

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.12.005

高效液相色谱法测定保健食品中葛根素含量

苏思尹, 郭菊玲

(云南省玉溪市食品药品监督管理局, 云南 玉溪 653100)

摘要:目的 建立测定保健食品中葛根素含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Lichrospher C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水(25:75, V/V)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40 ℃, 进样量为 10 μL, 检测波长为 250 nm。结果 葛根素质量浓度在 4.803 8~960.768 0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, $r=1.000\ 0$ ($n=7$); 平均加样回收率为 105.71%, RSD 为 1.99% ($n=9$)。结论 该方法操作简便, 结果准确可靠, 为测定保健食品中葛根素的含量提供了参考。

关键词: 高效液相色谱法; 保健食品; 葛根素; 含量测定

中图分类号: R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)12-0016-03

Content Determination of Puerarin in Health-Care Products by HPLC

Su Siyin, Guo Juling

(Yuxi Institute for Food and Drug Control, Yuxi, Yunnan, China 653100)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of puerarin in health-care products. **Methods** The Agilent Lichrospher C₁₈ column(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with methanol-water(25:75, V/V) as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 40 ℃, the sample size was 10 μL, and the detection wavelength was 250 nm. **Results** The puerarin showed good linearity in the range of 4.803 8~960.768 0 μg/mL, $r=1.000\ 0$ ($n=7$), the average recovery rate was 105.71%, RSD was 1.99% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, which can provide reference for content determination of puerarin in health-care products.

Key words: HPLC; health-care products; puerarin; content determination

葛根为豆科植物野葛或甘葛藤的干燥根, 有升阳解肌、透疹止泻、除烦止渴、清火排毒、调血脂等功效, 故被

广泛应用于保健食品中。市售保健食品质量标准中主要以检测总黄酮为功效指标, 但由于葛根素有改善外周循

第一作者: 苏思尹(1983-), 女, 主管药师, 主要从事化学药品分析和药械安全性评价工作, (电子信箱)51097652@qq.com。

- leukin-5 are rarely co-expressed by human T cells[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(8): 2413-2416.
- [15] Ioannides C, Whiteside T. T cell recognition of human tumors: implication for molecular immunotherapy of cancer[J]. Clin Immunol Immunopathol 1993, 66(2): 91-106.
- [16] Mrowietz U. Advances in systemic therapy for psoriasis[J]. Clin Exp Dermatol, 2001, 26(4): 362-367.
- [17] Cormier JN, Panell MC, Hackett JA, et al. Natural variation of the expression of HLA and endogenous antigen modulates CTL recognition in an in vitro melanoma model[J]. Int J Cancer, 1999, 80(5): 781-790.
- [18] 马俊杰, 刘会平, 周春祥. 运用胸腔镜技术探索细支气管肺泡细胞癌中医证型与 Th1/Th2 关系[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(8): 1069-1071.
- [19] Pradhan P, Qin H, Leleux JA, et al. The effect of combined IL10 siRNA and CpG ODN as pathogen-mimicking microparticles on Th1/Th2 cytokine balance in dendritic cells and protective immunity against B cell lymphoma[J]. Biomaterials, 2014, 35(21): 5491-5504.
- [20] Tate DJ Jr, Patterson JR, Velasco-Gonzalez C, et al. Interferon-γ-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells[J]. International Journal of Biological Sciences, 2012, 8(8): 1109-1120.
- [21] 王海生, 王武强, 刘小林, 等. 哮喘颗粒剂对热型哮喘患儿外周血 Th1/Th2 细胞的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2014, 24(5): 408-411.
- [22] Drobits B, Holemann M, Amberg N, et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells[J]. J Clin Invest, 2012, 122(2): 575-585.
- [23] Xiong Z, Ohlfest JR. Topical imiquimod has therapeutic and immunomodulatory effects against intracranial tumors[J]. Journal of Immunotherapy, 2011, 34(3): 264-269.
- [24] Rosberger DF, Coleman DJ, Silverman R, et al. Immunomodulation in choroidal melanoma: reversal of inverted CD4/CD8 ratios following treatment with ultrasound hyperthermia[J]. Biotechnol Ther, 1994, 5(1-2): 59-68.
- [25] 孔凡斌, 宁燕, 王智彪, 等. 高强度超声治疗对宫颈癌 U14 小鼠的脾淋巴细胞增殖及细胞毒性的影响[J]. 中国超声医学杂志, 2005, 21(1): 17-21.
- [26] 孔凡斌, 王智彪, 伍烽, 等. 高强度超声治疗对荷 U14 宫颈癌小鼠脾细胞 Th1、Th2 亚群细胞因子 mRNA 表达水平的影响[J]. 中国超声医学杂志, 2008, 24(9): 789-792.

(收稿日期: 2017-11-12)

环、抗血小板聚集等临床药理作用,长期、大量使用可能存在潜在的出血风险,故建议在功效指标中增加标志性成分葛根素的含量测定,以保证产品的安全性^[1-2]。本研究旨在遴选保健食品中葛根素的含量测定方法,以控制功效成分,更合理、安全地开发和利用葛根资源。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),配备 G1322A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1329A 自动进样机, G1316A 柱温箱, G1315D 二极管阵列紫外检测器; Sartorius TB-215D 型及 T-214 型电子分析天平(德国赛多利斯公司); HU10260F 型超声仪(天津市恒奥科技发展有限公司)。

1.2 试剂

葛根素对照品(批号为 110752-200912,含量为 96.0%,购自中国食品药品检定研究院);甲醇为分析纯(德国 Merck 公司);乙醇为化学纯(天津医药化学有限公司);水为超纯水(实验室自制);18 批次不同厂家含有葛根药材(或葛根素)的保健品(市场抽验品)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3]

色谱柱: Agilent Lichrospher C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(25:75); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40℃; 进样量: 10 μL; 检测波长: 250 nm。

2.2 溶液制备^[4]

对照品溶液: 称取葛根素对照品 26.06 mg, 精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 加 30% 乙醇溶液适量, 超声 20 min 溶解, 冷却至室温, 用 30% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

供试品溶液: 取供试品 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加 30% 乙醇溶液至 30 mL, 超声 20 min, 冷却至室温, 用 30% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 精密量取 2.2 项下对照品溶液 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加 30% 乙醇溶液稀释并定容至刻度, 按拟订色谱条件进样测定, 以峰面积(*A*)为纵坐标(*Y*)、质量浓度(μg/mL)为横坐标(*X*)进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.0254X + 1.4814$, $r = 1.0000$ ($n = 7$)。结果表明, 葛根素质量浓度在 4.8038 ~ 960.7680 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限确定: 精密量取质量浓度为 4.8 μg/mL 的对照品溶液 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 用 30% 乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀。依次改变进样量,

测定出定量限和检测限。信噪比(*S/N*)约为 1:3 时, 进样量为 5 μL, 测定检测限绝对值为 0.24 ng; *S/N* 约为 1:10 时, 进样量为 35 μL, 测定定量限绝对值为 1.68 ng。重复进样 5 次, 结果的 *RSD* 为 3.02% ($n = 5$)。

精密度试验: 精密吸取质量浓度为 96.0768 μg/mL 的对照品溶液, 依法连续进样 6 次, 测定峰面积。结果的 *RSD* 为 0.08% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一供试品(同仁堂牌同仁益健茶)溶液, 分别于 0, 1.5, 3, 6, 12, 24, 48 h 时进样, 测定葛根素峰面积。结果的 *RSD* 为 0.68% ($n = 7$), 表明常温下供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取供试品(纽斯葆牌葛维片), 按 2.2 项下方法平行配制 6 份供试品溶液, 每份各进样 2 次, 取平均值, 依法测定含量。结果的 *RSD* 为 2.35% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 称取已知含量的供试品(百邦葛灵胶囊)粉末 9 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分为 3 组, 每组分别加入质量浓度为 0.5760 g/L 的对照品溶液 0.8, 1.0, 1.2 mL。按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 葛根素加样回收试验结果($n = 9$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	<i>RSD</i> (%)
0.5004	0.5188	0.4608	0.9961	103.58		
0.5010	0.5194	0.4608	1.0186	108.33		
0.5008	0.5192	0.4608	1.0031	105.01		
0.5008	0.5192	0.5760	1.1348	106.87		
0.5045	0.5230	0.5760	1.1291	105.22	105.71	1.99
0.5013	0.5197	0.5760	1.1217	104.51		
0.5017	0.5201	0.6912	1.2594	106.95		
0.5023	0.5207	0.6912	1.2707	108.50		
0.5019	0.5203	0.6912	1.2281	102.40		

2.4 样品含量测定

取 18 批次保健品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定峰面积, 计算样品含量。结果见表 2。

2.5 样品处理方法及色谱条件选择

测定方法选择: 18 批保健品中均含有葛根药材或葛根提取物, 但检测标准中仅有 4 批测定葛根素功效成分, 且有的标准还存在同一指标有多种检验方法的现象, 而不同检验方法测定结果存在较大差异^[5-6]。结果见表 3。由于目前国产保健食品多以中草药为原料, 而且组分复杂, 因此, 在检测标志性成分葛根素时, 采用专属性较强的高效液相色谱(HPLC)法, 以保证检测结果的可靠性^[7-10]。

提取方法选择: 供试品前处理考虑了超声、回流、索

表2 样品含量测定结果

样品名称	批号	含量(mg/g)
德惠牌绞股蓝泽泻茶	20100621	0.000 0
百合康牌葛根提取物胶囊	20110325	36.688 2
星久牌力尊胶囊	20110803	7.880 0
纽斯葆牌葛维片	BE263-A	9.992 7
金奥力牌清宁软胶囊	20100910	5.196 7
百合康牌葛根提取物软胶囊	20110529	38.691 7
力克保健液*	20110622	0.081 1
纽斯葆牌葛维片	BE263-A	10.396 3
九巴乐含片	110105	1.626 0
国珍牌松花伴侣片	2011-08-15 2	5.571 1
国珍牌松花伴侣片	2011-09-10 3	5.196 7
常青春牌睡得安胶囊	20110929	1.009 9
百合康牌葛根提取物软胶囊	20110505	42.121 0
同仁堂牌同仁益健茶	110701	4.710 0
百邦葛灵胶囊	20110901	1.036 7
怡眠牌三七胶囊	20110601	0.000 0
一轻松牌舒解片	A970301	0.000 0
德惠牌绞股蓝泽泻茶	11091023	0.101 1

注:*力克保健液样品含量单位为g/L。

表3 不同方法样品含量测定结果

样品名称	批号	含量(mg/g)		
		UV法	UV法*	HPLC法
百合康牌葛根提取物胶囊	20110325	59.29	4.470 3	36.688 2
百合康牌葛根提取物胶囊	20110529	61.74	12.990 0	38.691 7
百合康牌葛根提取物胶囊	20110505	64.17	10.191 6	42.121 0
国珍牌松花伴侣片	2011-08-15 2	28.35	7.705 7	5.571 1
国珍牌松花伴侣片	2011-09-10 3	26.57	7.225 9	5.196 7
百邦葛灵胶囊	20110901	20.82	13.092 5	1.036 7
星久牌力尊胶囊	20110803	41.90	9.275 6	7.880 0
纽斯葆牌葛维片	BE263-A	122.89	2.470 9	9.992 7
金奥力牌清宁软胶囊	20100910	30.44	9.790 8	5.196 7
一轻松牌舒解片	A970301	98.48	2.465 7	0.000 0

注:*以芦丁为对照品,其余两法以葛根素为对照品。

氏3种提取方法,试验发现,超声提取效率明显高于其他2种,这与文献报道的黄酮类提取方法结果一致,且方便、快捷。

流动相选择:试验中比较了乙腈-水(11:89,流动相A),甲醇-水(25:75,流动相B)对样品测定的影响,发现以乙腈-水为流动相时峰形较好,但部分样品杂质峰与主峰不能完全分离,致使样品含量及加样回收率均偏大。比较结果见表4。使用甲醇-水作为流动相时,分离效果明显(供试品溶液色谱图理论板数不低于5 000,样品中待测组分与相邻峰的分离度大于1.5),能保证主峰的分离度,故选用甲醇-水(25:75)为流动相。

表4 不同流动相样品含量测定结果

样品名称	批号	含量(mg/g)	
		流动相A	流动相B
德惠牌绞股蓝泽泻茶	20100621	0.000 0	0.000 0
百合康牌葛根提取物胶囊	20110325	37.077 7	36.688 2
星久牌力尊胶囊	20110803	8.277 2	7.880 0
纽斯葆牌葛维片	BE263-A	10.795 3	9.992 7
金奥力牌清宁软胶囊	20100910	6.939 1	5.196 7
纽斯葆牌葛维片	BE263-A	11.121 8	10.396 3

提取溶剂选择:试验中比较了酸加入水解黄酮苷对提取率的影响,随着pH的增加含量变化不大,故借鉴了2015年版《中国药典(一部)》葛根素含量测定方法,直接采用30%乙醇作为提取溶剂。

3 讨论

试验中,有的供试品平行操作的2份样品含量精密度较差,重新取样配制后测定,精密度仍不能改善,究其原因可能是:供试品制剂本身均匀度较差,制剂在分装前未混匀,超声溶解时难免会出现溶解不充分的现象;个别供试品制剂中的辅料,造成葛根素的峰有一定程度的拖尾,导致积分后的峰面积稍有差异^[11]。

本研究中建立的高效液相色谱法操作简单,检测快速,分离度好,结果准确可靠,可用于检测保健食品中葛根素的含量,以有效控制保健品中该功效成分。

参考文献:

- [1] GB/T22251-2008. 中华人民共和国国家标准[S].
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:333.
- [3] 谭秦莉,刘冬,李玉宝,等. 总黄酮化合物药理作用研究进展[J]. 安徽中医学院学报,2009,28(3):62-64.
- [4] 田永利,许志宇,葛林,等. 总黄酮类化合物含量测定方法和药理作用研究进展[J]. 河北医药,2010,32(15):2094-2096.
- [5] 董宇. 黄酮类化合物的提取方法研究及展望[J]. 人参研究,2009,21(4):33-35.
- [6] 董丽荣,杨晓梅,李宗顺,等. 紫外分光光度法测定保健食品中总黄酮的含量[J]. 中国民族民间医药,2014,23(7):16-17.
- [7] 庄小梅,韩淑琴,李志锐. 葛根总黄酮提取物成分的HPLC测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(20):12156-12157.
- [8] 李婷,郑彩美,张彤,等. 葛根总黄酮提取物的含量测定研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(5):1089-1090.
- [9] 王言才,段金威,华永庆. 不同品种葛根中葛根素及总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):132-133.
- [10] 彭欣荣,李璞. RP-HPLC法测定保健品葛根粉中葛根素的含量[J]. 河南预防医学杂志,2007,18(3):177-178.
- [11] 李平,易路遥,王杉,等. 国产保健食品质量标准现状概述[J]. 中国药事,2013,27(6):648-650.

(收稿日期:2017-12-28)