

实验技术与方法

层析 - 高效液相色谱法测定保健食品中葛根素的含量

鲁杰 杨大进 宋书锋 侯维

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 建立测定保健食品中葛根素含量的层析反相高效液相色谱法。方法 D101 大孔树脂层析柱(10 cm ×15 cm ×1.0 cm)层析,采用 ODS C₁₈ (250 mm ×4.6 mm,5 μm) 色谱柱,甲醇+36 %乙酸+水=25+3+72 作为流动相,检测波长 247 nm。结果 葛根素在 5.0 ~ 50.0 μg/ml 内呈线性关系, $r = 0.9998$,方法的回收率为 81.6 % ~ 100.2 %,试样测定 RSD 为 0.84 % ~ 1.08 %。结论 该方法简便、准确、灵敏,回收率高,分离效果好。

关键词:营养保健品; 葛根素; 色谱法,高压液相

Determination of Puerarin in Health Foods by Laminar-High Performance Liquid Chromatography Method

LU Jie, YANG Da-jin, SONG Shu-feng, HOU Wei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: **Objective** To establish the method of laminar-high performance liquid chromatography for puerarin in health foods. **Method** The D101 macroporals resin (10 cm ×15 cm ×1.0 cm) was used as column. ODS C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) was used as chromatographic column. The mobile phase was methanol + 36 % acetic acid + H₂O = 25 + 3 + 72, at the wavelength of 254 nm. **Results** The linear range was 5.0 ~ 50.0 μg/ml. Recovery varied from 81.6 % to 100.2 %. RSD was from 0.84 % to 1.08 %. **Conclusion** The method has the characteristics of simple, accuracy, sensitivity, high recovery and fine separation.

Key word: Dietary Supplements; PUERARIN; Chromatography, High Pressure Liquid

葛根素,易溶于甲醇、水等极性溶剂,化学名称为 8-β-d 葡萄糖吡喃糖-4',7-二羟基异黄酮。

目前,葛根素的定量分析报道较多,已见报道的葛根素测定方法有分光光度法^[1]、薄层扫描^[2]、近红外光谱分析^[3]、毛细管电泳^[4]和高效液相色谱分析^[5-15]。分光光度法是比较普及和实用的方法,但无法排除干扰,影响测定结果;薄层扫描法具有试验费用便宜等优点,但只能作为半定量测定方法;近红外光谱分析法由于仪器的普及率不高,故方法的推广性不强;毛细管电泳法虽也是现在较为常用的检测方法,但定量差。高效液相色谱法的研究很多,但多用于血浆和中药中葛根素的测定^[5-12],也有少量文献^[13-15]报道用液相色谱法测定保健食品中的葛根素的含量,但前处理过程过于简单,无法去除干扰和污染。本研究采用层析-反相高效液相色谱法测定保健食品中的葛根素,由于经过了层析等前处理步骤,大大减少了试样对分析柱的污染和干扰。

1 材料与方法

1.1 试剂

甲醇(CH₃OH),保证试剂;冰乙酸(CH₃COOH),保证试剂;无水乙醇(C₂H₅OH),分析纯;36 %乙酸,用冰乙酸与水按 9:16 的比例配制;水,为实验室一级用水;电导率(25 °C)为 0.01 mS/m。

葛根素标准品 纯度 ≥95 %,中国生物制品检定所。

葛根素标准储备溶液 准确称取0.020 0 g葛根素标准品,用 70 %甲醇溶解并定容至 10 ml,得浓度为 2.0 mg/ml 的标准溶液(此标准溶液在4 °C冰箱中可保存 1 周)。

葛根素标准使用液 准确吸取 1.0 ml 葛根素标准储备溶液于 10 ml 容量瓶中,用 70 %甲醇定容至刻度,得浓度为 200 μg/ml 的标准使用液(此标准溶液在4 °C冰箱中可保存 1 周)。

D101 大孔树脂(天津市海光化工有限公司)树脂用 70 %乙醇浸泡 24 h,使其充分溶胀,反复用去离子水冲洗,将乙醇洗净后装入层析柱上,层析柱:柱高为 10 cm,长 15 cm,内径 1.0 cm。

作者简介:鲁杰 女 助理研究员

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪 附二极管阵列检测器 美国 Waters 公司, 超声波清洗器 美国 Branson 公司, 离心机 美国 SIGMA 公司。

1.3 方法

1.3.1 试样处理 单一葛根提取物制成的试样根据试样含量, 称取 0.5 ~ 1.0 g, 精确至 0.001 g, 加适量 70 % 甲醇, 于超声波清洗器中超声提取 20 min, 冷却至室温, 再用 70 % 甲醇定容至 10 ml, 混匀, 静置, 上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 待液相色谱分析。

多种植物提取物制成的试样 根据试样含量, 称取 0.5 ~ 1.0 g, 精确至 0.001 g, 加适量水溶解, 并于超声波清洗器中超声 20 min, 冷却至室温后用水定容至 10 ml, 混匀, 4 000 r/min 离心 5 min。取 1 ml 上清液上层析柱, 用约 40 ml 水淋洗杂质, 再用 50 ml 70 % 乙醇洗脱葛根素, 将洗脱液置于沸水浴蒸发近干, 用 70 % 甲醇将其溶解并定容至 1 ml, 过 0.45 μm 滤膜后, 待高效液相色谱用。

校正曲线的制备 分别吸取标准使用液, 用

70 % 甲醇稀释并定容得浓度分别为 5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μg/ml 标准系列。

1.3.2 高效液相色谱条件 色谱柱: ODS C₁₈ 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相: 甲醇 + 36 % 乙酸 + 水 = 25 + 3 + 72; 流速: 0.6 ml/min; 检测波长: 247 nm; 进样体积: 10 μl。

1.3.3 在给定的仪器条件下进标准溶液系列和试样净化液进行液相色谱仪分析, 以保留时间定性, 以峰高或峰面积定量。

1.4 分析结果的表述

$$x = \frac{c \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000 \times 1\,000}$$

式中: x — 试样中葛根素的含量, (g/kg); c — 由校正曲线求得进样液中葛根素的浓度, (μg/ml); V — 试样定容体积, (ml); m — 试样质量, (g)。计算结果保留两位有效数字。

1.5 允许差

在重复条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对值不得超过算术平均值的 10 %。

1.6 标准色谱图 见图 1。

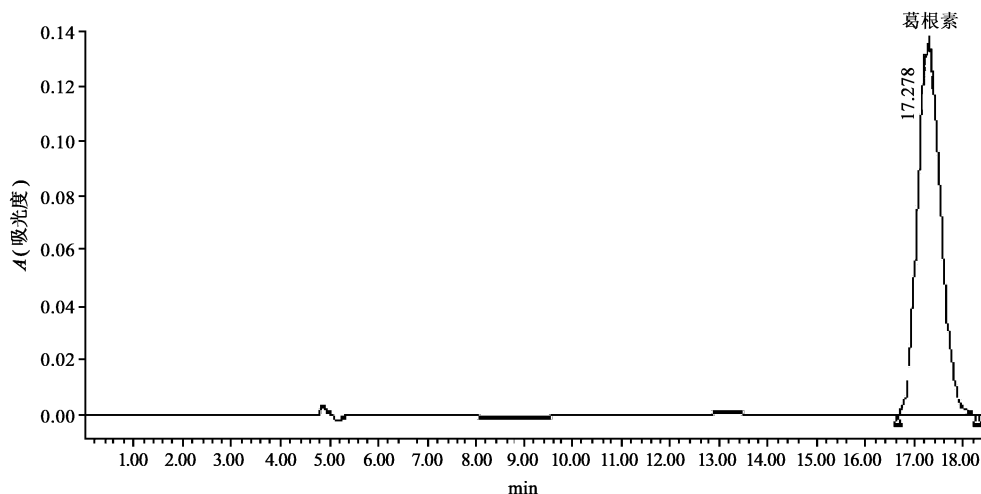


图 1 葛根素标准色谱图

2 结果与讨论

2.1 试样前处理条件的选择

2.1.1 试样提取溶剂的选择 根据葛根素易溶于甲醇、水等极性溶剂的理化性质, 实验采用水、乙醇、甲醇、不同比例的甲醇 + 水和不同比例的乙醇 + 水进行提取, 上述溶剂均可有效地将其提取完全。由于不少保健食品为剂型复杂的复合配方, 水、乙醇、甲醇单一提取液的直接色谱分析分离行为较差, 干扰峰很多, 必须要通过层析柱净化, 而大孔树脂层析柱最好采用水相, 故选择水作为复杂试样的提取溶剂, 保证下步净化的顺利开展。对于基质简单的试

样可采用 70 % 甲醇直接超声提取, 提取液经 0.45 μm 滤膜过滤, 分析效果较好。

2.1.2 大孔树脂条件的优化选择 将处理好的大孔树脂湿法装柱, 用 20 ml 去离子水将树脂柱清洗一遍, 保持去离子水刚好浸没树脂。将 100 μg/ml 葛根素标准液 1 ml 加入树脂中, 先用 40 ml 蒸馏水洗, 再改用体积分数 70 % 乙醇溶液洗脱, 依次接收每 10 毫升淋洗液, 用 HPLC 测定葛根素。以洗脱液体积为横坐标, 葛根素含量为纵坐标, 绘制淋洗曲线。

从图 2 可以看出, 在用 40 ml 水淋洗阶段, 葛根素未检出, 可见用水无法从层析柱上将葛根素洗脱下来。改用体积分数 70 % 乙醇洗脱液后, 使用 50 ml

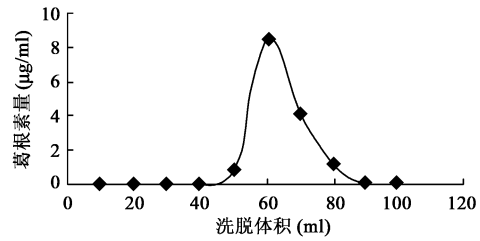


图 2 D101 型大孔树脂分离葛根素的淋洗曲线

洗脱液即可将葛根素完全洗脱下来。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 色谱流动相的选择 分别选择 0.2 % 磷酸水溶液 + 乙腈 (92 + 8) (见图 3) ; 甲醇 + 0.05 mol/L 乙酸铵 (20 + 80) (见图 4) ; 甲醇 + 36 % 乙酸 + 水 (25 + 3 + 72) (见图 5) 等溶液作为流动相进行比较。

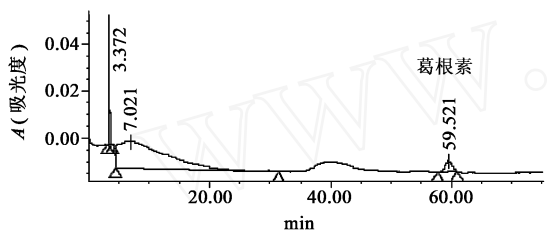


图 3 0.2 % 磷酸水溶液 + 乙腈 (92 + 8) 葛根素标准图

选用流动相甲醇 + 36 % 乙酸 + 水 (25 + 3 + 72) 时不但出峰时间合适且可将被测成分与杂质峰很好地分离,此条件下葛根素的出峰时间在 17 ~ 19 min

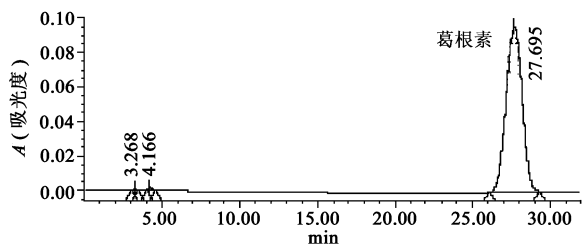


图 4 甲醇 + 0.05 mol/L 乙酸铵 (20 + 80) 葛根素标准图

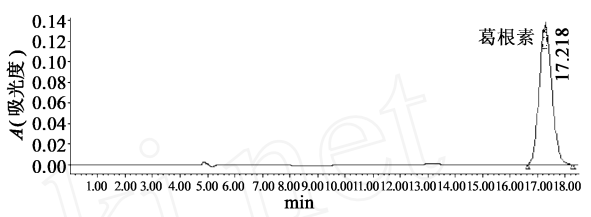


图 5 甲醇 + 36 % 乙酸 + 水 (25 + 3 + 72) 葛根素标准图

(见图 5) 。而且通过与标准的光谱图对照,试样中待测组分的光谱图与标准的光谱图匹配性很好,完全可以达到将待测组分与杂质峰完全分离的目的 (见图 6) ,满足分析的要求。

2.2.2 检测波长的选择 选择较高灵敏度的检测波长可以提高分析的精密性。根据葛根素有紫外吸收波长的性质,在 200 ~ 400 nm 进行吸收强度扫描,其中 247 nm 为其最大吸收波长,故选择此 247 nm 作为葛根素的吸收波长。葛根素紫外光谱图见图 7。

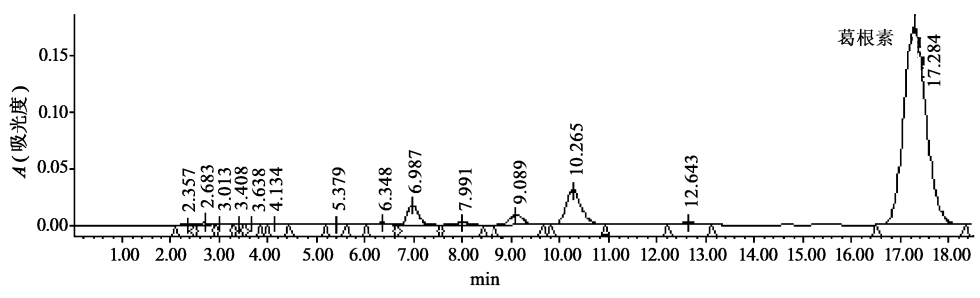


图 6 葛根素试样图

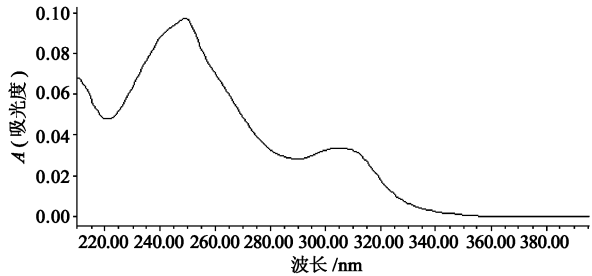


图 7 葛根素紫外光谱图

2.3 方法的线性关系及检出限

以 70 % 甲醇为溶剂,配成葛根素含量为 5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μg/ml 的标准系列,绘制

校正曲线,在规定的色谱条件下,进样 10 μl 进行测定,求葛根素的响应峰面积 - 葛根素浓度的线性回归方程,多次测定表明,在该浓度范围内,峰面积与浓度呈线性关系,符合定量要求,其相关系数 r 的范围为 0.999 2 ~ 0.999 9。

当信噪比 $S/N = 3$,取样量为 1.0 g,定容体积为 10 ml 时,本方法的检出限 (LOD) 为 2.0×10^{-5} g/kg; 当信噪比 $S/N = 10$,取样量为 1.0 g,定容体积为 10 ml 时,方法的定量限 (LOQ) 6.0×10^{-5} g/kg。

2.4 准确度试验

目前,保健食品市场中葛根和葛根的提取物应用范围较广,本研究共选择 11 种试样进行试样的加

标回收率实验,共进行了 3 个加标水平,6 次重复的回收试验,低标约为试样本底值的 50 %,中标约为试样本底值,高标约为试样本底值的 1 倍,具体结果见表 1。

表 1 不同基质试样的检测准确度结果 %

试样名称	主要成分	低标平均回收率	中标平均回收率	高标平均回收率
样品 1	葛根、黄芪、黄连、炙甘草等	92.6	90.1	96.5
样品 2	松针粉、松针提取物粉、菊花、绿茶、葛根提取物等	88.5	89.3	90.5
样品 3	菊花、生地黄、葛根粉、牡丹皮、山茱萸、枸杞子、茯苓、越橘提取物等	83.2	86.9	90.4
样品 4	黄酮、皂甙、金雀异黄素、染料木苷、黄豆苷元、黄豆苷、葛根等	90.6	93.5	94.1
样品 5	马鹿尾、人参、覆盆子、淫羊藿、葛根、马鹿茸、蜂蜜、蜂蜡等	82.7	81.6	90.5
样品 6	大蒜精油、花粉、牡蛎粉、西洋参、枸杞提取物、大豆油、葛根提取物、蜂蜡等	96.5	92.4	88.6
样品 7	桔梗末、远志末、甘草末、罗汉果末、葛根末、人参末等	87.1	88.8	85.5
样品 8	海鱼蛋白、海松皮提取物、茶多酚、葛根提取物、锌、铁、镁等	93.2	93.8	91.7
样品 9	螺旋蓝海藻、甲壳素、蚝提取物、葛根提取物、蜂皇乳等	92.5	93.4	89.9
样品 10	酸枣仁、麦冬、葛根、远志、藤茶等	90.0	93.1	89.1
样品 11	黄芪、甘草、麦冬、黄连、百合、紫苏子、苦杏仁、葛根等	95.7	90.2	100.2

从表 1 中可以看出,试样的总体加标回收率范围为 81.6 % ~ 100.2 %,平均回收率为 90.7 %,符合葛根素化学分析的要求,方法的准确度满足建立该方法的要求。

2.5 精密度

对 3 个已知含量的试样进行了 6 次测定。其中

RSD 的范围为 0.84 % ~ 1.10 %,见表 2。

2.6 稳定性试验

在 24 h 内每隔 0.5 h 检测 1 次葛根素试样溶液,各测定结果之间的 RSD < 0.5 %,表明用此方法处理过的葛根素试样溶液在常温下 24 h 内是稳定的。

表 2 试样检测的精密度结果

试样名称	1	2	3	4	5	6	平均值(g/kg)	RSD(%)
片剂	0.62	0.64	0.62	0.61	0.63	0.62	0.62	0.84
胶囊	2.70	2.60	2.60	2.60	2.70	2.60	2.60	0.66
保健茶	0.32	0.33	0.33	0.35	0.31	0.33	0.33	1.1

将标准溶液放置冰箱中 1 周,每天测定 1 次,各测定结果之间的 RSD < 0.7 %,说明葛根素的标准溶液在一周以内是稳定的。

参考文献

[1] 杨振林,寇玉玺,李红举. 紫外分光光度法测定葛根冲剂中葛根素含量[J]. 医药论坛杂志,2005,26(6):57.

[2] 马家骅,杨明,曹世栋,等. 葛根素的提取和含量测定[J]. 华西药学杂志,2006,21(2):206-207.

[3] 陈斌,赵龙莲. 近红外光谱法快速分析葛根中的有效成分[J]. 光谱学与光谱分析,2002,22(6):976-979.

[4] 李存红,陈晓峰,陈兴国,等. 非水毛细管电泳测定葛素汤制剂中 5 种有效成分[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2005,41(2):139-140.

[5] 成旭东,贾晓斌,陈彦,等. HPLC 法测定家犬口服葛根黄酮微丸后血浆中的葛根素含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(4):346-348.

[6] 梁玉香,赵赫,于丽萍,等. HPLC 法测定通脉颗粒中葛根素的含量[J]. 辽宁中医药大学学报,2007,9(2):131.

[7] 李捷,罗建云,刘晓峰,等. 大鼠血浆中葛根素含量的 RP-HPLC 测定方法[J]. 武警医学院学报,2007,16(2):149-151.

[8] 杨跃龙. 通脉口服液中药阿魏酸和葛根素的含量测定[J]. 中南药学,2007,5(1):31-33.

[9] 周翎,许耕. HPLC 法测定糖消片中葛根素的含量[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(2):212-213.

[10] 阮国虎,赵铁,菅凌燕,等. HPLC 法测定清热合剂中葛根素的含量[J]. 化学与生物工程,2007,24(2):77-78.

[11] 邹安华. 高效液相色谱法测定心康胶囊中葛根素的含量[J]. 白求恩医学院学报,2007,5(1):33-34.

[12] 邱震,周正华,杜安全. HPLC 法测定参苏感冒片中葛根素的含量[J]. 安徽医药,2007,11(1):29.

[13] 甘宾宾,廖庆明. 高效液相色谱法测定保健食品中葛根素的含量[J]. 化工技术与开发,2006,35(1):21-22.

[14] 刘泰然,赵珊,张楠,等. 反相液相色谱法测定保健食品中葛根素[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(2):147-148.

[15] 黄宏南,黄健文. HPLC-PDA 法快速测定保健食品中的葛根素[J]. 中国卫生检验杂志,2002,12(6):692-693.

[收稿日期:2007-08-02]