

超高效液相色谱法同时测定中草药保健食品中 7 种功效成分

杨珍, 胡骢, 汪琼

长沙市疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410000

摘要: **目的** 建立灵敏、简便的中草药保健食品中 7 种功效成分(丹参酮ⅡA、芍药苷、栀子苷、丹皮酚、芦丁、淫羊藿苷和木兰花碱)同时测定的超高效液相色谱方法。 **方法** 样品用 60% 甲醇超声提取, 采用 C18 色谱柱分离, 以甲醇—0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 紫外波长检测, 外标法定量。 **结果** 丹参酮ⅡA、芍药苷、栀子苷、芦丁、木兰花碱在 0.50~50.0 mg/L, 丹皮酚和淫羊藿苷在 0.10~25.0 mg/L 范围内有良好的线性关系, 相关系数 $r \geq 0.9992$ 。方法检出限为 0.1~1 mg/kg, 回收率 88.9%~105.0%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs) 为 0.4%~7.7%。 **结论** 该方法操作简便, 灵敏、快捷, 适合中草药保健食品中 7 种功效成分的同时测定。

关键词: 保健食品; 中草药; 功效成分; 超高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2023)01-0066-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.01.016

Simultaneous determination of seven functional components in health-care food from Chinese herbal medicine by ultrahigh performance liquid chromatography

YANG Zhen, HU Cong, WANG Qiong

Changsha Municipal Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410000, China

Corresponding author: HU Cong, E-mail: fox-winds@163.com

Abstract: **Objective** To establish a sensitive and convenient analytical method based on ultrahigh performance liquid chromatography (UPLC) for simultaneous determination of seven functional components (including tanshinone IIA, paeoniflorin, jasminoside, paeonol, rutin, icariin and magnoflorine) in health-care food from Chinese herbal medicine. **Methods** The analytes were extracted by ultrasound with 60% methanol and separated by a C18 column. The mobile phase was methanol-0.1% formic acid aqueous solution with gradient elution. Uv-wavelength detection was performed, and external standard method was used for the quantitative analysis. **Results** Tanshinone IIA, paeoniflorin, jasminoside, rutin and magnoflorine showed good linearity when the concentration ranged from 0.50 mg/L-50.0 mg/L, while paeonol and icariin displayed good linearity over the concentration range of 0.10 mg/L-25.0 mg/L, with the correlation coefficients $r \geq 0.9992$. The method detection limits for the seven compounds were 0.1 mg/kg-1 mg/kg. The recoveries ranged from 88.9% to 105.0%. The relative standard deviations (RSDs) were in the range of 0.4%-7.7%. **Conclusion** The proposed method is simple, sensitive and rapid, and it is suitable for simultaneous determination of the seven functional components in health-care food from Chinese herbal medicine.

Keywords: health-care food; Chinese herbal medicine; functional composition; ultrahigh performance liquid chromatography

保健食品是具有特定保健功能或以补充维生素、矿物质等为目的,适用于特定人群食用的食品^[1]。基于我国中草药使用的历史,将中草药合理应用到保健食品一直是保健食品领域发展趋势。根据调查数据显示,中药类保健食品已占据我国保健食品市场额的一半以上,随着我国老年人口增多,老龄化进程加快,以中草药为原料或添加中草药提取物的保健食品获得了越来越多消费者的青睐^[2]。对此类保健食品进行有

效监督,以满足安全、有效、质量可靠的目的,对保护消费者身体健康,推动中草药保健品健康发展具有重要的现实意义。

在功效上,增强免疫力、辅助降血压、降血脂是中草药保健食品的重要功能。芦丁是广泛存在于植物中的黄酮醇配糖体,可用于使用抗氧化剂和营养增强剂,具有维持血管抵抗力、降低其通透性、减少脆性等作用,可用于防治脑出血、高血压、视网膜出血等疾病^[3]。木兰花碱在保护心血管系统,调节免疫功能和抗氧化等方面具有良好疗效。从栀子干燥成熟果实提取的栀子苷也有抗动脉粥样硬化或抗血栓的作用^[4]。

作者简介: 杨珍(1983-),男,研究生,主管检验技师,主要从事理化检验工作。

通信作者: 胡骢, E-mail: fox-winds@163.com。

淫羊藿苷、芍药苷、丹皮酚、丹参酮 II A 均有改善心血管功能,降血压的效果^[5-7]。这些中草药提取物已在保健食品获得广泛应用。

目前对这 7 种功效成分的测定方法主要有电化学法^[8]、荧光光度法^[9]、紫外分光光谱法^[10]、液相色谱法^[11-12]、液相色谱质谱法^[13-14]等,液相色谱法用来测定保健食品中多组分的报道近年有所增加^[15-16],但对保健食品中丹参酮 II A、芍药苷、栀子苷、丹皮酚、芦丁、淫羊藿苷和木兰花碱的多组分多类别同时测定的文献报道较少,建立高通量、能实现同时测定多种组分的检测方法对大批量样品的监测具有重要的现实意义。因此本研究通过优化前处理方法和色谱条件,建立了中草药保健食品中 7 种功效成分同时测定的超高效液相色谱方法,方法简便、灵敏,能为中草药类保健食品的日常检测和质量控制提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 UPLC-H-Class 超高效液相色谱仪附有二极管阵列检测器(Waters 公司,美国);超声清洗仪(Elnma,德国);涡旋混匀器(VorteX-Genie 2,美国 Scientific Industries 公司);十万分之一电子天平(BT125D,德国);高速离心机(TGL16,长沙英泰仪器有限公司)。标准品芦丁、栀子苷、淫羊藿苷、丹皮酚、丹参酮 II A 购自中国食品药品检定研究院,木兰花碱、芍药苷购自国药集团化学试剂有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯,Merck 公司),实验用水为经 Millipore 处理的一级水。

1.2 样品前处理 ①固体样品:将样品粉碎均匀,称取 5.0 g 均匀样品于 50 ml 离心管中,加 60% 甲醇至 20 ml,超声提取 15 min,再补加 60% 甲醇至 25 ml,涡旋混匀,8 000 rpm 离心 5 min,经 0.45 μ m 滤膜过滤后进行 UPLC 分析;②液体样品:将样品摇匀,取 2.0 g 样品于 10 ml 离心管中,加 60% 甲醇稀释至刻度,超声提取 10 min,涡旋混匀,经 0.45 μ m 滤膜过滤后进行 UPLC 分析。

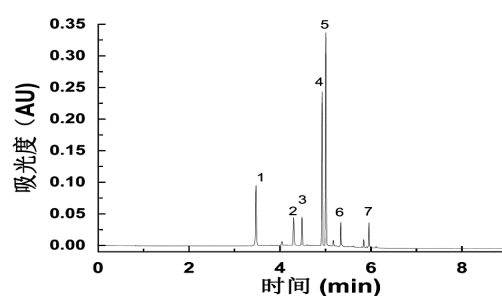
1.3 色谱条件 色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱(100 mm \times 2.1 mm \times 1.7 mm);柱温:30 $^{\circ}$ C;流动相及梯度:A 为甲醇,B 为 0.1% 甲酸;0~0.5 min,5.0% A,0.5~4.0 min,5.0%~95% A,5.0~7.0 min,95% A,7.0~7.1 min,95%~5.0% A,7.1~9.0 min,5.0% A;流速:0.4 ml/min;进样量:10 μ l;检测波长:芍药苷、木兰花碱为 230 nm,栀子苷为 240 nm,芦丁为 356 nm,丹参酮 II A、淫羊藿苷和丹皮酚为 270 nm。

1.4 标准溶液配制 分别称取木兰花碱、栀子苷、芍

药苷、芦丁、淫羊藿苷、丹皮酚、丹参酮 II A 10 mg 于 10 ml 容量瓶中,用 60% 甲醇溶解定容制备成 1.0 mg/ml 标准储备液。临用前,用 60% 甲醇稀释成混合标准系列,其中丹参酮 II A、芍药苷、栀子苷、芦丁、木兰花碱为 0.50、1.0、5.0、10.0、50.0 mg/L;丹皮酚和淫羊藿苷浓度为 0.10、0.50、1.0、5.0、10.0、25.0 mg/L。按 1.3 色谱条件进行测定,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 色谱条件的优化 实验表明采用甲醇与水为流动相,在等度条件下,木兰花碱、丹皮酚、丹参酮 II A、芦丁、淫羊藿苷出峰形良好,但是栀子苷和芍药苷出峰时间接近,无法分离,因此采用梯度洗脱方式。栀子苷和芍药苷性质相近,应选择合适的梯度条件改变化合物的分配系数,让其之间有更好的分离度。此外,在流动相中加入甲酸,能显著改善峰形,提高色谱峰的对称性、尖锐程度。在最佳分离条件下,对 7 种待测物在 200~600 nm 全波长范围扫描,获得最佳吸收波长以降低干扰并提高方法灵敏度。光谱表明芍药苷、木兰花碱在 230 nm 有最大吸收,栀子苷最大吸收波长为 240 nm,芦丁最大吸收波长为 356 nm,丹参酮 II A 最大吸收波长为 270 nm,淫羊藿苷、丹皮酚最大吸收波长为 273 nm,图 1 为最佳色谱条件下标准色谱图。



注: 1-木兰花碱;2-栀子苷;3-芍药苷;4-芦丁;5-淫羊藿苷;6-丹皮酚;7-丹参酮 II A。

图 1 7 种待测物标准色谱图

2.2 前处理方法的优化 根据 7 种待测物理化性质,栀子苷易溶于水,丹参酮 II A 微溶于水,丹皮酚溶于热水,在冷水溶解性差;但七种化合物均能溶于甲醇;因此直接采用 60% 甲醇作为提取液。采用超声提取方式,考察不同超声时间对回收率的影响,结果表明当超声时间达到 15 min 后能获得满意的回收率,因此选用 60% 甲醇超声 15 min 的前处理方法。

2.3 方法性能

2.3.1 方法线性范围及检出限 在确定最佳测定条件下,丹参酮 II A、芍药苷、栀子苷、芦丁、木兰花碱在

0.50 ~ 50.0 mg/L, 丹皮酚和淫羊藿苷在 0.10 ~ 25.0 mg/L 质量浓度与色谱峰面积有良好的线性关系, 相关系数 $r \geq 0.9992$ 。按 3 倍信噪比获得仪器的检出限, 丹参酮 IIA 和芍药苷检出限为 0.2 mg/L, 栀子苷、芦丁和木兰花碱检出限为 0.1 mg/L, 而丹皮酚和淫羊藿苷的检出限分别为 0.03 mg/L 和 0.05 mg/L。根据方法操作步骤, 丹参酮 IIA、芍药苷、栀子苷、丹皮酚、淫羊藿苷、芦丁、木兰花碱的检出限分别为 1、1、0.3、0.1、0.15、0.3、0.3 mg/kg, 见表 1。

表 1 7 种待测物标准曲线和检出限

名称	线性范围 (mg/L)	回归方程	相关系数 r	检出限 (mg/L)
丹参酮 IIA	0.50~50.0	$y = 17\ 408x - 1\ 234$	0.9999	0.2
芍药苷	0.50~50.0	$y = 22\ 160x - 7\ 036$	0.9992	0.2
栀子苷	0.50~50.0	$y = 30\ 990x - 6\ 229$	0.9999	0.1
丹皮酚	0.10~25.0	$y = 77\ 769x - 5\ 687$	0.9994	0.03
淫羊藿苷	0.10~25.0	$y = 71\ 663x - 3\ 203$	0.9998	0.05
芦丁	0.50~50.0	$y = 30\ 248x - 5\ 480$	0.9994	0.1
木兰花碱	0.50~50.0	$y = 36\ 011x - 3\ 065$	0.9999	0.1

2.3.2 方法回收率及精密度 在样品中添加三个浓度水平以考察方法回收率, 对样品平行测定 6 次, 计算回收率和相对标准偏差 (relative standard deviations, RSDs)。7 种待测物回收率为 88.9% ~ 105.0%, RSDs 为 0.4% ~ 7.7%, 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/g)	添加水平 (mg/g)	回收率 (%)	RSD (%)
丹参酮 II A	0.84	0.40	88.9	1.6
		0.80	92.6	0.7
		1.60	102.0	1.2
芍药苷	0.72	0.35	98.1	0.4
		0.70	97.6	3.7
		1.40	98.9	4.6
栀子苷	0.78	0.40	96.8	5.4
		0.80	99.4	2.8
		1.60	105.0	3.1
丹皮酚	1.26	0.60	98.7	3.7
		1.20	99.9	3.5
		2.40	99.3	4.9
淫羊藿苷	1.47	0.70	101.0	7.7
		1.40	96.2	5.2
		2.80	96.1	2.1
芦丁	-	0.0020	101.0	3.9
		0.0040	96.8	4.6
		0.0080	104.0	3.7
木兰花碱	-	0.0020	99.1	5.5
		0.0040	95.3	3.4
		0.0080	98.3	5.1

2.3.3 实际样品检测 采用本方法对采集的保健食品样品进行检测, 测定丹参酮 II A、芍药苷、栀子苷、丹皮酚和淫羊藿苷含量分别为 0.84、0.72、0.78、1.26 和

1.47 mg/g, 符合产品标识的浓度, 图 2 为典型样品色谱图。

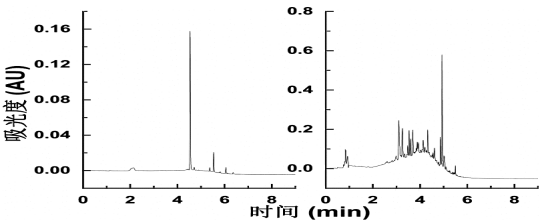


图 2 典型样品色谱图

3 结 论

建立了超高效液相色谱法同时测定中草药保健食品中丹参酮 II A、芍药苷、栀子苷、丹皮酚、芦丁、淫羊藿苷和木兰花碱 7 种功效成分。样品通过 60% 甲醇超声提取后直接上机测定, 简单快捷。7 种化合物方法检出限为 0.1 ~ 1 mg/kg, 回收率为 88.9% ~ 105.0%, RSDs 为 0.4% ~ 7.7%。该方法灵敏、简便, 可为中草药保健食品中丹参酮 II A、芍药苷、栀子苷、丹皮酚、芦丁、淫羊藿苷和木兰花碱的日常检测提供技术参考。

参考文献

[1] 陈东洋, 张昊, 冯家力, 等. 保健食品中违禁药物检验技术研究进展[J]. 色谱, 2020, 38(8): 880-890.

[2] 焦奥南, 王程程, 莫颖宁. 基于 SWOT-PEST 分析的我国中药类保健食品市场发展研究[J]. 食品与药品, 2021, 23(5): 438-444.

[3] 金芳多. 黄酮类化合物对肝细胞氧化损伤的保护作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(3): 222-225.

[4] 卜妍红, 陆婷, 吴虹, 等. 栀子化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(6): 89-93.

[5] 陈媛媛, 李敏, 崔树娜, 等. 基于网络药理学的淫羊藿调节免疫耐受作用机制研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2022, 43(2): 69-77.

[6] 刘玲, 蒋婷婷, 杨宇龙. 基于 CD40/NF- κ B 通路丹皮酚调控 miR-145 抑制小鼠动脉粥样硬化泡沫细胞炎症反应[J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(2): 69-74.

[7] 武爽, 王小龙, 徐品, 等. 丹参酮 II A 改善心肌梗死大鼠心脏功能、心肌细胞自噬及 Notch 通路的实验研究[J]. 中国处方药, 2022, 20(5): 18-20.

[8] 李玉, 王玲, 王兰, 等. 丹皮酚在石墨烯修饰电极上的电化学行为及应用研究[J]. 化学研究与应用, 2021, 33(9): 1673-1678.

[9] 曹津津, 孙启瑞, 李文红, 等. 木兰花碱的荧光性质及其在中药分析中的应用研究[J]. 分析化学, 2021, 47(6): 950-956.

[10] 雷燕妮, 张小斌. 商洛丹参和中江丹参中丹参酮 II A 的含量比较[J]. 陕西农业科学, 2017, 63(9): 22-24.

[11] 马春娟, 赵云鹤, 王月洁, 等. HPLC 双波长切换法同时测定加味益母草膏中 5 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(6): 1081-1086.

[12] 原月明, 乔宇航, 郭鑫, 等. 高效液相色谱法测定辽宁不同产地鲜淫羊藿油炙前后木兰花碱的含量[J]. 中南药学, 2021, 19(5): 964-966.

[13] 范帅帅, 高乐, 田伟, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定养胃汤中 26 个成分含量[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(11): 1875-1884.

[14] 林敏. HPLC-MS/MS 法同时测定丹杞逍遥丸中六个成分的含量[J]. 海峡药学, 2021, 33(12): 74-78.

[15] 陈东洋, 张昊, 冯家力, 等. 高效液相色谱法测定减肥类保健食品中 7 种功效成分[J]. 实用预防医学, 2020, 27(12): 1457-1459.

[16] 袁鹏, 李蕊, 杨瑞春. 液相色谱-蒸发光散射检测法测定保健食品中 8 种糖的含量[J]. 实用预防医学, 2020, 27(9): 1092-1095.