

高效液相色谱法 (HPLC) 测定藏花素的研究

张德权 吕飞杰 台建祥 中国农业科学院作物所农产品加工中心 北京 100081

摘要 采用高效液相色谱法 (HPLC), 选用 Tuner Packing Kromasil 氨基柱, 以乙腈:水(80:20)为流动相, 流速 0.8ml/min, 440nm 下测定藏花素, 结果表明: 藏花素的保留时间为 12.19min, 最小检测限为 12.5ng, 加样回收率为 99.34%, 色谱峰分离效果好, 具有良好的稳定性和重现性。

Abstract The High-performance liquid chromatographic determination of crocin was described. Crocin was separated very well on Tuner Packing Kromasil NH₂ column by the use of acetonitrile:water (80:20) as mobile phase, under the flow rate of 0.8ml/min. It was detected at 440nm by UV-VIS spectrophotometer, the retention time was 12.19min, the detection limit was 12.5ng. The average recovery rate was 99.34%, with a good stability and reproducibility.

藏花素 (crocin) 是栀子、西红花、藏红花中共存的一类自然界中少有的水溶性类胡萝卜素, 它是栀子黄色素的主体成分, 不仅具有抗癌、抑制肿瘤、降血脂、护肝、淬灭自由基、抗氧化等作用, 还具有水溶性好、着色力强、对光温稳定、pH1~14 范围内均呈鲜艳的黄色等优点^[1], 而被广泛地应用于食品领域, 日本年需要量 320 吨, 居日本天然色素市场第四位^[2]。我国分别于 1987 年、1998 年颁布实施了食品添加剂-栀子黄、食品中栀子黄的测定的国家标准^[3, 4], 标准中以色价作为栀子黄质量评价和控制的指标, 以薄层色谱的 R_f 值作为栀子黄色素定性的依据, 但还缺乏有效的栀子黄即藏花素的定量标准。自 1982 年 pfander 等人^[5]首次采用 HPLC 测定藏花素以来, 国外相继有数例报道对 HPLC 这一方法进行了改进和完善, 而我国目前仅有一例此方面的报道^[6]。本文亦拟建立起 HPLC 测定藏花素的分析系统, 旨在栀子黄色素的定量及生物功能的评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (waters), waters-510 型泵, waters-484 型紫外检测器 (Tunable Absorbance Detector), 25 μ l 进样器, 紫外分光光度计 (Shimadzu UV-240, 日本岛津), 超声波清洗机, 十万分之一天平。

1.2 试剂及材料

藏花素 (corcin): 购于 Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA) 乙腈: 天津市四友化工厂, 色谱纯; 栀子: 河南省唐河县政府提供; 栀子黄色素: 鹰潭市贵溪华康天然色素厂生产, 色价为 10。

1.3 标准溶液配制

粗确称取藏花素 0.025mg, 置于 10ml 容量瓶中, 用乙腈:水(80:20)定容, 配成藏花素含量为 2.5 μ g/ml

的工作液, 备用。

1.4 样品液制备

分别称取栀子全果、皮、种籽各约 10g (含水量均为 16.73%), 粉碎后过 20 目筛, 分别准确称取 0.5000g, 置于水溶加热回流烧瓶中, 加入 50ml 甲醇:水(1:1), 水溶加热回流至栀子无黄色止, 约 30~60min, 水溶加热回流结束后放冷, 定容于 50ml 容量瓶中, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取滤液各 1ml, 用乙腈:水(80:20)定量于 10ml 的容量瓶中, 备用。

此外, 准确称取色价为 10 的栀子黄色素 0.1000g, 定容于 100ml 的乙腈:水(80:20)溶液中, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 滤液备用。

1.5 色谱条件

色谱柱: Turner Packing Kromasil NH₂, 5 μ m, 4.6mm $\times$ 250mm; 流动相: 乙腈:水(80:20) 流速: 0.8ml/min; 检测波长: 440nm; 灵敏度: 1.0AUFS; Filter: 1.0。

2 结果与分析

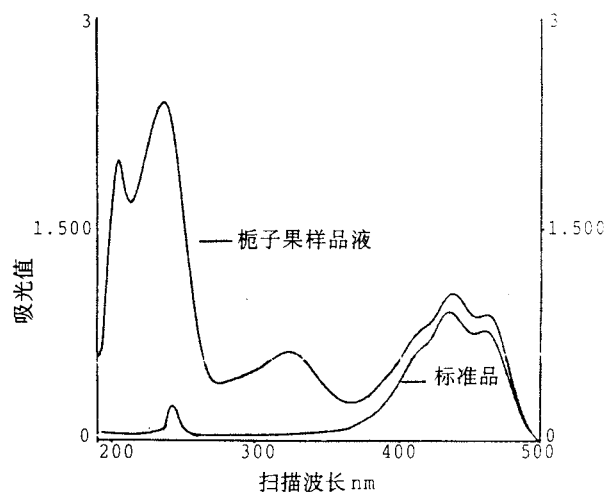


图 1 藏花素与栀子果的紫外吸收光谱图

2.1 最佳检测波长的选择

取栀子全果样品液与藏花素对照品标准液于190~500nm范围内进行紫外、可见光扫描,如图1所示,二者均在415、440及465nm处有吸收峰值,且440nm处的吸收值最大,表明440nm为藏花素的特征吸收峰值,因此检测波长确定为440nm。

2.2 藏花素纯度检查

采用1.5的色谱条件对标准品藏花素进行纯度分析,结果在本试验条件下未见杂质峰,纯度系数(即峰面积百分比)为0.9978。

2.3 流动相的选择

为了获得良好的分离效果,实验采用了乙腈、水的混合液作流动相,并对其配比进行了研究,结果表明,当流动相配比为80:20(乙腈:水)时,样品中的藏花素与其它成分分离较好(图2),保留时间为12.19min。

2.4 线性关系考察

准确吸取藏花素标准溶液5、10、15、20、25 μ l分别进行,按1.5的色谱条件进行测定,以藏花素进样量为纵坐标,峰面积分值为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为: $Y(X) = 9.2 \times 10^{-8}X + 3.06161 \times 10^{-3}$ ($r=0.9904$, $\alpha=0.01$),表明藏花素在0.0125~0.0625 μ g范围内呈良好的线性关系,达到极显著水平,当信噪比(S/N)为2时,藏花素的最小检测限为12.5ng。

2.5 精密度与重复性试验

准确吸取20 μ l标准溶液(0.05 μ g藏花素),于

上述色谱条例下重复进样10次,记录保留时间和峰面积积分值,并计算藏花素的含量。结果表明,藏花素的标准差为0.0059,相对标准差(RSD)为3.7%,保留时间的标准差为0.13,相对标准差(RSD)为0.34%,保留时间与藏花素含量的RSD均在5%以下,表明在该色谱条件下测定藏花素的含量具有很高的精确度和重现性。

2.6 稳定性试验

表1 标准品和栀子全果中藏花素12h内的稳定性(n=6)

项目	标准品 (μ g)	栀子全果 (g/100g)
测定平均值	0.0508	0.197
标准差	0.0036	0.0173
相对标准差(RSD)(%)	2.78	3.59

准确吸取20 μ l藏花素标准溶液(0.05 μ g藏花素)和栀子全果样品液,于上述色谱条件下每2h进样一次,共6次,分析测定藏花素的含量,结果见表1,标准液与样品液中的藏花素含量的RSD均在5%下,表明藏花素在12h内测定结果稳定。

2.7 加样回收率试验

准确称取经粉碎过20目筛的栀子全果50.00mg(藏花素含量0.2015%),准确加入藏花素0.025mg,按1.4样品液制备方法制备含栀子全果1mg/ml的乙腈-水(80:20)溶液,准确吸取20 μ l进样,按上述色谱条件重复测定6次,计算样品加样回收率。平均回收率为99.34%,标准差为10.17%,相对标准差为4.18%。

2.8 样品测定

分别精确吸取栀子全果、皮、种籽、色价为10的

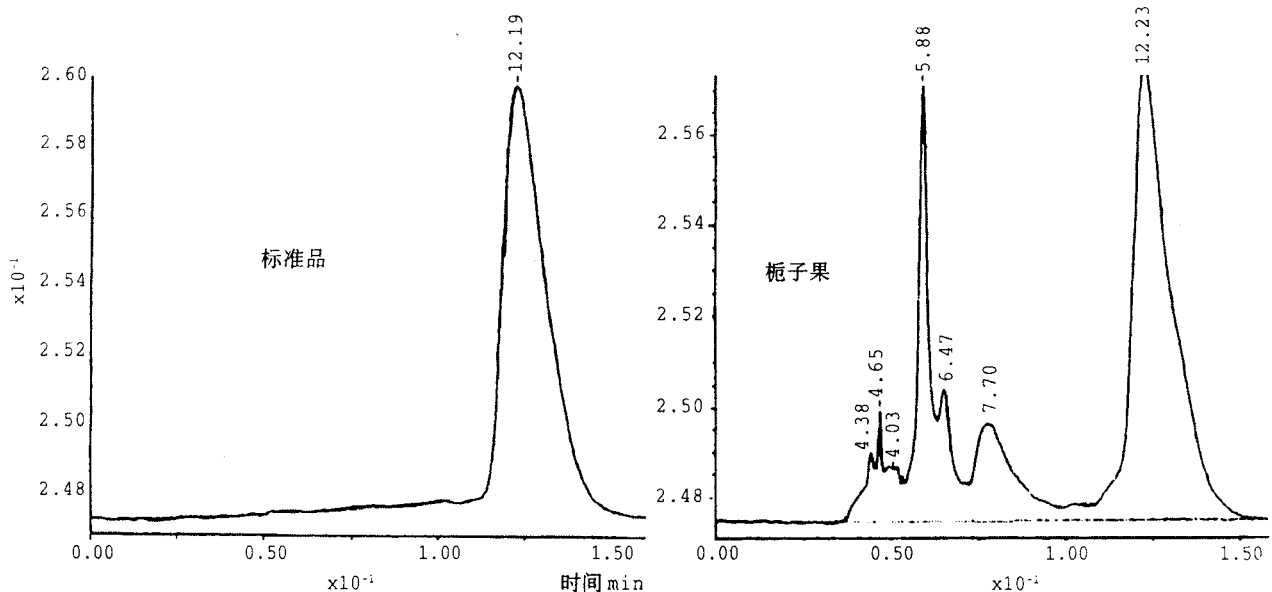


图2 标准品与栀子果中藏花素的分离色谱图

栀子黄色素样品液各 20 μ l, 依上述色谱条件进样, 分析测定藏花素的含量, 结果见表 2。

表 2 所试样品中藏花素的含量 ($n=5$) (g/100g)

样品	平均值	标准差 (g/100g)	相对标准差 (RSD) (%)
栀子果	0.2015 $\pm$ 0.0142	0.0142	3.15
栀子皮	0.1208 $\pm$ 0.0059	0.0059	2.18
栀子种籽	0.2543 $\pm$ 0.0182	0.0182	3.20
栀子黄色素	0.2508 $\pm$ 0.0145	0.0145	2.58

3 讨论与结论

藏花素是一类水溶性的类胡萝卜素^[1], 提取时会溶出许多杂质, 不利于 HPLC 的测定, 笔者采用了不同的溶剂系统和不同的提取方法对藏花素的提取进行了研究, 结果发现, 以乙醇-水 (1:1) 作提取溶剂, 水浴加热回流 30min 即可将栀子中的藏花素提取完全, 此法具有提取时间短、简单、快捷、杂质少等优点, 非常适合 HPLC 测定藏花素应用。

藏花素是藏花酸的龙胆二糖酯, 已有研究表明, 它存在顺反异构体及多种糖酯衍生物^[1]。本试验的色谱条件虽可使藏花素得以很好的分离, 但 4~10min 的各种成分的分离效果却很差, 它们是否是藏花素的衍生物目前尚不清楚, 还有待于深入地研究加以验证。

HPLC 分析测定脂溶性类胡萝卜素的方法虽日臻完善, 但藏花素这种水溶性类胡萝卜素的 HPLC 分析

方法却有人问津。目前, 仅有 10 余例此方面的报道, 原因可能一方面在于藏花素纯品不易获得, 另一方面在于人们长期忽略了藏花素的功能作用, 在者在于人们混淆了栀子黄色素中起着色作用的主体成分藏花素与杂质成分栀子甙, 常常将定量栀子甙的方法为栀子黄色素的定量方法^[4], 从而限制了采用 HPLC 法分析测定藏花素的研究。本文建立起了有效的 HPLC 测定藏花素的方法, 解决了藏花素的提取及色谱条件的确定两大关键难题, 使得这一方法切实可行, 为藏花素的功能评价和栀子黄色素的定量奠定了坚实的基础。

参考文献

- 1 Marie-Rosee VC, Martine CB, Francois C, et al. Spectroscopic characterization of crocetin derivatives from crocus sativus and gardenia jasminodes. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45: 1055~1061.
- 2 高桥崧. 日本的天然色素市场. *食品工业*, 1996, 3: 35~6.
- 2 中华人民共和国国家标准. 食品添加剂栀子黄 (粉末、浸膏), GB7912-87.
- 4 中华人民共和国国家标准. 食品中栀子黄的测定, GB T17335-1998.
- 5 Pfander H, Rychener M. Separation of crocetin glycosyl ester by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1982, 232: 443~447.
- 6 王春芳、鲁静. 高效液相色谱法测定栀子中藏花素的含量. *药物分析杂志*, 1997, 17 (5): 321~323.

聚苯胺修饰钨丝针型复合微 pH 传感器的研究及在水果测试中的应用

王朝瑾 李云峰 上海水产大学食品学院 200090

应太林 上海大学 200072

摘 要 由电聚合将聚苯胺修饰的钨丝电极作为 pH 敏感电极, 把 Ag-AgCl 体系填入针型塑料管内构成参比电极, 把经聚苯胺修饰的钨丝电极安置入该针型参比电极内构成复合针型微 pH 传感器, 在 pH2~12 范围内, 该传感器呈现 Nernst 响应, 斜率为 55mV/pH, 响应时间 <1min, 该传感器成功地应用于水果内微区 pH 的测定。

关键词 聚苯胺 针型复合微 pH 传感器 水果测试

Abstract A tungsten filament electrode modified with polyaniline by electro-polymerization was prepared to work as pH-sensitive electrode. A plastics needle filled with Ag/AgCl redox system was used as reference electrode. A micro needle-concentric pH sensor was constructed by inserting the polyaniline-modified tungsten filament electrode in the needle reference electrode obtained above. The sensor exhibited a linear response in the range 2~12 pH, with a Nernst response slope (55mV/pH) and a response time of less than 1min. The results obtained from the sensor were in good agreement with those from the glass pH electrode. The sensor has been successfully employed to determine pH in micro region of fruit.

Key words Polyaniline Needle-concentric pH sensor Fruit detection