

不同波长下高效液相色谱检测胭脂红酸的比较研究

郭元亨, 马李一, 郑华, 张弘, 甘瑾, 张忠和

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所/国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南昆明 650224)

摘要:为建立高效液相色谱测定胭脂红酸的方法,通过比较不同配比的流动相,不同流速和温度对出峰效果的影响,发现流动相为甲醇-乙腈-磷酸(0.01%)的混合液(体积比为10:15:75),流速为0.8 mL/min,柱温为20℃时,出峰效果最好。纯度为100%的胭脂红酸作为标准样品,绘制标准曲线,280 nm和494 nm的检测波长下分别得回归方程 $Y=60.7360X$, $R^2=0.9999$; $Y=8.6048X$, $R^2=0.9990$,两者线性关系均良好。以280 nm和494 nm为检测波长,使用纯度为100%的胭脂红酸验证仪器的精密性,自制胭脂虫红色素验证稳定性和加标回收率,测得精密性相对标准偏差分别为0.42%和0.54%,稳定性相对标准偏差分别为0.16%和0.32%,加标回收率分别为96.8%和94.3%。两种检测波长均可用于胭脂红酸的定量分析。

关键词:胭脂红酸; 高效液相色谱; 测定方法

中图分类号:TS202.3;S899.3

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2011)02-0102-04

Study on high performance liquid chromatography determining carminic acid at two wavelength

GUO Yuan-heng, MA Li-yi, ZHENG Hua, ZHANG Hong, GAN Jin, ZHANG Zhong-he

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry/Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Resource Insects, State Forestry Administration, Kunming 650224, China)

Abstract:This study aimed to establish the method on high performance liquid chromatography determining carminic acid. Comparing the different kinds of mobile phase, different flow rate and temperature of the column. The result showed that when mobile phase was consist of acetonitrile, methanol and phosphoric acid (0.01%) (volume ratio 10:15:75), flow rate was 0.8 mL/min, column temperature at 20℃, peak shape was the best. This method used for determined carminic acid both at 280 nm and 494 nm. Carminic acid (purity:100%) was utilized as standard sample, made standard curve, obtained regression equation $Y=8.6048X$, $R^2=0.9990$, and $Y=60.7360X$, $R^2=0.9999$, respectively. Both equation's linear relationship were fine. When determining cochineal red pigment, the result showed that by this method, sample had good stability (determined at 280 nm, $RSD=0.16\%$; at 494 nm, $RSD=0.32\%$), equipment had high precision (determined at 280 nm, $RSD=0.42\%$; at 494 nm, $RSD=0.54\%$) and sample had high recovery rate (determined at 280 nm, recovery rate was 96.8%, at 494 nm was 94.3%). High performance liquid chromatography was an ideal method for carminic acid determination, especially chose the detect wavelength at 280 nm.

Key words:carminic acid; high-performance liquid chromatography; determination method

胭脂虫(*Dactylopius coccus* Costa)是寄生在仙人掌上的资源昆虫,原产于拉丁美洲,我国本无自然分布。21世纪初,中国林业科学研究院资源昆虫研究所成功引进了胭脂虫及其优良寄主印楝仙人掌并在云南省繁育成功^[1-3]。雌性胭脂虫成虫体内含有蒽醌类色素——胭脂红酸(也称洋红酸),其含量约占雌性成虫干体质量的22.96%^[4-5],是一种用途广泛的天然色素,是FDA允许既可用于食品又可用于药品和化妆品的染色剂^[6]。研究表明,胭脂虫红色素除染色功能外,对因致癌物导致的DNA损伤有明显的修复作用,并可用于病毒性疾病(如水疱性口炎、疱疹性口炎等)、癌症和艾滋病的防治^[7-9]。我国引进胭脂虫后,对胭脂虫红色素提取、精制加工进行了较为系统的研

究^[9]。由于商品胭脂虫红色素成分复杂,需寻找一种精准、可靠性强的检测方法,以便有效地检测胭脂虫红色素中胭脂红酸的含量、评估色素质量。

目前,国内外普遍使用分光光度法测定胭脂红酸,其检测波长选择在可见光区494 nm^[16-18]。由于部分在494 nm下有吸收的杂质组分的叠加效应,分光光度法检测样品时易受干扰。随着科学技术的发展,高效液相色谱(HPLC)逐渐被广泛应用于天然产物的测定,相对于分光光度法,HPLC在检测前由于色谱柱的分离作用,能使测定结果更为精准。由于胭脂红酸在紫外光区和可见光区均有明显的吸收峰,本研究拟同时在两个光区的胭脂红酸最大吸收波长下进行HPLC检测,优选HPLC测定胭脂红酸的最佳操作条件,并在此条件下,验证仪器精密性、样品和仪器稳定性,进行加标回收率试验,对两种波长下的检测结果作比较分析,为胭脂红酸测定提供更精准的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2010-05-31

基金项目:科技部成果转化项目(2007GB24320425);国家林业科技成果推广项目([2010]11)

作者简介:郭元亨(1984-),男,在读硕士生,E-mail:gyh2905030235@sina.com

通讯作者:张弘(1963-),男,研究员,E-mail:kmzhong@163.com

试验原料:胭脂虫雌成虫干体引自南美洲,由中国林业科学研究院资源昆虫研究所滇中高原试验站提供;胭脂红酸高纯样品(纯度 100%)为日本三荣源株式会社产品。

主要试剂:甲醇、乙腈,Promptar 公司产品,均为色谱纯;磷酸(分析纯),重庆川江化学试剂厂产品;石油醚(60~90℃,分析纯),天津市致远化学试剂有限公司产品;无水乙醇(分析纯),上海化学试剂总厂生产;纯水(电阻率 18.2 MΩ),实验室自制。

主要仪器:Agilent 1200LC 系统,美国 Agilent 公司产品;SD-1000 喷雾干燥机,日本东京理化株式会社产品;PHS-3C 精密 pH 计,上海精密科学仪器有限公司产品;AB204-S 精密型电子天平,Mettler Toledo 中国有限公司产品;超滤膜,美国 Millipore 公司产品;DU 800 紫外-可见分光光度计,美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 检测波长选择 使用紫外可见分光光度计在 200~800 nm 的范围内对胭脂红酸吸收光谱扫描,依据扫描结果分别在紫外区和可见光区选择最大吸收波长。

1.2.2 操作条件选择 (1)流动相选择:通过分析比较不同的流动相条件下,HPLC 检测胭脂虫红色素中胭脂红酸的出峰效果和分离情况,确定最佳流动相。

(2)流速选择:在最佳流动相条件下,分别比较流速 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL/min 条件下胭脂红酸的出峰效果,确定最佳流速。

(3)柱温选择:在最佳流动相和流速下,比较 15、20、25、30、35℃的柱温下,胭脂红酸的出峰效果,确定最佳柱温。

1.2.3 色谱条件 色谱柱使用 C18 反相柱(4.6 mm×150 mm×5 μm),二极管阵列检测器(DAD 检测器)。检测波长依据紫外可见分光光度计扫描结果,分别选择紫外区和可见光区最大吸收波长。流动相、进样量和柱温依据 1.2.2 的结果确定。所有样品进样前均过 0.45 μm 的针筒式滤膜过滤,Agilent 化学工作站进行数据采集和处理。

1.2.4 标准曲线的绘制 配制浓度依次为 10.06、20.12、30.18、40.24、50.30、60.36、70.42、80.48、90.54、100.60 μg/mL 的胭脂红酸水溶液。并参考卢艳民等^[12-13]的方法制备胭脂虫红色素。在最佳色谱条件下,测定胭脂红酸标准溶液的峰面积,每个样测 3 次,取 3 次测定的平均值。以胭脂红酸标准溶液的浓度为横坐标,在两种检测波长下 HPLC 测得的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,求回归方程。

1.2.5 精密度试验 取 1.2.4 中配制的浓度为 50.30 μg/mL 的高纯度胭脂红酸水溶液,按照 1.2.3 项的色谱条件连续测定 7 次^[19-21],计算两种检测波长下测得的峰面积所对应浓度,以及 7 次实测值之间的 RSD。

1.2.6 稳定性试验 配制浓度为 56 μg/mL 的自制胭

脂虫红色素水溶液,按 1.2.3 项的色谱条件,在两种检测波长下 12 h 内每隔 2 h 测定一次峰面积。计算自制色素样品中胭脂红酸的含量,以及 7 次实测数值之间的 RSD。

1.2.7 加标回收率试验 配制浓度为 35、41、45、50、56 μg/mL 胭脂虫红色素水溶液,依次移取 10 mL 于 5 个 25 mL 的容量瓶中,同时每个容量瓶中各加入 5 mL 的 50.30 μg/mL 标准溶液,纯水定容,摇匀。按 1.2.3 项的色谱条件测定加标样品的峰面积,计算加标样品的回收率。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

在 200~800 nm 范围内对胭脂红酸的吸收光谱扫描,结果见图 1。胭脂红酸在紫外光区最大吸收波长在 280 nm 处,可见光区最大吸收波长在 494 nm 处。为对两个波长的检测效果进行比较,本研究检测波长同时选择 280 nm 和 494 nm。

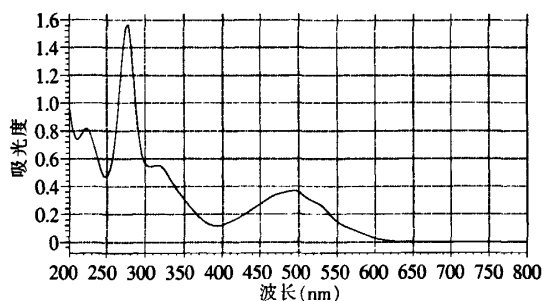


图 1 胭脂红酸的紫外-可见吸收光谱图

2.2 操作条件的确定

2.2.1 流动相选择 流动相是 HPLC 检测样品中操作条件的关键因素,本研究通过比较甲醇、不同配比的甲醇-水(考虑到仪器负荷,水的比例不超过 75%)混合液、甲醇-乙腈混合液、甲醇-乙腈-水混合液以及甲醇-乙腈-磷酸(0.01%)混合液(体积比为 10:15:75)作为流动相,分析 HPLC 检测胭脂红酸的出峰效果。对比发现,以甲醇-乙腈-磷酸的混合液作为流动相时,两个检测波长下的出峰效果最理想,且能够实现色素中胭脂红酸组分与非胭脂红酸组分的分离。

2.2.2 流速选择 在 2.2.1 确定的流动相条件下,比较不同流速对 HPLC 出峰及分离效果的影响,流速大于 0.8 mL/min,出峰时间提前,峰宽变窄,但柱压过大,对色谱柱不益;流速小于 0.8 mL/min,出峰时间延长,且峰形对称性降低;流速为 0.8 mL/min,出峰时间和峰宽适中,柱压合理。

2.2.3 柱温选择 根据反相色谱柱保留时间与温度之间的关系,温度的升高会增加色谱柱柱效,本研究比较柱温对出峰效果和分离效果的影响,发现柱温对两者影响不

大。从温度对出峰效果和色谱柱的影响综合考虑,本研究选择柱温为 20℃。

2.2.4 最佳条件确定 HPLC 测定胭脂红酸的操作条件:流动相为甲醇-乙腈-磷酸(0.01%)混合液(体积比为 10:15:75),流速为 0.8 mL/min,柱温为 20℃。此操作条件下,两种检测波长下胭脂红酸的出峰效果好,峰形对称因子高,能够实现色素中胭脂红酸和非胭脂红酸组分的基线分离,详见图 2、图 3。通过与高纯度胭脂红酸对比,结果显示胭脂红酸的出峰时间均为 11.396 min。

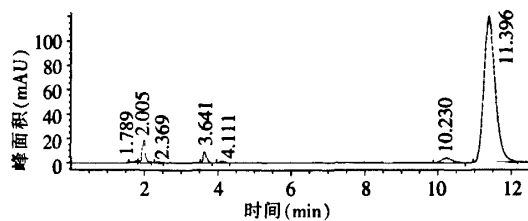


图2 280nm 波长下自制胭脂虫红色素色谱图

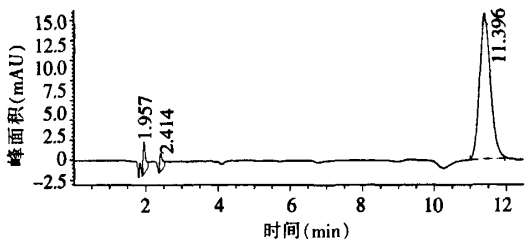


图3 494nm 波长下自制胭脂虫红色素色谱图

2.3 标准曲线的绘制

根据 1.2.4 的方法绘制标准曲线,在 280 nm 的检测波长下,得线性回归方程 $Y=60.7360X, R^2=0.9999$;在 494 nm 的检测波长下,得线性回归方程 $Y=8.6048X, R^2=0.9990$ 。两者均具有良好的线性关系,表明胭脂红酸浓度在 10.06~100.60 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,两个回归方程均可用于对其进行定量分析。

2.4 精密度的试验

连续测定 7 次胭脂红酸标准样品 (50.30 $\mu\text{g/mL}$),比较每次测定数据之间的差异,并计算 7 次测定值之间的相对标准偏差,评估仪器的精密度的,结果见表 1。从表 1 可以看出,以 280 nm 为检测波长,样品浓度的实测值为 49.69 $\mu\text{g/mL}$,7 次测定数据 RSD 为 0.42%;以 494 nm 为检测波长,样品浓度的实测值为 48.68 $\mu\text{g/mL}$,7 次测定数

表 1 胭脂红酸仪器精密度的试验结果

次数	280 nm				494 nm			
	峰面积 (mAU)	实测浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	峰面积 (mAU)	实测浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
1	30182	4969			4187	4866		
2	30206	4973			4199	4880		
3	30103	4956			4171	4847		
4	29997	4939	4969	0.42	4161	4836	4868	0.54
5	30101	4956			4172	4848		
6	30312	4991			4218	4902		
7	30358	4998			4216	4900		

据 RSD 为 0.54%。两种检测波长下的实测值与理论值之间的差异以及测得的数值之间相对标准偏差均在可信范围内,表明在本研究确定的最佳条件下,仪器精密度的可以满足胭脂红酸样品测定要求。

2.5 稳定性试验

为了评估胭脂虫红色素样品及高效液相色谱仪能否在较长的测定时间内保持良好的稳定性,在 12 h 内每隔 2 h 测定一次样品,计算两种检测波长下,7 次测定值之间的相对标准偏差,结果见表 2。从表 2 可以看出,以 280 nm 为检测波长,7 次测定值之间相对标准偏差 RSD 为 0.16%;以 494 nm 为检测波长,7 次测定值之间相对标准偏差 RSD 为 0.32%。两种波长下实测值的 RSD 均在可性范围内,表明在 12 h 之内,胭脂虫红色素样品溶液的稳定性及 HPLC 仪的稳定性均很好,可以满足在 12 h 以内胭脂虫红色素样品的测定要求。

表 2 胭脂红酸测定稳定性试验结果

次数	280 nm				494 nm			
	峰面积 (mAU)	样品中胭脂 红酸含量(%)	平均值 (%)	RSD (%)	峰面积 (mAU)	样品中胭脂 红酸含量(%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	837.5	24.62			116.0	24.07		
2	840.4	24.71			116.2	24.11		
3	838.6	24.66			115.6	23.98		
4	838.6	24.66	24.67	0.16	115.4	23.95	24.06	0.32
5	839.9	24.69			115.9	24.05		
6	840.7	24.72			116.5	24.18		
7	837.3	24.62			116.1	24.09		

2.6 加标回收率试验

对 1.2.7 项中的 5 份加标样品进行回收率试验,样品及标样加入量、加标样品溶液的 HPLC 实测数据详见表 3。由表 3 可以看出,5 份样品中,280 nm 的检测波长下,加标回收率极大值为 101.8%,极小值为

表 3 胭脂红酸加标回收率试验结果

编号	样品加入量 (μg)	标样加入量 (μg)	280 nm				494 nm			
			峰面积 (mAU)	实测量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	峰面积 (mAU)	实测量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	81.9	251.5	722.4	297.4	89.2		99.4	288.8	86.6	
2	95.9	251.5	796.9	328.0	94.4		109.6	318.4	91.6	
3	105.3	251.5	851.5	350.5	98.2	96.8	117.5	341.4	95.7	94.3
4	117.0	251.5	911.7	375.3	101.8		125.8	365.5	99.2	
5	131.0	251.5	932.8	384.0	100.4		129.3	375.7	98.2	

89.2%，平均值为 96.8%；494 nm 的检测波长下，加标回收率极大值为 86.6%，极小值为 99.2%，平均值为 94.3%。两种不同的检测波长下，样品的加标回收率均在可信范围内。

3 结语

本试验结果表明，高效液相色谱检测胭脂红酸的最佳条件为：流动相为甲醇-乙腈-磷酸(0.01%)的混合液(体积比为 10:15:75)，流速为 0.8 mL/min，柱温为 20℃。

在 280 nm 检测波长下，精密度试验结果表明 7 次测定数据相对标准偏差为 0.42%，稳定性试验结果表明 12 h 内 7 次测定数据相对标准偏差为 0.16%，加标回收率为 96.8%。以 494 nm 为检测波长，精密度试验结果表明 7 次测定数据相对标准偏差为 0.54%，稳定性试验结果表明 12 h 内 7 次测定数据相对标准偏差为 0.32%，加标回收率为 94.3%。

精密度、稳定性及回收率试验结果表明，两种检测波长测得数据均在可信范围内。该操作条件可以用于对胭脂红酸的定量分析。

参考文献：

- [1] 张忠和, 杨勋章, 王自力, 等. 胭脂虫实验种群研究[J]. 林业科学研究, 2003, 16(3): 254-261.
- [2] 张忠和, 石雷, 徐涛, 等. 胭脂虫与寄主仙人掌的关系[J]. 林业科学研究, 2004, 17(3): 321-32.
- [3] 张忠和, 陈晓鸣, 石雷, 等. 基于生命表技术的胭脂虫适生性研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(4): 484-489.
- [4] 郑华, 唐莉英, 卢艳民, 等. 胭脂虫虫体主要化学组成分析[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 510-513.
- [5] 郑华, 张弘, 张忠和. 天然动植物色素的特性及其提取技术概况[J]. 林业科学研究, 2003, 16(5): 628-635.
- [6] Mendez A, Gonzalez J, Lobo M, et al. Color Quality of Pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa)[J]. Agric Food Chem, 2004, 52(5): 1331-1337.
- [7] Takahashi E, Marczylo H, Watanabe T, et al. Preventive effects of Anthraquinone Food Pigments on the DNA Damage Induced by Carcinogens in *Drosophila*[J]. Mutat Res, 2001, 1: 139-145.
- [8] Ayuko W O. Use of Quinones in the Treatment of Cancer or AIDS[P]. Europe: 0499467, 1992-08-19.
- [9] 郑华, 张弘, 陈晓鸣. 胭脂虫甲壳素的提取[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 107-109.
- [10] 郑华, 张弘, 甘瑾, 等. 胭脂虫蜡的提取分离及初步精制[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 162-165.
- [11] 张弘, 卢艳民, 郑华, 等. 水溶法提取胭脂虫红色素工艺及优化[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 115-118.
- [12] 卢艳民, 郑华, 张弘, 等. 超声波法提取胭脂虫红色素的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 142-145.
- [13] 卢艳民, 周梅村, 郑华, 等. 超滤膜精制胭脂虫红色素的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 196-198.
- [14] 卢艳民, 郑华, 周梅村, 等. 硅胶柱层析纯化胭脂虫红色素[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(S): 383-385.
- [15] 张弘, 郑华, 陈军, 等. 胭脂虫红色素稳定性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 59-64.
- [16] 凌天庭. 食品添加剂手册(第 3 版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 988.
- [17] 张建云, 李志国, 赵杰军, 等. 胭脂红酸测定方法及稳定性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 321-326.
- [18] González M, Lobo M G, Médez J, et al. Detection of colour adulteration in cochineals by spectrophotometric determination of yellow and red pigment groups [J]. Food Control, 2005, 16: 105-112.
- [19] 李丽丽, 郑礼胜, 刘向前, 等. 新资源短梗五加及其同属植物根皮中紫丁香苷的 HPLC 测定研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(10): 140-143.
- [20] 田洋, 肖蓉, 徐昆龙, 等. 天麻中天麻素 RP-HPLC 测定及提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(10): 77-81.
- [21] 卢苏萍, 杜伟佳, 李建林, 等. 高效液相色谱分析氟蚊踪的含量[J]. 广东农业科学, 2009(8): 244-245.
- [22] 刘胜辉, 臧小平, 魏长宾, 等. 高效液相色谱法测定台农 19 号菠萝糖分[J]. 广东农业科学, 2008(12): 133-135.

沈阳农业大学 2010 年柞蚕功能基因组研究取得丰硕成果

沈阳农业大学生物科学技术学院刘彦群副教授及其研究团队在柞蚕功能基因组研究领域取得丰硕成果, 2010 年共克隆了 7 个柞蚕功能基因, 发表了 6 篇 SCI 论文。这些研究成果的取得, 表明沈阳农业大学在昆虫功能基因组研究领域已与国内外同类研究处于同一水平, 并且在柞蚕功能基因组研究上形成了自己的研究特色。

2009 年, 研究组成功构建了国内第一个柞蚕全长 cDNA 文库, 并借助基因表达序列标签(EST)技术完成了 3 个功能基因的克隆。2010 年, 在研究团队各位成员的共同努力下, 又完成了 7 个重要功能基因的克隆与表达模式分析, 包括烯醇化酶 I 和烯醇化酶 II 基因

(Acta Biochimica et Biophysica Sinica; 42, 816-826)、溶血磷脂酶基因 (Annals of the Entomological Society of America; 103, 647-653)、肌动蛋白基因 (African Journal of Agricultural Research; 5, 1095-1100)、异常翅节蛋白基因 (African Journal of Biotechnology; 9, 7372-7378) 肌球蛋白轻链 2 基因 (Biochemical Systematics and Ecology; doi: 10.1016/l.bse.2010.09.006)、长寿基因 (Molecular Biology Reports; doi: 10.1007/s11033-010-0495-2)。其中, 烯醇化酶 II 基因是该研究组首次从生物体中鉴定并命名的, 该基因可能与鳞翅目昆虫的生殖有关。