

大批量样品的快速测定。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [2] 王骏,胡梅,张卉,等. 超高效液相色谱快速测定饮料中的16种食品添加剂[J]. 食品科学,2010,31(2):195-198.
- [3] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.29—2003 食品中山梨酸、苯甲酸的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [4] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T

5009.31—2003 食品中尼泊金酯类的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2004.

- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 23377—2009 食品中脱氢乙酸的测定高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [6] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.140—2003 饮料中乙酰磺胺酸钾的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [7] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.28—2003 食品中糖精钠的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2004.

## 实验技术与方法

# 高效液相色谱法同时测定保健食品中红景天苷和腺苷

林宏琳<sup>1</sup>,李晓明<sup>2</sup>,华永有<sup>1</sup>,黄宏南<sup>1,2</sup>

(1.福建省疾病预防控制中心,福建福州 350001; 2.福建中医药大学,福建福州 350108)

**摘要:**目的 建立同时测定保健食品中的红景天苷和腺苷含量的高效液相色谱测定方法。方法 采用50%甲醇为溶剂,超声提取样品中的红景天苷和腺苷成分。采用shim-pack CLS-ODS色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇+20 mmol/L磷酸二氢钾水溶液(15+85,V/V),流速1.0 ml/min,进样量10 μl,紫外检测波长为红景天苷275 nm,腺苷260 nm。结果 红景天苷在10.0~200 μg/ml范围内线性良好( $r=0.9995$ ),平均回收率92.5%~99.5%,精密密度2.8%~4.7% ( $n=6$ );腺苷在2.50~50.0 μg/ml范围内线性良好( $r=0.9996$ ),平均回收率90.0%~94.0%,精密密度2.1%~5.2% ( $n=6$ )。红景天苷和腺苷检出限LOD分别为0.01和0.005 μg/g。结论 本方法快捷、简便、灵敏度高,可准确同时测定保健食品中的红景天苷和腺苷含量。

**关键词:**保健食品;红景天苷;腺苷;高效液相色谱

中图分类号:R155;O657.7;O625.34;Q525 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)02-0159-03

## Methodology of simultaneous determination of salidroside and adenosine in health food by high performance liquid chromatography

Lin Honglin, Li Xiaoming, Hua Yongyou, Huang Hongnan

(Fujian Center For Disease Control & Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China)

**Abstract: Objective** A method of high performance liquid chromatography was established for simultaneous determination of salidroside and adenosine in health food. **Methods** Salidroside and adenosine in samples were extracted ultrasonically with 50% methanol as the solvent and separated on a shim-pack CLS-ODS column (150 mm×4.6 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of methanol+20 mmol/L Potassium dihydrogen phosphate (15+85, V/V). The flow rate was 1.0 ml/min; the injection volume was 10 μl; the UV detection wavelength of salidroside and adenosine were 275 and 260 nm. **Results** The standard curve of salidroside was linear over the range in 10.0~200 μg/ml ( $r=0.9995$ ). The recovery was 92.5%~99.5%,  $RSD$  2.8%~4.7% ( $n=6$ ); The standard curve of adenosine was linear over the range in 2.50~50.0 μg/ml ( $r=0.9995$ ). The recovery was 90.0%~94.0%,  $RSD$  2.1%~5.2% ( $n=6$ ). The detection limits of salidroside and adenosine were 0.01 and 0.005 μg/g. **Conclusion** The method was simple, sensitive and accurate, it could be used for simultaneous determination of salidroside and adenosine in health food.

**Key words:** Health food; salidroside; adenosine; high performance liquid chromatography

收稿日期:2012-12-27

作者简介:林宏琳 女 主管技师 研究方向为营养与食品安全 E-mail:erianlin@sina.com

通信作者:黄宏南 男 主任技师 研究方向为营养与食品安全 E-mail:hnn666666@163.com

红景天苷 (salidroside) 是从藏药红景天提取出来的一种苯乙醇类化合物, 是红景天的主要有效成分。研究结果证明红景天苷具有保护心脑血管系统、调节免疫系统、提高缺氧耐受力、缓解体力疲劳、抗辐射、抗肿瘤、抗应激性、抗纤维化等多种药理作用<sup>[1-4]</sup>。腺苷 (adenosine) 全称腺嘌呤核苷, 是一种广泛存在于一些中草药 (如冬虫夏草、灵芝、贝母) 中的成分<sup>[1]</sup>, 具有改善心脑血管血液循环、防止心律失常、抗血凝、抑制神经递质释放、调节腺苷酸环化酶活性和激活腺嘌呤核苷受体来调节多种细胞的生物学活性等<sup>[5-6]</sup>作用。这两种成分经常用于保健食品和中成药中。由于保健食品和中成药的成分较为复杂, 对这两种药理活性成分的检测显得尤为重要。已报道的测定方法有 HPLC、HPCE、LC-MS 等<sup>[7-12]</sup>, 本文研究并建立了能同时分离测定保健食品中红景天苷和腺苷含量的 HPLC 方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪配 2996 二极管阵列检测器 (PDA) (美国 Waters)、Direct-Q UV 超纯水系统 (美国 Millipore)、KQ-250DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇为色谱纯 (美国 Fisher)、磷酸二氢钾 (优级纯)、水为超纯水、腺苷对照品 (批号 110879 200202, 中国药品生物制品检定所)、红景天苷对照品 (批号 1110818 200404, 中国药品生物制品检定所); 含腺苷和/或红景天苷的保健食品样品 3 种各 3 批次。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 对照品溶液的制备

对照品储备液: 准确称取红景天苷对照品 0.020 0 g, 用甲醇溶解并定容至 10.0 ml 容量瓶; 称取腺苷标准品 0.010 0 g, 用水溶解并定容至 25.0 ml 容量瓶, 分别配制成含红景天苷 2.00 mg/ml 和腺苷 0.500 mg/ml 的对照品储备液。避光贮存于 2 ~ 4 °C 冰箱中。

混合标准液: 以上对照品储备液各吸取 2.5 ml, 用 50% 甲醇稀释并定容至 25.0 ml 容量瓶, 将溶液过 0.45 μm 有机滤膜, 配制成含红景天苷 200 μg/ml 和腺苷 50.0 μg/ml 的混合标准液。

标准系列: 准确吸取以上混合标准液 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 ml 分别置于 10 ml 容量瓶, 用 50% 甲醇配制成含红景天苷 10.0、20.0、40.0、80.0、100、200 μg/ml 和含腺苷 2.50、5.00、10.0、20.0、25.0、50.0 μg/ml 的系列标准溶液。

#### 1.2.2 样品制备

准确称取试样约 0.5 g, 于 10 ml 容量瓶中, 加 50% 甲醇 10 ml, 以超声波提取 30 min, 加 50% 甲醇定容至刻度, 取上清液, 以 0.45 μm 微孔有机滤膜过滤于进样瓶中供 HPLC 分析。

#### 1.2.3 色谱条件

色谱柱为 shim-pack CLS-ODS 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 + 20 mmol/L 磷酸二氢钾水溶液 (15 + 85, V/V), 流速 1.0 ml/min, 进样量 10 μl, 紫外检测波长为红景天苷 275 nm, 腺苷 260 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理方法的优化

提取方式的选择: 比较了加热回流法、超声提取法<sup>[13-15]</sup> 2 种方法对红景天苷和腺苷含量测定的影响, 结果表明, 超声提取率与加热回流提取率无明显差别, 因超声提取操作简便、快速, 误差相对小, 因此本研究采用超声提取的方法。

提取溶剂的选择: 文献<sup>[1,13]</sup> 报道用于超声提取保健食品中的红景天苷和腺苷最常见的有机溶剂是水、甲醇、50% 甲醇和 50% 乙醇。本文分别比较了同等处理条件下, 甲醇、水、50% 甲醇及 50% 乙醇对保健食品中红景天苷和腺苷的提取效果, 分别记录其峰面积, 计算均值, 峰面积越大即提取率越好。发现以水提取腺苷最好 (设为 1), 但红景天苷提取率最低 (82.8%); 以甲醇提取红景天苷最好 (设为 1), 但腺苷提取率最低 (38.0%); 50% 甲醇比 50% 乙醇提取率均略好; 以 50% 甲醇提取腺苷和红景天苷的提取率分别是 90.2% 和 99.3%, 满足试验要求。为了使样品中的两个目标物都尽可能地完全提取出来, 本试验选用 50% 甲醇作为提取溶剂。

提取时间的选择: 比较了同等处理条件下 50% 甲醇超声提取 20、30、40 min 的效果, 结果表明超声 30 min 能够完全提取出保健食品中红景天苷和腺苷。故提取时间定为 30 min。

### 2.2 液相色谱条件的选择

流动相的选择: 本研究分别选用甲醇 + 水、甲醇 + 磷酸二氢钾水溶液、乙腈 + 水、乙腈 + 磷酸二氢钾水溶液作为流动相, 以不同比例等度分离腺苷和红景天苷的混合标准液及样品提取液。结果表明, 采用甲醇 + 20 mmol/L 磷酸二氢钾水溶液 (15 + 85, V/V), 腺苷和红景天苷可以获得良好的分离和峰形, 并且样品中其它杂质峰对主峰测定无干扰。色谱图见图 1, 腺苷和红景天苷保留时间分别约为 8.5 和 16.2 min。

检测波长的选择: 取腺苷和红景天苷对照品溶液在 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描, 发现红景天苷在

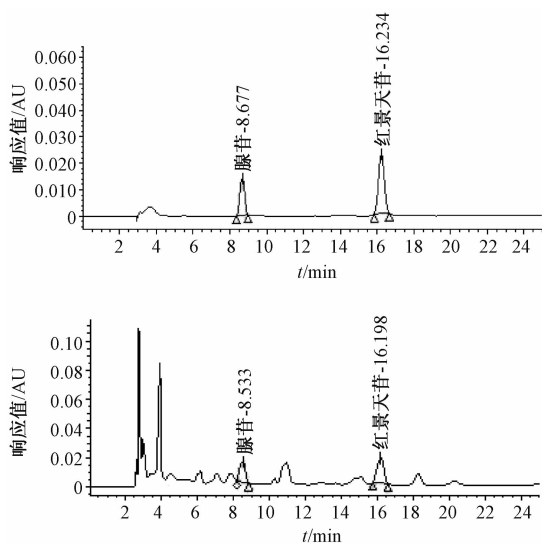


图1 腺苷和红景天苷对照品(上)及样品(下)色谱图  
Figure 1 Chromatograms of salidroside and adenosine in the reference solution (top), and a sample solution (bottom)

275 nm、腺苷在 260 nm 波长处有最大吸收,故分别采用为检测波长。

### 2.3 回收率和精密度

方法的线性范围、相关性及检出限:将标准系列依次进样,进样量均为 10 μl,以浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,对标准系列进行线性回归,得腺苷标准系列(2.50 ~ 50.0 μg/ml)的回归方程为: $y = 4.69 \times 10^4 x - 3.06 \times 10^4$ ,  $r = 0.9996$ ;红景天苷标准系列(10.0 ~ 200 μg/ml)的回归方程为: $y = 1.23 \times 10^4 x - 2.49 \times 10^4$ ,  $r = 0.9995$ 。腺苷和红景天苷在上述浓度范围内线性关系良好。当取样量为 0.5 g,信噪比  $S/N \geq 3$  时,确定腺苷和红景天苷的检出限 LOD 分别为 0.005 和 0.01 μg/g。

稳定性试验:取同一供试样品提取液,在室温中放置,分别在 0、6、12、18、24 h 进样分析,腺苷和红景天苷峰面积的 RSD 分别为 2.6%、1.9%。结果表明 2 种化合物溶液在 24 h 内稳定。

添加回收率和精密度:取已知含量(含腺苷 0.102 mg/g 和红景天苷 2.08 mg/g)的样品分别添加混合标准液 1.0、2.0、5.0 ml,每个水平作 6 个平行实验,统计各添加水平的平均数和标准差,得到腺苷回收率在 90.0%~94.0%,精密度在 2.1%~5.2%;红景天苷回收率在 92.5%~99.5%,精密度在 2.8%~4.7%。结果见表 1,表明本方法的准确度和精密度均符合分析要求。

### 2.4 样品测定

为考察方法的适用性,对含腺苷和/或红景天苷的 3 种保健食品各 3 批次样品进行测定。分别按 1.2.2 和 1.2.3 方法,制备供试品溶液并进样测定,

表 1 样品加标回收率和精密度的测定 (n = 6)

Table 1 The determination of spiked samples recoveries and RSD

化合物	添加水平 (mg/g)	平均测定值 (mg/g)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
腺苷	0	0.106		
	0.10	0.196	90.0	5.2
	0.20	0.294	94.0	2.1
	0.50	0.570	92.8	4.5
红景天苷	0	2.08		
	0.40	2.45	92.5	4.7
	0.80	2.86	97.5	4.3
	2.00	4.07	99.5	2.8

样品都能较好地分离,未发现干扰峰,说明样品的前处理方法及液相色谱条件的选择是满意的。色谱图见图 1,各组分保留时间与对照品基本一致。以外标法计算质量浓度,结果均与制造商企标规定的产品含量范围相一致。

### 3 结论

本文建立了用 HPLC 法同时测定保健食品中的红景天苷和腺苷的方法。采用 50% 甲醇为溶剂,同时超声提取样品中的红景天苷和腺苷成分,以甲醇 + 20 mmol/L 磷酸二氢钾水溶液 (15 + 85, V/V) 为流动相,进行 HPLC 的同时测定。该法可同时分析含有红景天苷和腺苷成分的保健食品,节省实验时间及仪器材料的消耗。实践证明,本方法快捷简便、准确可靠、灵敏度高,符合日常检测的要求,为测定保健食品功效成分提供了更有效的方法,可应用在保健食品的检测工作或产品质量控制中。

### 参考文献

- [1] 白鸿. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京:中国中医药出版社,2011.
- [2] 张雨楠,李屹,刘永琦,等. 红景天苷现代药理研究进展[J]. 临床荟萃,2011,26(21):1931-1933.
- [3] 陈辉,崔颖,李灵芝. 红景天苷及其类似物合成研究进展[J]. 天津药学,2011,23(5):28-33.
- [4] 胡敏. 红景天苷对心血管系统作用的研究[J]. 外医学心血管病分册,2003,30(5):298-300.
- [5] 许超德. 冬虫夏草的研究进展[J]. 菌物研究,2006,4(2):60-64.
- [6] 马红霞,周运恒,焦炳华. 腺嘌呤核苷受体及其生理学作用[J]. 医学综述,2004,10(10):589-590.
- [7] 谢显珍,黄兰芳,王小玉. 液相色谱-电喷雾离子化-质谱测定蛹虫草子实体中腺苷含量[J]. 光谱实验室,2009,26(3):631-634.
- [8] 李泽运,陈晓辉,马凤,等. RP-HPLC 法同时测定二至丸中红景天苷、女贞子苷和蟾蜍菊内酯的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(1):19-21.
- [9] 吴敏,卢佳,孙成均,等. HPLC 法同时测定保健品及中成药中的 5 种苷类成分[J]. 华西药学杂志,2011,26(2):165-167.
- [10] Wang J, Lin T, Lai J, et al. Analysis of adenosine phosphates in