

实验技术与方法

反相高效液相色谱法测定保健食品中阿魏酸的含量

李青 方赤光 白梅 张冠英 张丽薇 张博 姜楠 蒋素

(吉林省疾病预防控制中心,吉林 长春 130062)

摘要:目的 建立保健食品中阿魏酸的反相高效液相色谱法测定方法。方法 采用反相高效液相色谱法,色谱柱:Aichrom Bond-1 C₁₈ 4.6 mm ×150 mm, 5 μm,流动相:乙腈-0.085%磷酸水溶液=20:80,检测波长320 nm,流速1.0 ml/min,柱箱温度30℃。结果 阿魏酸在1.0~10.0 μg/ml范围内呈好的线性关系($r=0.9998$),平均回收率为90.3%~94.2%,相对标准偏差分别为6.00%~7.51%。结论 该方法简便、准确,能够满足保健食品中阿魏酸含量的检测要求。

关键词:营养保健品;色谱法;高压液相;阿魏酸;化学;分析

In Opposition Highly Effective Liquid Phase Chromatography Determination Health Foods Ferulic Acid Content

LI Qing, FANG Chi-guang, BAI Mei, ZHANG Guan-ying, ZHANG Li-wei, ZHANG Bo, JIANG Nan, JIANG Su
(Jilin Province Centers for Disease Control and Prevention, Jilin Changchun 130062, China)

Abstract: Objective To establish the method of ferulic acid in health foods with reversed phase high performance liquid chromatography. **Method** The reversed phase high performance liquid chromatography was composed. Chromatographic column: Aichrom Bond-1 C₁₈ 4.6 mm ×150 mm, 5 μm. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.085% phosphate acid (20:80); the wave length was 320 nm; speeds of flow were 1.0 ml/min; column box temperature was 30℃. **Results** The ferulic acid appeared the good linear relationship from 1.0-10.0 μg/ml ($r=0.9998$). The average return ratio is 90.3%-94.2%. The relatively standard deviations respectively is 6.00%-7.51%. **Conclusion** This method is simple, accurate, can satisfy the health foods the asafetida acid content examination request.

Key words: Dietary Supplements; Chromatography, High Pressure Liquid; Ferulic Acid; Chemistry, Analytical

阿魏酸分子式为 C₁₀H₁₀O₄, 分子量为 194.19, CAS 号为 1135-24-6, 阿魏酸的结构式如图 1 所示。

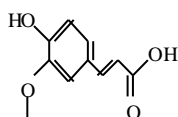


图1 阿魏酸结构式

阿魏酸存在于伞形科植物阿魏 (*Ferula assafoetida* L.), 木贼科植物木贼 (*Equisetum hiemale* L.) 的全草, 紫茉莉科植物光叶子花 (*Bougainvillea glabra* Choisy) 的根中等。具有抗氧化和清除自由基、抗血栓、降血脂、调节免疫功能、抗菌、抗病毒和防癌等功效作用^[1]。目前, 有关阿魏酸的检测方法大多是药材和中成药中阿魏酸含量的检测^[2-5], 本文研究了不同的检测方法, 结合实际情况, 建立了一种采用反相高效液相色谱法测定保健食品中阿魏酸

作者简介:李青女 主任技师

含量的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HPLC-10AVP 高效液相色谱仪(日本岛津公司), 紫外检测器, SCL-10AVP 工作站。阿魏酸对照品(自中国药品生物制品检定所)、乙腈(色谱纯)、磷酸(色谱纯)、水为超纯水。

1.2 标准溶液制备

1.2.1 贮备液 精密称取 5.00 mg 阿魏酸于 10 ml 棕色容量瓶中, 加甲醇溶解, 并定容, 浓度为 500 μg/ml。

1.2.2 标准系列 取适量储备液配制浓度为 1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 μg/ml 标准使用液。

1.3 分析方法

1.3.1 样品处理方法

固体样品 精密称取样品 1.00 g 于具塞锥形瓶中, 加 70% 甲醇 25 ml 混匀, 精密称重量, 加热回流 30 min, 冷却后, 再称其重量, 用 70% 甲醇补足减

失的重量,充分混匀,静置,取上清液过 0.22 μm 的微孔滤膜,滤液备用。

液体样品 精密量取样品 5.0 ml 于 25 ml 棕色容量瓶中,加甲醇 20 ml 混匀,超声处理 30 min,冷却后,用甲醇定容至刻度,充分混匀后静置,取上清液过 0.22 μm 的微孔滤膜,滤液备用。

1.3.2 液相色谱条件 色谱柱:Aichrom Bond - 1 C₁₈ 4.6 mm \times 150 mm,5 μm ;检测波长:320 nm;流动相:乙腈 0.085 % 磷酸水溶液 = 20 : 80;流速:1.0 ml/min;柱箱温度:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.3 测定 分别取阿魏酸标准系列 1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/ml}$ 和样品提取液 10 μl 进液相色谱仪,用保留时间定性,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的选择

2.1.1 提取液的选择 由于阿魏酸易溶于热水、醇等有机溶剂,当甲醇浓度低于 50 % 时,水溶性化合物提取增多,从色谱图上看对实验带来明显干扰,故选择甲醇浓度分别为 50 %、60 %、70 %、80 %、85 % 5 个浓度来观察。综合评价色谱分离情况,发现当甲醇浓度为 70 % 时,提取效果最好,不仅提取效率高而且干扰相对最小,因此本研究选用了 70 % 甲醇回流提取法提取样品中的阿魏酸。

2.1.2 流动相的选择 阿魏酸为酸性物质,在中性流动相中易发生分解,使含量偏低且拖尾严重,故研究采用了反相离子抑制技术,在流动相中加入少量磷酸,抑制其分解。流动相中酸度大小直接影响色谱峰形,酸度越大色谱峰形越好,由于酸度太大影响液相色谱柱的使用寿命,故本实验选择了 0.045 % 磷酸水溶液、0.085 % 磷酸水溶液和 1.500 % 磷酸水溶液,经实验 0.085 % 磷酸水溶液能够满足实验要求。对流动相中的有机相进行选择时发现乙腈的效果明显好于甲醇,峰形相对对称,响应高。对不同的流动相进行了比较选择,即:乙腈 0.085 % 磷酸(10 : 90);乙腈 0.085 % 磷酸(20 : 80);乙腈 0.085 % 磷酸(40 : 60),当流动相为乙腈 0.085 % 磷酸(20 : 80)时,阿魏酸的出峰时间在 9 min 左右,且峰形好,分离度高,故本实验采用此体系为流动相。色谱图详见图 2、图 3 所示。

2.1.3 检测波长的选择

为了使得待测样品中的阿魏酸能够与其他化合物很好地分离,并且能够准确地定量,根据阿魏酸的化学结构和特性,进行了全波长扫描,其中 320 nm 时响应高,基质干扰相对小,故选定 320 nm 为检测波长,如图 4 所示。

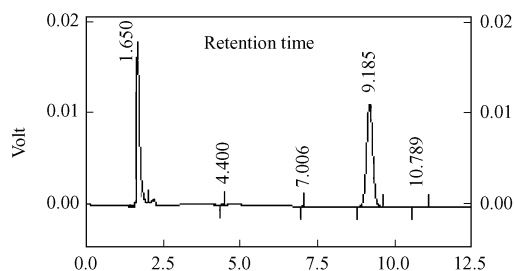


图 2 阿魏酸色谱图(阿魏酸保留时间为 9.185 min)

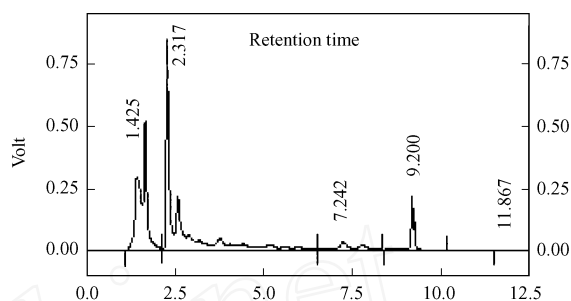


图 3 样品色谱图(阿魏酸保留时间为 9.200 min)

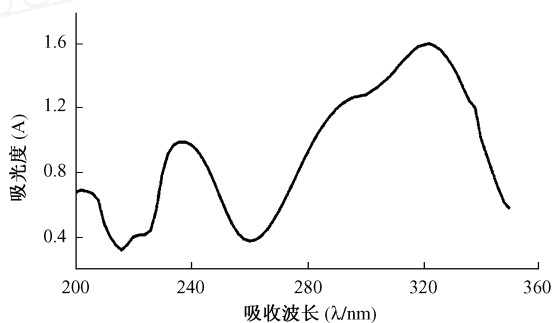


图 4 阿魏酸的全波长扫描图

2.2 线性关系

取阿魏酸标准溶液 1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/ml}$,按照以上色谱条件分别进样 10 μl ,以阿魏酸的浓度为横坐标(X),测定峰面积为纵坐标(Y)绘制校正曲线,线性回归方程式为 $y = 7.9662x - 0.4715$, $r = 0.9998$,结果表明当校正曲线浓度范围在 1.0 ~ 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 时,线性关系良好。

2.3 方法的准确度、精密度实验

取 3 个不同浓度的阿魏酸标准溶液加到含有当归等中药成分的样品中,按照以上方法每种浓度平行检测 6 次检测结果见表 1 所示。

从表 1 可以看出,该方法的精密度好、准确度高,添加平均回收率为 90.3 % ~ 94.2 %,相对标准偏差为 6.00 % ~ 7.51 %。

2.4 实际样品测定

对含有当归、胡黄连等伞形科植物的保健食品中的阿魏酸进行了检测,对市售的保健食品口服液和胶囊样品分别进行了检测,检测结果见表 2 所示。

实验技术与方法

免疫亲和柱——高效液相色谱法测定肾脏中的赭曲霉毒素 A

韩惠雯 黄菲菲

(农业部食品质量监督检验测试中心,上海 200072)

摘要:目的 针对动物肾脏中可能污染的赭曲霉毒素 A(OTA),建立了肾脏中赭曲霉毒素 A 的高效液相色谱方法。方法 试样用磷酸酸化后经乙酸乙酯提取,免疫亲和柱净化,以乙腈-水-冰醋酸(450+525+25)为流动相,C₁₈柱分离并通过荧光检测器定量。结果 赭曲霉毒素 A 标准溶液浓度在 0.10~20 μg/L 范围内呈线性相关($r=1.0000$),不同浓度水平的添加回收率为 72.5%~87.4%,检出限为 0.012 μg/kg。结论 使用免疫亲和柱净化能够达到良好的净化效果,是一种准确、方便的测定猪肾中赭曲霉毒素 A 的分析方法。

关键词:食品污染;真菌毒素;化学分析;色谱法,亲和;色谱法,高压液相;肾

Determination of Ochratoxin A in Kidney by Immunoaffinity Column and High Performance Liquid Chromatography

HAN Hui-wen, HUANG Fei-fei

(Shanghai Food Quality Supervision and Inspection Center of Ministry of Agriculture of China, Shanghai 200072, China)

Abstract: **Objective** To develop a method on Ochratoxin A (OTA) in kidney determinate by immuno-affinity column (IAC) and high performance liquid chromatography (HPLC). **Method** Samples were extracted by ethyl acetate, after cleaned up by

表 1 方法的准确度、精密度实验

本底值 (μg)	加标值 (μg)	测定值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD %
2.0	1.0	2.7	90.0	93.3	7.51
		3.1	103.3		
		2.8	93.3		
		2.6	86.7		
		3.0	100.0		
		2.6	86.7		
		3.0	100.0		
2.0	4.0	5.8	96.7	94.2	6.00
		5.5	91.7		
		5.9	98.3		
		5.4	90.0		
		5.2	86.7		
		6.1	101.7		
		5.8	96.7		
2.0	7.5	8.1	85.2	90.3	7.16
		8.9	93.6		
		9.4	98.9		
		7.7	81.0		
		8.9	93.6		
		8.5	89.5		
		8.5	89.5		

表 2 实际样品中阿魏酸的测定

样品编号	检测结果
1	2.04 mg/100 ml
2	1.89 mg/100 ml
3	1.56 mg/100 ml
4	4.32 mg/100 g
5	4.00 mg/100 g
6	3.68 mg/100 g

参考文献

- [1] 胡益勇,徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展. 中成药[J]. 2006,28(2):253-255.
- [2] 张惠,李祥,周红燕,等. HPLC 法测定脉络宁注射液中阿魏酸含量. 医学进展[J]. 2008,32(12):556-558.
- [3] 毕跃峰,田野,裴珊珊,等. 金银花化学成分分析. 郑州大学学报[J]. 2007,39(2):184-186.
- [4] 李波霞,魏玉辉,段好刚,等. HPLC 法测定四物合剂中芍药苷和阿魏酸的含量. 中国药房[J]. 2008,19(36):2853-2854.
- [5] 程东岩,王隶书,王海生,等. 高效液相色谱法测定慈航颗粒中阿魏酸的含量. 中国实验方剂学杂志[J]. 2008,14(11):16-17.

[收稿日期:2009-03-18]

结果与药检部门用其他方法检测的结果是一致的,说明该方法是适用的。

中图分类号:R15;O652.63;TS207.3;O656 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2009)03-0248-03

作者简介:韩惠雯 女 高级畜牧师