

高效液相色谱法测定保健食品多维康胶囊中叶酸的含量

姚 瑛, 付 晖, 李 群, 高 春*

(北京市药品检验所, 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室,
中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定多维康胶囊中叶酸含量的方法。**方法** 采用 C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以磷酸二氢钾-甲醇溶液为流动相, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL。**结果** 叶酸的线性关系良好, 相关系数为 1.000; 方法检出限为 0.034 μg/mL, 定量限为 0.091 μg/mL; 方法平均加标回收率为 98.80%~104.17%, 平均相对标准偏差为 0.02%。**结论** 该方法操作简单, 灵敏度高, 可作为保健食品多维康胶囊中叶酸的测定方法。

关键词: 叶酸; 保健食品; 多维康胶囊; 高效液相色谱法

Determination of folic acid in health food Duoweikang capsule by high-performance liquid chromatography

YAO Ying, FU Hui, LI Qun, GAO Chun*

(NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of folic acid in Duoweikang capsules by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with potassium dihydrogen phosphate methanol solution as mobile phase, the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear relationship of folic acid was good, the correlation coefficient was 1.000; the limit of detection was 0.034 μg/mL, the limit of quantitation was 0.091 μg/mL; the average recoveries were 98.80%-104.17%, and the average relative standard deviation was 0.02%. **Conclusion** The method is simple, sensitive and can be used for the determination of folic acid in Duoweikang capsules.

KEY WORDS: folic acid; health food; Duoweikang capsules; high-performance liquid chromatography

0 引言

叶酸, 化学名为蝶酰谷氨酸, 是一种重要的 B 族维生素。叶酸是机体细胞生长和繁殖所必须的物质, 参与红细

胞的生长和成熟, 是机体造血不可缺少的物质^[1]; 参与蛋白质代谢^[2]、脱氧核糖核酸甲基化^[3]。研究表明, 叶酸缺乏可导致婴儿畸形^[4]、心血管疾病、老年痴呆等疾病的发病率增高^[5]。补充叶酸除了能够有效减少上述疾病外, 还有

*通信作者: 高春, 主任药师, 主要研究方向为药品、保健食品质量与标准的研究。E-mail: adire@163.com

*Corresponding author: GAO Chun, Chief Pharmacist, Beijing Institute for Drug Control, No.25, Shengming Kexue Yuan, Shengming Road, Changping District, Beijing 102206, China. E-mail: adire@163.com

提高男性生育率, 增强记忆力, 预防硝酸甘油耐药性等功效^[6]。因此, 叶酸经常被添加入营养强化食品、保健食品中。据调查, 市面在售的营养补充剂的配方中几乎都含有叶酸^[7-8]。准确测定叶酸含量对产品的生产加工、功效评价等具有重要意义。有关叶酸分析方法的报道主要有微生物法^[9]、高效液相色谱法^[10]、电化学法^[11]、酶联免疫吸附法^[12]、同位素放射免疫法^[13]。微生物法是国家标准方法, 以其经典、准确、可靠成为许多国际标准检验机构的标准方法或第一法^[9,14-15], 保健食品中叶酸含量的国家标准方法就是微生物法。但是, 该方法对实验环境要求高, 操作繁琐, 易受广泛使用的抗生素影响, 专属性与准确度不佳。电化学法、酶联免疫吸附法与同位素放射免疫法对实验条件与耗材要求较高。高效液相色谱法作为在分析化学领域最常见的方法, 方法的可行性最好, 受制剂组分影响, 不同高效液相色谱法适用性与专属性不同。多维康胶囊中组分复杂, 建立一种能适用于测定保健食品多维康胶囊中叶酸含量的方法是必要的。研究采用高效液相色谱法对保健食品多维康胶囊中叶酸含量进行了检测和方法学的研究, 对样品前处理和流动相进行了优化, 对样品采用超声处理以磷酸二氢钾-甲醇溶液为流动相, 以期对多维康胶囊中叶酸含量的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司); C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱(日本资生堂公司); KQ-500 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); SevenCompact 型 pH 计、XA205 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); Millipore-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

叶酸标准品(批号 121K0144, 含量: 99.4%)、甲醇(色谱纯)(德国默克公司); 磷酸二氢钾、氢氧化钾、氨水(分析纯, 国药集团有限公司); 所有实验用水, 如未注明其他要求均指去离子水。

多维康胶囊(批号: 02190827/02200323/02200509, 规格: 500 mg, 山东禹王制药有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: 资生堂 C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸二氢钾 6.8 g 与 0.1 mol/L 氢氧化钾溶液 70 mL, 用水稀释至 850 mL, 调 pH 值至 6.3, 加甲醇 80 mL, 用水稀释至 1000 mL; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样体积: 10 μL。

1.2.2 标准品溶液的制备

精密称取叶酸标准品适量, 用 0.5%氨水溶液溶解,

配制成质量浓度约 300 μg/mL 的储备液。精密量取储备液 3 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 配制成叶酸质量浓度约 9 μg/mL 的标准品溶液。精密称取叶酸标准品 7.46、11.12、14.89、19.03、22.71 mg, 分别置于 50 mL 容量瓶中, 加 0.5%氨水溶液溶解, 并稀释至刻度, 摇匀; 再精密量取 3 mL 溶液, 置于 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度摇匀, 获得含制剂标示量浓度叶酸 50%、75%、100%、125%、150%的线性标准品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备

取多维康胶囊 20 粒, 精密称定, 精密称取内容物粉末适量(约相当于叶酸 225 μg), 置于 25 mL 容量瓶中, 加入 0.5%氨水溶液 15 mL, 超声处理(1000 W, 40 kHz)20 min, 并时时振摇使叶酸溶解, 放冷, 加水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 方法的优化

2.1.1 色谱条件的优化

本研究分别对流动相比比例、流动相 pH、色谱柱型号、流速、柱温、进样器温度与进样体积等参数进行优化, 结果显示以磷酸二氢钾-甲醇溶液为流动相, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL 为色谱条件, 叶酸色谱峰与其他组分的分离度良好, 峰形对称、保留时间约为 8 分钟。分别取标准品溶液、供试品溶液和空白溶液进样分析, 结果显示, 样品中辅料和其他成分不会干扰叶酸的测定, 结果见图 1。

2.1.2 检测波长的选择

根据主成分在流动相中的紫外吸收谱图来确定检测波长。叶酸在 254 nm 处有最大吸收, 故选择 254 nm 作为检测波长。

2.1.3 提取方法的选择

叶酸在偏碱性溶液中溶解度良好且组分稳定, 而其它水溶性维生素则在偏酸性溶液中稳定。为避免其它水溶性维生素的干扰, 选择用氨水溶液配制偏碱性溶液溶解样品, 提取待测组分叶酸。本研究比较了不同浓度的氨水溶液的提取能力, 结果显示用 0.5%氨水溶液提取时可以将待测成分提取完全; 比较了不同超声提取时间对提取结果的影响, 结果显示超声时间为 20 min 时, 待测成分基本溶解完全; 叶酸对光较敏感, 本研究均采用避光操作, 并且采用棕色量瓶和液相进样小瓶。综上, 采用 0.5%氨水溶液作为提取溶液, 超声 20 min 并且避光操作作为提取方法。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系考察及检测限、定量限

分别精密吸取 1.2.2 项下各浓度线性标准品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 以峰面积 Y 为纵坐标, 质量浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标作标准曲线。曲线

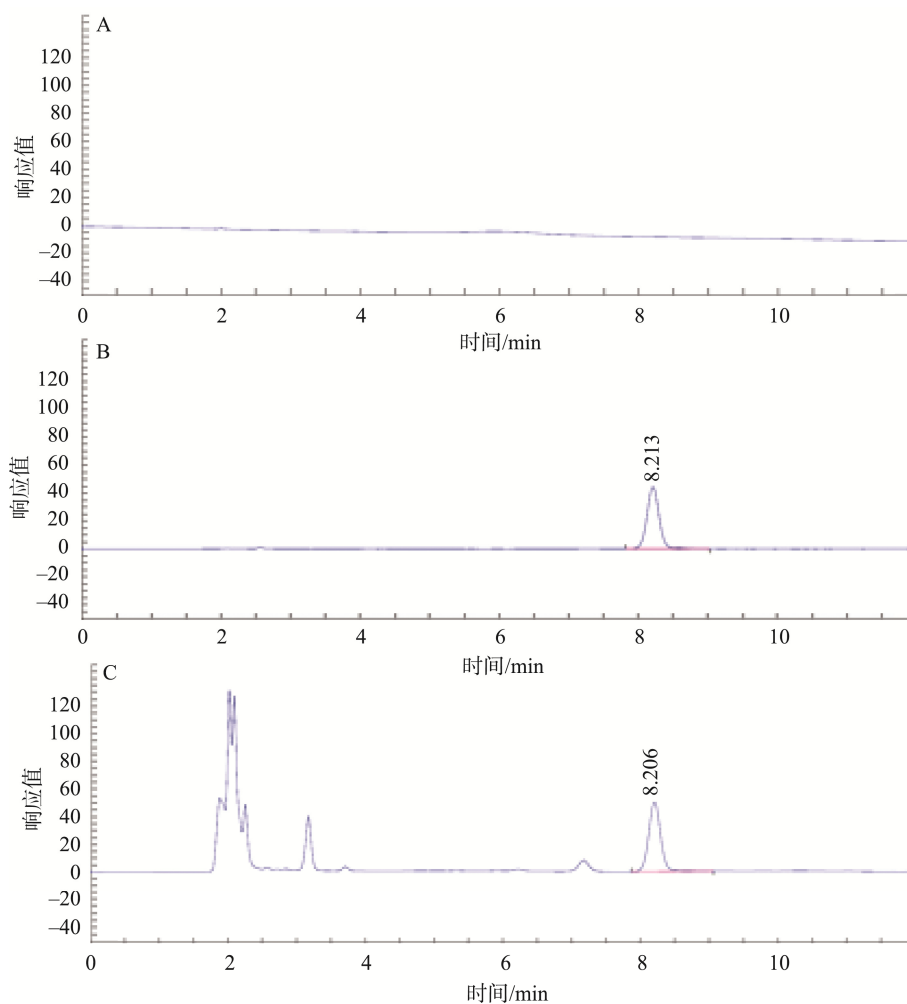


图 1 空白溶液(A)、叶酸标准品溶液(B)和供试品溶液(C)的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of blank solution(A), folic acid reference solution(B), and analytical sample solution(C)

回归方程为 $Y=11.431X-0.8778$, 线性相关系数为 1.000, 方法线性关系好。将标准品溶液逐级稀释后, 以信噪比(S/N)为 3.0 时的质量浓度 $0.034 \mu\text{g/mL}$ 为检出限(limit of detection, LOD), S/N 为 10.0 时的质量浓度 $0.091 \mu\text{g/mL}$ 为定量限(limit of quantitation, LOQ), 可知方法灵敏度较高。

2.2.2 精密度实验结果

取叶酸标准品溶液连续进样 6 次, 计算得到叶酸色谱峰峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)($n=6$)为 0.02%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.3 重复性实验结果

对样品独立制备供试品溶液 6 份, 分别进样分析, 计算得到叶酸的含量测定结果为 $85.29 \mu\text{g/粒}$, RSD($n=6$)为 2.50%, 结果见表 1, 说明方法的重复性良好。

2.2.4 加样回收实验结果

精密称取叶酸标准品及样品, 按照“1.2.3”项下方法操作, 制成含处方叶酸量的 80%、100%、120% 3 个浓度, 进行加样回收实验, 每个浓度制备 3 份, 共 9 份供试溶液。

结果见表 2。方法平均加标回收率为 98.80%~104.17%, 方法回收率良好。平均相对标准偏差为 0.02%, 方法精密度较高。

表 1 重复性试验结果
Table 1 Results of repetition

	1	2	3	4	5	6
取样量/g	1.2688	1.2706	1.2746	1.2748	1.2747	1.2762
结果/ $(\mu\text{g/粒})$	83.71	83.73	83.00	86.55	86.34	88.42
平均结果/ $(\mu\text{g/粒})$	85.29					
RSD/%	2.50					

3 结论

叶酸作为人体所需的重要营养成分, 市面在售的营养补充剂的配方中几乎都含有叶酸。行业内对叶酸含量的

主要测定方法是微生物法, 但微生物法对实验环境要求高, 操作繁琐, 易受广泛使用的抗生素影响, 专属性与准确度不佳。因此, 本研究建立了高效液相色谱法测定多维康胶

囊中叶酸含量的方法。结果表明建立的分析方法准确、可靠, 适合于多维康胶囊中叶酸的准确测定, 可为多维康胶囊的质量控制提供参考。

表2 加样回收率实验结果
Table 2 Results of recovery test

序号	相当标示量百分含量/%	样品细粉加入量/g	供试品溶液叶酸测得量/ μg	叶酸标准品加入量/mg	叶酸测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%
本底 1	/	0.5019	89.04	/	/	/	/
1	80	0.6254	188.5	6.97	7.76	111.3	104.17
2	80	0.6274	180.9	6.97	6.96	99.9	
3	80	0.6238	181.3	6.97	7.06	101.3	
4	100	0.6285	229.1	11.67	11.76	100.8	
5	100	0.6230	228.8	11.67	11.83	101.4	103.77
6	100	0.6249	238.1	11.67	12.73	109.1	
7	120	0.6284	264.6	16.02	15.31	95.6	
8	120	0.6293	280.9	16.02	16.93	105.7	98.80
9	120	0.6277	263.8	16.02	15.24	95.1	

参考文献

- CHEONG M, HUANG YX, TAY V, *et al.* Folic acid fortified milk increases blood folate to concentrations associated with a very low risk of neural tube defects in Singaporean women of childbearing age [J]. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 2016, 25(1): 62-70.
- 石若夫. 叶酸与蛋白质合成[J]. *生命科学*, 2007, (3): 330-332.
SHI RF. Folic acid and protein synthesis [J]. *Bioscience*, 2007, (3): 330-332.
- 曹能, 李璋. 叶酸在人体内作用的研究进展[J]. *生物学通报*, 2003, 38(2): 20-22.
CAO N, LI Z. The research progress of folic acid in human body [J]. *Bull Biol*, 2003, 38(2): 20-22.
- 张嵩, 段涛. 叶酸的母胎保护作用[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2013, 29(12): 993-995.
ZHANG A, DUAN T. Protective effect of folic acid on mother-fetus [J]. *Chin J Pract Gynecol Obstet*, 2013, 29(12): 993-995.
- 李梁蜜, 方芳, 曹文英, 等. 血浆同型半胱氨酸水平与老年痴呆的关系及叶酸, 维生素 B₁₂ 的干预效果研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(1): 49-51.
LI LM, FANG F, CAO WY, *et al.* The relationship between plasma homocysteine levels and Alzheimer's disease and the effects of folic acid and vitamin B₁₂ intervention [J]. *J Clin Med Pract*, 2016, 20(1): 49-51.
- 覃策, 程绪梅. 叶酸片对硝酸甘油耐药性的影响[J]. *医学临床研究*, 2018, 35(6): 1178-1180.
QIN C, CHENG XM. Effects of folic acid tablets on nitroglycerin resistance [J]. *J Clin Res*, 2018, 35(6): 1178-1180.
- 梁栋, 李湖中, 邓陶陶, 等. 我国市售幼儿配方食品中可选择添加成分研究[J]. *中国食品添加剂*, 2017, (6): 81-85.
LIANG D, LI HZ, DENG TT, *et al.* Study on optional additives in formula foods for infants on the market in my country [J]. *Chin Food Addit*, 2017, (6): 81-85.
- 吴菲. 关于叶酸, 你知道的和不知道的[J]. *健康与营养*, 2016, (5): 50-52.
WU F. What you know and don't know about folic acid? [J]. *Health Nutr*, 2016, (5): 50-52.
- 徐文婕, 曲全冈, 刘建蒙. 微生物法检测血浆叶酸实验方法评价及应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(7): 140-142.
XU WJ, QU QG, LIU JM. Evaluation and application of experimental methods for detecting plasma folic acid by microbiological method [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(7): 140-142.
- 刘树彬, 杨更亮, 尹俊发, 等. 反相高效液相色谱法测定叶酸及其相关物质[J]. *分析实验室*, 2004, 23(11): 33-35.
LIU SB, YANG GL, YIN JF, *et al.* Determination of folic acid and related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Anal Lab*, 2004, 23(11): 33-35.
- 姚伟, 刘爱胜, 房笃智. 电化学发光分析仪检测贫血指标的方法学性能验证[J]. *中国医学装备*, 2016, (1): 74-77.
YAO W, LIU AS, FANG DZ. Methodological performance verification of electrochemiluminescence analyzer for detecting anemia indicators [J]. *Chin Med Equip*, 2016, (1): 74-77.
- 杨娜, 王琳琳, 袁悦, 等. 酶联免疫吸附试验检测人叶酸受体抗体 IgM 方法的建立及评价[J]. *中国医学科学院学报*, 2014, 36(4): 410-414.
YANG N, WANG LL, YUAN Y, *et al.* Establishment and evaluation of

(责任编辑: 韩晓红)

enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human folate receptor antibody IgM [J]. J Chin Acad Med Sci, 2014, 36(4): 410-414.

- [13] 石丹, 贾云虹, 包怡红, 等. 叶酸检测方法的研究现状及发展趋势[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(3): 42-45.

SHI D, JIA YH, BAO YH, *et al.* Research status and development trend of folic acid detection methods [J]. China Dairy Ind, 2009, 37(3): 42-45.

- [14] 田浩, 王志伟, 顾文佳, 等. 微生物法测定食品中叶酸、泛酸、生物素、维生素 B₁₂ 注意事项和实践[J]. 中国标准化, 2018, 529(17): 128-131.

TIAN H, WANG ZW, GU WJ, *et al.* Precautions and practice for the determination of folic acid, pantothenic acid, biotin and vitamin B₁₂ in food by microbiological method [J]. China Stand, 2018, 529(17): 128-131.

- [15] GB 5009.211—2014 食品安全国家标准食品中叶酸的测定[S].

GB 5009.211—2014 National food safety standard-Determination of folic acid in food [S].

作者简介



姚 瑛, 主管药师, 主要研究方向为药品、保健食品检验技术及质量与标准研究。
E-mail: 13910765086@163.com



高 春, 主任药师, 主要研究方向为药品、保健食品质量与标准的研究。
E-mail: adire@163.com

“保健食品的研发与检测”专题征稿函

保健食品是指具有特定保健功能或者以补充维生素、矿物质为目的的食品。保健食品亦称功能性食品, 是特定的食品种类, 有调节人体功能的作用。

本刊特别策划了“保健食品的研发与检测”专题, 由北京联合大学 闫文杰副教授 担任专题主编。专题围绕但不限于**保健食品的开发、功能性活性成分提取与检测、新型保健食品研发、功能性食品添加剂、保健食品配料、保健功能性物质(肽与蛋白质、功能性油脂、多糖、微量元素、维生素等)应用、研发与检测**等方面, 或您认为有意义的相关领域开展论述和研究。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员、专题主编闫文杰副教授及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件。研究论文、综述、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划于 2021 年 5~6 月出版, 请您于 2021 年 3 月 31 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明保健食品的研发与检测专题)

E-mail: jfoodsq@126.com(注明保健食品的研发与检测专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部