

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2017.06.007

文章编号:2095-6002(2017)06-0042-06

引用格式:申科敏,胡晓琴,韩春. 高效液相色谱法测定高粱红色素中两种化合物含量[J]. 食品科学技术学报,2017,35(6): 42-47.



SHEN Kemin, HU Xiaolin, HAN Chun. Simultaneous determination of two components in sorghum pigment by HPLC[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017,35(6):42-47.

高效液相色谱法测定高粱红色素中两种化合物含量

申科敏^{1,2}, 胡晓琴³, 韩春^{3,*}

(1. 长治医学院 公共卫生与预防医学系, 山西 长治 046000;

2. 长治市食品药品检验所, 山西 长治 046000;3. 长治学院 化学系, 山西 长治 046011)

摘要:建立了 HPLC-双波长法测定高粱红色素中槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素含量的方法。样品经前处理提取溶解后通过高效液相色谱分析,以色谱峰保留时间和紫外可见光谱进行定性。采用 C₁₈反相色谱柱,以甲醇为流动相 A,1% 乙酸溶液为流动相 B,梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,进样量 20 μ L,选择 486 nm(槲皮素-7-葡萄糖苷)和 333 nm(芹菜素)两处波长同时检测,峰面积外标法定量。结果表明,两种化合物质量浓度在 10.2 ~ 408.0 μ g/mL 内线性关系良好,相关系数均大于 0.999,检出限为 2 μ g/mL,平均加标回收率为 97.3 % ~ 102.8 %,RSD 为 1.6% ~ 3.9% ($n=6$)。该方法操作简单,重复性和稳定性好,能满足高粱红色素中槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素同时测定的要求。

关键词:槲皮素-7-葡萄糖苷;芹菜素;高粱红色素;高效液相色谱法

中图分类号:TS202.3;TS207.3

文献标志码:A

高粱红色素(sorghum pigment)又称高粱红、高粱色素等^[1],是从高粱粒和高粱壳中提取的一种天然色素^[2-3],主要成分为芹菜素(apigenin;5,7,4'-三羟基黄酮)和槲皮素-7-葡萄糖苷(querctin-7-glucoside;3,5,3',4'-四羟基黄酮-7-葡萄糖苷)^[4]。食品安全国家标准(GB 2760—2014)规定,高粱红色素可在熟肉制品、果冻、饮料、糕点等各类食品中按生产需要适量使用^[5]。

高粱红色素作为一种广泛应用在食品生产行业中的添加剂,目前对高粱红色素的品质性能评价主要依据 GB 1886.32—2015《食品安全国家标准 食品添加剂 高粱红中的具体质量指标》^[4]。该质量指标中“色价”在评价高粱红色素方面更主要是反映产品着色能力的强弱,不能反映该色素本

身的主成分含量水平及原料本身的真伪,所以,应引入主成分含量水平的评价。现有文献主要集中在高粱红色素的提取工艺、理化性质等方面的研究^[6-14],未见对高粱红色素组成成分含量测定的报道。本研究建立了一种 HPLC-双波长法测定高粱红色素中槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素两种成分含量的方法,希望为高粱红色素主成分的检测提供科学参考依据,改进高粱红色素的评价方法。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

槲皮素-7-葡萄糖苷标准品(含量 98%,20 mg/支)、芹菜素标准品(含量 98%,25 mg/支),南京景竹生物科技有限公司;高粱红色素(批号:

收稿日期:2017-02-15

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(21402012);国家自然科学基金资助项目子项目(GJZX201605)。

作者简介:申科敏,男,工程师,硕士,主要从事食品质量安全检测方面的研究;

*韩春,女,副教授,博士,主要从事药物合成与分析方面的研究,通信作者。

20150718、20151021、20151023、20151024),长治学院化学系自制^[15];甲醇(色谱纯),德国 Meker 公司;无水乙醇(分析纯)、冰乙酸(分析纯),天津市永大化学试剂有限公司;盐酸(优级纯),洛阳市化学试剂厂;超纯水,自制。

1.2 仪器与设备

Waters e2695 型高效液相色谱仪(配有 Waters 2998 二极管阵列检测器(PDA)和 Empower 色谱工作站),美国 Waters 公司。

1.3 色谱条件

色谱柱 Shim-pack VP-ODS C₁₈(250 mm × 4.6 mm,5 μm)柱温 30 ℃;进样体积 20 μL;流速 1 mL/min;检测波长:芹菜素(333 nm)、槲皮素-7-葡萄糖苷(486 nm)。流动相 A 为甲醇,B 为 1% 乙酸溶液。梯度洗脱程序 0 ~ 7 min,60% A;7 ~ 9 min,60% ~ 80% A;9 ~ 15 min,80% A;15 ~ 16 min,80% ~ 60% A;16 ~ 26 min,60% A。

1.4 槲皮素-7-葡萄糖苷标样溶液和高粱红色素供试溶液的制备

1.4.1 标准溶液的制备

准确称取槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素标准品各 10.20 mg 至 10 mL 容量瓶中,加乙醇-盐酸溶液(pH 值 3.0)溶解、定容摇匀备用;槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素的质量浓度均为 1.02 mg/mL。分别量取标准储备液 0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,4.0 mL 至 10.0 mL 容量瓶中,用乙醇-盐酸溶液(pH 值 3.0)稀释至刻度,摇匀,得芹菜素和槲皮素-7-葡萄糖苷混合系列标准溶液,质量浓度为:10.2,20.4,51.0,102.0,204.0,408.0 μg/mL,按 1.3 方法进行检测。

1.4.2 高粱红色素样品的制备

称取 0.5 g 高粱红色素于三角瓶中,用 100 mL 乙醇-盐酸溶液(pH 值 3.0)于 30 ℃ 超声 10 min 后真空抽滤,滤液转移到 250 mL 的容量瓶中定容,取 1 mL 过 0.45 μm 的滤膜于试剂瓶中待 HPLC 检测。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 检测波长的选择

基于 1.3 中的色谱条件,采用 Waters 2998 二极管阵列检测器(PDA)对槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素标准溶液进行 200 ~ 800 nm 全波长扫描,提取两

种物质的紫外吸收光谱(见图 1)。图 1 显示,芹菜素在 267 nm 和 333 nm 处有吸收峰存在,考虑到 333 nm 处峰形较宽且规则,有利于芹菜素液相条件下的检测,所以拟选择 333 nm 作为芹菜素的检测波长^[15];槲皮素-7-葡萄糖苷在 486 nm 处有最大吸收峰,拟选择 486 nm 作为槲皮素-7-葡萄糖苷的检测波长。

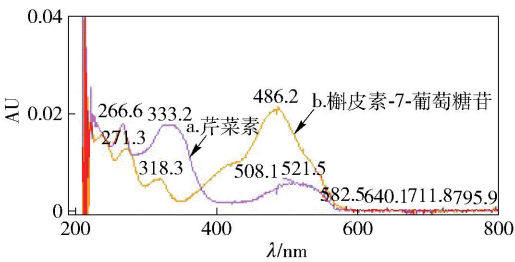


图 1 芹菜素和槲皮素-7-葡萄糖苷的紫外吸收光谱
Fig.1 Spectrogram of UV absorption of apigenin and quercetin-7-glucoside

2.1.2 流动相的选择

为选择较佳检测条件,本实验分别考察了甲醇与水、甲醇与 0.1% 乙酸水溶液、甲醇与 1% 乙酸水溶液、乙腈与 1% 乙酸水溶液等流动相体系对槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素在 C₁₈ 柱上保留行为的影响。结果发现,甲醇与 1% 乙酸水溶液为流动相时峰形好,响应高;通过 1.3 梯度洗脱条件,使样品中指标成分获得了良好的分离度,干扰少,保留时间相对适中。槲皮素-7-葡萄糖苷的保留时间为 7.3 min,芹菜素的保留时间为 13.1 min,液相色谱见图 2、图 3。

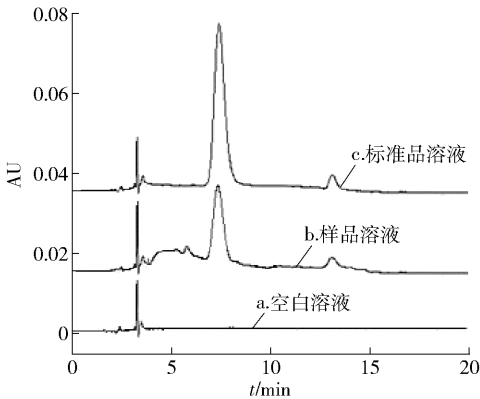


图 2 槲皮素-7-葡萄糖苷 HPLC

Fig.2 HPLC chromatograms of quercetin-7-glucoside

2.2 线性范围、检出限及定量限的确定

将 1.4.1 中系列质量浓度的混标溶液按 1.3 中色谱条件进样分析,以质量浓度为横坐标(X,μg/mL),

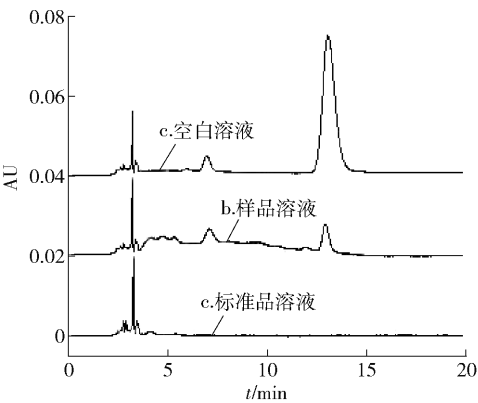


图 3 芹菜素 HPLC

Fig. 3 HPLC chromatograms of Apigenin

表 1 槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素回归方程、检测限和定量限

Tab. 1 Regression equations, detection limit, and quantitation limit for quercetin-7-glucoside and apigenin

化合物	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
槲皮素-7-葡萄糖苷	$Y=953.4X-493.7$	0.999 6	10.2~408.0	2.0	6.0
芹菜素	$Y=1\,237.6X-671.8$	0.999 5	10.2~408.0	2.0	6.0

各 5.00,10.00,100.00 mg/g,按 1.4.2 进行样品处理,每个浓度水平做 6 个平行实验,按 1.3 进行 HPLC 检测,测定其回收率,结果如表 2。表 2 中在 3 个不同的水平,槲皮素-7-葡萄糖苷的平均回收率为 97.3%~101.5%,其相对标准偏差 $RSD(n=6)$ 为 2.1%~3.1%;芹菜素的平均回收率为 101.1%~102.8%,其相对标准偏差 $RSD(n=6)$ 为 1.6%~3.9%,回收率良好,完全满足国家标准食品理化检测要求^[16]。

2.4 重复性实验结果

取高粱红色素同一样品(批号:20151021)6 份,按 1.4.2 制备高粱红色素供试样品溶液,按 1.3 色谱条件测定,记录峰面积,计算芹菜素和槲皮素-7-葡萄糖苷 RSD ,结果见表 3。表 3 中,芹菜素和槲皮素-7-葡萄糖苷 $RSD(n=6)$ 分别为 0.87% 和 0.94%,表明该实验方法的重复性良好。

2.5 稳定性实验结果

称量高粱红色素适量粉末(批号:20151023)一份,按 1.4.2 的样品处理方法制得供试样品溶液,放置 0,2,4,6,8,10 h,按 1.3 色谱条件分别进行测定,记录峰面积,结果见表 4。由表 4 可知,芹菜素和槲皮素-7-葡萄糖苷 $RSD(n=6)$ 分别为 0.62% 和 0.94%,表明该方法处理的样品溶液在室温条件下

峰面积为纵坐标(Y),进行回归分析;将标准溶液逐步稀释至其响应值为噪音的 3 倍($S/N=3:1$),所对应的溶液质量浓度为检出限;同时将加标样品经 1.4.2 中方法前处理,测得响应值为噪音的 10 倍(即 $S/N=10:1$),所对应的溶液质量浓度为方法定量限。回归方程、线性范围、相关系数(R^2)、检出限和定量限结果见表 1。由表 1 可知,该方法线性良好,线性范围、相关系数、检出限和定量限符合国家标准食品理化检测要求^[16]。

2.3 回收率和精密度分析

采用加标回收实验,在高粱红色素样品(批号:20150718)中分别加入芹菜素和槲皮素-7-葡萄糖苷

放置 10 h 内稳定。

2.6 实际样品测定结果

采用本方法对长治市周边所采集的 3 份高粱自制的高粱红色素进行处理和测定,结果见表 5。由结果可知,3 个批次的高粱红色素样品中槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素的含量趋于稳定,可推测长治地区生长的高粱制得的高粱红色素所含两成分分别在 16.4 mg/g 和 12.7 mg/g 左右。

3 结 论

建立了一种用 HPLC 测定高粱红色素中槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素两种主成分含量的方法。采用 Shim-pack VP-ODS C_{18} 色谱柱,以甲醇-1% 乙酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,进样量 20 μL ,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素检测波长分别为 486 nm 和 333 nm。结果表明,槲皮素-7-葡萄糖苷和芹菜素在 14 min 内出峰,与其他杂质组分能实现很好的分离,在质量浓度为 10.2~408.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,相关系数均大于 0.999,平均回收率为 97.3%~102.8%, RSD 为 1.6%~3.9% ($n=6$),方法检测限为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 加样回收率和精密度测定结果						
Tab. 2 Results of adding standard recovery rate and precision experiments						
化合物	样本含量/(mg·g ⁻¹)	添加水平/(mg·g ⁻¹)	测得值/(mg·g ⁻¹)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
槲皮素-7-葡萄糖苷	8.449 7	5.00	13.318 2	97.37	97.3	2.1
			13.371 7	98.44		
			13.205 2	95.11		
			13.327 3	97.55		
			13.461 4	100.23		
			13.194 2	94.89		
		10.00	18.351 6	99.02	101.3	3.1
			18.987 5	105.38		
			18.743 7	102.94		
			18.106 4	96.57		
			18.596 7	101.47		
			18.694 9	102.45		
		100.00	111.869 2	103.42	101.5	2.2
			111.281 3	102.83		
			106.775 4	98.33		
			109.919 7	101.47		
			107.759 9	99.31		
			112.073 8	103.62		
芹菜素	6.251 6	5.00	11.495 6	104.88	102.8	3.9
			11.617 3	107.31		
			11.373 8	102.44		
			11.185 2	98.67		
			11.129 2	97.55		
			11.562 1	106.21		
		10.00	16.202 6	99.51	101.1	1.8
			16.495 9	102.44		
			16.349 3	100.98		
			16.594 7	103.43		
			16.447 6	101.96		
			16.108 9	98.57		
		100.00	107.331 2	101.08	101.6	1.6
			109.491 7	103.24		
			108.012 4	101.76		
			106.643 1	100.39		
			109.782 5	103.53		
			105.564 2	99.31		

n = 6

表 3 重复性实验结果								
Tab. 3 Results of repeatability experiments								
化合物	测得值/(mg·g ⁻¹)						平均值/ (mg·g ⁻¹)	RSD/%
	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组	第 6 组		
槲皮素-7-葡萄糖苷	16.75	16.89	16.98	17.18	17.01	16.86	16.90	0.87
芹菜素	21.12	20.84	21.38	21.08	20.95	21.27	21.10	0.94

n = 6

表 4 稳定性实验结果
Tab.4 Results of stability experiments

化合物	峰面积						峰面积 平均值	RSD/%
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h		
槲皮素-7-葡萄糖苷	31 683	31 218	31 355	31 394	31 497	31 720	31 477. 8	0. 57
芹菜素	50 762	50 095	51 207	50 971	50 685	51 478	50 866. 3	0. 86

n = 6

表 5 3 个批次的高粱红色素两成分含量
Tab.5 Contents of two components in three
batches of sorghum pigment

化合物	各批次样品测得量/(mg·g ⁻¹)			平均值/ (mg·g ⁻¹)
	20151021	20151023	20151024	
槲皮素-7-葡萄糖苷	16. 89	16. 42	15. 78	16. 4
芹菜素	12. 47	13. 13	12. 38	12. 7

参考文献:

[1] 张兆俊, 肖丽娟. 天然色素高粱红开发应用[J]. 粮食与油脂, 2005(5): 40-41.
ZHANG Z J, XIAO L J. Development and utilization of natural pigment kaoliang color[J]. Cereals & Oils, 2005 (5): 40-41.

[2] 张爱琴, 方昭希, 娄莉青, 等. 高粱红色色素的初步研究[J]. 食品科学, 1990(11): 27-29.

[3] 张宏宇, 吕玉璋, 李韬. 高粱红色素乙醇提取工艺的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(3): 300-302.
ZHANG H Y, LÜ Y Z, LI T. Extraction of red pigment from sorghum[J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(3): 300-302.

[4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂 高粱红:GB 1886. 32—2015 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.

[5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准:GB 2760—2014 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

[6] 王毅民, 李师翁. 天然高粱红色素提取方法与性质的研究[J]. 甘肃科学学报, 1996, 8(2): 82-85.
WANG Y M, LI S W. The studies on the methods of extraction and stability of natural kaoliang red pigment[J]. Journal of Gansu Sciences, 1996, 8(2): 82-85.

[7] 詹嘉红, 蓝宗辉. 李红色素的理化性质及其应用研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(8): 61-63.
ZHAN J H, LAN Z H. Study on physicochemical characterization and application of red pigment from *Prunus salicina*[J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(8): 61-63.

[8] 张海容, 狄文婷, 赵新瑞. 高粱红色素萃取方法的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 124-129.
ZHANG H R, DI W T, ZHAO X R. Study on extraction methods for red pigment of sorghum[J]. Food Science, 2006, 27(3): 124-129.

[9] 潘训海. 从高粱中提取红色素的研究[J]. 广州化工, 2013, 41(15): 74-86.
PAN X H. Extraction of red pigment from sorghum[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2013, 41(15): 74-86.

[10] 李竹英, 毛绍春, 戴荣珍, 等. 紫黑高粱色素的提取工艺研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2010, 32(s1): 294-298.
LI Z Y, MAO S C, DAI R Z, et al. Study on extraction method of pigment of purple black sorghum[J]. Journal of Yunnan University(Natural Sciences Edition), 2010, 32(s1): 294-298.

[11] 陈金娥, 刘丽琴, 张海容. 高粱红色素稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(1): 189-192.
CHEN J E, LIU L Q, ZHANG H R. Study of stability on red pigment of sorghum [J]. Food Research and Development, 2009, 30(1): 189-192.

[12] 王金亭. 天然高粱红色素研究与应用进展[J]. 粮食与油脂, 2012(11): 7-11.
WANG J T. Research advances on natural red pigment form sorghum bicolor[J]. Cereals and Oils, 2012(11): 7-11.

[13] 毛绍春, 李竹英. 高粱色素含量测定方法的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2011, 33(s1): 301-304.
MAO S C, LI Z Y. Study on determination method of content of sorghum pigment[J]. Journal of Yunnan University(Natural Sciences Edition), 2011, 33(s1): 301-304.

[14] 李竹英, 毛绍春, 戴荣珍, 等. 红高粱色素的提取工艺及结构的初步分析[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 79-85.
LI Z Y, MAO S C, DAI R Z, et al. Extracted method

- and preliminary structural analysis of red sorghum pigment[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(17): 79–85.
- [15] 田新宇, 范翠梅, 渠田田, 等. 半枝莲总黄酮中7种成分的含量测定及抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 53–59.
- TIAN X Y, FAN C M, QU T T, et al. Determination of seven compounds and antitumor activity of total flavonoids from *scutellariae barbatae herba* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2017, 23(1): 53–59.
- [16] 中国合格评定国家认可中心. 实验室质量控制规范 食品理化检测: GB/T 27404—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

Simultaneous Determination of Two Components in Sorghum Pigment by HPLC

SHEN Kemin^{1,2}, HU Xiaoqin³, HAN Chun^{3,*}

(1. *Department of Public Health and Preventive Medicine, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China;*

2. *Changzhi Institute for Food and Drug Control, Changzhi 046000, China;*

3. *Department of Chemistry, Changzhi University, Changzhi 046011, China*)

Abstract: To determine flavonoid compounds of quercetin-7-glucoside and apigenin in sorghum pigment, the method of HPLC-double wavelength was established. Two components were extracted and dissolved after pretreatment and determined by the retention time and UV absorption spectra. Then they were analyzed by HPLC on a C₁₈ column and detected at the wavelength of 486 nm and 333 nm for quercetin-7-glucoside and apigenin respectively, with a mobile phase of methanol and 1% acetic acid for gradient elution. The velocity of flow was 1.0 mL/min and the injection volume was 20 μ L. The components were quantitatively determined by calculating the peak areas. The results showed that the calibration curve was liner in the range of 10.2–408.0 μ g/mL with the correlation coefficients of more than 0.999. The detection limit was 2 μ g/mg. The average recoveries ranged from 97.3% to 102.8%, and the relative standard deviations (RSD) were 1.6%–3.9% ($n=6$). The method showed good repeatability, accuracy, and stability and could be applied in the accurate quantification of two flavonoid components in sorghum pigment.

Keywords: quercetin-7-glucoside; apigenin; sorghum pigment; HPLC

(责任编辑: 叶红波)