

紫外分光光度法测定保健食品中总蒽醌的含量

潘小红¹, 钟庆元¹, 刘玉玲¹, 周利平^{2*}

(1. 湖南省食品药品检验研究院, 长沙 410001; 2. 湖南省科技交流交易中心, 长沙 410001)

摘要: **目的** 建立测定保健食品中总蒽醌含量的紫外分光光度法。**方法** 通过对仪器条件、呈色稳定性、提取方式、萃取溶剂及水解酸选择等条件的试验研究, 优化紫外分光光度计测定总蒽醌含量的方法。**结果** 样品以混合酸为提取剂, 直火加热回流 30 min, 用乙醚萃取, 用混合碱显色, 以 518 nm 为检测波长。试验平均回收率为 97.08%, 相对标准偏差为 3.96%($n=9$), 1, 8-二羟基蒽醌在 0.0020~0.0252 mg/mL 浓度范围内呈良好线性关系($r^2=0.9996$)。样品可于 40~75 min 内测定且稳定性良好。**结论** 本方法操作简便、稳定性好且仪器设备成本较低, 适用于保健食品中总蒽醌含量的测定。

关键词: 总蒽醌; 保健食品; 紫外分光光度法; 1, 8-二羟基蒽醌

Determination of total anthraquinones in health foods by ultraviolet spectrophotometry

PAN Xiao-Hong¹, ZHONG Qing-Yuan¹, LIU Yu-Ling¹, ZHOU Li-Ping^{2*}

(1. Hunan Institute for Food and Drug Control, Changsha 410001, China; 2. Hunan Science and Technology Exchange Center, Changsha 410001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of total anthraquinone in health foods by ultraviolet spectrophotometry. **Methods** The methods for determination of total anthraquinones were optimized by studying on the instrument conditions, color stability, extraction methods, extraction solvents and hydrolysis acid choice and so on. **Results** Samples were extracted with mixed acid as extraction agent, with the direct heat reflux for 30 min, and then extracted by ether. Using mixed alkali to present color reaction, samples were detected at the wavelength of 518 nm. The average recovery of the detection was 97.08%, and the relative standard deviation (RSD) was 3.96%. 1, 8-dihydroxy anthraquinone had a good linear relationship at the range of 0.0020~0.0252 mg/mL ($r^2=0.9996$), and samples could be measured within 40~75 min with good stability. **Conclusion** The established method has the advantages of simple operation, good stability and low cost, and is suitable for the determination of the content of total anthraquinone in health foods.

KEY WORDS: total anthraquinone; health foods; ultraviolet spectrophotometry; 1,8-dihydroxy anthraquinone

1 引言

蒽醌类化合物(anthraquinones)是熟大黄、制大黄、生何首乌、制何首乌、芦荟、番泻叶和决明子等中草药的功

效成分或标志性指标, 具有抗菌消炎、抗病毒、抗癌、保肝利胆、明目、改善慢性肾衰、促智、抗衰老、抗诱变和防紫外线等作用^[1,2], 在保健食品中的应用日益广泛。

目前, 我国对保健食品中总蒽醌含量的测定还没有

*通讯作者: 周利平, 副研究员, 主要研究方向为科技成果推广、产业技术转移和科技金融等。E-mail: 284902963@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Li-Ping, Associate Research Fellow, Hunan Science and Technology Exchange Center, No. 59, Bayi Road, Furong District, Changsha 410001, China. E-mail: 284902963@qq.com

建立国家标准,对总蒽醌含量的限量也没有相应的国家标准规定,《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)亦未收录,保健食品的企业标准规定的总蒽醌测定方法各不相同^[3,4]。根据德国联邦宣布,含蒽醌类植物泻药可能有遗传毒性和致肿瘤作用,长期服用可致水盐代谢和肠功能紊乱,必须限制每天最大用量和连续给药时间^[5]。因此,我国必须建立测定保健食品中总蒽醌含量的方法。

本研究借鉴了我国保健食品企业标准及文献资料中总蒽醌含量测定方法^[6-17]以及蒽醌类化合物的理化性质。一方面,天然中草药中蒽醌类母核上常有羟基、羟甲基、甲氧基和羧基取代,形成一系列蒽醌衍生物,其中羟基蒽醌衍生物及其甙类是中草药中的活性成分,羟基蒽醌类在碱性溶液中会显红~紫红色反应(Borntrager反应),此反应是鉴定中草药中羟基蒽醌类成分存在的最常用方法之一;另一方面,总蒽醌成分包括蒽醌衍生物及其不同程度的还原产物,如氧化蒽酚、蒽酚、蒽酮及蒽酮的二聚体等^[18-20],成分复杂、种类较多。有文献报道,芦荟中蒽醌类化合物就包括26种有效成分^[21],《中华人民共和国药典》(2015年版)中大黄的含量测定选择了5种有效成分^[22]。由于保健食品中原料种类较多,总蒽醌的成分比较多,采用高效液相色谱方法测定,标准品种类的确定与购买均存在一定困难,因此本研究选择以1,8-二羟基蒽醌计,用紫外分光光度法测定蒽醌总量,通过对该方法的提取方式、萃取溶剂、水解剂等研究,建立稳定性好、显色灵敏、操作简便且仪器设备成本较低并适用于保健食品中总蒽醌含量测定的方法,为我国保健食品中总蒽醌检测标准的建立提供参考。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

从2015年湖南省保健食品国家风险监测宣称含总蒽醌的保健食品中选取11个品种,分别为市售的爱东牌银杏芦荟茶、乌鸡人参口服液、百合康牌参茸软胶囊、丽人牌妮可胶囊、典奥牌依唯胶囊、易丽牌畅清软胶囊、女人缘牌减肥茶、绿婷牌绿婷减肥胶囊、三草牌芦荟畅通胶囊、博旺牌圣西德堡胶囊和炎农神牌银兰胶囊。

2.2 仪器与试剂

UV-2450型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);DG500超声波处理仪(无锡锡山德嘉电子有限公司)。

1,8-二羟基蒽醌标准品:批号为0829-9702,购自中国药品生物制品检定所。

乙醚、氢氧化钠、氨水、盐酸、冰醋酸、硫酸及三氯甲烷为分析纯,购自国药集团。

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液的配制

1,8-二羟基蒽醌标准储备溶液:精密称取1,8-二羟基

蒽醌标准品16.82 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀备用(浓度为0.3364 mg/mL)。

1,8-二羟基蒽醌标准工作溶液:精密吸取1,8-二羟基蒽醌标准储备溶液2 mL至10 mL的容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。精密吸取0、0.02、0.08、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0和2.5 mL分别置于10 mL容量瓶中,加混合碱液(10%氢氧化钠和4%氨水等体积比混合)定容至刻度,摇匀,于暗处放置40 min,以混合碱液为空白,在518 nm波长处测定吸光度。

2.3.2 仪器条件

采用紫外分光光度法,以试剂溶液为空白,在190~900 nm波长范围内扫描,确定其最大吸收波长。

2.3.3 样品前处理

固体样品:精密称取0.1~1 g样品(精确至0.0001 g);液体样品:精密量取1~50 mL样品(精确至0.01 mL),加热浓缩至1~2 mL(取样量根据样品中总蒽醌含量确定),于100 mL锥形瓶中,加混合酸溶液(2 mL 25%盐酸+18 mL冰醋酸)10 mL混匀,加热回流30 min,放冷;加乙醚40、30、20 mL提取3次,振摇,放冷,转移至分液漏斗中;用30、20 mL水振摇洗涤2次,弃去水洗液,取乙醚液用50、20、20 mL混合碱溶液提取3次,合并碱提取液,置100 mL容量瓶中,加混合碱溶液(10%氢氧化钠和4%氨水等体积比混合)至刻度,混匀,于暗处放置40 min,以混合碱溶液为空白,于30 min内测定。

2.3.4 显色稳定性研究

选取标准曲线低浓度0.8056 μg/mL、中浓度8.0560 μg/mL、高浓度25.1750 μg/mL 3个标准工作溶液于暗处放置,每隔5 min测定一次吸光度,共计80 min。

2.3.5 提取方式的选择

本研究参考了爱东牌银杏芦荟茶、乌鸡人参口服液、百合康牌参茸软胶囊、丽人牌妮可胶囊、典奥牌依唯胶囊、易丽牌畅清软胶囊、女人缘牌减肥茶、绿婷牌绿婷减肥胶囊、三草牌芦荟畅通胶囊、博旺牌圣西德堡胶囊、炎农神牌银兰胶囊及黄媛等企标中总蒽醌含量的测定方法^[6-17]。以湖南省博旺牌圣西德堡胶囊样品为试验对象,加混合酸溶液10 mL,混匀,分别采用超声提取、沸水浴加热提取和直火加热回流方式提取,其余同2.3.3“加热回流30min”以下。

2.3.6 水解酸的选择

分别采用(1)0.25 mol/L硫酸、(2)2.5 mol/L硫酸、(3)0.5 mol/L盐酸、(4)5 mol/L盐酸和(5)混合酸(2 mL 25%盐酸+18 mL冰醋酸)5种酸液,进行直火加热回流提取,其余同2.3.3“加热回流30min”以下。

2.3.7 萃取溶剂的选择

分别采用三氯甲烷、乙醚对混合酸直火加热提取的样品进行萃取,比较吸光值。

3 结果与分析

3.1 仪器及检测波长的选择

1, 8-二羟基蒽醌标准溶液在 190~900 nm 波长范围内光谱扫描图见图 1, 从图中可以确定, 最大吸收波长为 518 nm。

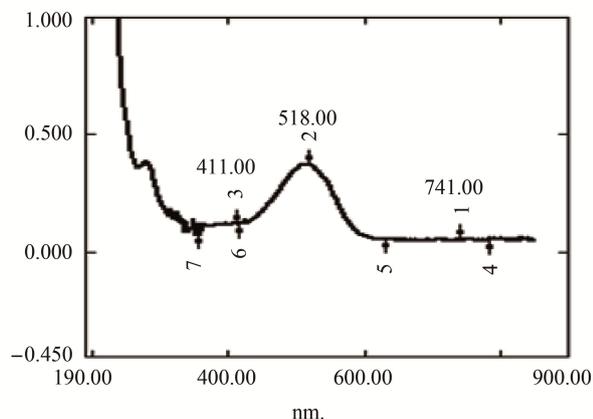


图 1 1, 8-二羟基蒽醌紫外吸收光谱
Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of 1,8-dihydroxy anthraquinone

3.2 线性结果分析

以浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线见图 2。结果表明, 1, 8-二羟基蒽醌在浓度 0.0020~0.0252 mg/mL 范围内线性关系良好。

3.3 呈色稳定性考察

呈色稳定性结果见图 3。结果表明, 蒽醌在碱液中 40~75 min 时吸光度值并无显著性差异, 样品稳定性良好; 75 min 后, 吸光度值开始下降。因此, 确定样品于在 30 min 内测定吸光度。

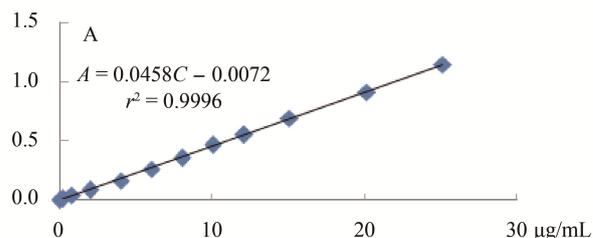


图 2 1, 8-二羟基蒽醌标准曲线
Fig. 2 Standard curve of 1, 8-dihydroxy anthraquinone

3.4 提取方式的选择

蒽醌成分包括蒽醌衍生物及其不同程度的还原产物, 如氧化蒽酚、蒽酚、蒽酮及蒽酮的二聚体等, 以上 3 种主要的蒽醌类衍生物在植物体内主要以游离苷元和与糖结合成氧苷 2 种形式存在, 羟基蒽醌以及具有游离酚羟基的蒽醌苷在碱性溶液中均可呈色, 但蒽酚、蒽酮、二蒽酮类化合物需氧化形成羟基蒽醌类化合物, 结合态需要水解后才能呈色^[20]。本研究采用超声提取、沸水浴加热提取、直火加热回流提取、混合酸超声水解提取、混合酸沸水浴提取和混合酸直火加热回流水解提取这 6 种方式进行提取, 各自的吸光度测定结果见图 4。

从图 4 就可以看出, 以吸光度值为参考, 采用超声提取<加热回流提取、直火加热回流提取<混合酸超声水解提取<混合酸沸水浴提取<混合酸直火加热回流水解。分析原因可能是: 一方面, 样品中结合态蒽醌较多, 加酸水解后结合态可游离出来; 另外, 超声提取、沸水浴提取温度均没有达到完全水解的条件, 故选择混合酸直火加热回流水解方式。

3.5 水解酸类型及浓度的选择

加不同酸的加热回流提取结果见图 5, 结果表明, 不同的酸提取效果不一样, 同样浓度下盐酸>硫酸, 混合酸>盐酸。因此, 本试验选择加混合酸提取。

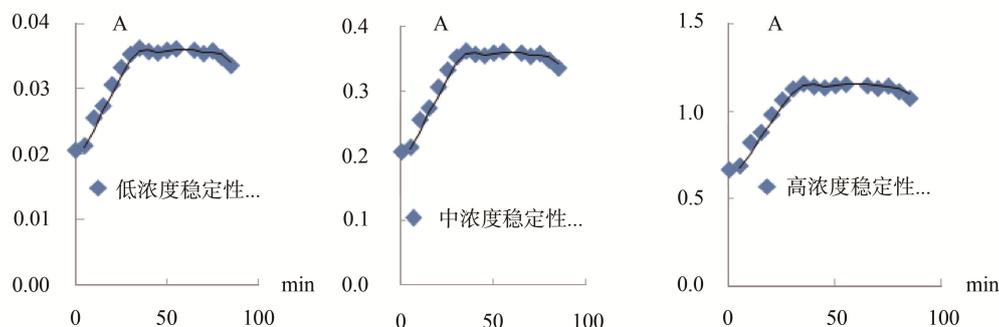


图 3 1, 8-二羟基蒽醌呈色稳定性曲线
Fig. 3 Colour stability curves of 1, 8-dihydroxy anthraquinone

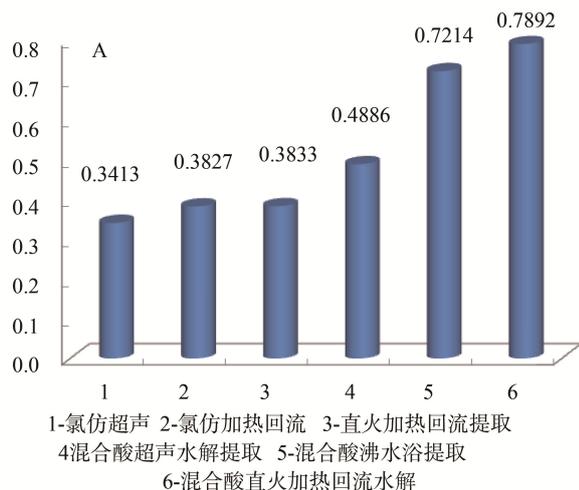


图4 不同提取方式的提取效果

Fig. 4 Extraction effects of different extraction methods

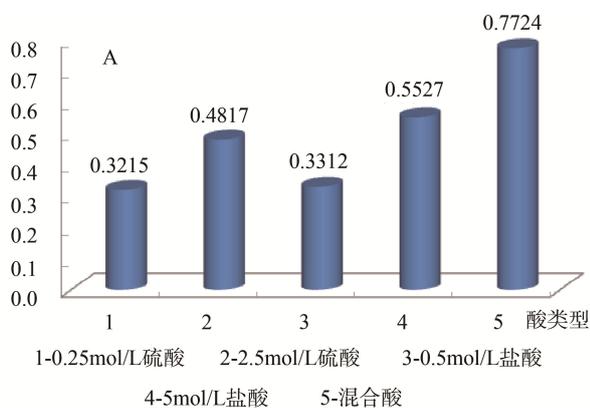


图5 不同水解酸的提取效果

Fig. 5 Extraction effects of different acids hydrolysis

3.6 萃取溶剂的选择

样品加酸加热水解回流, 结合态分解成游离态。据参考文献^[2,4]报道, 游离的蒽醌类极性较小, 一般可溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、苯及氯仿等有机溶剂, 微溶或不溶于水。考虑用碱溶液分离呈色, 而苯具有致癌性, 因此选择极性极小的乙醚、氯仿作为萃取溶剂, 吸光度测定结果分别为 0.7724 和 0.4123, 即用乙醚提取的效果大于三氯甲烷的提取效果。因此, 本试验选择乙醚为萃取剂。

3.7 回收率

根据优化的条件, 对样品进行回收率实验。精密称取已知含量的博旺牌圣西德堡胶囊样品 9 份(总蒽醌含量为 17.9752 mg/100 g), 每 3 份一组, 共 3 组, 分别加入 1, 8-二羟基蒽醌储备溶液(浓度为 0.3364 mg/mL)0.3、1.2 和 3.5 mL, 与样品同处理, 回收率见表 1。

3.8 样品测定

根据优化的结果, 选取湖南省国家抽验的 6 个品种, 进行总蒽醌含量的测定, 并与其企业标准规定的方法进行含量对比, 测定结果见表 2。

从表 2 中可以看出, 除乌鸡人参口服液、爱东牌银杏芦荟茶基本一致外, 典奥牌依唯胶囊、百合康牌参茸软胶囊、易丽牌畅清软胶囊和丽人牌妮可胶囊测定结果均有不通程度的增加, 尤其是百合康牌参茸软胶囊与典奥牌依唯胶囊, 结果增加非常明显。分析原因可能是乌鸡人参口服液、爱东牌银杏芦荟茶中总蒽醌主要为游离蒽醌, 其他保健食品品种中结合态蒽醌含量较高, 优化后的方法能够将结合态蒽醌充分水解为游离态并提取出来。

表 1 回收率结果(n=9)

Table 1 Results of recovery (n=9)

取样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
5.0234	0.9030	0.1009	0.9988	95.00	97.08	3.96
5.1324	0.9226	0.1009	1.0156	92.24		
4.9728	0.8939	0.4037	1.2762	94.70		
5.0512	0.9080	0.4037	1.3040	98.10		
5.0114	0.9008	1.1774	2.0799	100.14		
5.0107	0.9007	1.1774	2.1050	102.29		

表2 样品测定结果对比
Fig. 2 Comparison of the results of samples

项目	样品名称	企业标准测定结果(mg/100g)	本试验测定结果(mg/100g)
1	爱东牌银杏芦荟茶	0.85	0.88
2	乌鸡人参口服液	0.63	0.64
3	百合康牌参茸软胶囊	45.23	57.14
4	丽人牌妮可胶囊	102.94	110.72
5	典奥牌依唯胶囊	42.99	50.77
6	易丽牌畅清软胶囊	1004	1022

4 讨论

本研究应用紫外分光光度法测定总蒽醌的含量,测定羟基蒽醌类化合物的平均回收率为97.08%,相对标准偏差为3.96%,呈色稳定、稳定性好、操作简便且仪器设备成本较低,适用于保健食品中总蒽醌含量的测定。

本研究发现,加酸加热回流及回流后样品是否含有残渣对总蒽醌含量的结果影响非常大。本研究所有测定均采用直火加热回流方式,且残渣均未进行过滤,而选择残渣由乙醚萃取后溶于碱液中。目前尚未对残渣中是否需要过滤进行系统的研究,期望后期能够对此展开实验工作。

本研究尚未将紫外分光光度法与高效液相色谱法的含量测定进行方法比对,此后工作可考虑选择已知蒽醌总类的保健食品品种,如原料含大黄药材,用紫外分光光度法及高相液相色谱法同时测定含量,进行蒽醌总量的仪器方法比对,以便实现不同产品质量需求。

参考文献

- [1] 曹亮,周建军. 蒽醌类化合物的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(3): 237-238.
Cao L, Zhou JJ. Research progress in the research of the compounds of the anthraquinone [J]. Northwest Pharm J, 2009, 24(3): 237-238.
- [2] 李军生. 蒽醌衍生物毒副作用与部分中草药保健食品潜在安全风险分析[C]. 药用植物化学与中药有效成分分析研讨会论文集(上), 2008: 172-174.
Li JS. Analysis of the anthraquinones' cytotoxicity and the potential safety risk of Chinese herbal medicine-containing health foods [C]. Symposium on the analysis of medicinal plant chemistry and effective components of traditional Chinese Medicine (volume one), 2008: 172-174.
- [3] 国家标准网[EB/OL]. (2016-01-01) [http://cx.spsp.gov.cn/index.aspx?Token=\\$Token&First=First](http://cx.spsp.gov.cn/index.aspx?Token=$Token&First=First). National standard network [EB/OL]. [2016-01-01]. [http://cx.spsp.gov.cn/index.aspx?Token=\\$Token&First=First](http://cx.spsp.gov.cn/index.aspx?Token=$Token&First=First).
- [4] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[S].
The ministry of Health of the People's Republic of China. Health food inspection and evaluation of technical specifications(2003 Edition) [S].
- [5] 萧惠来. 德国限制使用含蒽类化合物的植物泻药[J]. 中药新药与临床药理, 1998, 9(3): 188-189.
Xiao HL. The restriction of the use of the anthracene compounds of plant laxative in Germany [J]. Tradit Chin Med Clin Harm, 1998, 9(3): 188-189.
- [6] Q/FSXHK0001J-2013 典奥牌依唯胶囊 北京杏华康医药科技有限公司企业标准[S].
Q/FSXHK0001J-2013 Dian ao pai yi wei capsule, Beijing xinghuakang pharmaceutical technology Co., Ltd. enterprise standards [S].
- [7] Q/BLW0003S-2012 丽人牌妮可胶囊 武汉百理王生物工程有限公司企业标准[S].
Q/BLW0003S-2012 Li ren pai ni ke capsule, Wuhan century king biological engineering Co., Ltd. enterprise standards [S].
- [8] Q/XAJC 0001S-2013 爱东牌银杏芦荟茶 西安佳诚药业有限公司企业标准[S].
Q/XAJC 0001S-2013 Ai dong pai yin xing lu hui tea, Xi'an jiacheng pharmaceutical Co. Ltd. enterprise standard [S].
- [9] Q/DXTJP 0079-2013 乌鸡人参口服液 北京同仁堂健康药业股份有限公司企业标准[S].
Q/DXTJP 0079-2013 Wu ji ren sheng oral liquid, Beijing tong ren tang health pharmaceutical limited by share Ltd enterprise standards [S].
- [10] Q/XZS0002S-2012 易丽牌畅清软胶囊 西安正元堂生物工程有限公司企业标准[S].
Q/XZS0002S-2012 Yi li pai chang qing soft capsule, Xi'an zhengyuantang biology engineering Co., Ltd. enterprise standard [S].
- [11] Q/RBH0010S-2012 百合康牌参茸软胶囊 荣成百合生物技术有限公司企业标准[S].
Q/RBH0010S-2012 Bai he kang pai soft capsule, Rongcheng lily biotechnology Co., Ltd. enterprise standard [S].
- [12] Q/AKJL0026S-2013 博旺牌圣西德堡胶囊 湖南金六谷药业有限公司企业标准[S].
Q/AKJL0026S-2013 Bo wang pai sheng xi de bao capsule, Hunan jinliugu pharmaceutical Co., Ltd. enterprise standard [S].
- [13] Q/CAXA004S-2013 炎农神牌银兰胶囊 湖南炎帝生物工程有限公司企

- 业标准[S].
Q/CAXA004S-2013 Yan nong pai yin lan capsule, Hunan yan biological engineering co. ltd. enterprise standard [S].
- [14] Q/SWJ 0142 S-2013 女人缘牌减肥茶 广东省食品安全企业标准[S].
Q/SWJ 0142 S-2013 Nv ren yuan pai beauty-slimming tea, Food safety in Guangdong province enterprise standard [S].
- [15] Q/KSW001-2008 绿婷牌绿婷减肥胶囊 遵义康神王生物科技有限公司企业标准[S].
Q/KSW001-2008 Lu ting pai lu ting slimming tea, Zunyi kang god biotechnology Co. Ltd. enterprise standard [S].
- [16] Q/BKYY 0001S-2013 三草牌芦荟畅通胶囊 广西博科药业有限公司企业标准[S].
Q/BKYY 0001S-2013 San cao pai lu hui chang tong capsule, Guangxi boke pharmaceutical Co Ltd enterprise standard [S].
- [17] 黄媛, 吴琼, 王晓黎, 等. 减肥茶中总蒽醌含量的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(5): 90-93.
Huang Y, Wu Q, Wang X, *et al.* Content comparisons of total anthraquinones in weight-reducing tea [J]. Food Res Dev, 2013, 34(5): 90-93.
- [18] 徐任生. 天然产物化学导论[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
Xu RS. Introduction to natural product chemistry [M]. Beijing: Science Press, 2006.
- [19] 段淑娥, 李敏. 中草药中蒽醌化合物的研究进展[J]. 西安文理学院学报, 2005, 8(1): 24-27.
Duan SE, Li M. Advances in the research of Chinese herbal medicine [J]. J Xi'an Univ Arts Sci, 2005, 8(1): 24-27.
- [20] 吴立军. 天然药物化学(第四版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
Wu LJ. Natural medicinal chemistry(4th Ed) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003.
- [21] 蔡健. 芦荟的功能成分与保健功效[J]. 食品与药物, 2006, 8(8): 27-30.
Cai J. Functional components and health function of Aloe [J]. Food Med, 2006, 8(8): 27-30.
- [22] 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.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of china (Part one) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Publishing Press, 2015.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



潘小红, 助理研究员, 主要研究方向为食品、药品、保健食品及化妆品的检验及研发。

E-mail: panxiaohong56781@163.com.



周利平, 副研究员, 主要研究方向为科技成果推广、产业技术转移、科技金融等。

E-mail: 284902963@qq.com