

高效液相色谱法测定营养强化剂中 氯化高铁血红素的含量

钟 钰^{1,2*}, 林海丹^{1,2}, 官咏仪^{1,2}, 张美金^{1,2}, 金 梦^{1,2}, 陈毓芳^{1,2}, 宋 阳^{1,2}

(1. 广东检验检疫技术中心, 广州 510623; 2. 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广州 510623)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance chromatography, HPLC)测定营养强化剂中氯化高铁血红素的含量。**方法** 采用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液提取样品, 以 Agilent TC-C₁₈ 为色谱分析柱, 流动相为 0.6% 乙酸:甲醇=30:70(V/V), 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 399 nm, 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器进行检测, 以峰面积外标法定量。**结果** 该方法在 40~140 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 r 为 0.9993, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 1.38%。**结论** 该方法操作简单、快速、准确、灵敏度高, 适合测定营养强化剂中氯化高铁血红素的含量。

关键词: 营养强化剂; 氯化高铁血红素; 高效液相色谱法

Determination of hemin in nutrient supplement by high performance liquid chromatography

ZHONG Yu^{1,2*}, LIN Hai-Dan^{1,2}, GUAN Yong-Yi^{1,2}, ZHANG Mei-Jin^{1,2},
JIN Meng^{1,2}, CHEN Yu-Fang^{1,2}, SONG Yang^{1,2}

(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China, 2. Key Laboratory of Animals and Plants and Food Import and Export of Technical Measures in Guangdong Province, Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of hemin in nutrient supplement by high performance chromatography (HPLC). **Method** The sample was extracted with 0.1 mol/L sodium hydroxide solution, and was analyzed with Agilent TC-C₁₈. The mobile phase was 0.6% acetic acid: methanol=30:70 (V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 35 °C. The detection wavelength was 399 nm, and the detection was performed by a high performance liquid chromatography-diode array detector. And the samples were quantified by peak area external standard method. **Result** The method had a good linear relationship in the range of 40-140 mg/L, the correlation coefficient r was 0.9993, and the relative standard deviations (RSDs) were less than 1.38%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and sensitive, which is suitable for the determination of hemin in nutrient supplement.

KEY WORDS: nutrient supplement, hemin, high performance chromatography

*通讯作者: 钟钰, 工程师, 主要研究方向为食品理化检测。Email: 22538570@qq.com

*Corresponding author: ZHONG Yu, Engineer, Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong-Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou, 510623, China. Email: 22538570@qq.com

1 引言

氯化血红素是一种生物铁, 作为缺铁性贫血的天然补品及药物原料, 它能被人体很好的吸收, 无毒副作用, 是现代医学公认的防治缺铁性贫血、吸收率高、效果好的生物铁源, 无铁腥味, 不刺激胃肠, 具有较好应用开发前景^[1], 其分子量为 651.94, 分子结构见图 1。氯化高铁血红素是天然血红素的体外纯化形式, 一般从猪血中提取, 在医药、食品、化工、保健品、建筑以及化妆品行业中有广泛的应用。在食品工业中, 氯化高铁血红素可代替肉制品中的发色剂亚硝酸盐和人工合成色素; 在制药行业中, 它可作为半合成胆红素原料, 是抗贫血和抗肿瘤药物的重要原材料^[2-4]。

氯化高铁血红素是现今所知吸收利用率最高的生物态铁剂, 也可被开发为保健食品、饮料^[5], 同时, 它没有体内铁蓄积中毒及胃肠刺激等不良反应, 且口服无任何毒副作用, 因此其受到了国内外学者的广泛重视。国内大量临床和动物试验表明, 氯化高铁血红素的抗贫血效果优于硫酸亚铁和富马酸亚铁, 且并未见毒副反应报道。

目前氯化高铁血红素的检测方法主要有紫外光谱法、荧光法、极谱法、紫外分光光度法、电极法、流动注射化学发光法等^[6-12], 以上方法都存在着操作步骤繁琐、检测时间长或误差大等问题, 且我国目前也尚无测定食品营养强化剂氯化高铁血红素含量的相关国家标准和行业标准。本研究利用高效液相色谱仪(high performance chromatography, HPLC)与二极管阵列检测器测定营养强化剂氯化高铁血红素的含量, 以期为提高氯高铁血红素质, 保障消费者的身体健康提供技术支持。

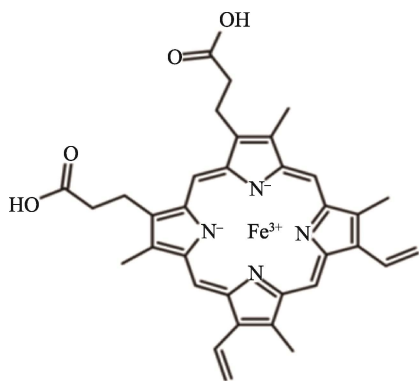


图 1 氯化高铁血红素结构图

Fig. 1 Chemical structure of hemin

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

氯化高铁血红素标准物质(hemin)(纯度 $\geq 97\%$, 美国

Sigma 化学公司); 氯化高铁血红素样品(湖南益旺生物科技有限公司、上海鸿儒科技发展有限公司、海宁和田龙生物科技有限公司等); 甲醇、乙酸(色谱级, 美国 Thermo Fisher 公司); 氢氧化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 超纯水(美国 millipore 公司)。

Waters Alliance e2695 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司); BT124S 电子天平(美国 Sartorius 公司); FD 23 型干燥箱(德国 Binder 公司); Multi Reax 涡旋振荡器(德国 Heidolph 公司); 3-18K 型高速离心机(美国 Sigma 公司); 孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的微孔有机相和水相滤膜(天津津腾实验设备有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

精密称取经 $105\ ^\circ\text{C}$ 干燥至恒重的试样 $20\ \text{mg}$ (精确到 $0.1\ \text{mg}$), 加入 $30\ \text{mL}\ 0.1\ \text{mol/L}$ 氢氧化钠溶液, 超声 $20\ \text{min}$ 溶解提取, 用 $0.1\ \text{mol/L}$ 氢氧化钠溶液定容至 $100\ \text{mL}$, $10000\ \text{r/min}$ 高速离心 $5\ \text{min}$, $0.45\ \mu\text{m}$ 水相滤膜过滤后, 供 HPLC 测定。

2.2.2 仪器分析条件

色谱柱: Agilent TC-C₁₈ 柱($4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$); 流动相: 甲醇: 0.6% 乙酸溶液 ($70:30$, $V:V$); 流速为 $1.0\ \text{mL/min}$; 柱温: $35\ ^\circ\text{C}$; 进样量: $10\ \mu\text{L}$; 检测波长为 $399\ \text{nm}$ 。

2.2.3 标准曲线的配制

标准储备液配制: 称取 $20\ \text{mg}$ (精确到 $0.1\ \text{mg}$) 的氯化高铁血红素标准物质, 用 $0.1\ \text{mol/L}$ 氢氧化钠溶液溶解并定容至 $100\ \text{mL}$, 配成质量浓度为 $200\ \text{mg/L}$ 的氯化高铁血红素标准溶液。该溶液于棕色试剂瓶中 $0\sim 4\ ^\circ\text{C}$ 避光保存, 有效期 $2\ \text{d}$ 。

3 结果与分析

3.1 方法学考察

3.1.1 线性方程和相关系数

分别准确吸取 2.00 、 3.00 、 4.00 、 5.00 、 6.00 、 $7.00\ \text{mL}$ 氯化高铁血红素标准溶液($200\ \text{mg/L}$)于 $10\ \text{mL}$ 棕色容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 配制成 40 、 60 、 80 、 100 、 120 、 $140\ \text{mg/L}$ 的标准工作溶液, 临用时配制。在选定的色谱条件下进行测定, 以标准工作溶液被测组分峰面积为纵坐标, 以标准工作溶液被测组分浓度为横坐标作线性回归曲线。在 $40\sim 140\ \text{mg/L}$ 质量浓度范围内, 得到氯化高铁血红素标准曲线回归方程 $Y=1.21\times 10^5 X+9.02\times 10^5$, 线性相关系数 r 为 0.9993 。相关标准品色谱图、氯化高铁血红素样品色谱图和标准曲线图见图 2、3、4。

3.1.2 重复性实验

以市售的 7 份氯化高铁血红素试样作为样品, 采用 2.2.1 中提供的方法对其进行前处理并上机进行重现性实

验。结果表明,试样中氯化高铁血红素的含量均在 90%~99% 范围内,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 1.38%,其方法精密度符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[13]中的要求,相关数据见表 1。

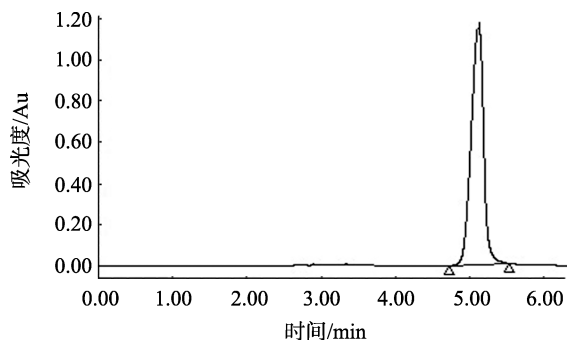


图2 氯化血红素标准品(100 mg/L)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of hemin standard solution (100 mg/L)

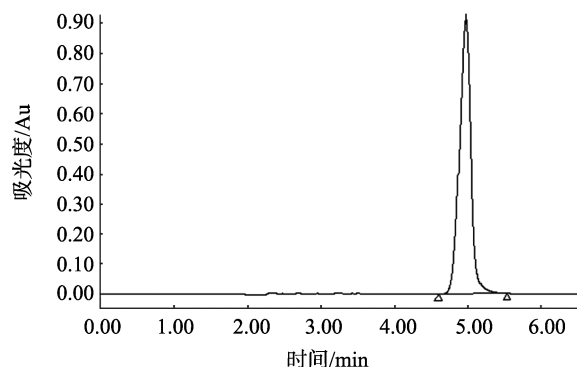


图3 氯化血红素样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of hemin sample

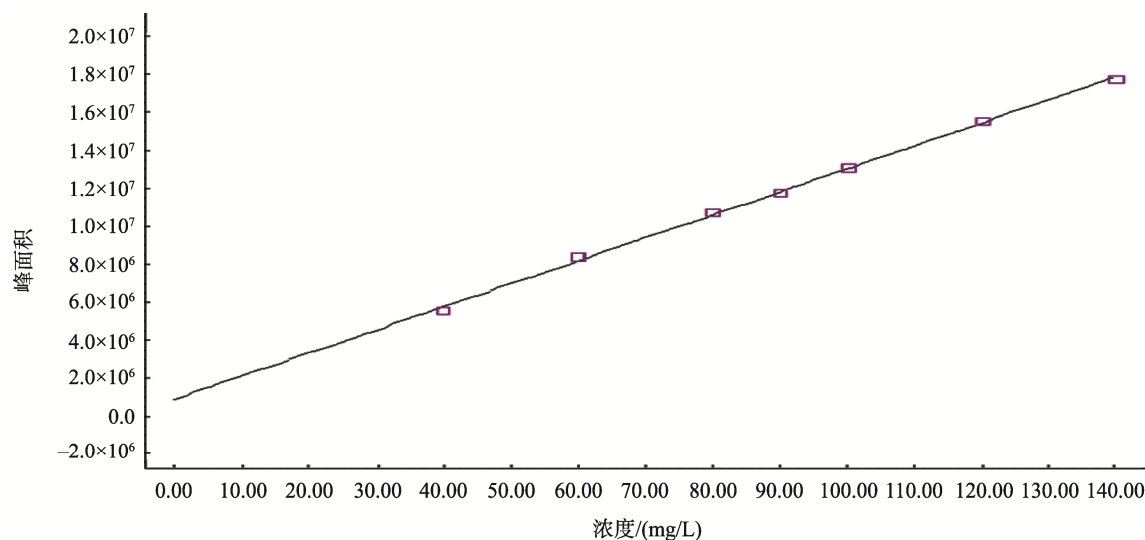


图4 氯化高铁血红素标准曲线

Fig. 4 Standard curve of hemin

3.1.3 稳定性实验

因为氯化高铁血红素在稀碱溶液内稳定性差,采用 2.2.3 的方法对氯化高铁血红素标准储备液进行配制及储存,分别于 0、4、8、12、24、36、48、72 h 进行上机测试,从而考察氯化高铁血红素标准储备液的稳定性,结果如图 5 所示,氯化高铁血红素标准储备液有效期以 2 d 为宜。

3.2 分析条件的优化

3.2.1 检测波长的确定

通过二极管阵列检测器在 200~500 nm 波长范围内进行全扫描^[14],发现 399 nm 为特征波长,且响应值及检测灵敏度较高,杂峰少,因此实验最终采用 399 nm 作为氯化高铁血红素的检测波长^[15]。

3.2.2 提取溶剂的选择

查阅文献,氯化高铁血红素具有碱溶性,溶于稀氨水和氢氧化钠水溶液,也溶于四氢呋喃,不溶于稀酸、水,难溶于乙醇^[1],在甲醇、乙腈中也不容易溶解,故我们首先考虑用碱溶液和四氢呋喃溶解氯化高铁血红素,因为氯化高铁血红素样品纯度高,加入四氢呋喃溶解不完全,则再用不同浓度的 NaOH 溶液以及氨水溶液进行考察,浓度太高的碱液易使样品降解为不可逆转的其他物质^[15],且会对色谱柱有损伤,故最后选择 0.1 mol/L 的 NaOH 作为最佳溶剂^[16]。

3.2.3 测定条件的选择和优化

本研究首先选用常用的甲醇-水作为流动相,同时考虑用乙酸调节含水相的 pH 值来抑制弱碱的离解,改变其保留行为。本实验比较了不同浓度的乙酸,同时我们还采用其他常用有机溶剂作为流动相进行测试(如乙腈、四氢呋

表 1 氯化高铁血红素样品的含量测定结果(*n*=10)
Table 1 Determination results of hemin (*n*=10)

编号	1	2	3	4	5	6	7	
试样来源	海宁和龙	上海鸿儒	湖南益旺	上海鸿儒	上海鸿儒	上海鸿儒	上海鸿儒	
实测值 /%	1	95.3	90.6	98.6	97.2	98.3	94.4	95.4
	2	99.1	90.9	94.2	97.0	97.6	92.2	98.6
	3	94.9	93.1	98.0	96.7	95.2	94.2	97.0
	4	97.3	91.5	96.4	95.4	97.9	94	98.1
	5	94.6	90.6	97.0	95.7	96.8	91.7	96.2
	6	96.2	92.2	95.6	97.0	97.4	95.7	96.0
	7	97.0	91.0	94.9	94.9	98.0	92.9	97.1
	8	96.9	90.4	96.4	95.6	98.1	94.2	96.6
	9	96.4	91.3	96.8	96.3	97.6	94.6	95.9
	10	95.8	91.0	95.1	96.0	96.5	92.2	97.3
平均值/%	96.4	91.3	96.2	96.2	97.3	93.3	96.8	
RSD/%	1.37	0.91	1.23	0.81	0.97	1.38	1.04	
试样标称含量/%	98.0	90.0	95.8	95.6	98.3	96.5	96.3	

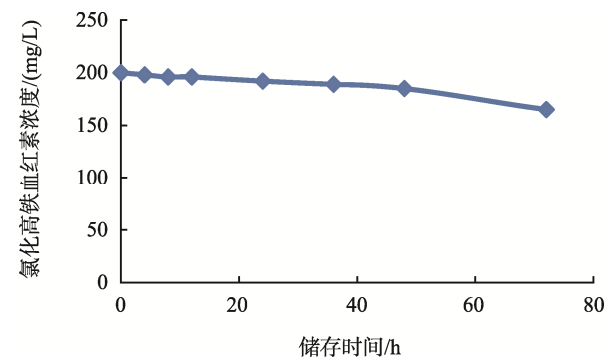


图 5 氯化高铁血红素标准储备液稳定性试验
Fig. 5 Stability test of hemin standard solution

喃等), 最终结果显示甲醇的峰形最为理想, 所以最终选用甲醇-0.6%乙酸做为流动相。另经不同色谱柱的分析筛选后, 考察其色谱行为, 最终选用 Agilent TC-C₁₈柱为色谱柱, 分离效果好, 且峰形理想, 氯化高铁血红素在甲醇:0.6%乙酸 (70:30, *V:V*)时, 7 min 内完成分析。

4 结 论

由于目前国内相关企业主要采用紫外分光光度法、极谱法、电极法、流动注射化学发光法等对氯化高铁血红素进行检测, 操作比较繁琐, 检测时间长, 加上我国目前尚无控制食品营养强化剂氯化高铁血红素产品品质的国家标准和行业标准, 相关食品安全管理方面处于空白, 本研究采用高效液相色谱与二极管阵列检测器测定营养强化剂氯化高铁血红素的含量, 通过对不同提取溶剂的选择以及高效

液相色谱条件的优化, 最终建立准确性好, 灵敏度高, 且操作简单方便的检测方法, 可作为营养强化剂氯化高铁血红素的有效检测方法并广泛应用。

参考文献

[1] 卿德刚, 夏国强, 倪慧, 等. HPLC 测定舒悦胶囊中氯化血红素含量[J]. 新疆中医药, 2005, 23(6): 6-7.
Qing DG, Xia GQ, Ni H, *et al.* Determination of the hemin of Shu Yue capsule by HPLC [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med, 2005, 23(6): 6-7.

[2] 李兴春. 氯化血红素的性质和检测方法[J]. 中国生化药物杂志, 1993, 66(4): 58-59.
Li XC. The properties and detection methods of hemin [J]. Chin J Biochem Pharm, 1993, 66(4): 58-59.

[3] 袁羲, 洪清, 陈樱. 紫外分光光度法测定氯化血红素口服液含量[J]. 中国药房, 1996, 5(6): 36-37.
Yuan X, Hong Q, Chen Y. Determination of hemin oral liquid by ultraviolet spectrophotometry [J]. China Pharm, 1996, 5(6): 36-37.

[4] 霍仕霞, 闫明, 黄毅, 等. HPLC 法测定氯化血红素片剂的含量[J]. 分析试验室, 2008, (27): 227-229.
Huo SX, Yan M, Huang Y, *et al.* Determination of the hemin of hemin tablet by HPLC [J]. Chin J Anal Lab, 2008, (27): 227-229.

[5] 胡曙光, 龙朝阳, 梁旭霞, 等. 高效液相色谱法测定食品中氯化血红素含量[J]. 华南预防医学, 2012, 1(38): 73-77.
Hu SG, Long ZY, Liang XX, *et al.* Determination of the hemin of food by high performance chromatography [J]. South Chin J Prev Med, 2012, 1(38): 73-77.

[6] 何云华, 聂峰. 流动注射化学发光法测定氯化血红素[J]. 分析试验室, 2008, 27(7): 39-41.
He YH, Nie F. Determination of the hemin by flow-injection

- chemiluminescence [J]. Chin J Anal Lab, 2008, 27(7): 39–41.
- [7] 苏冰, 王友联, 张枢. 一种适于多肽复合物分析的血红素测定方法[J]. 食品与药品, 2011, 13(3): 117–119.
- Su B, Wang YL, Zhang S. Method of hemin determination for peptide complex analysis [J]. Food Drug, 2011, 13(3): 117–119.
- [8] 马志科, 管林森. 血红素的应用与提取方法[J]. 动物医学进展, 2010, 31(9): 112–114.
- Ma ZK, Zan LS. Application and extraction method of hemin [J]. Prog Vet Med, 2010, 31(9): 112–114.
- [9] 李敏康, 钱冬明, 李红心. 提取氯化血红素新工艺的研究[J]. 食品科技, 2005, (12): 51–53.
- Li MK, Qian DM, Li HX. Study on the new technology for extracting hemin [J]. Food Sci Technol, 2005, (12): 51–53.
- [10] 汪学荣, 王飞. 生物态补铁剂—血红素铁研究进展[J]. 粮食与油脂, 2007, (4): 40–43.
- Wang XR, Wang F. Biology iron supplement-heme iron and its progress [J]. Cereal Oil, 2007, (4): 40–43.
- [11] 徐秦峰, 张敏, 薛冰纯, 等. 化学发光法研究氯化血红素的光解行为及其含量测定[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 11(24): 257–258.
- Xu QF, Zhang M, Xue BC, *et al.* Study on photolysis behavior and content determination of hemin by chemiluminescence [J]. Spectrosc Spectr Anal, 2004, 11(24): 257–258.
- [12] 袁曦, 林功舟, 陈鼎, 等. 复方氯化血红素胶囊中氯化血红素和 β -胡萝卜素含量测定 [J]. 中国药品标准, 2002, 4(3): 34–36.
- Yuan X, Lin GZ, Chen D, *et al.* Quantitative determination of hemin and β -carotene in the compound hemin capsule [J]. Drug Stand Chin, 2002, 4(3): 34–36.
- [13] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
- GB/T 27404-2008 Laboratory quality control specifications-Food physical and chemical testing [S].
- [14] 王君, 陈红亮, 张向东, 等. 氯化血红素提取新工艺的研究[J]. 当代化工, 2001, 30(3): 125–127.
- Wang J, Chen HL, Zhang XD, *et al.* Study on a new process for extraction of hemin [J]. Contemp Chem Ind, 2001, 30(3): 125–127.
- [15] 张锦荣. 富血口服液中铁含量测定[J]. 海峡药学, 2017, 29(9): 64–66.
- Zhang JR. Determination of hemin iron content in rich blood oral liquid [J]. Strait Pharm J, 2017, 29(9): 64–66.
- [16] 戎晓娟, 唐明清, 贺金华, 等. 反相高效液相色谱法测定氯高铁血红素的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 274–277.
- Rong XJ, Tang MQ, He JH, *et al.* RP-HPLC determination of related substances of hemin [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(2): 274–277.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



钟 钰, 本科, 工程师, 主要研究方向为食品理化检测。

E-mail: 22538570@qq.com