

高效液相色谱法测定减肥类保健食品中 7 种功效成分

陈东洋, 张昊, 冯家力, 曾栋, 刘先军, 李帮锐

湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 建立减肥类保健食品 7 种功效成分(左旋肉碱、L-茶氨酸、儿茶素、吡啶甲酸铬、番泻苷 A、番泻苷 B、鼠尾草酸)的高效液相色谱测定方法。 **方法** 样品直接用 50% 乙腈超声提取, 采用 C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇-磷酸二氢钾(0.1% 磷酸)水溶液为流动相, 梯度洗脱, 外标法定量。 **结果** 左旋肉碱、L-茶氨酸和鼠尾草酸在 10.0~100.0 mg/L, 儿茶素在 1.0~50.0 mg/L, 番泻苷 A 在 0.50~10.0 mg/L, 番泻苷 B 在 0.20~10.0 mg/L, 吡啶甲酸铬在 2.0~50.0 mg/L 内质量浓度和色谱峰面积有良好的线性关系, 相关系数 $r \geq 0.9991$ 。方法回收率为 89.9%~108.0%, 相对标准偏差为 1.2%~6.3%, 方法检出限为 0.1~5 mg/kg。 **结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合减肥类保健食品中 7 种功效成分的同时测定。

关键词: 减肥类保健食品; 功效成分; 高效液相色谱法

中图分类号: 0657.63 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2020)12-1457-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.12.013

Determination of 7 kinds of functional compositions in slimming health food by high performance liquid chromatography

CHEN Dong-yang, ZHANG Hao, FENG Jia-li, ZENG Dong, LIU Xian-jun, LI Bang-rui

Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: FENG Jia-li, E-mail: goodlucklkh@163.com

Abstract: **Objective** To develop an analytical method based on high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of 7 kinds of functional compositions (including L-carnitine, L-theanine, catechin, chromium picolinate, sennoside A, sennoside B and carnolic acid) in slimming health food. **Methods** Samples were extracted by 50% acetonitrile. The chromatographic separation was performed on C18 column using a mobile phase consisting of methanol and potassium dihydrogen phosphate solution (0.1% phosphoric acid) under gradient mode. And external standard method was used for quantitative analysis. **Results** A good linearity was got in the range of 10.0 mg/L-100.0 mg/L for L-carnitine, L-theanine and carnolic acid, in the range of 1.0 mg/L-50.0 mg/L for catechin, in the range of 0.50 mg/L-10.0 mg/L for sennoside A, in the range of 0.20 mg/L-10.0 mg/L for sennoside B, and in the range of 2.0 mg/L-50.0 mg/L for chromium picolinate. The correlation coefficients were equal to or greater than 0.9991. The recoveries were in the range of 89.9%-108.0%, the relative standard deviation was between 1.2% and 6.3%, and the limits of detection were 0.1 mg/kg-5 mg/kg. **Conclusions** This method is rapid, accurate and feasible, and it is suitable for simultaneous quantification of 7 kinds of functional compositions in slimming health food.

Keywords: slimming health food; functional composition; high performance liquid chromatography

保健食品是具有特定保健功能, 适用于特定人群食用的食品^[1]。随着生活水平的提高和消费者对自身保健的需求, 保健食品市场越来越大。其中, 减肥类保健食品深受消费者的青睐。在国家食品药品监督管理局数据库中显示减肥类保健食品以荷叶、决明子和左旋肉碱为原料使用频次最高, 因此, 其功效/标志性成分总黄酮、总蒽醌和左旋肉碱的测定频率也是最高的^[2-3]。但随着新原料、新技术的引入, 新

的减肥类保健食品不断投入市场, 以某一类成分总量作为标志性功能成分的评判方法难以评估产品质量, 且存在生产厂家使用代替原料的风险。因此, 对特定功能成分进行有效测定, 对保健食品质量控制具有重要的意义。左旋肉碱、L-茶氨酸、吡啶甲酸铬、番泻苷 A、番泻苷 B、儿茶素、鼠尾草酸均具有减肥降脂功效作用, 在减肥类保健食品的应用亦越来越广。目前对这 7 种减肥功能化合物的测定方法有薄层色谱法^[4]、毛细管电泳法^[5]、紫外分光光谱法^[6]、液相色谱法^[7-8]、液相色谱质谱法^[9-10]等, 但尚未见对这 7 种化合物同时测定的文献报道, 此外建立高通量、多组分同时测定方法对检测大批量样品具有重要的实际意义。因此本

基金项目: 湖南省卫健委科研项目 (B20160073 和 C20190035)

作者简介: 陈东洋 (1983-), 男, 博士, 主管技师, 主要从事理化检验技术研究工作。

通信作者: 冯家力, E-mail: goodlucklkh@163.com。

研究通过优化前处理方法和色谱条件,建立了高效液相色谱法测定保健食品中 7 种减肥类化合物的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 Agilent 1200 液相色谱仪附有二极管阵列检测器与荧光检测器(Agilent 公司,美国);超声清洗仪(Elnma,德国);涡旋混匀器(VORTE-X,海门市其林贝尔仪器制造有限公司);十万分之一电子天平(BT,深圳市精耐仪器有限公司);高速离心机(TGL16,长沙英泰仪器有限公司);0.45 μm 混合滤膜购自中国 Dikma 公司。

L-茶氨酸(纯度:98.92%)、儿茶素(纯度:98.2%)均购自成都曼思特生物科技有限公司;左旋肉碱(纯度:98.9%)购自美国 Stanford chemicals 公司;吡啶甲酸铬(纯度:98%)购自上海源叶生物科技有限公司;番泻苷 A(纯度:96.5%)、番泻苷 B(纯度:95.6%)、鼠尾草酸(纯度:99.3%)购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,Merk 公司),实验用水均为经 Millipore 处理的一级水。

1.2 样品前处理 称取 2.0 g 均匀样品于 10 ml 离心管中,加 50%乙腈至 8 ml,超声提取 20 min,再补加 50%乙腈至 10 ml,涡旋混匀、8 000 rpm 离心 5 min,经 0.45 μm 滤膜过滤后进高效液相色谱仪分析。

1.3 色谱条件 色谱柱:C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流动相:A 为乙腈,B 为 10 mmol/L 磷酸二氢钾(0.1%磷酸);梯度程序:0~3 min,1.0% A,3~9 min,1.0%~40% A,9~15 min,40%~99% A,15~19 min,99% A,19~20 min,99%~1.0% A,20~25 min,1.0% A;流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl;检测波长:左旋肉碱、L-茶氨酸:210 nm;吡啶甲酸铬:270 nm;儿茶素 249 nm;鼠尾草酸:280 nm;番泻苷 A、番泻苷 B:268 nm。

1.4 标准溶液配制 精密称取左旋肉碱、L-茶氨酸、吡啶甲酸铬、儿茶素、番泻苷 A、番泻苷 B 和鼠尾草酸标准物质 10.0 mg 分别置于 10 ml 容量瓶中,用 50%乙腈溶解定容制备成 1.0 mg/ml 标准储备液。

临用前,用 50%乙腈稀释成混合标准系列,其中左旋肉碱、L-茶氨酸和鼠尾草酸浓度为 10.0、20.0、50.0、100.0 mg/L,吡啶甲酸铬、儿茶素浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 mg/L,番泻苷 A、番泻苷 B 浓度为 0.20、0.50、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L。按 1.3 色谱条件,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归。

2 结果

2.1 方法线性范围及检出限 在确定最佳测定条件下,左旋肉碱、L-茶氨酸、鼠尾草酸在 10.0~100.0 mg/L,儿茶素在 1.0~50.0 mg/L,番泻苷 A 在 0.50~10.0 mg/L,番泻苷 B 在 0.20~10.0 mg/L,吡啶甲酸铬在 2.0~50.0 mg/L 质量浓度与色谱峰面积有良好的线性关系,相关系数 $r \geq 0.9991$ 。按 3 倍信噪比获得仪器的检出限,左旋肉碱、L-茶氨酸、儿茶素、吡啶甲酸铬、番泻苷 A、番泻苷 B、鼠尾草酸的检出限分别为 1.0、0.6、0.1、0.4、0.05、0.02 和 1 mg/L,根据方法操作步骤,左旋肉碱、L-茶氨酸、儿茶素、吡啶甲酸铬、番泻苷 A、番泻苷 B、鼠尾草酸的检出限分别为 5、3、0.5、2、0.3、0.1 和 5 mg/kg,见表 1。

表 1 7 种功效成分标准曲线相关参数

| 名称 | 线性范围 (mg/L) | 回归方程 | 相关系数 r | 检出限 (mg/L) |
|-------|-------------|------------------------|--------|------------|
| 左旋肉碱 | 10.0~100.0 | $y = 0.9858x - 1.9806$ | 0.9992 | 1 |
| L-茶氨酸 | 10.0~100.0 | $y = 6.9099x - 2.0199$ | 0.9997 | 0.6 |
| 儿茶素 | 1.0~50.0 | $y = 7.4731x - 4.8276$ | 0.9996 | 0.1 |
| 吡啶甲酸铬 | 2.0~50.0 | $y = 55.346x + 42.618$ | 0.9991 | 0.4 |
| 番泻苷 A | 0.50~10.0 | $y = 63.055x - 1.9745$ | 0.9998 | 0.05 |
| 番泻苷 B | 0.20~10.0 | $y = 45.744x - 0.8418$ | 0.9999 | 0.02 |
| 鼠尾草酸 | 10.0~100.0 | $y = 9.1308x + 0.3673$ | 0.9991 | 1 |

2.2 方法回收率及精密度 分别在样品中添加三个浓度水平,平行测定 6 次。按 1.2 进行前处理并测定,计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。7 种功效成分回收率为 89.9%~108.0%,RSDs 为 1.2%~6.3%,结果表明建立的方法重复性好,回收率结果满意,见表 2。

表 2 方法的回收率和相对标准偏差(n=6)

| 待测物 | 本底值 (mg/kg) | 添加水平 (mg/kg) | 回收率 (%) | 相对标准偏差 (%) |
|-------|-------------|--------------|---------|------------|
| 左旋肉碱 | 103 | 50.0 | 98.8 | 3.5 |
| | | 100.0 | 101.0 | 3.2 |
| | | 200.0 | 106.0 | 2.7 |
| L-茶氨酸 | 48.7 | 25.0 | 108.0 | 2.5 |
| | | 50.0 | 99.9 | 3.9 |
| | | 100.0 | 103.0 | 3.5 |
| 儿茶素 | - | 5.0 | 89.9 | 1.8 |
| | | 10.0 | 97.2 | 1.2 |
| | | 20.0 | 99.5 | 3.5 |
| 吡啶甲酸铬 | 126 | 50.0 | 103.0 | 2.3 |
| | | 100.0 | 101.0 | 2.6 |
| | | 200.0 | 99.6 | 3.1 |
| 番泻苷 A | - | 2.0 | 92.5 | 2.9 |
| | | 4.0 | 97.5 | 3.3 |
| | | 8.0 | 98.1 | 4.6 |
| 番泻苷 B | - | 1.0 | 107.0 | 5.7 |
| | | 2.0 | 100.0 | 6.3 |
| | | 4.0 | 98.9 | 4.6 |
| 鼠尾草酸 | 21.4 | 10.0 | 98.2 | 2.3 |
| | | 20.0 | 101.0 | 3.6 |
| | | 40.0 | 99.2 | 1.3 |

2.3 实际样品检测 采用本方法对 12 份减肥类保健

食品样品进行检测,测得左旋肉碱含量为 63.2 ~ 146 mg/kg;其中 3 份样品分别检出 L-茶氨酸、吡啶甲酸铬和番泻苷 B,含量分别为 48.7、126 和 21.4 mg/kg,见图 1。

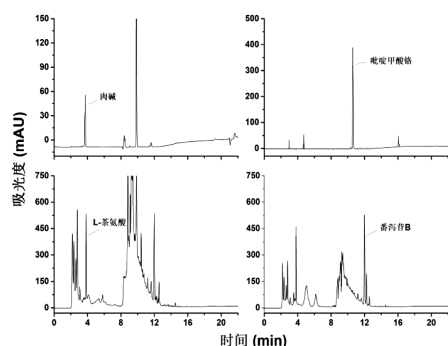
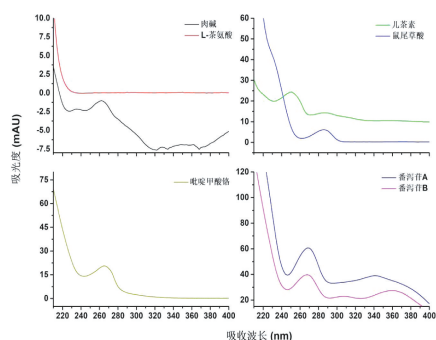


图 1 典型样品色谱图

3 讨论

3.1 流动相的优化 比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-磷酸二氢钾和乙腈-磷酸二氢钾(0.1%磷酸)5种流动相的分离效果,结果表明仅用甲醇或乙腈与水为流动相,7种待测物峰形不佳,且分离效果不好。为了改善峰形,加入磷酸二氢钾缓冲盐以改善分离效果。同时优化缓冲盐的浓度,选用 5、10、20 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液进行试验,随着缓冲盐浓度的增大,色谱峰峰形随之改善,但盐浓度过高易造成仪器的腐蚀并清洗困难。因此选用 10 mmol/L 的磷酸二氢钾(0.1%磷酸)缓冲溶液为流动相。

3.2 吸收波长的选择 在确定的最佳分离条件下,对 7 种化合物进行光谱扫描获得最大吸收波长以减少干扰并提高灵敏度。光谱表明左旋肉碱、L-茶氨酸在 210 nm 有最大吸收,番泻苷 A、番泻苷 B 最大吸收波长为 268 nm,吡啶甲酸铬最大吸收波长为 270 nm,儿茶素最大吸收波长为 249 nm,鼠尾草酸为 280 nm,见图 2。优化条件下标准色谱图,见图 3。



注:1-左旋肉碱;2-L-茶氨酸;3-吡啶甲酸铬;4-儿茶素;5-番泻苷 A;6-番泻苷 B;7-鼠尾草酸。

图 2 7 种待测物光谱图

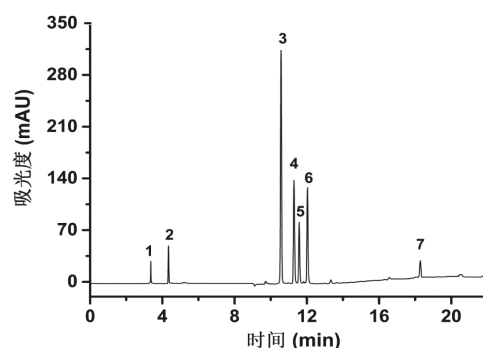


图 3 7 种待测物标准色谱图

4 结论

建立了保健食品中左旋肉碱、L-茶氨酸、吡啶甲酸铬、儿茶素、番泻苷 A、番泻苷 B、鼠尾草酸 7 种功效成分同时测定的高效液相色谱方法。方法采用 50% 乙腈超声提取前处理方式,简单快捷。方法检出限为 0.1 ~ 5 mg/kg,7 种功效成分回收率为 89.9% ~ 108.0%, $RSD \leq 6.3\%$ 。该方法快速、准确、灵敏,适用于减肥类保健食品中左旋肉碱、L-茶氨酸、吡啶甲酸铬、儿茶素、番泻苷 A、番泻苷 B 和鼠尾草酸 7 种功效成分的同时测定。

参考文献

- [1] Ki NY, Hur J, Kim BH, et al. Rapid screening of sulfonamides in dietary supplements based on extracted common ion chromatogram and neutral loss scan by LC-Q/TOF-mass spectrometry [J]. J Food Drug Anal, 2019, 27(1): 164-174.
- [2] 范翔,丁力,潘振球,等. 正交设计优化总蒽醌测定方法[J]. 中国卫生检验杂志,2011, 21(4): 860-862.
- [3] 李剑,罗波,李谭瑶,等. 葛根软胶囊中总黄酮含量测定提取条件优选[J]. 实用预防医学,2016, 23(8): 996-998.
- [4] 陆雪丽,潘晓鹏,邓萌萌,等. 鸡血藤提取物的 TLC 鉴别及儿茶素和表儿茶素的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2018, 24(16): 63-67.
- [5] 邹海民,周琛,孙成均,等. 市售保健品中 7 种醒酒护肝功效成分的毛细管电泳测定[J]. 高等学校化学学报,2016, 37(7): 1276-1281.
- [6] 贺年. 用紫外分光光度法测定当归藤中儿茶素含量的效果研究[J]. 当代医药论丛,2014, 12(7): 31-32.
- [7] 陈毓芳,林海丹,吴宏中,等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中 11 种功效成分[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 244-249.
- [8] 刘春霖,刁飞燕,谢强胜,等. 高效液相色谱法测定减肥类保健食品中番泻苷 A、番泻苷 B 的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(9): 3347-3352.
- [9] 唐吉旺,袁列江,肖泳,等. 高效液相亲水作用色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿配方乳粉中胆碱和左旋肉碱[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(6): 621-626.
- [10] 刘晓茂,杨志伟,崔岩岩,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定芦笋保健食品中 L-茶氨酸和 γ -氨基丁酸[J]. 食品科技, 2018, 43(3): 277-281.

收稿日期:2019-12-26