

高效液相色谱法测定保健食品中的羟基酪醇

吕卓, 李涛*, 贺茜, 史朝烨, 雷会宁, 樊少娟, 马月, 乔蓉霞

(陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定保健食品中羟基酪醇的方法。**方法** 样品用二甲基亚砜进行超声提取后, 采用 Waters Spherisorb ODS2 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行分离, 以 0.12%甲酸水溶液-0.12%甲酸甲醇溶液为流动相等度洗脱, 柱温为 30 °C, 流速 1 mL/min, 紫外检测器进行检测, 外标法定量。**结果** 羟基酪醇在 12.45 ~ 498.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999; 检出限为 0.03 g/100 g; 定量限为 0.12 g/100 g; 平均回收率为 99.5%~100.6%, 相对标准偏差值为 0.55%~1.13%。**结论** 该方法简便、快捷、高效、准确, 适用于保健食品中羟基酪醇的测定。

关键词: 保健食品; 羟基酪醇; 高效液相色谱法

Determination of hydroxytyrosol in health food by high performance liquid chromatography

LV Zhuo¹, LI Tao*, HE Qian, SHI Zhao-Ye, LEI Hui-Ning, FAN Shao-Juan, MA Yue, QIAO Rong-Xia

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of hydroxytyrosol in health food by high performance liquid chromatography. **Methods** After ultrasonic extraction with dimethyl sulfoxide, the samples were separated with Waters Spherisorb ODS2 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) by using 0.12% formic acid aqueous solution-0.12% formic acid methanol solution as mobile phase for isocratic elution at the flow of 1 mL/min. The temperature of column was 30 °C. The samples were detected by UV detector and quantified by external standard method. **Results** Hydroxytyrosol had a good linear relationship in the range of 12.45–498.0 μg/mL, and the correlation coefficient was greater than 0.999. The limit of detection was 0.03 g/100 g. The limit of quantitation was 0.12 g/100 g. The average recoveries were 99.5%–100.6%, and the relative standard deviations were 0.55%–1.13%. **Conclusion** This method is simple, rapid, efficient and accurate, which can be applied to detect hydroxytyrosol in health food.

KEY WORDS: health food; hydroxytyrosol; high performance liquid chromatography

1 引言

羟基酪醇(hydroxytyrosol, HT)是一种天然抗氧化剂,

广泛存在于橄榄科橄榄属植物的枝叶及果实中^[1]。近年来, 橄榄的主要用途是生产初榨橄榄油, 在橄榄油加工过程中, 产生大量的果渣, 果渣中含有果渣油、多酚和萜类化合物

基金项目: 食品安全风险物质筛查检测服务平台建设(2019PT-22)

Fund: Supported by Construction of Food Safety Risk Substance Screening and Testing Service Platform (2019PT-22)

*通讯作者: 李涛, 主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验、食品安全快速检测技术研究。E-mail: westyx@126.com

*Corresponding author: LI Tao, Chief Pharmacist, Shaanxi Institute for Food and Drug Control, No.21, Kejiwu Road, Gaoxin District, Xi'an 710065, China. E-mail: westyx@126.com

等多种活性成分^[2], 其中酚类物质中的橄榄苦苷含量占 25%, 橄榄苦苷的性质不稳定, 在酸、碱和酶的作用下易降解为羟基酪醇和橄榄香酸^[3]。研究报道, 羟基酪醇具有抗氧化、抗炎、抗癌、抗血栓、抗菌、抗病毒等功能^[4-12]。其药理主要作用机制是通过蛋白激酶 B、细胞外信号调节激酶、叉头蛋白 O3a 等信号途径激活细胞内抗氧化酶体系, 增加线粒体生成, 减少氧化损伤造成的疾病发生^[13]。

羟基酪醇是一种酚类化合物, 化学名为 3, 4-二羟基苯乙醇, 易溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide), 在 280 nm 处有最大吸收值。由于羟基酪醇具有的多重保健功效, 目前在缓解体力疲劳、缓解视疲劳、辅助降血糖等功能声称的保健食品中多有使用, 而我国近年来对其生物活性及制备工艺报道文章较多, 在其保健食品中含量检测方面报道较少, 并且目前现有的食品标准中尚未有羟基酪醇的检测方法, 本文通过测定上述, 从而建立测定保健食品中羟基酪醇含量的检测方法。

本研究建立了高效液相色谱法测定保健食品中羟基酪醇的含量, 为保健食品中羟基酪醇的质量控制及含量检测提供技术支持, 同时为保健食品生产企业的质量控制及监管提供相关依据。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

羟基酪醇标准品(纯度 96.9%, 批号: F3030008, ANPEL 公司); 甲醇、甲酸、二甲基亚砜(色谱纯, 德国 MERCK 公司); 实验用水为超纯水。

保健食品样品为企业提供, 宣称功能类别分别为缓解视疲劳胶囊(1 号样品)、辅助降血糖胶囊(2 号样品)、缓解体力疲劳胶囊(3 号样品), 共 3 批。

2.2 设备与仪器

Waters e2695 液相色谱仪(配二极管阵列检测器, 美国沃特世公司); Sartorius BT25S 电子分析天平(德国赛多利斯公司); AE-240 电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); KQ-500D 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司); CF16RN 型离心机(日本日立公司)。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters spherisorb ODS2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 0.12%甲酸水溶液: 0.12%甲酸甲醇溶液=85:15(V:V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 进样量 10 μL。

2.4 测定方法

2.4.1 标准溶液的配制

称取羟基酪醇标准品 0.1 g, 精确至 0.0001 g, 置于

100 mL 容量瓶中, 用二甲基亚砜溶解并定容, 摇匀, 配制成质量浓度为 1.000 mg/mL 的标准品储备液。分别精密吸取上述羟基酪醇标准储备溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用二甲基亚砜稀释并定容至刻度, 摇匀, 制成浓度分别为 10、20、40、80、100、200、300、400 μg/mL 的标准工作溶液, 实际浓度分别为 12.45、24.90、49.80、99.60、124.5、249.0、373.5、498.0 μg/mL。

2.4.2 样品处理

称取研细混匀的样品约 0.5 g, 精确至 0.0001 g。置于 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入二甲基亚砜 50 mL, 称定重量, 超声提取 30 min(40 KHz, 500 W), 放置室温, 用二甲基亚砜补足重量, 摇匀, 经 0.45 μm 有机系微孔滤膜过滤后, 滤液供液相色谱测定。

3 结果与分析

3.1 样品前处理条件的选择

羟基酪醇易溶于二甲基亚砜, 现有文献报道样品前处理中羟基酪醇的提取方式主要有加热回流提取、离子交换树脂、超声提取等方式^[14-19], 而超声提取方式是目前样品中羟基酪醇提取的主要方式, 所以本方法采用二甲基亚砜超声提取样品中的羟基酪醇, 再离心取上清液经有机系微孔滤膜过滤后上机测定, 同时经过方法学验证, 精密度及回收率良好, 方法快速简便, 满足保健食品中羟基酪醇的检测要求。

3.2 流动相的选择

目前检测羟基酪醇的流动相体系主要有甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸、乙腈-0.3%磷酸水溶液、甲酸水-甲酸甲醇等流动相系统^[14-19], 由于在样品的分离分析过程中, 流动相的 pH 值是否合适直接影响羟基酪醇的峰型、灵敏度及分离度, 而且羟基酪醇在色谱柱上的保留较弱, 选用 0.12%甲酸水溶液: 0.12%甲酸甲醇溶液=85:15(V:V)作为流动相时, 由于流动相中含有甲酸, 使得羟基酪醇的色谱峰形尖锐, 同时由于流动相中水相比例较大, 保留时间增加, 分离度好, 同时甲醇比乙腈毒性更小, 因此采用 0.12%甲酸水溶液: 0.12%甲酸甲醇溶液=85:15(V:V)作为本实验体系的流动相。

3.3 检测波长的选择

用二极管阵列检测器在 200~400 nm 范围内对羟基酪醇标准品进行扫描, 结果表明, 羟基酪醇的最大吸收波长分别为 222 nm 和 280 nm, 而由于 222 nm 属于末端吸收, 同时分别在 222 nm、280 nm 提取色谱图后发现羟基酪醇在 280 nm 波长处峰型及响应都好于 222 nm, 满足实验要求, 因此检测波长设为 280 nm。羟基酪醇的最大紫外吸收峰及 222 nm 标准色谱图、280 nm 标准色谱图分别见图 1~3。

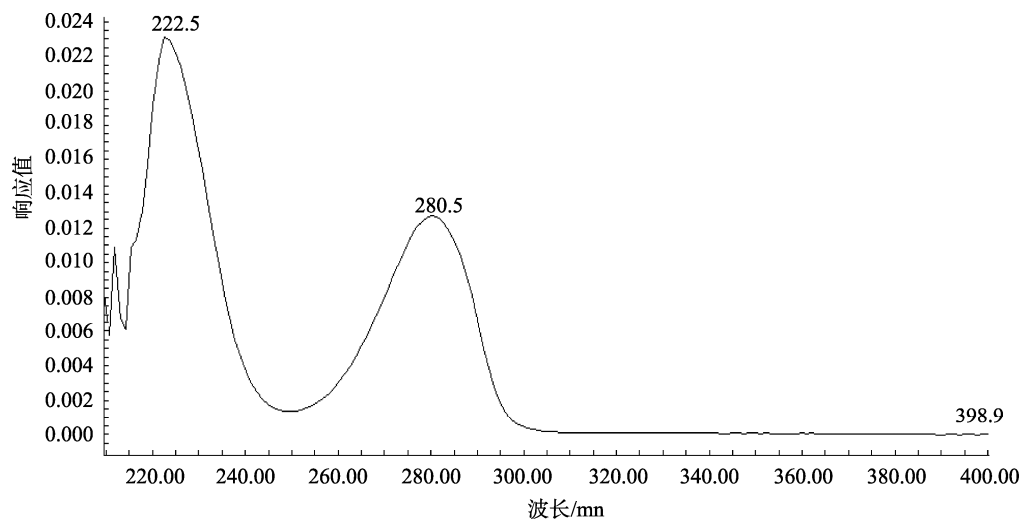


图 1 羟基酪醇的最大紫外吸收峰
Fig.1 Maximum ultraviolet absorption peaks of hydroxytyrosol

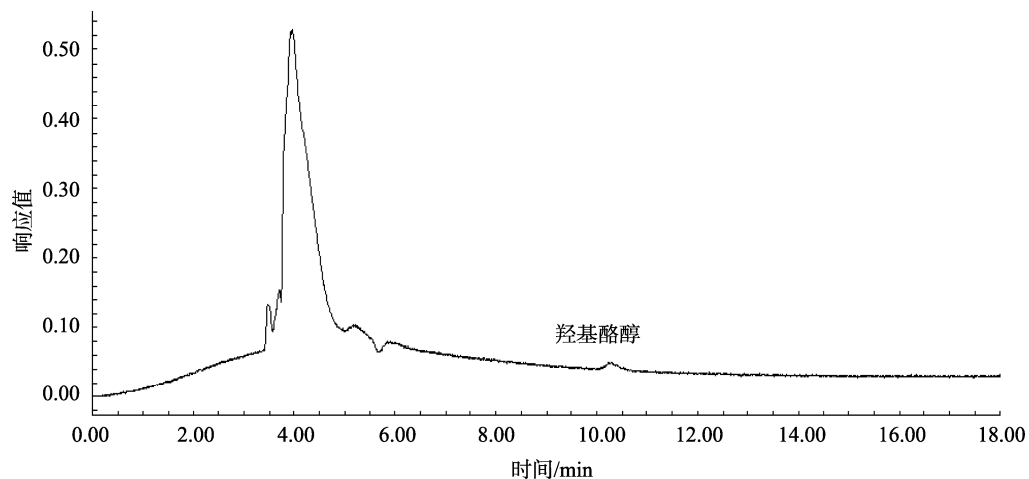


图 2 羟基酪醇的标准色谱图(222 nm)
Fig.2 Standard chromatogram of hydroxytyrosol(222 nm)

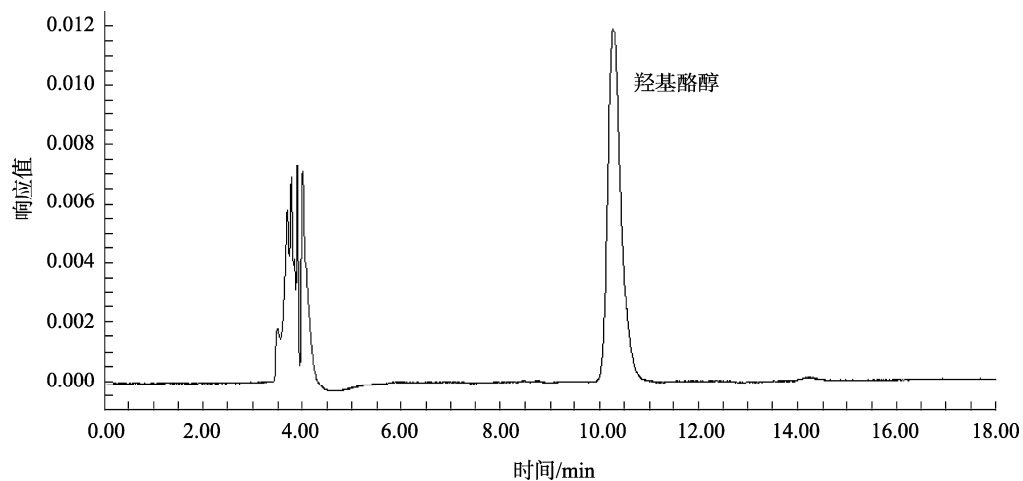


图 3 羟基酪醇的标准色谱图(280 nm)
Fig.3 Standard chromatogram of hydroxytyrosol(280 nm)

3.4 线性范围、相关系数与检出限

对羟基酪醇标准工作溶液进行液相色谱分析,以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,线性关系较好,回归方程和相关系数见表 1。分别以 3 倍信噪比($S/N=3$)、

10 倍信噪比($S/N=10$)计算检出限和定量限,羟基酪醇的检出限(limit of detection, LOD)、定量限(limit of quantitation, LOQ)见表 1,羟基酪醇空白色谱图、标准色谱图及样品色谱图见图 4~6。

表 1 羟基酪醇的线性回归方程、相关系数、线性范围、检出限、定量限
Table 1 Regression equation, correlation coefficient, linear range, LOD and LOQ of hydroxytyrosol

名称	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	线性回归方程	相关系数	LOD/ $(\text{g}/100\text{ g})$	LOQ/ $(\text{g}/100\text{ g})$
羟基酪醇	12.45 ~ 498.0	$Y=4440X-13600$	0.9999	0.03	0.12

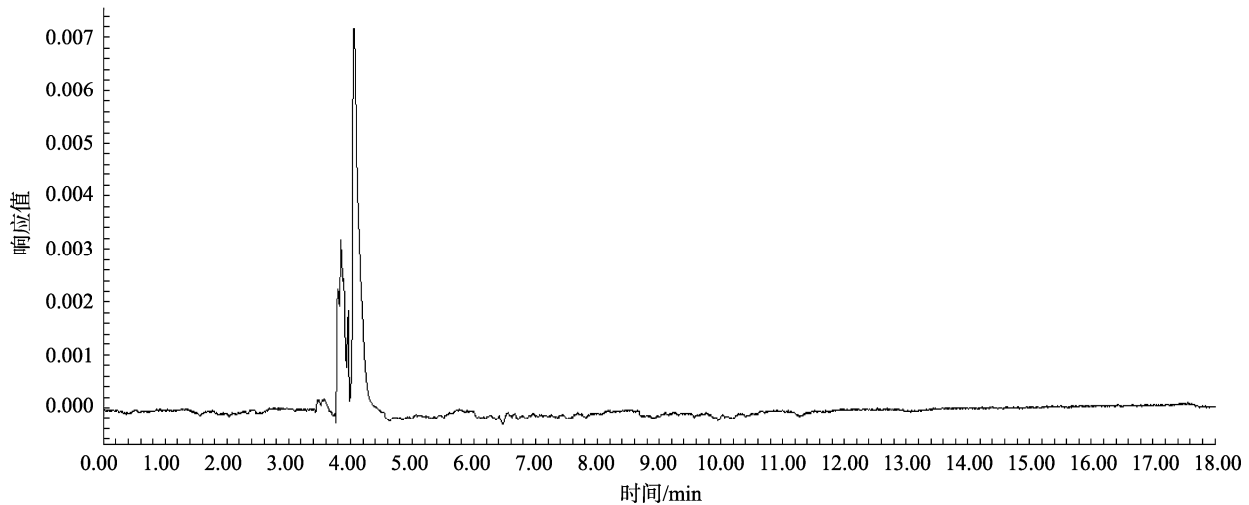


图 4 羟基酪醇的空白色谱图

Fig.4 Blank chromatogram of hydroxytyrosol

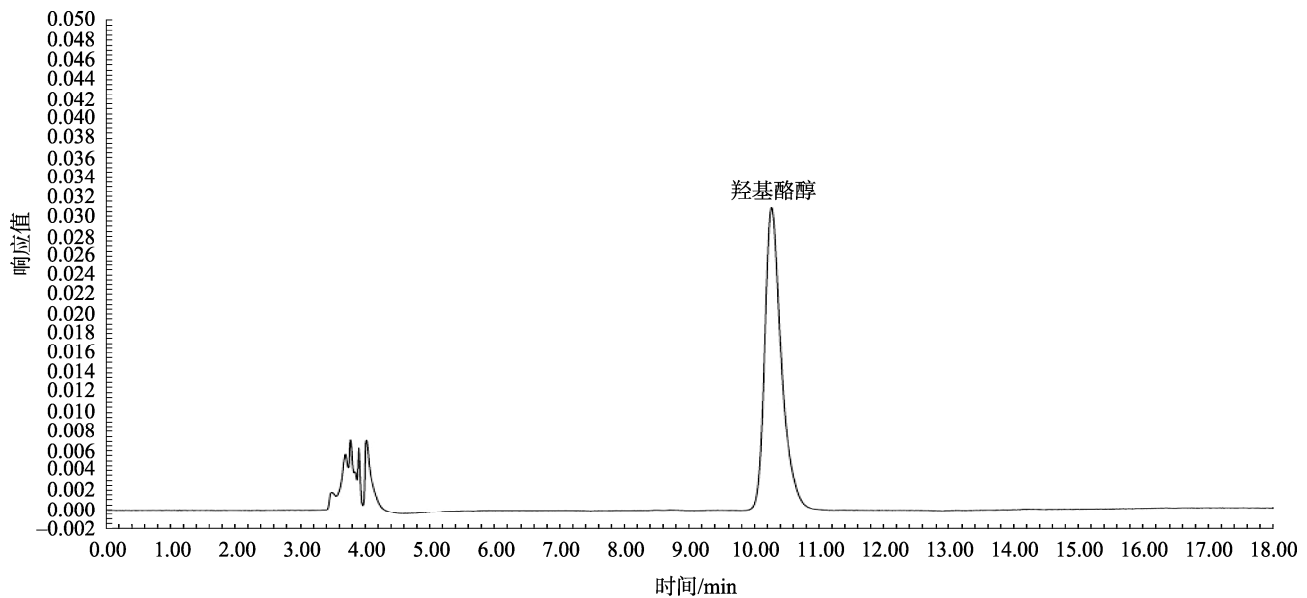


图 5 羟基酪醇的标准色谱图

Fig.5 Standard chromatogram for hydroxytyrosol

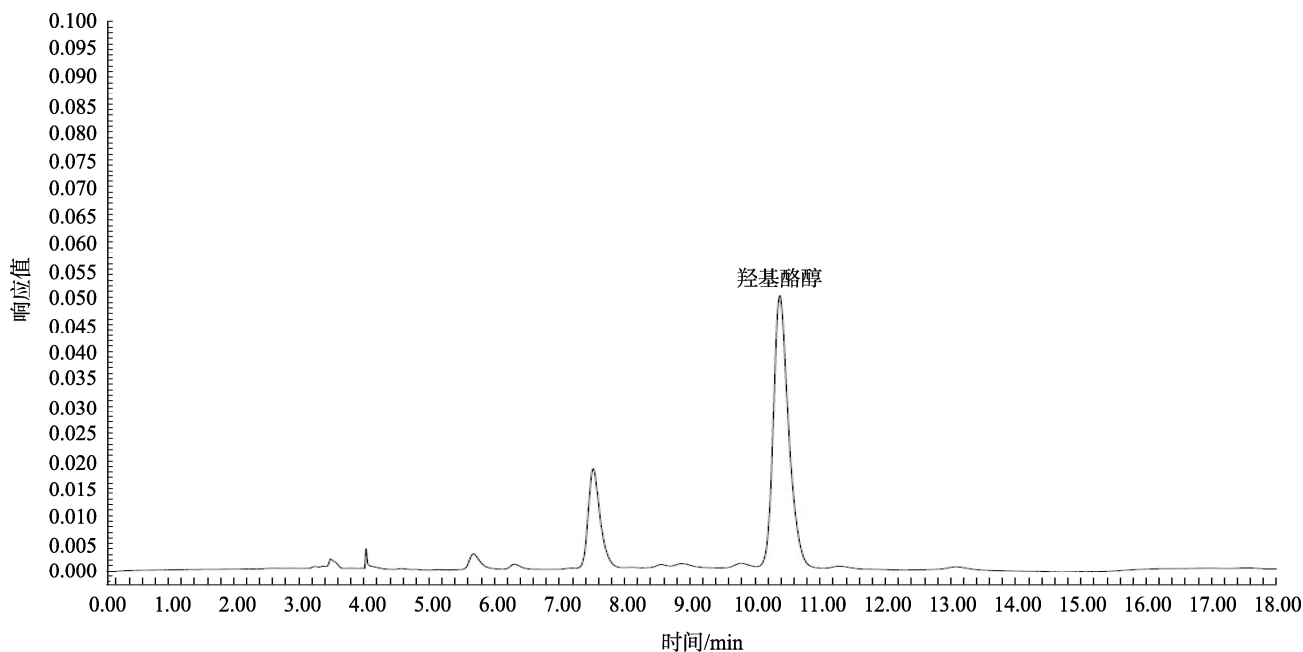


图 6 羟基酪醇的样品色谱图

Fig.6 Sample chromatogram of hydroxytyrosol

3.5 方法精密度及回收率

按照样品处理方法分别对 3 种功能声称的保健食品样品进行了羟基酪醇含量的测定实验及 3 个水平的加标实验, 样品含量测定结果的相对标准偏差在 0.34%~0.60%, 3

个水平加标实验回收率在 99.5%~100.6%, 相对标准偏差在 0.55%~1.13%, 样品测定含量、加标回收率以及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)见表 2。结果表明该方法回收率和精密度符合要求。

表 2 羟基酪醇的测定结果、精密度、回收率($n=3$)Table 2 Determination results, precision and recoveries of hydroxytyrosol($n=3$)

样品编号	含量平均值/(g/100 g)	RSD/%	添加浓度/(2.5 g/100 g)		添加浓度/(5.0 g/100 g)		添加浓度/(7.5 g/100 g)	
			平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
1	9.2	0.60	99.7	0.89	99.8	0.82	99.8	0.70
2	16.0	0.34	99.5	0.55	99.8	1.00	100.2	0.86
3	10.5	0.49	99.9	0.89	99.9	0.84	100.6	1.13

4 结 论

本研究建立了测定保健食品中羟基酪醇的检测方法, 实验过程简洁、快速、实用。同时, 本实验通过对含有羟基酪醇的保健食品进行含量测定, 并通过方法精密度、回收率等方法学实验验证了本检测方法, 在 12.45~498.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 该方法的检出限和定量限分别为 0.03 g/100 g 和 0.12 g/100 g, 加标回收率为 99.5%~100.6%, 相对标准偏差为 0.55%~1.13%。本方法简单、快速、准确, 前处理简单, 适合于硬胶囊类保健食品中羟基酪醇的测定。

参考文献

- [1] 杨子琪, 龙建纲, 刘健康. 羟基酪醇的生物学活性及其代谢特征[J]. 中国药理学通报. 2016, 32(9): 1189-1193.
Yang ZQ, Long JG, Liu JK. The biological effect and metabolic characteristics of hydroxytyrosol [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(9): 1189-1193.
- [2] 刘娜, 白万明, 韩锐, 等. 橄榄油加工废弃物中的活性成分及其综合利用技术研究进展[J]. 中国油脂, 2016, 41(5): 84-88.
Liu N, Bai WM, Han R, et al. Active ingredients of olive oil processing wastes and their comprehensive utilization technique: a review [J]. China Oils Fats, 2016, 41(5): 84-88.

- [3] 赵艳霞, 卜文文, 刘常金, 等. 油橄榄叶羟基酪醇提取工艺优化及抗氧化研究[J]. 食品工业, 2017, 38(4): 8–13.
Zhao YX, Bu WW, Liu CJ, *et al.* Study on extraction processing optimization of hydroxytyrosol from olive leaves and their antioxidant activities [J]. Food Ind, 2017, 38(4): 8–13.
- [4] Leonardis A, Macciola V, Lembo G, *et al.* Studies on oxidativestabilization of lard by natural antioxidants recovered from oliveoilmill wastewater [J]. Food Chem, 2007, 100(3): 998–1004.
- [5] Owen RW, Haubner R, Hull WE, *et al.* Olive and olive oil incancer prevention [J]. Eur J Cancer Prev, 2004, 13(4): 319–326.
- [6] Esparter MM. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol andhydrox tyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia – reoxygenatio [J]. Neurosci Lett, 2008, 11(3): 143–148.
- [7] Visioli F, Galli C. Olive oil phenols and their potential effects on human health [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(10): 4292–4296.
- [8] 刘威振, 张兴, 陈新建, 等. 羟基酪醇药理作用研究进展[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 685–687.
Liu WZ, Zhang X, Chen XJ, *et al.* Research progress on pharmacological actions of hydroxytyrosol [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2012, 28(6): 685–687.
- [9] 高凤, 王林, 徐静, 等. 羟基酪醇的抗氧化作用[J]. 中国食物与营养, 2013, 19(7): 71–73.
Gao F, Wang L, Xu J, *et al.* Anti-oxidative effect of hydroxytyrosol [J]. Food Nutr Chin, 2013, 19(7): 71–73.
- [10] Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosac L, *et al.* Hydroxytyr osol: From laboratory investigations to future clinical trials [J]. Nutr Rev, 2010, 68(4): 191–206.
- [11] 罗思源, 杨秋瑜, 李敏, 等. 羟基酪醇抑菌活性及抑菌稳定性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31: 843–849, 894.
Luo SY, Yang QY, Li M, *et al.* Antibacterial activity and stability of hydroxytyrosol [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31: 843–849, 894.
- [12] 罗成, 刘健康. 羟基酪醇抗肿瘤机制研究进展[J]. 中国科学, 2014, 44(1): 14–20.
Luo C, Liu JK. Advances in anti-cancer mechanisms of hydroxytyrosol [J]. Sci Sin (Vit), 2014, 44(1): 14–20.
- [13] 罗成, 刘健康. 羟基酪醇作为线粒体营养素的调控机制[J]. 生命科学, 2012, 24: 1114–1120.
Luo C, Liu JK. The regulation mechanism of hydroxytyrosol as a mitochondrial nutrient [J]. Chin Bull Life Sci, 2012, 24: 1114–1120.
- [14] 王强, 王锴, 黄梅桂, 等. LLE-UPLC-FLD 法测定橄榄油中羟基酪醇和酪醇的含量[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 233–238.
Wang Q, Wang K, Huang MG, *et al.* Determination of the contents of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil by liquid-liquid extraction and UPLC-FLD [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(9): 233–238.
- [15] 万茵, 黄婧嫣, 苏昱, 等. HPLC 同时测定毛蕊花糖苷、咖啡酸和羟基酪醇[J]. 分析试验室, 2016, 35(1): 30–33.
Wan Y, Huang JY, Su Y, *et al.* Simultaneous determination of acteoside, caffeic acid and hydroxytyrosol by HPLC [J]. Chin J Anal Lab, 2016, 35(1): 30–33.
- [16] 廖晓燕, 洪圆, 姜雯文, 等. HPLC-荧光法测定酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(24): 3064–3067.
Liao XY, Hong Y, Jiang WW, *et al.* Determination of hydroxytyrosol, salidroside and tyrosol in wine-fried ligustri lucidi fructus by HPLC with fluorescence detection [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2019, 36(24): 3064–3067.
- [17] 冯哈河, 崔玉婷, 毕金森, 等. UPLC-UV 法分离分析橄榄叶及生物样本中的羟基酪醇[J]. 分析试验室, 2020, 39(7): 800–805.
Feng HK, Cui YT, Bi JM, *et al.* An UPLC method for determination of hydroxytyrosol in extraction of olive leaf and several biosamples with UV detection [J]. Chin J Anal Lab, 2020, 39(7): 800–805.
- [18] 张亮, 曹欢, 孙佳琳, 等. HPLC 测定紫丁香叶中羟基酪醇含量[J]. 中医药学报, 2014, 42(3): 55–57.
Zhang L, Cao H, Sun JL, *et al.* Determination of hydroxytyrosol in *Syringa oblata* lindl. leaf by HPLC [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2014, 42(3): 55–57.
- [19] 管庆霞, 华晓丹, 张亮, 等. HPLC 同时测定丁香叶中丁香苦苷和羟基酪醇含量[J]. 中医药信息, 2015, 32(1): 1–3.
Guan QX, Hua XD, Zhang L, *et al.* Simultaneous determination of syringopicroside and hydroxytyrosol in folium syringae by HPLC [J]. Inf Tradit Chin Med, 2015, 32(1): 1–3.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



吕卓, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验。
E-mail: 22273865@qq.com



李涛, 主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验、食品安全快速检测技术研究。
E-mail: westyx@126.com