

## 实验技术与方法

## HPLC法测定保健食品中蒽醌类成分的含量

肖晶<sup>1</sup> 杨杰<sup>1</sup> 高尚伟<sup>2</sup> 杨大进<sup>1</sup> 姚令文<sup>3</sup> 屈秋园<sup>1</sup>(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021; 2. 辽宁省人民医院,辽宁 沈阳 110013;  
3. 中国药品生物制品检定所,北京 100005)

**摘要:**目的 建立测定保健食品中大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的高效液相色谱法。方法 使用 Symmetry@C<sub>18</sub> (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱,以甲醇+0.1%磷酸水溶液(80+20)为流动相,检测波长为 254 nm。结果 大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚在 0.014~0.280, 0.014~0.280, 0.0126~0.0252, 0.0156~0.104, 0.025~0.500 和 0.025~0.500 μg/ml 浓度范围内具有良好线性关系;平均加标回收率分别为 91.5%、90.2%、85.3%、105.3%、87.7% 和 102.1%;相对标准偏差分别为 6.21%、5.82%、7.11%、8.50%、7.35% 和 9.42%。结论 该方法简便、准确,有良好的重现性,技术参数指标符合食品理化分析的要求,可用于蒽醌类保健食品的质量控制。

**关键词:**大黄酸;芦荟大黄素;1,8-二羟基蒽醌;大黄素;大黄酚;大黄素甲醚;营养保健食品;色谱法;液相

**中图分类号:** O657.72; TQ612.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2010)01-0027-04

## Determination of Rhubarb Anthraquinones in Health Food with HPLC

XIAO Jing, YANG Jie, GAO Shang-wei, YANG Da-jin, YAO Ling-wen, QU Qiu-yuan  
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To establish a HPLC method for the determination of rhein, aloe-emodin, 1, 8-dihydroxyanthraquinone, emodin, chrysophanol and physcion in health food. **Method** A HPLC with Symmetry@C<sub>18</sub> column (250mm ×4.6mm, 5 μm), a mixture of CH<sub>3</sub>OH + 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (80+20) as mobile phase and a UV detector at 254 nm was used. **Results** The linearity for rhein, aloe-emodin, 1, 8-dihydroxyanthraquinone, emodin, chrysophanol, physcion was good in the ranges of 0.014-0.280, 0.014-0.280, 0.0126-0.0252, 0.0156-0.104, 0.025-0.500 and 0.025-0.500 μg/ml respectively; the recovery of those was 91.5%, 90.2%, 85.3%, 105.3%, 87.7% and 102.1% respectively; and the RSD of those was 6.21%, 5.82%, 7.11%, 8.50%, 7.35% and 9.42% respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, and could be used for the quality control of rhubarb anthraquinones in health food.

**Key words:** Rhein; Aloe-Emodin; 1, 8-Dihydroxyanthraquinone; Emodin; Chrysophanol; Physcion; Dietary Supplements; Chromatography, Liquid

蒽醌类物质种类很多,以部分游离、大部分与葡萄糖结合成苷的形式存在<sup>[1,2]</sup>。文献中关于蒽醌类化合物的检测研究有许多方法,如分光光度法<sup>[3,4]</sup>、薄层扫描法<sup>[5,6]</sup>等,使用最广泛的检测技术是色谱法,主要是高效液相色谱法<sup>[2]</sup>。这些方法大多用于药材及中成药<sup>[7-11]</sup>的测定,目前测定保健食品中蒽醌类成分含量的方法比较少,需要建立一个简便、准确、科学的保健食品中蒽醌类成分含量的检测方法。

本文主要运用酸水解、液液萃取等前处理方法,结合 HPLC 紫外检测手段,建立检测保健食品中大

黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚等 6 种蒽醌类化合物(结构式见图 1)含量的方法,为制定国家标准奠定理论基础,以保障食品安全,保护人们身体健康。

## 1 材料与方法

## 1.1 试剂

大黄酸(纯度 100%)、芦荟大黄素(纯度 100%)、1,8-二羟基蒽醌(纯度 100%)、大黄素(纯度 100%)、大黄酚(纯度 100%)和大黄素甲醚(纯度 100%)均购自中国药品生物制品检定所。甲醇分析纯、色谱纯均购自北京市化学试剂公司,甲醇分析纯用于样品前处理过程,甲醇色谱纯用于液相色谱分析过程。磷酸二氢钠购自北京市化学试剂公

收稿日期:2009-06-12

作者简介:肖晶 女 副研究员 研究方向为食品检验

E-mail: xiaocf@sina.com

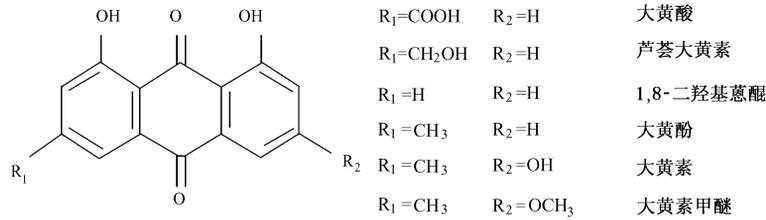


图 1 6种蒽醌类化合物结构式

司。水为实验室一级用水,电导率(25℃)为 0.01 mS/m。

精密称取大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品 10 mg,加流动相稀释至 10 ml,制成每 1 ml 含 1.0 mg 大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的对照品贮备溶液。

1.2 仪器与设备

分析天平(Sartorius公司),超声波清洗器(博励行公司),液相色谱仪(Waters 2695),超纯水仪(美国,PL5242)。

1.3 方法

1.3.1 试样溶液的制备 取样品适量,置 50 ml 三角瓶中,准确加入 10 ml 水和 2 ml 盐酸水解,沸水回流 30 min,冷却。过滤,取滤液用乙醚萃取 3 次,每

次 15 ml,合并乙醚层,室温挥干,残留物用甲醇溶解并定容至 5 ml,过 0.45 μm 滤膜,待上液相色谱仪。

1.3.2 高效液相色谱条件 色谱柱: Symmetry@C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇 + 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液(80 + 20),用 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调节 pH 3.5;流速: 1.0 ml/min;检测波长: 270 nm;柱温: 室温 25℃。

2 结果

2.1 线性范围

精密吸取上述对照品溶液,照按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积值为纵坐标,含量为横坐标绘制标准曲线并进行回归计算,6种蒽醌类成分的线性回归方程见表 1。

表 1 6种蒽醌类成分的线性回归方程

成分	回归方程	线性范围(μg/ml)
大黄酸	$y = 4.40 \times 10^6 x - 4.40 \times 10^4 (r = 0.9999)$	0.014 ~ 0.280
芦荟大黄素	$y = 5.28 \times 10^6 x - 5.75 \times 10^4 (r = 0.9999)$	0.014 ~ 0.280
1,8-二羟基蒽醌	$y = 5.24 \times 10^6 x - 4.18 \times 10^4 (r = 0.9998)$	0.0126 ~ 0.0252
大黄素	$y = 4.02 \times 10^6 x - 1.98 \times 10^4 (r = 0.9999)$	0.0156 ~ 0.104
大黄酚	$y = 5.81 \times 10^6 x - 1.14 \times 10^5 (r = 0.9991)$	0.025 ~ 0.500
大黄素甲醚	$y = 3.27 \times 10^6 x - 6.18 \times 10^5 (r = 0.9998)$	0.025 ~ 0.500

2.2 准确度

采集该类保健食品,进行大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的加标试验。各加入高、中、低 3 个水平的标准溶液,试验结果见表 2,大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的平均加标回收率分别为 91.5%、90.2%、85.3%、105.3%、87.7% 和 102.1%,相对标准偏差分别为 6.21%、5.82%、7.11%、8.50%、7.35% 和 9.42%。图 2 分别为混合标准液相色谱图、空白样品液相色谱图和样品加标液相色谱图。

2.3 精密度

吸取上述对照品溶液(浓度为 2.0 μg/ml) 10 μl,连续进样 5 次,按上述色谱条件测定峰面积,测得大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 RSD 分别为 0.74%、0.67%、0.83%、0.73%、0.68% 和 1.28% (n = 5)。仪器精

密度满足要求。

2.4 重现性试验

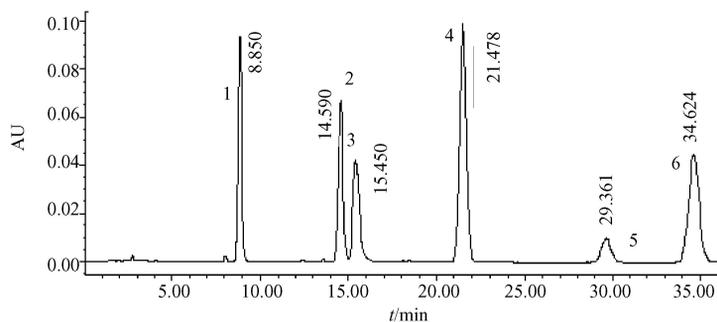
取同一样品,按“1.3 方法”项下方法制备试样溶液,按上述色谱条件测定大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量。结果,对应的 RSD 分别为 1.28%、1.30%、1.59%、1.69%、1.85% 和 1.17% (n = 5),表明方法重现性良好。

2.5 稳定性试验

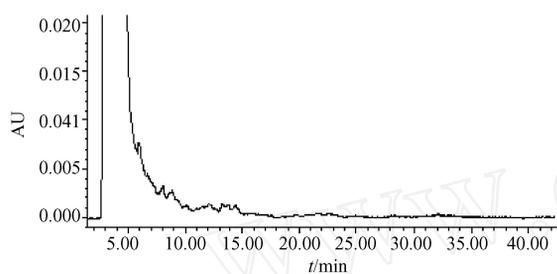
吸取同一试样溶液,放置 4、8、12、24 h 测定大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量,RSD 分别为 1.78%、1.61%、1.77%、1.38%、1.38% 和 1.66% (n = 5),表明试样溶液在 24 h 内稳定。

2.6 试样含量测定

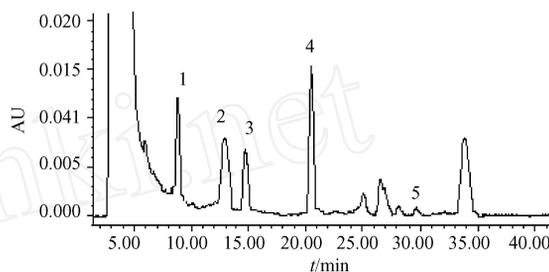
取保健食品样品按上述方法(1.3 方法)制备、测定并计算含量,测定结果见表 2。



混合标准液相色谱图



空白样品液相色谱图



样品加标液相色谱图

注: 1: 大黄酸; 2: 芦荟大黄素; 3: 1,8-二羟基蒽醌; 4: 大黄素; 5: 大黄酚; 6: 大黄素甲醚。

图 2 混合标准、空白样品和样品加标液相色谱图

表 2 不同样品测定结果 (g/100 g)

样品	1	2	3
大黄酸	0.0202	0.102	0.0548
芦荟大黄素	0.0156	0.0530	0.0195
1,8-二羟基蒽醌	0.128	0.0991	0.105
大黄素	0.0251	0.118	0.0288
大黄酚	0.0280	0.0211	0.0142
大黄素甲醚	0.00580	0.0108	0.0101

### 3 讨论

#### 3.1 样品前处理条件的优化

蒽醌以游离型和结合型 2 种形式存在,用高效液相色谱法进行测定时,主要是对游离蒽醌进行测定,因而应将结合型苷水解成游离型蒽醌。本文采用酸水解、有机溶剂萃取的方法对样品进行前处理,测定样品水解后的蒽醌总量作为质量控制指标,以便更为真实地反映样品中总蒽醌的含量。

结合型蒽醌需经水解后测定,由于盐酸挥发性较好,易除去,故选取盐酸作为水解酸。酸的浓度和水解时间直接影响水解是否完全,酸用量分别考察加入 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml 盐酸时的水解效果,结果表明,采用加入水 10 ml 和盐酸 2 ml,水解提取较完全。水解时间分别考察 20、30、60 min 的水解效果,结果表明,采用沸水浴水解 30 min,水解完全。

萃取溶剂的选择,样品酸水解成蒽醌苷元,极性较小,分别采用三氯甲烷、乙醚萃取。结果表明,采用以三氯甲烷、乙醚萃取均较完全。由于三氯甲烷毒性较大,选择乙醚作为萃取溶剂。

#### 3.2 波长的选择

当选用波长 225、245 nm 作紫外检测波长时,样品液相色谱峰杂质较多,影响测定结果。因此选用波长 270 nm 为紫外检测波长。大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的紫外光谱见图 3。

#### 3.3 流动相的选择

目前采用液相色谱方法对大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚分析时,基本采用反相色谱,流动相以甲醇+水、乙腈+水体系为主,用磷酸二氢钠、磷酸和醋酸调节 pH 值。本实验采用 Symmetry@C<sub>18</sub> (5 μm, 250 mm × 4.6 mm) 色谱柱分离,分别考察不同比例甲醇+0.2 mol/L 磷酸二氢钠作为流动相洗脱的效果。

当以甲醇+0.2 mol/L 磷酸二氢钠 (7+3) 作为流动相时,由于保留时间较短,杂质与目标化合物分离不理想,造成测定结果的偏差;当以甲醇+0.2 mol/L 磷酸二氢钠 (8+2) 作为流动相时,分离效果较好,保留时间延长,但检测周期变长,浪费时间及试剂。当以甲醇+0.2 mol/L 磷酸二氢钠 (8+2) 且 pH 调节到 3 时,作为流动相,分离效果较为理想。

本文建立了保健食品中大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 HPLC 测定方法。该方法具有较高的灵敏度和选择性,结果准确可靠、重现性好。

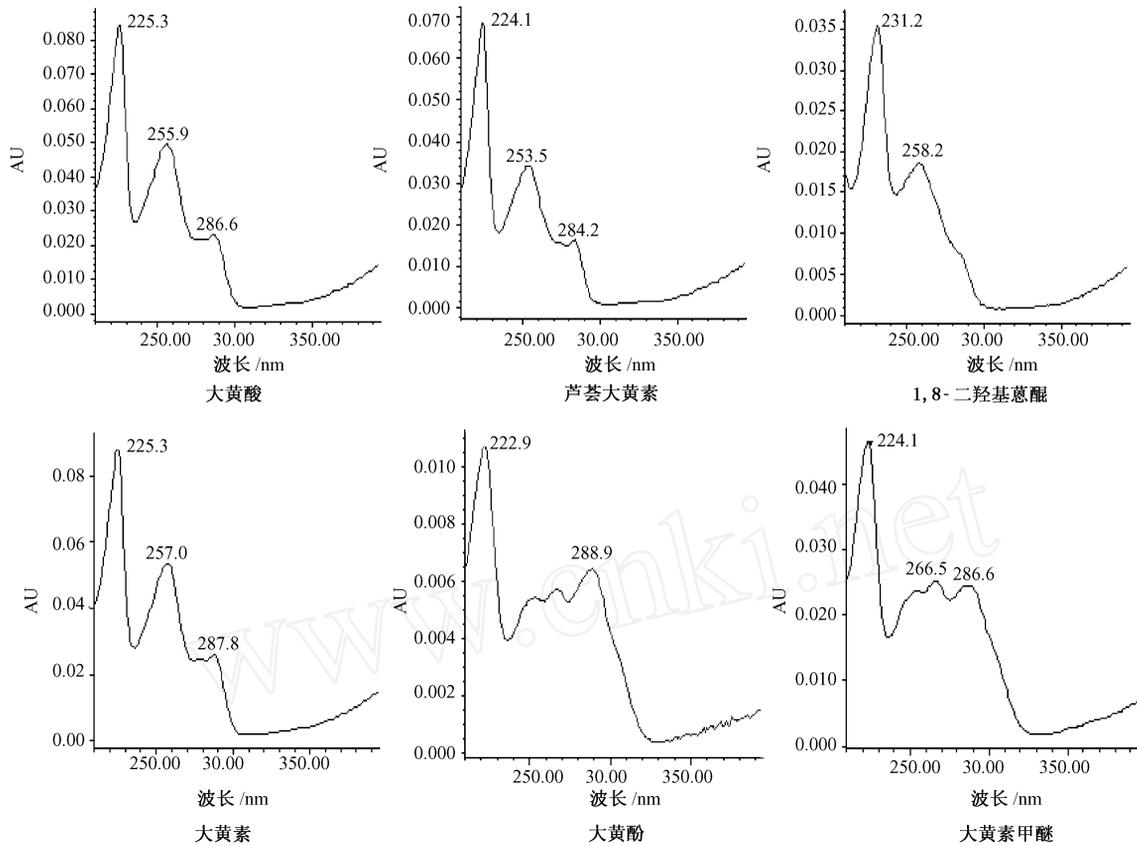


图 3 大黄酸、芦荟大黄素、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的紫外光谱图

参考文献

[1] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 228.

[2] 温枫. 大黄药理作用及临床应用 [J]. 山西中医, 2000, 6 (3): 53-54.

[3] 黎海彬, 方昆阳, 李续娥, 等. 中药决明子蒽醌类成分含量测定的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28 (7): 427-429.

[4] 魏玉辉, 武新安, 陈岚, 等. 大黄蒽醌类成分含量测定方法实验研究 [J]. 兰州大学学报 (医学版), 2005, 31 (1): 13-15.

[5] 王新春, 胡志林, 袁勇. 黄连复方合剂的质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13 (10): 604-605.

[6] 白研, 黄丽玫, 毋福海, 等. 德庆首乌中蒽醌类成分的含量测定 [J]. 广东药学院学报, 2001, 17 (1): 40-41.

[7] 刘颖, 韩曼雪, 张小茜. HPLC测定新清宁片中大黄蒽醌类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (22): 1899-1901.

[8] 李敏, 李丽霞, 刘渝, 等. HPLC法测定大黄配方颗粒中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19 (5): 32-34.

[9] 温昌泓, 黄静, 林开忠. HPLC法测定解毒降脂胶囊中大黄素的含量 [J]. 贵阳中医学院学报, 2008, 30 (3): 71-72.

[10] 刘三康, 钱广生, 李章万. 反相高效液相色谱法测定首乌及其4种中成药中大黄素的含量 [J]. 药物分析杂志, 1998, 18 (6): 1.

[11] 谢岱, 卢全德, 余南才. 高效液相色谱法测定复方伸筋片中大黄素的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28 (19): 1725-1726.

请示批复

卫生部办公厅关于饼店行业申办生产经营许可意见的复函

卫办监督函 [2009]1048号

中国焙烤食品糖制品工业协会:

你协会《关于饼店业营业执照无法正常申办的情况反映》收悉。经研究并征求有关部门意见, 现答复如下:

根据《食品安全法》第二十九条的规定, 饼店行业中如果属于在其生产场所销售其生产食品的, 应当按照有关要求取得食品生产许可, 不需要取得食品流通许可; 如果属于食品加工小作坊的, 应由省级人大制定地方性法规, 规定其是否实行许可管理以及相应监管部门。

特此复函。

二 九年十一月三十日