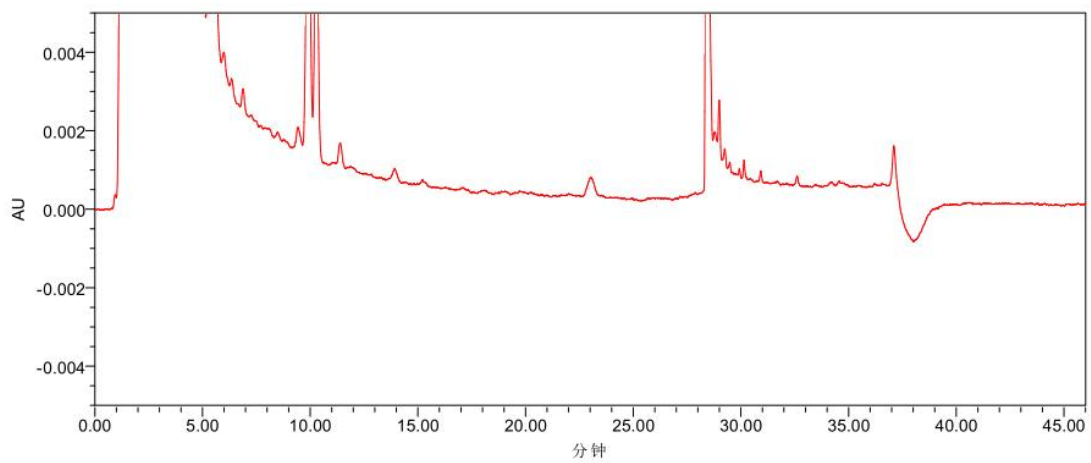
(e) 口服液样品空白



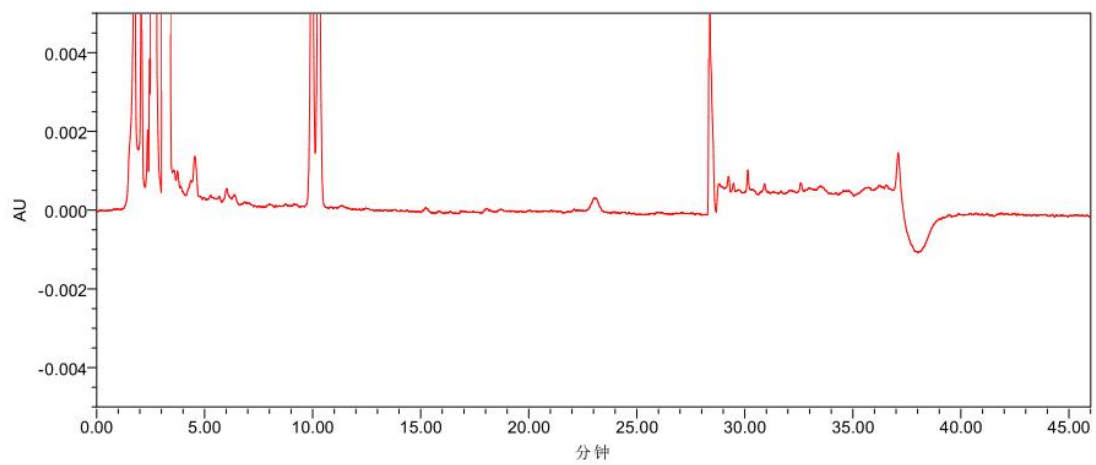
(f) 保健茶样品空白



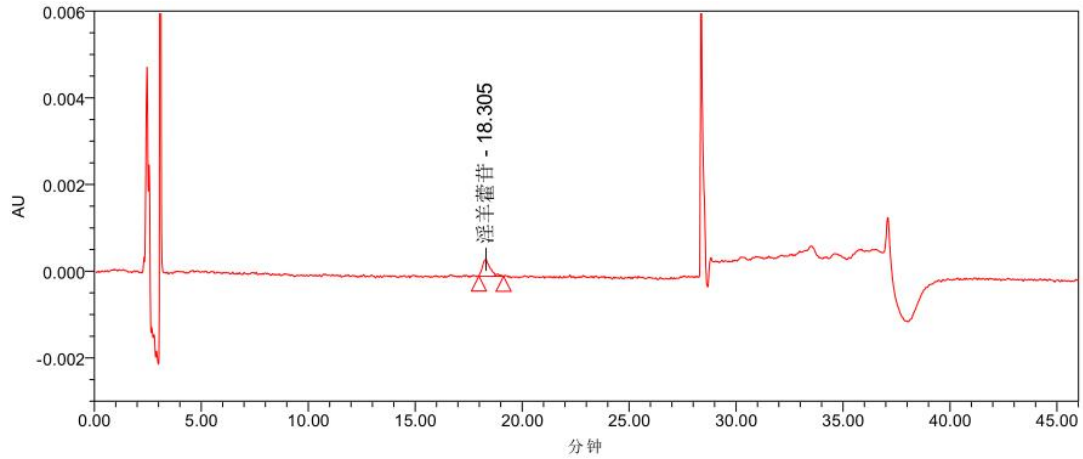
(g) 颗粒剂样品空白



(h) 丸剂样品空白



(i) 粉剂样品空白



(j) 淫羊藿苷标准溶液

图2 不同剂型样品空白出峰情况

2、前处理条件的选择和优化

2.1 提取溶剂的选择

为选择合适的提取溶剂，选取淫羊藿中药、含淫羊藿的钙片、含淫羊藿的口服液为研究对象，考察不同溶剂水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯，40%乙醇溶液、50%乙醇溶液、60%乙醇溶液、70%乙醇溶液、80%乙醇溶液、40%甲醇溶液、50%甲醇溶液、60%甲醇溶液、70%甲醇溶液、80%甲醇溶液）对目标物的提取效果。结果见图3，由实验结果可知，70%乙醇水溶液对含目标物样品的提取效果最佳。

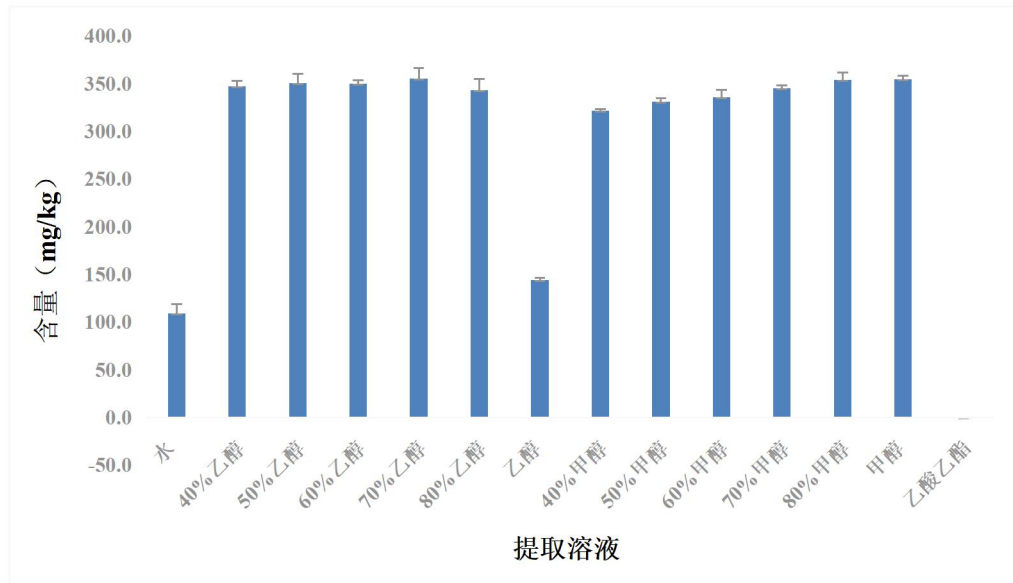


图 3(a) 不同溶剂对淫羊藿中药中淫羊藿苷的提取效果

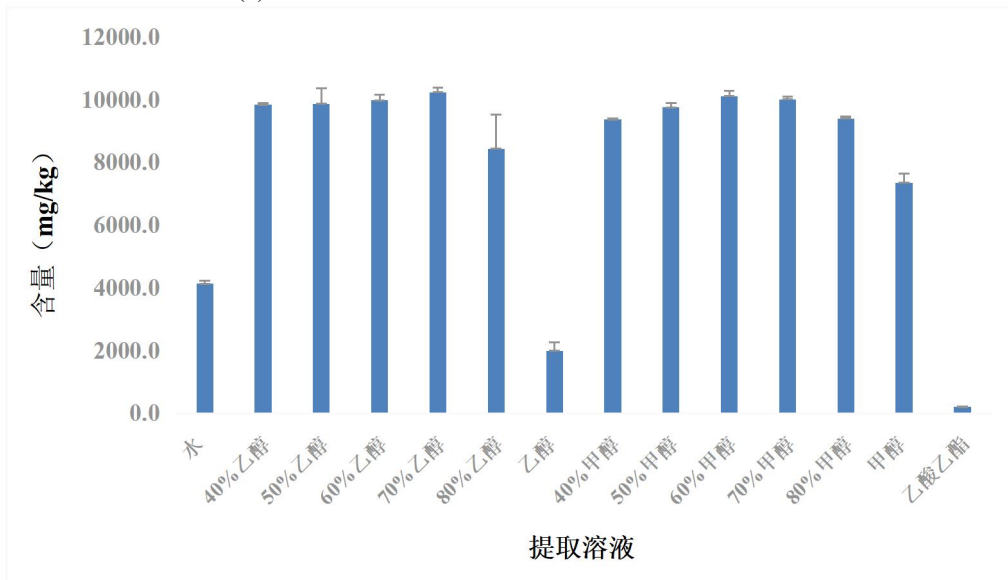


图 3(b) 不同溶剂对含淫羊藿的钙片中淫羊藿苷的提取效果

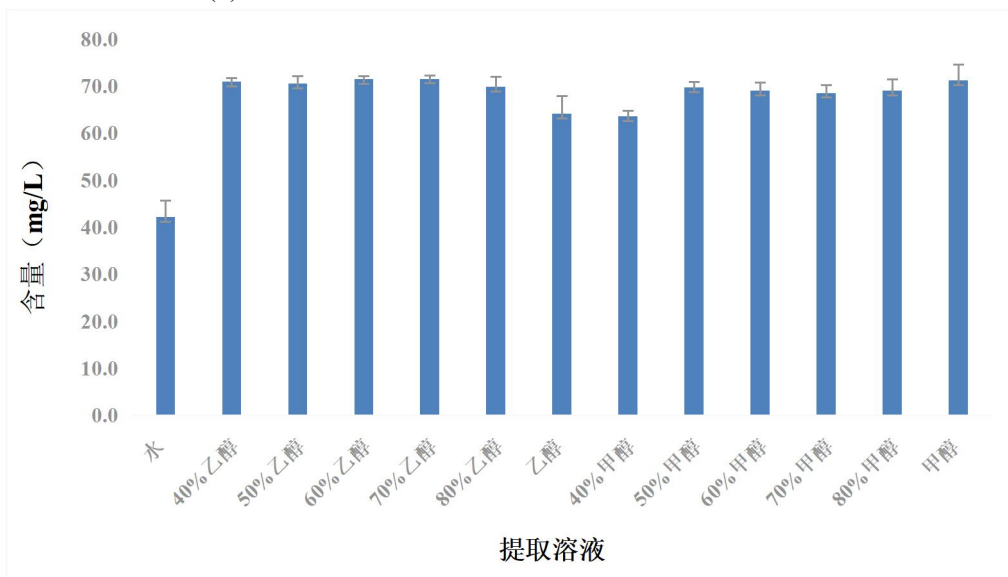


图 3(c) 不同溶剂对含淫羊藿的口服液中淫羊藿的提取效果

2.2 提取方式的选择

为选择合适的提取方式，实验选取淫羊藿中药、含淫羊藿的钙片、劲酒、含淫羊藿的口服液为研究对象，考察振荡提取（提取时间 10min、20min、30min、1h）和超声提取（超声时间 10min、20min、30min、1h）的提取效果。结果见图 4，由实验结果可知，超声提取 20min 的提取效果最佳。

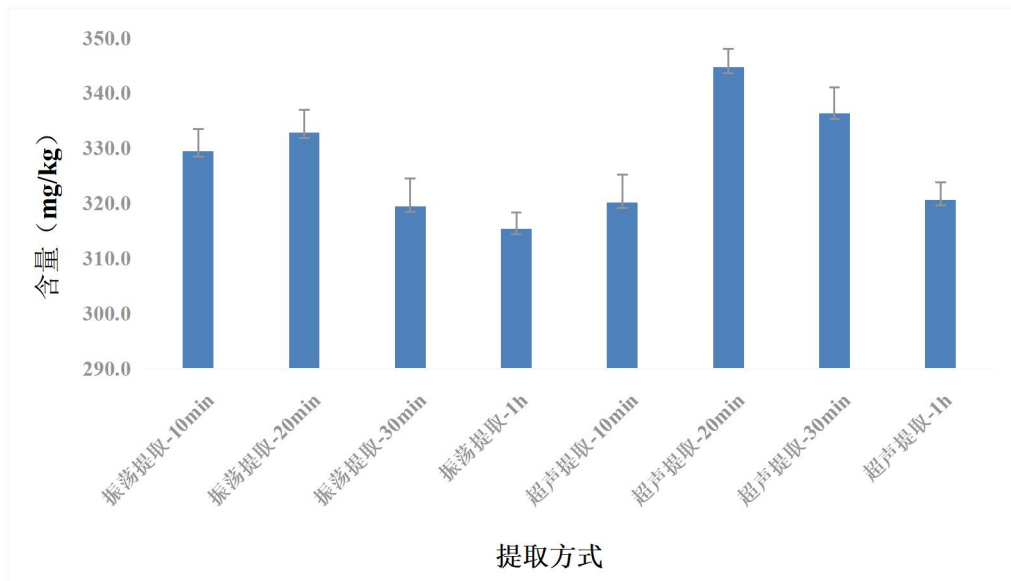


图 4(a) 不同提取方式对淫羊藿中药中淫羊藿苷的提取效果

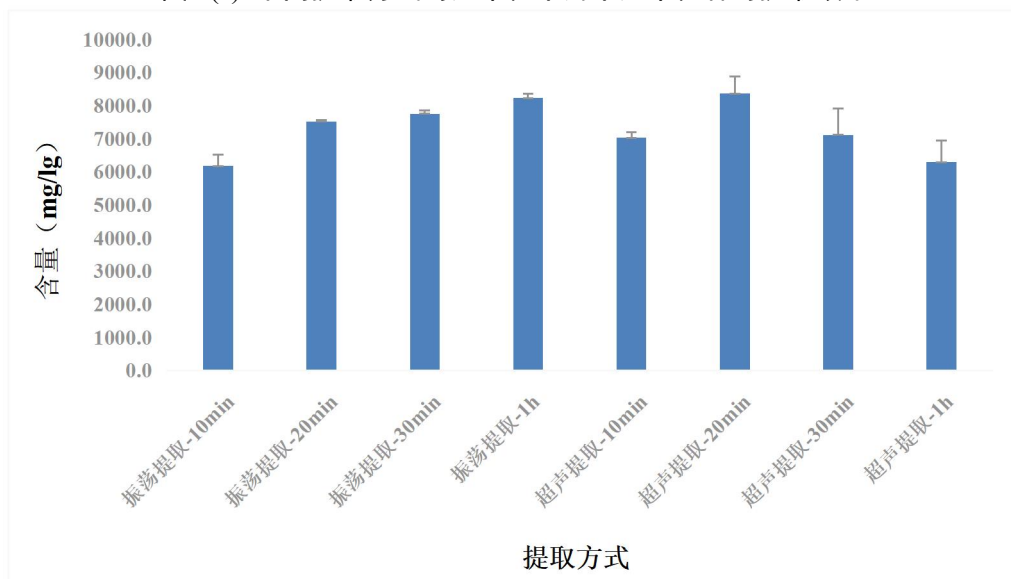


图 4(b) 不同提取方式对含淫羊藿的钙片中淫羊藿苷的提取效果

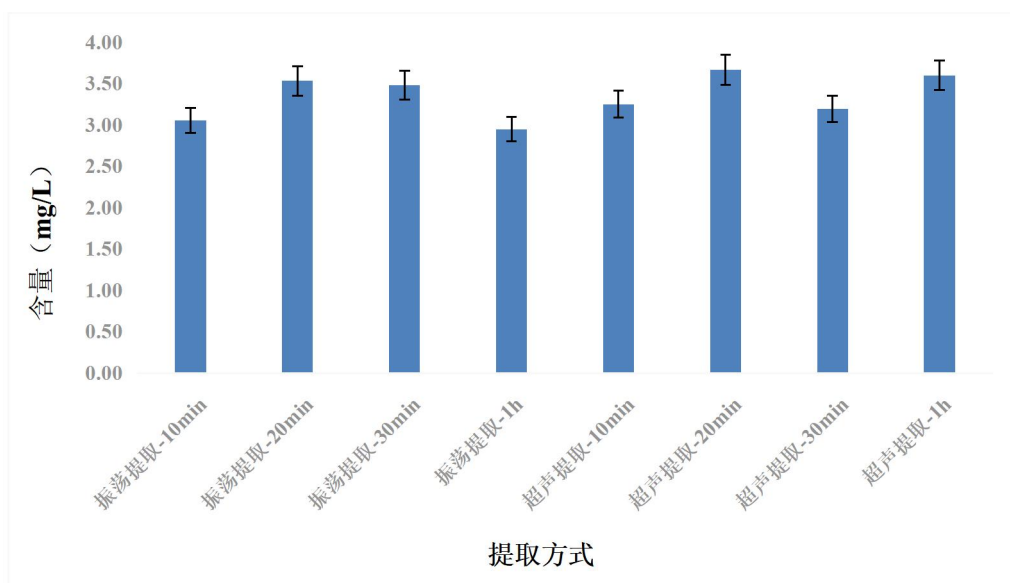


图 4(c) 不同提取方式对酒类中淫羊藿苷的提取效果

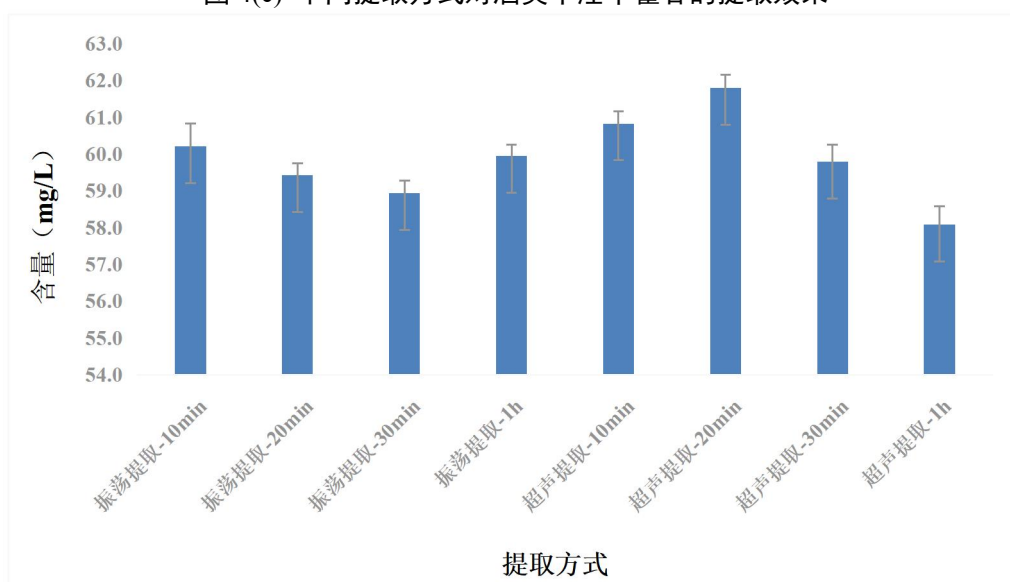


图 4(d) 不同提取方式对含淫羊藿的口服液中淫羊藿苷的提取效果

2.3 含油样品除脂方式的选择

软胶囊等含油试样由于含油大量脂肪酸影响目标物的提取，实验选取含淫羊藿的软胶囊样品为研究对象，考察石油醚除脂和正己烷除脂两种方式下提取效果。结果见图 5，由实验结果可知，正己烷除脂的效果更好。后续实验，含油样品采用正己烷除脂。

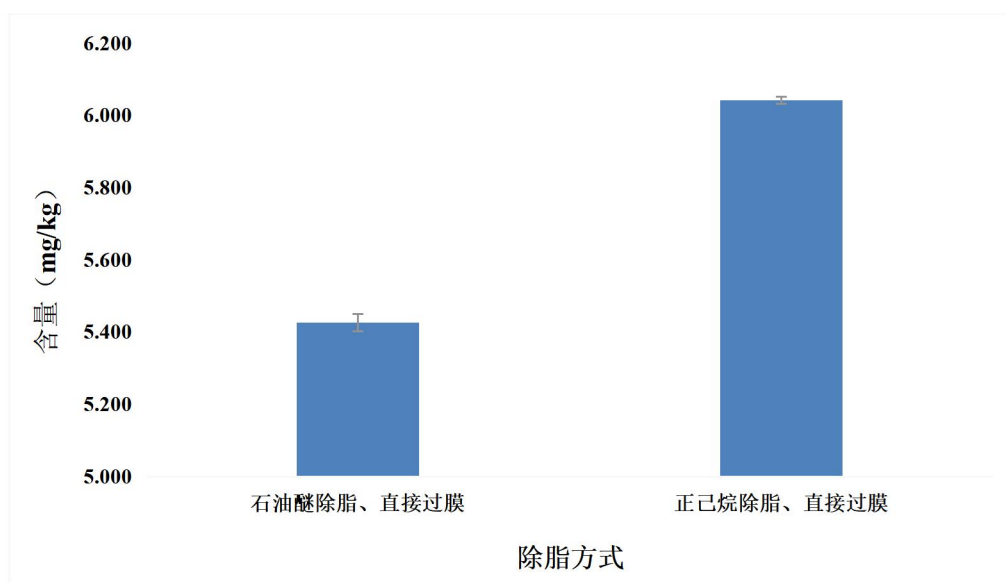


图 5 不同除脂方式对含淫羊藿的软胶囊中淫羊藿苷的提取效果

2.4 净化方式的选择

选择胶囊、片剂、酒类、软胶囊、口服液、保健茶、颗粒、丸剂、粉剂等不同剂型的保健食品，考察不净化、分散固相萃取净化和 PRiME HLB 固相萃取净化时加标回收率。其中，胶囊、片剂、保健茶、颗粒、丸剂、粉剂加标水平为 25 mg/kg，酒类、软胶囊、口服液添加水平为 10 mg/L。如图 6 所示，胶囊提取液采用分散固相萃取净化（2 mL 提取液+50 mg PSA、50 mg C₁₈）时，存在干扰，无法得到回收率数据；颗粒提取液在未采取净化措施时，存在干扰，无法得到回收率数据，《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》（GB 5009.295-2023）规定，分析物浓度范围为 100μg/kg~1000 mg/kg 时，回收率范围为 80%~110%。因此，净化方法选择 PRiME HLB 固相萃取柱净化。

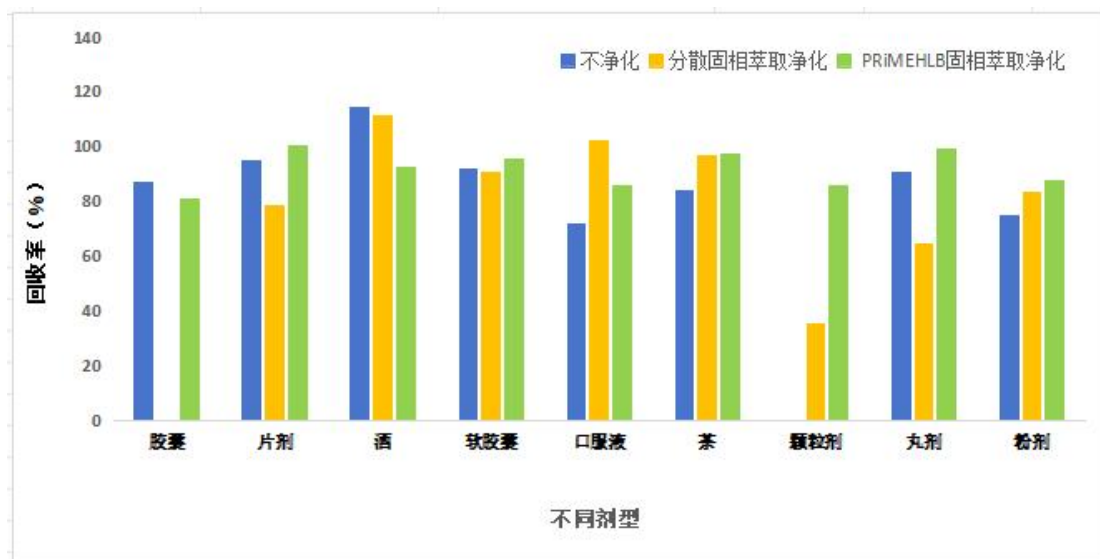


图 6 不同净化方式对加标回收率的影响

综上，提取液选择 70%乙醇溶液，提取方式选择超声提取，超声时间为 20min，含油样品选择正己烷除脂，净化方式选择通过式固相萃取净化。

3、仪器条件的选择和优化

3.1 吸收波长的选择

我们做了 210nm~400nm 波长范围的扫描,结果 270nm 响应最高,结果见图 7。后续实验，检测波长选择 270nm。

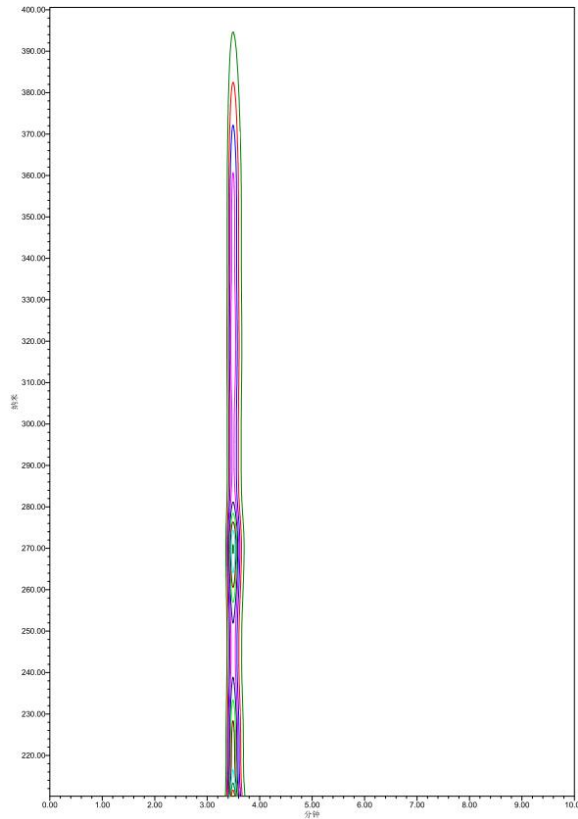


图 7(a) 淫羊藿苷光谱图

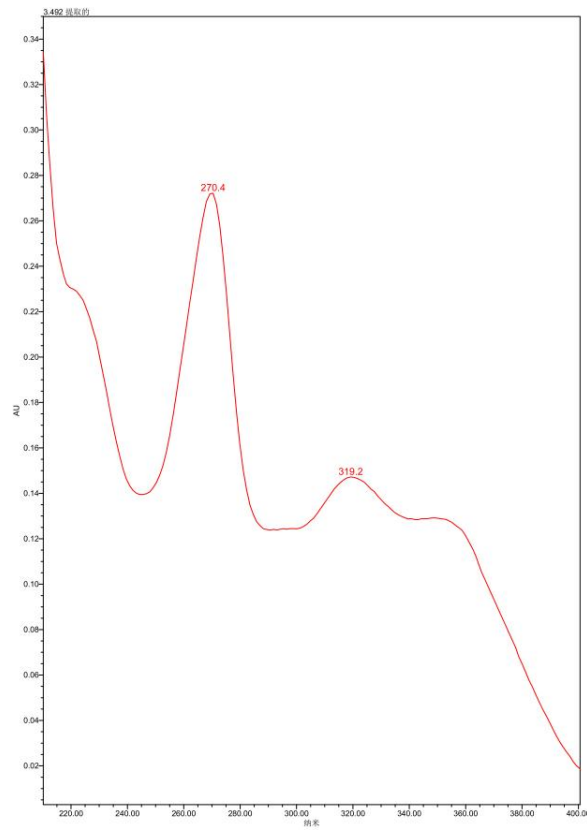


图 7 (b) 出峰时间提取光谱图

3.2 流动相的选择

为了将淫羊藿苷与淫羊藿提取物中其他功效成分朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C 完全分离，我们参照了《中国药典》（2020 版）淫羊藿苷的梯度洗脱条件，并进行了优化。同时，我们考察了乙腈-水体系和甲醇-水体系对淫羊藿苷及朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的分离效果，结果表明甲醇-水体系很难将朝藿定 C 与淫羊藿苷充分分离，最终选择乙腈-水体系，梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.00	76	24
25.0	74.3	25.7
25.1	30	70
34.0	30	70
34.1	76	24
46.0	76	24

3.3 色谱柱的选择

实验考察了在最佳的梯度洗脱条件下，柱温 35℃，流速为 1.0 mL/min 时淫羊藿苷与朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 在 Waters XBridge® C₁₈ 色谱柱（5μm 4.6*250mm）、Waters SunFire® C₁₈ 色谱柱（5μm 4.6*250mm）和 Waters XBridge® Shield PR 18 色谱柱（5μm 4.6*250mm）的分离效果，综合考虑出峰时间、仪器响应，后续实验选择 Waters XBridge® C₁₈ 色谱柱（5μm 4.6*250mm）。不同色谱柱出峰情况见图 8。

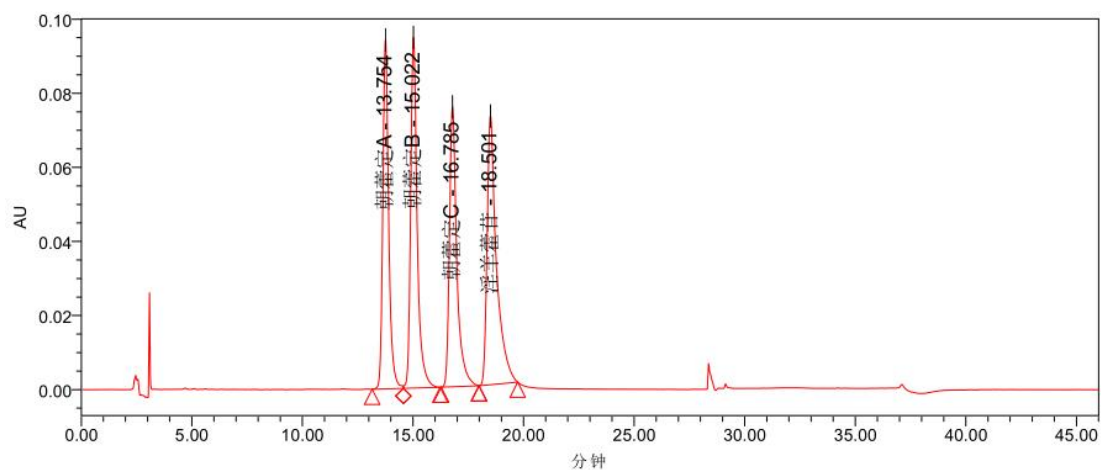


图 8 (a) Waters XBridge® C18 色谱柱 (5 μ m 4.6*250mm) 的分离效果

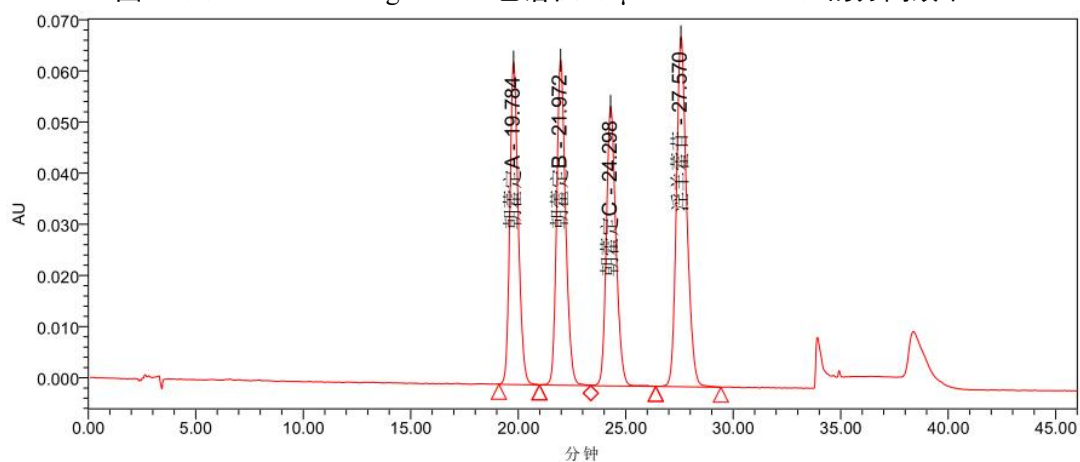


图 8 (b) Waters SunFire® C18 色谱柱 (5 μ m 4.6*250mm) 的分离效果

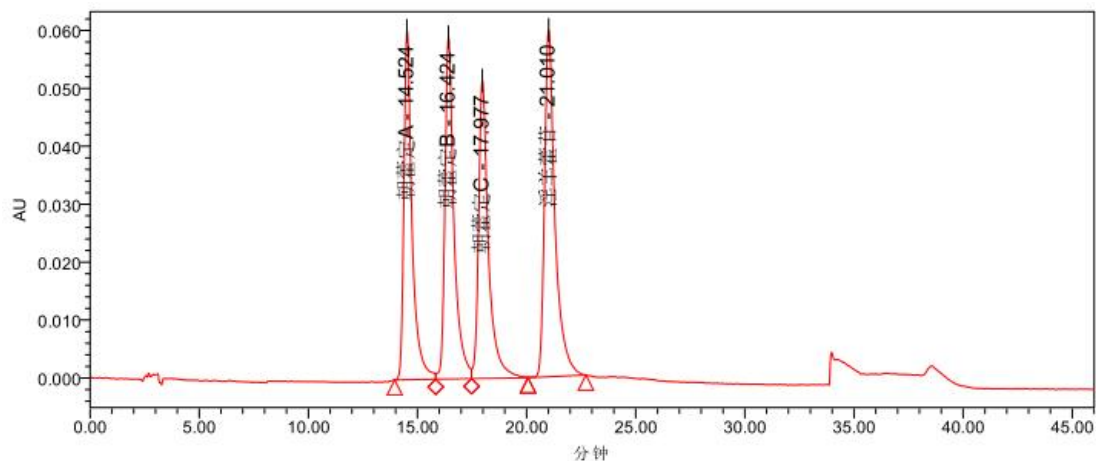


图 8 (c) Waters XBridge® Shield PR 18 色谱柱 (5 μ m 4.6*250mm) 的分离效果

4、检出限

检出限估值：采用信噪比法估计方法检出限：向空白样品基质添加目标分析物，信噪比为 3 时的添加浓度作为估算检出限。结果见表

2。

表 2 淫羊藿苷分析方法检出限验证估算结果

信噪比 (S: N=3: 1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低检出浓度
胶囊	1.0g	12.5 mg/kg
片剂	1.0g	12.5 mg/kg
酒剂	1.0 mL	5 mg/L
软胶囊	1.0g	5 mg/kg
口服液	1.0 mL	5 mg/L
保健茶	1.0g	12.5 mg/kg
颗粒剂	1.0g	12.5 mg/kg
粉剂	1.0g	12.5 mg/kg
丸剂	1.0g	12.5 mg/kg

测定：选取空白样品基质至少 20 个平行样，分别添加估算检出限浓度的目标分析物，如目标分析物的检出概率不低于 95%，则定为检出限。结果见表 3。

表 3 方法检出限验证结果

样品基质 (剂型)	目标分析物检出数量	目标分析物检出率
胶囊	20	100%
片剂	20	100%
酒剂	20	100%
软胶囊	20	100%
口服液	20	100%
保健茶	20	100%
颗粒剂	20	100%
粉剂	20	100%
丸剂	20	100%

5、定量限

估算：取对照品溶液，逐步稀释成一定的浓度，以信噪比 S:N=10:1

时的浓度作为定量限。

表 4 淫羊藿苷分析方法定量限验证估算结果

信噪比 (S: N=10: 1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低定量浓度
胶囊	1.0g	25 mg/kg
片剂	1.0g	25 mg/kg
酒剂	1.0 mL	10 mg/L
软胶囊	1.0g	10 mg/kg
口服液	1.0 mL	10 mg/L
保健茶	1.0g	25 mg/kg
颗粒剂	1.0g	25 mg/kg
粉剂	1.0g	25 mg/kg
丸剂	1.0g	25 mg/kg

测定：采用估算定量限浓度水平的有证标准物质/标准样品、质控样品或标准添加样品进行独立检测，至少检测 6 个平行样品。

表 5 淫羊藿苷分析方法定量限验证结果

样品名称	本底值	添加定量限浓度	实测值	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
胶囊	未检出	25 mg/kg	27.4 mg/kg	109.6	103.5	3.59
			25.1 mg/kg	100.5		
			26.3 mg/kg	105.0		
			25.6 mg/kg	102.4		
			24.8 mg/kg	99.2		
			26.1 mg/kg	104.4		
片剂	未检出	25 mg/kg	22.5 mg/kg	90.0	102.6	6.33
			26.4 mg/kg	105.4		
			25.6 mg/kg	102.3		
			26.7 mg/kg	106.9		
			26.9 mg/kg	107.6		
			25.8 mg/kg	103.3		
酒剂	未检出	10 mg/L	10.2 mg/L	102.1	100.4	8.57
			9.23 mg/L	92.3		
			8.74 mg/L	87.4		

			10.6 mg/L	105.8		
			10.9 mg/L	109.4		
			10.5 mg/L	105.1		
软胶囊	未检出	10 mg/kg	10.2 mg/kg	102.1	99.3	7.67
			8.5 mg/kg	84.6		
			9.9 mg/kg	99.4		
			10.2 mg/kg	101.9		
			10.7 mg/kg	106.8		
			10.1 mg/kg	101.2		
口服液	未检出	10 mg/L	10.5 mg/L	105.1	105.0	2.74
			10.9 mg/L	109.1		
			10.1 mg/L	101.3		
			10.8 mg/L	107.5		
			10.4 mg/L	104.2		
			10.3 mg/L	103.0		
保健茶	未检出	25 mg/kg	24.5 mg/kg	97.8	102.8	7.41
			22.4 mg/kg	89.7		
			26.2 mg/kg	104.6		
			27.3 mg/kg	109.0		
			26.9 mg/kg	107.6		
			27.1 mg/kg	108.2		
颗粒剂	未检出	25 mg/kg	26.4 mg/kg	105.7	106.9	1.80
			27.3 mg/kg	109.2		
			27.0 mg/kg	108.1		
			26.9 mg/kg	107.7		
			26.7 mg/kg	106.6		
			26.0 mg/kg	103.8		
粉剂	未检出	25 mg/kg	25.0 mg/kg	100.0	103.9	2.57
			25.5 mg/kg	102.0		
			26.2 mg/kg	104.7		
			26.7 mg/kg	106.6		
			25.8 mg/kg	103.3		
			26.7 mg/kg	106.8		
丸剂	未检出	25 mg/kg	24.7 mg/kg	98.7	101.6	2.48
			25.7 mg/kg	102.8		

			24.6 mg/kg	98.2		
			25.8 mg/kg	103.1		
			26.1 mg/kg	104.3		
			25.6 mg/kg	102.5		

6、测定范围

采用标准曲线法定量，定量方法标准曲线的线性相关系数应大于等于 0.99，并具有 6 个数据点（不包括 0 点）。

表 6 淫羊藿苷标准曲线（HPLC）

标准点	1	2	3	4	5	6
质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.00	2.00	5.00	25.00	50.00	100.00
峰面积	30020.95	48859.27	116963.2 9	548555.4 3	1037283. 82	2109440. 40
曲线方程	$Y=9.98614*10^3X+2.093555*10^4$					
相关系数 (R^2)	0.9998					

A 9.986140e+03
B 2.093555e+04
C 0.000000e+00
D 0.000000e+00
R^2 0.999801

校正曲线图

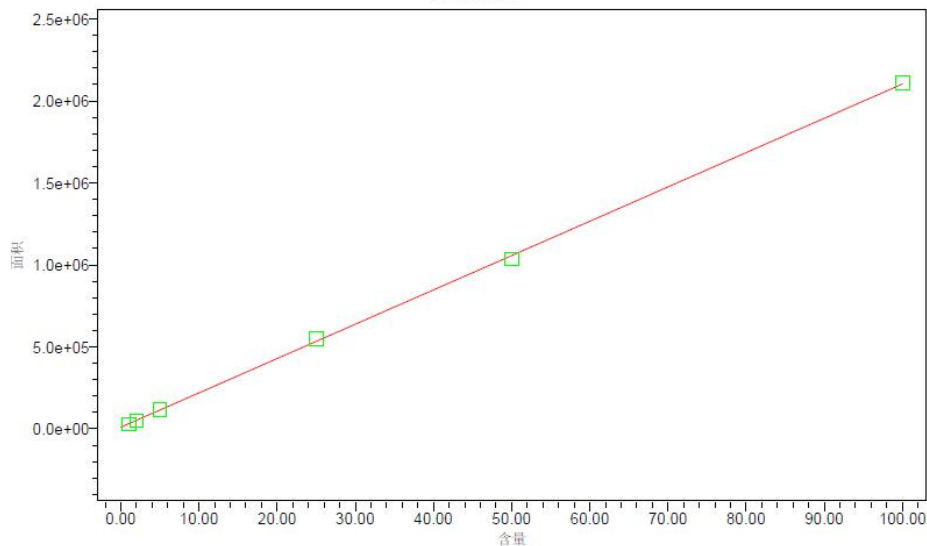


图 9 校准曲线

7、正确度

选择胶囊、片剂、保健茶、颗粒、丸剂、粉剂空白样品，分别加入 25 mg/kg (LOQ)、125 mg/kg (5LOQ)、250 mg/kg (10LOQ)

淫羊藿标准品,选择酒类、口服液空白样品,分别加入 5 mg/L(LOQ)、50 mg/L(5LOQ)、100 mg/L(10LOQ)淫羊藿标准品,选择软胶囊空白样品,分别加入 10 mg/kg(LOQ)、50 mg/kg(5LOQ)、100 mg/kg(10LOQ)淫羊藿标准品,每个添加六个平行。结果显示:实验室内样品的平均加标回收率在 92.1%~109.6%之间,相对偏差在 1.03%~8.57%之间。具体结果见表 7。

表 7-1 胶囊样品添加回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
25	27.4	109.6	103.5	3.59
	25.1	100.5		
	26.3	105.0		
	25.6	102.4		
	24.8	99.2		
	26.1	104.4		
125	120.3	96.2	96.2	1.03
	119.5	95.6		
	121.3	97.0		
	119.2	95.4		
	122.1	97.7		
	119.0	95.2		
250	230.2	92.1	93.9	1.52
	235.7	94.3		
	231.5	92.6		
	240.3	96.1		
	236.1	94.4		
	234.5	93.8		

表 7-2 片剂样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
25	22.5	90.0	102.6	6.33
	26.4	105.4		
	25.6	102.3		
	26.7	106.9		
	26.9	107.6		
	25.8	103.3		
125	127.4	101.9	101.1	1.95
	123.3	98.7		
	126.5	101.2		

	123.7	98.9		
	129.8	103.8		
	127.5	102.0		
250	265.7	106.3	100.7	5.97
	234.5	93.8		
	234.2	93.7		
	267.6	107.0		
	259.9	104.0		
	248.4	99.3		

表 7-3 酒类样品加标回收率

添加水平 (mg/L)	测定值 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
10	10.2	102.1	100.4	8.57
	9.23	92.3		
	8.74	87.4		
	10.6	105.8		
	10.9	109.4		
	10.5	105.1		
50	49.6	99.2	96.4	5.42
	45.8	91.5		
	47.4	94.7		
	51.4	102.8		
	44.8	89.6		
	50.2	100.3		
100	105.6	105.6	106.6	2.96
	101.1	101.1		
	107.5	107.5		
	109.5	109.5		
	106.1	106.1		
	109.5	109.5		

表 7-4 软胶囊样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
10	10.2	102.1	99.3	7.67
	8.5	84.6		
	9.9	99.4		
	10.2	101.9		
	10.7	106.8		
	10.1	101.2		
50	47.9	95.8	101.9	3.61
	51.5	103.0		
	50.7	101.3		
	50.3	100.5		
	53.2	106.3		
	52.3	104.5		
100	106.2	106.2	104.6	1.10
	105.7	105.7		
	103.7	103.7		
	104.1	104.1		

	103.3	103.3		
	104.6	104.6		

表 7-5 口服液样品加标回收率

添加水平 (mg/L)	测定值 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
10	10.5	105.1	105.0	2.74
	10.9	109.1		
	10.1	101.3		
	10.8	107.5		
	10.4	104.2		
	10.3	103.0		
50	43.8	87.6	95.4	5.99
	45.4	90.9		
	46.4	92.8		
	50.4	100.9		
	50.2	100.4		
	49.9	99.8		
100	96.7	96.7	99.8	4.63
	93.7	93.7		
	98.5	98.5		
	100.0	100.0		
	104.3	104.3		
	106.0	106.0		

表 7-6 保健茶样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
25	24.5	97.8	102.8	7.41
	22.4	89.7		
	26.2	104.6		
	27.3	109.0		
	26.9	107.6		
	27.1	108.2		
125	123.1	98.5	98.9	1.84
	126.6	101.3		
	122.4	97.9		
	124.8	99.8		
	120.2	96.1		
	125.0	100.0		
250	226.8	90.7	94.4	6.37
	253.9	101.5		
	241.3	96.5		
	211.1	84.5		
	244.7	97.9		
	238.3	95.3		

表 7-7 颗粒样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
25	26.4	105.7	106.9	1.80
	27.3	109.2		
	27.0	108.1		
	26.9	107.7		
	26.7	106.6		
	26.0	103.8		
125	122.5	98.0	100.6	2.13
	122.5	98.0		
	126.7	101.4		
	128.7	102.9		
	127.8	102.2		
	126.5	101.2		
250	269.6	107.8	105.1	3.18
	259.2	103.7		
	270.9	108.3		
	249.6	99.8		
	268.4	107.4		
	258.4	103.4		

表 7-8 粉剂样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
25	25.0	100.0	103.9	2.57
	25.5	102.0		
	26.2	104.7		
	26.7	106.6		
	25.8	103.3		
	26.7	106.8		
125	117.5	94.0	99.6	2.93
	125.4	100.3		
	125.5	100.4		
	127.2	101.7		
	127.4	101.9		
	123.9	99.1		
250	254.2	101.7	102.1	4.12
	245.5	98.2		
	272.5	109.0		
	255.2	102.1		
	260.5	104.2		
	243.8	97.5		

表 7-9 丸剂样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
25	24.7	98.7	101.6	2.48
	25.7	102.8		
	24.6	98.2		

	25.8	103.1		
	26.1	104.3		
	25.6	102.5		
125	124.1	99.3	101.2	3.04
	128.3	102.7		
	120.5	96.4		
	131.8	105.4		
	126.9	101.5		
	127.4	101.9		
250	259.7	103.9	104.0	3.04
	261.4	104.6		
	266.9	106.8		
	246.2	98.5		
	268.0	107.2		
	257.1	102.8		

8、稳定性

淫羊藿苷标准储备液（2.0 mg/ mL）、标准中间溶液（200 μ g/ mL）放置4℃冰箱中贮存1个月后,与新配制同浓度淫羊藿苷标准储备液、标准中间溶液峰面积无差异。

将前处理好后的待测试样溶液分别放置0、2、4、6、8小时后进行测定,含淫羊藿的片剂、口服液和酒类的峰面积相对标准偏差低于2%,含量相对偏差低于4%,表明试样溶液的稳定性良好。

表8 样品稳定性测试

样品类别	时间 (h)	0	2	4	6	8	平均值	RSD (%)
含淫羊藿的片剂	峰面积	240592	243213	238333	238680	236897	239543	1.02
	含量 (mg/kg)	345.3	349.4	341.7	342.3	339.4	343.6	1.12
含淫羊藿的口服液	峰面积	215534	216536	217455	214632	216897	216211	0.521
	含量 (mg/L)	61.1	61.5	61.7	60.8	61.6	61.4	0.592
含淫	峰面积	35105	34339	35313	34677	35181	34923	1.16

羊藿 的酒 类	含量 (mg/L)	4.07	3.83	4.13	3.93	4.09	4.01	3.13
---------------	--------------	------	------	------	------	------	------	------

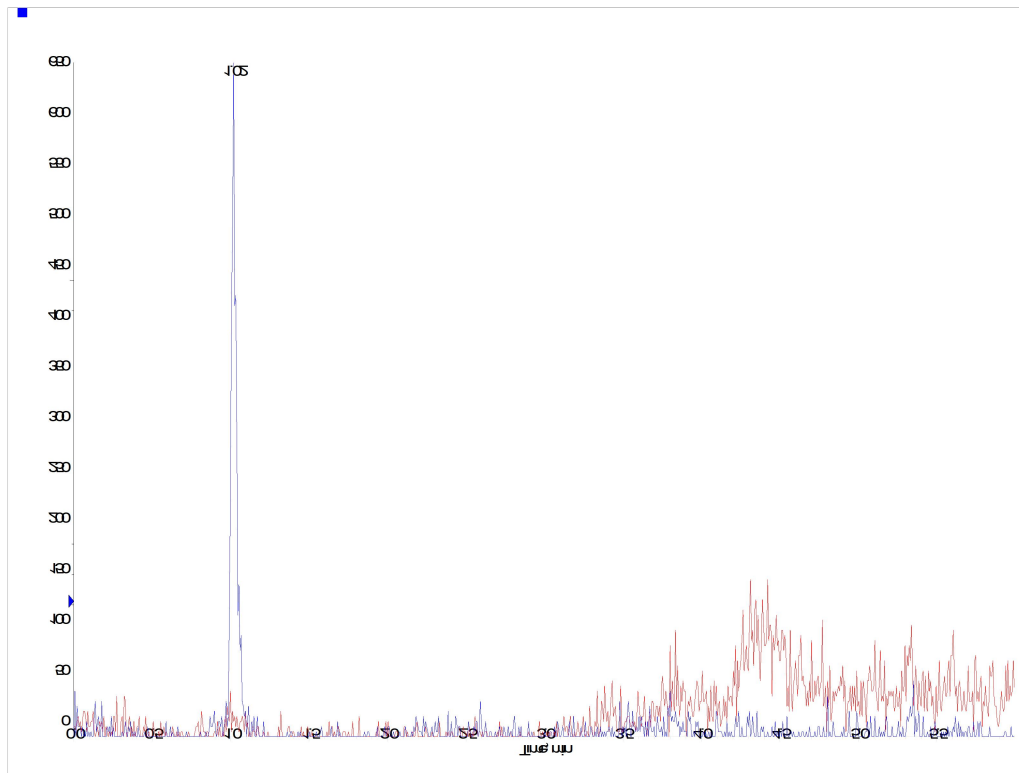
第二法 液相色谱-串联质谱法

一、方法验证

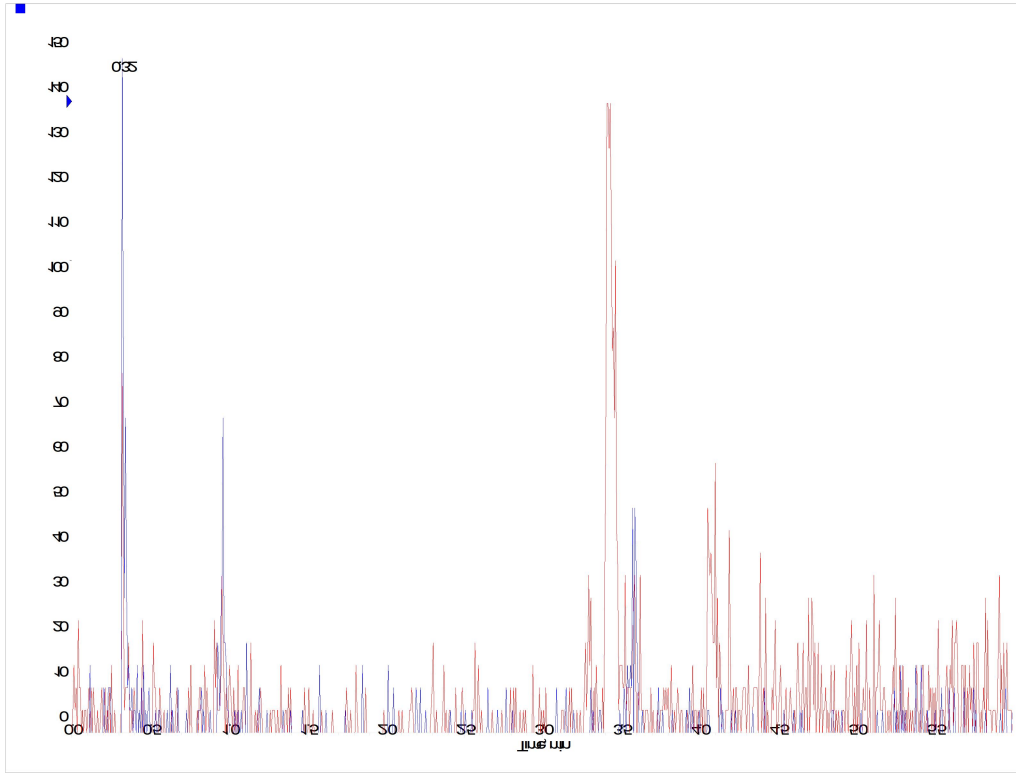
1、特异性

选择胶囊、片剂、酒类、软胶囊、口服液、保健茶、颗粒、丸剂、粉剂等空白样品与淫羊藿苷标准进行比对,结果显示淫羊藿苷保留时间为 3.6min, 空白辅料中无色谱峰对淫羊藿苷检测造成干扰, 具体见图 10。

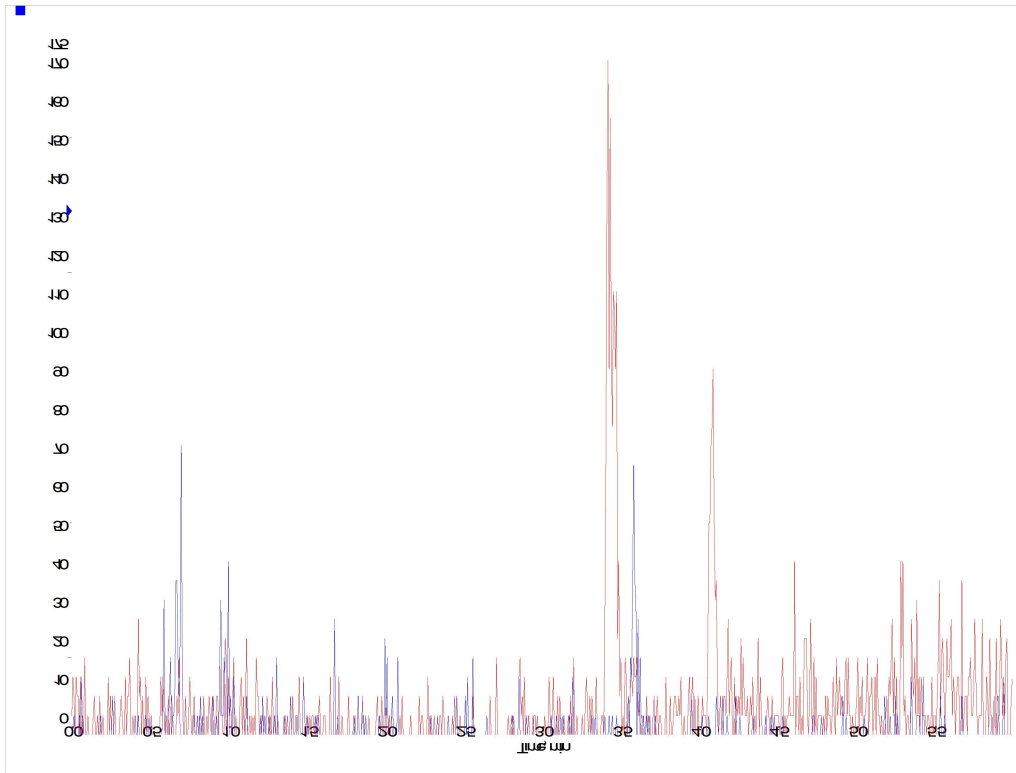
图 10。



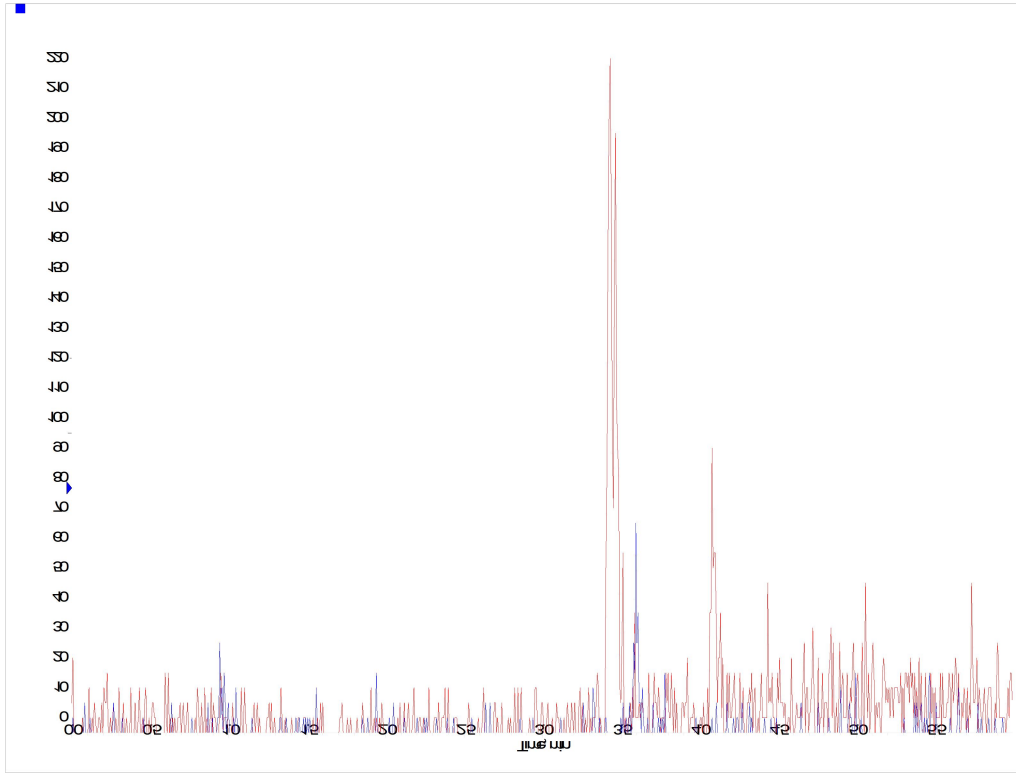
(a) 胶囊空白样品色谱质谱图



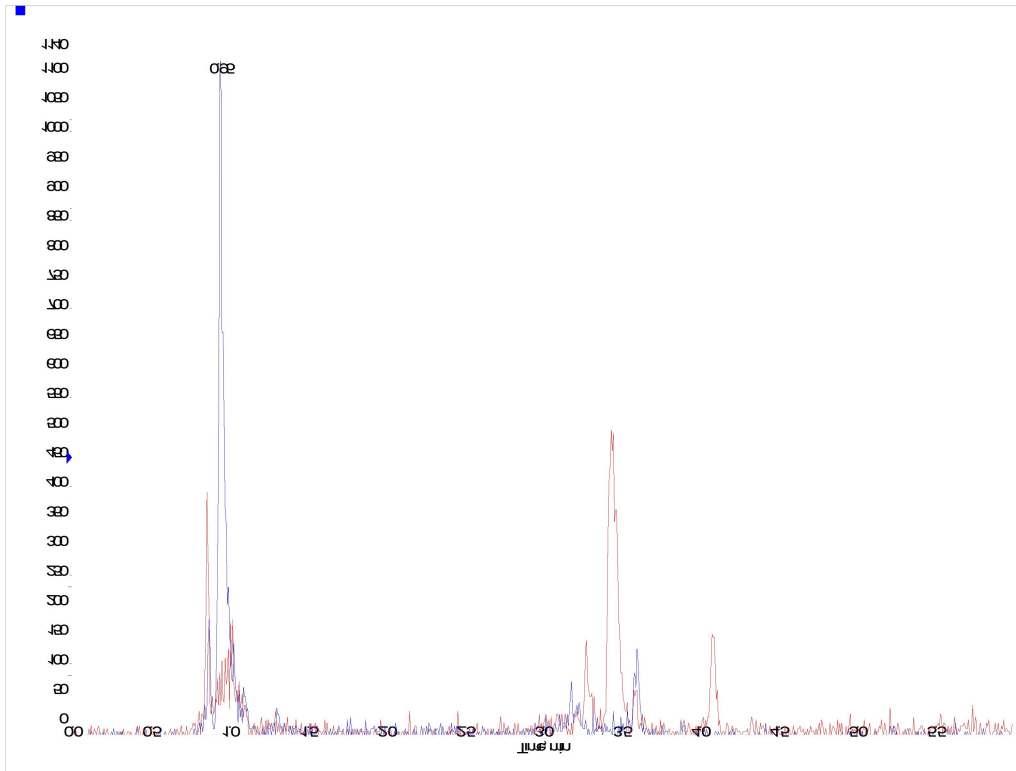
(b) 片剂空白样品色谱质谱图



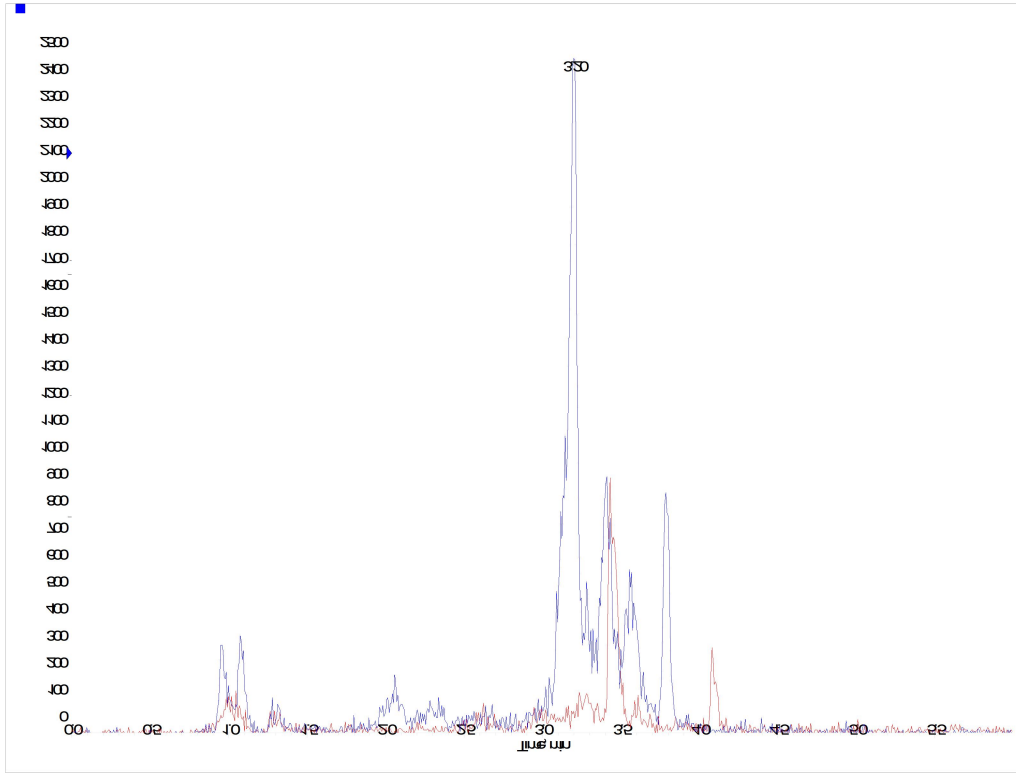
(c) 酒类空白样品色谱质谱图



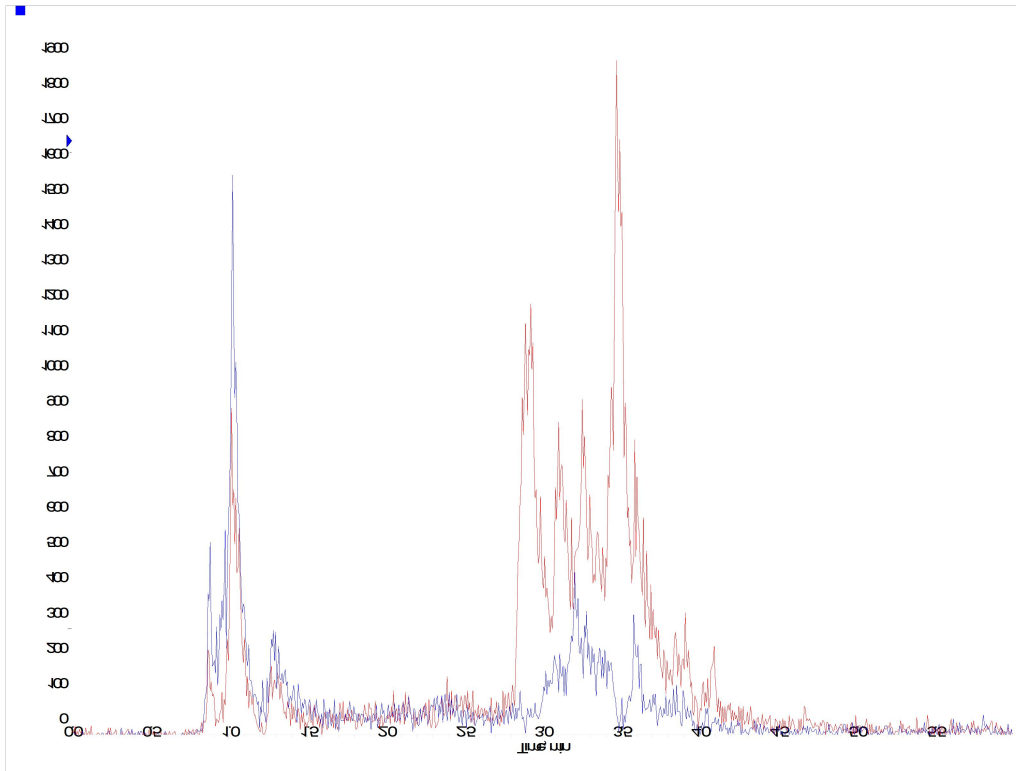
(d) 软胶囊空白样品色谱质谱图



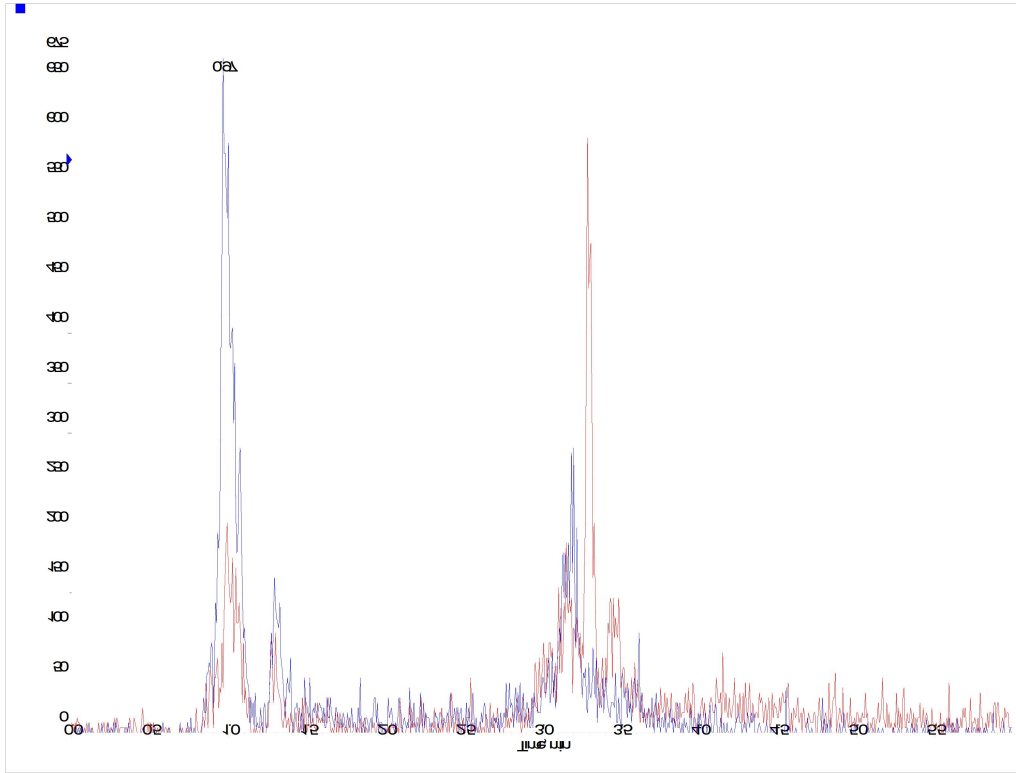
(e) 口服液空白样品色谱质谱图



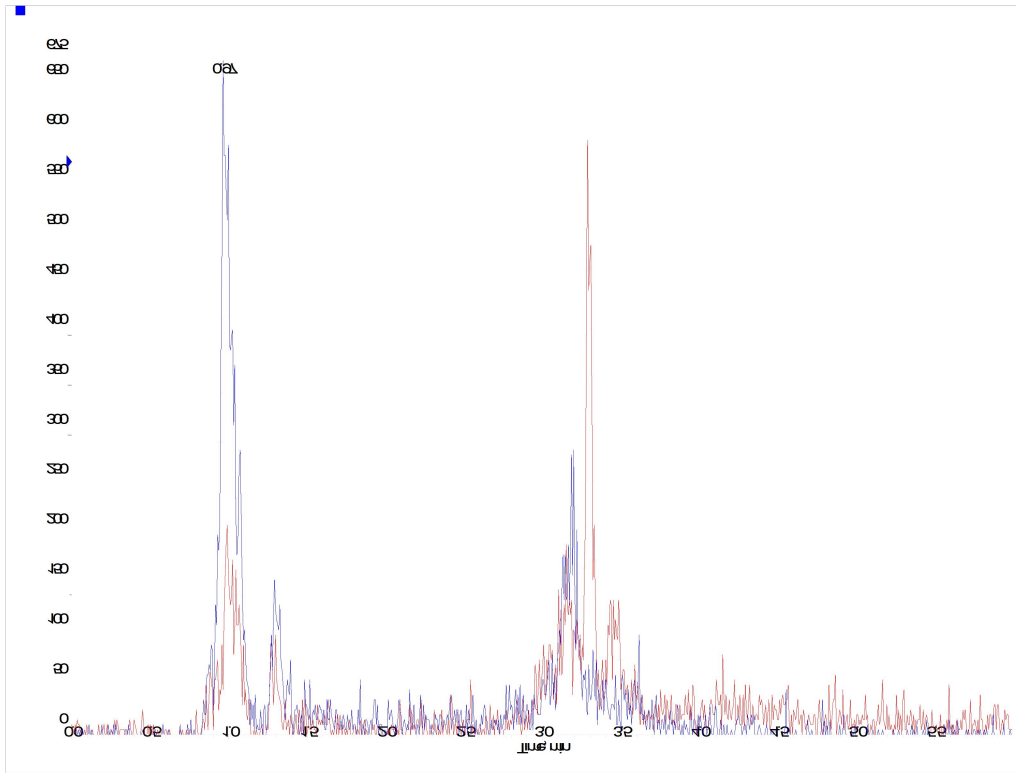
(f) 保健茶空白样品色谱质谱图



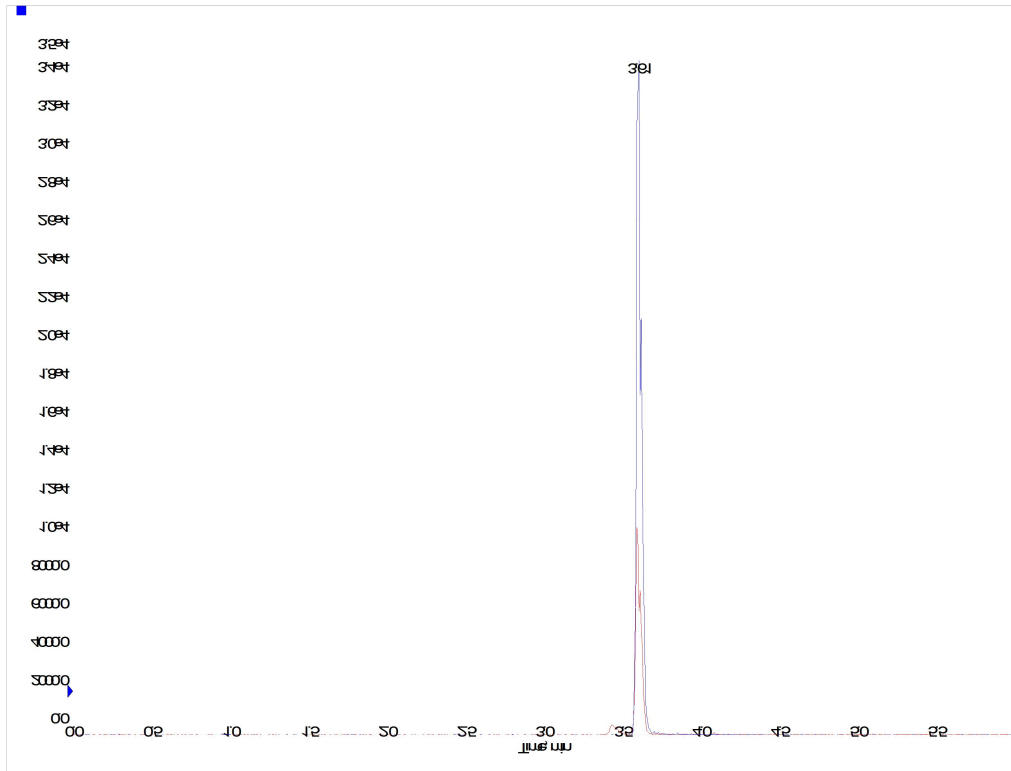
(g) 颗粒空白样品色谱质谱图



(h) 丸剂空白样品色谱质谱图



(i) 粉剂空白样品色谱质谱图



(j) 淫羊藿苷标准溶液色谱质谱图

图 10 不同剂型空白样品色谱质谱图

2、仪器条件的选择和优化

2.1 流动相的选择

本实验用液相色谱仪型号为岛津 Nexera UHPLC LC-30A。

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，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。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。

2.2 色谱柱的选择

本实验考察了目标物在Waters Acquity UPLC HSS T3色谱柱（2.1 mm*100 mm，粒径1.8 μm ）、Waters ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm*2.1 mm，2.5 μm ）、Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18色谱柱（100 mm*2.1 mm，1.7 μm ）和Phenomenex Kinetex F5柱（2.1 mm*100 mm，2.6 μm ）上的分离效果。结果显示，与其他色谱柱相比，Waters ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm*2.1 mm，2.5 μm ）色谱柱在减少分析时间和提高分离度方面是最好的，得到的待测物峰型最佳，尖锐对称，故选择Waters ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm*2.1 mm，2.5 μm ）柱作为本方法的色谱柱。图11为目标化合物的提取离子色谱图。

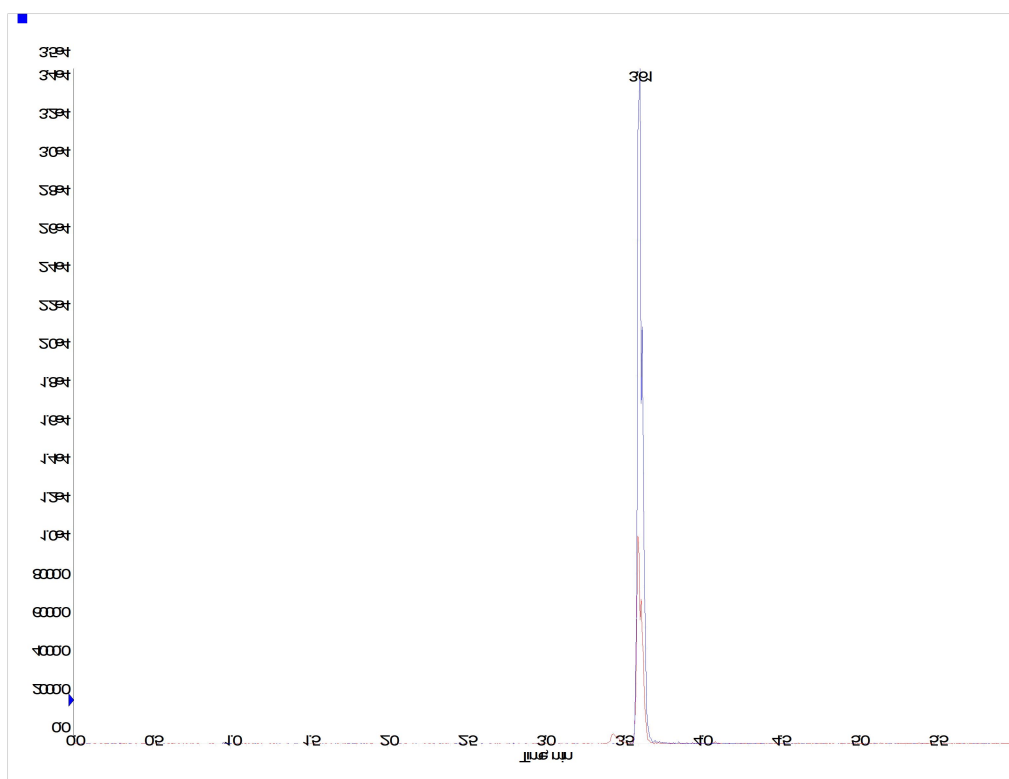


图 11 淫羊藿苷特征离子色谱图

2.3 质谱条件的优化

本实验用质谱仪型号为 SCIEX Triple Quad™ 6500。

2.3.1 电离方式的选择

电喷雾ESI离子源适应极性范围广，离子化效率高，重现性好，而且方法中淫羊藿苷在负离子模式（ESI⁻）下有良好的响应信号和强势的子离子。通过调研和标准品试验的结果，本方法淫羊藿苷选择负离子电离方式（ESI⁻）、多反应监测（MRM）模式进行检验。

2.3.2 质谱参数的优化

淫羊藿苷在负离子电离方式的准分子离子峰为 m/z 675.1。根据欧盟2002/657/EC指令规定对于质谱确证方法必须达到4个确证点的要求，低分辨液相色谱-质谱联用仪检测应在确定母离子的基础上选择两个以上的子离子。

以目标化合物的准分子离子峰为母离子，进行二级质谱扫描，最后采集全扫描的二级质谱图，得到碎片离子信息，淫羊藿苷二级质谱图见图12，淫羊藿苷的 m/z 513和 m/z 367碎片离子的强度最大，因此选择上述子离子作为定量和定性检测子离子。在负离子模式下，淫羊藿苷的准分子离子峰为 m/z 675 [M-H]⁻，其产生的特征二级离子碎片有 m/z 513、 m/z 367，其中 m/z 513 为[M-H-C₆H₁₂O₅]⁻， m/z 367 为[M-H-C₆H₁₂O₅-C₆H₁₂O₄]⁻，淫羊藿苷裂解途径见图13。

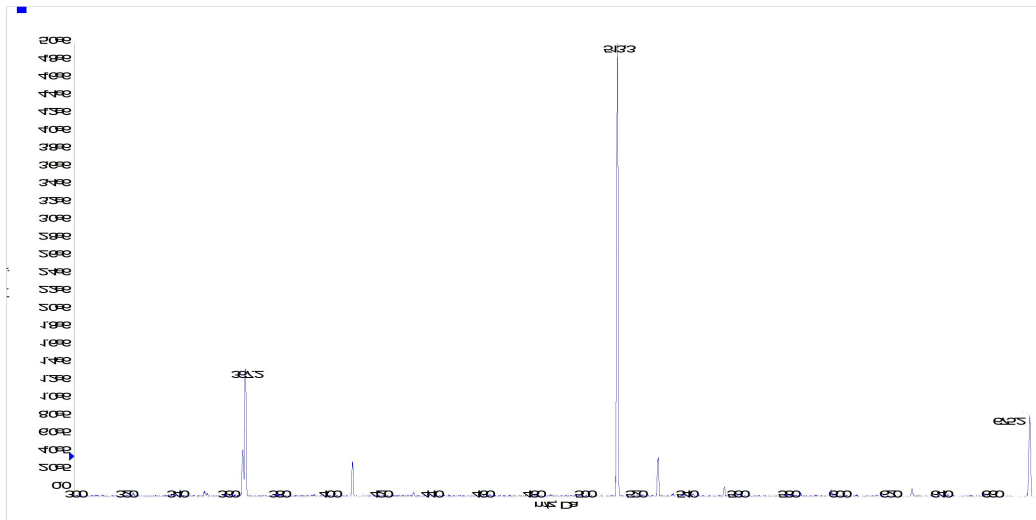


图 12 淫羊藿苷的二级质谱图

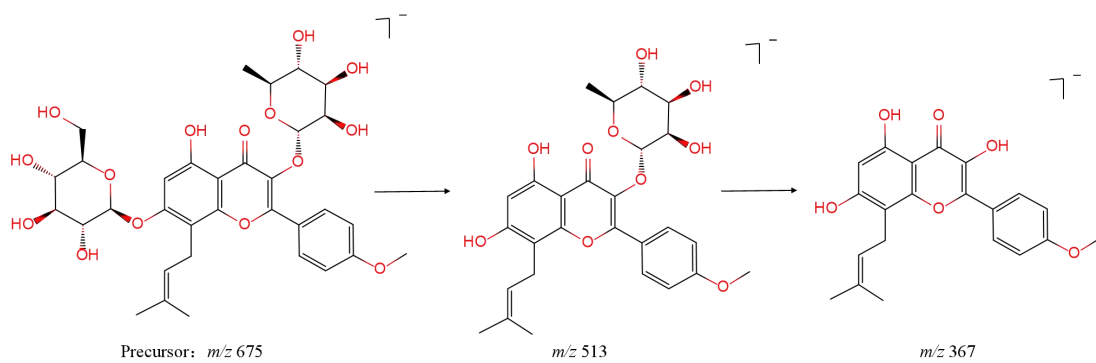


图 13 淫羊藿苷的裂解途径

然后再对得到的二级质谱参数如破碎电压、碰撞电压等进行优化，使定性离子与定量离子产生的离子对强度达到最大时为最佳，得到淫羊藿苷的最佳质谱参数。淫羊藿苷在碰撞电压分别为-17 V和-47V时， m/z 513.2和 m/z 367.3碎片离子的强度最大，因此将上述碰撞电压作为质谱检测时的碰撞电压。

3、检出限

检出限估值：采用信噪比法估计方法检出限：向空白样品基质添加目标分析物，信噪比为 3 时的添加浓度作为估算检出限。结果见表 9。

表 9 淫羊藿苷分析方法检出限验证估算结果 (LC-MS)

信噪比 (S: N=3: 1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低检出浓度
胶囊	1.0g	12 μ g/kg
片剂	1.0g	12 μ g/kg
酒剂	1.0 mL	12 μ g/L
软胶囊	1.0g	12 μ g/kg
口服液	1.0 mL	12 μ g/L
保健茶	1.0g	12 μ g/kg
颗粒剂	1.0g	12 μ g/kg
粉剂	1.0g	12 μ g/kg
丸剂	1.0g	12 μ g/kg

测定：选取空白样品基质至少 20 个平行样，分别添加估算检出限浓度的目标分析物，如目标分析物的检出概率不低于 95%，则定为检出限。结果见表 10。

表 10 方法检出限验证结果 (LC-MS)

样品基质 (剂型)	目标分析物检出数量	目标分析物检出率
胶囊	20	100%
片剂	20	100%
酒剂	20	100%
软胶囊	20	100%
口服液	20	100%
保健茶	20	100%
颗粒剂	20	100%
粉剂	20	100%
丸剂	20	100%

4、定量限

估算：取对照品溶液，逐步稀释成一定的浓度，以信噪比 S:N=10:1 时的浓度作为定量限。

表 11 淫羊藿苷分析方法定量限验证估算结果 (LC-MS)

信噪比 (S: N=10: 1)

样品基质（剂型）	取样量	最低检出浓度
胶囊	1.0g	25 μ g/kg
片剂	1.0g	25 μ g/kg
酒剂	1.0 mL	25 μ g/L
软胶囊	1.0g	25 μ g/kg
口服液	1.0 mL	25 μ g/L
保健茶	1.0g	25 μ g/kg
颗粒剂	1.0g	25 μ g/kg
粉剂	1.0g	25 mg/kg
丸剂	1.0g	25 μ g/kg

测定：采用估算定量限浓度水平的有证标准物质/标准样品、质控样品或标准添加样品进行独立检测，至少检测 6 个平行样品。

表 12 淫羊藿苷分析方法定量限验证结果

样品名称	本底值	添加定量限浓度	实测值	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
胶囊	未检出	25 μ g/kg	26.3 μ g/kg	105.2	97.7	5.23
			24.2 μ g/kg	96.8		
			23.8 μ g/kg	95.2		
			22.5 μ g/kg	90.0		
			24.6 μ g/kg	98.4		
			25.1 μ g/kg	100.4		
片剂	未检出	25 μ g/kg	21.6 μ g/kg	86.4	96.9	6.31
			24.2 μ g/kg	96.8		
			25.1 μ g/kg	100.4		
			23.7 μ g/kg	94.8		
			26.1 μ g/kg	104.4		
			24.7 μ g/kg	98.8		
酒剂	未检出	25 μ g/L	23.5 μ g/L	94.0	95.7	3.36
			24.1 μ g/L	96.4		
			23.9 μ g/L	95.6		
			24.3 μ g/L	97.2		
			22.7 μ g/L	90.8		
			25.1 μ g/L	100.4		
软胶囊	未检出	25 μ g/kg	22.6 μ g/kg	90.4	90.6	4.24

			21.8µg/kg	87.2		
			23.1µg/kg	92.4		
			22.4µg/kg	89.6		
			24.3µg/kg	97.2		
			21.7µg/kg	86.8		
口服液	未检出	25µg/L	23.4µg/L	93.6	92.4	3.53
			22.6µg/L	90.4		
			23.0µg/L	92.0		
			24.3µg/L	97.2		
			23.4µg/L	93.6		
			21.9µg/L	87.6		
保健茶	未检出	25µg/kg	23.6 µg/kg	94.4	95.7	3.76
			22.5µg/kg	90.0		
			25.1µg/kg	100.4		
			24.6 µg/kg	98.4		
			23.7 µg/kg	94.8		
			24.1 µg/kg	96.4		
颗粒剂	未检出	25µg/kg	23.2 µg/kg	92.8	91.5	3.47
			24.0 µg/kg	96.0		
			22.6µg/kg	90.4		
			23.3 µg/kg	93.2		
			21.7µg/kg	86.8		
			22.5µg/kg	90.0		
粉剂	未检出	25µg/kg	21.2 µg/kg	84.8	88.5	3.35
			22.3 µg/kg	89.2		
			22.8 µg/kg	91.2		
			21.6 µg/kg	86.4		
			23.1 µg/kg	92.4		
			21.7 µg/kg	86.8		
丸剂	未检出	25µg/kg	20.8 µg/kg	83.2	85.3	2.46
			21.3µg/kg	85.2		
			21.6 µg/kg	86.4		
			20.7µg/kg	82.8		
			21.5µg/kg	86.0		
			22.1 µg/kg	88.4		

5、测定范围

采用标准曲线法定量，定量方法标准曲线的线性相关系数应大于等于 0.99，并具有 7 个数据点（不包括 0 点）。

表 13 淫羊藿苷标准曲线（LC-MS）

标准点	1	2	3	4	5	6	7
质量浓度 (ng/mL)	1.00	2.00	4.00	10.00	20.00	40.00	100.00
峰面积	899.95	1430.90	4034.40	9024.10	16719.81	36217.83	88063.99
曲线方程	$Y=882.25151X+33.20832$						
相关系数 (R^2)	0.99964						

6、正确度

选择胶囊、软胶囊、片剂、保健茶、颗粒、丸剂、粉剂空白样品，分别加入 1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 淫羊藿标准品，选择酒类、口服液空白样品，分别加入 1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L 淫羊藿标准品，每个添加六个平行。结果显示平均加标回收率在 80.3 %~109.0 %之间，相对偏差在 1.26%~5.97%之间，具体结果见表 14。

表 14-1 胶囊样品添加回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	0.995	99.5	97.4	2.35
	1.00	100.3		
	0.944	94.4		
	0.968	96.8		
	0.980	98.0		
	0.956	95.6		
5	4.91	98.1	95.4	2.32
	4.59	91.8		
	4.69	93.8		
	4.81	96.2		
	4.86	97.2		
	4.75	95.0		
10	9.20	92.0	91.5	1.35
	9.32	93.2		
	90.4	90.4		

	9.02	90.2		
	9.07	90.7		
	9.25	92.5		

表 14-2 片剂样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	0.888	88.8	85.1	4.32
	0.814	81.4		
	0.816	81.6		
	0.856	85.6		
	0.832	83.2		
	0.90	90.0		
5	4.40	88.0	85.0	3.21
	4.20	83.9		
	4.01	80.2		
	4.25	85.0		
	4.29	85.8		
	4.34	86.8		
10	8.80	88.0	89.8	3.14
	8.54	85.4		
	9.09	90.9		
	9.26	92.6		
	8.94	89.4		
	9.26	92.6		

表 14-3 酒类样品加标回收率

添加水平 (mg/L)	测定值 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	0.820	82.0	88.4	5.21
	0.838	83.8		
	0.937	93.7		
	0.915	91.5		
	0.887	88.7		
	0.908	90.8		
5	4.74	94.8	91.0	5.39
	4.44	88.8		
	4.10	82.0		
	4.62	92.4		
	4.71	94.2		
	4.69	93.8		
10	9.14	91.4	93.8	4.25
	8.82	88.2		
	10.0	100.2		
	9.35	93.5		
	9.41	94.1		
	9.52	95.2		

表 14-4 软胶囊样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	0.951	95.1	95.2	1.26
	0.939	93.9		
	0.971	97.1		
	0.948	94.8		
	0.943	94.3		
	0.961	96.1		
5	4.67	93.4	93.9	1.86
	4.82	96.4		
	4.56	91.2		
	4.67	93.4		
	4.71	94.2		
	4.75	95.0		
10	8.69	86.9	90.0	3.10
	8.76	87.6		
	9.20	92.0		
	8.91	89.1		
	9.04	90.4		
	9.43	94.3		

表 14-5 口服液样品加标回收率

添加水平 (mg/L)	测定值 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	0.868	86.8	89.2	1.89
	0.906	90.6		
	0.879	87.9		
	0.901	90.1		
	0.888	88.8		
	0.912	91.2		
5	4.25	85.0	88.7	4.68
	4.80	96.0		
	4.28	85.6		
	4.31	86.2		
	4.52	90.4		
	4.46	89.2		
10	8.41	84.1	86.8	3.22
	8.65	86.5		
	8.92	89.2		
	8.53	85.3		
	8.47	84.7		
	9.12	91.2		

表 14-6 保健茶样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	0.937	93.7	89.1	4.29
	0.882	88.2		
	0.840	84.0		
	0.856	85.6		
	0.904	90.4		
	0.924	92.4		
5	4.53	90.4	95.0	3.68
	4.75	95.0		
	5.03	100.6		
	4.81	96.2		
	4.78	95.6		
	4.62	92.4		
10	8.50	85.0	89.8	4.76
	8.44	84.4		
	9.15	91.5		
	9.25	92.5		
	9.03	90.3		
	9.52	95.2		

表 14-7 颗粒样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	0.907	90.7	90.6	3.78
	0.905	90.5		
	0.846	84.6		
	0.928	92.8		
	0.900	90.0		
	0.948	94.8		
5	4.84	96.8	100.5	4.03
	5.40	108.0		
	4.97	99.4		
	4.95	99.0		
	4.90	98.0		
	5.10	102.0		
10	9.49	94.9	99.1	6.10
	10.4	104.0		
	10.9	109.0		
	9.70	97.0		
	9.43	94.3		
	9.52	95.2		

表 14-8 粉剂样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	0.806	80.6	82.3	2.01
	0.803	80.3		
	0.824	82.4		
	0.848	84.8		
	0.832	83.2		
	0.824	82.4		
5	4.57	91.4	94.0	3.80
	4.57	91.4		
	5.04	100.8		
	4.65	93.0		
	4.63	92.6		
	4.75	95.0		
10	9.34	93.4	97.1	5.05
	9.27	92.7		
	10.6	106.0		
	9.74	97.4		
	9.82	98.2		
	9.47	94.7		

表 14-9 丸剂样品加标回收率

添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对偏差 (%)
1	1.01	101.0	99.1	5.09
	1.06	106.0		
	0.917	91.7		
	0.984	98.4		
	0.956	95.6		
	1.02	102.0		
5	4.42	88.4	90.1	2.44
	4.59	91.8		
	4.36	87.2		
	4.46	89.2		
	4.65	93.0		
	4.55	91.0		
10	10.7	107.0	99.8	5.95
	8.95	89.5		
	10.3	103.0		
	9.82	98.2		
	10.2	102.0		
	9.90	99.0		

7、稳定性

淫羊藿苷标准储备液(1.0 mg/mL)、标准中间溶液(20.0 μ g/mL)

放置4℃冰箱中贮存1个月后,与新配制同浓度淫羊藿苷标准储备液、标准中间溶液峰面积无差异。

将前处理好后的待测试样溶液分别放置0、2、4、6、8小时后进行测定,含淫羊藿的片剂、口服液和酒类的峰面积相对标准偏差低于2%,含量相对偏差低于4%,表明试样溶液的稳定性良好。

表 15 样品稳定性测试 (LC-MS)

样品类别	时间 (h)	0	2	4	6	8	平均值	RSD (%)
含淫羊藿的片剂	峰面积	13454.73	13328.96	13296.21	13297.00	13386.43	13352.67	0.51
	含量 (ng/mL)	14.585	14.444	14.407	14.408	14.08	14.38	1.29
含淫羊藿的口服液	峰面积	17231.11	17232.34	17292.57	17322.40	17202.81	17256.25	0.29
	含量 (ng/mL)	18.823	18.825	18.892	18.926	18.791	18.85	0.29
含淫羊藿的酒类	峰面积	21919.82	22071.77	21983.04	22119.08	22054.22	22029.59	0.36
	含量 (ng/mL)	24.086	24.256	24.157	24.309	24.237	24.21	0.36

8、方法等效性验证

选择了淫羊藿饮片、含淫羊藿的软胶囊、含淫羊藿的酒类和含淫羊藿的口服液,开展高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法的等效性测试。淫羊藿饮片、含淫羊藿的软胶囊、含淫羊藿的酒类和含淫羊藿的口服液高效液相色谱法测定结果分别为 233.0 mg/kg、260.9

mg/kg、14.1 mg/L、102.7 mg/L，液相色谱-串联质谱法测定结果分别为 228.2 mg/kg、257.0 mg/kg、14.4 mg/L、100.7 mg/L。经 F 检验，4 个样品经高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法测定结果均无显著差异，表明两种方法具有很好的等效性。

表 16 方法等效性测试

样品	平行样	高效液相色谱法			液相色谱-串联质谱法		
		1-1	1-2	1-3	1-1	1-2	1-3
淫羊藿 饮片	含量 (mg/kg)	233.1	235.8	230.2	230.7	228.7	225.3
	平均值 (mg/kg)	233.0			228.2		
含淫羊藿 的软胶囊	含量 (mg/kg)	262.7	254.1	265.8	260.4	248.3	262.4
	平均值 (mg/kg)	260.9			257.0		
含淫羊藿 的酒类	含量 (mg/L)	13.4	14.6	14.2	13.9	14.5	14.8
	平均值 (mg/L)	14.1			14.4		
含淫羊藿 的口服液	含量 (mg/L)	102.6	102.1	103.5	98.1	102.6	101.5
	平均值 (mg/L)	102.7			100.7		

二、实验室间方法验证

本方法经过河北省食品检验研究院、南京食品药品监督检验院、华测检测认证集团股份有限公司、广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、无锡市食品安全检验检测中心、河南大学等单位，根据修订方法进行实验室间验证（包括检出限、定量限、测定范围、正确度和再现性），测定结果符合要求，具体比对实验结果见表 17 和表 18。

表 17 实际样品结果比对

样品信息	淫羊藿苷含量（液体：mg/100mL，其他：g/100g）						平均值	RSD
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6		
样品 1 YYH-01S （软胶囊）	0.0404	0.0404	0.0397	0.0421	0.0447	0.0411	0.0414	4.37
样品 2 YYH-02S （片剂）	0.653	0.619	0.659	0.537（格 拉布斯剔 除）	0.701	0.63	0.652	4.86
样品 3 YYH-12S （液体）	0.90	0.989	0.544（格 拉布斯剔 除）	0.963	0.83	0.923	0.921	6.67

选择 3 家实验室，分别通过液相和液相色谱-质谱联用方法进行样品测定，两种方法结果对比见表 18。

表 18 液相、液质方法等效性验证

样品信息	Lab1			Lab2			Lab5		
	液相	液质	二者比值	液相	液质	二者比值	液相	Lab5液质	二者比值
样品 1 YYH-01S （软胶囊）	0.0404	0.0459	0.88	0.0404	0.0378	1.07	0.0447	0.0399	1.12
样品 2 YYH-02S （片剂）	0.653	0.67	0.98	0.619	0.6216	0.10	0.701	0.701	1.00
样品 3 YYH-12S （液体）	0.90	0.809	1.11	0.989	1.038	0.95	0.83	0.753	1.10

说明：计量单位同表 17。